

SIĞIRLARDAN İZOLE EDİLEN ESCHERİCHIA COLI SUŞLARININ HEMAGLUTINASYON YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

O. Turhan SESLİ (*)

LİTERATÜR BİLGİSİ

E. coli, ilk olarak, 1885 yılında Escherich tarafından bir çocuğun dışkılarından izole edilmiştir (12).

E. coli 2 - 4 mikrometre (μm) uzunluğunda, 0,4 - 0,7 mikrometre (μm) genişliğinde, uçları yuvarlak çomak biçiminde bakterilerdir. Gram negatif, sporsuz ve genellikle hareketli, kapsülsüz (kapsül teşkil eden formları da vardır) bakterilerdir. E. coli'lerde hareket peritrich flagellalar tarafından sağlanır. Flagellalar serolojik tanıda önem taşırlar ve protein (flagellin) karakterindedirler. E. coli'lerde flagellalardan başka piluslar da (fimbria) bulunur. Pilus'ların bazıları (az sayıda) bakteriyel konjugasyon olaylarında yer alır (seks pilusu) ve diğer kısmı ise bakterinin hücrelere ve aynı zamanda insan, at, koyun ve kobay alyuvarlarına yapışmasını sağlar (1,3,5,35).

E. coli aerobik ve fakültatif anaerobik bir mikroorganizma olup genel besi yerlerinde kolaylıkla ürerler. Bu mikroorganizma 5-46° C. arasındaki ısı derecelerinde ürer; optimal üreme ısı 37°C. dir. Ve en uygun pH 7.0-7,2 dir. E. coli'lerin agar da oluşturdukları S tipi kolonileri hafif yuvarlak, düzgün, bombeli 1-2 mm. çapındadır. Kapsüllü E. coli'lerin kolonileri mukoid karakterde olup, çapları daha büyüktür. E. coli buyyonda kısa sürede ürer ve hafif bir bulanıklık oluşturu-

(*) Uzman Vet. Hekim, Etlik Vet. Kont.-Araşt. Enst, Ankara

rur. Buyyon kültüründe 24 saatten sonra sıvının üst düzeyinde tüpe yapışık bir zar şekillenir (3,5,35).

E. coli'lerin izolasyon ve identifikasyonun da çeşitli selektif besi yerleri kullanılır. Mac Conkey agarda yuvarlak kırmızı koloniler oluşturan E. coli'ler, EMB agarda metalik renkte refle veren koloni oluşturlar. Aynı amaç için kanlı agar da kullanılır. Hemolitik E. coli'ler kanlı agarda koloni etrafında hemoliz oluşturlar (3,5,35).

E. coli'ler kuvvetli sakkarolitik etkiye sahiptirler. Genellikle laktoz, glukoz, mannitol, arabinoz ve ksilozdan asit ve gaz oluşturlar. Sakkaroz, dulsit, rafinoz ve salisine etkileri değişkendir. Adenitol ve inositole tesir etmezler. Triptofandan indol oluşturlar. Sitratl besiyerlerinde üremezler, üreyi parçalayamazlar, H₂S oluşturmazlar, metil - red pozitif, voges - proskauer reaksiyonu negatiftir (3,5,35).

E. coli sporsuz bir bakteri olduğu halde dış tesirlere oldukça dayanıklıdır. 60°C.de 30 dakikada, 55°C.de bir saatte ölürlür, oda derecesindeki süblime, oksijenli su, fenol, klor gibi dezenfektanlarla birkaç dakikada ölürlür (5,12).

E. coli'lerin kuvvetli ve kompleks yapıda antijenik özellikleri vardır. Somatik «O», flagellar «H» ve kapsüler «K» antijenleri bulunmaktadır.

Somatik O-antijeni : Lipopolisakkarit tabiatında, ısıya, kaynatılmağa ve alkole dayanıklı, formole dayanıksızdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda 146 farklı O antijeninin varlığı saptanmıştır. E.coli serolojik olarak O antijenlerine göre grublara H-ve K-antijenleriyle tiplerine ayrılır. E.coli'lerin birçok tipleri O serumları ile aglutine olmazlar. Bu bakterinin yüzeyinde bulunan K-antijeninin varlığından ileri gelir (23,32).

H-antijeni : Hareketli suşlarda bulunurlar, protein tabiatında ve ısıya dayanıksızdırlar. 100°C.de ısıtmakla alkol ve proteolitik fermentlerle harap olurlar, formole dayanıklıdırlar. Şimdiye kadar 49 H-antijeni bulunmuştur. Bu E.coli'de az miktarda olduğundan çoğaltmak için bakterinin yumuşak jelozda pasajını yapmak gerekir (5,23,32).

K-antijeni : Başlıca üç tip K-antijeni (L,A,B) vardır :

Somatik L-antijeni : Isıya dayanıksız bir antijendir. 100°C.de bir saat ısıtmakla harap olur, antijenik özelliğini kaybeder. Bu antijeni

ihativa eden E.coli suşları ekseri hemolitik, fareler için toksik, tavşan derisine verildiğinde nekrotik ve insanlar için patojendir. Kendisinde L-antijeni bulunan E.coli'lerin kolonileri bulanık ve çok kesiftir; canlı halde iken O serumu ile aglutine olmazlar ,ancak 100°C.de 1,5 saat kaynatıldıktan sonra aglutine olurlar. L-antijeni bulunmayan E.coli'lerin kolonileri berrak ve şeffaftır; bunlar canlı iken O serumu ile aglutine olurlar. Şimdiye kadar 32 tip L-antijeni tesbit edilmiştir (5,15,32).

A-antijeni : Kapsüllü E.coli'lerde rastlanmıştır. Isıya dayanıklıdır ve ancak 120°C.de 2 saat ısıtmakla harap olur; spesifik bir polisakkarittir. A-antijeni taşıyan E.coli'lerin kolonileri beyaz, kesif ve mukoid özelliğindedir. Bunlar % 50 safra ilave edilmiş buyyonda üretildiğinde A+ formda A- forma geçerler. Birbirinden farklı 26 tipi bulunmuştur (5,12,15,23,32).

Somatik B-antijeni : Isıya dayanıksız bir antijendir. 100°C.de bir saat ısıtmakla harap olurlar. K-antijeni gibi bakterinin O serumuyla aglutine olmasına mani olurlar. Bu antijene her suşta rastlanmaz, oldukça nadirdir. Şimdiye kadar 30 tipi bulunmuştur (5,12,15,23,32).

Vi antijeni : Isıya dayanıksız bir antijendir. 100°C.de ısıtmakla, dilüe asitlerle ve özellikle asit fenikle muamele edilmekle harap olurlar. Bunlar O serumlarıyla aglutinasyon vermezler, yalnız anti Vi serumlarıyla aglutine olurlar (5,12,15,23,32).

Enterobakterilerin çeşitli gruplarında ortak olarak bulunan Kunitin antijenleri diye adlandırılan, polisakkarit tabiatında antijenlerin olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (27).

E. coli'lerin enteropatojenik suşları 2 farklı enterotoksin oluştururlar. Bunlardan ısıya dayanıklı toksin (ST) ve ısıya dayanıksız toksin (LT) olarak tanımlanırlar. Bunlardan (ST) toksini 65°C.ısıya dayanıklı olup antijenik özelliği yoktur, ekstrasellüler ve küçük moleküldür. (LT) toksini termolabil olup 65°C.de inaktive olur, antijeniktir, intrasellüler olarak bulunur ve büyük moleküldür (8,18).

Kaufman ve arkadaşlarının çabası sonucu; E.coli kültürlerinin serolojik tiplendirilmesi için antijenik şema hazırlandı (22).

E. coli serotiplerinin identifikasyonu günlük olarak ekseriya veteriner teşhis laboratuvarlarında yapılamamakta, bunlar iyi teçhiz edilmiş referens laboratuvarlarında yapılmaktadır. Serotipleri ortaya

koymada harflerle belirtilen antijenler kullanılır ve sonlarına arabik numaralar ilave edilir, Örneğin OIII : K4 (B) H2 gibi (8).

E. coli'lerin tiplendirilmesinde bakteriyofajlardan da faydalanılmakta ve muayyen kolifajlarla bilhassa gastro-enterit enfeksiyonlarına sebep olan özel suşlar identifiye edilmektedir (5).

E. coli erişkin insan ve hayvanların barsak florasında bulunurlar ve barsak içinde iken hastalık oluşturmazlar. Barsakta bulunan kokuşma bakterilerine (Proteuslar) karşı antagonistik etki gösterirler; bu suretle barsak kokuşmasının azalmasına yardımcı olurlar. Bu etkenler özellikle idrar yolları, safra yolları, periton, akciğer yada beyin zarlarına geçebildikleri takdirde patojenik etki gösterek iltihaplanmalar yaparlar (2,15).

E. coli virulansları birbirinden farklı bir mikroorganizmadır. Bazı suşları oldukça patojenik olduğu halde, birçokları hastalık yapma yönünden zayıf olup sayıca artarlarsa ve hayvanın direnci azalırsa hastalık oluşturabilirler (34).

E. colinin evcil hayvanlarda (buzağı, inek, kuzu, tavuk, köpek, domuz) oluşturduğu bazı önemli hastalıklar : Buzağı ishali ve daha az şiddetli buzağuların intestinal enfeksiyonları yani enterotoksemik kolibasilloz, mastitis, hava kesesi iltihabı ve koligranulomatozis'tir (8).

Buzağular için patojenik olan E.coli serotipleri şunlardır : 08,09, 015,017,020,021,026,035,055,0114,0119,0126,0137 (8,18).

E. coli enfeksiyonlarında pekçok etken rol oynarsa da bunların en önemlileri : 1 - Doğan buzağuların yeteri kadar kolostrum alamamaları, 2 - A vitamini eksikliği, 3 - Soğuk ve sıcaklığın enfeksiyona yatkınlık yaratması, 4 - Irk özellikleridir (14,18).

Buzağılardaki septisemik kolibasilloz olgularında yapılan bakteriyolojik yoklamalar kana bakteri girişinin zorunlu olarak barsak florasından olmayacağını göstermektedir; göbük ve diğer bölgelerden, örneğin burun ve yutak mukozasından da enfeksiyonu alabilirler (14).

E. colilerden ileri gelen akciğer yangılarında bulaşma solunum yolundan olur; buna karşılık, E.coli meningo-ensefalitiste kanla beyine ulaşır. E.coli ile bulaşık organlarda bozuklar şekillendikten son-

ra aktif vepa pasif bağışıklıktan yararlanma antikorların kandaki konsantrasyonuna değil, bu dokulardaki yoğunluğuna bağlıdır (37).

E. coli enfeksiyonları klinik, bakteriyolojik ve patolojik bulgulara göre; septisemik, enterotoksemik ve enterik formda görülürler (3, 15,18).

Buzağılarda E.coli ile oluşan klinik enfeksiyonun enaz iki şeklinin bulunduğu bildirilmiştir. Bakteriyemi yapan suşların oluşturduğu sistemik şekil ve barsak şeklidir. Barsak formunda enteropatojenik suşlar ince barsakların anteriyöründe ürerler ve oluşturdukları enterotoksin ile sürgüne neden olurlar. Böyle suşlar invazyon meydana getirmezler.

E. colinin meydana getirdiği sistemik enfeksiyonun kolostrum almamış buzağılarda görülen bir bozukluktur ve arasıra sürgün ile şekillenir. Buna neden olan suşlar enteropatojenik değil bakteriyemi oluşturan suşlardır (36).

Otopside, perakut ve septisemik olgularda patolojik lezyona rastlanmaz. Uzun süren olaylarda hemoraji, enteritis ve gastrit vardır (3,34).

E. coli enfeksiyonlarının laboratuvar teşhisi daha ziyade bakteriyolojiktir ve kısmende serolojik olarak yapılır. Hastalardan veya otopside lezyonlu bölgelerden alınan idrar, süt, gaita, irin v.s. boyama yapılır gram negatif çomakçıklar aranır, mikroskopik muayene bittikten sonra materyalden bir miktar Mac Conkey, EMB agara ekim yapılır; üremeyi takiben bakterinin muhtelif şekerlere tesiri, İMVIC, H:S ve KCN'li vasatlardaki durumu incelenerek identifiye edilir (5,17).

E. colinin enterotoksijenik olup olmadığını saptamada kullanılan, çabuk ve güvenilir sonuçlar veren yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar : 1 - Tavşan ince barsak lub testi, 2 - İnfant fare testi, 3 - Vasküler permeabilite deri testidir (18).

Serolojik teşhisi aglütinasyon ve hemaglutinasyon testi ile yapılmaktadır. Bu serolojik testlerden, mikroorganizmaların bazı antijenik fonksiyonları ile eritrositlerin absorbe olabilme gerçeğine dayanır ve uygun koşullar altında böyle hassaslaştırılmış eritrositler bu özel antijenik fonksiyonlara karşı yöneltilmiş spesifik serumlarla aglutine olurlar (35).

Lennette ve arkadaşları E.coli'nin agar kültürünü % 0,5 tuzlu suda süspanse ederek bilinen anti serumları ile lam üzerinde direk hemaglutinasyona tabi tutmuşlardır (22).

Lijungh ve ark. E.coli ile değişik hayvan türlerinde eritrosit aglutinasyonunu indirek hemaglutinasyon testi ile incelemişlerdir (25).

İndirek hemaglutinasyon testi yapan bakteriler : Salmonellalar, stafilokok, E.coli, Vibrio cholera, Hemofiluz türleri, korine bakteriler ve leptospiralalar olduğu bildirilmiştir (11).

E. coli infeksiyonlarında salgının önüne geçilmesi için kaynağın saptanması, hijyenik tedbirlerin yerine getirilmesi, ineklere gebeliğin son 1/3 döneminde A - ve D - vitaminleri verilmesi, doğumun uygun mevsimlerde olmasının sağlanması, göbek bölgesinin dezenfeksiyonu (14). Mono ve poli-valant olarak O - ve K - antijenlerine karşı hazırlanan aşılarda da iyi sonuçlar alınmaktadır (3,14,18).

İnfeksiyonun tedavisinde etkenin ayırımı büyük önem taşır. İzole edilen etkenin antibiyogram testleri yapıldıktan sonra antibiyotiklerle tedaviye geçilmelidir. Antibiyotiklerin erken kullanılması sürgünü kontrol altına alarak elektrolit değişmelerini önler. Hastalarda kan volümünün normal seviyeye getirilmesi için su kaybını önleyici (serum deksroz) elektrolit solüsyonların kullanılmasında büyük yararlar vardır. Son yıllarda glukoz, gliserin içeren solüsyonların ağız yoluyla verilmesinden de başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Antibiyotiklerin A vitamini ile birlikte kullanılması başarı oranını artırır (18,28).

Bu çalışmamızda, sığırlardan izole ve identifiye edilen E.coli suşları ile;

a — Değişik hayvan türlerinden (koyun, tavşan, tavuk, koyun, keçi, siğir) alınan kan örneklerinin direk hemaglutinasyon testi ile E.coli ye duyarlı eritrositlerin tesbiti ve

b — Bu suşlarla tavşanlardan elde edilen anti serumlarla indirek hemaglutinasyon testi yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyal : Bu amaçla Atatürk Orman Çiftliği, Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsü, özel halk işletmelerinden alınan 250 adet süt nümunesi ve 45 hayvandan temin edilen rektal swab materyaliyle çalışıldı.

A — KULLANILAN BESİ YERLERİ :

E.coli'nin izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan besi yerleri, testler ve biyokimyasal aktivitelerinin ölçülmesi için kullanılan ortam ve ayıraçlar şunlardır :

1. Kanlı agar,
2. Mac Conkey agar,
3. EMB agar,
4. Tryptoslu buyyon,
5. Lassen'in «3 lü tüp» yöntemi (24),
6. İMVİC testi için gerekli besi yeri ve ayıraçlar (1,4,12,15).

B — NÜMUNELERİN HAZIRLANMASI VE EKİMİ :

Laboratuvara getirilen nünunelerden usulüne uygun olarak kanlı agar, Mac Conkey agar, EMB agara ekimler yapıldı. Ekimlerden sonra vasatlar 37°C.de 24 saat inkube edildi. Bu sürenin sonunda üreyen kolonilerin üreme özellikleri makroskobik olarak kontrol edildi. Mac Conkey agarda, laktozu fermente eden renkli, yüzeyleri düzgün, yuvarlak ve kenarları düz koloniler, EMB agarda metalik parlaklık gösteren koloniler arandı.

Şüpheli koloniler aşağıdaki sıralamaya göre identifiye edildi :

1. Gram boyama yöntemi,
2. Tek koloni izolasyonu ve saf kültürlerin hazırlanması,
3. Morfolojik, kültürel ve biyokimyasal aktivitelerinin ölçülmesi.

C — ANTİJEN HAZIRLANMASI :

İdentifiye edilen 5 adet E.coli suşlarınının 18 saatlik buyyon kültüründen daha önce hazırlanmış ve sterilite kontrolleri yapılmış nutrient agar ihtiva eden roux şişelerine 1,5 - 2 cc. konarak ekim yapıldı. Şişeler sağa sola hareket ettirilerek kültürün bütün yüzeye yayılması sağlandı. Bu şişeler 37°C.de 48 saat inkube edildikten sonra, her şişeye 10 cc. (% 0,85 lik) tuzlu su ilave edildi ve koloniler suya geçinceye kadar çalkalandı. Gram boyama ve kanlı agara ekim yapılarak kontaminasyon kontrolleri yapıldı.

1. Her suşa ait şişelerdeki suspansiyon (10 ml.) steril santrifüj tüplerine alındı 3 defa santrifüj yardımı ile yıkandı,
2. Tüplerde toplanan her suşa ait tortuya 50 cc. fizyolojik tuzlu su konarak homojen suspansiyon yapıldı,
3. Bu suspansiyonlara 68°C. sıcaklıktaki fenolden (% 90 lık 100'er cc. katıldı,
4. Bu karışımlar soğuyuncaya kadar bekletildi sonra 3000 devirde 30 dakika santrifüj edildi.
5. Oluşan 3 katmandan en üstte bulunanı steril bir pipetle tüpe alındı,
6. Bunlara 2,5 cc. % 20 lik sodyum asetat ve sonrada 50 cc. absolut alkol ilave edildi,
7. Bu karışımlar 4°C.de bir gece bekletildi,
8. Ertəsi günü 2500 devirde 15 dakika santrifüj edildi,
9. Meydana gelen tortular 2 0cc. distile su ile sulandırıldı,
10. Mc. Farland (6) ya göre ayarlanarak hazırlandı ve testlerde kullanıldılar (6,19).

D — KULLANILAN ERİTROSİTLER :

Çeşitli hayvan türlerinden (kobay, tavşan, tavuk, koyun, keçi, sığır alınan kan örnekleri kullanıldı.

E — ERİTROSİTLERİN DUYARLILAŞTIRILMASI :

1. Taze koyun kanı içinde sitrat bulunan bir tüpe alındı, ayrı ayrı üç defa fizyolojik su ile yıkandı,
2. Depo kandan (santrifüj tüpünün dibindeki kan) 1 ml. alınarak üzerine 5ml. antijen ve 94 ml. fizyolojik su ilave edildi,
3. Bu karışım 37°C.de, zaman zaman çalkalanarak, 60 dakika inkübe edildi,
4. Bu sürenin sonunda eritrositler santrifüj yardımı ile 2 defa fizyolojik su ile yıkandı,

5. Kan tortusunun 0.1 ml.sine 9,9 ml. fizyolojik su konarak % 1 lik süspansiyon yapıldı ve testlerde kullanıldı (19,35).

F — ANTİ E.coli SERUMU HAZIRLANMASI :

Sağlıklı olarak ayırdığımız 1,5-2 kgr. ağırlığındaki tavşanların elimizdeki 5 adet E.coli antijenleri ile antikor kontrolleri yapıldı, negatif olanlar denemeye alındı. Bunlara sterilite koşullarına uyularak her antijenden 3 adet tavşana deri altı ve damar içi (V. marginalis) enjeksiyon yapıldı. Enjeksiyon 4 gün ara ile aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi :

<u>Enjeksiyon adedi</u>	<u>Süspansiyon miktarı</u>	<u>Veriliş yolu</u>
1. enjeksiyon	1 cc.	Deri altı
2. »	0,5 »	Damar içi
3. »	0,5 »	» »
4. »	1 »	» »
5. »	2 »	» »
6. »	4 »	» »

Son enjeksiyondan bir hafta sonra tavşanlardan kan alınarak serumu çıkarıldı ve bu serum 56°C.de yarım saat inaktive edildi. Daha sonra hazırlanan duyarılaştırılmış % 1 lik eritrosit süspansiyonu ile yapılan hemaglutinasyon testinde 1/128 dilisyonunda pozitif reaksiyon verdiği görüldü (21,30).

G — HEMAGLUTINASYON TESTİNİN UYGULANIŞI :

1. **Direk hemaglutinasyon :** Yıkanmış eritrositlerin tuzlu suda % 2, % 3, % 4, % 5 lik süspansiyonları hazırlandı. Bir damla eritrosit süspansiyonu ile bir damla E.coli buyyon kültürü lam üzerinde iyice karıştırılarak sağa sola hareket ettirildi. 1-2 dakika gibi kısa sürede hemaglutinasyonun görülmesi kuvvetli pozitif, 3-4 dakikada ise zayıf hemaglutinasyon olarak değerlendirildi (11).

2. İndirek hemaglutinasyon : Bir seri tüp hazırlandı ve bütünlere 0,3 cc. tuzlu su kondu; 1. tüpe 0,3 cc. serum konup, iyice karıştırıldıktan sonra diğer tüplere 0,3 cc. geçerek serumun 2 katlı dilisyonu hazırlandı (1/4, 1/8, 1/1024). Son tüpe sadece tuzlu su kondu, bu kontrol tüpüdür. 56°C.de tüpler 30 dakika inaktive edildi. Sonra bütün tüplere 0,3 cc. % 1 lik duyarlılaştırılmış eritrosit süspansiyonundan ilave edildi. Bu karışım oda derecesinde 45 dakika bırakıldı ve sonra 4°C.de iki saat bırakıldı. Sonuç okundu. Kontrol ve negatif tüplerde eritrositler düğme tarzında tüpün dibini kapladı. Pozitif reaksiyonlarda geniş ve kenarları testere dişli olarak, tüpün dibini kapladı (35).

BULGULAR

İncelenen 250 süt materyalinden 14 adet (% 5,6), 45 rektal swab materyalinden 26 adet (% 58) koliform bakteri izole edildi. Bunların biyokimyasal özellikleri incelendiğinde süt materyalinden 4 adedinin (% 1,6), rektal swab materyalinden ise 15 adedinin (% 33,3) E.coli özelliği gösterdikleri saptandı. Bu 19 suşun biyokimyasal özelliklerinin saptanmasında glukoz, laktoz, mannitol, indol, metilred pozitif, VP, sitrat, H₂S testlerinin negatif olması güvenilir kriterler olarak kabul edildi. (Tablo I-II-III-IV).

İdentifiye edilen E.coli suşlarının 5 adedinden hazırlanan antijenlerden tavşanlara verilme suretiyle anti serum elde edildi. Bu serumlarla yapılan hemaglutinasyon testinde bir tanesi 1/128 de hemaglutinasyon verdi.

Öte yandan bu E.coli suşlarının tryptos'lu buyyon kültürlerinden değişik hayvan türlerinin eritrositleriyle yapılan direk hemaglutinasyon testinde, kobay ve tavuk eritrositlerinin hemaglutine olduğu fakat koyun ,tavşan, keçi ve sığır eritrositlerinin hemaglutinasyon vermediği saptandı. (Tablo V-VI).

Fenol ekstraksiyon yöntemi uygulanarak hazırlanan antijenin 5 ml. sine, 1 ml. yıkanmış koyun eritrositi ve 94 ml. fizyolojik tuzlu su ilave edildi. Bu süspansiyon 37°C.de 30,45,60 dakika bekletmek suretiyle en iyi absorbsiyon süresi tayin edilmeğe çalışıldı. Sonuç olarak 60 dakikanın en iyi absorbsiyon süresi, 37°C.nin en iyi optimal absorbsiyon ısısı olduğu saptandı.

TABLO I. LASSEN'İN "3-LÜ TUP" YÖNTEMİ

I. Tüp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glikoz fermantasyonu	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Laktos ferm.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
H ₂ S oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lizin dekar- boksilas ol.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I. Tüp	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Glikoz fermantasyonu	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Laktos ferm.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
H ₂ S oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lizin dekar- boksilas ol.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I. Tüp	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Glikoz fermantasyonu	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Laktos ferm.	x	x	x	x	x	x	x	-	x	x
H ₂ S oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-
Lizin dekar- boksilas ol.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I. Tüp	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Glikoz fermantasyonu	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Laktos ferm.	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x
H ₂ S oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lizin dekar- boksilas ol.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

G - Gaz oluşumu
x - Pozitif
- Negatif

TABLO II LASSEN'İN "3 LÜ Tüp" YÖNTEMİ

II. Tüp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mannitol Fermentasyonu	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Hareket	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Nitrat Redüksiyonu	×	×	×	×	-	×	×	×	×	×

II. Tüp	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Mannitol Fermentasyonu	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Hareket	×	×	×	×	×	×	×	-	×	×
Nitrat Redüksiyonu	×	×	×	×	-	×	×	×	×	-

II. Tüp	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Mannitol Fermentasyonu	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Hareket	×	88	×	×	×	-	×	×	-	×
Nitrat Redüksiyonu	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

II. Tüp	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Mannitol Fermentasyonu	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Hareket	×	×	×	-	-	×	×	×	×	×
Nitrat Redüksiyonu	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

TABLO III

LASSER'İN "3 LÜ TUP" YÖNTEMİ

III. Tüp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ürease oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol oluşumu	×	×	-	×	-	-	-	×	-	-
Tryptose Deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

III. Tüp	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ürease Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	×
İndol oluşumu	×	-	-	-	-	×	×	×	×	-
Tryptose Deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

III. Tüp	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ürease Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol Oluşumu	-	×	×	-	-	×	-	-	×	-
Tryptose Deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

III. Tüp	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Ürease Oluşumu	-	-	-	×	-	-	-	-	×	-
İndol Oluşumu	×	-	-	×	-	×	×	-	×	×
Tryptose Deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLO IV İMVIC TEST SONUÇLARI

Testler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
İndol	×	×	-	×	-	-	-	×	-	-
Metil Red	×	×	-	×	-	-	-	×	-	-
Voges-proskuer	-	-	-	-	-	×	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	-	-	×	-	-	×

Testler	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
İndol	×	-	-	-	-	×	×	×	×	-
Metil Red	×	-	-	-	-	×	×	×	×	-
Voges-proskuer	-	-	×	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	×	-	-	-	-	×

Testler	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
İndol	-	×	×	-	-	×	-	-	×	-
Metil Red	-	×	×	-	-	×	-	-	×	-
Voges-proskuer	-	-	-	×	-	-	-	×	-	-
Sitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Testler	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
İndol	×	-	-	×	-	×	×	-	×	×
Metil Red	×	-	-	×	-	×	×	-	×	×
Voges-proskuer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	×	×	-	×	-	-	-	-	-

TABLO V. DİREK HEMAĞLUTİNASYON

Suş No.	1				2				3				4				5			
Kul.kan türleri	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5
Kobay	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
Tavşan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tavuk	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-
Koyun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Keçi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Siğir	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Suş No.	6				7				8				9				10			
Kul.kan türleri	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5
Kobay	x	x	x	x	-	x	x	x	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x
Tavşan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tavuk	x	x	x	x	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Koyun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Keçi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Siğir	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLO VI. DİREK HEMAGLUTİNASYON

Suğ No	11				12				13				14				15			
Kul.kan türleri	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5
Kobay	-	x	x	x	-	-	-	-	x	x	x	x	-	x	x	x	-	-	-	-
Tavşan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tavuk	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	x	x	-	-	-	-
Koyun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Keçi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Siğir	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Suğ No.	16				17				18				19			
Kul.kan türleri	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5	%2	%3	%4	%5
Kobay	x	x	x	x	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x
Tavşan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tavuk	x	x	x	x	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x
Koyun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Keçi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Siğir	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TARTIŞMA

Çalışmamızda çeşitli kamu kurumları ve halk elindeki sığırlardan identifiye edilen 19 E.coli suşunun, değişik hayvan türlerinden temin edilen eritrositlerde direk ve indirek hemaglutinasyon verme karakterleri incelendi.

Bazı araştırmacılar antijeni E.coli kültürlerini 37°C.de 18-48 saat inkube edip elde ettikleri bakteri süspansiyonunu, 100°C.de 2 saat kaynatıp santrifüj etmek suretiyle hazırlamışlardır (21,23,35). Biz bu araştırmacılara uymakla birlikte, E.coli kültürünü 100°C.de 2 saat kaynatmak yerine yapılan diğer araştırmalarda daha duyarlı sonuç veren fenol ekstraksiyon yöntemini uyguladık (19). Ancak eritrositleri duyarlılaştırırken hemoliz olmalarını önlemek amacıyla, antijeni tuzlu su ile suspanse ettikten sonra eritrosit ilave edildi.

Bu şekilde hazırlanan antijenle yapılan indirek hemaglutinasyon testinin, serum ağıltinasyon testinden daha duyarlı olduğu saptanmış ve yapılan çalışmalarımız bunu doğrular nitelikte sonuç vermiştir.

Çalışmamızda tavuk ve kobay kanlarının E.coli suşlarıyla kuvvetli homaglutinasyon verdiğini, buna karşılık tavşan, koyun, keçi ve siğir eritrositlerinin hemaglutinasyon vermediğini saptadık.

Sonuç olarak; indirek hemaglutinasyon testinin uygulanmasının ekonomik oluşu, yapılacak çalışmalarda serumun çok az miktarının bile yeterli olması ,sonuçların 60 dakika gibi kısa bir sürede okunması testin daha kullanışlı olduğunu, diğer taraftan testin tek antijenle çalışıldığında en az 100, iki veya üç antijenle çalışıldığında 50 serumun işlenebilmesine imkan vermesi zaman kazandırıcı önemli özelliğidir.

Direk hemaglutinasyon sonuçları ise bu testin ancak belirli hayvan eritrositleri için geçerli olabileceğini gösterdiğinden teşhiste pratik olmayacağı ortaya konmuştur.

ÖZET

Bu çalışmada özel ve devlet çiftliklerindeki sağlıklı sığırlardan elde edilen 19 E.coli suşlarının hemaglutinasyon spektrumları incelendi.

İzole ve identifiye edilen suşların hepsi glukoz, manitol, laktoz, indol ve metil kırmızısı pozitif olmasına rağmen H₂S, üre, V-P, sitrat, tryptose deaminase, lezine dekarboksilase testleri negatif sonuç vermiştir. Bütün suşlar hareketlidir ve hiçbir hemolitik değildir.

Kobay ve tavuk eritrositi kullanıldığında direk hemaglutinasyon % 68,4 pozitif olduğu halde koyun, tavşan, keçi ve sığır eritrositleri kullanıldığında hiçbir suş hemaglutinasyon vermemiştir.

SUMMARY

In this investigation 19 E.coli strains were obtained from the healthy cattle of some government and private farms and were tested for haemoglutination spectrum.

All the isolated and identified strains were positive for glucose, mannitol, lactose, indole, methyl red where as they were negative for H₂S; urea, V-P, citrate, tryptose deaminase, lysine decarboxylase tests. All the strains were motile; and none of them were haemolytic.

By using guinea pig and Chicken erythrocytes, 68,4 % of E.coli strains were positive for haemaglutination; none of the strains agglutinated sheep, rabbit, goat and cattle erythrocytes.

KAYNAKLAR

- 1 — Arda, M. (1978) : Genel Bakteriyoloji Ders Kitabı, A. Ü. Vet. Fakültesi Yayına : 342, Ders Kitabı No. 242, A. Ü. Basımevi. 396-409.
- 2 — Akman, M. ve Gülmezoğlu, E. (1976) : Tıbbi Mikrobiyoloji (2. Baskı) Hacettepe Tıp ve Sağlık Bilimleri Fak. A. Ü. Basımevi. 249-254.
- 3 — Başkaya, H., Ertürk, Ö., Beşe, M. ve Arda, M. (1972) : Evcil hayvanların Enfeksiyöz Hastalıkları, A. Ü. Vet. Fak. Yayınları : 223, Ders Kitabı No. 184, A. Ü. Basımevi. 109-118.
- 4 — Beşe, M. (1974) : Mikrobiyolojide kullanılan Biyokimyasal testler ve Besi-yerleri, A. Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları : 298, Yardımcı Ders Kitabı : 199, A. Ü. Basımevi. 75-149.
- 5 — Bilgehan, H. ve Sertei, F. (1972) : Özel Bakteriyoloji, Ege Üniversitesi Tıp Fak. Yay. No. 91 Ege Üniv. Basımevi, 6-15.
- 6 — Bilgehan, H. (1965) : Klinik Mikrobiyoloji Pratiği Ders Kitabı, Ege Üniv. Basımevi. 247-250.
- 7 — Bozkurt, M. (1978) : Türkiye'de Leptospira Serolojisi Üzerinde Araştırma, Gülhane As. Tıp Akademisi.

- 8 — Cater, R.G. (1979) : Diagnostic proceures in Veterinary bacteriology and mycology. Third ed. Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois U.S.A.. 83-95.
- 9 — Cowan, S.T., and Steel, K.J. (1966) : Manual for the identification of Medical Bacteria. Cambridge at the Univ. Press. 61-82.
- 10 — Cicioğlu, R. ve Payzın, S. (1973) : Ankara'da izole edilen yeni E.coli serotipleri ve immünojik Analizler. Mikrobiyoloji Bült. 7, 39-53.
- 11 — Çetin, E.T. (1973) : Genel ve Pratik Mikrobiyoloji. 3. Baskı, Sermet Matbaası, 233-235.
- 12 — Dumas, J. (1967) : Bactériologie Medicale. Edition medicales, Flammarion. 22 Rue de Vaugirard, Paris-IV e 225-373.
- 13 — Dalkılıç, E. (1979) : Ankara civarında Muhtelif Kaynaklardan İzole Edilen L. Monocytogenes suçları ve Listeria Üzerine Çalışmalar. Do. Tezi.
- 14 — Girgin, H. (1972) : Buzağılarda colibacillosis sorunu. Mikrobiyoloji Bült., 455-495.
- 15 — Gross, W.B. (1978) : Colibacillosis. In «Diseases of Poultry» edited by M. S. Hofstad, B.W. Calnek, C.F. Helmboldt, W.M. Reid and H.W. Yoder, Jr. Iowa State Üniv. Press, Ames, Iowa. 321-329.
- 16 — Gross, W.B., and Domermuth, C.H. (1975) : Colibacillosis. in «Isolation and identification of avian pathogenes. 36-37.
- 17 — Hauduray, P., Ehringer, T., Guillot, G., Magrou, T., et Prévot, A.R. (1935) : Dictionnair des bactéries pathogenes pour l'homme, les animaux et les plantes. Masson et C editeurs, Libraires de l'academie de medicine. 120. Boulevard. st. Germain, Paris VI^e 233-246.
- 18 — İstanbulluoğlu, E. (1977) : Kolibasillozis problemi üzerinde yeni gelişmeler, İzmir Semineri.
- 19 — İstanbulluoğlu, E. ve Arda, M. (1979) : İndirek hemaglutinasyon testinin kanatlıların S. gallinarum infeksiyonlarının teşhisinde kullanılması, Plate test ve serum aglutinasyon testi ile karşılaştırılması üzerinde incelemeler. A. Ü. Vet. Fak. Derg. 26 : 98-110.
- 20 — Keskintepe, H. (1976) : İnsan ve hayvanlarda enteropatojenik E. coli infeksiyonları. İ. Ü. Vet. Fak. Dergisi 2 (2) 30-46.
- 21 — Kunin , M., and Beard, M. V. (1964) : Serological studies of O antigens of Escherichia coli by means of the hemaglutination test. J. Bact., 85 (3) : 541-548.
- 22 — Lennette, E.E., Spaulding. H.E., and Truant, J. P, (1974) : Manual of clinical microbiology. Second edition. American society for microbiology. Washington D. C. 189-221.

- 23 — Le Minor, L. (1963) : Le diagnostic de laboratoire des enterobacteries. 2^eed., de la Tourelle st-Mande-France 89, 108.
- 24 — Lassen, J. (1975) : Rapid identification of gram-negative rods a three - Tubes methods combined with a dichotomic key. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 83-525-533.
- 25 — Lyungh, A., Faris, A., and Wadstrim, T. (1979) : Hemagglutination by Escherichia coli in septicemia and urinary tract infections. J. Clin. Microbiol. 10 : 477-481.
- 26 — Morris, J.A., Wray, C., and Sojka, W.J. (1980) : Passive protection of lambs against enteropathogenic Escherichia coli: Role of antibodies in serum and colostrum of dams vaccinated with K99 antigen. I. Med. Microbiol., 13: 265-271.
- 27 — Makela, P. and Mayer, H. (1976) : Enterobacterial common antigen. Bact. Rev., 40 : 591.
- 29 — Maupos, P. and Rioux, J. (1969) : Use of a non-pathogenic Escherichia coli strain to overcome the calf scour syndrom. Bull. Soc. Vet. Prat. Fr., 53 : 95-101.
- 29 — Neter, E. (1956) : Bacterial hemagglutination and hemolysis. Bact. Review, 20 : 166-188.
- 30 — Nelson, D.J. and Shelton. (1963) : Immunofluorescent studies of Listeria monocytogenes andersypelothrix insidiosa. J. Lab. Clin. Med. 935.
- 31 — Oliveir, MS., Pestana de castro, A.F, and Serafin, M.B. (1981) : Mannos-resistand hemagglutination and colonisation factors among Escherichia coli strains isolated from pigs. Vet. Rec., 109 : 275-278.
- 32 — Öktem, Z. (1955) : Tibbi Bakteriyoloji, Ders Kitabı., İ. Ü. Yayını : 636, Kurtulmuş Matbaası. 189-210.
- 33 — Porter, P., Kenworthy, R., Holmee, D.W., and Horsfiel, S. (1973) : Escherichia coli antigens as dictary additiwes for oral immunisation of pigs: Trials with pigs creep feeds. Vet. Rec., 92 : 630-636.
- 34 — Pamukçu, M. (1968) : Veteriner Patoloji: A. Ü. Vet. Fak. Yayını : 228, Ders Kitabı : 130, A. Ü. Basımevi. 174-178.
- 35 — Sojka, W.J. (1965) : Escherichia coli in domestic animals an poiltry commonweath agricultural bureaux Firnhal Royal Bucks England, 211-213.
- 36 — Smith, H.W., and Hols, S. (1967) : Observation by the ligated intestinal segments and oral inoculation methods on Escherichia coli infections in pigs, calves, lambs and rabbits, J. Path-Bact., 93 : 499-506.
- 37 — Van Pelt, R.M., and Lanbham, R.F. (1966) : Non spesific polyarthritis secondary to primary systemic infection in calves., J. Am. Vet. Med. Ass., 149. 505-511.