

**T.C.  
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ADİYAMAN İLİNDEN VE ÇEVRE İLLERDEN TOPLANAN ETLERDE  
MULTİPLEX PCR KULLANILARAK *ESCHERICHIA COLI* İZOLASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU**

**AZİZ CEM BAKIR**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADİYAMAN, 2022**

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

#### ADİYAMAN İLİNDEN VE ÇEVRE İLLERDEN TOPLANAN ETLERDE MULTİPLEX PCR KULLANILARAK *ESCHERICHIA COLI* İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

**Aziz Cem BAKIR**

Adıyaman Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Muhsin AYDIN  
Yıl : 2022, Sayfa sayısı: 40  
Jüri : Doç. Dr. Muhsin AYDIN  
Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI  
Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Dünya genelinde, kırmızı etlerde ve bu etlerin kullanıldığı gıda ürünlerinde en fazla besin zehirlenmesine sebebiyet veren patojenik bakteri *Escherichia coli*'dir. *E. coli*'nin en çok tercih ettiği konak canlıının ruminantlar (geviş getirenler) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada Adıyaman'da ve çevre illerde tüketime sunulan kırmızı (sığır, koyun, keçi, vb.) etlerde ve bu etlerin kullanıldığı gıda mamullerinde *E. coli* bakterisinin varlıklarının tespiti ve genotipik sınıflandırılması amaçlanmıştır. Bu amaç için *E. coli* klasik kültür yöntemleri kullanılarak izole edildi ve bakteriyi spesifik olarak tanımlayabilen ve tespit edilmesini sağlayan uspA genini amplifiye edebilen primerler kullanıldı. Bu sayede, PCR testi yardımıyla *E. coli* genetik materyalinin varlığını tespit edildi. Bu örnekler daha sonra altı set primer (6 F ve 6 R) kullanılarak PCR yardımıyla genotipik olarak karakterize edildi. Çalışmamız dahilinde dört farklı ilden toplam 45 (25 adet büyükbaş ve 20 adet küçükbaş) örnek toplandı. Toplanan bu örneklerde toplam 68 farklı koloni üremesine rastlanmış olup bu kolonilerin DNA'sı uspA gen varlığı tespiti için duplike olarak çalışıldı ve 63 adedi (%92,6) *E. coli* pozitif sonucu verdi. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, uspA pozitif çıkan 63 örneğin, 22 adedi (%34,9) filogrup A, 9 adedi (%14,3) grup B1, 7 adedi (%11,1) grup B2, 3 adedi (%4,8) grup F, 5 adedi (%7,9) grup C, 2 adedi (%3,2) grup D, 2 adedi (%3,2) grup E, 13 adedi (%20,6) de U yani bilinmeyen filogrup olarak sınıflandırılmıştır.

Bilgilerimiz dâhilinde, ülkemizde bu tip besin hijyeni çalışmaları çok az sayıdadır. PCR yöntemi sayesinde patojenik bakteri erken varlık tespitlerinin, kontamine olmuş kırmızı et ve mamullerini tüketen şahısların erken uyarılması ile besin zehirlenmelerinin önüne geçilebileceği öngörülmekte olup halk sağlığının korunması amaçlanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Multipleks PCR, *Escherichia coli*, Karakterizasyon, Filogrup, Genetik Analiz

## ABSTRACT

### MSc Thesis

#### ***ESCHERICHIA COLI* ISOLATION AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION USING MULTIPLEX PCR IN MEAT SAMPLES COLLECTED FROM ADIYAMAN AND SURROUNDING PROVINCES**

**Aziz Cem BAKIR**

Adiyaman University  
Institute of Graduate Education  
Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Muhsin AYDIN  
Year : 2022, Number of pages: 40

Jury : Assoc. Prof. Dr. Muhsin AYDIN  
Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI  
Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

*Escherichia coli* is a pathogenic bacterium that causes the most food poisoning in red meats and food products using these meats worldwide. It has been reported that the most preferred host organism of *E. coli* is ruminants. In this study, it was aimed to determine the presence of *E. coli* bacteria and to classify the genotypic of the red (cattle, sheep, goat, etc.) meats offered for consumption in Adiyaman and the surrounding provinces and in the food products in which these meats are used. For this purpose, *E. coli* was isolated using classical microbiological culture methods. Previously designed primers that could specifically identify and amplify the *uspA* gene were used. In this way, the presence of *E. coli*'s genetic material was detected with the help of PCR test. These samples were then genotypically characterized by PCR using six sets of primers (6 F and 6 R). Within the scope of our study, a total of 45 (25 bovine and 20 ovine) samples were collected from four different provinces. A total of 68 different colonies were found in these collected samples, then their DNA were subjected to PCR (studied as duplicates) in order to determine the presence of *uspA* gene, and 63 (92.6%) of these colonies gave positive results for *E. coli*. According to the results of this study, of 63 samples that were positive for *uspA* classified as 22 (34.9%) phylogroup A, 9 (14.3%) group B1, 7 (11.1%) group B2, 3 (4%, 8) group F, 5 (7.9%) group C, 2 (3.2%) group D, 2 (3.2%) group E, 13 (20.6%) group U, unknown phylogroup.

To the best of our knowledge, the number of such food safety studies is low in our country. Thanks to the PCR method, it is predicted that the early presence of pathogenic bacteria can be detected, and food poisoning can be prevented by early warning of people consuming contaminated red meat and products. Therefore, by completing this study protection of the public health was aimed.

**Key Words:** Multiplex PCR, *Escherichia coli*, Characterization, Phylogroup, Genetic Analysis

## **DESTEKLER**

Bu tez çalışması, Adıyaman Üniversitesi BAP (ADYÜBAP) tarafından FEFYL/2020-0006 numaralı proje ile desteklenmiştir.



## BEYAN

“Adıyaman İlinden ve Çevre İllerden Toplanan Etlerde Multiplex PCR Kullanılarak *Escherichia coli* İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Aziz Cem BAKIR

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehberlik eden, yardımlarını esirgemeyen ve yüksek lisans süresi boyunca danışmanlığımı yapan hocalarım Sayın Doç. Dr. Muhsin AYDIN ve Sayın Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, hep yanımda olan babam İsmet BAKIR'a ve annem Tülay BAKIR'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, manevi desteğini hep yanımda hissettiğim amcam Zeynal BAKIR'a teşekkürü borç bilirim.

Projemizi maddi olarak destekleyen Adıyaman Üniversitesi BAP (ADYÜ-BAP) birimine ve personellerine teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                         |                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| ÖZET .....                                                                                                              | I                                       |
| ABSTRACT .....                                                                                                          | II                                      |
| DESTEKLER .....                                                                                                         | III                                     |
| BEYAN .....                                                                                                             | IV                                      |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                                          | V                                       |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                       | VI                                      |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                                 | VII                                     |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                                   | VIII                                    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                                                            | IX                                      |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                          | 1                                       |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....                                                                                               | 4                                       |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                                                              | 9                                       |
| 3.1. Kullanılan Kimyasallar .....                                                                                       | 9                                       |
| 3.1.1.Agaroz .....                                                                                                      | 9                                       |
| 3.1.2.10X Tris-Borate-EDTA (10X TBE) .....                                                                              | 9                                       |
| 3.1.3.Ethidium Bromür.....                                                                                              | 9                                       |
| 3.1.4.Loading Dye (Yüleme Boyası) .....                                                                                 | 9                                       |
| 3.1.5.Buffered Peptone Water (Peptonlu Su).....                                                                         | 9                                       |
| 3.1.6.Tryptic Soy Broth.....                                                                                            | 9                                       |
| 3.1.7.EMB (Eosin Methilen Blue) Agar .....                                                                              | 10                                      |
| 3.1.8.MacConkey Agar .....                                                                                              | 10                                      |
| 3.2. Kullanılan Cihazlar .....                                                                                          | 10                                      |
| 3.2.1.Kaba Terazı .....                                                                                                 | 10                                      |
| 3.2.2.Hassas Terazı.....                                                                                                | 10                                      |
| 3.2.3.Blender .....                                                                                                     | 10                                      |
| 3.2.4.İnkübatör .....                                                                                                   | 10                                      |
| 3.2.5.Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı .....                                                                              | 111                                     |
| 3.2.6.Termal Döngüleyici (Thermal Cycler).....                                                                          | 111                                     |
| 3.2.7.Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı.....                                                                            | 111                                     |
| 3.2.8.UV – Jel Görüntüleme Kabini.....                                                                                  | 11                                      |
| 3.3. Örneklerin Toplanması:.....                                                                                        | 11                                      |
| 3.4. Pozitif Kontrollerin Temini:.....                                                                                  | 11                                      |
| 3.5. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması ve Büyüme Koşulları:.....                                                       | 122                                     |
| 3.6. Besin Örneklerinin Hazırlanması ve <i>E. coli</i> Deteksiyonu ve Moleküler<br>Doğrulaması: .....                   | <b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b> |
| 3.7. <i>E. coli</i> İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu (Filogenetik<br>Sınıflandırma):.....                       | 133                                     |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                                                                           | 16                                      |
| 4.1 Kırmızı Etlerde <i>E. coli</i> Tespiti ve <i>uspA</i> Geninin Doğrulanması.....                                     | 166                                     |
| 4.2 Quadruplex PCR ile Genotipik Sınıflandırma .....                                                                    | 17                                      |
| 4.3 <i>trpA</i> ve <i>arpA2</i> genlerinin Varlık Tespiti = A veya C ile D veya E<br>Filogruplarının Belirlenmesi ..... | 18                                      |
| 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....                                                                                            | 21                                      |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                         | 23                                      |
| KİŞİSEL BİLGİLER .....                                                                                                  | 28                                      |
| Eğitim Durumu .....                                                                                                     | 28                                      |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1 Quadraplex PCR kullanılarak yapılan genotipler ve <i>E. coli</i> izolatlarının filo-gruplarına göre sınıflandırılması için gerekli adımlar ..... | 14 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|





## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.1 Örnek Sınıflandırmanın Gösterilmesi- Jel görüntüsü örneği. ....                                                                                                    | 14 |
| Şekil 4.1 Yapılan <i>E. coli</i> doğrulaması örneği, 884 bp'lik uspA genine ait<br>amplikonların jeldeki görüntüleri. ....                                                   | 16 |
| Şekil 4.2 İlk etapta test edilen 19 adet uspA pozitif örneğin filogenetik gruplandırma<br>amaçlı quadraplex PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü. ....                       | 17 |
| Şekil 4.3 İkinci etapta test edilen 14 adet uspA pozitif örneğin filogenetik<br>gruplandırma amaçlı quadraplex PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü. ....                    | 18 |
| Şekil 4.4 Filogrup A veya C olma olasılığı olan örneklerin spesifik olarak sadece grup<br>C'yi amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PCR sonrası jel görüntüsü. .... | 19 |
| Şekil 4.5 Filogrup D veya E olma olasılığı olan örneklerin spesifik olarak sadece grup<br>E'yi amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PCR sonrası jel görüntüsü. .... | 19 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

|       |                                               |
|-------|-----------------------------------------------|
| DNA   | : Deoksiribonükleik asit                      |
| EAEC  | : Enteroagregative <i>E. coli</i>             |
| EHEC  | : Enterohemorrajik <i>E. coli</i>             |
| EIEC  | : Enteroinvazive <i>E. coli</i>               |
| EMB   | : Eosin metilen blue                          |
| EPEC  | : Enteropathojenik <i>E. coli</i>             |
| ETEC  | : Enterotoksijenik <i>E. coli</i>             |
| HACCP | : Hazard Analysis and Critical Kontrol Points |
| HÜS   | : Hemolitik üremik sendrom                    |
| KOB   | : Koloni oluşturan birim                      |
| MLST  | : Multilokus dizi tiplendirmesi               |
| NTEC  | : Nekrotoksijenik <i>E. coli</i>              |
| PCR   | : Polimeraz zincir reaksiyonu                 |
| STEC  | : Shiga benzeri toksin üreten <i>E. coli</i>  |
| VTEC  | : Verotoksijenik <i>E. coli</i>               |

**1. GİRİŞ**

Günümüzde çoğu gıda steril olmadığı gibi, pişirim ile tüketime hazır, taze, konserve ya da fermente kırmızı et ürünleri de çoğunlukla steril olmayıp tehlike arz etmektedir. Bu gıdaların çoğu da çürükçül mikroorganizmalar vasıtasıyla bazen de patojen mikroorganizmalar vasıtasıyla kontamine edilmiş durumdadır. Etlerin yüzeyinde ve içindeki mikroorganizma çoğunlukla tehlike arz edebilir ve gıdanın kalitesini ve güvenliğini azaltabilir. Dolayısı ile bu tarz gıdaların tüketilmesi durumunda bazen gıda zehirlenmesi istenmeyen sonuçlar doğurabilmekte ve hukuki süreçlere yol açabilmektedir [1]. *Escherichia coli* O157: H7 ile enfeksiyon, Amerika Birleşik Devletleri ve dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Organizma, potansiyel olarak hemolitik üremik sendrom gibi yaşamı tehdit eden komplikasyonlara yol açabilen ciddi ishal hastalığına neden olur. *Escherichia coli* O157:H7 esas olarak sığır kaynaklı yiyeceklerle ilişkilendirilmektedir. Bununlar beraber, son yıllarda süt ve süt ürünleri, marul ve yonca filizi gibi çok çeşitli yiyecekler de bulaşma aracı olarak hizmet etmiştir [2].

Gıda hijyeni, gıdanın üretimden tüketimine kadar güvenliğini sağlamak için gerekli şartlar ve tedbirlerdir. Üretilen gıdanın tüketim için güvenli olması, herhangi bir gıda işleminin temel şartıdır. Gıda güvenliği temel bir ihtiyaçtır ancak etkili ve verimli süreçlerin geliştirilmesinde gözden kaçma tehlikesi vardır. Gıda güvenliği, gıda kaynaklı hastalık salgınlarında kritik bir sorun olmaya devam etmektedir ve bu da, bireyler, gıda endüstrisi ve ekonomi için önemli bir tehdit unsurudur. Gıda hijyenin eksikliği durumunda, gıda kaynaklı hastalıklara ve tüketicinin ölümüne yol açabilir. Kirlenmiş gıda günümüz dünyasında gastrointestinal hastalıklara (örn. akut ishal, bulantı, kusma ve karın ağrısı), beslenme durumunun bozulmasına ve hastalıklara karşı daha az direnç görülmesine neden olabilir. Bunun sonunda üretkenlik kaybı söz konusudur. Gıda satın alma, saklama, hazırlama ve tüketiminin çeşitli aşamalarında güvenli gıda-hijyen uygulamaları takip edilirse, gıda kontaminasyonundan kaynaklanan gastrointestinal hastalık büyük ölçüde önlenabilir [3], [4].

*Escherichia coli*, Enterobacteriaceae familyasına ait en önemli türlerden biridir. Bu bakteri basil şeklinde, spor üretmeyen, fakültatif anaerob olup Gram negatiftir. İlk olarak Theodor Escherich tarafından 1885 yılında yeni doğan bebeklerin

dışkılarında izole edilen bakteri "*Bacterium coli commune*", daha sonra *Escherichia coli* olarak isimlendirilmiştir [5]. Enterobacteriaceae ailesine bağlı, spor oluşturmeyen, çomak şekilli Gram negatif bir mikroorganizma olarak *E. coli* insan ve sıcak kanlı hayvanların barsak florasının doğal bir elemanıdır. *E. coli*'ler sekonder olarak besinlerin metabolize olmasına yardımcı olmanın yanında normal şartlar altında hiçbir hastalığa sebep olmazlar. Fakat buna rağmen *E. coli*'lerin bazı türleri taşıdıkları virülens genler sebebiyle patojenik özellikler gösterebilirler ve ishal, sepsis, idrar yolu enfeksiyonu, menenjit gibi intestinal ve extra-intestinal hastalıklara sebep olabilirler [6, 7]. *E. coli*'ler sahip oldukları patojenite mekanizmaları, ürettikleri toksin tipleri, neden oldukları klinik semptomlar, epidemiyolojileri ve O:H antijenlerine göre enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enterohemorrajik *E. coli* (EHEC), necrotoksijenik *E. coli* (NTEC), enteroinvazive *E. coli* (EIEC), ve enteroagregative *E. coli* (EAEC) olmak üzere altı ana grup altında toplanmaktadır [7]. Bu gruplar içerisinde EHEC'ler son yıllarda gıda kaynaklı enfeksiyonlarda sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. EHEC suşları lizojen bir bakteriyofaj tarafından kodlanan, vero hücrelerine toksik etki gösteren, protein sentezini inhibe eden Shiga-toksin benzeri verotoksin salgırlarlar [8]. 1982 yılında O'Brien ve arkadaşlarının bu verotoksin ile *Shigella dysenteriae* tip 1'in shiga-toksini arasındaki yakın homolojiyi göstermesiyle, bu mikroorganizma literatüre "Shiga benzeri toksin üreten *E. coli* (STEC)" olarak geçmiştir [9].

Epidemiyolojik olarak hayvanlarla yakın temas ve hayvansal ürünlerin tüketimi ile ilişkili olan STEC suşları zoonoz olması açısından önemlidir [10]. Bu suşların özellikle çocuklarda hemolitik üremik sendrom (HÜS), trombotik trombositopenik purpura ve hemorajik kolitise neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir [11]. Birçok STEC suşu bir ve/veya iki (Stx1 ve Stx2) shiga toksin üretmesine rağmen hepsi insan patojeni olarak önem arz etmemektedirler [12]. Yapılan çalışmalarla STEC suşları (1) HÜS salgının yaygın sebebi olan O157 suşları (2) nadir olarak salgınlara fakat daha yaygın olarak münferit vakalar ve münferit HÜS enfeksiyonuna sebep olan non-O157 suşları (O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM), (3) ishalden başka ciddi semptomları olmayan STEC suşları, (4) sadece düzensiz aralıklarla ortaya çıkan vakalara eşlik eden non-O157 suşları ve (5) insan patojeni olmayan suşlar olmak üzere 5 farklı seropatotipe ayrılmışlardır [13]. Bunlardan *E. coli* O157:H7 sadece Amerika'da yılda 63.000'in üzerinde vakadan sorumlu olan en tehlikeli STEC suşu olarak

tanımlanmaktadır [14]. Bu sebeple STEC suşları arasında en çok çalışılan serotiplerin başında gelmektedir. Non-O157 STEC suşlar ise yine Amerika'da yaklaşık 37.000 vakadan sorumlu olduğu tahmin edilmektedir [10], [11].

Geviş getiren hayvan dışkısının STEC insan enfeksiyonları için en önemli kaynaklardan biri olduğu düşünülmektedir. Almanya'da yapılan bir çalışmada büyükbaş hayvanlar ile STEC serotiplerinin neden olduğu hastalıklar arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur[15]. 3000'den fazla STEC vakasının incelendiği bir başka çalışma kilometre başına 100 sığır artmasının STEC enfeksiyon riskini %68 artırdığını göstermiştir [16].

*E. coli* suşlarının çoğu zararsız olmalarına karşın bazı serotipleri konaklarında ciddi sonuçlara varan gıda zehirlenmelerine sebebiyet verebilmektedirler [17]. Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) çok sayıda besin zehirlenmesine sebebiyet veren patojenlerdendir. İnsan hastalıklarına en çok neden olan STEC'ler arasında en iyi bilineni STEC-kaynaklı hastane vakalarının %89'una ve STEC-kaynaklı ölümlerin %100'üne sebep olan *E. coli* O157:H7'dir [14]. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri'ne (CDC) göre, *E. coli* O157:H7 gıda zehirlenmelerinden kaynaklı her sene ortalama 2.100 hastane vakasına ve 20 ölüme neden olmaktadır [14]. *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu gıda enfeksiyonlarının büyük bir çoğunluğu ruminant hayvanlardan elde edilen kırmızı et ürünlerinden kaynaklanmaktadır.

*E. coli* O157:H7'nin sebep olduğu hastane vakaları ve ölüm sayıları göz önünde bulundurularak gıdalarda ve gıda yüzeylerinde özellikle de kırmızı et ve mamullerinde taranması ve bu patojenin sayımı gıda güvenliği ve hijyeni açısından son derece büyük önem arz etmektedir. Hükümet yetkilileri ve gıda şirketleri ürünlerin tüketime sunulmasındaki her aşamada kontaminasyon durumlarını izlemek için temel mikrobiyolojik analiz yöntemleri (klasik kültür yöntemleri) kullanırlar. Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (Hazard Analysis and Critical Kontrol Points = HACCP) sistemi göz önünde bulundurularak her besin için uygun mikrobiyolojik yöntemin seçilmesi şarttır [18]. Bu sistem, ürün güvenliğini etkileyen tehlikelerin önceden belirlenmesi ve kontrol altına alınmasını sağlayan sistematik bir yaklaşımdır. HACCP gibi kontaminasyon önleyici sistemlerin uygulanması gıda güvenliğini arttırmıştır, fakat daha iyi patojen tarama yöntemleri geliştirilene kadar HACCP tam olarak etkili olamayacaktır [19]. Bu nedenle, HACCP ile entegre olarak çalışabilecek patojen tarama ve tanımlama hususunda etkili olabilecek yeni teknolojilerinin geliştirilmesi elzem hale

gelmiştir. Bu çalışmada kullanılan olan mltipleks (oklu) PCR ve singlepleks (tekli) PCR'lar ile *E. coli*'nin kırmızı etlerde ve ürünlerinde taranması ve karakterizasyonu tamamen mümkün olabilecektir. Bütün bunlarla beraber daha hızlı sonuçların eldesi sayesinde *E. coli* varlığı tespit edilebilecek olup halk sağlığının korunması sağlanacak ve ekonomik kayıpların önüne geçilebilecektir.



**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Gıda kaynaklı enfeksiyonların geniş yelpazesi zaman içinde değişmiştir; köklü patojenler kontrol ediliyor ve yenileri ortaya çıkıyor. Yeni patojenler, değişen ekolojinin veya potansiyel bir patojeni besin zincirine bağlayan teknolojinin değişmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Ayrıca, genellikle bakteriyofajlar yoluyla mobil virülans faktörlerinin aktarılmasıyla de novo ortaya çıkabilir. Gıda kaynaklı hastalık yükü hâlâ önemli. Örneğin, her dört Amerikalıdan birinin her yıl önemli bir gıda kaynaklı hastalıktan etkilendiği tahmin edilmektedir [20, 21]. Türkiye’de yapılan ve 2016-2020 yıllarını kapsayan bir çalışmaya göre gıda kaynaklı toplam zehirlenme sayısı 504 (aylık ortalama 42 vaka) olarak hesaplanmıştır [22]. Gıda kaynaklı bulaşıcı hastalıklardaki eğilimleri gösteren veriler, sanayileşmiş birkaç ülkeyle ve hatta daha az patojenle sınırlıdır. Gıda kaynaklı hastalık salgınları 30 faktör kadar eksik raporlanabileceğinden, gıdayla ilişkili gastroenterit vakalarının sayısının yılda 68 milyon ile 275 milyon arasında olduğu tahmin edilmektedir [23].

Gıdaların çeşitli hastalıkların bulaşmasında bir araç olarak önemi, özellikle hijyen standartlarının sıkı bir şekilde takip edilmediği veya uygulanmadığı gelişmekte olan ülkelerde belgelenmiştir [24]. Çok az hastalığın gıda ile kesin olarak ilişkilendirilebilmesi, gıda kaynaklı hastalıkların ne boyutta olduğunu tahmin etmeyi zorlaştırır ve bu bağlantılar genellikle sadece salgın durumlarında yapılır. Gıda kaynaklı hastalıklar her zaman akut gastroenterit ile sonuçlanmasa bile, gıda önemli bir hastalığı temsil eder. Bugüne kadar 250’den fazla farklı gıda kaynaklı hastalık tanımlanmıştır. Bu hastalıkların çoğuna gıda kaynaklı olabilen ve gıda zehirlenmesine neden olabilen çeşitli patojenik bakteriler, parazitler ve virüsler neden olur. Birçok bakteri türü, özellikle *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. ve *Listeria* spp. [25-30] gibi bakteriler dünya çapındaki birçok çalışma ile tanımlanmıştır. Geleneksel gıda kaynaklı hastalıklara ek olarak, *Escherichia coli* O157:H7 gibi gıda kaynaklı bakteriler giderek daha fazla rapor edilmektedir. Bu mikroorganizmaların varlığı gıda kaynaklı birçok salgına yol açabilir. Çoğu gıda, gıda hazırlama, paketlenme, depolama ve servis sırasında yetersiz temizlik nedeniyle kontamine olur. ABD’de Shawarma olarak satılan yiyeceğin kökeni Türkiye’ye kadar uzanmaktadır ve burada "çevirme" yani "döner" denilmektedir. Yunanca’da ise "dönmüş" anlamına gelen gyros denir. Ürdün, Orta Doğu, Avrupa,

Kanada ve diğer ülkelerdeki hazır gıda tüketicileri arasında daha popülerliği gittikçe artmakta. Temel olarak, dönen bir dikey şiş üzerine yağ şeritleri ve terbiyeli et parçalarının dönüşümlü olarak istiflenmesiyle hazırlanan kıyılmış et (sığır, kuzu veya marine edilmiş tavuk) sarmadır. İç kısmın çoğu çiğ kalırken, etin dışarıdan kavrulması sağlanır. Et servis için et bloğundan kesilir ve kalan et bloğu döner şiş üzerinde ısıtılmış halde tutulur. Shawarma sandviçleri, dilimlenmiş tavuk, sığır eti veya yağlı kuzu eti içerir, baharatlanır ve pide ekmeği içinde servis edilir. Bazı restoranlar, sandviçleri baharatlamak için yerel mayonez kullanır. Hazır bir gıda olan et ve tavuk döneri gibi gıdalar hazırlama, işleme ve servis sırasında patojenlerle kontaminasyona maruz kalma olasılığı çoktur ve iyi pişirilmedikleri takdirde gıda zehirlenmelerine sebebiyet verebilirler [31, 32]. Bu gıdalar, işleme sırasında kapsamlı bir şekilde manipüle edilir ve bu nedenle etin yanı sıra iç yüzeyinde de yüksek bakteri kontaminasyon seviyeleri potansiyeline sahiptir. Sonuç olarak, sadece çapraz kontaminasyonla değil, aynı zamanda bu tür fast-food endüstrisinde gözlemlendiği gibi az pişirme yoluyla da patojenlerin hayatta kalma ve bulaşma riski artar [31]. Gençer ve Kaya [32] 40 adet pişmiş döner örneğini kimyasal bileşim ve mikrobiyolojik kalite yönünden incelemişlerdir. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı ortalama 5,1 log kob/g olarak belirlemişlerdir. Laktik asit bakteri sayısı örneklerin %20'sinde, Enterobacteriaceae ve *S. aureus* sayıları ise örneklerin %60'ında saptanabilir sınırın altında olduğu rapor edilmiştir. Örneklerin %45'inde koliform grubu bakteri, %67,5'inde *E. coli*, %85'inde de *C. perfringens* sayılarını saptanabilir sınırlar altında olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte döner örneklerinin hiçbirinde *Salmonella* türlerine rastlamamışlar fakat 32 örneğin 8'inde *Listeria* türlerini tespit etmişlerdir. Benzer bir diğer çalışmada, Elazığ il merkezinde satılan 80 adet pişmiş (40 adet et ve 40 adet tavuk) döner örneklerinin mikrobiyolojik kalitesi kontrol edilmiş, et ve tavuk döner örneklerinin hiç birinde *S. aureus* ve *Clostridium perfringens* tespit edilemezken et döner örneklerinin 14'ünde (%35) ve tavuk döner örneklerinin 18'inde (%45) *E. coli*'nin 1.0 log<sub>10</sub> kob/g'ın üzerinde olduğu raporlanmıştır [33]. Benzer bir çalışma da İstanbul'da yapılmış olup yine pişmiş tavuk dönerlerin mikrobiyolojik kalitesi toplanan 30 örnekte araştırılmış ve 12 örnekte *Enterobacteriaceae*, 6 örnekte *E. coli*, 1 örnekte *Salmonella* spp. ve 5 örnekte *S. aureus* bakterilerine rastlanıldığı rapor edilmiştir [34].



Yukarıda da bahsedildiği üzere, gıda kaynaklı patojenler önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedirler. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157: H7, gıda kaynaklı başlıca patojenler olarak kabul edilir. *Salmonella* uzun zamandır gıda kaynaklı önemli patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Salmonelloz insidansı önemli ölçüde artmaktadır. Enfekte hayvanlar veya süt, diğer süt ürünleri, çiğ etler ve yumurtalar gibi ürünleri, insan salmonellozunun başlıca bulaşma yollarıdır. *L. monocytogenes*, özellikle hamile kadınlar, kanser hastaları ve yaşlılar ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler için tehlikeli olan listeriosis'e neden olur. *L. monocytogenes* geniş bir sıcaklık aralığında büyüyebilir. Süt, peynir, buz,krema, et ve yemeye hazır yiyecekler, insan listeriyozu için başlıca kontaminasyon kaynakları olarak bildirilmiştir . Enterohemorajik *E. coli* O157: H7, ağırlıklı olarak hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom gibi daha ciddi komplikasyonlar ile ilişkili olan önemli bir insan patojenidir. *E. coli* O157: H7'nin insandan insana bulaştığı gösterilmiş olmasına rağmen, enfeksiyonların çoğu kontamine kıyma, süt, su ve süt ürünlerinin tüketimiyle ilişkilendirilmiştir [35, 36].

*Escherichia coli*, sağlıklı hayvanların ve insanların bağırsak mikro florasının bir parçası olan bir bakteri grubudur. Bununla birlikte, *E. coli* O157 dahil olmak üzere belirli serogruplar, verotoksinler veya Shiga benzeri toksinler olarak bilinen toksinleri üretmelerine izin veren genleri taşıyabilir. Verotoksijenik *E. coli* (VTEC) geviş getiren hayvanlar için patojen değildir, ancak dünya çapında insanlarda ishal, hemorajik kolit, hemolitik-üremik sendrom ve bazen ölümle sonuçlanabilir. İnsanlara bulaşmanın en yaygın yolu kontamine çiğ ve az pişmiş et tüketimidir. Keçiler de dahil olmak üzere evcil geviş getiren hayvanlar *E. coli* O157 için doğal rezervuarlardır; bu nedenle insan enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde önemli bir rol oynarlar. Patojen taşınır bağırsak yolu ve dışkı ile atılır. Kesim sırasında, patojen hayvanın derisinde veya dışkısında bulunabilir ve iç organ çıkarma veya deri çıkarma sırasında karkasa geçebilir. Bu nedenle, kötü kesim teknikleri, özellikle kesim sırasındaki kötü hijyen uygulamaları, *E. coli* O157 ile et kontaminasyonu riskini büyük ölçüde artırır. Et kontaminasyonu riski, kesim hayvanlarının *E. coli* O157 taşıma durumuna da bağlıdır. Bu nedenle, et tüketicilerinin *E. coli*'ye maruz kalma riskinin belirlenmesinde kesim hijyeninin ve kesim öncesi hayvan popülasyonunun taşıma durumunun değerlendirilmesi esastır. *E. coli* O157. Ek olarak, enterik bakteriler arasındaki antimikrobiyal direnç, artan bir küresel halk sağlığı sorunudur. Antimikrobiyallerin yaygın olarak uygulanması,

bakteriyel enfeksiyonların tedavisini zorlaştıran antimikrobiyal dirençli suşların seçimini teşvik eder. Ayrıca, insan, hayvan ve çevre sağlığının iç bağlantısını vurgulayan Tek Sağlık konseptine göre antimikrobiyal direncin hayvan sağlığı ve çevre üzerinde de olumsuz etkileri vardır. Özellikle hayvancılık, antimikrobiyallerin yaygın olarak kullanıldığı sanayileşmiş ülkelerde antimikrobiyal direnç kaynakları olarak kabul edilir [36].

Diğer bir çalışmada, gıda kaynaklı hastalığa bağlı gastroenteritin, Etiyopya'da en yaygın hastalıklardan biri olduğundan bahsedilmiş ve ülkedeki her yaştan insan arasında önde gelen ölüm nedeni arasında olduğu bildirilmiştir [37]. Gıda kaynaklı patojenlerin sürveyans eksikliği, kötü hijyen koşulları ve mezbahalarda standart altı kesim uygulamaları ve çiğ et tüketiminin yaygın kültürel uygulaması, bunların hepsi Etiyopyalıların VTEC (Vero-sitotoksin üreten *E. coli* olarak da bilinir) gibi gıda kaynaklı patojenlere maruz kalma riskinin yüksek olmasına katkıda bulunan başlıca faktörler olduğunu belirtmişlerdir ve bu nedenle keçi etlerinde çoklu ilaç direncine sahip *E. coli* O157:H7 sürveyansını çalışmışlardır [37].

Gıda kaynaklı enfeksiyonlar küresel bir halk sağlığı sorunudur. O157 ve O157 olmayan birçok serotip dahil olmak üzere Shiga toksini üreten *Escherichia coli* (STEC), gıda kaynaklı hastalıkların önemli bir nedenidir. Sonuçlar, hafif bağırsak rahatsızlığından hemolitik üremik sendroma (HUS), son dönem böbrek hastalığına (ESRD) kadar uzanır ve ölüm bildirilen insidans genellikle düşük olmasına rağmen ciddi sonuçları olan büyük salgınlar meydana gelir. Bazı ülkeler STEC'in nüfus sağlığı üzerindeki etkilerini tahmin etmiş olsa da küresel bir tahmin yoktur [38].

*Escherichia coli*, birçok gıda kaynaklı hastalık vakasının temel kaynağı olarak rapor edilmiştir. Gıda kaynaklı hastalıkları önlemek için gıda muhafazası genellikle fiziksel veya kimyasal yöntemlerle yapılır. Ancak, bu yöntemler gıdanın kalitesini ve organoleptik özelliklerini azaltabilir. Antibiyotiğe dirençli bakteriler geliştirebileceğinden, antibiyotikler gibi kimyasal ajanların eklenmesi hala bir endişe kaynağıdır. Bakteriyofajlar, özellikle insan, bitki veya hayvan hücrelerini bozmadan bakterileri hedef alabilen virüsler oldukları için gıdaları korumak için doğal bir alternatif yöntemdir. Son yıllarda, bakteriyofajların biyokontrol olarak kullanımı, özgüllüğü, kendi kendini kopyalama kabiliyeti ve gıdada bol olması nedeniyle giderek artmaktadır. Bakteriyofaj, güvenliği sağlamak için minimum gereklilik olarak litik ve dönüştürücü olmamalıdır. Tavuk ve sığır eti dünya çapında en çok tüketilen etlerdir ve

gıda kaynaklı patojen bakterilerin ana rezervuarı olarak tanımlanmıştır. Tavuk ve sığır eti yüksek protein içeriğine sahiptir, bu nedenle bakteriler tarafından kolayca kontamine olabilirler [39].



**3. MATERİYAL ve YÖNTEM****3.1. Kullanılan Kimyasallar****3.1.1. Agaroz**

Tüm jeller için SIGMA marka, CAS numarası 9012-36-6 ve kimyasal formülü  $C_{24}H_{38}O_{19}$  olan agaroz kullanılmıştır.

**3.1.2. 10X Tris-Borate-EDTA (10X TBE)**

Tüm jel elektroforezi kullanımları için 1X olarak seyreltilmek üzere THERMO SCIENTIFIC marka hazır 10X'lik TBE solüsyonu kullanılmıştır.

**3.1.3. Ethidium Bromür**

Tüm jellerde UV altında görüntüleme yapabilmek için CAS numarası 1239-45-8 ve kimyasal formülü  $C_{21}H_{20}BrN_3$  olan SIGMA marka etidyüm bromür kullanılmıştır.

**3.1.4. Loading Dye (Yükleme Boyası)**

Amplikonlar elektroforeze tabi tutulmadan hemen önce agaroz jellere DNA yükleme yapılabilmesi için THERMO Scientific marka DNA Gel Loading Dye (6X) kullanılmıştır.

**3.1.5. Buffered Peptone Water (Peptonlu Su)**

Homojenize edilen et örneklerinden bakterilerin kurtarılması amacıyla MERCK marka peptonlu su kullanılmıştır.

**3.1.6. Tryptic Soy Broth**

İzole edilen bakterilerin genel çoğaltma işlemlerinde kullanılmak üzere MERCK marka tryptic soy broth kullanılmıştır.

**3.1.7. EMB (Eosin Methilen Blue) Agar**

*In vitro* yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde, Enterobacteriaceae familyasının patojen üyeleri ve koliform grup bakteriler için selektif katı besiyeri olarak kullanılır. Bu çalışmada, *Escherichia coli* türü bakterilerin üreyen tüm bakteri türleri arasından spesifik olarak seçilebilmelerini kolaylaştırmak için MERCK marka EMB agar kullanılmıştır.

**3.1.8. MacConkey Agar**

*In vitro* yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakteriler ve özellikle *Escherichia coli* 'nin geliştirilmesi ve sayılması için selektif katı besiyeri olarak MERCK marka MacConkey agar kullanılmıştır.

**3.2. Kullanılan Cihazlar****3.2.1. Kaba Terazî**

Et ağırlıklarının tartım işlemleri ve tüm kaba ağırlıklar 0,1 g duyarlılığı olan OHAUS marka Scout Pro modeli ile yapılmıştır.

**3.2.2. Hassas Terazî**

Tüm küçük ağırlıklar, 0,0001 g duyarlılığı olan OHAUS marka hassas terazî ile ölçülmüştür.

**3.2.3. Blender**

Kırmızı etlerin homojenizasyonu 1 L hacme sahip olan WARING marka blender ile yapılmıştır.

**3.2.4. İnkübatör**

Her aşamada bakterilerin çoğaltılması işlemleri, NÜVE marka EN-120 model

inkübatör ile gerçekleştirildi.

### **3.2.5. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı**

Bakteri örneklerinin DNA izolasyonu için kaynatılma işlemleri ve besiyerlerinin saf su içerisinde çözdürülme işlemlerinin tamamı VELD marka ARE model ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile yapıldı.

### **3.2.6. Termal Döngüleyici (Thermal Cycler)**

Tüm DNA çoğaltma işlemleri APPLIED BIOSYSTEMS marka Veriti modeli ile yapılmıştır.

### **3.2.7. Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı**

Agaroz jellere yüklenen DNA ampikonlarının boyutlarına göre elektriksel olarak yürütülmesi işlemlerinde THERMO marka elektroforez güç kaynağı ve yatay elektroforez tankı kullanılmıştır.

### **3.2.8. UV – Jel Görüntüleme Kabini**

Elektroforez sonrası jellerin görüntüleme işlemleri için VILBER LOURMAT marka UV – Jel görüntüleme kabini kullanılmıştır.

## **3.3. Örneklerin Toplanması:**

Adıyaman ve komşu iller olan Kahramanmaraş, Gaziantep ve Hatay sınırları içerisinde bulunan kırmızı et ve mamulleri satan yerel marketlerden rastgele sığır eti, koyun eti ve keçi etlerinden oluşan toplam 45 adet örnek toplanmıştır. Bu örneklerin, 25 adeti büyükbaş (sığır eti) ve 20 adeti küçükbaş (10 koyun ve 10 keçi eti) örneği idi.

## **3.4. Pozitif Kontrollerin Temini:**

Gıda hijyeni ön testlerinde pozitif suşlar kullanılmıştır. Bu amaçla, *E. coli* ATCC 25922 suşu Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

**3.5. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması ve Büyüme Koşulları:**

Bakteriler triptik soy broth içerisinde 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra inkübe edilen tüplerden 1 mL bakteri kültürü alınıp plastik tüplere aktarılmış ve 17.000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar alınıp, kalan hücreler 1 mL PBS (1 × phosphate buffered saline, pH 7,6) ile süspanse edilmiştir. MacConkey ve eosin metilen (EMB) blue agar kullanılarak petri kaplarındaki koloniler sayılarak mL'deki koloni oluşturan birim = KOB (yaklaşık canlı hücre sayısı) belirlenmiştir. Ayrıca EMB agar üzerinde turkuaz mavisi rengi ile koyu mor rengine kadarki renk yelpazesine giren tüm koloniler seçildi ve bu kolonilerin *E. coli* olup olmadığı polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR = polymerase chain reaction) doğrulanmak üzere DNA izolasyonları yapıldı. Yapılan PCR testinin doğruluğunun tespiti için daha önceden temin edilen pozitif kontrol suşunun da DNA'sı izole edildi ve *uspA* (universal stres protein) spesifik primerler varlığında ilgili gen bölgesi amplifiye edildi.

**3.6. Besin Örneklerinin Hazırlanması ve *E. coli* Deteksiyonu ve Moleküler Doğrulaması:**

Kırmızı et ve mamulleri her analizden 24 saat önce rastgele toplandı. Her bir örnekten 25 g alınıp 225 mL 1 ×'lik PBS (pH 7,6) içerisine konulup homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlar alınarak *E. coli* suşları bu besin homojenatlarına inoküle edildi. Bakteriler besin homojenatlarına konularak farklı dilüsyonlarda ( $1 \times 10^6$  KOB) eklendi. Bakteri inokülasyonlarından hemen sonra herhangi bir inokülasyon yapılmadan örneklerin test edilmesi işlemlerine başlandı. Oluşan kolonilerdeki her bir hücrede mevcut olan nükleik asidin hücre dışına çıkarılması ısı yardımıyla (95°C'de 5 dk) gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen DNA örneklerinden, bu kolonilerin *E. coli* olup olmadığı bu bakteriye özgü bir primer çifti yardımıyla ve moleküler bir yöntem olan PCR ile tespit edildi ve daha sonra bu bakterinin *E. coli* olması durumunda multiplex PCR kullanılarak genetik karakterizasyonu yapıldı [40–42]. Quadruplex PCR'de kullanılan primerler Clermont vd. [43] belirtmiş olduğu şekilde seçildi ve PCR koşulları bu çalışmada belirtilen metoda göre uygulandı [34]. İzole edilen *E. coli* kolonilerinin doğrulanması Chen ve Griffiths [44] tarafından tarif edildiği gibi evrensel stres proteini (*uspA*) geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu ile duplike

şu şekilde gerçekleştirildi; birincil denatürasyon 94°C’de 5 dk / ikincil denatürasyon 94°C’de 30 sn – annealing 56°C’de 30 sn – birincil uzama 72°C’de 30 sn (30 döngü) / ikincil uzama 72°C’de 5 dk. Birinci PCR aşaması bittikten sonra, oluşan tüm ampliconların gözlemlenebilmesi için jel elektroforezi yapıldı ve elektroforez sonunda tüm ampliconların oluşturduğu bantlar UV jel kabininde gözlemlendi ve fotoğraflandı.

### **3.7. *E. coli* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu (Filogenetik Sınıflandırma):**

Filotipik karakterizasyon yapmak için laboratuvarımızda bulunan thermal cyclers (ısı döngüleyici) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR = polymerase chain reaction) metodu uygulandı.

Bu amaç doğrultusunda 6 adet primer çifti kullanılmıştır. Bunlar Clermont ve vd. [43] belirtildiği üzere kullanılmış ve PCR koşulları da aynı şekilde uygulanmıştır. Kullanılan primerler, *chuA*, *yjaA*, Tspe4.C2, *arpA1*, *arpA2* ve *trpA*’dır. Bu primerlerden dört tanesi (*chuA*, *yjaA*, Tspe4.C2 ve *arpA1*) quadruplex (dördü bir arada) olarak PCR’de multipleks bir şekilde uygulanmıştır. PCR koşulları kısaca; birincil denatürasyon 94°C’de 4 dk / ikincil denatürasyon 94°C’de 5 sn – annealing 59°C’de 20 sn (30 döngü) / ikincil uzama 72°C’de 5 dk şeklinde olmuştur. *E. coli*’nin gruplandırması bu 4 genin bulunmalarına göre yine Clermont vd. [43] belirttiği gibi çizelge 1’e uygun şekilde yapılmıştır. İkinci PCR aşaması bittikten sonra, oluşan tüm ampliconların elektroforez sonunda oluşturduğu bantlar UV jel görüntüleme kabininde gözlemlendi ve fotoğraflandı.

D veya E grubunun belirlenmesi için ise *arpA2* primerleri kullanılmıştır. D veya E grubunun belirlenmesinde kullanılan kriter *arpA2* genine ait ampliconun (301 bp büyüklüğündeki bandın) varlığıdır. Yapılan PCR analizi neticesinde bant varlığı tespit edilmesi halinde, test edilen *E. coli* örneğinin filogrup E olduğu sonucuna varılmıştır. *arpA2* için PCR şartları şu şekilde kullanılmıştır; birincil denatürasyon 94°C’de 4 dk / ikincil denatürasyon 94°C’de 5 sn – annealing 57°C’de 20 sn (30 döngü) / ikincil uzama 72°C’de 5 dk şeklindedir. Ayrıca, çizelge 1’de de belirtildiği üzere A veya C grubunun belirlenmesinde kullanılan kriter *trpA* genine ait 219 bp uzunluğundaki amplicona ait bandın varlığıdır [43]. Yapılan PCR analizi neticesinde bant varlığı tespit edilmesi



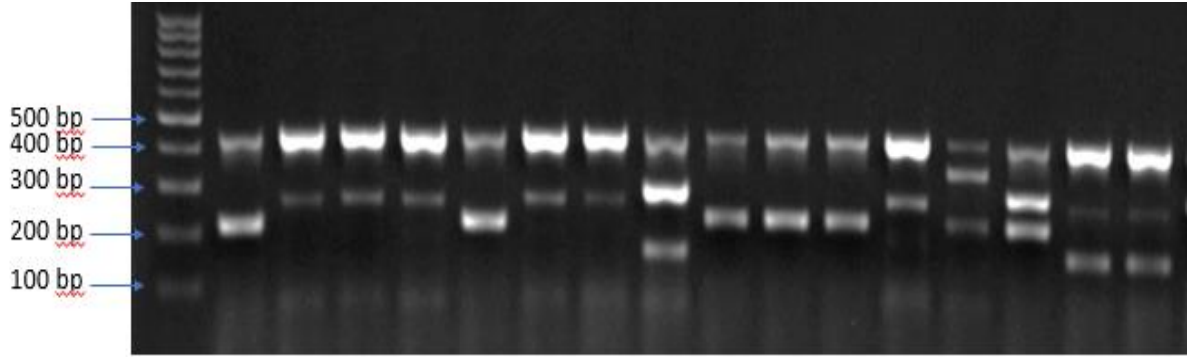
halinde, test edilen *E. coli* örneğinin filogrup C olduğu sonucuna varılmıştır. *trpA* için PCR şartları şu şekilde uygulanmıştır; birincil denatürasyon 94°C’de 4 dk / ikincil denatürasyon 94°C’de 5 sn – annealing 59°C’de 20 sn (30 döngü) / ikincil uzama 72°C’de 5 dk şeklindedir. Daha önce de belirtildiği üzere ampliconların varlığı üçüncü PCR aşaması bittikten sonra, UV jel görüntüleme kabininde gözlemlendi ve fotoğraflandı. Bant varlıkları doğrultusunda *E. coli* örneklerinin A veya C ya da D veya E grubu oldukları tespit edildi.

Clermont vd. [43] belirttiği üzere, çizelge 1’de bahsedilen kriterlerin hiçbirine uymayan filogruplar ise tanımlanamayan (U = unknown) filogrup olarak sınıflandırılmıştır. Aynı araştırmacıların tavsiye ettiği gibi bu grupların belirlenmesi için PCR’den farklı bir metot olan multilokus dizi tiplemesi (MLST = multilocus sequence typing) ile belirlenmeleri gerekmektedir.

**Çizelge 3.1** Quadruplex PCR kullanılarak yapılan genotipler ve *E. coli* izolatlarının filo-gruplarına göre sınıflandırılması için gerekli adımlar [43].

| Quadruplex genotipi     |                         |                         |                      | Filo-grup | Sonraki Aşama |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|-----------|---------------|
| <i>arpA</i><br>(400 bp) | <i>chuA</i><br>(288 bp) | <i>yjaA</i><br>(211 bp) | TspE4.C2<br>(152 bp) |           |               |
| +                       | -                       | -                       | -                    | A         | -             |
| +                       | -                       | -                       | +                    | B1        | -             |
| -                       | +                       | -                       | -                    | F         | -             |
| -                       | +                       | +                       | -                    | B2        | -             |
| -                       | +                       | +                       | +                    | B2        | -             |
| -                       | +                       | -                       | +                    | B2        | -             |
| +                       | -                       | +                       | -                    | A veya C  | <i>trpA</i>   |
| +                       | +                       | -                       | -                    | D veya E  | <i>arpA2</i>  |
| +                       | +                       | -                       | +                    | D veya E  | <i>arpA2</i>  |
| +                       | +                       | +                       | -                    | E         | -             |
| -                       | -                       | -                       | +                    | U         | MLST          |
| -                       | -                       | +                       | +                    | U         | MLST          |
| +                       | -                       | +                       | +                    | U         | MLST          |
| +                       | +                       | +                       | +                    | U         | MLST          |
| -                       | -                       | -                       | -                    | U         |               |

U = Unknown: bilinmeyen filogrup, bu örneklerin başka bir tiplendirme yöntemi olan MLST ile filogrubun belirlenmesi gerekir. A veya C ile D veya E sonucunu veren örnekler daha sonra C spesifik (*trpA*) ve E spesifik (*arpA2*) primerler kullanılarak PCR’ye tabi tutulacaklardır.



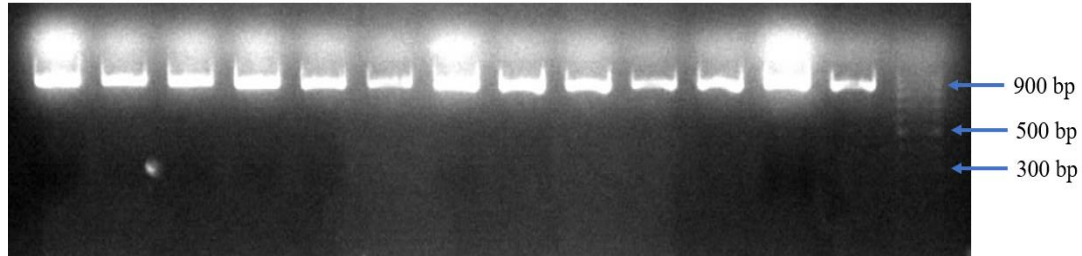
Şekil 3.1. Örnek Sınıflandırmanın Gösterilmesi- Jel görüntüsü örneği.

Birinci sütun DNA markırını, ikinci sütun iki bant (*yjaA* ve *arpA* genlerine ait amplikonlar) varlığını göstermektedir. Bu da, buradaki izolatın filogrup A veya C olduğuna işaretler. Benzer şekilde üçüncü sütun iki bant (*chuA* ve *arpA* genlerine ait amplikonlar) göstermektedir. Buradaki izolatın filogrup D veya E olduğuna işaretler. Bunların tespiti sırasıyla *trpA* ve *arpA2* genotiplerinin varlığına bakılarak yukarıda anlatıldığı gibi yapılmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kırmızı Etlerde *E. coli* Tespiti ve *uspA* Geninin Doğrulanması

Çalışmamız dahilinde dört farklı ilden (Adıyaman, Gaziantep, Kahramanmaraş ve Hatay) toplam 45 (25 adet büyükbaş ve 20 adet küçükbaş) kırmızı et örneği toplandı. Toplanan bu örneklerde toplam 68 farklı koloni üremesine rastlanmış olup bu kolonilerin 63 adedi (%92,6) PCR’de *uspA* geni varlık tespiti ile *E. coli* pozitif sonucu vermiştir (Şekil 4.1). Toplanan 25 adet büyükbaş kırmızı et numunesinin 24’ünde bakteriyel üremeye rastlanmış olup bu örneklerden toplam 41 koloni izole edilmiştir. Elde edilen izolatların 37 (%90,2)’sinde *uspA* genine rastlanmıştır. Öte yandan, toplanan 20 adet küçükbaş kırmızı et numunesinin 18’inde bakteriyel üremeye rastlanmış olup bu örneklerden toplam 26 koloni izole edilmiştir. Elde edilen izolatların tamamında (26 = %100) *uspA* genine rastlanmıştır. Bu da toplam büyükbaş ve küçükbaş kırmızı et örneklerinin %93,3’ünde (42/45’inde) *E. coli* bakterisine rastlandığını göstermektedir.

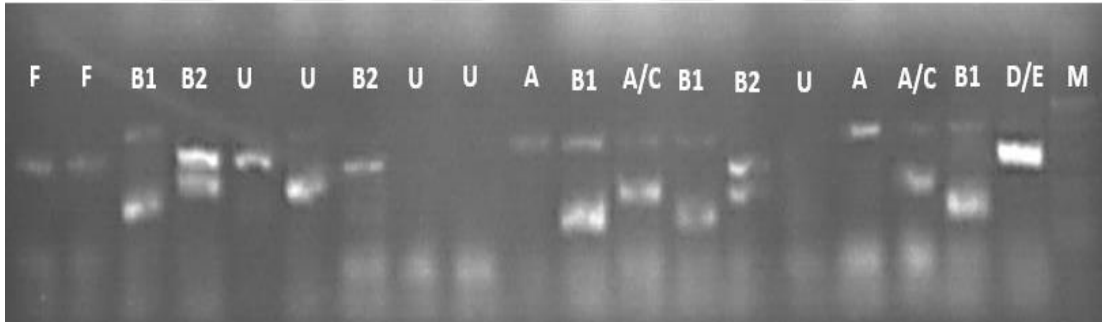


**Şekil 4.1** Yapılan *E. coli* doğrulaması örneği, 884 bp’lik *uspA* genine ait amplikonların jeldeki görüntüleri.

Kürekçi vd. [41] yaptıkları çalışmada, toplam 122 tavuk ve süt örneğinin 66 (%54,1) adedinde *E. coli* suşlarına rastlamışlardır. Bu çalışmada ise toplanan 45 kırmızı et örneğinin 42’sinde (%93,3) *E. coli* suşlarına rastlanmıştır. Aradaki insidans oran farkına bakıldığında insanlar için kırmızı et örneklerinin, tavuk ve süt örneklerinden daha tehlikeli olabileceği sonucu çıkarılabilir. Bununla beraber, elde edilen *E. coli* izolatlarının ancak antibiyotik direnç testleri ve genetik karakterizasyonu yapılırsa bu çıkarımın doğruluğunun kanıtlanabilme ihtimali olacaktır.

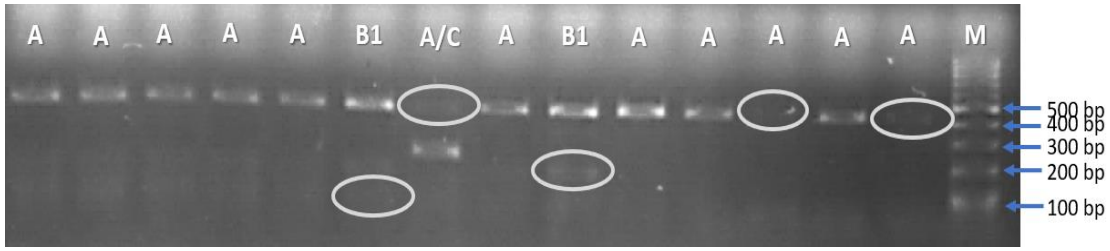
#### 4.2 Quadraplex PCR ile Genotipik Sınıflandırma

İlk etapta, elde edilen ve *uspA* pozitif olarak belirlenen 63 izolatın 19 tanesi quadraplex PCR ile filogruplandırma için çalışıldı (Şekil 4.2). Bunlardan, 2 adedi grup A, 4 tanesi grup B1, 3 tanesi grup B2, 2 tanesi grup F, 2 tanesi grup A veya C, 1 tanesi de grup D veya E, 5 tanesi de U yani bilinmeyen filogrup olarak sınıflandırılmıştır (sınıflandırmaya örnek teşkil eden jel görüntüsü Şekil 3.1’de verilmiştir). Geriye kalan 44 izolat da aynı şekilde quadraplex PCR’ye tabi tutuldu ve sınıflandırma yapıldı. Test edilen 19 izolatın 2 tanesinin A veya C, 1 tanesinin de D veya E olma ihtimali söz konusudur. Bu durum için de grup C spesifik ve grup E spesifik primerler kullanılarak singleplex PCR uygulanmıştır. Bunlarla beraber, daha önceki Clermont vd. [43] çalışmalarında bahsettikleri gibi filogrup U olarak tasnif edilen izolatlar farklı bir yöntem olan MLST ile başka bir çalışma kapsamında çalışılıp gruplandırmaları yapılabilecektir.



**Şekil 4.2** İlk etapta test edilen 19 adet *uspA* pozitif örneğin filogenetik gruplandırma amaçlı quadraplex PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü. Jel kuyucukları üzerinde yazan harfler filogrupları temsil etmektedir. A: grup A; A/C: grup A veya C; B1: grup B1; B2: grup B2; D/E: grup D veya E; F: grup F; U: bilinmeyen grup; M: 100 bp’lik DNA markırı.

İkinci etapta, *uspA* pozitif olarak belirlenen 63 izolatın 14 tanesi daha quadraplex PCR ile filogruplandırmaya tabi tutuldu (Şekil 4.3). Bunlardan, 11 adedi grup A, 2’si grup B1, ve 1 adedi grup A veya C olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3** İkinci etapta test edilen 14 adet *uspA* pozitif örneğin filogenetik gruplandırma amaçlı quadruplex PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü. Halka ile gösterilen kısımlarda bant varlığı vurgulamaktadır. Çekilen fotoğrafın inverse versiyonunda bu bantlar daha bariz bir şekilde görülebilmektedirler. Jel kuyucukları üzerinde yazan harfler filogrupları temsil etmektedir. A: grup A; A/C: grup A veya C; B1: grup B1; M: 100 bp'lik DNA markırı.

Üçüncü ve dördüncü etaplarda sırasıyla 13 ve 17 adet toplam 30 *uspA* pozitif *E. coli* izolatının DNA'sı quadruplex PCR ile filogenetik gruplandırmaya tabi tutuldu ve bunlardan, 9 adedi grup A, 3'ü grup B1, 4'ü grup B2, 1'i grup F, 2'si grup A veya C, 3'ü grup D veya E, 8 tanesi de U yani bilinmeyen filogrup olarak sınıflandırılmıştır (şekiller eklenmemiştir).

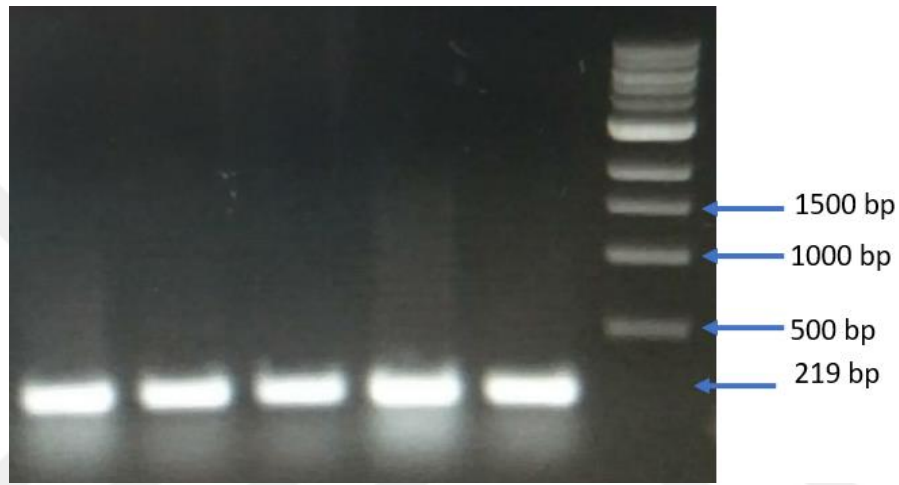
Quadruplex PCR'ye tabi tutulan toplam 63 *E. coli* örneğine filogenetik gruplandırma şu şekilde olmuştur. Test edilen örneklerin 22 adedi grup A, 9 adedi grup B1, 7 adedi grup B2, 3 adedi grup F, 5 adedi grup A veya C, 4 adedi grup D veya E, 13 adedi de U yani bilinmeyen filogrup olarak sınıflandırılmıştır. Bilinmeyen filogrup olan grup U olarak tasnif edilen izolatlar farklı bir yöntem olan MLST ile başka bir çalışma kapsamında çalışılması gerekmektedir. Bununla birlikte, grup A veya C ile D veya E filogruplarının tespiti için yapılan testlerin sonucu takip eden bölümde gösterilmiştir.

#### 4.3 *trpA* ve *arpA2* genlerinin Varlık Tespiti = A veya C ile D veya E

##### Filogruplarının Belirlenmesi

Filogenetik grup A veya C ile D veya E belirlenebilmesi için materyal ve yöntem kısmında belirtilen yöntem uygulanarak iki farklı singleplex PCR uygulandı. Filogrup A veya C'nin tespiti için *trpA* genine ait 219 baz çiftine (bç = bp) denk gelen bölgenin amplifikasyonu için PCR yapıldı. Aynı şekilde, filogrup D veya E'nin tespiti için *arpA* genine ait 301 bp'lik bölgenin amplifikasyonu için PCR yukarıda anlatıldığı gibi yapıldı ve amplikonların varlığı jelde görüntülendi. Sonuçlar şekil 4.4 ve 4.5'da

ki gibi gözlemlenmiştir. Bu şekillere göre, 5 adedi grup A veya C olma olasılığı olan örneğin tamamında bant gözlemlendi ve bu örneklerin tümünün filogenetik grup C olduğunun kanısına varıldı. Bununla beraber, 4 adedi grup D veya E olma olasılığı olan örneklerin 2 tanesinde filogrup E'ye spesifik olan *arpA* genine ait 301 bp büyüklüğündeki bandın varlığına rastlanmış ve bu örnekler filogrup E olarak sınıflandırılmıştır. Ancak, bu 4 örneğin 2 adedinde de *arpA* genine rastlanmamış olup bu örnekler filogrup D olarak tasnif edilmiştir.



**Şekil 4.4** Filogrup A veya C olma olasılığı olan örneklerin spesifik olarak sadece grup C'yi amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PCR sonrası jel görüntüsü (500 bp'lik DNA markırı kullanılmıştır).



**Şekil 4.5** Filogrup D veya E olma olasılığı olan örneklerin spesifik olarak sadece grup E'yi amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan PCR sonrası jel görüntüsü (250 bp'lik DNA markırı kullanılmıştır).

Yapılan tüm PCR sonuçlarına göre, *uspA* pozitif çıkan 63 örneğin, 22 adedi (%34,9) filogrup A, 9 adedi (%14,3) grup B1, 7 adedi (%11,1) grup B2, 3 adedi (%4,8) grup F, 5 adedi (%7,9) grup C, 2 adedi (%3,2) grup D, 2 adedi (%3,2) grup E, 13 adedi

(%20,6) de U yani bilinmeyen filogrup olarak sınıflandırılmıştır. Bilinmeyen filogrup olan grup U örneklerinin MLST ile sınıflandırılması gerekmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda benzer sonuçlara rastlanmıştır. Kürekçi vd. [41] yaptıkları çalışmada, toplam 122 tavuk ve süt örneğinin 66 adedinde *E. coli* suşlarına rastlamışlar ve bu suşları PCR yardımıyla filogenetik olarak karakterize etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, 51 örneğin D grubu, 13 örneğin A grubu ve 2 örneğin B2 grubuna dahil olduklarını bulmuşlardır. Bu çalışmada yapılan moleküler karakterizasyonun aksine hiç A veya C, B1 ve F filogrubuna rastlanmamıştır. Bu sonuca bakıldığında, çalışmamızda yer alan kırmızı et örneklerinde bulunan *E. coli* suşlarının çeşitliğinin tavuk ve sütlerdeki orana daha fazla olduğunu söyleyebiliriz.

Diğer bir çalışmada da yine Kürekçi vd. [45] nehirlerden ve su arıtma tesislerinden aldıkları su örnekleri üzerine yaptıkları çalışmada, toplam 65 su örneğinde *E. coli* suşlarına rastlamışlardır. Bu suşların, 33 adedinin filogenetik grup A, 14'ünün grup C, 7'sinin grup B, 6'sının grup E ve 5'inin grup D olduğunu göstermişlerdir.

**5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER**

Gıda hijyeni ve güvenliği günümüzde önemli ölçüde riskli hale gelmektedir. Bunun önde gelen sebepleri arasında da bakteriler yer almaktadır. Bu bakterilerin erken tespit ve teşhisi hayat kurtarıcı olabilir. Bu tez çalışmasında kullanılan PCR testi filogenetik gruplandırma için kullanılabilecek ekonomik ve hassasiyeti yüksek olan bir metot olduğu kanısına varılmıştır. PCR metodu, gıda örneklerinde var olabilecek patojen bakterilerin varlığını 6- 24 saat içerisinde tespit edebilecek hızlı bir deteksiyon tekniğidir. *E. coli* bakterilerinin halk sağlığı ve ekonomi üzerindeki zararlı etkileri ancak yüksek hassasiyet ve hızlılık kabiliyetine sahip tanımlama yöntemleriyle tespit edilebilir. Bununla birlikte, farklı bakterilerin sebep olabileceği gıda zehirlenmelerinden kaynaklı hastalanan insanları kurtarmak için zamanında hareket etmek gerekir ve bu amaçla tür düzeyinde bakterileri hızlı bir şekilde tespit etmek son derece önemlidir. Bu çalışmanın amacı, gıda örneklerinde etkin bir bakteri izleme metodu kullanılarak bakterilerin yalnız tür seviyesinde değil, aynı zamanda filogenetik grup düzeyinde tanımlamalarını yapabilmektir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle türe ve filogenetik gruplarına özgü DNA dizileri kullanılmış olup, bu diziler PCR yardımı ile çoğaltılmıştır.

Çalışmamızda kullanılmak amacıyla farklı illerden toplanan kırmızı et örneklerinin çoğunda 63/66'sında (%93,3) izin verilebilir seviyede de olsa *E. coli* varlığı tespit edilmiştir. Farklı illerden toplanan kırmızı et örneklerindeki bu benzerlik *E. coli* ve buna benzer bakterilerin ülkemizdeki kırmızı etlerdeki yayılma alanlarının fazlalığına örnek teşkil edebilir. Bu çalışmada tespit edilen *E. coli* izolatlarının 50 adedinin 7 farklı filogenetik gruba dahil edilebildiği sonucuna varılmıştır. Ancak, 13 adet *E. coli* izolatı bilinmeyen (U) filogrup olarak tasnif edilmiş ve bu örneklerin daha ileri seviye testlere tabi tutulması sonucuna varılmıştır. Filogenetik gruplandırması yapılan izolatlarda bilinmeyen grup (U) olarak sınıflandırılan filogenetik grupları tespiti için MLST analizi yapılması önerilmektedir. Böylelikle hangi gruba dahil edilebilecekleri tespit edilebilir. Ayrıca, bu bilinmeyen filogenetik grupların tespiti için daha spesifik primerler de dizayn edilebilir ve PCR'nin mütipleks özelliğinden yararlanılarak filogruplandırma yapılabilir.

Kırmızı etlerde bulunan *E. coli* türüne ait bakterilerin çok çeşitli filogenetik



gruplara ait olduğu saptanmıştır. Bu, *E. coli* türüne ait bakterilerin çoklu çeşitlenme ile gıda hijyeni ve güvenliği açısından çok tehlikeli bir unsur haline geldiğinin göstergesidir.

Filogenetik gruplandırması yapılan bakterilerin ilerleyen dönemlerde, çoklu antibiyotik direnç varlık tespitlerine yönelik çalışmaların yapılması ve buna benzer çalışmaların artırılması önerilmektedir.



**KAYNAKLAR**

- [1] Z. Sarisoy, “Mikrobiyal hastalık bulaştırma aracı olarak bazı fermente gıdaların adli bilimler açısından araştırılması,” İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2019.
- [2] P. M. FRATAMICO, L. K. BAGI, and T. PEPE, “A Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection and Identification of Escherichia coli O157:H7 in Foods and Bovine Feces†,” *J. Food Prot.*, vol. 63, no. 8, pp. 1032–1037, Aug. 2000, doi: 10.4315/0362-028X-63.8.1032.
- [3] A. Uçar, M. V. Yilmaz, and F. P. Çakıroğlu, *Food Safety – Problems and Solutions*. IntechOpen, 2016. doi: 10.5772/63176.
- [4] S. Kamboj, N. Gupta, J. D. Bandral, G. Gandotra, and N. Anjum, “Food safety and hygiene: A review,” *Int. J. Chem. Stud.*, vol. 8, no. 2, pp. 358–368, 2020, doi: 10.22271/chemi.2020.v8.i2f.8794.
- [5] S. T. Shulman, H. C. Friedmann, and R. H. Sims, “Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician?,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 45, no. 8, pp. 1025–1029, Oct. 2007, doi: 10.1086/521946.
- [6] J. M. Fairbrother, E. Nadeau, and C. L. Gyles, “Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies,” *Anim. Health Res. Rev.*, vol. 6, no. 1, pp. 17–39, Jun. 2005, doi: 10.1079/ahr2005105.
- [7] J. B. Kaper, J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley, “Pathogenic Escherichia coli,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2004, doi: 10.1038/nrmicro818.
- [8] P. K. Fagan, M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, and S. P. Djordjevic, “Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 2, pp. 868–872, Feb. 1999, doi: 10.1128/AEM.65.2.868-872.1999.
- [9] A. O. O’Brien, T. A. Lively, M. E. Chen, S. W. Rothman, and S. B. Formal, “Escherichia coli O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (SHIGA) like cytotoxin,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 1, no. 8326 Pt 1, p. 702, Mar. 1983, doi: 10.1016/s0140-6736(83)91987-6.
- [10] J. C. Paton and A. W. Paton, “Methods for detection of STEC in humans. An overview,” *Methods Mol. Med.*, vol. 73, pp. 9–26, 2003, doi: 10.1385/1-59259-316-

- [11] S. Grisaru, "Management of hemolytic-uremic syndrome in children," *Int. J. Nephrol. Renov. Dis.*, vol. 7, pp. 231–239, Jun. 2014, doi: 10.2147/IJNRD.S41837.
- [12] E. Büyükcangaz, M. Khider, A. Şen, M. Cengiz, and S. Sonal, "Detection of Shiga-Toxin Producing E.coli (STEC), Enteropathogenic E.coli (EPEC) And Enterotoxigenic E.coli (ETEC) From Animals By M-PCR," *J. Res. Vet. Med.*, vol. 38, no. 2, Art. no. 2, Dec. 2019, doi: 10.30782/jrv.m.624890.
- [13] M. A. Karmali *et al.*, "Association of genomic O island 122 of Escherichia coli EDL 933 with verocytotoxin-producing Escherichia coli seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 11, pp. 4930–4940, Nov. 2003, doi: 10.1128/JCM.41.11.4930-4940.2003.
- [14] E. Scallan *et al.*, "Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 17, no. 1, pp. 7–15, Jan. 2011, doi: 10.3201/eid1701.p11101.
- [15] C. Frank, S. Kapfhammer, D. Werber, K. Stark, and L. Herd, "Cattle Density and Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infection in Germany: Increased Risk for Most but Not All Serogroups | Vector-Borne and Zoonotic Diseases." <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2007.0237> (accessed Jun. 03, 2022).
- [16] J. E. Valcour, P. Michel, S. A. McEwen, and J. B. Wilson, "Associations between Indicators of Livestock Farming Intensity and Incidence of Human Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Infection," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 8, no. 3, pp. 252–257, Mar. 2002, doi: 10.3201/eid0803.010159.
- [17] T. Li *et al.*, "Draft Genome Sequence of Escherichia coli LCT-EC106," *J. Bacteriol.*, vol. 194, no. 16, pp. 4443–4444, Aug. 2012, doi: 10.1128/JB.00853-12.
- [18] S. H. Park *et al.*, "Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of Salmonella in poultry and poultry products," *Food Microbiol.*, vol. 38, pp. 250–262, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.fm.2013.10.002.
- [19] A. K. Bhunia, "Biosensors and bio-based methods for the separation and detection of foodborne pathogens," *Adv. Food Nutr. Res.*, vol. 54, pp. 1–44, 2008, doi: 10.1016/S1043-4526(07)00001-0.
- [20] T. Bintsis, "Foodborne pathogens," *AIMS Microbiol.*, vol. 3, no. 3, pp. 529–563, Jun. 2017, doi: 10.3934/microbiol.2017.3.529.
- [21] "Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- 10 States, 2009." <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5914a2.htm> (accessed Jun. 03,

2022).

- [22] B. Bařaran, “A Study of Food Poisoning Cases in Turkey from 2016 to 2020 According to the Written and Visual Media,” *Akad. Gıda*, pp. 281–290, Oct. 2021, doi: 10.24323/akademik-gida.1011221.
- [23] J. Barrett and C. N. Fhogartaigh, “Bacterial gastroenteritis,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 45, no. 11, pp. 683–689, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.mpmed.2017.08.002.
- [24] T. Parlak, “GIDA ÜRÜNLERİ ÜRETİMİNDE HİJYEN KAVRAMINA FARKLI BİR BAKIŞ,” *OHS Acad.*, pp. 82–110, Aug. 2020, doi: 10.38213/ohsacademy.740235.
- [25] K. Wessels, D. Rip, and P. Gouws, “Salmonella in Chicken Meat: Consumption, Outbreaks, Characteristics, Current Control Methods and the Potential of Bacteriophage Use,” *Foods*, vol. 10, no. 8, p. 1742, Jul. 2021, doi: 10.3390/foods10081742.
- [26] K. R. Schneider, R. M. Goodrich, M. J. Mahovic, and R. Shukla, “Preventing Foodborne Illness: Shigellosis,” *EDIS*, vol. 2005, no. 12, May 2019, doi: 10.32473/edis-fs128-2005.
- [27] J. Xia *et al.*, “High Prevalence of Fluoroquinolone-Resistant Campylobacter Bacteria in Sheep and Increased Campylobacter Counts in the Bile and Gallbladders of Sheep Medicated with Tetracycline in Feed,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 85, no. 11, pp. e00008-19, Jun. 2019, doi: 10.1128/AEM.00008-19.
- [28] K. Umeda *et al.*, “Molecular and epidemiological characterization of staphylococcal foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* harboring seg, sei, sem, sen, seo, and selu genes without production of classical enterotoxins,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 256, pp. 30–35, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.023.
- [29] K. R. Schneider, R. Goodrich-Schneider, P. Kurdmongkoltham, and B. Bertoldi, “Preventing Foodborne Illness Associated with,” p. 4.
- [30] H. Zhang *et al.*, “*Listeria monocytogenes* Contamination Characteristics in Two Ready-to-Eat Meat Plants From 2019 to 2020 in Shanghai,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, 2021, Accessed: Jun. 04, 2022. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.729114>
- [31] L. Nimri, F. A. A.- Dahab, and R. Batchoun, “Foodborne bacterial pathogens recovered from contaminated shawarma meat in northern Jordan,” *J. Infect. Dev. Ctries.*, vol. 8, no. 11, Art. no. 11, Nov. 2014, doi: 10.3855/jidc.4368.
- [32] K. V. Gençer and M. Kaya, “Yaprak dönerin mikrobiyolojik kalitesi ve kimyasal bileřimi,” *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, vol. 28, no. 6, Art. no. 6, 2004.

- [33] G. Öksüztepe and P. Beyazgül, “Elazığ ’da satılan pişmiş et ve tavuk dönerlerin mikrobiyolojik kalitesi,” *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilim. Vet. Derg.*, vol. 28, no. 2, Art. no. 2, 2014.
- [34] A. Ünver Alçay, “Investigation of Microbiological Quality of Cooked Chicken Doner Sold in Istanbul,” *Türk Mikrobiyoloji Cemiy. Derg.*, 2019, doi: 10.5222/TMCD.2019.074.
- [35] M. A. Ameer, A. Wasey, and P. Salen, “Escherichia Coli (E Coli 0157 H7),” in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Accessed: Jun. 03, 2022. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507845/>
- [36] B. I. Ajuwon, S. K. Babatunde, O. M. Kolawole, A. E. Ajiboye, and A. H. Lawal, “Prevalence and antibiotic resistance of Escherichia coli O157:H7 in beef at a commercial slaughterhouse in Moro, Kwara State, Nigeria,” *Access Microbiol.*, vol. 3, no. 11, p. 000289, Nov. 2021, doi: 10.1099/acmi.0.000289.
- [37] F. Dulo, A. Feleke, B. Szonyi, R. Fries, M. P. O. Baumann, and D. Grace, “Isolation of Multidrug-Resistant Escherichia coli O157 from Goats in the Somali Region of Ethiopia: A Cross-Sectional, Abattoir-Based Study,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 11, p. e0142905, Nov. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0142905.
- [38] S. E. Majowicz *et al.*, “Global Incidence of Human Shiga Toxin–Producing Escherichia coli Infections and Deaths: A Systematic Review and Knowledge Synthesis,” *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 11, no. 6, pp. 447–455, Jun. 2014, doi: 10.1089/fpd.2013.1704.
- [39] C. Lukman, C. Yonathan, S. Magdalena, and D. E. Waturangi, “Isolation and characterization of pathogenic Escherichia coli bacteriophages from chicken and beef offal,” *BMC Res. Notes*, vol. 13, no. 1, p. 8, Jan. 2020, doi: 10.1186/s13104-019-4859-y.
- [40] M. Aydin, J. Carter-Conger, N. Gao, D. F. Gilmore, S. C. Ricke, and S. Ahn, “Molecular identification of common Salmonella serovars using multiplex DNA sensor-based suspension array,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 10, pp. 2637–2646, Apr. 2018, doi: 10.1007/s00216-018-0938-5.
- [41] C. Kürekci *et al.*, “Evaluation of bulk tank raw milk and raw chicken meat samples as source of ESBL producing Escherichia coli in Turkey: Recent insights,” *J. Food Saf.*, vol. 39, no. 2, p. e12605, 2019, doi: 10.1111/jfs.12605.
- [42] C. Kürekci, M. Aydın, İ. O. Tekeli, P. Ambarcıoğlu, S. A. Şengül, and F. Sakin, “Occurrence and characterization of ciprofloxacin-resistant Escherichia coli from

- bovine and ovine bulk tank milk samples in Turkey,” *J. Food Saf.*, vol. 41, no. 2, p. e12881, 2021, doi: 10.1111/jfs.12881.
- [43] O. Clermont, J. K. Christenson, E. Denamur, and D. M. Gordon, “The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups,” *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 5, no. 1, pp. 58–65, Feb. 2013, doi: 10.1111/1758-2229.12019.
- [44] J. Chen and M. W. Griffiths, “PCR differentiation of *Escherichia coli* from other gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 27, no. 6, pp. 369–371, Dec. 1998, doi: 10.1046/j.1472-765x.1998.00445.x.
- [45] C. Kürekci, M. Aydin, M. Yipel, M. Katouli, and A. Gündoğdu, “Characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Asi (Orontes) River in Turkey,” *J. Water Health*, vol. 15, no. 5, pp. 788–798, Jul. 2017, doi: 10.2166/wh.2017.257.