T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA İLİNDE PAZARLARDA AÇIKTA SATILAN KÜFLÜ PEYNİRLERDE ENTEROHEMORAJIK *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 SUŞUNUN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan

Eda AKÇAMLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Uçkun Sait UÇAN

KONYA-2008

ÖNSÖZ

Türkiye'de onlarca çeşit peynir üretilmektedir. Konya'da halk tarafından üretilen *küflü peynir* de bunlardan birisidir. Bu ürünün, ulusal ve hatta uluslar arası düzeyde tüketime girebilmesi için ürünle ilgili standartların belirlenmesi gerekmektedir. Buna yönelik üretim ve üretim sonrası şartlarının etkisini teknolojik ve hijyenik açılardan ele alan çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılan az sayıda çalışmada küflü peynirlerin çeşitli üretim ve mikrobiyolojik kalitesine yönelik bilgiler mevcuttur. Ancak *E. coli* O157:H7'nin varlığına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, Konya ilinde satışa sunulan küflü peynirlerde *E. coli* O157:H7'nin varlığını araştırmak ve küflü peynirin bir halk sağlığı problemi kaynağı olup olmadığını belirlemektir.

Fakültede gerekli olan eğitim; uygun çalışma ortamını sağlayan ve Yüksek Lisans eğitimim süresince her zaman teorik ve pratik bilgi ve deneyimlerini aktararak yetişmeme katkıda bulunan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Uçkun Sait UÇAN'a, besin hijyeni laboratuarında çalışmamı sağlayan Doç.Dr. Ahmet GÜNER'e; Bilgi ve deneyimlerinden faydalanma imkânı sağlayan Bölüm Başkanımız sayın Prof. Dr. Mehmet ATEŞ'e, Prof. Dr. Osman ERGANİŞ, Egitimim sırasında hep yanımda oldugunu hissettiren, her konuda bana yol gösteren, yardımcı olan, yakın ilgisi ile beni her zaman tesvik ve motive eden sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ'ye ve her zaman destek ve ilgilerini esirgemeyen Araştırma görevlilerimiz Zafer SAYIN ve Kürşat KAV'a, tüm çalısmalarım süresince her türlü yardımını gördüğüm yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÇİZELGE LİSTESİ iii
ŞEKİL LİSTESİ iv
SİMGE VE KISALTMALAR v

1. GİRİŞ 1
   1.1. Tarihçe 2
   1.2 . Etiyoloji 6
   1.3. Epidemiyoloji 7
   1.4. Patojenite 10
   1.5. İzolasyon ve İdentifikasyonu 12
   1.5.1. Klasik Yöntemler 12
   1.5.2. Gelişmiş ve Hızlı Testler 17

2. GEREÇ VE YÖNTEM 22
   2.1. Gereç 22
   2.2. Yöntem 28

3. BULGULAR 32
4. TARTIŞMA 37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 42
6. ÖZET 44
7. SUMMARY 45
8. KAYNAKLAR 46
9. EKLER 51
   EK.1. Stomacher Torbasında Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) ile Küflü Peynire Ait Önzenginleştirilmiş Besiyeri 51
   . EK.2. 4-methylumbelliferyl-b-Dglucuronide. (MUG) içeren Lauryl Sulphate .... Tryptose Broth (LSTB) Her tüpe 1 ml olacak şekilde tüplerdeki görünümü 51
   . EK.3. Sorbitol MacConkey Agarda E.coliO157:H7' nin görünümü 52
   . EK.4. Brillant Green Bile Broth gaz teşekül eden tüpler 52
   . EK.5. İndol pozitif ve negatif suşlar 53
   . EK.6. Üreaz pozitif ve nagatif suş 53
   . EK.7. Clark –Lubs Besiyeri**,** Voges Proskauer (VP) pozitif ve negatif suş 53
   . EK.8. Metil Red (MR) pozitif ve negatif suş 53
   . EK.9. Konya'nın Bozkır pazarında tezgahlarda satışa sunulan küflü peynirlerden görünümler 54
   . EK.10. Konya'nın Ilgın pazarında tezgahlarda satışa sunulan küflü peynirlerden görünümler 54
10. ÖZ GEÇMİŞ 55

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1. Konya ilinde izole edilen göre *Escherichia coli* suşlarının ilçelere göre dağılımı 33
Çizelge 3.2.Araştırmaya katılan küflü peynir satıcılarına ait tezgahların çeşitli özellikleri 33
Çizelge 3.3. Küflü Peynirlerdeki mikrobiyal kontaminasyon 34
Çizelge 3.4. Küflü Peynir numunelerinden izole edilen şüpheli etkenlerin ait biyokimyasal özellikleri 35
Çizelge 3.5. Konya'da satışa sunulan küflü peynirlerden izole edilen bakteriler ve alındıkları ilçeler 36

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Dışkıya bulanmış kötü bakımlı sağmal inek sağım ahırları 4
Şekil 1.2. *Escherichia coli* O157:H7'nin insana bulaşma zinciri 8
Şekil 1.3. Dünyada yılara göre *Escherichia coli* O157:H7 serotipi bulunan kişilerin oranları (100.000)..... 10
Şekil 1.4. Verotoksin – 1 A ve B olarak adlandırılan iki alt grubun epitel hücrelerde oluşturduğu komplikasyonlar..... 11
Şekil 2.1. *Escherichia coli* O157:H7'nin identifikasyonu..... 31
Şekil 3.1. Konya ilinde satışa sunulan küflü peynirlerden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının dağılımı 34

SİMGE VE KISALTMALAR

C.D.C	ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CT	Sefiksim Tellürit
CT-SMAC	Sefiksim Tellüritli Sorbitol MacConkey agar
DEC	Diyarejenik *Escherichia coli*
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	Electrochemiluminescence
EHEC	Enterohemorajik *Escherichia coli*
EIA	Enzim immunoassay
EPEC	Enterpatojenik *Escherichia coli*
ETEC	Enterotoksigenik *Escherichia coli*
FIA	Floresan immünoassay
HGMF	Hidrofobik grid membran filtre
HUS	Hemolitik Üremik Sendrom
IMS	ImmunomaGnetic Seperation
LD	Lizin Dekarboksilaz
LEE	Locus of EnterocyteEffacement
LSTB	Lauryl Sulphate Tryptos Broth
MR	Metil Red
NB	Nutrient Broth
PFS	Peptonlu Fizyolojik Su
PR	*Penicillum roqueforty*
RIA	Radioimmunoassay
SLT1	Shiga benzeri toksin 1
SLT2	Shiga benzeri toksin 2
SLTEC	Shiga ve benzeri toksin üreten *Escherichia coli*
SMAC	Sorbitol MacConkey agar
STEC	Shiga toksin Üreten *Esherichia coli*
TPP	Trombositopenik Purpura
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
TS	Triptik Soya Broth
USDA-FSIS	ABD Tarım Bakanlığı Gıda Güvenliği ve Kontrolü Şubesi
VP	Vosges Proskauer
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1 GİRİŞ

İnsanlarda oldukça şiddetli enfeksiyonlara yol açan *Enterohemorajik Escherichia coli* (EHEC)*'nin* O157:H7 suşu özellikle son yıllarda adından sıklıkla bahsedilen gıda kaynaklı bir patojen olarak bilinmektedir (Jay 2000, Erol 2007). Ülkemizde gıda zehirlenmelerinden en sık rastlanılanı *E. coli* zehirlenmeleridir (Erol 2007). *E. coli* suşları insanlarda gıda zehirlenmesi sonucu enterit tablosu oluşturabildiği gibi bazen de ölüme sebep olabilmektedir (Vernozy 2000).

E. coli O157:H7 insanlarda hemorajik kolit (kanlı diyare), hemolitik üremik sendrom (HUS) ve trombositopenik purpuraya neden olup, ilk olarak 1982 yılında ABD'de kanamalı kolit ile seyreden iki salgından izole edilmiştir (Doyle 1993). *E. coli* O157:H7 suşlarının Verotoksin 1 ve 2 olarak isimlendirilen 2 tip şigatoksini ürettiği ve suşların bunlardan birini veya her ikisini birden üretebildiği bildirilmiştir (Robinson ve ark 2000). *E. coli* O157:H7 enfeksiyonları ve diğer Shiga toksin üreten *Esherichia coli* (STEC) enfeksiyonları 30'dan fazla ülkede görülmektedir (Coia 1998). Gıdaların patojen mikroorganizmalarla kontaminasyonu sonucu görülen besin zehirlenmelerine ilişkin güvenilir istatistiklerin bulunduğu gelişmiş ülkelerde, sorunun halk sağlığını tehdit etmesinin yanı sıra önemli ekonomik kayıplara da yol açtığı bildirilmektedir (Erol 2007).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda sığır sürülerinin önemli bir kısmının *E. coli* O157:H7'yi çevreye dışkıları vasıtasıyla saçtığı görülmüştür (Sidjabat ve Bensink 1999). *E. coli* O157:H7 salgınlarının çoğunluğu dışkı ile kontamine olmuş hayvansal kökenli gıdalardan ve meyve ve sebze ürünlerinden kaynaklanmaktadır (McClure 2000). Pek çok ülkede kontamine et ve et ürünleri (WHO 1997) fekal yollarla kirlenen içme suları ile kullanma suları (Jones 1996), peynirler (Durch ve ark 2000), süt ve yoğurtlara (Upon, Coia 1994) bağlı enfeksiyonlar meydana geldiği bildirilmiştir.

Besinlerle bulaşan hastalıklar, başta gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur (Erol 2007). Ülkemizde açıkta satılan gıdaların büyük bir kısmı semt pazarlarında tüketiciye sunulmaktadır. Açıkta satılan gıdalar, özelliklede alt yapısı yetersiz, çevre koşulları olumsuz bölgelerde insan

sağlığını tehdit etmektedir (Aureli ve arkadaşları 2000). Konya semt pazarlarında tüketime sunulan ve soğuk zincire uyması gereken ancak bunun çok az uygulandığı gıda çeşitleri arsında küflü peynirde yer almaktadır.

Türkiye' de süt ve süt ürünlerinde *E. coli* O157:H7'nin varlığını araştıran çok az sayıda çalışma yapılmıştır (Aslantaş ve Yıldız 2002).

Konya ilinde bu konuda daha önce yapılan çalışmalarda sığır etleri ile kıymalarında, tavuk etlerinde ve sığır dışkılarında *E. coli* O157:H7'nin varlığı belirlenmiş (Erganiş 1992), yapılan literatür taramalarında küflü peynirlerde *E. coli* O157:H7 üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, Konya ilinde satışa sunulan küflü peynirlerde *E. coli* O157:H7'nin varlığını araştırmak ve küflü peynirin bir halk sağlığı problemi kaynağı olup olmadığını belirlemektir.

1.1. Tarihçe

E. coli O157:H7; gram negatif, gıda güvenliğini tehdit eden, zoonotik ve gerektiğinde bioterörizm için kullanılabilme veya ihmalinde biyolojik teröre neden olma özelliğinde bir bakteridir. İlk kez Kuzey Amerika'da görülmekle beraber, günümüzde 6 kıtada ve en az 16 ülkede giderek artan sayıda vakalara rastlandığı, genelde Mayıs-Ekim aylarında ve kışın vaka sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir. İlk defa 1982 yılında ABD'de Oregon ve Michigan'da çıkan salgınlarda ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (C.D.C.) tarafından identifiye edilmiş, 1982 ile 1992 yılları arasında ABD'de 17 salgın görülmüştür. İskoçya'da 1996-97'da bu bakteri yüzünden 21 kişi hayatını kaybetmiştir (Park ve ark 1999).

İnsanlarda diyareye neden olan *E. coli* suşları 2. Dünya Savaşı'ndan sonra belirlenmiştir. Bu tarihe kadar düşük virülense sahip olduğu ve idrar yolları enfeksiyonlarına neden olabildiği kabul edilen *E. coli*'nin diyare etkeni olarak tanımlanması ile bu bakteriye bakış değişmiştir. *Enterohemorajik E. coli* (EHEC) olarak tanımlanan grubu başlıca *E. coli* O157:H7 serotipi oluşturur. EHEC izolatları çeşitli toksinler oluşturmakla beraber bunlardan sadece bir kaçı tanımlanabilmiştir. İlk

kez 1955 yılında tanımlanmış olan hemolitik üremik sendrom (HUS) en fazla ölüme neden olan hastalıktır (Deschenes ve ark 1998).

E. coli suşları arasında serolojik 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 belirlemiş, 1943'de ise Kaufmann flagella antijenini de göstermiştir. Buna göre *E. coli*'de *O1-O171* arasında gösterilen 165 somatik O antijeni, K1-K90 arasında gösterilen 90 kapsül K antijeni ve H1-H56 arasında gösterilen 56 flagella H antijeni saptanmıştır. En son çalışmalara göre bugün 174 O, 56 H ve 80 K antijeni olduğu saptanmıştır (Perna ve ark 2002).

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 (Şekil 1.1) ile ete, süte, toprağa, suya ve dolayısı ile tüm çevreye yayıldığını göstermiştir (Blanco ve ark 2004). 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 benimsenmiştir. 16S rRNA ve ve 5S rRNA dizilişleri ile yapılan filogenetik araştırmalar *Escherichia* ve *Salmonella'*nın memeli hayvanların ilk türeyişi olan 120-160 milyon yıl önce ortak bir atadan ayrıldıkları, *Shigella* spp.'nin erken primatların oluştuğu 80 milyon yıl kadar önce *E.coli*'den türediği, kommensal *E.coli*'lerin memelilerin bağırsağını tercih ederken, patojen *E. coli*'lerin barsak epitelini aşıp dolaşım sistemine ve buradan uygun bulduğu yerlere lokalize oldukları kabul edilmektedir (Fantalli ve Stephan 2001).



Şekil 1.1. Dışkıya bulanmış kötü bakımlı sağmal inek sağım sırasında bulaşmada önemli role sahiptir www.samsuntb.org.tr/bilgiler/buzagi1.asp2007/1

Patojenik *E. coli*, *Salmonella* ve *Shigella* suşlarının virülens analizleri bunların en az bir virülens determinantlarının plazmid ya da transpozon olarak ekstrakromozomal elementler üzerinde bulunduğunu göstermiştir. Örneğin turist ishalinden izole edilmiş *Enterotoksigenik E. coli* (ETEC) suşlarında en az 2 adet plazmid bulunmuştur (Abdullah ve Davies 2000, Erol 2007). Bu konudaki bir başka örnek *Shigella sonnei*'nin O antijenini kodlayan bir plazmide sahip olmasıdır. Önceleri bu genin kromozom üzerinde bulunduğu, zamanla bunun inaktive olduğu ve plazmid üzerinde yer aldığı, bunun nedeninin de plazmidde kodlanan genlerin yeni bir ortama adaptasyonda avantaj sağladığı düşünülmektedir. Bu teori, patojen olmayan *E. coli* gibi kommensal bir bakterinin *Shigella sonnei* gibi bir patojene dönüşmesi için çok sayıda faktöre gerek olmaksızın sadece tek bir plazmidin aktarılmasının yeterli olacağı hakkındaki görüşü kuvvetlendirmektedir (Oyarz´abal ve ark 2003).

Enterik patojenlerde yapılan kromozomal incelemeler sonucunda çeşitli DNA segmentlerinin fonksiyonel virülens özellikleri kodladığı bulunmuş ve bunlara "Pathojenity Island; Pais" adı verilmiştir. Daha ilginç olarak bu genler çoğunlukla başka mikroorganizmalardan kazanılmış olarak ortaya çıkmaktadır. Pais, bakteriye kompleks bir virülens özellik kazandırmakta ve genetik transfer ve rekombinasyonları önlemektedir. Pais genellikle hemolizin ve fimbria gibi hücre yüzeyi proteinlerinden

sorumlu genleri içerir. *E. coli* O157:H7'de 35 kb olan "Locus of Enterocyte Effacement ; LEE" olan bir Pais bulunmuştur. Pais' in ortaya konulması ile *E. coli* O157:H7'nin evrim teorileri yeni bir yön kazanmış, bu evrime en azından belirli patojen *E. coli* klonlarının farklı aşamalarda dahil olduğu şeklinde teoriler geliştirilmiştir. Kommensal bakteri kromozomuna LEE'nin yerleşmesi Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) benzeri bir klon oluşması için temel bir aşamadır. *E. coli* O157:H7; EPEC benzeri bir atadan önce LEE'yi elde etmesi, sonra transdüksiyon ile Shiga benzeri toksin 2 (SLT 2)'yi alması, sonra hemolizini kodlayan EHEC plazmidini kazanması, daha sonra Shiga benzeri toksin 1 (SLT 1)'i kazanması ve en son olarak sorbitol fermantasyonu ve β-GUR aktivitesini yitirmesi ile evrimini tamamladığı kabul edilmektedir (Law 2000).

Bu bakteri süt ineklerinin dışkılarında diğer sığırlara göre daha fazla bulunmaktadır (Wang ve arkadaşları 1997). Süt sığırlarının dışkısına 10^3 ve 10^5 kob/g düzeyinde *E. coli* O157:H7'nin inoküle edilip, dışkının 5; 22 ve 37 ^oC'larda depolandığı bir çalışmada *E. coli* O157:H7'nin 5 ^oC'da 70 gün canlılığını koruduğunu görmüşlerdir. Sığır dışkısında 50 günden daha fazla sürede belirlenebilecek düzeyde kalırken, 10^6/ml inokülasyonlarında sığır idrarında 10 günde, nehir suyunda 7 günde belirlenemeyecek sayıya düşmektedir. Ayrıca, sığır dışkısında 5, 15 ve 25 ^oC'lardaki depolanmasında sırasıyla 14, 18 ve 12 hafta canlılığını sürdürdüğü gösterilmiş ve bu bulgulara göre sığır dışkısının bu patojenin yayılmasında önemli bir taşıyıcı olduğu, dolayısıyla ahırlarda dışkının iyi bir şekilde kontrol edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Doyle ve ark 1999).

Süt hayvanlarının beslenmesinde kullanılan pamuk tohumu ve mısır silajı gibi yemlerde az da olsa *E. coli* O157:H7 serotipi içerdiği, süt ineklerinin dışkılarında bu bakteriye daha fazla rastlandığı belirtilmekle beraber, modern çiftliklerde beslenen süt ineklerinin dışkılarında daha az rastlanılmaktadır (Akkaya ve ark 2007).

Ruminantlarda özel beslenme ile sağlanan gastrointestinal epitel hücre gelişmesinin E. coli O157:H7 serotipi üzerinde olumsuz etki yaptığı, buna karşın silaj yapımı sırasında yetersiz fermantasyonun tüm fekal koliformlarda olduğu gibi *E. coli* O157:H7 sayısında da artışa neden olduğu ve dolayısı ile dışkı ile bulaşmış otların silajında yetersiz fermantasyonun bu bakterinin ruminantlar arasında taşınmasında etkili olabileceği kanıtlanmıştır (Fenlon, Wilson 2000; Blanco ve ark 2004).

Deneysel olarak 25 adet *E. coli* O157:H7 verilen civcivlerin inokülasyondan 8 ay sonrasına kadar dışkıları ile bakteriyi saçtıklarının belirlenmesi; *E. coli* O157:H7'nin ana kaynağının kanatlılar olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, 50 çiftlikte 500 hayvanın dışkısında bakteriye rastlanılmaması kanatlıların potansiyel kaynak olmadığı gösterilmiştir (Doyle ve ark 1999).

1.2. Etiyoloji

E. coli O157:H7 serotipi, sorbitolü fermente edememesi, β – glucuronidase (uidA) enzimine sahip olmaması, buna karşın *eae* genine sahip olması, 60 mDa plazmid taşıması ve yaygın olarak görülmeyen 5000-8000 Dalton moleküler ağırlıkta OMP ekspresyonu ve enterohemolizin üretimi ile diğer *E. coli* suşlarından ayrılır (Turnail 2000, Lahti ve ark 2002). *E. coli* O157:H7 sorbitolü 48 saat içinde fermente edememektedir. Bununla beraber Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre, Shiga- benzeri toksin üreten *E. coli* (SLTEC) O157 suşları arasında sorbitol pozitif olanlara da rastlanılmaktadır. Yeni bir tip hemolizin olarak kabul edilen enterohemolizin, verotoksin pozitif *E. coli* O157:H7 ve *E. coli* O157:H$^-$ serotipleri tarafından üretilirken, Enterohemolizin sadece eritrositleri yıkanmış kanlı agar petrilerinde belirlenebilir. Bu şekilde 33 adet verotoksik *E. coli* O157:H7 ya da *E. coli* O157:H$^-$ izolatının 32 adedinin enterohemolizin ürettiği gösterilmiştir. Bunların dışında *E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli*'lere göre safra tuzlarına daha az dayanıklıdır (Noveir ve Halkman 2000).

EHEC *E. coli* O157:H7'de MUG belirteci *uid*A geninin varlığı gösterilmiş olmakla beraber, yapılan sekans analizleri bu serotipte *uid*A geninde bir kaç baz mutasyonu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *E. coli* O157:H7 serotipinde MUG reaksiyonu negatiftir (Hill ve ark. 1999).

E. coli O157:H7'nin O157 antijenik determinantı bakterinin selüler lipopolisakkaritinin polisakkarit kısmında bulunur.Yapısal analizler sonucunda bu determinant D-glukoz, L-fukoz (6-deoksi-L-galaktoz), 2-asetamido-2-deoksi-D-galaktoz, 4-acetamido-4,6-dideoksi-D mannoz (1:1:1:1)'dan oluşan ve tekrarlanan tetrasakkarid ünitelerinin doğrusal polimeri olarak tanımlanmıştır (Eileen ve ark 2001).

MUG negatif *E. coli* O157 izolatlarının verositotoksin üretimi yönünden yapılan bir çalışmada; 188 *E. coli O157* 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 bulunmuştur (Parry ve Palmer 2000).

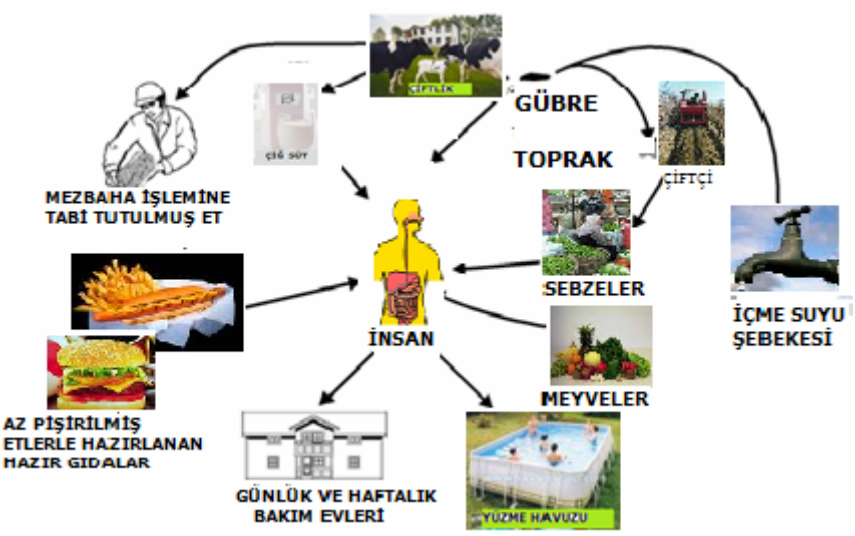
1.3. Epidemiyoloji

Yapılan çeşitli araştırmalar ve klinik veriler hastalıkların giderek arttığını, *E. coli* O157:H7 enfeksiyonları gibi yeni hastalıkların ortaya çıktığını göstermektedir. *E. coli* enfeksiyonlarının ortaya çıkışında ve yayılmasında ekolojik değişmeler, demografik hareketler, insanların ve ticari malların dünya yüzeyinde daha fazla dolaşması, antibiyotiklerin hatalı uygulanmalar sonucunda mikroorganizmaların direnç kazanması gibi bir çok faktör etkin rol oynamaktadır (Şekil 1.2) (Wong 2000).

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 Amerikan doları tahmin edilmektedir. CDC tahminlerine göre sadece ABD'de gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklar toplamı olarak yılda 76 milyon vaka olmakta, bunlardan 300.000'i tedavi görürken 5000 ölümle sonuçlanmakta, *E. coli* O157:H7 ise 20.000 vaka ve 250 ölümden sorumlu tutulmaktadır. 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 (Fenlon ve Wilson 2000).

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 sadece 1 iken bu sayı 1995 yılında 1000'i geçmiştir. Kıta Avrupa'sı ile İngiltere'deki enfeksiyonlar da farklılık göstermektedir. 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 (Park ve ark 1999).



Şekil 1.2. *E. coli O157:H7*' nin insana bulaşma zinciri**,**

ABD'de Philadelphia eyaletinde 1971 yılında 5 erişkin hastada izlenen klinik seyir bilinen barsak hastalıkları ile açıklanamamış ve hiç bir etiyolojik etken saptanamayan benzer hastalıkların ABD'nin diğer eyaletleri ile Avrupa ve Japonya'da ihbar edilmesi üzerine CDC 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 (Özbaş 1998).

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 ikisi 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 Ottowa'da evde yapılan sandviçlerin de salgına neden olduğu bildirilmiştir. Benzer vakalar ABD, Kanada ve İngiltere'de görülmüş, daha sonra Meksika, Çin, Arjantin, Belçika gibi ülkelerde de aynı hastalığa rastlanmış, 1996 yaz aylarında ise Japonya'da 16 kişinin ölümüne neden olan salgının etkeni *E. coli* O157:H7 olarak bildirilmiştir (Coia ve ark 2001).

E. coli O157:H7 enfeksiyonları gençlerde daha etkilidir. Japonya'da yapılan araştırmalarda gençlerin ve çocukların *E. coli* O157:H7 serotipine 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 bu semptomları göstermemiştir (Parry ve Palmer 1999, Erol 2007).

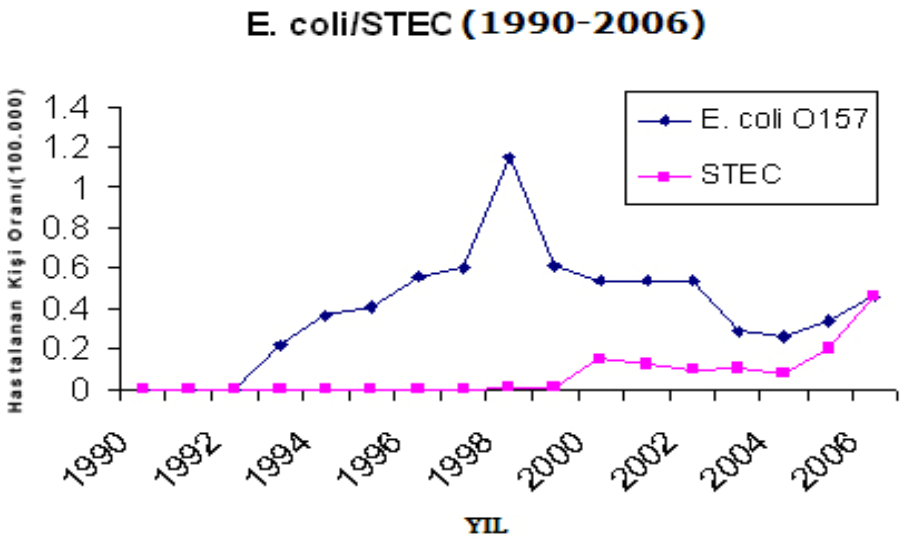
E. coli O157:H7'nin neden olduğu hastalıkların oranı 1/10000'den daha az olduğu kabul edilmektedir (Şekil 1.3). Buna karşı hastalar hastalığın ortaya çıkmasından itibaren 10 gün süre ile *E. coli* O157:H7 yayarlar ve ortalama % 5 kadarı HUS' a yakalanırken, % 50'den daha azında dışkıda kan görülür (Parry ve Palmer 1999). Bununla birlikte, başka kaynaklar *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında dışkıda kan görülme olasılığını % 90 olarak vermektedir (Doyle 1999).

Bu suş 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 (Doyle 1999), benzer sonuçlar ABD' de de alınmıştır (Wong 2000). 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 (Park ve ark 1999).

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 suşlarının % 80'den fazlasının O157:H7 serotipi olduğunu göstermiştir (Watanable 2000). Benzer şekilde *E. coli* O157:H7 olmayan Verotoksin oluşturan *E. coli* (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 belirtilmektedir (Johnson 1996).

Patojenik grupların gıdalarda bulunma sıklığı üzerinde yapılan araştırmalar farklı sonuçları göstermektedir. Eylül 1983' de ABD Washington DC'de 45 kişinin Fransa'dan ithal edilen brie peynirinden kaynaklanan benzer semptomlar taşıyan sulu

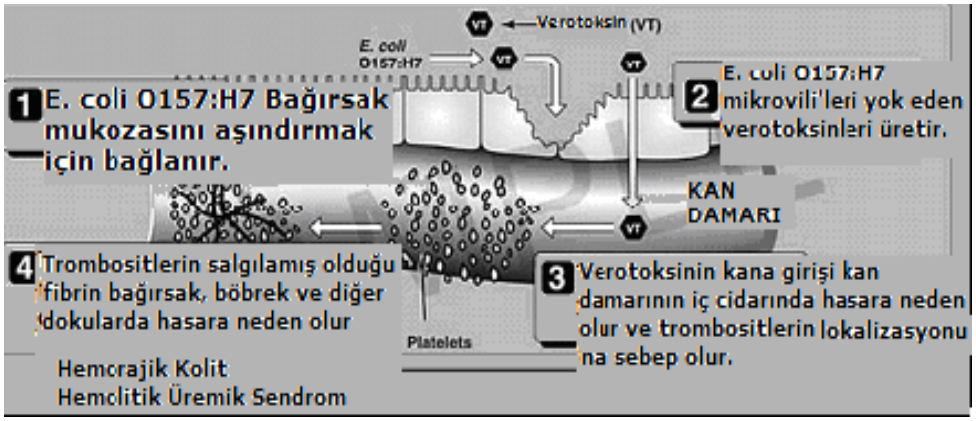
diyare (% 91) ve karın krampları (% 80) göstermesi üzerine yapılan çalışmalarda hastalık etkeninin *E. coli* O157:H7 olduğu saptanmıştır. Benzer hastalıklar kısa bir süre sonra ve yine peynirden kaynaklanmak üzere ABD' nin 4 eyaletinde daha görülmüştür. Brezilya'da sığır eti, hamburger ve sosislerden yapılan analizlerde sırasıyla % 5; % 7,5 ve % 10 ETEC suşlarına rastlanmıştır. Buna karşın AB'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 ya da bunları oluşturan genleri içermediği görülmüştür. EHEC suşlarına ise sığır kıymasında rastlanılmaktadır (Özbaş 1998, Abdullah ve Davies 2000, Erol 2007).



Şekil 1.3. Dünya da yılara göre *E. coli* O157:H7 serotipi izole edilen kişilerin oranları (100.000)

1.4. Patojenite

E. coli O157:H7'nin patojenitesi tam olarak açıklanamamış olmakla beraber önemli virülens faktörleri identifiye edilmiştir. Tüm klinik izolatların 1 ya da 2 verotoksin ürettikleri, bunların doku kültüründe geliştirilen Vero ve HeLa hücrelerine sitotoksik oldukları saptanmıştır. Buyyon kültüründen elde edilen toksinleri Verotoksin -1(VT-1) ve Verotoksin-2 (VT-2) olarak adlandırılmıştır. Bunlardan VT-1 immünojenik ve yapısal olarak *Shigella dizanteria*-1 (*Sh. Dysenteriae- 1)*'in oluşturduğu shiga toksinlerinden ayırt edilemediği için bu toksinler shiga'ya benzer anlamında Shiga-like toksinler olarak da adlandırılmaktadır. SLT-1'in nükleotid dizilişi shiga toksine benzemektedir (Buetin ve ark 2004).



Şekil 1.4. Verotoksin – 1 A ve B olarak adlandırılan iki alt grubun epitel hüçrelerde oluşturduğu komplikasyonlar ve hemorajik kolit ile HUS gelişimi

http// connection.www com/products/ strohl/documents/sample B/jpg/FOOD1-15-04jbg accessed 1;2006

VT-1, *E. coli* O157:H7 serotipinden saflaştırılmış olmakla beraber VT-1 ve VT-1'e benzer toksinler *E. coli'*nin diğer suşlarından da izole edilmiştir. İmmünojenik olarak VT-1'e benzer proteinler ise *Salmonella, Campylobacter jejuni, Vibrio cholerae* ve *Vibrio parahaemolyticus* gibi diğer bakteriler tarafından da üretilmektedir. Her ne kadar ELISA, immundifüzyon vb. yöntemler kullanılarak bu verotoksinlerin shiga toksine benzerliği gösterilmiş ise de izoelektrik noktası ve molekül ağırlığı gibi özelliklerden yararlanılarak *E. coli* verotoksinleri shiga toksinlerinden ayırt edilebilmektedir. VT-1, A ve B olarak adlandırılan ve molekül ağırlıkları sırasıyla 5000 ve 7000; izoelektrik noktaları ise 7,1 olan 2 alt gruptan oluşur. VT-1, *E. coli* O157:H7' nin bazı suşları tarafından üretilen intraselüler bir toksindir (Bauer 1996, Acheson 2000).

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_1 fragmentine indirgendiği bu fragmentin daha sonra 60S ribozomlarına bağlanarak protein sentezini inhibe ettiği ve hücre ölümüne yol açtığı tahmin edilmektedir (Şekil 1.4). *E. coli* O157:H7 serotipinin taşıdığı 60 Mda'luk plazmidin patojenitede önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Bauer 1996). Enterohemorajik *E. coli* O157:H7'nin RTX sitotoksin olarak belirlenen yeni bir hemolitik determinantının 90 kbq plazmidde (pO157) kodlandığı gösterilmiştir (Bauer 1996, Özbaş 1998).

E. coli O157:H7'nin gıdalarda verotoksin oluşturup oluşturmadığı ya da gıdalarda önceden oluşmuş verotoksinin sindirilmesi ile insanlarda hastalık meydana gelip gelmediği bilinmemektedir. Bununla beraber VT-1'in ısıya dayanıklı bir toksin olduğu ve dolayısıyla yetersiz ısıtılan gıdada bu toksinin aktif olarak kalacağı gösterilmiştir. Isıl işlem uygulanan 70 ^{o}C'da 60 dakikada VT-1'in önemli ölçüde stabil kaldığı, 80 ^{o}C'da 15 dakika %90 ve 80 ^{o}C'da 30 dakika %99 azaldığı, buna karşın 80 ^{o}C'da 60 veya 85^{o}C'da 5 dakika ısıl işlem uygulamasının başlangıç aktivitesi 1000-2000 Vero CD_{50} olan verotoksinin tümüyle inaktive olduğu belirlenmiştir. Isıl işleme olan toleransı ve 4,5 pH' da 16 saat içinde aktivitesi %90 düşen toksinin pH'ı gıda endüstrisinde önem taşımaktadır (Bauer 1996, Doyle 1999).

1.5. İzolasyon ve İdentifikasyon

1.5.1. Klasik Yöntemler

E. coli O157:H7'nin belirlenmesi için kullanılan 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 araştırılır. Buna göre materyalde *E. coli* O157:H7'nin varlığının gösterilmesi sırasıyla selektif bir sıvı besiyerinde zenginleştirme, selektif ve ayırt edici diğer bir (katı) besiyerine ekim, şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve/veya lateks agglutinasyon testleri ile *E. coli O157* olarak belirlenmesi ve en son olarak izolatın H7 antijeni içerip içermediğinin belirlenmesi şeklindedir. *E. coli* O157 olduğu saptanan izolatların verotoksin analizlerinin de yapılması gerekmektedir (Turnail 2000).

Klasik yöntemlerle *E. coli* O157:H7 izolasyonunda yoğun refakatçı flora varlığına bağlı olarak sıklıkla yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. Benzer şekilde analiz edilen diğer mikroorganizmalarda da olduğu gibi, selektif zenginleştirme ortamı olarak kullanılan besiyerinde *E. coli* O157:H7 serotipi ile aynı düzeyde üreyebilen *E. coli* tip 1, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Hafnia alvei* gibi yakın akraba türler selektif katı besiyerinde de rahatlıkla üreyebilmekte ve eğer başlangıçta *E. coli O157:H7* sayısı bu flora içinde yeterli bir oranda değil ise bu bakterilerin baskılaması nedeni ile ekim sonucu hatalı olarak negatif alınmaktadır. Burada hedef bakterinin selektif sıvı ve katı besiyerlerinde üreyebilen refakatçı flora içindeki oranı en düşük %1 olmalıdır. Bu şekilde standart boy bir petri kutusunda bulunan selektif bir katı

besiyerine 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 bakterinin petri kutusunda görülmesi ve izolasyonu mümkün değildir (Noveir ve Halkman 2000).

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 1 adedinin koloni oluşturma olasılığı % 10 olacak, bir diğer deyiş ile % 90 olasılıkla petri kutusunda hedef bakteri koloni oluşturmayacaktır. Bu koşulda *E. coli* O157:H7'nin koloni oluşturması için petri kutusunda 1000 koloni oluşacak şekilde seyreltme yapılması gerekmektedir, ancak bu koşulda da refakatçı bakteri kolonileri hedef bakteriyi maskeleyecek ve 1000 koloni içinden *E. coli* O157:H7 ' nin seçilip izolasyonu mümkün olmayacaktır. (Noveir ve Halkman 2000).

Yapılan bir araştırmada Brain-Hearth Infusion besiyerinde *Hafnia alvei'* nin *E. coli O157:H7* 'nin üremesini kayda değer ölçüde engellediği gösterilmiştir (Duffy 2000). Bu durumda klasik yöntemlerle analiz edilen örnekte *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi bir anlamda refakatçı floranın baskılanabilmesi ile doğrudan ilişkilidir.

Gıdalarda fekal koliformların ve dolayısı ile *E.coli'* nin belirlenmesi için kullanılan inkübasyon sıcaklığı olan 44-45,5 ^{o}C sıcaklık sınırı refakatçı floranın gelişimini baskılarken, *E. coli*' nin üremesini teşvik etmekte, ancak *E. coli* O157:H7 bu sınırda zayıf olarak gelişmektedir. *E. coli O157:H7, E. coli* tip 1 ve diğer koliformların EC Broth besiyerinde gelişmeleri ve gaz oluşturmaları için gerekli en düşük ve en yüksek sıcaklığın araştırıldığı bir çalışmada *E. coli* O157:H7' nin üreyebildiği sıcaklık sınırları 24 saatte 24,3-41,0 ^{o}C; 36 saatte 19,3-41,0 ^{o}C ve 48 saatte 19,3-41,0 ^{o}C olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Triptik soya (TS) broth besiyerinde gelişme sıcaklık sınırının 20-42 ^{o}C olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular fekal koliform ve *E.coli'*nin standart aranma yönteminde kullanılan 44,5 ^{o}C'ın *E. coli* O157:H7 serotipinin üremesine olanak tanımadığını, bu nedenle gıdalarda *E. coli* aranmasına yönelik olarak kullanılan geleneksel yöntemler ile *E. coli* O157:H7 belirlenmesinin söz konusu

olamayacağını göstermiştir (Park 1999). Benzer şekilde yapılan bir başka araştırmada *E. coli* O157:H7 serotipinin belirlenebilmesi için en uygun inkübasyon sıcaklığı 41-42 ^{o}C olarak bulunmuştur (Boer 2000).

E. coli O157:H7 serotipinin klasik yöntemlerle belirlenmesi amacı ile kullanılan selektif besiyerleri içinde modifiye (mEC) broth modifiye trypticase soy (mTS) broth (Boer 1999), LST broth (Noveir 2000), EZ coli zenginleştirme besiyeri (Noveir 2000) ve özelikle kümes hayvanları ile yapılan analizlerde önerilen piliç ekstrakt broth (Clavero 1994) bulunmaktadır. Genel olarak 1:9 oranında besiyeri ile homojenize edilen örnek 37 ^{o}C' da 24 saat inkübasyona bırakılmakta, bu sürenin sonunda selektif bir katı besiyerine ekilmektedir. mTSB brotha 0,05 mg/l cefixime, 10 mg/l cefsuladin ve 80 mg/l vancomycine ilavesi ile ön zenginleştirme besiyeri daha da selektif hale getirilebilmektedir. Zenginleştirme kültürlerinin hidrofobik grid membran filitreden (HGMF) geçirilip, bu filitrelerin selektif katı besiyeri üzerine yerleştirilmesi de yaygın uygulama bulmaktadır (Noveir 2000).

E. coli O157:H7'nin belirlenmesinde doğrudan selektif ön zenginleştirme yerine önce selektif olmayan bir ortamda canlandırma işlemi yapılması ile hasar görmüş hücrelerin daha iyi bir şekilde belirlenebileceği ve buna bağlı olarak klasik yöntemlerin duyarlılığının 10 misli artırılabileceğide gösterilmiştir (Erol 2007).

Selektif katı besiyeri olarak bu gün en yaygın kullanılan Sorbitol MacConkey (SMAC) agar ve bu besiyerinin çeşitli modifikasyonlarıdır. Bu besiyerinin standart MacConkey agardan farkı bileşiminde laktoz yerine sorbitol bulunmasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol negatif olduğu için bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturmakta, buna karşı 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. Ancak her sorbitol negatif *E. coli* suşu O157:H7 serotipi olarak değerlendirilmemeli, basit olarak MUG testi ile izolatın *E. coli* tip 1 olup olmadığı kontrol edilmelidir. Refakatçı flora içinde en yaygın bulunan bakterilerden *E. coli tip* 1, *Citr. freundii*, *Serratia* spp. sorbitol pozitif iken, *H. alvei* sorbitol negatiftir, *Enterobacter*' lerde ise sorbitol reaksiyonu türlere göre değişmektedir. *E. hermanii* ve diğer bazı enterik bakteriler biyokimyasal olarak tipik *E. coli O157* sonuçlarını verirler. Bu nedenle biyokimyasal identifikasyonda dikkatli

olunması ve sahte pozitif sonuçlardan sakınılması ve serolojik yöntemlerle doğrulama yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (Halkman 1999). SMAC agar % 100 sensitivite, % 85 spesifiteye sahip olduğu bildirilmiştir (Hill ve ark 1999).

Standart MacConkey agar ve dolayısı ile SMAC agar besiyerleri sırası ile laktoz ve sorbitol reaksiyonlarına dayalı olarak yeterli düzeyde bir ayırt edici özellik sağlamakla beraber, her iki besiyeri de oldukça zayıf bir selektiviteye sahiptir ve dolayısı ile hedef bakteri yanında akraba pek çok bakterinin de üremesine izin vermektedirler. Bu nedenle SMAC agar besiyeri çeşitli selektif katkılar ile desteklenmekte ve böylece besiyerine refakatçı floranın daha yüksek düzeyde baskılanmasını sağlayacak seçicilik kazandırılmaya çalışılmaktadır. Tellurit ile desteklendiğinde *E. coli* O157:H7 dışında kalan ve başta yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı olmak üzere diğer yöntemler ile baskılanamayan diğer *E coli*'leri de önemli ölçüde etkilenmektedir. Bununla beraber özellikle stres altındaki *E. coli* O157:H7 suşları Sefiksim Tellürit (CT) varlığında daha zayıf üreme göstermektedirler (Park 1999). SMAC agarın sefiksim ve tellürit kombinasyonuna ilave olarak salicin ve 4-methylumbelliferyl-β-galactopyranoside'in ilavesi ile elde edilen CT-SSMAC agar besiyerinin *E. coli* O157:H7 izolasyonunda Sefiksim Tellüritli Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) agardan daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir (Fujisawa 2000).

SMAC dışında, phenol red sorbitol (PRS) + MUG agar, L-EMB agar, hemorragic colitis (HC) agar, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) agar, BCM *O157* agar, CHROMagar O157, modifiye edilmiş EMB (mEMB) agar, Fluorocult *E. coli* O157 agar, standart enterik agar ve purple agar base + %1 sorbitol besiyeri kombinasyonu besiyerleri de çeşitli denemelerde kullanılmıştır. HC agar MUG ve sorbitol içermesi ile MUG ve sorbitol negatif kolonilerin izolasyonuna olanak sağlamaktadır. Bununla beraber inkübasyonun uzamasına bağlı olarak floresansın yayılması MUG reaksiyonunun sağlıklı olarak değerlendirilebilmesini olanaksız kılmaktadır. Bu nedenle MUG yerine kolorimetrik bir katkı olan BCIG'in kullanılması daha yüksek doğrulukla izolasyon yapılabilme olasılığı vermektedir (Karapınar ve Gönül 2000).

Zenginleştirme besiyerleri ile selektif katı besiyeri kombinasyonları üzerinde de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Buna göre, mEC broth ve SMAC agar ile LST broth ile

SMAC agarın, mTS broth ve cefixime ve tellurite katılmış SMAC agarın denenen diğer kombinasyonlardan daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Klasik yöntemle, *E. coli* O157:H7 aranmasında son aşama selektif katı besiyerinden izole edilen şüpheli kolonilerin tanımlanmasıdır. Bu tanımlama O157 serotipi için biyokimyasal testler ile yapılabileceği gibi doğrudan lateks agglutinasyon testi ile de yapılabilmekte, ancak O157 olduğu belirlenen izolatın H7 olup olmadığı H7 antiserumu ile belirlenebilmektedir (Halkman 1999).

Yukarıda da belirtildiği gibi *E. coli* O157:H7 serotipi *E. coli* tip 1'den β-glucuronidase enzimi içermemesi ve sorbitol negatif olması ile ayrılır. Bir diğer deyiş ile *E. coli* tip 1'in belirlenmesine yönelik tüm temel identifikasyon testleri *E. coli* O157:H7 serotipi belirlenmesi için de kullanılabilir. Buna göre *E. coli* O157:H7 serotipinde MUG, hidrojen sülfür oluşturma, Voges-Proskauer, sorbitol testleri negatif, laktoz, glikozdan gaz oluşturma, indol, metil red, hareket ve lisin dekarboksilaz testleri ise pozitiftir. Aynı biyokimyasal test sonuçlarını veren diğer bakteriler *Kluyvera ascorbata* ve *Kluyvera cryocrescens* olmakla beraber bu türler rutin gıda kontrollerinde selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine geçme aşamalarında inhibe olmaktadırlar. Küçük laboratuvarlarda *E. coli* O157:H7 çalışmaları için sorbitol negatif izolatlara ornithin ve lizin dekarboksilasyon testlerinin de yapılması ile taramalarda duyarlığın artırılabileceği gösterilmiştir (Hill ve ark 1999).

E. coli O157 suşlarının serolojik esaslarla belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan lateks agglutinasyon kiti iki adet lateks solüsyonu içermektedir. Bunlardan test solüsyonu, *E. coli* O157 antijenine karşı tavşandan elde edilen antikorlar ile kaplanmış lateks partiküllerinden oluşmakta iken, kontrol solüsyonu ise immünize edilmemiş tavşan antikorları ile kaplanmış latex içermektedir. Test edilen kültürler SMAC agar üzerinde geliştirildikten sonra, sorbitol negatif olan koloniler, lateks testine tabi tutularak test sonucu 1 dakika içinde tespit edilebilmektedir. Fekal örneklerde bulunabileceği gibi daha çok çiğ süt ve dana eti gibi gıdalardan izole edilen *E. hermannii* sorbitol negatif olup *E. coli* O157 antiserumu ile agglutine olabilmekte ve böylece *E. coli* O157 ile karıştırılabilmektedir. Buna göre özellikle gıdalarda bulunan *E. hermannii* 'nin izolasyonu için kullanılan SMAC besiyerlerinin yanı sıra sellobiyoz-MacConkey agar bazı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır. Böylece *E. hermannii*

sellobiyoz fermentasyonu ile *E. coli* O157'den ayırt edilebilmektedir (Bielaszowska ve ark 2000). Bu kitin yüksek duyarlıkta olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir.

E. coli O157 olarak saptanan izolatın *H7* olup olmadığının saptanmasında *H7* antiserumu çeşitli besiyerlerine katılarak immobilizasyon testi uygulanmaktadır. Dışkı örnekleri ile inoküle edilmiş SMAC agar besiyerinden izole edilen sorbitol negatif *E. coli* O157:H7 serotiplerinin hızlı identifikasyonu için *E. coli* O157:H7 fluoresans antikor konjugatının %100 duyarlı ve spesifik olduğu bulunmuştur (Özbaş ve Aytaç 1998).

1.5.2. Gelişmiş ve Hızlı Testler

Klasik yöntemlerle birçok enfeksiyon teşhis edilebilmekte ise de bunlar bazen yetersiz kalabilmekte ve özellikle refakatçı floranın maskelemesi nedeni ile çoğu kez yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. Bu nedenle, giderek gelişen analiz teknikleri içinde başta DNA esaslı testler ve immuno enzimatik yöntemler olmak üzere çeşitli analiz yöntemleri üzerinde çalışılmakta, bunlardan bir kısmı ticari olarak üretilip pazarlanmaktadır.Ayrıca serolojik metotlar, özellikle, immunoassay, radioimmunoassay (RIA), floresan immünoassay (FIA), enzim immünoassay (EIA), immun peroksidaz testleri vs. bakterilerin belirlenmesinde güvenli ve erken sonuçlar verebilir. Ancak, bu testler pahalı olduğu gibi yetişmiş personele ve iyi donatılmış laboratuvarlara gereksinim duymaktadır. Bu kadar duyarlı olmalarına karşı, bazı olgularda da yine çapraz reaksiyonlar ve şüpheli durumlar ortaya çıkmakta ve tanı gecikmektedir. İmmünolojik belirleme ve identifikasyon sistemleri analiz süresinde kayda değer bir kısalma sağlamaktadır. Bunlar arasında latex agglutinasyon, ELISA, koloni immünblot analizleri ve diğer immünolojik teknikler *E. coli* O157:H7 analizlerinde kullanılmaktadır. Bu amaçla O ve H antijenlerine karşı monoklonal ve poliklonal antiserumlar geliştirilmiştir. Bu sistemlerde 1 gecelik inkübasyon sonrasında 1 kob/g' dan daha az sayıda olan *E. coli* O157:H7'nin varlığı belirlenebilmektedir. İmmünokimyasal analizlerde O157 serotipinin sadece O antijenine ya da O157:H7'nin tüm antijenlerine karşı antikorlar kullanılmaktadır (Park ve ark 1999).

HGMF 'de gelişen *E. coli* O157 kolonilerinin belirlenmesi için immünolojik yöntemle boyamada *H7* dışındaki serotipleri de içeren spesifik MAb kullanılmaktadır.

Bu yöntemde HGMF'de gelişen koloniler petride yeniden üretilip işaretli problarla boyanmakta, kullanılan MAb tüm *E. coli O157* serotipleri ve N grup *Salmonella* suşları ile reaksiyona girdiği için immün pozitif koloniler yine biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle kontrol edilmektedir. Enterohemorajik *E. coli* O157:H7 ve O26:H11 için üretilen spesifik bir MAb *E. coli* O157 antijeni ya da O157 poliklonal antikorları ile çapraz reaksiyona giren diğer bakteriler ile çapraz reaksiyon vermemekte, MAb özel olarak sadece enterohemorajik *E. coli* O157:H7 *ve* O26:H11 serotiplerinde bulunan 2 dış membran proteini ile reaksiyona girmektedir. Bu yüksek spesifikliğinden dolayı MAb gıda ve klinik örneklerde bu *E. coli* serotiplerinin hızlı belirlenmesi için yararlı bir immünoassay olarak tanımlanmaktadır (Doyle 1993).

Farklı O157 ve H7 serotiplerinden oluşan *E. coli*, *Salmonella* ve diğer Gram negatif bakteri suşları ile yapılan bir çalışmada monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılmış, her iki antiserumun *E. coli H7* ile kuvvetli reaksiyon verirken, poliklonal antiserumların H7 olmayan *E. coli*'ler ile ve *E. coli* olmayan diğer suşlarla da çapraz reaksiyon verdiği belirlenmiş, ayrıca bu poliklonal antiserum ile *E. coli* $H2_3$ ve $H2_4$ serotiplerinde kuvvetli reaksiyon alınmıştır. Bu bulgular *E. coli*'nin *H7,* $H2_3$, $H2_4$ serotipleri arasında serotip spesifik epitoplarının belirlenmesi gereğini göstermiştir. Anti H7 monoklonal antikorların yüksek kalitede teşhis araçları olduğu, gıda, insan ve veteriner klinik örneklerinde *E. coli* O157:H7'nin aranması veya identifikasyonunda tek başlarına ya da O157 monoklonal antikorları ile kullanılabileceği görülmüştür. *E. coli* O157:H7 suşları analiz edilecek gıdanın selektif zenginleştirme kültürünün HGMF'den geçirilip enzimle işaretlenmiş antikor analizi (enzyme labeled antibody assay) ile belirlenebilmektedir. Bu yöntemde peroksidaz A (HRP-A) protein ile işaretlenmiş ve O antijenine spesifik olan MAb'dan da yararlanılmakta ve zenginleştirme yapılmaksızın gıdada *E. coli* O157:H7 sayımı gerçekleştirilebilmektedir (Ge ve ark 2002).

USDA-FSIS (ABD Tarım Bakanlığı Gıda Güvenliği ve Kontrolü Şubesi) etlerden *E. coli* O157:H7 izolasyonu için geliştirdiği yöntem 3M petrifilm *E. coli* petrileri ve poliklonal O157 antikor ile immünolojik işaretleme esasına dayanmaktadır. Zenginleştirme kültürünün çeşitli dilüsyonları petri film petrilerine ekilmekte, oluşan koloniler doğrudan temas ile nitroselüloz kağıtlara alınmakta, buradaki immün pozitif koloni beneklerine uyan petri film petrilerindeki koloniler ve zenginleştirme kültüründen bu kez SMAC-BCIG agara ekim yapılmakta, şüpheli koloniler EMB agar

ile PRS-MUG agar besiyerlerine sürülmekte, tipik *E. coli* O157:H7 kolonileri lateks aglütinasyon testine alınmakta, ayrıca biyokimyasal ve serolojik olarak doğrulanmaktadır (Doyle 1993, Karapınar 2000).

USDA-FSIS yöntemi ve esas olarak O157 poliklonal antikor kullanan diğer yöntemlerde alınan yanlış pozitif sonuçlar bunların yaygın kullanımını kısıtlamaktadır. *O157* poliklonal antiserumu *E. hermannii, Brucella abortus, B. melitencis, Y. enterocolitica* serogrup 0:9, *Salmonella* N grup, *Ps. maltophilia* ve diğer bazı enterik bakteriler ile çapraz reaksiyona girmektedir. Bu çapraz reaksiyondan sorumlu olan genel epitop hücre duvarı lipopolisakkaridinde bulunan 4-amino-4,6-dideoxy-α-D-mannopyranose' dur (Doyle 1993).

E. coli O157:H7'nin zenginleştirme ve katı besiyeri kullanılmadan antikor-direk epifluoressent filtre tekniği (Ab-DEFT) ile doğrudan sayımı mümkündür. Bu analiz yöntemi ile 15 dakika süre ile tripsin ve Triton X-100 ile muamele edilen kıyma 5 mm por çaplı ön filtreden sonra 0,2 mm por çaplı siyah polikarbonat filitreden geçirilmekte ve son filtre doğrudan fluorescein ile işaretlenmiş anti-O157 poliklonal antikor ile boyanıp yıkanmakta ve epifloresan mikroskopta incelenmekte, böylece 1 saatten daha az bir süre içinde analiz tamamlanmaktadır (Tortorello 1994).

SLT 1 ve SLT 2 antikorları için ELISA yöntemleri kullanımı HeLa hücre sitotoksisitesi nötralizasyon analizleri ile benzer sonuçlar vermiştir. Gerek ELISA uygulamaları gerek nötralizasyon testleri enfekte olmuş hastaların belirlenmesinde duyarlı değillerdir. Bununla beraber *E. coli* O157 lipopolisakkarit antikorları için ELISA tekniklerinin her ikisi de duyarlı ve spesifik olarak bulunmuş ve *E. coli* O157:H7 ile enfekte olmuş kişilerin belirlenmesinde antitoksik antikorlardan muhtemelen daha yararlı olarak yorumlanmıştır (Ge ve ark 2002).

ELİSA yüksek düzeydeki spesifikliği, duyarlığı ve hızlı olmasının yanında bu işlem rutin mikrobiyolojik kontroller yapan laboratuvarlar için kullanımı kolay ve uygun bir yöntem olarak tanımlanmıştır. Et ve tavuk ürünlerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu için ticari olarak bulunan ve *E. coli* O157 antijeni için "reactive disc blot" ELISA sisteminin kullanıldığı bir tarama yöntemi de tasarlanmıştır (Ge ve ark 2002).

İmmünolipozomlar kullanılarak geliştirilen ve bir kolorimetrik immün analiz yöntemi olan "immünoliposome sandwich assay" ile *E. coli* O157:H7'nin yıkama ve inkübasyon aşamalarına gerek duyulmadan 8 dakika gibi kısa bir süre içinde belirlenebileceği, ve immünopolizomların sadece *E. coli* O157:H7 ile bağlanabileceği ve hiç bir çapraz reaksiyon alınmadığı transmisyon elektron mikroskobik analizler ile gösterilmiştir (Park ve ark 2000).

E. coli O157'nin hızlı ve basit olarak belirlendiği bir diğer enzim immünoassay sistemi polymacron'dur. Bu sistemin esası test örneğinin sodyum cholate ile 100 ^{o}C 'da 10 dakika ısıtılması ile ekstrakte edilen *E. coli* O157 antijeninin immüno enzimatik yöntemle belirlenmesidir. Immünoadsorbent yüksek bir yüzey alanına sahiptir. Sistem, *E. coli* 'nin 29 O157:H7 serotipi ile pozitif sonuç vermiş ancak çok sayıda gram negatif ve gram pozitif bakteri ile reaksiyon vermemiştir. Bu yöntem ile çiğ kıymaya inoküle edilen 0,4 kob/g düzeyindeki *E. coli* O157:H7 belirlenebilmektedir (Hill ve ark 1999).

Yine ticari bir kit olan EZ Coli ise standart mikropipette bulunan *E. coli* O157 için spesifik olan hızlı immünoassay yöntemi olup *E. coli* O157 ve laktozu fermente eden diğer koliform bakteriler için selektif olan tek aşamalı zenginleştirme besiyeri ve *E. coli* O157 aranmasında 6 aylık raf ömrüne sahip mikropipet ucu formunda bir mikrofilament ELISA testi olan EZ coli detektör uç olmak üzere iki unsurdan oluşmaktadır. EZ coli kitinin başarılı bir kit olarak tanımlanmasına karşın, bir başka çalışmada EZ coli kiti ile pozitif sonuç alınan örneklerde standart kültürel yöntemlerle *E. coli* O157 izole edilememiş, dolayısı ile bu kitin kullanımı doğrulama açısından şüphe ile karşılanmıştır. EZ Coli ticari kiti dışında benzer şekilde geliştirilmiş olan başka ticari kitler de vardır. Bunlardan BioMerieux' un Mini Vidas sistemi ve Organon Teknika 'nın EHEC-TEK sistemi en çok kullanılanlar arasındadır. Her ne kadar Mini Vidas için 7 basamaklı, EHEC-TEK için 11 basamaklı bir işlem uygulanırken EZ coli için 14 basamak bulunmakta ise de analiz sürelerinin Mini Vidas' da 45 dakika, EHEC-TEK' de 90 dakika iken EZ Coli 'de sadece 9-10 dakika olması EZ Coli için büyük bir üstünlük sağlamaktadır (Erol 2007).

İmmünomanyetik ayırım yöntemi ile çalışan sistemler üzerinde son yıllarda yoğun bir ilgi vardır. İmmünomanyetik ayırım yönteminde *O157* spesifik antikorların paramanyetik parçacıklara tutturulması şeklindeki bir selektif zenginleştirme ile dışkıda

10^7 kob/g koliform bakteri bulunurken 10^2 kob/g düzeyindeki *E. coli* O157:H7 belirlenebilmiştir. Bu yöntem pek çok araştırıcı tarafından güvenilir ve duyarlı bulunmuş ve doğrulama için doğrudan izolasyon sağlaması nedeni ile diğer gelişmiş analiz yöntemlerine göre avantajlı olarak tanımlanmıştır. Electrochemiluminescence (ECL) ile kombine edilmiş immünomanyetik ayırım (immunomagnetic seperation = IMS) sistemi olan bir ticari sensör ile gıdalarda *E. coli* O157 bir saatten daha az sürede belirlenebilmektedir (Yu ve Bruno 1996; Erol 2007).

Son zamanlarda toksin oluşturan çeşitli *E. coli* suşlarının belirlenmesinde multipleks PCR tekniği de kullanılmaktadır. Bu yöntem ile bifteklerde *E. coli* O157:H7 ve toksinlerinin araştırıldığı bir çalışmada PCR'ı inhibe eden gıda parçacıkları 2 aşamalı basit bir filtrasyon ile giderilmiştir. Bu yöntem ile genel bir besiyerinde 37 ^oC 'da 6 saat inkübasyon ile 10^3 kob/g, bir gece inkübasyon ile 1 kob/g düzeyinde duyarlık sağlanmaktadır. Benzer şekilde yürütülen bir araştırmada da multipleks PCR tekniği kullanılarak başarılı sonuçlar alınmıştır. "Restriction-site specific-PCR ; RSS-PCR" yöntemi ile çevresel örneklerden izole edilmiş çok sayıdaki *E. coli* izolatının *E. coli* O157:H7 olup olmadığının belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği, bunların dışında lazer taramalı konfokal mikroskobik araştırmalar ile de etlerde *E. coli* O157:H7' nin belirlenebileceği gösterilmiştir (Prachaiyo 2000, Erol 2007).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1.Çalışma Materyalleri

Araştırmanın materyalini Konya pazarlarından toplanan 200 adet küflü peynir numunesi oluşturdu. Küflü peynir numuneleri örneklendikleri gün içerisinde laboratuara getirilmiş buzdolabında +8 derecede saklandı.

2.1.2. Dilüsyon Sıvıları

2.1.2.1. Tamponlanmış Peptonlu Su (Oxoid CM 0509)

Peptone	10,0 g
Sodyum Klorür (NaCl)	5,0 g
Na_2HPO_4.	12 g
Dipotasyum fosfat (K_2HPO_4)	1,5 g

Dehidre besiyeri 25,5 g/L olacak şekilde su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir, 500 mL erlenlere 225'er mL olacak şekilde ya da diğer hacimlerde uygun cam malzemeye dağıtılır ve otoklavda 121 ^{o}C'da 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renklidir. Otoklav sonrası 25 ^{o}C'da pH 7,0±02'dir.

2.1.2.2. Peptonlu Fizyolojik Tuzlu Su

Sodyum Klorür (NaCl)	5.5 g
Peptone	11 g
Distile su	1000 cc

NaCl ve pepton distile su içerisinde çalkalanarak otoklavda sterilize edildi.

2.1.3. Besi yerleri

2.1.3.1. Lauryl Sulphate Tryptose Broth (LSTB) (Oxoid CM967)

Lauryl Sulphate Tryptos Broth Mug Agar	22. 02 g
Distile su	600 ml

22 g Lauryl Sulphate Tryptose Broth Mug Agara 600 ml distile su ile karıştırıldı. 121 ^{0}C 15 dakika sterilize edildi. Her tüpe 1 ml olacak şekilde dağıtıldı.

2.1.3.2. Sefiksim Tellüritli Sorbitollu MacConkey Agar (SMAC)

Peptone	20,0 g
NaCl	5,0 g
Bile Salts no	1,5 g
Sorbitol	10,0 g
Crystal violet	0,001 mg
Neutral red	0,03 g
Agar-agar	15,0 g
Distile su	1000 cc
Sefiksim Tellürit Supplement	
Potasyum tellürit	2.5 mg
Sefiksim	0.05 mg

Dehidre besiyeri ısıtılarak damıtık su içinde eritildi ve otoklavda 121 ^{o}C'da 15 dakika sterilize edildi. 45-50 ^{o}C' ye soğutuldu ve buna köpük oluşturmayacak şekilde sefiksim Tellürit Suplement karıştırıldı. Steril ortamda 90 mm çapındaki petrilere 20-25 ml miktarında dağıtıldı. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renkte ve 25 ^{o}C'da pH 7,1±0,2 'idi.

2.1.3.3. Nutrient Broth (NB) (Oxoid CM1)

Nutrient Broth (Oxoid CM1)	25 g
Distile su	1000 cc

Dehidre besiyeri, 25 g/1000 mL olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritildi ve otoklavda 121 ^{o}C'da 15 dakika sterilize edildi. Steril Petri kutularına 12,5'er mL döküldü.

2.1.3.4. Üçlü Tüp

2.1.3.4.A. Birinci Tüp

Pepton	20 g
Laktoz	10 g
Glukoz	1g
Sodyum thiosülfat	0.2 g
Ferro ammanyumsülfat	0.3 g
NaCl	5 g
Agar	17 g
Fenol Kırmızısı (% 2)	12.5 ml
Damıtık Su	1000 cc

Malzemeler karıştırıldı ve pH' sı 7.0 ye ayarlandıktan sonra 10 cc olacak şekilde tüplere dağıtıldı. Otoklavize edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra tüpler hafif yatırılarak donduruldu.

2.1.3.4.B. İkinci Tüp

Pepton	10 g
Mannitol	2 g
Agar	2.5 g
Potasyum nitrat	1.7 g
Fenol Kırmızısı (%0.2)	20 ml
Damıtık su	1000 cc

Malzemeler karıştırıldı ve pH sı 7.4 e ayralandıktan sonra 10 cc olacak şekilde tüplere dağıtıldı. Otoklavize edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra soğuması beklendi.

2.1.3.4.C. Üçüncü Tüp

L_trytaphon	0.3 g
KH_2PO_4 (Mono-potassium phosphate)	0.1 g
K_2HPO_4(Dipatassium phosphate)	0.1 g
NaCl (Sodyum Klorür)	0.5 g
Üre	2 g
Etanol %95	1 ml
Phenol Red (%0.2)	1.25 ml
Damıtık su	1000 cc

Kimyasal maddeler damıtık su ile karıştırıldı ve pH sı 6.5 olacak şekilde ayarlandı.Tindalize edildi. Kullanılmadan hemen önce tüplere dağıtıldı.

2.1.3.5. Jelatin Hidroliz Testi

Nutrient Agar
Distile su
Bakteriyolojik Jelatin
Triklorasetik asit

Nutrient agar distile su içerisinde eritildi ve %5 oranında bakteriyolojik jelatin eklendi ve sterilize edilerek petri kaplarına döküldü. Ekim yapıldı ve 37 ^{o}C de üç gün inkübe edildi. Besi yerinin üzerine 5-10 ml %30 luk triklorasetik asit solusyonundan döküldü ve koloniler etrafında şefaf halerin görülmesi jelatinin hidrolize edildiğini gösterdi.

2.1.3.6. Lizin Dekarboksilaz (LD) Testi

Pepton	5 g
Lab Lamco	5 g
Pridoksin HCl	5 mg
Glukoz	0.5 g
Distile su	990 ml
Brom Krezol moru	2 cc

Kimyasallar eritildi ve pH'sı 6.0 a ayarlandı. Bu solusyona 5ml 1/500 oranında hazırlanmış brom krezol morun dan eklendi. 1000 ml ye tamamlandı. Bu besi yeri ikiye ayrıldı. Birincisine %2 oranında DL-Lizin eklendi ve pH' sı 0.1N NaOH ile 6.0'ya ayarlandı. İkincisi kontrol besi yeridir. Bu besi yerleri 2cm yüksekliğinde bolacak şekilde tüplere dağıtıldı. Üzerlerine 5ml kalınlık yapacak şekildeb mineral yağ döküldü. 121 ^{0}C 15dakika sterilize edildi. LDC buyonda mor renk, kontrol buyonunda ise sarı rengin oluşumuyla belirlendi.

Eğer LDC buyon sarı renkte ise lizinin henüz dekarboksile olmadığı; eğer her iki tüpte mor renk mevcut ise bakterinin lizini dekarboksile ettiği şeklinde yorumlandı.

2.1.3.7. MR (Metil Red) ve Vosges Proskauer için
Clark –Lubs Besiyeri

Pepton	7 g
Glikoz	5 g
Dipotasyum fosfat (K_2HPO_4)	5 g
Distile su	1000 cc

Malzemeler karıştırıldı ve pH ' sı 6.9 za ayarlandı. 5ml olarak tüplere paylaştırıldı. Otoklavda (121 ^{0}C de, 15dakika) steril edildi.

2.1.3.7.A. Metil Red ayıracı

Metil Kırmızısı	0.1 g
%95 lik etil alkol	300 ml
Distile su	200 ml

Metil Kırmızısı alkolde eritildi ve su ilave edildi.

Testin Yapılışı

Clark- Lubs besiyerindeki bakterinin 48-72 saatlik kültürünün 5ml'sine, yaklaşık olarak 5 damla Metil red ayıracı ilave edildi. Pozitif reaksiyonda bariz bir kırmızı renk oluştu.

2.1.3.7.B. Vosges-Proskauer ayıracı

a-	Alfa – naftol	5 gr
	Mutlak etil alkol	100 ml
b-	Potasyum Hidroksit (KOH)	40 gr
	Distile su	100 ml

A Solüsyon : %95 lik etil alkol içinde % lik alfa– naftol çözeltisi hazırlanır.

B Solüsyon : % 40 lık potasyum hidroksit solüsyonu içinde % 0.3 oranında kreatin eritilerek hazırlandı.

Testin Yapılışı

Bakterinin 48-72 saatlik bir MR-VP buyyon kültürüne A solüsyonun dan 3 kısım, B Solüsyonun dan 1 kısım ilave edildi. Tüp havalandırıldığı zaman renk reaksiyonu daha bariz olacağı için, bir dakika daha çalkalandı; oda sıcaklığında 2-4 saat bekletildi.

2.1.3.8. Sımmons- Cıtrate Agar

$MgSO_4$ (Magnezyum sülfat)	0.2 g
$NH_4H_2PO_4$ (Mono-ammonium phosphate)	1 g
K_2HPO_4 (Di potasyum phesphate)	1 g
Sodium citrate	2 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Bromthymol Mavisi	0.08 g
Distile su	1000 cc

Malzemeler karıştırıldı ve pH'sı 6.8 e ayarlandı. Tüplere dağıtılıp otoklavda sterilize edildikten sonra dipte küçük bir dik kısım kalacak şekilde yatırılarak donduruldu.

2.2. Yöntem

2.2.1. Numunelerin Toplanması ve İlk İnceleme

Numunelerin alındığı poşetler öncelikle otoklava tabi tutularak steril edildiler. Konya il pazarlarından toplanacak küflü peynir numunelerinin hangi pazarlardan toplanacağı tespit edildi. Her bir peynir satıcısının tezgâhındaki satışa sunulan küflü peynirlerin açık teneke ya da peynirlerin içersine konuldukları plastik leğen vb. kaplardan aseptik şartlar altında üç seri halinde 100 gramlık 200 adet peynir numunesi toplandı. Steril poşetler içersinde toplanan peynir örnekleri dış ortam şartlarının etkisinde kalmayı önlemek amacıyla termoslu taşıma kutusu yardımı ile soğuk zincir altında laboratuarlara getirilerek mikrobiyolojik yönden analiz edildiler.

Steril poşetlerin üzerine toplanan tarih ve bölgenin adı yazılarak 200 adet örnek incelenmeye alındı. Herbir örneğin (100gr) iç kısmından 25'er gram olacak şekilde ikişer örnek alındı. Mikrobiyolojik analizlerin güvenirliğini arttırmak ve hata oranını düşürmek amacıyla her bir numune için çift analiz yapıldı.

2.2.2. *E. coli* O157:H7 suşunun izolasyonu

Bu amaçla, 25 g peynir numunesi içerisinde 225 ml Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) bulunan stomacher torbasına konuldu ve 2 dakika çalkalandı (Bkz EK.1).

Homojenize olan numune 37 ^{o}C'de 1-3 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. Ön zenginleştirme besiyerinden 1 ml alınıp 9 ml peptonlu fizyolojik su çözeltisi içeren tüpe aktarılarak ana dilüsyon hazırlandı. Daha sonra 10^{-3} basamağına kadar numunelerin diğer dilüsyonları yapıldı. Her dilüsyondan 1'er ml olacak şekilde (Bkz EK.2), 4-methylumbelliferyl-b-Dglucuronide (MUG) içeren Lauryl Sulphate Tryptose Broth (LSTB)'un bulunduğu 3 tüpe ekim yapıldı. Tüpler 37 ^{o}C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı.

2.2.3. *E. coli* O157:H7 suşunun identifikasyonu

MUG içeren LSTB tüplerinin herbir dilüsyonundan (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) bir öze dolusu alınarak Sorbitol MacConkey Agar (SMAC)'a yayma plak metodu ile paralel ekimler yapıldı. Petriler 37 ^{o}C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı (Bkz EK 3). Sorbitol negatif renksiz kolonilerden Nutrient Broth (NB) geçilerek 44 ^{o}C'de 18 saat inkübe edildi. NB'da görülen üremelerden, mikroskopik muayene ve biyokimyasal testler yapıldı.

2.2.4. Mikroskobik Muayene

Etkenin morfolojik yapısı Gram boyama yöntemi ile saptandı; hareketli olup olmadığı hareket muayenesi ile belirlendi (Uçan ve Erganiş, 2005).

2.2.5. Biyokimyasal testler

İzole edilen etkenin identifikasyonu amacıyla, İndol testi (Bkz EK.5), Hidrojen sülfür (H_2S) testi, Jelatin hidroliz testi, Karbonhidrat fermentasyon testleri, Katalaz testi, Lizin dekarboksilaz (LD) testi, MR-VP (Metil Red- Voges Proskauer) (Bkz EK. 7,Bkz EK.8) testi, Sitrat kullanım testi ve üre testi (Bkz EK.6) yapıldı (Uçan ve Erganiş, 2005).

2.2.6. Doğrulama testi (Latex aglütinasyon testi)

İndol testi pozitif olan ve sorbitolu fermente etmeyen şüpheli kültürlerdeki kolonilere latex aglütinasyon testi *E. coli* O157 (Oxoid DR620M) ve *E. coli H7* antiserumları uygulandı ve doğrulamaları yapıldı.

2.2.7. Koliform identifikasyonu

Koliform bakterilerin identifikasyonu üçlü tüp metoduna (Ehrlich- Ziehl-Neelsen) göre yapıldı.

2.2.8. *S.aureus* identifikasyonu

Aerop mezofil, katalaz ve koagulaz olumlu numunelere stafilokok analizi için Baird-Parker Agar (OXOID CM 275) besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapıldı. Baird-Parker besiyerinde üreyen tipik ve atipik kolonilerden staphylase testi yardımı ile koagulaz pozitif stafilokokların varlığı tespit edildi.

2.2.9. Referans Suş

Referans *E. coli* O157:H7 suşu (S.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji lab. kültür koleksiyonu); negatif bir peynir numunesine inokule edilerek 30 gün boyunca laboratuvarda bekletildi ve 15. ve 30. günlerde yapılan ekimlerde suşun izolasyonu sağlandı.

2.2.10. İstatistik metod

Çalışmada numunelerin alındığı köy pazarlarındaki *Enterobacteriaceae* familyasına ait mikroorganizma varlığının önem derecesinin belirlenmesinde kikare (SPSS 11.5) testi kullanıldı.

25’ er gr küflü peynir numunesi + 225 ml Zenginleştirme besiyeri

⇩

37 ^{O}C’ de 1-3 saat inkübasyon

⇩

0.1 ml

+

0.9 ml peptonlu fizyolojik su

⇩

Her dilüsyondan 1ml alınıp LSTB ye ekim yapılır

37 ^{o}C’ de- 48 saat

⇩

MUG İçeren LSTB tüplerinin her bir dilüsyonundan

Sorbitol MacConkey Agar(SMAC)

⇩

EHEC O157:H7 SMAC agarda renksiz koloniler

İdentifikasyon

Gram Boyama	Katalaz Testi	Hareket Testi	Karbonhidrat fermantasyon Testi	MR-VP Testi	Lizin Dekarboksilaz Testi	Sitrat ve Üre Testi	İndol

⇩

Sonuçlar değerlendirilir, eğer *E. coli* uyumluysa

⇩

***E. coli* O157:H7 Latex Aglütinasyon**

Pozitif

⇩

Sonuç

Şekil 2.1. *E. coli* O157:H7’ nin İzolasyon ve identifikasyonu

3. BULGULAR

Konya ilinde satışa sunulan küflü peynirlerden izole edilen *E. coli* suşlarının ilçelere göre dağılımı Çizelge 3.1 de verildi. Araştırmaya dahil edilen semt pazarlarındaki tezgahlardan alınan küflü peynirlerin 40 (%17)'sında *E. coli* ürediği saptandı. İzole edilen *E. coli* suşlarından 3 (% 7,5)'u *E. coli* O157 ve 1 (% 2.5)'i *E. coli* O157:H7 olarak identifiye edildi. Çalışmada ilçelerden alınan küflü peynir numunelerindeki mikroorganizmaların varlığı karşılaştırıldığında ilçeler arasındaki farklılıklar istatiksel olarak önemsiz bulundu. (p>0.05)

Çizelge 3.1. Konya İlçelere göre *E. coli* izole edilen suşların ilçelere göre dağılımı

Numunelerin Alındığı İlçeler	Pozitif		Negatif		TOPLAM
	n	%	n	%	n
Selçuklu	10	14	63	86	73
Karatay	7	29	17	71	24
Meram	0	0	4	100	4
Ereğli	0	0	7	100	7
Sarayönü	1	20	4	80	5
Karapınar	2	20	8	80	10
Çumra	2	17	10	83	12
Ilgın	4	14	24	86	28
Cihanbeyli	3	30	7	70	10
Bozkır	2	13	13	87	15
Beyşehir	0	0	5	100	5
Akören	1	20	4	80	5
Kadınhanı	2	20	8	80	10
Hadim	1	33	2	67	3
Seydişehir	3	20	12	80	15
Akşehir	0	0	4	100	4
Yunak	1	50	1	50	2
Kulu	1	50	1	50	2
TOPLAM	40	19	194	81	234



Şekil 3.1. Konya ilinde izole edilen küflü peynirlerde ilçelere göre E. coli dağılımı

Çizelge 3.2. Araştırmaya katılan küflü peynir satıcılarına ait tezgahların tespit edilen bazı hijyenik özellikleri

Mikroorganizma	**n**	**%**
İş elbisesi		
Giyiyor	35	15
Giymiyor	199	85
Kapalı camlı bölme		
Var	40	17
Yok	**194**	83
Soğuk hava dolabı		
Var	30	13
Yok	204	87
Çöp bidonu		
Var	100	43
Yok	134	57
Akar su tertibatı		
Var	50	21
Yok	184	79
Toplam	234	100

Peynir satıcılarına ait, iş elbisesi, ürünlerin sergilendiği temiz ve kapalı cam tezgah, soğuk hava dolabı, çöp bidonu, akar su tertibatı nın mevcudiyeti olarak belirlenmiş vasıflar Çizelge 3.2'de sunuldu. Çalışan personelin %85'inin iş elbisesi giymediği, tezgahların % 83' ünde küflü peynirlerin saklandığı bir kapalı camlı bölmenin bulunmadığı yine aynı iş yerlerinin %87'sinde soğuk hava dolabının olmadığı saptandı. % 57'sinin standartlara uygun çöp bidonu bulundurmadıkları belirlendi. Araştırmaya dahil edilmiş olan iş yerlerinin %79' unda akar su tertibatının mevcut olmadığı tespit edildi (Bkz EK.9; Bkz EK.10).

Çizelge 3.3. Küflü peynirlerdeki mikrobiyal kontaminasyon

Mikroorganizma	**n**	**%**
E. coli		
Pozitif	40	17
Negatif	194	83
S.aureus		
Pozitif	100	43
Negatif	134	57
Koliform spp. (*E. coli* dışındaki)	40	17
Enterobacter aerogenes		
Pozitif	30	13
Negatif	204	87
Enterobacter cloacae		
Pozitif	10	4
Negatif	224	96
Toplam	**234**	**100**

Çalışılan küflü peynir numunelerinin % 43'ünde *S.aureus ve* numunelerin % 34' ünde (80) koliform grubu bakteri üredi. Örneklerdeki bu bakterinin görülme sıklığı Çizelge 3.3'de sunuldu.

Küflü Peynir numunelerinden izole edilen *E. coli* izolatlarına ait biyokimyasal test sonuçları

Numunelerin alındığı yer ve nosu	BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI												
	H_2S	İN	JH	Glu	Lak	Man	KT	LD	MR	VP	ST	ÜR	Har
SELÇUKLU 33	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SELÇUKLU24	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SELÇUKLU 27	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SELÇUKLU 33	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SELÇUKLU 53	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SELÇUKLU55	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SELÇUKLU 56	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SELÇUKLU 60	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SELÇUKLU 63	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SELÇUKLU 72	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KARATAY 75	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KARATAY 80	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KARATAY 84	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KARATAY 87	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KARATAY 93	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KARATAY 95	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KARATAY 96	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SARAYÖNÜ 112	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
KARAPINAR116	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KARAPINAR118	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
ÇUMRA 127	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
ÇUMRA 130	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
ILGIN 150	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
ILGIN 153	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
ILGIN 157	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
ILGIN 163	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
CİHANBEYLİ 165	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
CİHANBEYLİ 169	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
CİHANBEYLİ 170	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
BOZKIR 175	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
BOZKIR 176	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
AKÖREN 196	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
HADİM 210	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KADINHANI 201	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KADINHANI202	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SEYDİŞEHİR217	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SEYDİŞEHİR221	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SEYDİŞEHİR226	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
YUNAK 231	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
KULU 233	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+

H2S: Hidrojen sülfür, İN: İndol, JH: Jelatin hidrolizasyon, Glu: Glu-koz,
Lak: Laktoz, Man: Mannitol, Sak: Sakkaroz, KT: Katalaz, LD: Lizin- dekarboksilaz,
MR: Metil Red, VP: Voges Proskauer, ST: Sitrat, HA: Hareket, ÜR: Üre, +: Pozitif, -: Negatif

Bu çalışmada izole edilen 40 *E. coli* suşunun tamamı laktoz, glikoz, mannitol fermentasyonu, MR, indol pozitif olarak belirlenirken izolatlardan bir tanesi üreaz pozitif bulundu. Suşların tamamı hareketli, VP, H_2S ve sitrat aktiviteleri yönünden

negatif bulundu. Çalışmada izole edilen *E. coli* suşlarının biyokimyasal özellikleri Çizelge 3.4'te sunuldu.

Çizelge 3.5. Konya'da satışa sunulan küflü peynirlerden izole edilen bakteriler ve alındıkları yerler

İzole edilen bakteri türü	**Numune nosu ve alındığı yer**
E. coli	3-24-27-33-53-55-56-60-63-72-75-80-84-87-93-95-96-112-**116**-**118-127-130-150-**153***-157-163-165-**169***-170-175-176-196-201-202-210-217-221-226-231-233
Enterobacter aerogenes	1-2-30-76-77-79-81-88-89-90-91-92-94-121-128-141-145-151-155-159-167-168-176-194-198-199-222-223-225-232
Enterobacter cloacae	74-78-80-82-85-86-87-138-177-200
S.aureus	1-2-3-6-7-8-9-10-11-12-13-16-17-18-20-21-23-24-25-30-33-37-41-45-50-56-63-65-68-74-75-76-77-78-79-80-83-84-85-86-87-91-92-94-97-98-99-100-102-103-104-108-109-110-111-119-120-121-122-127-128-130-138-141-150-151-153-155-157-159-163-165-167-168-169-170-175-176-177-189-191-194-195-196-198-199-200-201-202-210-217-221-222-223-225-226-227-228-229-230-231-232-233

1-72 Nolu numuneler Selçuklu; 74-96 Karatay; 97-100 Meram; 102-111 Ereğli; 112 Sarayönü; 116-122 Karapınar; 127-130 Çumra; 138-163 Ilgın; 165-170 Cihanbeyli; 175-177 Bozkır; 189-191 Beyşehir; 194-196 Akören; 198-202 Kadınhanı; 210 Hadim; 217-226 Seydişehir; 227-230 Akşehir; 231-232 Yunak; 233 Kulu orjinlidir. 116** E. coli O157:H7; 153* E. coli O157;169* *E. coli* O157 suşlanı ifade etmektedir.

Konya ilinde satışa sunulan peynirlerden izole edilen bakteri türleri ve küflü peynirlerin temin edildikleri ilçeler Çizelge 3.5'te sunuldu.

4. TARTIŞMA

Dünyada peynir üretiminin yılda yaklaşık 17 milyon ton olduğu ve bunun % 4 düzeyinde arttığı tahmin edilmektedir (Tekinşen 2000). Ülkemizde yıllık toplam süt üretimi 1993 yılı'nda yaklaşık 7,5 milyon ton olup, bunun % 80'i süt ürünleri yapımında kullanılmıştır (Yaygın ve Kılıç 1993). Türkiye İstatistik Kurumu (http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&ust_id=13)'nun 2007 yılı geçici rakamlarına göre ise, koyun ve keçi sütü üretimi 1,01 milyon ton; inek (manda dahil) sütü üretimi ise 11,3 milyon ton olmuştur. Peynir, Türk Kültüründe çok eskilerden beri üretilmekte, yapımında çoğunlukla inek sütü ayrıca koyun, keçi ve manda sütü kullanılmaktadır (Tekinşen ve ark 2002, Kahraman 2006). Türkiye'de süt üretiminin yaklaşık % 20'si peynir olarak işlenmektedir (Ülgüray 1986).

Peynir; sütün peynir mayası, organik asitler veya starter kültürlerle pıhtılaştırılması, işlenmesi, tuzlanması, yöreye bağlı olarak tatlandırılması ve kokulandırılması (Küflü peynir-Konya veya Otlu peynir-Erzurum gibi) ile farklı süre ve sıcaklık derecelerinde olgunlaştırılarak elde edilen hayvansal bir üründür (Eralp 1974, Tekinşen ve ark 2002). Peynir üretiminde mikroorganizmalar önemli bir paya sahiptir. Gerek üretim ve gerekse muhafaza sürecinde peynirde bulunacak mikroorganizmalar doğrudan peynirin kalitesini ve sonuçta tüketici sağlığını etkiler (Keskin ve ark 1996, Yaygın ve Kılıç 1993, Aksu ve ark 1999, Erdoğan ve Sert 2004).

Ülkemizde üretilen süt ve süt ürünlerinin mikrobiyel kalitesi üzerine pek çok çalışma yapılmıştır (Yalçın 1987, Nizamlıoğlu ve ark 1989, Keskin ve ark 1996 Yaygın ve Kılıç 1993, Aksu ve ark 1999, Erdoğan ve Sert 2004, Akkaya ve ark 2007). Ancak küflü peynirlerin mikrobiyel kalitesi üzerinde sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Demirer 1973, Topal 1987, Hasenekoğlu 1988, Özkalp ve Durak 1998).

E.coli'nin çeşitli serotipleri, insan ve hayvanlardaki koli enfeksiyonlarından primer veya sekonder olarak sorumlu olan barsak kökenli gram negatif bakterilerdir Çorlu ve ark, 1990; Erganiş ve ark, 1992; Gülhan 2003). *E. coli* O157 H7 serotipi

insanlarda gıda ile bulaşan önemli bir barsak enfeksiyonuna (Hemolitik üremik Sendrom) sebep olur (Mead ve Griffin, 1998).

E.coli'nin biyokimyasal özellikleri incelendiğinde, suşlar arasında izole edildiği hayvan türüne göre bazı farklılıklar bildirilmektedir (Gülhan, 2003). Bu çalışmada izole edilen 40 *E. coli* suşunun tamamı laktoz, glikoz, mannitol fermentasyonu, MR, indol pozitif olarak belirlenirken izolatlardan bir tanesi üreaz pozitif bulundu. Suşların tamamı hareketli, VP, H_2S ve sitrat aktiviteleri yönünden negatif bulundu. İzole edilen 39 izolatın biyokimyasal özellikleri, Ülkemizde daha önce beyaz peynir üzerinde yapılmış bir çalışmada (Dülger ve Gücin, 1999) bildirilen *E. coli* suşlarının özellikleriyle uyumlu bulunmuştur.

Bir çalışmada (Colombo ve ark 1998) sığır orijinli 181 *E. coli* izolatının % 3.9'unun üreaz pozitif olduğu bildirilirken başka bir çalışmada (Gülhan 2003) ise bu oran % 100 olarak bildirilmiştir. Gülhan (2003) koyun ve kuzu orijinli *E. coli* izolatlarının (n:396) tamamının üreaz pozitif olduğunu rapor etmektedir. Çalışmamızda % 2.5 oranında bulunan bu enzime ait pozitiflik oranı literatür bilgileriyle uyum göstermekte ve bu oran, biyokimyasal aktivite çeşitliliği ile açıklanmaktadır.

Dülger ve Gücin (1999) Bursa yöresinde satışa sunulan peynirlerden yaptıkları örneklemede tüm numunelerin koliform içerdiğini, izole edilen 264 izolatın % 40.3'ünün *E. coli* olduğunu bildirmişlerdir. TS 591'e göre beyaz peynirde *E. coli* bulunmamalıdır (TS 591, 1995). Aynı araştırmacılar, peynirde (veya süt ürününde) bildirilen *E. coli* izolasyonunun fekal kontaminasyonu gösterdiğini ve izolasyon oranının yüksek olmasının ise numunelerde patojen mikroorganizmaların bulunabileceğine de işaret edilebileceğini bildirmişlerdir. Söz konusu araştırmada *E. coli* O157 H7 varlığı araştırılmamıştır. Diğer taraftan Aksu ve ark (1999) *E. coli* O157 H7'nin süt ve süt ürünlerinde çok az sayılarda veya oranlarda bulunmasının dahi halk sağlığı problemine yol açabileceğini çünkü etkenin patojenitesi yüksek bir bakteri olduğuna işaret etmişlerdir.

Aksu ve ark (1999) 6 farklı şehirden (İstanbul, Tekirdağ, Kırklareli, Edirne, Kocaeli, Diyarbakır) topladıkları 150 peynir numunesinde (tulum, kaşar, örgü ve

beyaz peynir) *E. coli O157:H7* varlığını araştırmışlar ve 50 salamura beyaz peynir örneğinden %2 oranında bakteri izolasyonunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Türkiye'de Kars yöresinde satışa sunulan peynirlerde *E. coli* O157:H7 varlığının araştırıldığı bir diğer çalışmada da söz konusu suşa rastlanmadığı bildirilmiştir (Baz ve ark 2002). Kayseri İlinde köy pazarlarında satılan taze peynirlerde *E. coli* O157:H7'nin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise hijyen indikatörü mikroorganizmaların % 13 oranında bulunmasına karşın hiçbir numunenin *E. coli O157:H7* bulundurmadığı tespit edilmiştir (Gümüşsoy ve Gönülalan 2005). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise Afyonkarahisar'da tüketime sunulan peynirlerde % 1 oranında *E. coli* O157:H7 bulunduğu bildirilmektedir (Akkaya ve ark 2007). Özetle daha çok çiğ sütten izole edilmekle beraber çeşitli peynir tiplerinden de *E. coli* O157:H7 izolasyonu yapılmıştır.

Konya Yöresine özgü bir süt ürünü olan Küflü peynir; tulum peynirinin olgunlaşmasını müteakiben tulumun çeşitli kısımlarından açılarak bodrum, mağara vb alanlarda bekletilmesi ile küflendirilmesi sonucu elde edilir. Küflü peynir, halkın geleneksel yöntemlerle üretip pazarladığı bir üründür (Özkalp ve Durak 1998).

Türkiye'de peynirlerde *E. coli* O157:H7 varlığının arştırıldığı az sayıda araştırma vardır (Gönül 1997, Aksu ve ark 1999, Aslantaş ve Yıldız 2002, Akkaya ve ark 2007). Ancak küflü peynirlerde *E. coli* O157:H7 kontaminasyonuna yönelik hiç bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Özkalp ve Durak (1998) Konya ilindeki pazarlardan ve Halk Sağlığı laboratuarına getirilen toplam 140 küflü peynir numunesini küf florası yönünden inceledikleri çalışmalarında *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait 9 tür izole etmişlerdir. Araştırmacılar en sık izolasyonun *Penicillium roquefortii* türü olduğunu ve bu türün dünyada bilinen diğer küflü peynir çeşitlerinin (Rokfort, Stilton ve Gorgonzola) üretiminde kullanılan starter kültür türü olduğunu bildirmişlerdir.

Türkiye'de geleneksel Küflü peynirlerde *E. coli* O157:H7'nin araştırıldığı ilk çalışma olan bu araştırmada söz konusu serotip % 1 oranında bulunmuştur. Ayrıca çalışmada, referans *E. coli* O157:H7 suşu (S.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji

lab. kültür koleksiyonu); negatif bir peynir numunesine inokule edilerek 30 gün boyunca laboratuvarda bekletilmiş ve 15. ve 30. günlerde yapılan ekimlerde suşun izolasyonu sağlanmıştır.

Küflü peynirlerde bulunan en önemli mikotoksinler, rokfortin, penisillik asit, *Penicillium roqueforti* (PR) toksini ve aflatoksinlerdir (Özkalp ve Durak 1998, Finoli ve ark 2001, Erdoğan ve Sert 2004). Rokfortinin mikroorganizmalar üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Kopp-Holtwiesche ve Rehm 1990) bu mikotoksinin Gram pozitif bakterileri inhibe ettiği ancak Gram negatif bakteriler üzerinde yüksek konsantrasyonlarında (100 µc/mL) dahi hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Küflü peynirde en fazla miktarda bulunan rokfortinin Gram negatif bakterilere etkisiz olması bu tür *E. coli* O157:H7'nin canlılığını sürdürmesi veya üremesi için oluşacak mikroortam şartlarının oluşmasına katkıda bulunabileceği kanısına varılmıştır.

Modern teknoloji kullanılarak üretilen peynirde pastörizasyon pıhtı oluşumu evresindeki düşük ph ve tuzlama aşamasında tuzun bakterisit etkisi sonucu üretim esnasında *E.coli*'nin üreme şansı kalmaz (Keskin ve ark 2006) Ancak küflü peynir daha çok halk elinde üretildiğinden ve pastörizasyon işlemine çoğunlukla tutulmadığından bu peynirde rasladığımız *E. coli* mevcudiyeti üretim süreci sonunda oluşan kontaminasyona bağlanabileceği gibi; çiğ süteki *E. coli* mevcudiyetine bağlanabilme olasılığı da tamamen dışlanamayacağı kanaatine varılmıştır.

Diğer çalışmalarda çalışanların ellerinde %8-10, tezgahlarda ise % 35 oranında *E.coli*'ye rastlanmış olması (Carrigue 2003) peynire elle temas sonucu kontaminasyonu oluşmakta ve çoğunlukla soğuk hava dolabının bulunmayışı sonucu bakteri için üreme fırsatını doğurmaktadır. Temiz iş elbisesi ve çöp bidonunu satışlarda çoğunlukla bulunmayışı, hem çalışanların hijyen anlayışını göstermekte hem de ortamın ve ürünün kontaminasyonunu kolaylaştıran ek faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Öte yandan T.S.E. (Anonim 1999) de belirtilen kurallara, pazarlarda çoğunlukla uyulmamaktadır. Çalışmamızda örnekleme yaptığımız küflü peynir satıcılarının % 85'inin iş elbisesi giymediği, %83'nün peyniri kapalı ve camlı

bölmede muhafaza etmediği, % 87'sinin soğuk hava dolabının bulunmadığı, %57'sinin çöp bidonunun bulunmadığı, %79'unun akar su tertibatının mevcut olmadığı belirlenmiştir. Peynire *E. coli* ve diğer bakterilerin bulaşmasında hijyenik kurallara uyulmamasının payı olabilir.

İncelenen küflü peynir numunelerinin % 34' ünde (80) koliform grubu bakteriye rastlanmış olması küflü peynirlerin üretim sonucunda oluşabilecek kontaminasyonu gösteren bir bulgudur.

Çalışılan örneklerde azımsanamayacak oranda % 43 *S.aureus* izolasyonu gerçekleşmiştir. Beyaz peynirlerde yapılan bir diğer çalışmada bu bakteri türünün izolasyon oranı % 66 olarak bildirilmiştir (Keskin ve ark. 2006). *S.aureus* gıda kökenli hastalıkların en sık tanımlanan patojen etkeni olup (Keskin ve ark 2006) çalışmamızda bu etkene yüksek oranda rastlanmış olması ayrıca dikkat çekilmesi gereken bir başka bakteriyel kontaminasyonu işaret etmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda örnekleme yapılan açık pazar alanı ve peynir satışı yapan satıcıların ilgili yasal düzenlemelere uymadıkları belirlenmiştir.

Bu çalışmada Konya ilinde satışa sunulan küflü peynirlerde ilk defa ve % 1 oranında *E. coli* O157:H7 izolasyonu yapılmıştır. Çalışma ile Konya küflü peynirlerinde de söz konusu serotipin bulunabileceği gösterilmiştir. Ayrıca % 66 oranında *S.aeureus* izolayonu gerçekleşmiştir. Satışa sunulan küflü peynirler, mevcut haliyle halk sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadır.

Peynirlerde patojen etkenlerin bulunması çoğunlukla üretim sonu kontaminasyonu akla getirmektedir ve alınacak yasal önlemler bu doğrultuda yoğunlaşmalıdır. Çalışanlar ve tezgahlar mutlaka yasal standartlar açısından sıkı denetime tutulmalı çalışanların gıda hijyeni bilinci geliştirilmelidir.

Küflü peynirlerin % 34'ünde koliform bakterilerin üremesi peynirlerin % 34'ünün tüketim için uygun olamadığının göstergesidir. Küflü peynirlerdeki mikroorganizma üremesinin başlıca nedeni sekonder kontaminasyonundan kaynaklandığından alınacak önlemlerin bu yönde yoğunlaşması gerekmektedir. Çalışanların gıda tüzüğüne uygun satış yapmaları gerekmektedir. Semt pazarlarındaki küflü peynir satıcılarına soğuk hava dolabı kullanma zorunluluğu getirilmeli ve ürünler burada mutlaka hijyen koşullarına uygun şekilde soğuk zincir kırılmadan saklanmalıdır. Her tezgahta çöp bidonu bulunmalı ve ağzı kapaklı olmalıdır. En büyük eksikliklerden bir diğeri de akar su tertibatının semt pazarlarında bulunmayışıdır.

Çalışanların dezenfektan madde içeren sıvı sabun ya da el temizlik jelleri kullanarak ellerini yıkamaları/temizlemeleri ve tezgâh temizliği konusunda bilgilendirilmeleri sağlanmalı, gerekli eğitimler uygulamalı olarak gösterilmelidir. Genelde satıcıların tezgâhlarında durgun su bulundurmakta ve bunu her türlü ihtiyaç için kullanmaktadırlar. Bu durumun ortadan kaldırılması gerekmektedir Semt pazarlarına belli bir düzen getirilmelidir. Şehir şebeke kullanım suyuna gereksinilen

iş kolları pazar yerlerinde belli bir alanda toplanarak bir akar su ile beraberinde atık suyunda toplanmasını sağlayacak bir düzen, sistem içersinde kurulmalıdır.

Unutulmaması gereken bir diğer önemli hedef kitle de küflü peynir tüketicisinin kendisi olmaktadır. Satın aldığı ürünü nasıl kullanıp, koruyacağı ve ne süre ile nerede, ne şekilde saklayacağının bilincinde olması gerekmektedir. Standardize işlemlerin hem üretim hem de denetleme yönünden sıkı bir şekilde uygulamaya geçirilmesi gereklidir.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA İLİNDE PAZARLARDA AÇIKTA SATILAN KÜFLÜ PEYNİRLERDE ENTEROHEMORAJIK ESCHERİCHIA COLI O157:H7 SUŞUNUN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

EDA AKÇAMLI
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2008

Bu araştırma, Konya ve yöresinde tüketime sunulan küflü peynirlerden *E. coli* O157:H7 nin izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla yapıldı. Araştırmada Konya ve yöresinde Kasım- 2007 ile Eylül- 2008 ayları arasında 30 semt pazarındaki 234 küflü peynir numunesi incelendi. Her bir peynir satıcısının tezgahındaki satışla sunulan açık ya da küflü peynirlerin içersine konuldukları plastik leğen vb. kaplardan aseptik şartlar altında 200 gramlık numuneler alındı.

Toplam 234 küflü peynir numunesinden 40 (% 17)' ından *E. coli* izole edildi. Tüm *E.coli*' lerin içinden 3(% 7.5) *E. coli O157* ve bunlar 1(% 2.5)'inde *E. coli* O157:H7 suşu izole edildi. Diğer bir patojen S.aureus'a % 43, indikatör mikroorganizmalardan koliform grubuna ise % 34 oranında rastlandı.

Sonuç olarak tüketime sunulan küflü peynir örneklerinde *E. coli O157:H7*' ye rastlanması, *E. coli* O157:H7 ile kontaminasyonun meydana gelebileceği halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike oluşturabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Küflü peynir; *E.coli*; *E. coli* O157:H7

7. SUMMARY

T.C

SELÇUK UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE

A STUDY ON THE PRESENCE OF *ENTEROHEMORRHAGIC ESCHERICHIA COLI* O157:H7 STRAIN IN BLUE CHEESE SOLD IN PUBLIC MARKETS IN KONYA PROVINCE

EDA AKÇAMLI

MIKROBIOLOGY DEPARTMENT

MASTER THESİS / KONYA-2008

This study vas carried out to isolate and identificate *E. coli* O157:H7 from blue cheese consumed in Konya region. The investigation was performed between November- 2007 and September- 2008 year between 30 puplic markets and 234 blue cheese merchants were chosen in the district of Konya. Specimens were taken from each stand and from each open product. Three series of specimens weighing 200 g each were collected.

From Out of 234 blue chesse samples, 40 (% 17) *E. coli* and 3 (% 7.5) *E. coli* O157 and 1(% 2.5) *E. coli* O157:H7 was isolated and identificated. Another pathogen S.aureus was isolated from 43% of the samples. Coliform group as an indizatör microorganis was detected 34 % of the blue cheese sold in the region.

In conclusion, this study indicates that the presence of *E. coli* O157:H7 in the blue cheese sold in province Konya occurred at 1% which represents a potantial healt hazard.

Key words : Blue cheese; E.coli; *E. coli* O157:H7

8. KAYNAKLAR

Abdullah NS, Davies R. Growth and toxin production of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) in the presence of sodium chloride. Suppl to J Appl Micr 2000;87(1) 15.

Acheson DW. How does *Escherichia coli* O157:H7 testing in meat compare with what we are seeing clinically? J Food prot 2000;63(6)819-821.

Akkaya L, Alişarlı M, Kara R, Telli R. Afyonkarahisar' da tüketime sunulan çiğ süt ve peynirlerde *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi. YYÜ Vet Bil Dergisi 2007;18(1):1-5

Aksu H, Özgen-Arun Ö, Aydın A,Uğur M. *E. coli O157:H7*'nin hayvansal kökenli çeşitli gıda maddelerinde varlığı Pendik Vet Mikrobiol Derg 1999;30:77-81

Anonim.Semt pazarları genel kuralları 1999;Türk Standartları Enstitüsü TS 10081

Aslantaş Ö, Yıldız P. Kars yöresinde hayvansal kaynaklı gıdalarda: *Escherichia coli* O157:H7 izolasyonu, Vet Bil Derg, 2002;18, 1-2, 107-111.

Aureli P, Di Cunto M, Maffei A, De Chiara G, Franciosa G, Accorinti L, Gambardella AM, Greco D. An outbreak in Italy of botulism associated with a dessert made with mascarpone cream cheese. Eur J Epidemiol; 2000;16: 913.

Bauer ME, Welch RA. Characterisation of A RTX Toxin From Enterohemorrhagic *Escherichia coli O157:H7*. Infection and Immunity 1996;64(1)167-175.

Baz E, Gülmez M, Güven A, Sezer Ç, Duman B. Kars ilinde satışa sunuşan çiğ süt ve taze beyaz peynirlerin Koliform grubu bakteri, *E. coli* ve *E. coli* O157:H7 yönünden incelenmesi. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg. 2003;9(2): 165-167

Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. J Clin Microbiol 2004;42, 1099–1108.

Bielaszewska F, Herbert S, Almut L, Rita P, Wolfgang R, Helmut T, Alois C, Jan J. Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermentation shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strains and a source of human disease. J Clin Microbiol 2000;38, 3470–3473.

Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Gonzalez EA, Bernardez MI, Alonso MP, Coira A. Verotoxinproducing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-*O157 VTEC* in ruminants, raw beef products, and humans. Exp Biol Med (Maywood) 2004;228, 345–351.

Boer ED, Heuvelink AE. Methods for the detection and ısolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli.* Symp Ser Appl Micr 2000;29:133S-143S.

Campbell J, Bang W, Isonhood J, Gerard PD, Drake MA. Effects of salt, acid, and MSG on cold storage survival and subsequent acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. Food Microbiol 2004;21:727–35.

Carrique-Mas JJ, Hokeberg I, Andersson Y, Arneborn M, Tham W, Danielsson-Tham ML, Osterman B, Leffler M, Steen M, Eriksson E, Hedin G, Giesecke J. Febrile gastroenteritis after eating on-Farm manufactured fresh cheese-an outbreak of listeriosis? Epidemiol Infect 2003;130:79.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds-Wisconsin, June 1998. Morb Mortal Wkly Rep 2000;44, 911–913.

Clavero MRS, Monk JD, Beuchat LR, Doyle MP. Inactivation of *E. coli* O157:H7, Salmonellae, and C. jejuni in raw ground beef by gamma ırradiation. Appl Envr Micr 1994;60(6)2069-2075.

Coia JE. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *E. coli* O157 infection. FEMS Immun. And Med. Microbiol. 1998; 20: 1-9.

Coia JE. Johnstan Y, Steers NJ, Hanson MF. A aurvey of the prevalance of *E. coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. Int. J. Food Microb. 2001; 66: 63-69.

Colombo S, Pacciarini ML, Fusi P. Isolation of new phenotypic variant of *Escherichia coli* O157:H7 from food. Vet.Rec.1998; 142: 144-145.

Çorlu M, Ateş M, Erganiş O, Kaya O. Konya bölgesindeki ishalli kuzulardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının çeşitli özellikleri üzerinde incelemeler. Tr J Vet Anim Sci. 1990;14:126-133.

Deschenes G, Casenave C, Grimont F, Desenclos J C, Benoit S, Collin M, Baron S, Mariani P, Grimont PAD, Nivet H .Cluster of cases of haemolytic uremic syndrome due to unpasteurised cheese, pediatr nephrol. 1998;10(2): 203-205.

Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S. *Escherichia coli* O157:H7. In "Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Eds MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville. ASM Press Washington D.C 1999; 768, 171-191.

Doyle MP. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. Int J Food Microbiol.1993;12 (4):289-301.

Duffy G, Riordan DCR, Sheridan JJ, Call JE, Whiting RC, Blair IS, McDowell DA. Effect of pH on Survival, Thermotolerance, and Verotoxin Production of *Escherichia coli* O157:H7 during Simulated Fermentation and Storage. J Food Prot 2000; 63:12–8.

Durch J, Ringhand T, Manner K, Proetor M, Davis J, Boxrud D. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds. Morbility, Mortality Weekly Report 2000; 49, 911–913.

Dülger B, Ay YD, Gücin F. Bursa'da satışa sunulan taze beyaz peynirlerden izole edilen koliform grubu bakterilerin tanılanması. Uludağ üniversitesi Biyoloji Dergisi 1999;8;32 17-20

Eileen P, Virginia WJ, Susan MF. *E. coli* O157:H7 Etiology, clinical features, complications and treatment. Nephrol. Nurs J, 2001; 28: 5.

Eralp M. Peynir teknolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları: 1974;533, Ankara.

Erdoğan A, Sert S. Erzurum piyasasında satılan çiğ sütlerin antibiyotik ve mikrobiyolojik yönden incelenmesi. Doğu Anadolu Tarım Kongresi. 2004;1677-1686

Erganiş O, Orhan G, Kaya O, Uçan US, Kuyucuoğlu Y. Kolibasillosisli tavuklardan izole edilen *Escherichia coli*'lerde Tip 1 pilus tiplendirmesi. Veterinarium1992;3: 7-12.

Erol İ . Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi Ders Notları. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2007; 82-93

Fantelli K, Stephan R. Prevalance and chararecteristics of Shigatoxin- producing *E. coli* and *L. monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. İnt. J. Food Microbiol.2001; 70: 63-69.

Fenlon DR, Wilson J. Growth of *Escherichia coli O157* in Poorly Fermented Laboratory Silage : A Possible Environmental Dimension in the Epidemiology of *E. coli O157*. Lett Appl Micr 2000;30(2)118-121.

Finoli C, Vecchio A, Gali A, Dragoni I. Roquefortine C occurrence in blue cheese. J Food Microbiol. 2001;33: 85-102.

Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Online www.fda.gov.tr/2002

Fujisawa T, Sata S, Aikawa K, Takahashi T, Yamai S, Shimada T. Modification of Sorbitol MacConkey Medium Containing Cefixime and Tellurite for the Isolation of *Escherichia coli O157:H7* from Radish Sprouts. Appl Envr Micr 2000; 66(7)3117-3118.

Ge B, Zhao S, Hall R ve Meng J. PCR-Elisa for detecting shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Microbes and Infection 2002;4, 285–290.

Gümüşsoy GF, Gönülalan Z. Kayseri ilinde köy pazarlarında satılan taze peynirlerde *Enterohemorajik Escherıchıa coli O157:H7* suşunun araştırılması. Sağlık bilimleri dergisi 2005;14(1)13-19

Gülhan T, İlhan Z, Boynukara B. Memeli ve kanatlı hayvanlardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Vet. Hek. Mikrobiyol. Derg. 3 (1-2): 39-44

Halkman AK, Noveir MR, Doğan HB. Çeşitli hayvansal gıda ürünlerinde *E. coli* O157:H7 Aranması. TÜBİTAK-VHAG-1192 Nolu Proje. Ankara Basılmamış 2003;75

Hasenekoğlu I. Erzurum ve çevresinde üretilen küflü peynirlerin mikrofungus florası üzerine bir araştırma. Kükem Derg. 1988;11(1): 35-42.

Hill WE, Datta AR, Feng P, Lampel KA, Payne WL. Identification of Foodborne Bacterial Pathogens by Gene Probes. In, Bacteriological Analytical Manual. (BAM) 6th Ed. US Food and Drug Administration. Published and Distributed by AOAC, 1999;Virginia. 31 Bölüm + 3 Ek,

Jay JM. Modern food Microbiology. Maryland 531-547

Johnson RP, Clarke RP, Wilson JB, Read SC. Growing Concerns and Recent Outbreaks Involving Non-O157:H7 Serotypes of Verotoxigenic *Escherichia coli*. J Food Prot 2000; 59(10)1112-1122.

Jones IG, Roworth M. An outbreak of *Escherichia coli O157* and campylobacteriosis with contamination of a drinking water supply. Pub. Health. 1996; 110: 277-282

Kahraman ÜC. Küfle olgunlaştırılan peynirler. Yüksek lisans semineri, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006;Konya.

Karapınar M, Gönül ŞA. Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar Gıda Mikrobiyolojisi. 2000; 109-164.

Keskin Y. Lokanta, Kafeterya ve Kebapçılarda Sağlık Risklerinin incelenmesi. [doktora]. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 1996

Kopp-Holtwiesche B, Rehm HJ. Antimicrobial action of roquefortine. J Environ.Pathol. Toxicol. Oncol. Jan-Apr; 1990; 10(1-2): 41-44.

Lahti E, Eklund M, Ruutu P, Siitonen A, Rantala L, Nuorti P, Honkanen-Buzalski T. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of Escherichia coli O157:H7 from dairy farms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21, 189–195.

Law D.Virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli*. J Appl Microbiol 2002; 88:729–45.

McClure P. The impact of *E. coli* O157 on the food industry. World J Microbiol Biotechnol 2000; 16, 749-755.Mead PS, Griffin PM (1998) Escherichia coli O157:H7. Lancet 10; 352(9135): 1207-1212.

Nizamlıoğlu M, Yalçın S, Tekinşen OC. Konya ve yöresindeki beyaz peynirin kalitesi doğa türk vet. Ve hayv. Derg.1989; 13 (2): 137-142.

Noveir MR, Halkman AK. A Study on Selective Broths and Agar Media for the Isolation of *E. coli* O157:H7 serotype. TÜBITAK Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi 2000;24(5)459-464.

Oyarz´abal OA, Nogueira MCL, Gombas DE. Survival of *Escherichia coli O157:H7*, Listeria monocytogenes, and Salmonella in juice concentrates. J Food Prot 2003;66:1590-1595

Özbaş Y, Aytaç A. *Escherichia coli* O157:H7 epidemiyolojisi, gıdalarla ilişkisi, patojenitesi ve izolasyon yöntemleri. Türk hjyen ve deneysel biyoloji dergisi 1998;52(1)47-53.

Özkalp B, Durak Y. Konya ve civarı küflü peynirlerinde küf florasının araştırılması. TÜBİTAK 22 1998; 341-346

Park S, Worobo R, Durst R. *Escherichia coli* O157:H7 As an Emerging Foodborne Pathogen : A Literature Review. Critical Reviews in Food Sci and Nutrition 1999;39(6)481-502.

Parry SM, Palmer SM. The Public Health Significance of VTEC O157. Supplement to J Appl Microbiology 2000; 87(1) S2.

Perna NT, Mayhew GF, Posfai G, Blattner FR. Genome sequence of entrohemorrhagic *E. coli O157:H7*. Nature 409 2002;33-50

Prachaiyo P, Mc L and Sborough LA. A Microscopic Method to Visualise *Escherichia coli* Interaction with Beef Muscle. J Food Prot 2000; 63(4)427-433.

Robinson RK, Batt CA, Patel PD. Encyclopedia of Food Microbiology, Academic Press, London;2000.

Sidjabat-Tambunan H, Bensink JC. Verocytotoxin-producing Escherichia coli from the faeces of sheep, calves and pigs. Aust. Vet. 1999; 75: 92-293.

Spano G, Goffredo E, Beneduce L, Tarantino D, Dupuy A, Massa S. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of mozzarella cheese. Letters in Applied Microbiology 2003;73-76

Tekinşen OC. Peynir Teknolojisi, Süt Ürünleri Teknolojisi Kitabı, Selçuk Üniversitesi Basımevi, 3.baskı, 2000;Konya.

Tekinşen OC, Atasever M, Keleş A, Tekinşen KK. Süt, yoğurt, tereyağı, peynir üretim ve kontrol. SÜ 2002;Basımevi Konya

Thompson JS, Hodge DS, Borczyk AA. Rapid biochemical test to ıdentify verocytotoxin - positive strains of *Escherichia coli* serotype *O157*. J Clin Micr 1992;28(10)2165-2168.

Topal Ş. Kaşar peynirinde yüzey küflenmenin getirdiği yüzey küfleri ve mikotoksin riskleri. Gıda Derg. 1987;12: 3-6.

Tortorello ML, Stewart DS. Antibody-Direct epifluorescent filter technique for rapid, direct enumeration of *Escherichia coli O157:H7* in beef. Appl Envr Micr 1994;60(10)3553-3559.

TS 591 Beyaz Peynir, Türk Standartları Enstitüsü, 1995;Ankara.

Tunail N. Mikrobiyel İnfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Alınmıştır, "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara, 2000;522 s". pp 81-184.

Uçan US, Erganiş O. Pratik Bakteriyoloji. Selçuk Üniversitesi Basımevi.Konya 2005;80-108

Upon P, Coia JE. Outbreak of *Escherichia coli O157* infections associated with pasteurized milk supply. Lancet, 1994;334: 1015

Ülgüray D. Türkiye'de süt sanayinin gelistirilmesi ile ilgili politikalar. Basbakanlık D.P.T. Iktidasi Plan Bsk. Yay ve Temsil Dairesi Matbaası. Ankara, 105-126, 1986.

Vernozy-Rozand C. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *Escherichia coli* O157:H7 in medicine and food industry. Ann Biol Clin (Paris) 2000; 57:507.

Watanable H. Japanese Outbreaks of *Escherichia coli O157*. Suppl to J Appl Micr 1999;87(1) S13.

WHO. Prevention and control enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections: Report of a WHO consultation. 1997;Geneva

Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the Hemolytic-Uremic syndrome after antibiotic treatment of *E. coli* O157:H7 ınfections. N Engl J Med 1987;342(26)1930-1936.

Yalçın S. Ankara ve yöresinde tüketime sunulan salamura beyaz peynirlerin mikrobiyel ve kimyasal içerikleri ile duyusal nitelikleri arasındaki ilişki. Doğa Türk Vet. Ve Hayv. D., 1987; 11 (2): 189-198.

Yaygın H ve Kılıç S. Süt endüstrisinde saf kültür. Altındağ matbaacılık. 1993; İzmir. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&ust_id=13

Yu Bruno. Immunomagnetic electrochemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella typhimurium in foods and environmental water samples. Appl. Environ. Microbiol. 1996;62, 587

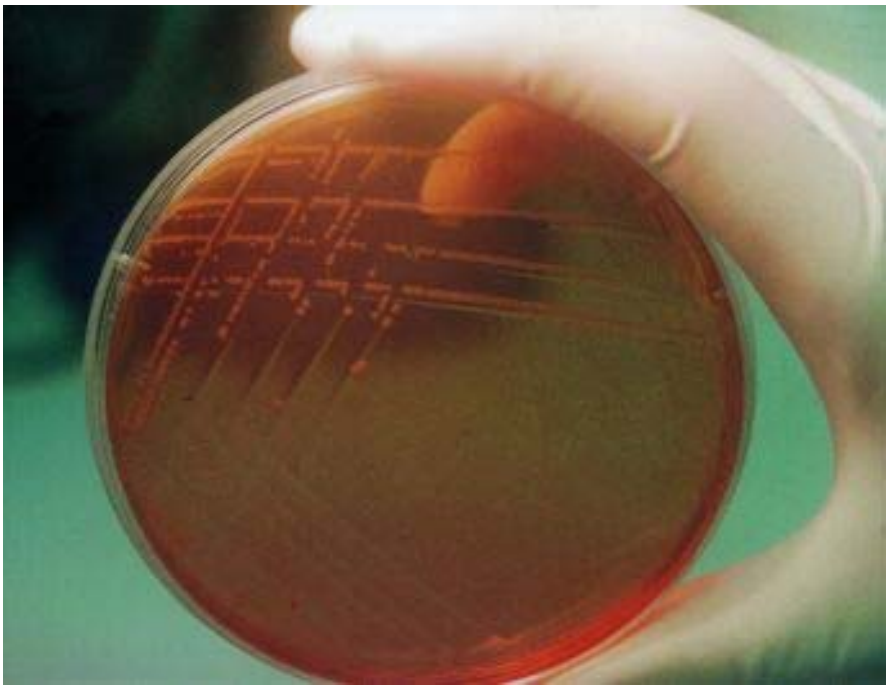
9. EKLER



EK.1. Stomacher Torbasında Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) ve Küflü Peynire Ait Önzenginleştirilmiş Besiyeri.



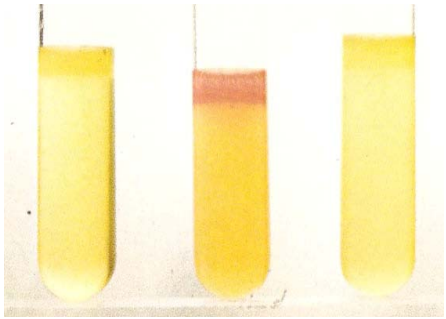
EK.2. 4-methylumbelliferyl-b-Dglucuronide (MUG) içeren Lauryl Sulphate Tryptose Broth (LSTB) Her tüplerdeki görünümü



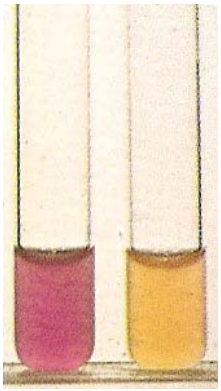
EK.3. Sorbitol MacConkey Agarda E. coli O157:H7’ nin kolonisi



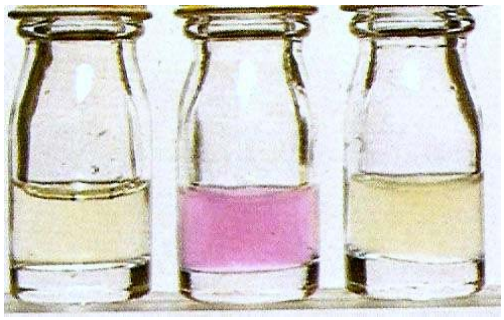
EK.4. Brillant Green Bile Broth gaz teşekkül eden tüpler



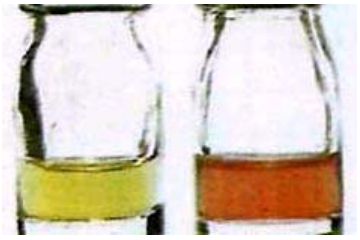
EK.5. İndol negatif ve pozitif suşlar



EK.6. Üreaz pozitif ve negatif suş



EK.7. Clark –Lubs Besiyeri**,** Voges Proskauer (VP) pozitif ve negatif suş



EK.8. Metil Red (MR) negatif ve pozitif suş



EK.9. Konya' nın ilçesi Bozkır pazarında tezgahlarda satışa sunulan küflü peynirlerden görünüm



EK.10. Konya'nın ilçesi Ilgın pazarında tezgahlarda satışa sunulan küflü peynirlerden görünüm

10. ÖZGEÇMİŞ

17.04.1984 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlk öğremini Bursa'da tamamladıktan sonra, 2001 yılında Bursa Anadolu Yıldırım Kız Meslek Lisesinden mezun oldu. 2002 yılında Selçuk Üniversitesi Mesleki Eğitim Fakültesi Beslenme öğretmenliğini bölümünü kazandı ve 2006 yılında mezun oldu. Aynı yıl Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.