

## KIYMALARDA *E.COLI* O157:H7 ARANMASINDA EZ COLI KİTİ KULLANIMI ÜZERİNE ARAŞTIRMA<sup>1</sup>

### RESEARCH on USING EZ COLI KIT FOR SEARCHING *E.COLI* O157:H7 IN GROUND BEEF

Mallhe R. NOVEİR, Hilal B. DOĞAN, A. Kadir HALKMAN

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

**ÖZET:** Bu çalışmada 57 çiğ kıyma örneğinde standart kültürel yöntem ve EZ Coli hazır kiti ile *E. coli* O157:H7 serotipi aranmıştır. EZ Coli kiti ile 2 adet örnekte (%3,5) pozitif sonuç alınmış olmasına rağmen pozitif sonuçların elde edildiği zenginleştirme besiyerinden SMAC agar besiyerine yapılan ekimlerde *E. coli* O157 serotiplerine rastlanılmamıştır. Benzer şekilde pozitif sonuç alınan örneğe ait LST broth ve mEC broth kültürlerinden de SMAC agarda bu serotiplere rastlanılmamıştır. Bu bulgular, refakatçi flora baskılaması nedeni ile izolasyon yapılamaz iken kitin çok duyarlı olduğunu göstermekle beraber, tersine olarak, bir başka örneğe ait EZ Coli zenginleştirme besiyerinden SMAC agara yapılan ekimde *E. coli* O157 serotipinin izole edilebilmesi, buna karşın bu örnekte kitin negatif sonuç vermesi bu kez de kitin duyarlılığı hakkında endişe doğurmuştur. Bu kit çok duyarlı olsa bile, pozitif sonuç alınan örneklerden standart kültürel yöntemlerle izolasyon yapıp bakterinin H7 serotipi olup olmadığı ve/veya verotoksijenik olup olmadığı saptanamaz ise rutin kullanımda fazlaca bir şansı olmayacaktır.

**ABSTRACT:** In this research, 57 ground beef samples were analyzed by EZ Coli kit and simultaneously by conventional culture techniques for the presence of *E. coli* O157: H7 serotype. Although 2 positive results (3.5%) were obtained by EZ Coli kit, no *E. coli* O157 isolation was succeeded from the SMAC agar dishes spread from EZ Coli enrichment broth and also LST broth and mEC broth cultures of the same samples. These results indicate that this kit is very sensitive even the masking of cohabitant flora in agar media. On the contrary, one *E. coli* O157 was isolated from EZ Coli kit enrichment broth culture while the kit gave negative result. Hence a suspicion was borne about the sensitiveness of the kit. Even if the kit is highly sensitive, if no isolation can be done by conventional techniques or it can not be determined whether the isolates are H7 serotype and/or verocytotoxicogenic, the kit will have not have any chance to be employed for routine analysis.

### GİRİŞ

*E. coli* 1950'li yılların sonuna kadar insan ve memeli hayvanlar ile kanatlıların bağırsağında bulunan ve patojenik olmayan flora olarak nitelendirilir iken, bugün insan ve hayvanlarda ölüme kadar gidebilen pek çok hastalığın etmeni olduğu saptanmıştır. Bu hastalıklar arasında çeşitli diyareler, yara enfeksiyonları, menenjit, septisemi, arteriosklerozis, hemolitik üremik sendrom (HUS) ve çeşitli immunolojik hastalıklar en önemli olanlardır (DOYLE ve ark. 1997; TUNAİL 1999).

Bireysel vakalar dışında *E. coli* O157:H7 ilk olarak 1982 yılında ABD'de Oregon'da 26 ve Michigan'da 21 olmak üzere 47 vaka ile ve her ikisi de yine daha öncekilere benzemeyen kanlı diyare şeklinde 2 salgın ile görülmüştür. Her iki salgında da köfteli sandviçlerin yenilmesinin hastalığa neden olduğu belirlenirken salgınların birinde aynı partiye ait donmuş köftelerde *E. coli* O157:H7'ye rastlanmıştır. Bundan hemen sonra benzer vakalar ABD, Kanada ve İngiltere'de görülmüş, daha sonra Meksika, Çin, Arjantin, Belçika gibi ülkelerde de aynı hastalığa rastlanmıştır, 1996 yaz aylarında ise Japonya'da 17 kişinin ölümüne neden olan salgının etmeni *E. coli* O157:H7 olarak gösterilmiştir (DOYLE, 1991; HALKMAN ve ak., 1996; REMIS ve ark., 1984).

Bugün *E. coli* O157:H7 serotipi bilinen en önemli gıda kaynaklı patojenler arasında yer almaktadır. O26: H11 serotipi ile birlikte Enterohemorajik *E. coli* grubunda yer alır. Her iki bakteri de aynı hastalıkları yapmakla

<sup>1</sup>Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen VHAG-1492 nolu projenin bir bölümüdür.

beraber O26:H11 serotipine gıdalarda rastlanılamamıştır. Bir diğer deyiş ile gıda kaynaklı tek EHEC serotipi *E. coli* O157:H7'dir (KARAPINAR ve GÖNÜL 1998; NOVEİR, 1996).

*E. coli* O157:H7'nin izolasyonu için kullanılan geleneksel yöntemlerin büyük çoğunluğu selektif zenginleştirme ve katı besiyerine ekim aşamalarını içermektedir. Selektif zenginleştirme besiyeri olarak modifiye EC (mEC) broth, modifiye triptik soy (mTS) broth, LST broth yaygın bir şekilde kullanılırken selektif katı besiyelerinde *E. coli* O157:H7'nin sorbitol ve  $\beta$ -glucuronidase negatif olması temel özellik olarak ele alınmıştır. Bu şekilde laktoz yerine sorbitolün kullanıldığı sorbitol MacConkey (SMAC) agar besiyeri pek çok çalışmada başarı ile kullanılmıştır. SMAC agara sefiksim ve potasyum tellurit ilavesi ile refakatçi flora baskılanmakta ve dolayısı ile izolasyon şansı daha yükselmektedir (ÇAKIR 1999; MARCH ve RATNAM, 1986; NOVEİR, 1996; OKREND ve ark., 1990).

Selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerlerinde en büyük sorun bu besiyerlerinde *E. coli* O15:H7 serotipi ile aynı düzeyde gelişen yakın araba bakterilerdir. Bunlar arasında *E. coli* tip 1, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. ve *Hafnia alvei* *E.coli* O157: H7'yi maskeleyerek sahte negatif sonuçlara yol açabilmektedirler. Bu nedenle bu besiyerlerinde gelişebilen refakatçi flora içinde *E. coli* O157:H7'nin başlangıç konsantrasyonu %1'den daha az olur ise standart boy bir petri kutusunda ideal olarak oluşması beklenen 100 kadar koloni içinde *E. coli* O157:H7 bulunmayabilmektedir. Selektif zenginleştirme ve katı besiyerleri bileşimlerin refakatçi flora aleyhine formülüle edilmesi ve/veya yüksek inkübasyon sıcaklığı gibi uygulamalar ile bu sorun ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır (HALKMAN ve ark. 2000).

*E. coli* O157:H7 serotipinin izolasyonu amacı ile geliştirilmiş daha hızlı ve daha duyarlı olan genetik, enzimatik ve immunolojik analiz metotlarının kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (NOVEİR 1996; ROUGEL 1999).

EZ COLİ (Difco), ticari olarak hazırlanmış bir kit olup, standart bir mikropipette bulunan *E. coli* O157 için spesifik olan hızlı immunoassay yöntemidir. *E. coli* O157 ve laktozu fermente eden diğer koliform bakteriler için selektif olan tek aşamalı zenginleştirme besiyeri ve *E. coli* O157 aranmasında bir mikrofilament ELISA testi olan EZ coli detektör uç olmak üzere iki unsurdan oluşmaktadır (ANONYMOUS 1996; SULLIVAN 1995).

Bu kite benzer şekilde geliştirilmiş olan başka ticari kitler de vardır. Bunlardan BioMerieux tarafından üretilen Mini Vidas sistemi ve Organon Teknika tarafından üretilen EHEC-TEK sistemi en çok kullanılanlar arasındadır. Her ne kadar Mini Vidas için 7 basamaklı, EHEC-TEK için 11 basamaklı bir işlem uygulanırken EZ coli için 14 basamak bulunmakta ise de analiz sürelerinin Mini Vidas'da 45 dakika, EHEC-TEK'de 90 dakika iken EZ Coli'de sadece 9-10 dakika olması EZ Coli için büyük bir üstünlük sağlamaktadır (HAWKINS ve ORME 1995; RAUGEL 1999).

EZ Coli zenginleştirme brothu *E. coli* O157 ve laktoz-pozitif olan bakteriler için selektif bir besiyeridir. İstenmeyen mikrofloraların gelişimini önlemek için besiyeri bileşimine kullanılan örneğe bağlı olmak üzere akriflavin ve/veya novobiosin ilave edilmektedir. İlave edilen 25 gram örnekte 1 kob *E.coli* O157 mevcut ise dahi 42°C'de 24 saat inkübasyondan sonra bakteri sayısı 10<sup>6</sup> kob/ml'ye ulaşabilmektedir. Zenginleştirme besiyerinde 24 saat inkübasyondan sonra EZ Coli detektör uç ile test sonuçlanmaktadır. EZ Coli detektör uç; bir pozitif ve bir negatif renk değişim alanı ve örnek test alanı olan üç reaksiyonluk bölgeden oluşmaktadır. Test alanı *E. coli* O157'ye spesifik olan primer antikor içermektedir. Test direkt olarak EZ Coli zenginleştirme brothundan yapılmak üzere EZ Coli detektör ucun test alanında menekşe-eflatun rengin gelişmesi *E. coli* O157'nin varlığını göstermektedir. Toplam test süresi 10 dakika sürmekle beraber çok kanallı mikropipet kullanılarak 12 test aynı zamanda yapılabilmektedir. Bu uçlar *Salmonella* O grup-N dışında diğer bakterilerle çapraz reaksiyon vermemektedir. Bundan dolayı *E. coli* O157 gibi reaksiyon veren uçlar biyokimyasal ve serolojik tekniklerle doğrulanmaktadır (ANONYMOUS 1996; SULLIVAN, 1995).

FIRSTENBERG-EDEV ve SULLIVAN (1997) EZ Coli kiti üzerindeki çalışmalarında *E. coli* O157 ile aşılınmış gıdalarda denenen 42 suşun tümünü pozitif, O157 olmayan 29 *E. coli* suşunun tümünün negatif sonuç verdiğini, *Citrobacter*, *Hafnia* ve *Klebsiella*'nın selektif besiyerinde geliştiğini ancak kitle pozitif sonuç vermediğini, 2 adet *Salmonella* O grup N'in pozitif sonuç verdiğini, temiz ve doğal olarak kontamine olmuş

başta çiğ et olmak üzere 378 gıda ile *E. coli* O157'nin 50 farklı suşu ile kontamine edilmiş 337 farklı gıdada (dana, domuz, hindi, piliç gibi çiğ et ve süt ürünleri baharatlar, elma şarabı) %1,7 sahte pozitif ve %1,5 sahte negatif sonuç alındığını, bu bulgulara göre bu kitin çiğ ve işlenmiş gıdalarda hızlı ve güvenilir sonuç verdiğini belirlemişlerdir.

Bu çalışmada tümüyle geleneksel yöntemler ile toplam 57 çiğ kıyma örneğinde standart kültürel yöntemler ile *E. coli* O157:H7 serotipi aranmış, ayrıca rutin analizlerde kabul edilen en iyi analiz kitlerinden birisi olan EZ Coli Rapid Test Kiti denenmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

Denemelerde 57 çiğ kıyma örneği kullanılmıştır. Örnekler tümüyle Ankara'daki kasap dükkanları ve marketlerden sağlanmıştır.

### Metot

#### Besiyerleri

Denemelerde kullanılan besiyerlerinin bileşimleri ve hazırlanışları aşağıda verilmiştir.

- Modifiye EC (mEC) Broth: Trypton (Oxoid) %2; laktöz (Oxoid) %0,5; bile salts no 3 (Difco) %0,112; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) %0,15; NaCl (Merck) %0,5. Bileşenler 1 litre suda çözülüp Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilip oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 20 mg/l olacak şekilde novobiosin (Merck) ilave edilmiştir. mEC broth erlenlerde 135 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

- **Lauryl Sulphate Tryptose (LST) Broth:** 35,5 g/litre konsantrasyonda hazır LST broth (Merck) besiyeri otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. LST broth erlenlerde 135 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

- **Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar:** 51,6 g/litre konsantrasyonda hazır SMAC agar (Oxoid) besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

- **EZ Coli Zenginleştirme Besiyeri:** 36,7 g/l konsantrasyonda hazırlanan EZ Coli zenginleştirme besiyeri (Difco) erlenlere 225'er ml dağıtılmış, otoklavda 121°C 'da 15 dakika strelizasyondan sonra besiyeri oda sıcaklığına soğutulmuş ve üzerine 20 mg/l konsantrasyon olacak şekilde filitre ile sterilize edilmiş novobiosin ile 10 mg/litre konsantrasyonda olacak şekilde yine filtre ile sterilize edilmiş acriflavine hidroklorür ilave edilmiştir. EZ Coli zenginleştirme besiyeri erlenlerde 225 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

#### Standart Kültürel Analizler

*E. coli* O157:H7 aranmasında kullanılan örnek miktarı benzer diğer patojenlerde olduğu gibi 25 g olmakla beraber bu çalışmada örnekler 55 g olarak alınmıştır. Bu miktarın 2 adet 15 gramlık bölümü her biri 135 ml olan mEC broth ve LST broth besiyerlerine, kalan 25 gramı ise 225 ml olarak hazırlanan EZ Coli zenginleştirme besiyerine ilave edilmiştir. mEC broth ve LST broth besiyerleri 37°C 'da, EZ Coli zenginleştirme besiyeri ise 42°C'da 24 saat inkübe edilmişlerdir.

Bu sürenin sonunda mEC broth, LST broth ve EZ Coli zenginleştirme besiyeri kültürlerinde hazırlanan 10<sup>-4</sup> ve 10<sup>-5</sup> seyreltilerden içlerinde SMAC agar bulunan petri kutularına 0,1'er ml inoküle edilip yayma yapılmış ve petri 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde her ürün için 3 farklı selektif besiyeri ve 2 farklı seyreltme kullanılarak *E. coli* O157:H7 izolasyon şansı artırılmıştır.

İnkübasyon sonunda SMAC agar petri kutularında sorbitol negatif en az 5'er koloni nutrient broth besiyerine alınarak 37°C'da 24 saat inkübasyon ile aktive edilmişlerdir. Bu kültürler HALKMAN ve DOĞAN (1997) tarafından geliştirilen indentifikasyon şemasına göre tanımlanmışlardır. İdentifikasyonda kullanılan besiyerleri ile çözümlerin hazırlanması ile sonuçların değerlendirilmesi BAM/AOAC (ANONYMOUS 1984) ve TEMİZ (1994)'e göre yapılmıştır.

### EZ Coli Testi

EZ Coli zenginleştirme besiyerinde gelişen kültürlerle EZ Coli detektör ucun uygulanmasından önce, kıyma partiküllü materyal olduğu için bir filitreleme uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla EZ Coli filitre ucuna üstten normal steril bir pipetle 1 ml kültür konulmuş, 1000 µl mikropipet bu uca geçirilmiş ve U tabanlı mikrotiterin en üstteki yuvasına 4-6 damla olacak şekilde filitrelenmiş kültür aktarılmıştır. Sonra aynı mikrotiterin üstten 2. yuvasına 2 damla EZ Coli secondary antibadi, 3. yuvaya ise 3 damla EZ Coli substratı aktarılmıştır. Aynı bir tüpe ise 1 ml kadar EZ Coli yıkama tamponu konulmuştur.

Bu işlemler tamamlandıktan sonra EZ Coli detektör ucundaki sarı ve yeşil başlıklar çıkarılmış 200 µl'ye ayarlanmış mikropipet ile ucun içindeki transport tamponu boşaltılmış, sonra bu detektör uçlar EZ Coli yıkama tamponu ile yıkanmışlardır. Bu amaçla 100 µl'ye ayarlanmış mikropipete normal bir mikropipet ucu geçirilip 100 µl EZ Coli yıkama tamponu çekilmiş ve bu miktar detektör ucun üstüne aktarılmış, mikropipetteki normal uç çıkarılarak yerine detektör uç takılmış ve 100 µl'lik yıkama tamponu detektör uçtan dışarı boşaltılmıştır. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlanmıştır.

100 µl'ye ayarlanmış mikropipetin ucuna detektör uç takıldıktan sonra mikrotiterin en üst kuyucuğundaki filitrelenmiş örnek yavaşça bu uca çekilmiş ve geri boşaltılmıştır. Bu işlem 5 kez tekrarlandıktan sonra detektör uçta test edilecek filitrelenmiş kültür çekilmiş halde iken oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılmış, bu süre sonunda kültür detektör uçtan dışarı boşaltılmış ve yukarıda belirtildiği şekilde detektör uç EZ Coli yıkama tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. Sonra yine 100 µl'ye ayarlanmış mikropipete detektör uç takılı iken mikrotiterin 2. kuyusunda bulunan secondary antibadi 5 kez çekilip boşaltılmış, detektör uçta secondary antibadi bulunurken oda sıcaklığında yine 2 dakika inkübasyona bırakılmış, secondary antibadi dışarı boşaltıldıktan sonra yine yukarıda belirtildiği gibi detektör uç 3 kez EZ Coli yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

Daha sonra öncekilerden farklı olarak 150µl'ye ayarlanmış olan mikropipetin ucuna detektör uç takılmış ve mikrotiterin 3. kuyucuğunda bulunan EZ Coli substratı yine öncekilerden farklı olarak sadece 1 kez çekilmiş ve bu şekilde oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda EZ Coli substratı dışarı boşaltılmış ve mikropipet 100 µl'ye ayarlanarak yıkama tamponu ile 2 kez yıkanmıştır.

Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilen detektör uçlarda renk değişimine göre muhtemel *E. coli* O157 sonucuna varılmıştır. Buna göre detektör ucun 3 kademeli okuma alanlarından pozitif kontrol olan üst alanın menekşe rengi olması, negatif kontrol olan orta alanın renksiz olması detektör ucun doğru çalıştığını göstermiştir. Test alanı olan alttaki bölgede menekşe renk oluşumu muhtemel *E. coli* O157 olarak değerlendirilmiş, bu bölgenin renksiz kalması ise denemeye alınan örnekte *E. coli* O157 bulunmadığına karar verilmiştir (ANONYMOUS 1996).

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada toplam 57 kıyma örneğinden 1 adet *E.coli* O157 serotipi standart kültürel yöntemle izole edilmiş, 2 kit (%3,5) ile pozitif sonuç alınmıştır. Kitin pozitif ve negatif sonuç veren örnekleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

Her ne kadar 2 örnekte EZ coli kiti ile *E. coli* O157 serotipi bulunmuş ise de bu örneklerin zenginleştirme besiyerlerinden *E. coli* O157 serotiplerini izole etmek mümkün olmamıştır. Yöntem gereği EZ Coli zenginleştirme besiyerine uygulanan kitte pozitif sonuç alınır ise bu zenginleştirme besiyerinden SMAC agar besiyerine sürme yapıp sorbitol negatif kolonilerin *E. coli* O157 serotipleri olup olmadığı mutlaka biyokimyasal ve özellikle serolojik testler ile doğrulanmalıdır (ANONYMOUS 1996; SULLIVAN 1995). Bu amaçla pozitif sonuç veren örneklerin sadece EZ Coli zenginleştirme kültürlerinde değil aynı zamanda aynı örneklerin LST broth ve mEC broth kültürlerinde de farklı dilüsyonlardan SMAC agar besiyerine ekim yapılmış, sorbitol negatif bütün koloniler izole edilerek biyokimyasal testlere alınmış, ancak sonuçta bu serotipe rastlanılmamıştır.

Bunun üzerine, kitin aşırı duyarlı bir sistem olmasından kaynaklanan bir refakatçi flora baskılamasından dolayı mı *E. coli* O157 izole edilemediği kuşkusunu ile bu kez aynı kültürlerden 14 cm çaplı büyük petri kutularına hazırlanmış SMAC agar besiyerlerine yine bu kültürlerin farklı seyreltilerden 0,5 ml yayılarak izolasyon duyarlılığı standart petri kutularındaki 1:100'den 1:500'e çıkarılmış buradan izole edilen sorbtol negatif kolonilerde de yine *E. coli* O157'ye rastlanmamıştır.

Yukarıda açıklanan şekilde *E. coli* O157:H7'nin refakatçi flora içinden standart kültürel yöntem ile geri alınabilmesi için refakatçi flora içindeki başlangıç konsantrasyonunun 1:100'den daha fazla olması gereklidir. EZ Coli kiti ile başlangıçta 25 g örnekte 1 adet *E. coli* O157 ve 100 adet/g koliform bakteri olsa dahi pozitif sonuç alınabilmektedir. Ancak sonucun biyokimyasal ve serolojik olarak doğrulanabilmesi bu denli düşük konsantrasyonlarda mümkün görülmemektedir. Bunun nedeni pozitif sonuç veren kitlere ait selektif zenginleştirme besiyerinden SMAC agara yapılan ekimlerde *E. coli* O157:H7'ye rastlanma olasılığının düşük olmasıdır.

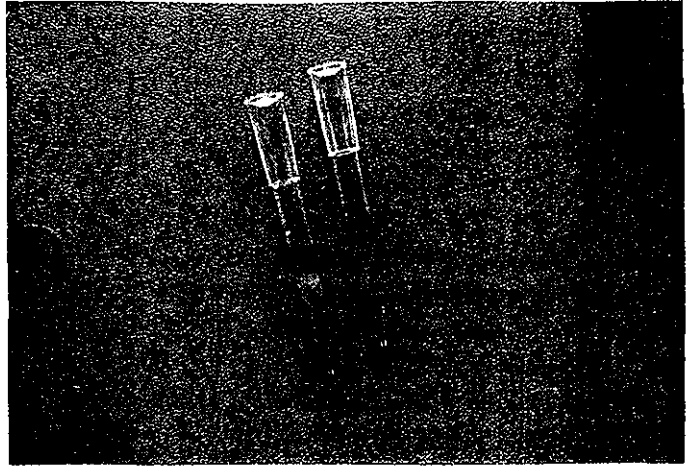
Bu çalışmada klasik yöntemle bir adet çiğ kıyma örneğinden izole edilen suşun *E. coli* O157 serotipi olduğu, ancak bunun H7 olmadığı saptanmıştır. *E. coli* O157 olduğu belirlenen izolat gerek nötralizasyon testi ile mikroskopik gerek H7 antiserumu ile hareketin engellenmesi (FARMER III ve DAVIS, 1985; AKKUŞ, 1996) yöntemleri ile analiz edilmişlerdir.

Biyokimyasal test sonuçlarına göre toplam 4 örnekten elde edilen 6 izolat *E. coli* O157 olarak belirlenmiş ancak lateks (Oxoid) ve lam üzerinde *E. coli* O157 antiserumu (Difco) ile yapılan aglütinasyon testleri ile bunlardan sadece birinin *E. coli* O157 olduğu görülmüştür. Lateks ve lam aglütinasyon testleri birbirlerini doğrulamıştır.

Söz konusu toplam 6 izolat içinde 2 adet MUG pozitif olan da vardır. Her ne kadar *E. coli* O157:H7 serotipi MUG negatif ise de, THOMPSON ve ark. (1990) *E. coli* O157 serotipleri içinde %11,7 oranında MUG pozitif olanları da saptadıkları için bu olasılık göz ardı edilmemiş ve MUG pozitif izolatlar da serolojik kontrole alınmıştır. Ancak *E. coli* O157 olarak bulunan izolatın MUG negatif olduğu görülmüştür.

Kuzey Amerika, Avrupa, Uzak doğu ülkelerine yapılmış olan çalışmalarda *E. coli* O157:H7'ye rastlanılmış olmasına rağmen Türkiye'de yapılan çalışmalarda bugüne kadar gıdalardan *E. coli* O157:H7 serotipi izole edildiğine ilişkin veriler oldukça azdır (HALKMAN ve ark. 2000) DOYLE ve SCHOENI (1987) analize aldıkları 896 domuz, sığır, kuzu, tavuk etinde toplam 18, WELLS ve ark. (1991) 23 süt örneğinde 1, CHAPMAN ve ark. (1993) 2103 sığırdan yaptıkları çalışmalarında karkaslarda 7 *E. coli* O157:H7 saptamışlar iken Türkiye'de gerek diyareli, hastalarda gerek gıdalarda bu bakteriye rastlanmamış olması dikkat çekmektedir.

Yukarıda ilgili bölümlerde geleneksel yöntem ile yapılan analizlerde hedef bakterinin, zenginleştirme ve selektif izolasyon besiyerlerinde beraber gelişebilen refakatçi flora içindeki sayısal oranının %1'den daha fazla olması gerektiği belirtilmiştir. Bu bulguya göre 57 örneğin sadece 1 adedinde (%1,8) *E. coli* O157 serotipi saptanıp H7 serotipinin bulunamaması örneklerden 1 adedinde *E. coli* O157 serotipinin söz konusu refakatçi flora içindeki oranının %1'den fazla olduğunu, diğer 56 örnekte ise bu serotipin olmadığını söyleyemeyeceği, ancak matematik olarak bu 56 örnek için *E. coli* O157 serotipinin adı geçen refakatçi flora içindeki oranının %1'den daha az olduğu söylenebilir. Bir diğer ifade şekli ile tanımlanmış izolatların %28,3'ünü oluşturan *H. alvei* göz ardı edilip sadece koliform grup bakteriler dikkate alırsa dahi sırasıyla ortalama olarak çiğ kıymalarda



Şekil 1. EZ Coli kitinde pozitif ve negatif sonuçlar

155 EMS/g düzeyinde koliform grubu bakterilerin refakatçi flora olarak bulunması, bir anlamda *E. coli* O157:H7'nin çiğ kıymalarda 1,5 EMS/g'dan daha az olduğunu göstermektedir.

Analize alınan örneklerde *E. coli* O157:H7 saptanamamış olması bu açıdan bakıldığında hiç bir şekilde Türk Halkı'nı rahatlatacak bir bulgu değildir. Tersine olarak *E. coli* O157:H7'nin hayvansal gıdalarda bu denli yüksek koliform grup bakteri (ve diğer adı geçen refakatçi flora) içinde saptanamamış olması tehlike göstergesidir. Eğer bu ürünlerde koliform grup bakteri sayısı örneğin 10 misli daha az olsa idi buna bağlı olarak *E. coli* O157:H7'nin örneklerdeki geleneksel yöntem ile saptanabilecek maksimum sayısı da 10 misli azalacak, hastalık riski 10 kez daha az olacak idi.

Kuşkusuz bu yorum şekli "Türkiye'de *E. coli* O157:H7 serotipi vardır, ancak analiz yönteminin duyarsızlığına bağlı olarak bulunamamıştır" anlamına gelmemekte, sadece "bu bakterinin olmadığı anlamının çıkarılmaması gerektiği" vurgulanmaktadır.

Ayrıca AKKUŞ (1996) tarafından sığır dışkılarında ve HALKMAN ve ark. (2000) tarafından çiğ kıymada *E. coli* O157:H7'ye rastlanması gıda hijyeni oldukça düşük olan işletmelerimiz ve dolayısıyla Türk Halk Sağlığı açısından kayda değer bir tehlike potansiyelini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, piyasa taramalarında maliyet hesapları göz önüne alınarak immuno manyetik ayırım gibi sistemlerin kullanılması yararlı olacaktır. EZ Coli kiti gibi sistemler oldukça duyarlı olmakla beraber bunların doğrulanması oldukça zordur. EZ Coli kitinde 2 adet *E. coli* O157 pozitif sonuç alınmış olmakla beraber pozitif sonuç alınan EZ Coli özenleştirme kültürlerinden tüm çalışmalara karşın biyokimyasal özellikleri *E. coli* O157 serotipine benzeyen izolatlar elde edilememesi bu kitin aşırı duyarlı mı yoksa sahte (false) pozitif sonuç mu verdiğini açıklığa çıkaramayacaktır. Konu üzerinde yapılmış diğer dış yayınlara göre kit aşırı duyarlıdır. Tarafımızca yapılan çalışmalarda da bu kitin basit bir deneyim kazanılması ile çok kolaylıkla kullanılabilirliği görülmüştür. Ancak 2 kıymada *E. coli* O157 serotipi olduğu kabul edilse dahi bunların H7 serotipine dahil olup olmadıkları, bunlar H7 serotipi değilse dahi verotoksijenik olup olmadıkları bir bilinmeyen olarak kalacaktır. Bu nedenle *E. coli* O157 aranmasında pozitif sonuç veren örneklerde doğrulama değilse bile H7 serotipi ve verositotoksin testi yapılabilecek şekilde izolasyon olanağı sağlayan immuno manyetik seperasyon sistemlerinin doğrudan kullanılmasına vey EZ coli testi ile bu sistemin kombinasyonuna mutlak gerek vardır.

## TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan EZ Coli kitini bağışlayan Dizdärer Ltd. Şirketine teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- AKKUŞ, F. (1996) Hazır Sığır Kıymalarında Verotoksin Oluşturan *Escherichia coli* O157: H7 İzolasyonu. Ank. Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 68 sayfa, 1996.
- ANONYMOUS (1984). Bacteriological Analytical Manual (BAM) 6<sup>th</sup> Ed. US Food and Drug Administration Published and Distributed by Association of Official Analytical Chemist (AOAC), Virginia. 31 Bölüm +3 Ek.
- ANONYMOUS (1996). EZ Coli Rapid Food borne Pathogen. Detection Difco Laboratories. Detroit, Michigan, 4 s, 1996.
- CHAPMAN, P.A., SIDONS, C.A., WRIGHT, D.J., NORMAN, P. (1993). Cattle as a Possible Source of Verocytotoxin Producing *Escherichia coli* O157 Infections in Man. *Epidemiol Infect* 11:439-447.
- ÇAKIR, İ. (1999). *Escherichia coli* O157: H7 Aranması. Alınmıştır. "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Armoni Matbaacılık Ltd. 296s. Ankara" pp 267-272.
- DOYLE, M.P., ZHAO, T., MENG, J., ZHAO, S. (1997). *Escherichia coli* O157:H7. In "Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Eds M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville. ASM Press Washington D.C. 768 p". pp 171-191.
- DOYLE, M.P. (1991). *Escherichia coli* O157: H7 and its Significance in Foods. *Int J Food Micro* 12: 289-302.
- DOYLE, M.P., SCHOENI, J.L. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Retail Fresh Meats and Poultry. *Appl Environ Micro* 53 (10) 2394-2396.
- FARMER III, J.J., DAVIS, B.R. (1985) H7 Antiserum-Sorbitol Fermentation Medium: A Single Tube Screening Medium for Detecting *Escherichia coli* O157: H7 Associated with Hemorrhagic colitis. *J Clin Micro* 22 (4) 620-625.
- FIRSTENBERG-EDEN, R., SULLIVAN, N.M. (1997). EZ Coli Rapid Detection System. A Rapid Method for the Detection of *Escherichia coli* O157 in Meat and Other Foods. *J Food Prot* 60(3) 219-225.

- HALKMAN, A.K., DOĞAN, H.B. (1997). *Enterobacteriaceae* Familyası Üyelerinin İdentifikasyonu Üzerine Bir Araştırma. XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi Cilt II Biyoteknoloji, Mikrobiyoloji, Moleküler Biyoloji Genetik Seksiyonu s. 187-196. Final Copy Center, İstanbul 562 s.
- HALKMAN, A.K., NOVEİR, M.R. DOĞAN, H.B. (1998). Çeşitli Hayvansal Gıda Ürünlerinde *E. coli* O157:H7 Aranması. TÜBİTAK -VHAG 1192 Nolu Proje. Ankara Basılmamış 75s.
- HALKMAN, A.K., YILMAZ, İ., NOVEİR M.R., ERDAL, N. (1996). Koli Basilli O157H7. TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi 290 (10) 96-98.
- HALKMAN, A.K., DOĞAN, H.B., ÇOKSÖYLER, N., KEVEN, F., KULEAŞAN, H., ÇAKIR, İ. (2000). Hayvansal Gıdalarda *E.coli* O157:H7 Aranmasında Minimal İnhibasyon Konsantrasyonu. TÜBİTAK-VHAG 1466 nolu proje, Ankara basılmamış.
- HAWKINS, E.W., ORME, L.E. (1995). Rapid Testing Methodology for *Escherichia coli* O157: H7 Using Commercially Available Products. Proceedings, Western Section, Am Soc Anim Sci Vol 46.
- KARAPINAR, M. GÖNÜL, Ş.A. (1998). Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar. "Gıda Mikrobiyolojisi, Eds. A. Ünlütürk ve F. Turantaş, Mengi Tan Basım Evi İzmir 605 s". pp 109-164.
- MARCH, S.B., RATNAM, S. (1986). Sorbitol MacConkey Medium for Detection of *E. coli* O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis. J Clin Micr 23 (5) 869-872.
- NOVEİR, M.R. (1996) Enzimatik ve Immunogenetik Yöntemlerle Hemorajik *E.coli* ve Ürettiği Toksinlerin İzolasyon ve İdentifikasyonu. Ank. Üniv. Fen Bilimleri Enst. Semineri. Basılmamış 27 s.
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., BENNETT, B. (1990). A Screening Method for the Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Ground Beef. J Food Prot 53 (3) 249-252.
- RAUGEL, P.J. (1999). Rapid Food Analysis and Hygiene Monitoring. Springer-Verlag, Berlin, 921 p.
- REMIS, R.S., MacDONALD, K.L., RILEY, L.W., PUHR, N.D. (1984) Sporadic Cases of Hemorrhagic Colitis Associated with *Escherichia coli* O157:H7. Annals Int Med 101: 624-626.
- SULLIVAN, N. (1995). Introducing EZ Coli for Detection of *Escherichia coli* O157: H7 from Food. Culture Club News 4: 1-3.
- TEMİZ, A. (1994) Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Şafak Matb Ltd., Ankara 266 s.
- THOMPSON, J.S./ HODGE, D.S, BORCZYK, A.A. (1990). Rapid Biochemical Test to Identify Verocytotoxin -Positive Strains of *Escherichia coli* Serotype O157 J Clin Micr 28 (10) 2165-2168.
- TUNAİL, N. (1999). Mikrobiyel İnfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Alınmıştır, " Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Armoni Matbaacılık Ltd. Ankara, 296 s." pp 59-90.
- WELLS, J.G., SHIPMAN, L.D., GREENE, K.D., SOWERS, E.G. (1991). Isolation of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Other Shiga Like Toxin Producing *E.coli* Dairy Cattle. J Clin Micr 29 (5) 985-989.