

Taze Peynirlerden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Genotiplendirilmesi

Sadık Savaşan, Ergün Ömer Göksoy

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hij. ve Tek. AD, Aydın

Geliş Tarihi / Received: 12.10.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 08.11.2018

Özet: Bu çalışmada, Aydın ilinde üretilen taze peynirlerden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının RAPD-PCR yöntemi ile genotiplendirilerek filogenetik yakınlıklarının ve ekolojik çeşitliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Aydın ili ve çevresinde farklı mandıralarda üretilip, mandıra satış noktalarında, marketlerde ve semt pazarlarında satışa sunulan toplam 100 adet taze peynir numunesi koliform bakteri sayısı ile *E. coli* varlığı yönünden incelenmiştir. Her bir numuneden 250 gram olacak şekilde steril poşetler içerisinde soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir. Taze peynir örneklerinin zenginleştirilmiş ve selektif besiyerlerine ekimlerini takiben izole edilen *E. coli* şüpheli bakterilerin biyokimyasal yöntemlerle identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyon sonuçları PCR ile doğrulanmıştır. İzole edilen *E. coli* suşları RAPD-PCR yöntemi ile genotiplendirilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda 77 adet taze peynir örneğinde ortalama 4,83 log kob/g koliform bakteri saptanmış, koliform bakteri saptanan 77 adet taze peynir örneğinin 22 sinden 44 adet *E. coli* izolatu elde edilmiştir. Elde edilen 44 adet izolat PCR yöntemi ile de *E. coli* olarak doğrulanmıştır. Bu izolatlardan RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi sonucu 22 farklı genotip belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Taze peynir, *E. coli*, RAPD-PCR, genotiplendirme

Genotyping of *Escherichia coli* Strains Isolated From Fresh Cheese

Abstract: The aim of this study was to evaluate phylogenetic and ecological diversity of *E. coli* strains isolated from raw cheese samples produced in Aydın province, by genotyping with RAPD-PCR technique. In this research, the fresh cheese materials produced at different dairy houses were obtained from dairy markets, local markets, district markets in and near Aydın province and they were investigated for colony forming unit of coliform bacteria and *E. coli* presence. 250 gr pieces of 100 fresh cheese samples that were obtained from different markets were taken in sterile bags and were brought to Adnan Menderes University. Veterinary Faculty, Food Hygiene and Technology Department laboratories in cold chain. After the enrichment and selective media processes, the isolated bacteria were identified by bio-chemical tests and PCR. After then, isolates were genotyped by using RAPD-PCR. As a result, in our study, coliform bacteria found in 77 fresh cheese materials at the average level of 4,83 log cfu/g., 44 *E. coli* isolates were identified in 22 of the 77 coliform contaminated samples.. The obtained 44 isolates were also verified as *E. coli* by PCR. 22 different genotypes were determined by genotyping of these isolates using RAPD-PCR.

Key Words: Fresh cheese, *E. coli*, RAPD-PCR, genotyping

Giriş

Geleneksel bir süt ürünü olan peynir, farklı çeşitleri ile hemen hemen bütün tüketim gruplarına hitap etmekte ve insan beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Peynirin günlük beslenmemizde kolay sindirilebilir özelliğinin yanı sıra, yapısında üretimde kullanılan sütteki yağ, çözünmeyen tuzları, koloidal maddelerin tümüne yakın miktarını bulundurması ve süt serumundaki çözünen tuzlar, vitaminler, serum proteinleri ve diğer besin unsurlarının da bir ölçüde peynirin yapısına girmesinden dolayı önemli olarak kabul edilmektedir. Peynir ayrıca, yüksek kalitede protein, yağ, A ve B2 vitaminleri yönünden de oldukça zengindir [30].

Peynir her ne kadar güvenli bir gıda ürünü olarak bilinse de, pek çok semptomlarla ortaya çıkan gıda zehirlenmesi vakalarına neden olduğu bildirilmektedir. Peynir kaynaklı gıda zehirlenmelerine yol açan patojenler, kirli çevre veya infekte hayvan kaynaklı bulaşmış çiğ süt, süt işletmesi florasının ya da bu floranın çiğ süt kaynaklı kirliliği, üretim aşamasında çalışanlar kaynaklı olabilmektedir [18]. Ülkemizde peynirlerin fekal kontaminasyon ve patojen mikroorganizmalarla bulaşmasını, çiğ sütün toplam bakteri sayısı fazlalığına bağlı düşük kalitesi, sağım, taşıma, depolama aşamalarında ve işletmelerde, temizlik ve hijyen kurallarına yeterince önem verilmemesi, yeterli olgunlaştırma süresi dolmadan tüketime sunulması, uygunsuz koşullarda pazarlanması gibi faktörler olumsuz yönde

etkilemekte ve bu durum tüketici sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadırlar [8,14,26,29].

Halk sağlığı için risk teşkil eden peynir kaynaklı zehirlenmelerin en önemli neden olarak *Escherichia coli* gösterilmektedir. *E. coli*, Enterobacteriaceae familyasından, sporsuz gram negatif, uçları yuvarlak çomak şeklinde, çoğunlukla hareketli, asidorezistans özelliği olmayan, insan ve pek çok sıcakkanlı hayvanın doğal barsak florasında bulunan, optimum gelişme sıcaklığı 37°C, optimum gelişme pH'sı 7,2 olan basil şekilli bir bakteridir [7,28]. *E. coli*, insan ve bazı memelilerin barsak florasında bulunması nedeniyle zararsız olarak kabul edilse de, bazı tipleri gerek barsakta gerekse barsak dışı ortamlarda insanlarda hastalıklara sebep olabilmektedir [15]. Gıdalarda saptanması, saptanma miktarı, halk sağlığı yönünden önem arz eden enteropatojenik ya da toksijenik *E. coli* bulunma ihtimali açısından, fekal kontaminasyonu gösterme açısından

indikatör bir mikroorganizma olarak kabul edilir [22]. Çok sayıda patojen *E. coli* grubu bulunmakla birlikte, enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olmak üzere 4 grup önem arz etmektedir. Bu gruplar farklı *E. coli* serotiplerini içermektedir. Bir başka sınıflandırma şeklinde ise bazı *E. coli* serotipleri verotoksijenik (VTEC) grubu içinde toplanır. Bu gruplar dışında Meksika'da çocuklarda hafif geçen bir diareye neden olan diffuse adhering *E. coli* (DAEC), çeşitli ülkelerde bebek ve çocuklarda kronik diareye neden olan entero-aggregative *E. coli* (EAggEC), enter rastlanan facultatively enteropathogenic *E. coli* (FEEC) grupları da mevcuttur. EAggEC serotipleri agregatif yapışma özellikleri ile diğer tüm *E. coli* serotiplerinden farklılık gösterir [13]. Patojenik *E. coli* alt grupları ile ilgili bazı özellikler ve semptomlar Tablo 1'de özetlenmiştir [11].

Tablo 1. Patojenik *E. coli* alt grupları ile ilgili bazı özellik ve semptomlar [11].

Özellikler/ Semptomlar	ETEC	EPEC	EHEC	EIEC
Toksin	LT/ST	-	Shiga veya Vero toksin	-
İnvaziv	-	-	-	+
İntimin	-	+	+	-
Enterohemolizin	-	-	+	-
Dışkı	Sulu	Sulu ve Kanlı	Sulu, Çok Kanlı	Mukoid, Kanlı
Ateş	Düşük	+	-	+
Fekal lökosit	-	-	-	+
İlgili Barsak	İnce Barsak	İnce Barsak	Kolon	Kolon,kısmen ince barsak
Seroloji	Çeşitli	O26, O111 ve diğerleri	O157:H7, O26,O111 ve diğerleri	Çeşitli
IDb	Yüksek	Yüksek	Düşük	Yüksek

LT=labil toksin (ısıya dirençsiz toksin), ST=stabil toksin (ısıya dirençli toksin) I_d^b=infektif doz.

Bu araştırmada, Aydın ilindeki çeşitli mandıra ve peynir işletmelerinde üretilen, market, pazar ve mandıra satış noktalarında tüketiciye sunulan taze peynirlerde *E. coli* varlığının araştırılması ve izole edilen suşlar arasındaki ekolojik çeşitliliğin saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada, Aydın ili ve çevresinde farklı mandıralarda üretilip, mandıra satış noktalarında, marketlerde ve semt pazarlarında satışa sunulan

taze peynirler koliform bakteri sayısı ile *E. coli* varlığı yönünden incelendi. Bu amaçla çeşitli satış noktalarından toplam 100 taze peynir numunesi, her bir numunedan 250 gram olacak şekilde steril poşetler içerisinde soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirildi.

***E. coli* İzolasyon ve İdentifikasyonu:** Toplanan peynir örneklerinden aseptik şartlarda alınan 10'ar gram peynir numunesi stomacher torbalarına konulup, üzerine 90 ml steril fizyolojik peptonlu su

(Oxoid LP0005, Fluka 70179) ilave edilerek Stomacherde (Bag mixer, Interscience, France) 2 dakika boyunca homojenize edildi. Elde edilen homojenizattan seri dilüsyonlar hazırlanarak Violet Red Bile Agar'a (Oxoid CM0107) çift katlı dökme plak yöntemi ile inokulasyonlar yapıldı ve takibinde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyerinde oluşan 1-2 mm çaplı koyu kırmızı koloniler sayılıp, sonuçlar log10 tabanına göre koloni oluşturan birim/gram (kob/g) olarak değerlendirildi [12,24]. Koliform sayımından sonra VRB Agar'da üreyen kırmızı zonlu tipik kolonilerden 5 adet alınarak içerisinde Durham tüpü bulunan Lactose Broth'a (Oxoid CM0137) inokule edilip 44°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda gaz ve bulanıklık oluşturan tüplerden Eosine Methylene Blue Agar (EMB) (Oxoid CM0069) ve MUG supplement (Oxoid BR0071) içeren Violet Red Bile Agar'a (Oxoid CM0107) öze ile ekim yapılarak 37°C'de 24 saat bekletildi. EMB Agar'da metalik röfle ve MUG'lu VRB Agar'da uzun dalga boylu (366 nm) UV lambası ile floresan ışımaya veren kolonilere identifikasyon için İndol, Metil Red, Voges Proskauer ve Citrate (IMViC) testleri uygulandı [12,24]. Aynı peynir örneğinden izole edilen

E. coli suşları aynı numara ve farklı harflerle kodlandırıldı.

***E. coli* izolatlarının PCR ile identifikasyonu:**

DNA Ekstraksiyonu: PCR'da kullanılmak üzere *E. coli* izolatlarından total DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla şüpheli koloniler nutrient agara ekildi ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Koloniler öze yardımı ile toplanarak, 500 µl DNase-RNase free ependorf tüpünde deiyonize su ile süspanse edildi ve 100°C'de 10 dk kaynatıldı. Daha sonra 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı PCR'da hedef DNA olarak kullanılmak üzere saklandı [5].

PCR Amplifikasyonu: PCR identifikasyonunda Abd El-Razik ve ark [1]'nin kullandıkları protokol modifiye ve optimize edildi. PCR amplifikasyonu 50 µl son hacim içinde gerçekleştirildi. Ekstrakte edilmiş 200 ng DNA, 2 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, 1 µM primer, 0,2 mM dNTP ve 2 U Taq polimeraz içeren PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları olarak 95°C'de 2 dk ilk denatürasyon, 35 siklus olmak üzere 94°C'de 45 sn denatürasyon, 57°C'de 45sn bağlanma, 72°C'de 45 sn uzama ve son siklustan sonra 72°C'de 10 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 2. *E. coli* izolatlarının tür düzeyinde identifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primerler.

Hedef bakteri	Oligonükleotid primer dizilimi	Bant büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>E. coli</i>	F 5'-GCTTGACACTGAACATTGAG-3' R 5'-GCACTTATCTCTCCGCATT-3'	662	Abd El-Razik ve ark. [1]

Amplikonların Görüntülenmesi: Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren % 1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 662 bp'lik bant görülmesi *E.coli* için pozitif olarak değerlendirildi.

İzolatların Genotiplendirilmesi: Tüm izolatlar ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)-2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') primeri kullanılarak RAPD-PCR profillerinin belirlenmesi sonrasında genotiplendirildi. RAPD-PCR amplifikasyonu Versalovic ve ark [31] tarafından bildirilen metodun modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. Bu aşamada deiyonize su, 1XPCR Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM her bir dNTP, 2,5 U

Taq DNA polimeraz, 25 pmol primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl'lik PCR karışımı oluşturuldu. Bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 40°C'de 1 dk bağlanma, 72°C'de 3 dk uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 7 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren % 1,5'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Oluşan RAPD paternlerinin dendrogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile Quantity One (BioRad) dendrogram ve görüntü analiz programı kullanılarak çizildi.

Bulgular

İzolasyon ve İdentifikasyon bulguları: Peynir numuneleri koliform bakteri sayısı açısından değerlendirildiğinde 100 adet peynir numunesinin 77 adetinde (% 77) belirlenen dilüsyonlarda üreme saptandı. İncelenen peynir numunelerinin koliform

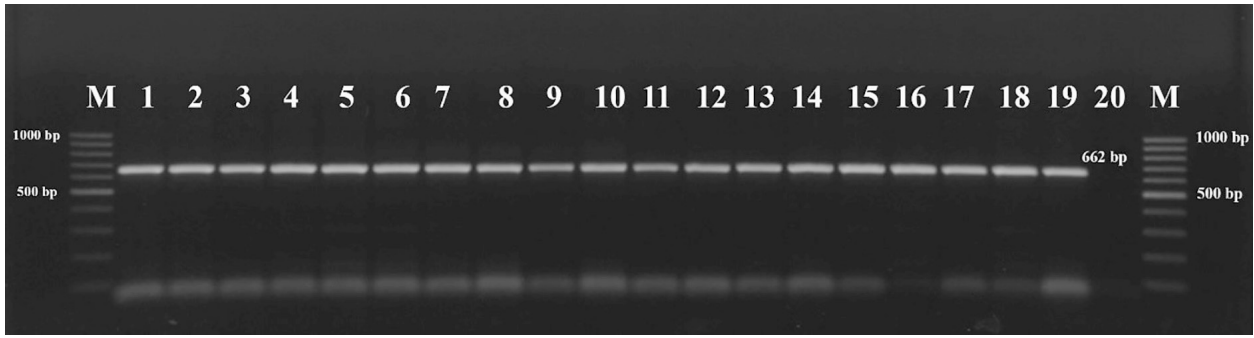
bakteri sayısı sonuçları Tablo 3'te gösterilmiştir. İncelenen peynir numunelerinin 22 adetinde (% 22) *E. coli* varlığı tespit edildi. Pozitif olan numunelerden 44 adet *E. coli* izolatu elde edildi (Aynı peynir örneğinden izole edilen *E. coli* suşları aynı numara ve farklı harflerle kodlanarak gösterildi).

Tablo 3. İncelenen peynir numunelerinin koliform bakteri sayısı sonuçları.

Koliform Bakteri Pozitif Numune Sayısı (77)	Koliform Bakteri Sayısı (log ₁₀ kob/g)		
	Minimum	Maksimum	Ortalama
	2,47	6,54	4,83

PCR Bulguları: Fenotipik olarak *E. coli* şüpheli izolatların PCR ile analizi sonrasında 44 adet izolatın 662 bp.'lik ürün verdiği görüldü ve identifi-

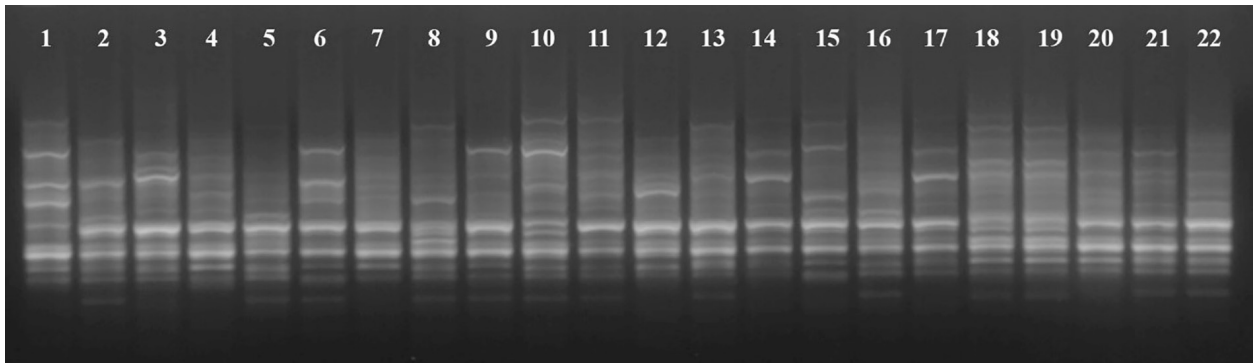
kasyonu (Resim 1). Bu sonuçlara göre incelenen 44 adet izolat da *E. coli* olarak identifiye edildi.



Resim 1. *E. coli* PCR sonuçları. M: marker (100 bp, Fermentas); 1-19: *E. coli* (662 bp), 20: negatif kontrol (*Staphylococcus aureus*).

Genotiplendirme ve Filogenetik Analiz: *E. coli* olarak identifiye edilen 44 adet izolatın genotiplendirmesi amacıyla ERIC-2 primeri kullanılarak gerçekleştirilen işlem sonucunda 22 farklı RAPD-

PCR profili tespit edildi (Resim 2). Onbir RAPD-PCR profiline tek bir izolat düşerken, diğer 11 profil içinde % 100 düzeyinde homoloji gösteren 2-6 izolat yer aldı.



Resim 2. İncelenen *E. coli* izolatlarının RAPD profilleri.

Dendrogramın % 100 eşik değeri belirlenerek yapılan analizi sonucunda izolatların 11 adet tekli genotip ve 11 adet küme oluşturduğu belirlendi. Kümelerin 5 adetinin 2 izolat, 3 adetinin 3 izolat, 2 adetinin 4 izolat ve 1 adetinin de 6 izolattan oluştuğu saptandı (Tablo 4).

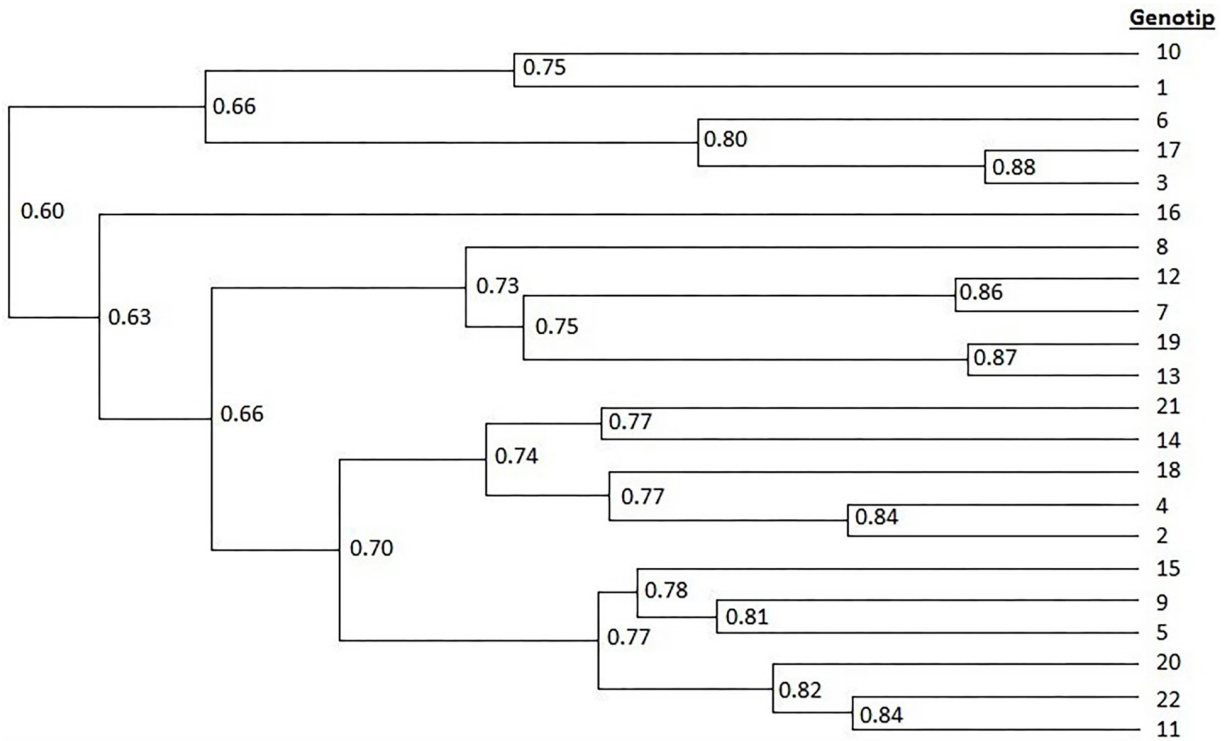
RAPD-PCR profillerinin UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) ile yapılan filogenetik analizlerinin sonucu Şekil 1'de gösterilmiştir. Buna göre, belirlenen 22 genotip arasında 0,60-0,88 katsayı (% 60-88) arasında homoloji görüldü.

Çalışmada 7 genotipte (1, 2, 7, 12, 20, 21, 22) sadece birer peynir örneğine ait suşlar yer aldı. Bununla birlikte 7 genotip içinde (5, 6, 9, 11, 13, 14, 17) farklı peynir örneklerinden izole edilen suşlar aynı genotip içinde yer aldı (Tablo 5).

Diğer bir açıdan değerlendirildiğinde 6 peynir örneğinden farklı genotiplerde yer alan farklı suşlar (25.örnek 3.ve 5. genotip, 27.örnek 4. ve 5. genotip, 32. örnek 6. ve 8. genotip, 37. örnek 9. ve 10. genotip, 73. örnek 11., 15. ve 16. genotip, 84. örnek 18. ve 19. genotip) elde edildi (Tablo 5).

Tablo 4. RAPD-PCR sonucunda saptanan genotiplerde yer alan izolatlar ve sayıları.

Genotip	Bakteri no	n
1	20B3A	1
2	22B3A	1
3	25B2B	1
4	27B2B, 27B2A	2
5	25B3A, 27B3A	2
6	30B3B, 32B3A, 32B3B	3
7	33B2A	1
8	32B3A	1
9	35B3A, 35B3B, 37B2B, 37B3A	4
10	37B3B	1
11	44B3B, 44B4B, 44B3A, 73-3A	4
12	62B3A	1
13	63B3, 68B4	2
14	71-3A, 71-4A, 69-4A	3
15	73-3B	1
16	73-4A	1
17	75-3B, 75-4A, 75-4B, 78-3A, 78-3B, 78-4B	6
18	84-3A, 84-3B	2
19	84-4A	1
20	91-3A	1
21	99-4A,99-4B	2
22	100-3A,100-4A,100-4B	3



Şekil 1. İncelenen *E. coli* izolatlarının filogenetik yakınlık analizi sonucunda oluşturulan dendrogram (1 katsayı x 100 = % homoloji).

Tablo 5. Belirlenen genotiplerin peynir örneklerine dağılımı.

GENOTİP*	PEYNİR ÖRNEK (BAKTERİ No.)																						
	20	22	*25	*27	30	*32	33	35	*37	44	62	63	68	69	71	*73	75	78	*84	91	99	100	
***1	+																						
***2		+																					
3			+																				
4				+																			
**5			+	+																			
**6					+	+																	
***7							+																
8						+																	
**9								+	+														
10									+														
**11										+						+							
***12											+												
**13												+	+										
**14														+	+								
15																+							
16																+							
**17																	+	+					
18																			+				
19																			+				
***20																				+			
***21																						+	
***22																							+

***7 genotipte sadece birer peynir örneğine ait suşlar yer aldı. **7 genotip içinde farklı örneklerden izole edilen suşlar aynı genotip içinde yer aldı.
*6 örnekten farklı genotiplerde yer alan farklı suşlar elde edildi.

Tartışma ve Sonuç

İnsan ve hayvanların barsak florasında bulunan *E. coli* canlı için genellikle zararsız bir bakteri olarak kabul edilmektedir. Bazı patojenik türleri gıdaları kontamine edebilmekte veson yıllarda artış gösteren salgınlarda, her yıl yüzbinlerce insanın etkilendiği, yüzlercesinin de öldüğü saptanmıştır. Bu gıda zehirlenmelerinde kaynak insan veya hayvan dışkıdır. Kontaminasyon yolu oldukça kompleks olabilmekte ve insanlar, hayvanlar, bitkiler ile tüm bunların ekosistemle etkileşimleri kaynak oluşturmaktadır. Konakçı kaynak, sanitasyon ve hijyen düzeyleri, tarımsal sistemler, gıda üretim yöntemleri, bakterinin epidemiyolojisi üzerine etkili unsurlar olarak karşımıza çıkmaktadırlar [9].

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 2014 yılında çiğ süten yapılmış 60 günlük peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi amaçlı bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada 19 Şubat 2014 ile 3 Kasım 2015 tarihleri arasında 1606 adet peynir örneği toplanmıştır. Toplanan bu örneklerin 473 adetinin (% 29) yerli üretim tarzında üretildiği, 1133 adetinin (% 71) ise uluslararası peynir tiplerinden oluştuğu belirtilmiştir. Yerel peynir örnekleri üretim noktaları, depolar ve satış noktalarından, dış kaynaklı peynir örneklerinin ülkeye giriş noktası olan liman ve benzeri yerlerden, iç piyasaya sunulmadan önceki son kontrol noktalarından toplanmıştır. Bu çalışma sonucunda, 1606 adet örneğin 87 adetinde *E. coli* saptandığı, çalışmanın bütünündeki kontaminasyon oranının ise % 5.4'ü olduğu be-

İrtilmiştir. *E. coli* saptanan örneklerden 18 adetinin yerel peynir, 69 adetinin dış kaynaklı peynir olduğu saptanmıştır. Toplam 1606 adet örneğin hiçbirinde *E. coli* O157:H7 bulunmadığı bildirilmiştir. Araştırmada 1606 örnekten 11 adetinde Shiga toksin üreten *E. coli* saptandığı, bu 11 adet örnekten 1 adetinde de patojenik serotip O111:H8 bulunduğu bildirilmiştir [10]. Madic ve ark. [20], çiğ süttten üretilen peynirlerde, Multiplex Real-Time PCR tekniğini kullanarak, 400 örnekte Shiga toksin üreten *E. coli* taraması yapmışlardır. Bu çalışmada 5 temel patojenik serotip olan O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 ve O157:H7 serotiplerini araştırmışlar, 26 örnekte (% 6,5) bu serotiplerde Shiga Toksin üreten *E. coli* bulduklarını bildirmişlerdir. Quinto ve Cepeda [23], yumuşak peynirlerde toksijenik *E. coli* insidensini araştırmak için yaptıkları çalışmada, 221 adet çiğ süttten yapılmış, 75 adet pastörize süttten yapılmış peynir örneklerini analiz ettiklerini, enterotoksijenik, verotoksijenik, nekrotoksijenik *E. coli* serotiplerini çalıştıklarını belirtmişlerdir. Pastörize süttten üretilen peynir örneklerinde toksijenik *E. coli* izole etmediklerini, çiğ süttten üretilen peynir örneklerinin 3 adetinde (% 1,35) toksijenik *E. coli* saptadıklarını bildirmişlerdir. Paneto ve ark. [21], Orta-Batı Brezilya'da satılan, çiğ süttten üretilmiş peynirlerde toksijenik *E. coli* varlığını araştırmak için planladıkları çalışmada, farklı marketlerden 50 adet örnek topladıklarını, analiz yöntemi olarak PCR tekniğini kullandıklarını bildirmişlerdir. Çalışma sonunda 48 adet (% 96) örnekte *E. coli* saptadıklarını, bunlardan % 6'sının O125, % 4'ünün O111, % 2'sinin O55, % 2'sinin O119 serotiplerinde olduğunu belirtmişlerdir. Stephan ve ark. [25], İsviçre'de çiğ süttten üretilen peynirlerde STEC varlığını, serotiplerini saptamak amacıyla planladıkları araştırmada, ülke genelindeki üreticilerden Mart 2006-Aralık 2007 tarihleri arasında 796 adet örnek topladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 2006 yılında toplanan 432 örnekten 16 adetinde (% 3,7), 2007 yılında toplanan 364 örnekten 23 adetinde (% 6,3) STEC saptadıklarını belirtmişlerdir. Ahmed ve ark. [2], Mısır'da üretilen taze peynirlerde (Damietta ve Kareish) fekal koliform ve enteropatojenik *E. coli* varlığını araştırmak amacı ile 100 adet örnek topladıklarını, Damietta peynir örneklerinin % 2'sinde *E. coli* düzeyinin $\geq 10^3$ kob/g, Kareish peynir örneklerinin % 84'ünde *E. coli* düzeyinin $10-10^3$ kob/g olduğunu bildirmişlerdir. *E. coli* saptanan 46 adet Damietta ve

Kareish peynir örneklerinin 15 adetinin O125:B15, O25:K11, O128:B12, O126:B16 ve O111:B4 enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir. Ladan ve Reza [19], İran yerel taze peynirlerinde enteropatojenik *E. coli* (EPEC) kontaminasyon varlığını araştırmak amacıyla güney-batı İran, Kerman bölgesindeki satış noktalarından 77 adet örnek topladıklarını bildirmişlerdir. Topladıkları 77 adet örnekten 76 adetinde (% 98,70) *E. coli* izole ettiklerini, bunlardan 15 adetinde de (% 19,48) enteropatojenik *E. coli* (EPEC) saptadıklarını bildirmişlerdir. Tekinşen ve Özdemir [27], Van otlu peynirinde gıda kaynaklı patojenlerin varlığını araştırmışlar, bu amaçla olgunlaşmamış 50 adet peynir örneği topladıklarını belirtmişlerdir. Araştırma sonucunda, 31 adet (% 62) örnekte *E. coli* izole ettiklerini, kontaminasyon düzeyinin 3,68 log kob/g olduğunu bildirmişlerdir. Keskin ve ark. [17], semt pazarlarında satılan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması amaçlı planladıkları çalışmada, İstanbul Üsküdar Belediyesine bağlı 20 semt pazarındaki 50 beyaz peynir satıcısından, 2004 yılı Ocak-Mart aylarında peynir örnekleri aldıklarını, örneklerin % 96'sında koliform bakteri, % 86'sında *E. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Kaynar ve ark. [16], Ankara piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları araştırmada, Ankara ili Ulus semtindeki marketlerden 30 adet peynir örneği aldıklarını, 21 adet örnekte koliform grubu bakteri izole ettiklerini, bu örneklerin 18 adetinde de $7,3 \times 10^1 - 2,4 \times 10^2$ kob/g düzeyinde fekal koliform ve *E. coli* saptadıklarını bildirmişlerdir. Doğan ve ark. [6], çeşitli gıdalarda koliform, fekal koliform, *E. coli* varlığının araştırılması amaçlı yaptıkları çalışmada, topladıkları 97 adet peynir numunesinin % 78,4'ünde koliform bakteri, % 75,3'ünde fekal koliform, % 72,2'sinde *E. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bingöl ve ark. [4], İstanbul'da satılan peynirlerde enterotoksin ve verotoksin varlığının araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada, topladıkları 150 adet peynir numunesinden 55 adetinde (% 36,66) *E. coli* izole ettiklerini, 3 peynir örneğinde *E. coli* O157 saptadıklarını, hiçbir peynir örneğinde O157:H7 izole edilmediğini bildirmişlerdir. Arslan ve Özdemir [3], Türk ev yapımı beyaz peynirlerde *E. coli* O157'nin araştırılması amacıyla Bolu ilindeki açık halk pazarlarından, çiğ süttten ya da yetersiz pastörizasyon işlemi uygulanmış sütlere

den üretilmiş, ev yapımı 245 adet beyaz peynir örneği topladıklarını belirtmişlerdir. Toplam 245 adet peynir örneğinin 21 adetinde (% 9,4) *E. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Gelişmiş olan ülkelerde taze peynirlerde *E. coli* varlığının, düzeylerinin saptanması amacı ile yapılan çalışmalarla ilgili incelenen makalelerdeki bulgulara göre, araştırmacılar taze peynirlerde % 5-% 6,5 düzeylerinde *E. coli* saptadıklarını, elde edilen bu sonuçların bir kısmının insanlarda oluşan salgınlarla ilişkilerinin belirlendiğini bildirmişlerdir [10,20]. Bu çalışmada taze peynir örneklerinde % 22 düzeyinde *E. coli* izole edilmiş olup, bu düzeyin gelişmiş olan ülkelerdeki saptanan düzeylere göre oldukça yüksek olduğu belirlendi. Bu sonuç, taze peynirlerde hijyen probleminin olduğunu ve elde edilen *E. coli* prevalansının halk sağlığı açısından önemli risk oluşturabileceğini göstermiş olup, bu konuda etkin çalışma ve eğitimlerin yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Gelişmekte olan ülkelere taze peynirlerde *E. coli* varlığının, düzeylerinin saptanması amacı ile yapılan çalışmalarla ilgili incelenen makalelerdeki bulgulara göre, araştırmacılar % 46-% 98 düzeylerinde *E. coli* saptadıklarını bildirmişlerdir [2,19]. Bu saptanan düzeyler çalışmamızda saptadığımız % 22 *E. coli* düzeyinin oldukça üzerindedir. Bu sonuç, gelişmekte olan ülkelere göre peynir hijyeni ve teknolojisi açısından daha iyi bir noktada olduğumuzu göstermektedir.

Ülkemizde taze peynirlerde *E. coli* varlığının, düzeylerinin saptanması amacı ile yapılan çalışmalarla ilgili incelenen makalelerdeki bulgulara göre, Bolu ilinde yapılan çalışmada *E. coli* düzeyi % 9,4 olarak bildirilmiş [3], diğer çalışmalarda ise % 36 - % 86 düzeylerinde *E. coli* saptandığı bildirilmiştir [4,17]. İncelenen makalelerdeki çalışmaların yapıldığı iller ve sonuçlar karşılaştırıldığında, illerin coğrafi konumunun, ekonomik gelişmişliğinin saptanan *E. coli* düzeyleri üzerinde etkisinin olmadığı gözlemlendi. Bu çalışmada saptanan % 22 *E. coli* düzeyinin, ülkemizdeki sonuçlara göre düşük olduğu belirlenmiş ancak halk sağlığı açısından önemli riskler oluşturabilecek düzeyde olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma ile ilk kez Aydın ilinde taze peynir örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarının filogenetik analizleri yapıldı. İzole edilen *E. coli* izo-

latlarının RAPD-PCR ile genotiplendirilmeleri ve filogenetik yakınlık analizleri sonucunda izolatların 22 farklı genotipe sahip olduğu ve bu genotiplerin % 60-88 arasında benzerliklere sahip oldukları belirlendi. Dendrogramın değerlendirilmesi ile izolatların 11 adet tekli genotip, 11 adet küme içerisinde yer aldığı saptandı. Kümelerin 5 adetinin 2 izolat, 3 adetinin 3 izolat, 2 adetinin 4 izolat ve 1 adetinin de 6 izolattan oluştuğu görüldü. Halk sağlığı açısından önemli riskler oluşturan *E. coli*'nin peynirlere bulaşma yollarının ve aşamalarının çok çeşitliliği, bu çalışmada 22 farklı genotip saptanması ile ortaya konuldu. RAPD-PCR sonucunda % 60-88 arasında benzerlik gösteren 22 farklı genotip tespit edilmesi bölgedeki peynirlerde bulunan *E. coli* suşlarının ekolojik çeşitliliğini gösterdi. Bu çeşitlilik *E. coli*'nin peynirlere bulaşma yollarının farklılığından kaynaklanabileceğini düşündürdü. Bu ekolojik çeşitlilik de halk sağlığı açısından önemli riskler oluşturan *E. coli*'nin peynirlere bulaşma yollarının ve aşamalarının daha net saptanması ve kritik kontrol noktalarının daha etkin şekilde belirlenmesinin gerekliliğini göstermektedir.

Kaynaklar

1. Abd El-Razik KA, Abderrahman KA, Ahmed YF, Gomaa AM, Eldebaky HA, (2010). Direct Identification of Major Pathogens of the Bubaline Subclinical Mastitis in Egypt using PCR. *Journal of American Science*, 6(10), 652-660.
2. Ahmed AH, Ahmed SH, Moustafa K, (1988). Occurrence of Fecal Coliforms and Enteropathogenic *Escherichia coli*(EEC) in Egyptian Soft Cheese. *Journal of Food Production*, 51 (6), 442-444.
3. Arslan S, Özdemir F, (2013). Investigation of *Escherichia coli* O157 in Turkish homemade White Cheese. *Istanbul University Faculty of Science Journal of Biology*, 72(1), 45-51.
4. Bingöl BE, Çetin Ö, Çolak H, Hampikyan H, (2012). Presence of enterotoxin and verotoxin in Turkish cheeses sold in İstanbul. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36(4), 424-432.
5. Çiftçi A, Fındık A, Onuk EE, Savasan S, (2009). Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 254-261.
6. Doğan BH, Çakır İ, Keven F, Coşansu S, Kırıl N, Dağar İT, Gürsu G, Halkman KA, (2001). Çeşitli Gıdalarda Koliform, Fekal Koliform ve *E. coli* Varlığı. *Gıda*, 6(2), 83-90.
7. Dufty G, Whiting R, Sheridan J, (1999). The Effect of Competitive Microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 16, 299-307.

8. Ergüllü E, (1980). Beyaz peynirlerin olgunlaşması sırasında mikrofloranın, özellikle gaz yapan bakterilerin değişimi üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, s.21.
9. Food and Agriculture Organisation (FAO), (2011). Preventing *E. coli* in Food, 231.
10. Food and Drug Administration (FDA), (2016). FY 2014-2016 Microbiological Sampling Assigment. Summary Report: Raw Milk Cheese Aged 60 days. Office of Compliance, Center for Food Safety and Applied Nutrition.
11. Food and Drug Administration (FDA), (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Authors: Peter Feng, Stephen D. Weagent, Karen Jinneman. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4A.
12. Halkman KA, (2005). Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık, Ankara, 141-182.
13. Halkman KA, (2013). Gıda Mühendisliği II. Ders Notları, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 24-31.
14. Heperkan D, Sarıyar L, Aytakin A, (1994). Peynirlerde *Escherichia coli* Gelişmesi ve Hijyenin Önemi. Animal, 9, 87-95.
15. Kaper JB, Natro JP, Mobely HLT, (2004). Pathogenic *E. coli* Natural. Review. Microbiology, 2, 123-140.
16. Kaynar Z, Kaynar P, Koçak C, (2005). Ankara Piyasasında Tüketime Sunulan Beyaz Peynirlerin Hijyenik Kalitelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Türk Hijyen Deneysel Biyoloji Dergisi, 62(1,2,3), 1-10.
17. Keskin Y, Özyaral O, Başkaya R, Susur M, (2006). Semt pazarlarında satılan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 36, 9-19.
18. Kousta M, Mataragos M, Skandomis P, Drosinos EH, (2010). Prevalance and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. Food Control, 21(6), 808-815.
19. Ladan NM, Reza G, (2006). A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese. The Journal of Veterinarski Arhiv, 76, 531-536.
20. Madic J, Vingadassalon N, Garam P, Marault M, Scutz F, Brugere H, Jamet E, Auvrey F, (2011). Detection of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7 in Raw Milk Cheeses by Using Multiplex Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 2035-2041.
21. Paneto BR, Hurrino SRP, Macedo C, Santo E, Marin JM, (2007). Occurence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 59(2).
22. Pamela L, Rinemann D, Kathryn H, (2008). The Effect of Milking Management on Microbial Quality Presented at XII. Curso. Novas Enfoques Na produçose reproduced de Bovinos, Uberlandia, Brazil.
23. Quinto EJ, Cepeda A, (1997). Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. Letters in Applied Microbiology, 24, 291-295.
24. Roberts D, Greenwood M, (2003). Practical Food Microbiology. 3rd edition, Blackwell Publishing, 150-170.
25. Stephan R, Schumacher S, Corti S, Krause G, Danuser J, Beutin L, (2008). Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Swiss Raw Milk Cheeses Collected AT Producer Level. Journal of Dairy Science, 91(7), 2561-2565.
26. Tan S, Ertürk YE, (2002). Peynir. TEAE Bakış Dergisi, 1(11), 1-4.
27. Tekinşen KK, Özdemir Z, (2006). Prevalence of the foodborne pathogens in Turkish Van otlı (herb) cheese. Food Control, 17(9), 707-711.
28. Töreci K, (2002). *Escherichia* türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 2.baskı, 1564-1574.
29. Tunail N, (1999). Mikrobiyel enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar. In: Akçelik M, Aydar LY, Ayhan K, Çakır İ, Doğan HB. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Armoni Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 59-90.
30. Üçüncü M, (2013). Süt ve Mamülleri Teknolojisi. Meta Basım Matbaacılık, İzmir.
31. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR, (1991). Distribution of repetitive DNA sequences to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 19(24), 6823-6831.