



RESEARCH ARTICLE

Ticari yumurtacı tavuklarda *Escherichia coli* O157:H7 varlığının araştırılması

Zeki Aras*, Gökçenur Sanioglu

Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
68100, Kampüs, Aksaray, Türkiye
Geliş: 11.04.2015, Kabul: 06.06.2015
*zekiaras@hotmail.com

Investigation of the presence of *Escherichia coli* O157:H7 in commercial layers

Eurasian J Vet Sci, 2015, 31, 4, 218-221
DOI:10.15312/EurasianJVetSci.2015413526

Öz

Amaç: Bu çalışmada klinik yönden sağlıklı görünen ticari yumurtacı tavuk işletmelerinde bulunan tavuklardan toplanan kloakal sıvap örneklerinde *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 varlığının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Konya ili ve çevresinde bulunan 10 farklı kümesteki yumurtacı tavuklardan 200 kloakal sıvap örneği toplandı. Tüm örnekler bakteriyolojik kültür yöntemi ile değerlendirildi. İzolatların verotoksin üretimi lateral flow assay kiti ile belirlendi.

Bulgular: Toplam 200 kloakal sıvap örneğinden 19 (%9.5) sorbitol negatif *E. coli* izole edildi. İzolatlardan 3 (%1.5)'ü *E. coli* O157 olarak tanımlandı ve bu suşlardan 1 (%0.5)'i *E. coli* O157:H7 pozitif olarak bulundu. İzole edilen *E. coli* O157:H7 suşunun verotoksin 1 ve 2'yi ürettiği belirlendi.

Öneriler: Yumurtacı tavuk kloakal sıvap örneklerinden *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 belirlendiği dikkate alındığında veteriner halk sağlığı açısından önemli olabileceği ifade edilebilir.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli* O157:H7, verotoksin, yumurtacı tavuk.

Abstract

Aim: The purpose of this study was to investigate the presence of *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 strain in cloacal swab samples of clinically healthy commercial layers.

Materials and Methods: A total of 200 cloacal swab samples were collected from laying hens at 10 different layer flocks in Konya province. All samples were examined by bacteriological culture method. Verotoxin productions of isolates were detected by lateral flow assay kit.

Results: A total of 19 sorbitol negative *E. coli* strains were isolated from 19 (9.5%) of 200 cloacal swab samples. Three (1.5%) of the isolates were identified as *E. coli* O157 and one (0.5%) of them was found *E. coli* O157:H7 positive. The production of verotoxin 1 and 2 was detected in *E. coli* O157:H7 isolate.

Conclusion: It may be stated that the occurrence of *E. coli* O157 and *E. coli* O157:H7 in cloacal swab samples of layers may be important in veterinary and human public health.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, verotoxin, layer.





Giriş

Escherichia coli (*E. coli*), insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminin doğal florasında bulunan bir bakteridir. Bununla birlikte patojenik özelliğe sahip çok sayıda serogruba sahiptir ve antijenik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır (Wasteson 2001). Günümüzde *E. coli*'yi sınıflandırmak için O, H ve K yüzey antijenlerine göre serogrurlara ayrılmış modifiye Kauffman şeması kullanılmaktadır (Nataro ve Kaper 1998). *E. coli* O157:H7 bu sınıflandırma içerisinde en önemli enterohemorajik serotiptir (Buchanan ve Doyle 1997) ve hastalığa neden olduğu ilk olarak 1983 yılında bildirilmiştir (Riley ve ark 1983, Wasteson 2001). Etken zoonoz olması ve verotoksin salgılayabilmesi nedeniyle halk sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır (Karmali 1989, Rüssmann ve ark 1995). İnsanlarda hemolitik üremik sendrom ve hemorajik colitis gibi önemli hastalıklara yol açabilmektedir (Wallace ve ark 2000).

E. coli kanatlı hayvanların enteritis, koliseptisemi, hava kesesi yangısı, koligranuloma, peritonitis, perikarditis, perihepatitis, artrit, omfalitis, sellulitis ve yumurta sarısı enfeksiyonlarından izole edilmiştir (Barnes ve ark 2003). *E. coli* O157:H7'nin ana bulaşma kaynağı sığır eti olmakla beraber yapılan araştırmalarda kanatlı et ve dışkı örneklerinden de izole edildiği bildirilmiştir (Schoeni ve Doyle 1994, Naylor ve ark 2005). Schoeni ve Doyle (1994) tarafından yapılan deneysel enfeksiyonda *E. coli* O157:H7'nin sekumda kolonize olduğu, yumurta kabuğunda uzun süre canlı kaldığı ve yumurtanın potansiyel rezervuar olabileceği rapor edilmiştir.

Enfeksiyonun tanısında izolasyon ve identifikasyona dayanan klasik kültür yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, antijen ve toksin tipini belirlemek amacıyla moleküler yöntemler, immunomanyetik seperasyon, ELISA ve latex aglütinasyon testleri kullanılmaktadır (Gülhan ve ark 2009).

E. coli O157:H7'nin insanlara bulaşmasında kanatlı ürünlerinin rezervuar olarak rol oynadığına yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte, yumurtacı tavukların bulaşmadaki rolüne yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, klinik yönden sağlıklı görünen yumurtacı tavukların kloakal sıvap örneklerinde verotoksinojenik *E. coli* O157:H7'nin varlığının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Örnek toplanması

Konya ili ve çevresinde bulunan 10 farklı ticari yumurta işletmesindeki 10 farklı kümeden sağlıklı görünen tavuklardan (25-45 haftalık) 200 kloakal sıvap örneği alındı. Her kümeden 20 örnek olmak üzere toplam 200 örnek rastgele örnekleme ile toplandı. Bütün örnekler soğuk zincir altında birkaç saat içinde laboratuvara ulaştırıldı.

Bakteriyel izolasyon ve identifikasyon

Steril sıvapla alınan örnekler 10 mL PBS içerisinde homojen hale getirildi. Selektif ön zenginleştirme amacıyla her örnekten 1 mL alınarak 9 mL Modifiye Triptik Soy Buyyon (mTSB, Oxoid CM0129) içine aktarıldı ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ön zenginleştirme kültüründen 100 µL alınarak, Tellurit-Sefiksim (CT-Supplement, Merck 1.09202) eklenmiş sorbitollü Mac Conkey (CT-SMAC) Agara ekim yapıldı ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. CT-SMAC Agarda sorbitözü fermente etmemiş, renksiz tipik koloniler şüpheli kabul edildi ve biyokimyasal testler ile *E. coli* olarak doğrulandı (Schouten ve ark 2005).

İzole edilen suşlarda O157 antijeninin saptanması için *E. coli* O157 lateks test kiti (DR0620M, Oxoid) kullanıldı. Bir dakika içerisinde aglütinasyon gösteren izolatlar *E. coli* O157 olarak kabul edildi. H7 antijeninin saptanması için *E. coli* Antiserum H7 (BD Difco 221591) kullanıldı. Kısaca, *E. coli* O157 kültüründen ve H7 antiserumundan 0.5 mL test tüpüne alındı. Su banyosunda 50°C'de 1 saat bekletilerek aglütinasyon varlığı incelendi ve aglütinasyonun oluşması pozitif olarak değerlendirildi (Farmer ve Davis 1985).

İzole edilen suşlarda verotoksin (VT) 1 ve 2 varlığının saptanması için lateral flow assay (Duopath Verotoxin, Merck, Germany) test kiti üretici firmanın talimatına göre kullanıldı. İzolatlar öze yardımıyla 1 mL Caye Broth + Carbadox besiyerine ekilerek 37°C de 6 saat inkübe edildi. Oluşan Verotoksinin salınması için kültürden 180 µL alınarak 20 µL polimiksin çözeltisine eklendi ve 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Bu çözeltiden test kitine 160 µL damlatılarak 20 dakika bekletildi ve kırmızı çizginin oluşması pozitif olarak kabul edildi.

Bulgular

Yumurtacı tavuklardan alınan toplam 200 kloakal sıvap örneğinden selektif ön zenginleştirme ve sorbitollü Mac Conkey Agara ekim sonucunda 19 adet (%9.5) sorbitol negatif *E. coli* kolonisi izole edildi. *E. coli*'nin O157 antijenini belirlemek için bu izolatlar latex aglütinasyon testi uygulandı ve 3 (%1.5) izolat *E. coli* O157 olarak identifiye edildi. Bu 3 suştan 1 tanesi (%0.5) H7 antijeni yönünden pozitif bulundu. Yapılan örnekleme sonucunda toplanan 200 yumurtacı tavuk kloakal sıvap örneğinin bir tanesinde *E. coli* O157:H7 tespit edildi. Bu izolatin VT1 ve VT2 toksinine sahip olduğu da belirlendi.

Tartışma

E. coli O157:H7 gıda kaynaklı salgınların en önemli nedenlerinden biridir. Etken insanlarda hemorajik kolitis, diyare ve hemolitik üremik sendroma neden olur (Wallace ve ark 2000). Verotoksin üreten *E. coli* O157:H7 ilk olarak hayvansal kaynaklı gıdalarda tespit edilmiş ve Amerika Birleşik



Devletleri ile Kanada'da ortaya çıkan gıda kaynaklı iki ayrı büyük salgında kanatlı hayvan ürünlerinden izole edilmiştir (Ryan ve ark 1986, Carter ve ark 1987). *E. coli* O157:H7'nin kanatlı hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunduğu ve yumurtanın kloakadan geçiş sırasında *E. coli* O157:H7 ile kontamine olduğu bildirilmiştir (Berry ve ark 1985, Park ve ark 2003).

Bu çalışmada, yumurtacı tavuk işletmelerinden alınan kloakal sıvap örneklerinde *E. coli* O157:H7 varlığı araştırıldı ve toksin tipi incelendi. Bu amaçla incelenen 200 adet kloakal sıvap örneğinden 19 *E. coli* suşu izole edildi ve lateks aglütinasyon testi ile incelendiğinde yalnızca 3 (%1.5)'ü *E. coli* O157 olarak tanımlandı. *E. coli* O157 dünyanın değişik bölgelerinde sığır, koyun, domuz ve kümes hayvanlarından izole edildiği rapor edilmiştir (Doyle ve Schoeni 1987, Heuvelink 1999). Tavuklarda yapılan çalışmalarda, *E. coli* O157 prevalansının Hollanda'da yumurtacı tavuklarda %0.1 (Schouten ve ark 2005), Hindistan'da %0.4 (Wani ve ark 2004) ve Slovakya'da %9.3 (Pilipcinec ve ark 1999) olduğu bildirilmiştir. Kuzey Amerika'da 264 kanatlı örneğinde %1.5 oranında *E. coli* O157 tespit edilmiştir (Doyle ve Schoeni 1987). Ancak, İngiltere ve Kore'de yapılan çalışmalarda ise tavuklarda *E. coli* O157'nin izole edilemediği rapor edilmiştir (Chapman ve ark 1997, Jo ve ark 2004). Benzer şekilde, Hollanda'da yumurtacı tavuklara ait 501 örnek incelenmiş ve *E. coli* O157'nin izole edilemediği bildirilmiştir (Heuvelink 1999).

Türkiye'de yumurtacı tavuk veya tavuk eti örneklerinde *E. coli* O157:H7 varlığını araştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Erzurum'da toplanan kanatlı eti numunelerinde %2.7 oranında *E. coli* O157 ve aynı örneklerde %0.9 oranında *E. coli* O157:H7 izole edildiği bildirilmiştir (Ünsal 2007). Ankara'da tavuk eti örneklerinde klasik kültür metoduyla %1.8 ve immünoyenetik seperasyon metoduyla %3.5 oranında *E. coli* O157:H7 izolasyonu rapor edilmiştir (Mercanoğlu ve Aytaç 2006). Ege bölgesinin bazı illerinden toplanan kloakal sıvap örneklerinde %6.40 (Sekmen ve Kaya 2010) ve Afyon'dan toplanan kloakal sıvap örneklerinde %1.05 (Akkaya ve ark 2006) oranında *E. coli* O157:H7 tespit edilmiştir. Mevcut araştırmada elde edilen %1.5 *E. coli* O157 pozitiflik oranı ve %0.5 *E. coli* O157:H7 oranı Ünsal (2007) ile Akkaya ve ark (2006)'ın çalışmasıyla uyumlu fakat Sekmen ve Kaya (2010) ile Mercanoğlu ve Aytaç (2006) belirlediği oranlardan düşük bulundu. Türkiye'de yapılan çalışmalarda bulunan farklı sonuçlar bölgesel farklılıktan kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

Çek Cumhuriyetinde 1999 yılında yapılan bir çalışmada 216 kloakal sıvap örneği lateks aglütinasyon testiyle incelenerek 20 *E. coli* O157:H7 izolatu tespit edilmiş ve bu suşların 19 (%95)'unda her iki verotoksin geninin de bulunduğu bildirilmiştir (Pilipcinec ve ark 1999). Bu çalışmada da 1 adet *E. coli* O157:H7 suşu izole edildi ve bu suşun her iki verotoksini

sentezlediği lateral flow assay kiti ile ortaya konuldu.

Öneriler

Sonuç olarak, yumurtacı tavuk kloakal sıvap örneklerinde *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7 varlığı dikkate alındığında, bu durumun halk sağlığı açısından önemli sonuçlara neden olabileceği ifade edilebilir.

Kaynaklar

- Akkaya L, Atabay HI, Kenar B, Alisarlı M, 2006. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 on chicken carcasses sold in Turkey. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50, 513-516.
- Barnes HJ, Vaillancourt JP, Gross WB, 2003. Colibacillosis, in: *Disease of Poultry*, 11 edition, Ed: Saif YM, Iowa State Press, Iowa, USA, pp: 631-656.
- Berry JT, Doyle MP, Schoeni JL, 1985. Colonization of chicken cecae by *E. coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol*, 49, 310-315.
- Buchanan R, Doyle MP, 1997. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technol*, 51, 69-76.
- Carter AO, Borczyk AA, Carlson JAK, Harvey B, Hockin JC, Karmali MA, Krishnan C, Korn AD, Lior H, 1987. A Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med*, 317, 1496-1500.
- Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA, 1997. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect*, 119, 245-250.
- Doyle MP, Schoeni JL, 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol*, 53, 2394-2396.
- Farmer JJ, Davis BR, 1985. H7 antiserum sorbitol fermentation medium: A single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol*, 22, 620-625.
- Gülhan T, Boynukara B, Alişarlı M, 2009. Typing of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from animal and human sources. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 181-184.
- Heuvelink AE, 1999. Isolation and characterization of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int J Food Microbiol*, 52, 67-75.
- Jo MY, Kim JH, Lim JH, Kang MY, Koh HB, Park YH, Yoon DY, Chae JS, Eo SK, Lee JH, 2004. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. *Int J Food Microbiol*, 95, 41-49.
- Karmali MA, 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 2, 15-38.
- Mercanoğlu B, Aytaç SA, 2006. Ankara piyasasında satışa sunulan tavuk etlerinde *Yersinia enterocolitica* ve *Escherichia coli* O157 varlığının araştırılması. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Mayıs 24-26, Bolu, Türkiye, pp: 162.
- Nataro JP, Kaper JB, 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11, 142-201.





- Naylor SW, Roe AJ, Nart P, Spears K, Smith DGE, Low JC, Gally DL, 2005. *Escherichia coli* O157:H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE4 operon. *Microbiology*, 151, 8 2773-2781.
- Park CH, Kim HJ, Hixon DL, Bubert A, 2003. Evaluation of the duopath verotoxin test for detection of shiga toxins in cultures of human stools. *J Clin Microbiol*, 41, 2650-2653.
- Pilipcinec E, Tkáčikova L, Naas HT, Cabadaj R, Mikula I, 1999. Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiol*, 44, 455-456.
- Riley LW, Remis RS, M.D, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML, 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *Engl J Med*, 308, 681-685.
- Rüssmann H, Kothe E, Schmidt H, 1995. Genotyping of shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. *J Clin Microbiol*, 36, 840-842.
- Ryan CA, Tauxe RV, Hosesk GV, Wells JG, Stoesz PA, McFadden Jr H., Smith PW, Wright GF, Blake PA, 1986. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. *J Infect Dis* 154, 631-638.
- Schoeni JL, Doyle MP, 1994. Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl Environ Microbiol*, 60, 2958-2962.
- Schouten JM, Van De Giessen AW, Frankena K, De Jong MC, Graat EA, 2005. *Escherichia coli* O157 prevalence in Dutch poultry, pig finishing and veal herds and risk factors in dutch veal herds. *Prev Vet Med*, 70, 1-15.
- Sekmen SGD, Kaya O, 2010. Broiler piliçlerden *Escherichia coli* O157:H7 serotipinin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 37, 19-31.
- Ünsal C, 2007. Erzurum bölgesinde satışa sunulan etlerde *E. coli* O157:H7'nin varlığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Programı, Erzurum, Türkiye, pp: 36-40.
- Wallace DJ, Van Gilder T, Shallow S, Fiorentino T, Segler, SD, Smith KE, Shiferaw B, Etzel R, Garthright WE, Angulo FJ, 2000. Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. FoodNet Working Group. *J Food Prot*, 63, 807-809.
- Wani SA, Samanta I, Bhat MA, Nishikawa Y, 2004. Investigation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in avian species in India. *Lett Appl Microbiol*, 39, 389-394.
- Wasteson Y, 2001. Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Vet Scand*, 95, 79-84.