

Anahtar Kelimeler: Manda, karkas, mezbaha, *E. coli* O157:H7, İstanbul

Araştırma Makalesi

MANDA KARKASLARI VE REKTAL SWABLARINDA *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Aysun YILMAZ*, Hüseyin GÜN**

Geliş Tarihi : 19.9.2007

Kabul Tarihi : 03.10.2007

Investigations on the presence of *Escherichia coli* O157:H7 on buffalo carcasses and rectal swabs

Abstract : The aim of this study was to investigate presence of *E. coli* O157:H7 on rectal swabs and buffalo carcasses slaughtered in the abattoirs. Five abattoirs in İstanbul were visited between January 2000 and 2001. During visits, systematic sampling method was used and a total of 28 buffalo and their carcasses were sampled. All the swabs were placed in modified *E. coli* broth containing Novobiocin. Immunomagnetic separation (IMS) was performed after the preenrichment. The product from the IMS was used for further identification procedures using the Cefixime Tellurite MacConkey agar (CT-SMAC) agar, Chrom agar and biochemical tests. The reaction of the isolates with anti-O157 and H7 sera were also analysed. Seven isolates from the rectal swabs and 2 from the carcasses were sorbitol negative on CT-SMAC agar. None of these isolates reacted with antisera to *E. coli* O157 nd H7.

Key Words: Buffalo, carcasses, abattoir, *E. coli* O157:H7, İstanbul

Özet : Bu çalışmanın amacı mandalardan alınan rektal swab örneklerinde ve manda karkaslarında *E. coli* O157:H7 varlığının araştırılmasıdır. Bu amaçla, İstanbul'da bulunan 5 mezbaha Ocak 2001 ve Ocak 2002 tarihleri arasında ziyaret edildi. Sistematik örnekleme yöntemiyle toplam 28 mandanın rektumlarından ve karkaslarından swablar alındı. Alınan swablar Novobiocin içeren modifiye *E. coli* broth içine konuldu. İnkübasyondan sonra immunomanyetik separasyon (IMS) yapıldı ve IMS ürünü daha sonraki identifikasyon çalışmaları için Cefixime Tellurite MacConkey (CT-SMAC) agara ekildi. İdentifikasyon amacıyla krom agara ekimler, biyokimyasal ve serolojik testler yapıldı. İzolatların anti-O157 ve H7 serumu ile reaksiyonu incelendi. Rektal swablardan izole edilen 7 ve karkaslardan izole edilen 2 izolat CT-SMAC agarda sorbitol negatif koloniler oluşturdu. Bu izolatların hiçbirisi *E. coli* O157 ve H7 antiserumu ile aglutinasyon oluşturmadı.

* Çevre Endüstriyel Analiz San. Ve Tic. A.Ş., Kağıthane/İstanbul.

** Kalealtı Limited Şirketi Anadolu Hisarı/İstanbul.

Giriş

Verotoksijenik *E. coli* O157:H7, insanlarda hemolitik üremik sendrom (HUS), trombositik-trombositopenik purpura ve hemorajik kolitis'e neden olmaktadır . Bu bozukluklar sonucu insanlarda ciddi sağlık problemleri ve özellikle çocuklarda böbrek bozuklukları bildirilmiştir (1, 28). İnsanlarda *E. coli* O157:H7 infeksiyonları Dünyada yaklaşık 30 ülkede saptanmıştır (22). Hayvanlarda da *E. coli* O157:H7 infeksiyonları oluşmakta fakat infeksiyon genellikle asemptomatik seyretmekte ve asemptomatik hayvanlar da etkeni saçabilmektedir (4, 25).

E. coli O157:H7 gıda ve sularla ağız yoluyla bulaşmaktadır. İnsandan insan direk temas ile bulaşma çok nadirdir. İnsanlarda görülen infeksiyonların çoğunun kaynağının sığır kökenli gıdalar ve özellikle kıyma olduğu bildirilmiştir (1, 6, 22). Buna karşın *E. coli* O157:H7, süt (6), yoğurt (23) geyik eti (20), tavuk, kuzu, domuz ve deniz ürünleri (29), elma şarabı (apple cider) (3), elma suyu (8) , sebzeler (27, 32), içme suyu (30) yüzme havuzu suyunda da (19) saptanmıştır.

E. coli O157:H7'nin izolasyonu ve identifikasyonunda, kültürel, biyokimyasal, serolojik ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılmaktadır (16, 21, 22, 24). İzolasyon amacıyla ön zenginleştirmeden sonra immunomanyetik separasyon (IMS) önerilmekte (2) ve IMS ürünleri 18-24 saatlik inkübasyon sonucunda sorbitol MacConkey agarda sorbitol negatif (renksiz) koloniler oluşturmaktadır (21, 22). İdentifikasyon amacıyla diğer selektif besiyerlerinden CT-SMAC, rainbow, krom agar ve biyokimyasal testler (β -glukuronidaz aktivitesi olmadığı için MUG testi negatif) kullanılmaktadır (16, 21, 22, 24). Ayrıca etkenin serogruplandırılması için anti-O157 ve H7 serumları ile aglutinasyon testi uygulanır. Etkenin Verotoksin üretip üretmediğinin saptanması ise biyolojik (sitotoksiste deneyleri) ve moleküler biyolojik yöntemler ile yapılmaktadır (15, 17, 21, 24, 32).

Bu çalışmada, mandaların dışkı ve karkaslarından alınan örneklerden ön zenginleştirme ve IMS yapıldıktan sonra CT-SMAC agara ekilerek *E. coli* O157:H7'nin saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Örneklerin toplanması

İstanbul'da bulunan 1 adet devlet mezbahası ve 4 adet özel sektöre ait mezbaha Ocak 2000 ve Ocak 2001 tarihleri arasında ziyaret edildi. Kesilen mandalardan sistematik örnekleme yöntemi ile 1/2 oranında, birinci mezbahadan 2, ikinci

mezbahadan 1, üçüncü mezbahadan 2, dördüncü mezbahadan 13 ve beşinci mezbahadan 10 olmak üzere toplam 28 manda seçildi. Mandalar kesildikten sonra rektumlarından ve karkaslarından swablar alındı. Karkaslardan örnek alınmasında Calicchia ve ark. (7) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Swablar karkasın 4 çeyreğinde (her bir ön bacak ve arka bacaklarda) seçilen 4 tane 25 cm² lik alana sürüldü. Karkas swabları ve rektal swablar 20mg/L Novobiocin (Sigma) içeren 10 ml modifiye *E. coli* broth (mEC broth-Merck) içine konuldu. Örnekler soğuk ortamda acilen laboratuvara getirildi ve TÜBİTAK gıda laboratuvarında incelendi.

Ön zenginleştirme ve Immunomanyetik separasyon (IMS)

Tüm swablar, ön zenginleştirme amacıyla 41.5 ± 0.5°C de 18-24 saat inkübe edildi. Üreme saptanan besiyerlerinden üretici firma tarafından bildirilen yönteme göre immunomanyetik separasyon yapıldı (Dynabeads anti-*E.coli* O157, Dynal, UK). Kısaca, üreme saptanan ön zenginleştirme besiyerinden 1 ml alınarak 20 µl anti-*E.coli* O157 ile kaplanmış manyetik partiküllerle karıştırıldı ve karışım manyetik araç üzerine yerleştirildi. İşlem tamamlandıktan sonra, son ürün izolasyon ve identifikasyon amacıyla kullanıldı.

İzolasyon ve identifikasyon

E. coli O157:H7 izolasyonu ve idendifikasyonu için daha önce yapılan çalışmalardan yararlanıldı (2, 14, 16, 24, 31). IMS ürününden 50 µl miktarında 0,05mg/L cefixime ve 2,5mg/L tellurite (Oxoid) içeren sorbitol MacConkey (CT-SMAC) agara ekildi. Besiyerleri 37±1°C de 18-24 saat süreyle inkübe edildikten sonra sorbitol negatif (renksiz) kolonilerin olup olmadığı yönünden kontrol edildi. Sorbitol negatif koloniler seçildi ve O157:H7 yönünden identifikasyon çalışmalarına tabi tutuldu. Bu amaçla sorbitol negatif kolonilerden Krom agara (Chrome agar, Medikal Diagnostik, EE22-020109) ekimler yapıldı. Ayrıca sorbitol negatif koloniler 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG), indol testi ve hareket muayenesine tabi tutuldu. Daha sonra izolatlar serogruplandırma amacıyla O157 ve H7 antiserumu (Oxoid) ile aglutinasyon testine tabi tutuldu. İzolasyon, identifikasyon çalışmaları ve serolojik çalışmalarda nontoksijenik *E. coli* O157:H7 suşu (NCTC-12900) kontrol olarak kullanıldı.

Bulgular

Rektal swab örneklerinin IMS ürünlerinden CT-SMAC agara yapılan ekimler sonucunda, 7 örnekten yapılan ekimlerde sorbitol negatif koloniler saptandı. Bunlardan 5 tanesi MUG negatif-indol pozitif ve 6 tanesi hareket yönünden pozitif bulundu.

Karkas örneklerinin IMS ürünlerinden CT-SMAC agara yapılan ekimler sonucunda ise, 2 örnekten yapılan ekimlerde sorbitol negatif koloni saptandı. Sorbitol negatif kolonilerden hiç birisi MUG negatif bulunmazken, her ikisi indol pozitif ve 1 tanesi de hareket yönünden pozitif bulundu. Rektal swab ve karkaslardan izole sorbitol negatif kolonilerden Krom agara yapılan ekimler sonucunda Krom agarda leylak renginde koloni saptanmadı. Şüpheli kolonilerin O157 ve H7 antiserumu ile reaksiyonu incelendiğinde, hiçbir koloni pozitif reaksiyon vermedi. Bu bulgulara göre çalışmada incelenen 28 mandanın dışkı ve karkaslarında *E. coli* O157:H7 saptanmadı.

Tartışma ve Sonuç

Sığırlar *E.coli* O157:H7 için başlıca rezervuar hayvanlardır ve sığırlarda yapılan çalışmalarda düşük (12, 17) ve yüksek (5) prevalans değerleri bildirilmiştir. Etken sığırlardan başka diğer hayvanlardan at, köpek, kedi, domuz, manda, koyun, keçi, geyik ve kuşlardan da izole edilmiştir (4, 10, 15, 18). Et ve et ürünleri kesim ve işleme sırasında *E. coli* O157:H7 ile kontamine olmaktadır. Kontaminasyonda deride ve intestinal içerikte bulunan etkenin çevreye saçılması etkin rol oynamaktadır. Sığırlarda yapılan çalışmalarda etkenin dışkıda ve deride bulunma sıklığı ile karkas kontaminasyonu arasında korelasyon saptanmıştır (11). Bu nedenle mezbahalarda ve işleme yerlerinde bu noktalara dikkat etmek gerekmektedir.

Ülkemizde sığır ve sığır karkaslarında *E. coli* O157:H7 saptanmış ve halk sağlığı açısından önemi vurgulanmıştır (9, 14, 31). Ancak ülkemizde bulunan diğer hayvanlarda ve mandalarda varlığı ve karkas kontaminasyonu ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Diğer ülkelerde de mandalarda *E. coli* O157:H7 ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Mandalarda yapılan çalışmaların sınırlılığının en önemli nedenleri arasında, mandaların belirli coğrafik bölgelerde lokalize olması ve manda popülasyonunun ülkeden ülkeye değişken olmasına bağlı olabilir. Buna bağlı olarak manda kesimi ve tüketimi de az olmaktadır. Şu ana kadar mandalarda yapılan bir çalışma da gaitadan *E. coli* izole edilmiştir (10). Bu çalışmada, mandalar ve karkaslarında *E. coli* O157:H7 saptanması yönünde çalışmalar yapıldı ve bu çalışmalar sonucunda mandalarda ve karkaslarında etken bulunamadı. Rektal swablardan 7 ve karkaslardan da 2 sorbitol negatif bakteriler edilmiş fakat bu izolatlar *E. coli* O157 ve H7 antiserumları ile reaksiyon vermemiştir. Bu çalışmada mandaların etken yönünden negatif olmasının bazı nedenleri olabilir. Bunlar arasında örnek alınan mandalarda etkenin olmaması, infeksiyon oluşturabilen suşların virülens faktörleri, örnek sayısı, örnekleme ve izolasyon metotları sayılabilir (13, 21, 26). *E. coli* O157:H7 yaz ve sonbahar mevsiminde daha sık izole edilmektedir (21, 26). Bu çalışmada tüm mevsimlerde örnek toplanmıştır. Çalışmada karkasların örnekleme için kullanılan yöntem diğer araştırmacılar tarafından da kullanılmıştır (7). Araştırmacılar bu yöntemin ekonomik olduğunu ve örnek alım sırasında ete zarar vermediği için tercih edildiğini

bildirmişlerdir. Bu yöntemin dezavantajının kas dokusuna iyi penetre olmuş etkenin negatif sonuçlara neden olabileceğidir (13). Ayrıca bu çalışmada izolasyon ve identifikasyon için kullanılan yöntemler (ön zenginleştirme, IMS, CT-SMAC agar, seroloji) birçok araştırmacı tarafından değerlendirilmesi yapılmış ve uluslararası standartlara uygun yöntemlerdir (2, 16, 21, 24, 26).

Sonuç olarak, bu çalışmada mandalardan alınan rektal swab örneklerinde ve manda karkaslarında *E. coli* O157:H7 saptanmamıştır. Ancak mandalarda *E. coli* O157:H7'nin bulunup bulunmadığının daha çok sayıda manda incelenerek araştırılmasında yarar vardır. Ayrıca ülkemizde mandalar ve sığırlar aynı ortamda kesildiği için sığırlardan manda karkaslarına bulaşmanın olabileceği göz önüne alınmalıdır. Çünkü karkasların *E. coli* O157:H7 ile kontamine olması intestinal içeriğin kesim ve işleme sırasında ete bulaşmasına bağlıdır. Kontamine olmuş etler halk sağlığı açısından risklidir. Bu nedenle bulaşmanın engellenmesi için koruyucu önlemlerin alınmasında yarar vardır. Bulaşmanın engellenmesi amacıyla kritik noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu noktalar arasında kasaplık hayvanlarda *E. coli* insidensinin düşürülmesine yönelik çalışmalar yapılması, dışkının deriye bulaşmasının engellenmesi, rektumun bağlanması, konveyörlerde hayvanların belirli aralıklarla işlenmesi (sıkışık olmadan) ve kesim işleme sırasında hijyenik kurallara uyulması bulunmaktadır.

Kaynaklar

1. **Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Batheson, C.A., Lewis, J.H., Ballett, T.J., Wells, J.G., Balon, R.S, Kobayashi, J.:** A multi-state outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhoea and haemolytic uraemic syndrome from hamburgers-the Washington experience. *JAMA*, 1994; 272: 1349-1353.
2. **Bennet, A.R., Macphee, S., Betts, R.P.:** The isolation and detection of *Escherichia coli* O157 by use of immunomagnetic separation and immunoassay procedures. *Lett Appl Microbiol*, 1996; 22: 237-243.
3. **Besser, T.E., Lett, S.M., Weber, J.T., Doyle, M.P., Barrettt, T.J., Wells, J.G., Griffin, P.B.:** An outbreak of diarrhoea and haemolytic uraemic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh pressed apple cider. *JAMA*, 1993; 269: 2217-2220.
4. **Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Karch, H.:** Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J Clin Microbiol*, 1995; 33(3): 631-635.

5. **Bonardi, S., Maggi, E., Pizzin, G., Morabito, S., Caprioli, A.:** Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int J Food Microbiol*, 2001; 66 (1-2): 47-53.
6. **Chapman, P.A., Wright, D.J., Higgins, R.:** Untreated milk as a source of verotoxigenic *E. coli* O157:H7. *Vet Rec*, 1993; 133: 171-172.
7. **Calichia, M.L., Parker, E.L., Gambrel-Lenarz, S., Matner, R.R.:** Use of the petrifilm test Kit-EHEC direct blot enzyme immunoassay method without swap pre-enrichment to screen for low levels of *Escherichia coli* O157:H7 on beef carcasses by surface swabbing. *J Food Prot*, 1997; 60(7): 870-873.
8. **Cody, S.H., Glynn, M.K., Farrar, J.A., Cairns, K.L., Griffin, P.M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A.S., Lewis, J.H., Swaminathan, B., Bryant, R.G., Vugia, D.J.:** An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med*, 1999; 130(3): 202-209.
9. **Cabalar, M., Boynukara, B., Gulhan, T., Ekin, I.H.:** Van yöresinde sağlıklı görülen süt sığırcılığı işletmelerinde Rotavirus, *E.coli* K99 ve O157:H7'nin varlığı üzerine araştırmalar. *Tr J Vet Anim Sci*, 2001; 25(2):191-196.
10. **Dorn, C.R., Angrick, E.J.:** Serotype O157:H7 *Escherichia coli* from bovine and meat sources. *J Clin Microbiol*, 1991; 29(6):1225-1231.
11. **Elder, R.O., Keen, J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher, G.A., Koohmaraie, M., Laegreid, W.W.:** Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci*, 2000; 97(7): 2999-3003.
12. **Galland, J.C., Hyatt, D.R., Crupper, S.S., Acheson, D.W.:** Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(4):1619-1627.
13. **Gill, C.O., Jones, T.:** Microbiological sampling of carcasses by excision or swab. *J Food Prot*, 2000; 63(2): 167-173.
14. **Gun, H., Yilmaz, A., Turker, S., Tanlasi, A., Yilmaz, H.:** Contamination of bovine carcasses and abattoir environment By *Escherichia coli* O157 :H7 in Istanbul. *Int J Food Microbiol*, 2003; 84: 339-344.
15. **Hancock, D.D., Besser, T.E., Rice, D.H., Ebel, E.D., Herriott, D.E., Carpenter, L.V.:** Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev Vet Med*, 1998; 35(1): 11-19.
16. **Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M, de Boer, E.:** Evaluation of media and test kits for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from minced beef. *J Food Prot*, 1997; 60(7): 817-824.
17. **Heuvelink, A.E., Roessink, G.L., Bosboom, K., de Boer, E.:** Zero-tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. *Int J Food Microbiol*,2001;66(1-2):13-20.

18. **Johnsen, G., Wasteson, Y., Heir, E., Berget, O.I., Herikstad, H.:** *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. Int J Food Microbiol, 2001; 65(3): 193-200.
19. **Keene, W.E., McNulty, J.M., Hoesly, F.C., Williams, L.P., Jr Hedberg, K., Oxman, G.L., Barrett, T.J., Pfaller, M.A., Fleming, D.W.:** A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. N Eng J Med, 1994; 331: 579-584.
20. **Keene, W.E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D.H., Hancock, D.D., Balan, V.K., Zhao, T., Doyle, M.P.:** An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced jerky made from deer meat. JAMA, 1997; 277: 1229-1231.
21. **Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M., Schmidt, H.:** Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999; 34: 229-243.
22. **Mead, P.S., Griffin, P.M.:** *Escherichia coli* O157:H7. Lancet, 1998; 352: 1207-1212.
23. **Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B., Majid, F.:** Verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of yoghurt. Epidemiol Infect, 1993; 111: 181-187.
24. **Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M.:** The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. J Appl Microbiol, 2001; 91(2): 373-379.
25. **Orskov, F., Orskov, I., Villar, J.A.:** Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Lancet, 1987; 2: 276.
26. **Park, S., Worobo, R.W., Durst, R.A.:** *Escherichia coli* O157:H7 As an Emerging Foodborne Pathogen: A literature Review. Crit Rev in Food Sci and Nut, 1999; 39(6): 481-502.
27. **Richert, K., Albrecht, J.A., Bullerman, L.B., Sumner, S.S.:** Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on broccoli, cucumber and green pepper. Dairy Food and Environmental Sanitation, 2000; 20(1): 24-28.
28. **Riley, L.W., Remis, R.S., Helgeson, S.D., McGee, H.B., Wells, L.G., Davis, B.R., Herbert, R.J., Olcott, G.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L.:** Haemorrhagic colitis associated with a *Escherichia coli* serotype. New Eng J Med, 1983; 308: 681-685.
29. **Samadpour, M., Ongert, J.E., Liston, J., Tran, N., Nguyen, D., Whittam, T.S., Wilson, R.A., Tarr, P.I.:** Occurrence of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. Appl Environ Microbiol, 1994; 60: 1038-1040.

30. **Swerdlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippen, S., Donnell, D., Geldreich, E., Payne, B.J., Meyer, A., Wells, J.G., Greene, K.D., Bright, M., Bean, N.H., Blake, P.A.:** A water borne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhoea and death. Ann Int Med, 1992; 117: 812-818.
31. **Yilmaz, A., Gun, H., Yilmaz, H.:** Frequency of *E. coli* O157:H7 in Turkish cattle. J Food Prot, 2002; 65(10):1637-1640.
32. **Yilmaz, A.:** Salatalarda kullanılan sebzelerden *E. coli* O157:H7 izolasyonu ve verotoksijenik genin PCR ile saptanması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2002.