

Analiz Yöntemleri *E. coli* O157:H7 (Kaynak 3)¹

[01. Belirlenmesi](#)

[01.01. Klasik Yöntemler](#)

[01.02. Gelişmiş ve Hızlı Yöntemler](#)

01. Belirlenmesi

E. coli O157:H7 serotipinin çeşitli gıda, klinik ve çevre örneklerinde aranmasına yönelik olarak kısaca klasik ve gelişmiş olarak 2 ana grupta toplanabilecek çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Diğer bakterilerin aranmasında olduğu gibi *E. coli* O157:H7 serotipi aranmasında da klasik yöntemler ile gelişmiş yöntemler kıyaslandığında klasik yöntemler sarf malzemesi gideri açısından avantajlı ancak, iş gücü maliyeti, analizin duyarlılığı ve süre açısından dezavantajlıdır.

Gıdalar, klinik örnekler ve diğer materyalde *E. coli* O157:H7 belirlenmesine ilişkin pek çok yöntem üzerinde çalışılmaktadır. Bunlardan klasik olarak tanımlananlar biyokimyasal testler üzerine kurulmuştur ve rutin test laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Başta serolojik yöntemler olmak üzere geliştirilmiş testler öncelikle maliyet ve deneyim faktörleri nedeniyle genellikle araştırma laboratuvarlarında uygulanmaktadır.

01.01. Klasik Yöntemler

E. coli O157:H7 'nin belirlenmesi için kullanılan klasik yöntemlerin büyük çoğunluğu selektif zenginleştirme ve katı besiyerine ekim aşamalarını içeren var/yok testleri şeklindedir. Bu testler ile analiz edilen belirli bir miktar örnekte bu bakterinin varlığı ya da yokluğu araştırılır. Buna göre materyalde *E. coli* O157:H7 'nin varlığının gösterilmesi sırasıyla selektif bir sıvı besiyerinde zenginleştirme, selektif ve ayırt edici bir katı besiyerine ekim, şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve/veya lateks agglutinasyon testleri ile *E. coli* O157 olarak belirlenmesi ve en son olarak izolatin H7 antijeni içerip içermediğinin belirlenmesidir. *E. coli* O157 olduğu saptanan izolatların verotoksin analizlerinin de yapılması gerekmektedir (49, 80, 125, 160).

Klasik yöntemlerle *E. coli* O157:H7 izolasyonunda yoğun refakatçi flora varlığına bağlı olarak sıklıkla sahte negatif sonuçlar alınabilmektedir. Benzer şekilde analiz edilen diğer mikroorganizmalarda da olduğu gibi, selektif zenginleştirme ortamı olarak kullanılan besiyerinde *E. coli* O157:H7 serotipi ile aynı düzeyde gelişebilen *E. coli* tip 1, *Citr. freundii*, *Enterobacter* spp., *Hafnia alvei* gibi yakın akraba türler selektif katı besiyerinde de rahatlıkla gelişebilmekte ve eğer başlangıçta *E. coli* O157:H7 sayısı bu flora içinde yeterli bir oranda değil ise bu bakterilerin baskılanması nedeni ile analiz sonucu hatalı olarak negatif alınmaktadır. Burada hedef bakterinin selektif sıvı ve katı besiyerlerinde gelişebilen refakatçi flora içindeki oranı en düşük %1 olmalıdır. Bu şekilde standart boy bir petri kutusunda bulunan selektif bir katı besiyerine selektif zenginleştirme kültüründen yapılan ekim ve inkübasyon sonucunda oluşacak 100 koloni içinden hedef bakterinin diğerlerinden farklı olan koloni morfolojisine göre ayırt edilmesi ve izolasyonu mümkündür. Burada, petri kutusunda 100 koloni oluşacak şekilde selektif zenginleştirme

¹ Kaynak : [Escherichia coli O157:H7 Serotipi](#) Orkim Ltd Yayınları, Ankara

kültüründen seyreltme yapılması esastır. Bu orandan daha düşük konsantrasyonlarda bulunacak hedef bakterinin petri kutusunda görülmesi ve izolasyonu mümkün değildir. Gıda maddesinde başlangıçta bu oranın %0,1 olduğu varsayılır ise selektif zenginleştirme sonunda bu oran korunacak, petri kutusunda 100 koloni oluşması sağlanacak şekilde yapılan seyreltme sonunda petri kutusuna hedef bakteriden 1 adedinin koloni oluşturma olasılığı %10 olacak, bir diğer deyiş ile %90 olasılıkla petri kutusunda hedef bakteri koloni oluşturmayacaktır. Bu koşulda *E. coli* O157:H7 'nin koloni oluşturması için petri kutusunda 1000 koloni oluşacak şekilde seyreltme yapılması gerekmektedir, ancak bu koşulda da refakatçı bakteri kolonileri hedef bakteriyi maskeleyecek ve 1000 koloni içinden *E. coli* O157:H7 'nin seçilip izolasyonu mümkün olmayacaktır. Klasik yöntemlerle yapılan analizlerde yakın akraba refakatçı floranın inhibisyonu üzerinde pek çok çalışma yapılmaktadır. Bunların inhibisyonu için yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı, düşük pH, çeşitli antibiyotiklerin kullanılması, kısa inkübasyon süresi gibi faktörler araştırılmaktadır (18, 22, 81, 89, 120).

Refakatçı floranın *E. coli* O157:H7 belirlenmesindeki maskeleyen şeklindeki olumsuzluğu yanında sıvı besiyerinde doğrudan bu bakterinin gelişmesini engellemek ve dolayısı ile belirlenmesini tümden olanaksız kılmak gibi olumsuzlukları da vardır. Yapılan bir araştırmada brain-hearth infussion besiyerinde *H. alvei* 'nin *E. coli* O157:H7 'nin gelişmesini kayda değer ölçüde engellediği gösterilmiştir (59). Bu durumda klasik yöntemlerle analiz edilen örnekte *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi bir anlamda refakatçı floranın baskılanabilmesi ile doğrudan ilişkilidir.

Gıdalarda fekal koliformların ve dolayısı ile *E. coli* 'nin belirlenmesi için kullanılan inkübasyon sıcaklığı olan 44-45,5 °C sıcaklık sınırı refakatçı floranın gelişimini baskılamak, *E. coli* 'nin gelişimini teşvik etmekte, ancak *E. coli* O157:H7 bu sınırdan zayıf olarak gelişmektedir. *E. coli* O157:H7, *E. coli* tip 1 ve diğer koliformların EC Broth besiyerinde gelişmeleri ve gaz oluşturmaları için gerekli en düşük ve en yüksek sıcaklığın araştırıldığı bir çalışmada *E. coli* O157:H7 'nin geliştiği sıcaklık sınırları 24 saatte 24,3-41,0 °C ; 36 saatte 19,3-41,0 °C ve 48 saatte 19,3-41,0 °C olarak bulunmuştur. Benzer şekilde TS broth besiyerinde gelişme sıcaklık sınırının 20-42 °C olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular fekal koliform ve *E. coli* 'nin standart aranma yönteminde kullanılan 44,5 °C 'ın *E. coli* O157:H7 serotipinin gelişmesine olanak tanımadığını, bu nedenle gıdalarda *E. coli* aranmasına yönelik olarak kullanılan geleneksel yöntemler ile *E. coli* O157:H7 belirlenmesi söz konusu olamayacağını göstermiştir (8, 55, 57, 129, 137). Benzer şekilde yapılan bir başka araştırmada *E. coli* O157:H7 serotipinin belirlenebilmesi için en uygun inkübasyon sıcaklığı 41-42 °C olarak bulunmuştur (21).

E. coli O157:H7 serotipinin klasik yöntemlerle belirlenmesi amacı ile kullanılan selektif besiyerleri içinde modifiye EC (mEC) broth (13, 20, 93, 120, 121, 124, 145), modifiye trypticase soy (mTS) broth (21, 55, 120, 152, 169), LST broth (81, 120), EZ coli zenginleştirme besiyeri (119) ve özellikle kümes hayvanları ile yapılan analizlerde önerilen piliç ekstrakt broth (40) bulunmaktadır. Genel olarak 1:9 oranında besiyeri ile homojenize edilen örnek 37 °C 'da 24 saat inkübasyona bırakılmakta, bu sürenin sonunda selektif bir katı besiyerine ekilmektedir. mTSB brotha 0,05 mg/l cefixime, 10 mg/l cefsuladin ve 80 mg/l vancomycine ilavesi ile ön zenginleştirme besiyeri daha da selektif hale getirilebilmektedir. Zenginleştirme kültürlerinin hidrofobik grid membran filitreden (HGMP) geçirilip, bu filitrelerin selektif katı besiyeri üzerine yerleştirilmesi de yaygın uygulama bulmaktadır (8, 80, 89, 120). mTS broth besiyerinde 43 °C 'da ve 100 d/d çalkalama hızı ile yapılan inkübasyon ile direkt ekimden 10 misli daha fazla duyarlıkta ve en iyi geri alma sağlandığı belirtilmektedir (152). Buna karşı bir başka araştırmada 42 °C 'da çalkalama yapılmadan inkübasyonun refakatçı floranı önemli ölçüde baskılayacağı gösterilmiştir (20).

E. coli O157:H7 'nin belirlenmesinde doğrudan selektif önzenginleştirme yerine önce selektif olmayan bir ortamda canlandırma işlemi yapılması ile hasar görmüş hücrelerin daha iyi bir şekilde belirlenebileceği ve buna bağlı olarak klasik yöntemlerin duyarlılığının 10 misli artırılabilceğinin gösterildiği araştırmalar da bulunmaktadır (18, 82).

Selektif katı besiyeri olarak bu gün en yaygın kullanılan sorbitol MacConkey (SMAC) agar ve bu besiyerinin çeşitli modifikasyonlarıdır. Bu besiyerinin standart MacConkey agardan farkı bileşiminde laktoz yerine sorbitol bulunmasıdır. *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol negatif olduğu için bu besiyerinde renksiz koloniler oluşturmakta, buna karşı sorbitolü kullanan bakterilerin oluşturduğu asitlik bir pH indikatörü yardımı ile kolonilerin kırmızı görülmesine neden olmakta, böylece *E. coli* O157:H7 serotipi sorbitol pozitif bakterilerden ayırt edilmektedir. Her ne kadar *E. coli* 'lerin çoğu sorbitolü fermente edebilir iken %6 kadar *E. coli* sorbitol negatiftir. Bu atipik suşlar da gıdalarda bulunabilmektedir. Bu nedenle her sorbitol negatif *E. coli* suşu O157:H7 serotipi olarak değerlendirilmemeli, basit olarak MUG testi ile izolatan *E. coli* tip 1 olup olmadığı kontrol edilmelidir. Refakatçı flora içinde en yaygın bulunan bakterilerden *E. coli* tip 1, *Citr. freundii*, *Serratia* spp. sorbitol pozitif iken, *H. alvei* sorbitol negatiftir, *Enterobacter* 'lerde ise sorbitol reaksiyonu türlere göre değişmektedir. *E. hermannii* ve diğer bazı enterik bakteriler biyokimyasal olarak tipik *E. coli* O157 sonuçlarını verirler. Bu nedenle biyokimyasal identifikasyonda dikkatli olunması ve sahte pozitif sonuçlardan sakınılması ve serolojik yöntemlerle doğrulama yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (80, 89). SMAC agar %100 duyarlı, %85 spesifik ve %86 doğru sonuç veren bir besiyeri olarak tanımlanmış iken (108) aynı araştırmacılar (109) daha sonra SMAC agarı gıda analizlerinde dışkı analizlerinde olduğu kadar başarılı bulmamışlardır.

Standart MacConkey agar ve dolayısı ile SMAC agar besiyerleri sırası ile laktoz ve sorbitol reaksiyonlarına dayalı olarak yeterli düzeyde bir ayırt edici özellik sağlamakla beraber, her iki besiyeri de oldukça zayıf bir selektiviteye sahiptir ve dolayısı ile hedef bakteri yanında akraba pek çok bakterinin de gelişmesine izin vermektedirler. Bu nedenle SMAC agar besiyeri çeşitli selektif katkı ile desteklenmekte ve böylece besiyerine refakatçı floranın daha yüksek düzeyde baskılanmasını sağlayacak selektivite kazandırılmaya çalışılmaktadır. Bu katkı arasında antiserum (100), 5-bromo-4-chloro-3-indoxyle- β -D-glucuronic acid cyclohexyl ammonium salt ; BCIG (89, 122), cefixime ve tellurite (4, 15, 21, 22, 38, 87, 89, 123, 124, 173), ramnoz ve cefixime (34) ve MUG (2) çeşitli araştırmalarda denenmiştir. Bunlar arasında yeni bir sefalosporin olan cefixime sorbitol negatif olan *Proteus* spp. 'nin inhibisyonu için önemlidir. Tellurite ile desteklendiğinde *E. coli* O157:H7 dışında kalan ve başta yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı olmak üzere diğer yöntemler ile baskılanamayan diğer *E. coli* 'leri de önemli ölçüde etkilemektedir. Bununla beraber özellikle stres altındaki *E. coli* O157:H7 suşları CT varlığında daha zayıf olarak gelişmektedir (9, 89, 129, 166). SMAC agarın cefixime ve tellurite kombinasyonuna ilave olarak salicin ve 4-methylumbelliferyl- β -galactopyranoside ile desteklenmesi ile elde edilen CT-SSMAC agar besiyerinin *E. coli* O157:H7 izolasyonunda CT-SMAC agardan daha iyi sonuç verdiği (71), SMAC agarın BCIG yerine 8-hydroxyquinoline- β -D-glucuronide (HQG) ile desteklenmesi halinde daha ucuz ve daha etkili bir izolasyon sağladığı (139) gösterilmiştir.

SMAC dışında, phenol red sorbitol (PRS) + MUG agar (121), L-EMB agar (121), hemorrhagic colitis (HC) agar (151), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) agar (90), BCM O157 agar (124), CHROMagar O157 (124), modifiye edilmiş EMB (mEMB) agar (41, 44), Fluorocult *E. coli* O157 agar (120, 145), standart enterik agar ve purple agar base + %1 sorbitol besiyeri kombinasyonu (84) besiyerleri de çeşitli denemelerde kullanılmıştır. HC agar MUG ve sorbitol

içermesi ile MUG ve sorbitol negatif kolonilerin izolasyonuna olanak sağlamaktadır. Bununla beraber inkübasyonun uzamasına bağlı olarak floresansın yayılması MUG reaksiyonunun sağlıklı olarak değerlendirilebilmesini olanaksız kılmaktadır. Bu nedenle MUG yerine kolorimetrik bir katkı olan BCIG 'in kullanılması daha yüksek doğrulukla izolasyon yapılabilme olasılığı vermektedir (89, 120).

Zenginleştirme besiyerleri ile selektif katı besiyeri kombinasyonları üzerinde de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Buna göre mEC broth ve SMAC agar ile LST broth ile SMAC agarın (120), mTS broth ve cefixime ve tellurite katılmış SMAC agarın (21, 87) denenilen diğer kombinasyonlardan daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Klasik yöntemle *E. coli* O157:H7 aranmasında son aşama selektif katı besiyerinden izole edilen şüpheli kolonilerin tanımlanmasıdır. Bu tanımlama O157 serotipi için biyokimyasal testler ile yapılabileceği gibi doğrudan lateks agglutinasyon testi ile de yapılabilmekte, ancak O157 olduğu belirlenen izolatın H7 olup olmadığı H7 antiserumu ile belirlenebilmektedir (80, 109).

Yukarıda da belirtildiği gibi *E. coli* O157:H7 serotipi *E. coli* tip 1 'den β -glucuronidase enzimi içermemesi ve sorbitol negatif olması ile ayrılır. Bir diğer deyiş ile *E. coli* tip 1 'in belirlenmesine yönelik tüm temel identifikasyon testleri *E. coli* O157:H7 serotipi belirlenmesi için de kullanılabilir. Buna göre *E. coli* O157:H7 serotipinde MUG, hidrojen sülfür oluşturma, Voges-Proskauer, sorbitol testleri negatif, laktoz, glikozdan gaz oluşturma, indol, metil red, hareket ve lisin dekarboksilaz testleri ise pozitifdir. Aynı biyokimyasal test sonuçlarını veren diğer bakteriler *Kluyvera ascorbata* ve *Kluyvera cryocrescens* (5) olmakla beraber bu türler rutin gıda kontrollerinde selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine geçme aşamalarında inhibe olmaktadır (79, 80, 89). Küçük laboratuvarlarda *E. coli* O157:H7 çalışmaları için sorbitol negatif izolatlara ornithin ve lisin dekarboksilasyon testlerinin de yapılması ile taramalarda duyarlılığın artırılabilceği gösterilmiştir (77).

E. coli O157 suşlarının serolojik esaslarla belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan lateks agglutinasyon kiti iki adet lateks solüsyonu içermektedir. Bunlardan test solüsyonu, *E. coli* O157 antijenine özel tavşan antikoları ile kaplanmış lateks partiküllerinden oluşmakta iken, kontrol solüsyonu ise pre-immun halde tavşan globulinleri içermektedir. Test edilen kültürler SMAC agar üzerinde geliştirildikten sonra, sorbitol negatif olan koloniler, lateks testine tabi tutularak test sonucu 1 dakika içinde tespit edilebilmektedir. Fekal örneklerde bulunabileceği gibi daha çok çiğ süt ve dana eti gibi gıdalardan izole edilen *E. hermannii* sorbitol negatif olup *E. coli* O157 antiserumu ile agglutine olabilmekte ve böylece *E. coli* O157 ile karıştırılabilmektedir. Buna göre özellikle gıdalarda bulunan *E. hermannii* 'nin izolasyonu için kullanılan SMAC besiyerlerinin yanı sıra sellobiyoz-MacConkey agar bazı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır. Böylece *E. hermannii* sellobiyoz fermentasyonu ile *E. coli* O157 'den ayırt edilebilmektedir (109). Bu kitin yüksek duyarlılıkta olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (80, 109, 145). *E. coli* O157:H7 serotipi ile *E. hermannii* arasındaki serolojik benzerlik sahte identifikasyon sonuçlarına neden olmaktadır. *E. coli* O157 olarak tahmin edilen kültürlerin sarı pigment oluşturma, sellobiyoz fermentasyonu ve KCN 'de gelişme testlerinin de yapılması önerilmektedir (106).

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar sığır dışkılarından izole ettikleri ve *E. coli* 'ler içinde sadece O157:H7 serotipine özgüllük gösteren spesifik bir kolifajın *E. coli* O157 identifikasyonunda başarı ile kullanılabileceğini göstermişlerdir. Ayrıca bu fajın *E. coli* O157:H7 gibi hastalıklar yapan çeşitli enterik bakteriler arasında sadece *Sh. dysenteriae* 'yı etkilemesine dikkat çekmişlerdir (144).

E. coli O157 olarak saptanan izolatın H7 olup olmadığının saptanmasında H7 antiserumu çeşitli besiyerlerine katılarak immobilizasyon testi uygulanmaktadır (4, 64, 145). Dışkı örnekleri ile inoküle edilmiş SMAC agar besiyerinden izole edilen sorbitol negatif *E. coli* O157:H7 serotiplerinin hızlı identifikasyonu için *E. coli* O157:H7 fluoresans antikor konjugatının %100 duyarlı ve spesifik olduğu bulunmuştur (157).

01.02. Gelişmiş ve Hızlı Yöntemler

Klasik yöntemlerle birçok enfeksiyon teşhis edilebilmekte ise de bunlar bazen yetersiz kalabilmekte ve özellikle refakatçi floranın maskeleymesi nedeni ile çoğu kez sahte negatif sonuçlar alınabilmektedir. Bu nedenle, giderek gelişen analiz teknikleri içinde başta DNA esaslı testler ve immuno enzimatik yöntemler olmak üzere çeşitli analiz yöntemleri üzerinde çalışılmakta, bunlardan bir kısmı ticari olarak üretilip pazarlanmaktadır. Bu yöntemlere son zamanlarda yeni serolojik metotlar, özellikle, immunoassay, radioimmunoassay (RIA), fluorescent immunoassay (FIA), enzim immunoassay (EIA), immun peroksidaz testleri vs. katılarak bakterilerin belirlenmesinde daha güvenli ve erken sonuçlar alınmaktadır. Ancak, bu testler pahalı olduğu gibi yetişmiş personele ve iyi donatılmış laboratuvarlara gereksinim duymaktadır. Bu kadar duyarlı olmalarına karşı, bazı olgularda da yine çapraz reaksiyonlar ve şüpheli durumlar ortaya çıkmakta ve tanı gecikmektedir. İmmunolojik belirleme ve identifikasyon sistemleri analiz süresinde kayda değer bir kısalma sağlamaktadır. Bunlar arasında latex agglutinasyon, ELISA, koloni immunblot analizleri, direkt immunofloresan filtre ve immun yakalama teknikleri *E. coli* O157:H7 analizlerinde kullanılmaktadır. Bu amaçla O ve H antijenlerine karşı monoklonal ve poliklonal antiserumlar geliştirilmiştir. Bu sistemlerde 1 gecelik inkübasyon sonrasında 1 kob/g 'dan daha az sayıda olan *E. coli* O157:H7 varlığı belirlenebilmektedir (9, 21, 22, 65, 88). İmmunokimyasal analizlerde O157 serotipinin sadece O antijenine ya da O157:H7 'nin tüm antijenlerine karşı antikorlar kullanılmaktadır. Sadece O antijeni kullanıldığında diğer bakterilerin lipopolisakarit antijenlerindeki yapısal benzerlikler nedeni ile sahte pozitif sonuçlar alınabilmektedir (129).

Doyle ve Schoeni tarafından geliştirilen yöntem *E. coli* O157:H7 ile doğal olarak kontamine olmuş çiğ et ve çiğ sütlerde başarılı bir şekilde kullanılabilir. Bu uygulamada 18-24 saatlik selektif zenginleştirmeden sonra kültürün çeşitli dilüsyonları HGMF 'den geçirilmekte, bu filtreler nitroselüloz kağıt üzerinde ve bir selektif besiyerinde 37 °C 'da 24 saat süre inkübe edilmekte, her nitroselüloz kağıt için VT-1 ve VT-2 antiserumları kullanılarak immunblotlar hazırlanmakta, HGMF 'lerdeki immunpozitif kolonilerin *E. coli* O157:H7 olup olmadığı biyokimyasal, serolojik ve verositol toksisite testleri ile doğrulanmaktadır. Bu yöntem ile gıdalarda *E. coli* O157:H7 varlığı başarı ile gösterilmekle beraber, rutin kullanımının uygun olmadığı bildirilmektedir (56, 57). Buna benzer bir uygulamada HGMF 'de gelişen *E. coli* O157 kolonilerinin belirlenmesi için immünolojik yöntemle boyamada H7 dışındaki serotipleri de içeren spesifik MAb kullanılmaktadır. Bu yöntemde HGMF 'de gelişen koloniler petride yeniden üretilip immünolojik olarak boyanmakta, kullanılan MAb tüm *E. coli* O157 serotipleri ve N grup *Salmonella* suşları ile reaksiyona girdiği için immün pozitif koloniler yine biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle kontrol edilmektedir (158). Enterohemorajik *E. coli* O157:H7 ve O26:H11 için üretilen spesifik bir MAb *E. coli* O157 antijeni ya da O157 poliklonal antikorları ile çapraz reaksiyona giren diğer bakteriler ile çapraz reaksiyon vermemekte, MAb özel olarak sadece enterohemorajik *E. coli* O157:H7 ve O26:H11 serotiplerinde bulunan 2 dış membran proteini ile reaksiyona girmektedir. Bu yüksek spesifikliğinden dolayı MAb gıda ve klinik örneklerde bu *E. coli* serotiplerinin hızlı belirlenmesi için yararlı bir immunoassay olarak tanımlanmaktadır (57).

Farklı O157 ve H7 serotiplerinden oluşan *E. coli*, *Salmonella* ve diğer Gram negatif bakteri suşları ile yapılan bir çalışmada monoklonal ve poliklonal antikolar kullanılmış, her iki antiserumun *E. coli* H7 ile kuvvetli reaksiyon verirken, poliklonal antiserumların H7 olmayan *E. coli* 'ler ile ve *E. coli* olmayan diğer suşlarla da çapraz reaksiyon verdiği belirlenmiş, ayrıca bu poliklonal antiserum ile *E. coli* H23 ve H24 serotiplerinde kuvvetli reaksiyon alınmıştır. Bu bulgular *E. coli* 'nin H7, H23, H24 serotipleri arasında serotip spesifik epitoplarının belirlenmesi gereğini göstermiştir. Anti H7 monoklonal antikoların yüksek kalitede teşhis araçları olduğu, gıda, insan ve veteriner klinik örneklerinde *E. coli* O157:H7 'nin aranması veya identifikasyonunda tek başlarına ya da O157 monoklonal antikoları ile kullanılabileceği görülmüştür (86). *E. coli* O157:H7 suşları analiz edilecek gıdanın selektif zenginleştirme kültürünün HGMF 'den geçirilip enzimle işaretlenmiş antikor analizi (enzyme labeled antibody assay) ile belirlenebilmektedir. Bu yöntemde bayır turbu peroksidaz A (HRP-A) protein ile işaretlenmiş ve O antijenine spesifik olan MAb 'dan da yararlanılmakta ve zenginleştirme yapılmaksızın gıdada *E. coli* O157:H7 sayımı gerçekleştirilebilmektedir (152, 158).

USDA-FSIS (ABD Tarım Bakanlığı Gıda Güvenliği ve Kontrolü Şubesi) etlerden *E. coli* O157:H7 izolasyonu için geliştirdiği yöntem 3M petrifilm *E. coli* petripleri ve poliklonal O157 antikor ile immunolojik boyama esasına dayanmaktadır. Zenginleştirme kültürünün çeşitli dilüsyonları petri film petriplerine ekilmekte, oluşan koloniler doğrudan temas ile nitroselüloz kağıtlara alınmakta, buradaki immun pozitif koloni beneklerine uyan petri film petriplerindeki koloniler ve zenginleştirme kültüründen bu kez SMAC-BCIG agara ekim yapılmakta, şüpheli koloniler EMB agar ile PRS-MUG agar besiyerlerine sürülmekte, tipik *E. coli* O157:H7 kolonileri lateks aglütinasyon testine alınmakta, ayrıca biyokimyasal ve serolojik olarak doğrulanmaktadır (57).

USDA-FSIS yöntemi ve esas olarak O157 poliklonal antikor kullanan diğer yöntemlerde alınan sahte pozitif sonuçlar bunların yaygın kullanımını kısıtlamaktadır. O157 poliklonal antiserumu *E. hermannii*, *Brucella abortus*, *Bru. melitensis*, *Y. enterocolitica* serogrup 0:9, *Salmonella* N grup, *Ps. maltophilia* ve diğer bazı enterik bakteriler ile çapraz reaksiyona girmektedir. Bu çapraz reaksiyondan sorumlu olan genel epitop hücre duvarı lipopolisakkaridinde bulunan 4-amino-4,6-dideoxy- α -D-mannopyranose 'dur (57).

E. coli O157:H7 'nin zenginleştirme ve katı besiyeri kullanılmadan antikor-direk epifluorescent filitre tekniği (Ab-DEFT) ile doğrudan sayımı mümkündür. Bu analiz yöntemi ile 15 dakika süre ile tripsin ve Triton X-100 ile muamele edilen kıyma 5 mm por çaplı ön filtreden sonra 0,2 mm por çaplı siyah polikarbonat filtreden geçirilmekte ve son filitre doğrudan fluorescein ile işaretlenmiş anti-O157 poliklonal antikor ile boyanıp yıkanmakta ve epifloresan mikroskopta incelenmekte, böylece 1 saatten daha az bir süre içinde analiz tamamlanmaktadır (159).

SLT 1 ve SLT 2 antikoları için ELISA yöntemleri kullanımı HeLa hücre sitotoksitesi nötralizasyon analizleri ile benzer sonuçlar vermiştir. Gerek ELISA uygulamaları gerek nötralizasyon testleri enfekte olmuş hastaların belirlenmesinde duyarlı değildir. Bununla beraber *E. coli* O157 lipopolisakkarit antikoları için ELISA tekniklerinin her ikisi de duyarlı ve spesifik olarak bulunmuş ve *E. coli* O157:H7 ile enfekte olmuş kişilerin belirlenmesinde antitoksik antikolardan muhtemelen daha yararlı olarak yorumlanmıştır (13).

Selektif zenginleştirme kültürünün "sandwich" ELISA *E. coli* O157 antijeni için spesifik bir poliklonal antikor ile uygulanmasıdır. Yüksek düzeydeki spesifikliği, duyarlılığı ve hızlı olmasının yanında bu işlem rutin mikrobiyolojik kontroller yapan laboratuvarlar için kullanımını kolay ve

uygun bir yöntem olarak tanımlanmıştır (126). Et ve tavuk ürünlerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu için ticari olarak bulunan ve *E. coli* O157 antijeni için "reactive disc blot" ELISA sisteminin kullanıldığı bir tarama yöntemi de tasarlanmıştır (122).

İmmunolipozomlar kullanılarak geliştirilen ve bir kolorimetrik immuno analiz yöntemi olan "immunoliposome sandwich assay" ile *E. coli* O157:H7 'nin yıkama ve inkübasyon aşamalarına gerek duyulmadan 8 dakika gibi kısa bir süre içinde belirlenebileceği, ve mmunopolizomların sadece *E. coli* O157:H7 ile bağlanabileceği ve hiç bir çapraz reaksiyon alınmadığı transmisyon elektron mikroskobik analizler ile gösterilmiştir (130).

Dışkı örneklerinde *E. coli* O157:H7 'nin belirlenebilmesi için geliştirilmiş ve 1 saatten daha az sürede sonuç veren hızlı bir ELISA yönteminde diğer enterik patojenler ile çapraz reaksiyon alınmamıştır. Bu yöntem dışkılarda *E. coli* O157 'nin aranması için doğru ve kolay uygulanabilir olarak değerlendirilmiştir (128). *E. coli* O157:H7 varlığı ticari kit olan HEC O157 ELISA ile test edildiği bir çalışmada ise *E. coli* izolatlarının hiç birisinin O157:H7 serotipi olmadığı saptandığı için ticari HEC O157 ELISA kiti düşük duyarlılık olarak kabul edilmiştir (147).

E. coli O157 'nin hızlı ve basit olarak belirlendiği bir diğer enzim immunoassay sistemi polymacron 'dur. Bu sistemin esası test örneğinin sodyum cholate ile 100 °C 'da 10 dakika ısıtılması ile ekstrakte edilen *E. coli* O157 antijeninin immuno enzimatik yöntemle belirlenmesidir. Immunoadsorbent yüksek bir yüzey alanına sahiptir. Sistem, *E. coli* 'nin 29 O157:H7 serotipi, 1 O157:H12 serotipi ve 1 O157:NM (non motile ; H⁻) serotipi ve *S. urbana* (N grup) ile pozitif sonuç vermiş ancak çok sayıda Gram negatif ve pozitif bakteri ile reaksiyon vermemiştir. Bu yöntem ile çiğ kıymaya inoküle edilen 0,4 kob/g düzeyindeki *E. coli* O157:H7 belirlenebilmektedir (19).

Yine ticari bir kit olan EZ Coli ise standart mikropipette bulunan *E. coli* O157 için spesifik olan hızlı immunoassay yöntemi olup *E. coli* O157 ve laktozu fermente eden diğer koliform bakteriler için selektif olan tek aşamalı zenginleştirme besiyeri ve *E. coli* O157 aranmasında 6 aylık raf ömrüne sahip mikropipet ucu formunda bir mikrofilament ELISA testi olan EZ coli detektör uç olmak üzere iki unsurdan oluşmaktadır. EZ coli kitinin başarılı bir kit olarak tanımlanmasına karşın (7, 68, 80), bir başka çalışmada EZ coli kiti ile pozitif sonuç alınan örneklerde standart kültürel yöntemlerle *E. coli* O157 izole edilememiş, dolayısı ile bu kitin kullanımı doğrulama açısından endişe ile karşılanmıştır (119). EZ Coli ticari kiti dışında benzer şekilde geliştirilmiş olan başka ticari kitler de vardır. Bunlardan BioMerieux 'un Mini Vidas sistemi ve Organon Teknika 'nın 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 (85, 138).

İmmunomanyetik ayırım yöntemi ile çalışan sistemler üzerinde son yıllarda yoğun bir ilgi vardır (22). İmmunomanyetik ayırım yönteminde O157 spesifik antikorların paramanyetik parçacıklara tutturulması şeklindeki bir selektif zenginleştirme ile dışkıda 10⁷ kob/g koliform bakteri bulunurken 10² kob/g düzeyindeki *E. coli* O157:H7 belirlenebilmiştir (96). Bu yöntem pek çok araştırmacı olarak güvenilir ve duyarlı olarak bulunmuş ve doğrulama için doğrudan izolasyon sağlaması nedeni ile diğer gelişmiş analiz yöntemlerine göre avantajlı olarak tanımlanmıştır (15, 38, 87). Electrochemi luminescence (ECL) ile kombine edilmiş immunomanyetik ayırım (immunomagnetic seperation = IMS) sistemi olan bir ticari sensör ile gıdalarda *E. coli* O157 1 saatten daha az sürede belirlenebilmektedir (172).

Nükleik asit esaslı analizler ağırlıklı olarak DNA Stxs geni ya da *eae* genine spesifik DNA probu kullanan yöntemler ve PCR analizleri olarak 2 gruba ayrılır. Bunlardan Stxs genine özel nükleik asit esaslı testler sadece Stxs üreten patojenlere spesifik olmakla beraber, 60 kadar farklı *E. coli* serotipi ile hatta *Citr. freundii* 'nin de Stx II varyantlarını üretebilmesi nedeni ile bu testler doğrudan O157:H7 belirlenmesinde kullanılamamaktadır. Aynı şekilde *eae* genine spesifik yöntemlerde de sadece *E. coli* O157:H7 değil, diğer EPEC serotipleri de pozitif sonuç verebilmektedir. Oysa β -glucuronidase (*uidA*) geni ile ilgili analizlerde böyle bir kısıtlama yoktur. Son olarak sadece *E. coli* O157:H7 serotipinin *uidA* geninin belirli bir bölgesine duyarlı olan 18 bp 'lik oligonükleotid DNA probu PF-27 'nin oldukça başarılı bir şekilde kullanılabildiği belirtilmektedir. Multiplex PCR analizleri duyarlı, spesifik ve O157:H7 serotipinin fenotipik varyantlarını belirleyebilecek düzeyde iken, bu sistemin çok kompleks ve gıdalar ile klinik örneklerin rutin analizlerinde kullanılamayacak kadar pahalı olduğu belirtilmektedir (129).

Enterohemorajik *E. coli* dışındaki pek çok VTEC suşunun insanları hastalandırmadaki önemi ve bu suşların hemorajik kolit ve HUS ile ilişkisinin bilinmemesi nedenleri ise gıdalardaki verotoksijenik *E. coli* 'lerin belirlenmesi daha yararlı olabileceği görüşü de vardır. VT-1 ve VT-2 'yi kodlayan DNA 'nın kullanıldığı gen probe analizlerinde sadece enterohemorajik *E. coli* serotipleri olan O157:H7 ve O26:H11 değil tüm VT-1 ve VT-2 üreten *E. coli* 'ler belirlenebilmektedir. *E. coli* O157:H7 'nin 3,4 kilobazlık bir segmentinden hazırlanan DNA probu *E. coli* O157:H7 ile %99, *E. coli* O26:H11 ile %77, hemorajik kolit veya HUS hastalarından izole edilen diğer VT pozitif *E. coli* serotipleri ile %81 düzeyinde hibridize olduğunun belirlenmesi bu yöntemin duyarlılığını göstermektedir (57). DNA esaslı testler üzerinde başarılı sonuçların alındığı çeşitli çalışmalar ile de gösterilmiştir (17, 74, 169).

Son zamanlarda toksin oluşturan çeşitli *E. coli* suşlarının belirlenmesinde multipleks PCR tekniği kullanılmaktadır. Bu yöntem ile bifteklerde *E. coli* O157:H7 ve toksinlerinin araştırıldığı bir çalışmada PCR 'ı inhibe eden gıda parçacıkları 2 aşamalı basit bir filtrasyon ile giderilmiştir. Bu yöntem ile genel bir besiyerinde 37 °C 'da 6 saat inkübasyon ile 10³ kob/g, bir gece inkübasyon ile 1 kob/g düzeyinde duyarlık sağlanmaktadır (162). Benzer şekilde yürütülen bir çalışmada da multipleks PCR tekniği kullanılarak başarılı sonuçlar alınmıştır (132). "Restriction-site specific-PCR ; RSS-PCR" yöntemi ile çevresel örneklerden izole edilmiş çok sayıda *E. coli* izolatının *E. coli* O157:H7 olup olmadığının belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği (98), bunların dışında lazer taramalı konfokal mikroskobik araştırmalar ile de etlerde *E. coli* O157:H7 'nin belirlenebileceği gösterilmiştir (136).