

# ***E. coli* O157:H7 Serotipi**

[01. Genel Bilgiler](#)

[02. Aranması](#)

[03. Doğrulanması](#)

[04. Kullanılan Besiyerleri](#)

[04.01. mEC Selective Enrichment Broth](#)

[04.02. mTSB Selective Enrichment Broth](#)

[04.03. mLST Broth](#)

[04.04. CT-SMAC Agar](#)

[04.05. Fluorocult HC Agar](#)

[04.06. Fluorocult \*E. coli\* O157:H7](#)

[04.07. Singlepath \*E. coli\* O157: H7](#)

## **01. Genel Bilgiler**

*E. coli* 'nin özel bir serotipi olup, bugün için en tehlikeli gıda kaynaklı patojen olarak kabul edilmektedir. Enfeksiyon dozu 1 hücreye kadar düşük olabilmektedir. Özellikle çocuklarda ve yaşlılarda ölüme kadar giden çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Enterovirulent *E. coli* 'lerin Enterohemorajik (EHEC) grubuna girer.

Genel olarak yeterli ısı işlem görmemiş köfte ve hamburger gibi et ürünleri ve pastörize edilmemiş süt ile bulaşmakla beraber, Japonya 'da turp filizi, Kanada 'da nehir suyu, pek çok Avrupa ülkesi ve ABD 'de elma şarabı ve taze sıkılmış elma suyu da salgınlara ve ölümlere yol açmıştır.

Türkiye 'de yapılan gıda tarama çalışmalarında daha önce bu serotipe rastlanamamış olması analiz yönteminde mi eksiklik var, yoksa Türkiye genelinde mi bu bakteri son derece az sorgulamasını da getirmiş, ancak son olarak gıdalarda *E. coli* O157:H7 serotipi analiz yöntemlerinin duyarlılığının artırılmasına bağlı olarak Türkiye'den de karkas (TÜBİTAK – MAM) ve kıyma (Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü) örneklerinden bu bakteri izole edilmiştir.

*E. coli* O157:H7 serotipi ile ilgili daha fazla genel bilgi için [burayı tıklayın](#).

## **02. Aranması**

Gıdalarda bu bakteri sadece aranır, sayısı önemli değildir. Bir diğer deyiş ile 25 g (ya da ml) gıdada bu bakteri olmamalıdır. Buna göre eğer varsa kaç adet olduğu önemsizdir.

Var/yok testi ile yapılan analizinde selektif zenginleştirme, selektif katı besiyerine sürme, izolasyon, biyokimyasal identifikasyon ve serolojik yöntemlerle doğrulama aşamaları vardır. Gıda maddesinde bulunan diğer refakatçi bakterilerin *E. coli* O157:H7 'yi maskeleyebilmesi

ve dolayısı ile sahte negatif sonuçlar alınabilmesi nedeni ile analizinde giderek daha duyarlı olan enzimatik, genetik ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır.

*E. coli* O157:H7, önemi nedeniyle bu gün için gıda mikrobiyolojisi dalında üzerinde en çok çalışılan bakterilerden birisi olmuştur. Konu ile ilgili pek çok bilgi birikimi sağlanmıştır.

Bu serotipin standart kültürel yöntemlerle belirlenmesinde ele alınan iki kriter sorbitolü kullanamaması ve MUG reaksiyonunun negatif olmasıdır. MUG için [burayı tıklayın](#). Bu iki temel reaksiyon ile katı besiyerinde gelişmiş olan koloniler arasından muhtemel *E. coli* O157:H7 serotipleri seçilebilir. Selektif zenginleştirme ve özellikle selektif katı besiyerine ekim aşamasında ise sefiksim – tellurit katkısı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Selektif zenginleştirme ortamı olarak en yaygın kullanılan iki besiyeri modifiye EC (mEC) Broth (Merck 1.14582) ile modifiye Tryptic Soy Broth (mTSB ; Merck 1.09205) iken Lauryl Sulfate (LST) Broth (Merck 1.10266) besiyeri de çeşitli çalışmalarda olumlu sonuç vermiştir. Katı besiyeri olarak en fazla kullanılan besiyeri Sorbitol MacConkey Agar (Merck 1.09207) ve bunun cefixim – tellurit (CT) ile (Merck 1.09202) ile desteklenmiş şekli olan CT – SMAC Agar besiyeridir. Fluorocult *E. coli* O157:H7 Agar (Merck 1.04036) ve Fluorocult HC Agar (Merck 1.09206) besiyerleri *E. coli* O157:H7 serotipinin MUG negatif olma özelliği ile ayrımını sağlamaktadırlar.

*E. coli* O157:H7 serotipi ile ilgili daha fazla analiz bilgisi için [burayı tıklayın](#).

### 03. Doğrulanması

Selektif katı besiyerinden elde edilen tipik koloniler mutlaka biyokimyasal ve/veya serolojik testler ile doğrulanmalıdır. Gıdalarda sorbitol negatif bakteriler arasında Enterobacteriaceae familyasının pek çok üyesi olduğu ve bunların selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerlerinin çoğunda gelişebileceği gözden uzak tutulmamalıdır.

Sorbitol ve floresan negatif kolonilerin *E. coli* O157 serotipi olması mümkündür. Bu koloniler latex testi ile (Oxoid DR 120M) kontrol edilir. Pozitif sonuç sadece O157 serotipini gösterir. Latex testinde *Escherichia hermannii* 'nin sahte pozitif sonuç verebileceği de gözden uzak tutulmamalıdır. H7 serotipinin belirlenmesi için ayrıca H7 antiserumu ile test yapılmalıdır. Gıdalardan H7 serotipi olmayan pek çok O157 serotipinin sıklıkla izole edildiği unutulmamalıdır.

*E. coli* O157:H7 serotipi ile ilgili daha fazla analiz bilgisi için [burayı tıklayın](#).

### 04. Kullanılan Besiyerleri

#### 04.01. mEC Selective Enrichment Broth (Merck 1.14582)

Standart EC Broth besiyerinden farkı safra tuzlarının miktarının azaltılmış olması ve novobiosin ilave edilmiş olmasıdır. Bu nedenle standart EC Broth besiyerine novobiosin eklenerek bu besiyeri elde edilemez. Safra tuzları konsantrasyonunun azaltılmış olması nedeni *E. coli* O157:H7 serotipinin *E. coli* tip 1 'e göre safra tuzlarına daha az dirençli olmasıdır. Standart EC Broth için [burayı tıklayın](#). 36,7 g/l konsantrasyonda destile su içinde eritilerek

hazırlanan besiyeri 225 ml olacak şekilde erlenlere dağıtılıp otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir. Novobiosin doğrudan besiyeri bileşiminde olduğu için otoklav sonrası bir katkı ilavesi söz konusu değildir. Besiyerine standart uygulamada 25 g (ya da ml) gıda maddesi ilave edilip 35 – 37 °C 'da 18 – 24 saat ve tercihen çalkalanarak inkübe edilir, buradan alınan 0.1 ml kültür doğrudan ya da seyreltilerek selektif bir katı besiyerine sürülür. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 225 ml 'lik 60 adet erlen hazırlanabilir. Bu besiyeri hakkında daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

#### **04.02. mTSB Selective Enrichment Broth (Merck 1.09205)**

Standart Tryptic Soy Broth besiyerinde modifikasyon yapılarak hazırlanmıştır, ancak standart EC Broth – mEC Broth besiyerinde olduğu gibi standart Tryptic Soy Broth besiyerine ilaveler yapılarak mTSB besiyeri elde edilemez. 33,0 g/l konsantrasyonda destile su içinde eritilerek hazırlanan besiyeri 225 ml olacak şekilde erlenlere dağıtılıp otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir. Novobiosin doğrudan besiyeri bileşiminde olduğu için otoklav sonrası bir katkı ilavesi söz konusu değildir. Besiyerine standart uygulamada 25 g (ya da ml) gıda maddesi ilave edilip 35 – 37 °C 'da 18 – 24 saat ve tercihen çalkalanarak inkübe edilir, buradan alınan 0.1 ml kültür doğrudan ya da seyreltilerek selektif bir katı besiyerine sürülür. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 225 ml 'lik 67 adet erlen hazırlanabilir. Bu besiyeri hakkında daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

#### **04.03. mLST Broth**

TÜBİTAK – VHAG – 1466 nolu proje kapsamında geliştirilmiş bir besiyeridir. Henüz ulusal ya da uluslararası kuruluşlar tarafından onaylanmamıştır. Söz konusu proje için [burayı tıklayın](#). Temel olarak refakatçi floranın selektif zenginleştirme aşamasında baskılanması hedeflenmiştir. Bu amaçla SMAC agar besiyeri katkısı SMAC 'da olduğunun yarı konsantrasyonunda ilave edilmekte, inkübasyon 42 °C 'da 24 saat olarak yapılmaktadır. Standart LST Broth besiyeri (Merck 1.10266) 35,5 g/l konsantrasyonda olacak şekilde destile su içinde eritilerek hazırlanır ve erlenlere 225 'er ml olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir. Oda sıcaklığına geldiğinde CT SMAC Agar katkısı (cefixim – tellurite ; Merck 1.09202) ilave edilir. Bu katkının hazırlanması için 1 şişe katkıya 1 ml steril distile su katılır ve karıştırılır. Standart SMAC Agardaki konsantrasyonun yarısı mLST Brotha ilave edileceğine göre bu karışımdan 0,225 ml ilave edilip, üzerine analiz edilecek örnek eklenir ve 42 °C 'da 24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda CT ilave edilmiş SMAC Agar besiyerine doğrudan ya da seyreltilerek sürme yapılır. Katkının en ekonomik kullanılması için 4 örnek beraberce analiz edilir. 4 adet 225 ml LST Broth besiyerine toplam 0,9 ml CT kullanılıp geriye 0,1 ml kalır. Bu miktar ise 50 ml (4 Petri kutusu) CT-SMAC Agar besiyeri için yeterlidir. 500 g olan dehidre LST Broth besiyerinden 225 ml olacak şekilde 62 erlen hazırlanabilir. Bunun için gereken CT katkısı 31 şişedir. CT katkısı 16 'lık şişe olarak pazarlandığına göre 2 kutu katkı yeterlidir. Bununla beraber CT katkısının depolama ömrünün LST Broth besiyerinden daha az olduğu dikkate alınmalıdır. Standart LST Broth ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

#### **04.04. CT- Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar Base (Merck 1.09207)**

*E. coli* O157:H7 serotipinin sorbitol negatif olması nedeni ile standart MacConkey Agar besiyeri bileşiminden laktoz çıkartılmış, yerine sorbitol ilave edilmiştir. Dolayısı ile sorbitol negatif olan bakteriler bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturur. *E. coli* O157:H7 analizinde doğrudan SMAC Agar besiyeri kullanılabilirse de refakatçi floranın yoğun baskılaması sonucunda sahte negatif sonuç alınabilir. Bu nedenle besiyeri genellikle CT katkısı ile desteklenerek kullanılmaktadır. Dehidre besiyeri 51,6 g/ l konsantrasyonda gerekirse ısıtılarak destile su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir. CT katkısı (Merck 1.09202) ilave edilmesi için 1 şişe katkı üzerine 1 ml steril distile su konulup karıştırılır. Bu miktar 500 ml besiyeri için yeterlidir. Bu nedenle pratik uygulamada SMAC Agar besiyeri 25,8 g/500 ml olacak şekilde hazırlanır. Otoklav sonrasında 45 °C 'a soğutulup 500 ml bazal besiyeri için 1 şişe katkı ilave edilir, karıştırılır ve petrilere 12,5 ml/petri olacak şekilde dökülür. Selektif zenginleştirme kültüründen doğrudan ya da seyreltilerek alınan 0,1 ml besiyeri üzerine yayılır, ya da öze ile sürme yapılır. 35 – 37 °C 'da 24 saat inkübasyon sonunda sorbitolü kullanamayan *E. coli* O157:H7 ve diğer bakteriler renksiz koloni oluştururken, sorbitol pozitif olanlar kırmızı koloni oluştururlar. 500 g olan dehidre besiyeri ile 12,5 ml/petri hesabı ile 775 adet petri hazırlanabilir. Bu miktar için gereken CT katkısı 19 şişedir. Bu katkı 16 şişe/kutu olarak pazarlandığına göre 1 kutu katkı (16 şişe) 1 kutu 500 g dehidre SMAC Agar besiyeri için az bir farkla yetmektedir.

#### **04.05. Fluorocult HC Agar (Merck 1.09206)**

Dehidre besiyeri 58,2 g/l olacak şekilde gerekirse ısıtılarak distile su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir ve petrilere dökülür. Besiyeri bileşimindeki safra tuzları Gram pozitif refakatçi bakterileri önemli ölçüde inhibe eder. 35 – 37 °C 'da 18 – 24 saat süre yapılan inkübasyon sonunda sorbitolü kullanamayan bakteriler renksiz kalırken sorbitol pozitif bakteriler sarı renkli koloni oluşturur. Sorbitol negatif kolonilere uzun dalga boylu UV el lambası ile (Merck 1.13203) floresan testi yapılır. Floresan ışımının yayılmasını önlemek için inkübasyon süresi tercihen 18 saat olmalıdır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 ml/petri hesabı ile 687 petri hazırlanabilir.

#### **04.06. Fluorocult *E. coli* O157:H7 Agar (Merck 1.04036)**

Dehidre besiyeri 55,0 g/l olacak şekilde gerekirse ısıtılarak distile su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir ve petrilere dökülür. 35 – 37 °C 'da 18 – 24 saat süre yapılan inkübasyon sonunda sorbitolü kullanamayan bakteriler renksiz , sorbitol pozitif bakteriler sarı renkli koloni oluşturur. Besiyeri bileşimindeki sodyum tiyosülfat ve amonyum demir (3) sitrat hidrojen sülfür oluşturan *Proteus mirabilis* gibi refakatçi floranın kahverengi koloni vermesini sağlar. Selektif zenginleştirme kültüründen doğrudan ya da seyreltilerek alınan 0,1 ml besiyerine yayılır ya da öze ile sürme yapılır. Sorbitol negatif kolonilere uzun dalga boylu UV el lambası ile (Merck 1.13203) floresan testi yapılır. Floresan ışımının yayılmasını önlemek için inkübasyon süresi tercihen 18 saat olmalıdır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 ml/petri hesabı ile 727 petri hazırlanabilir.

#### **04.07. Singlepath *E. coli* O157: H7 (Merck 1.08839)**

GLISA (Gold Labelled Immuno Sorbent Assay) hızlı *E. coli* O157:H7 analizi için kullanılan kittir. Selektif zenginleştirme besiyeri kültüründen alınan 3 damla örnek kitin örnek gözüne

aktarılır, oda sıcaklığında 20 dakika bırakılır. Bu süre içinde kitin “C” kontrol penceresinde kırmızı şerit oluşmalıdır. “T” test penceresinde de oluşan kırmızı şerit örnekte *E. coli* O157:H7 varlığını gösterir. Bu kit immun akış prensibi ile hazırlanmış immunolojik bir test kitidir. Duyarlılığı %99,9, spesifikliğı %99,4 olarak belirlenmiştir. Özenleştirme aşamasından sonra 20 dakika içinde sonucu doğrudan *E. coli* O157:H7 serotipi olarak verdiği için hızlı kit olarak değerlendirilir ve dolayısı ile başka malzemeye gerek duymadığı için ekonomiktir. Bu kit ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).