

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Escherichia coli*'NİN FARKLI ŞEKERLERİ KULLANMA YETENEĞİ**
ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Vet. Hek. Nurhayat SIĞIRTMAÇ
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Murat GÜLMEZ

2008 KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Escherichia coli*'NİN FARKLI ŞEKERLERİ KULLANMA YETENEĞİ**
ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Vet. Hek. Nurhayat SIĞIRTMAÇ
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Murat GÜLMEZ

2008 KARS

T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde Nurhayat Sığırtmaç tarafından hazırlanmış olan “*Escherichia coli*” nin Farklı Şekerleri Kullanma Yeteneği Üzerine Bir Araştırma” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08.04.2008

Adı Soyadı

imza

Başkan : Doç.Dr.Mitat ŞAHİN

.....

Üye : Doç.Dr.Murat GÜLMEZ

.....

Üye : Yrd.Doç.Dr.Leyla VATANSEVER

.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **14.04.2008** Gün ve **09/63** Sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç.Dr.Hakan KOCAMIŞ
Enstitü Müdürü



	İÇİNDEKİLER	Sayfa
		No
	Önsöz	I
	Simgeler ve kısaltmalar dizini	II
	Şekiller dizini	III
	Tablolar dizini	IV
1.	GİRİŞ	1
1.1.	Mikroorganizmalar ve Sağlıkla İlişkisi	1
1.2.	Mikroorganizmaların Sınıflandırılması	3
1.2.1.	Prokaryotik mikroorganizmalar	4
1.2.1.1.	Bakteriler	4
1.2.1.2.	Mavi-yeşil Algler	4
1.2.2.	Ökaryotik mikroorganizmalar	5
1.2.3.	Virüsler	5
1.3.	Bakterilerin Sınıflandırılması	5
1.3.1.	Doğal (Filojenik) Sınıflandırma	5
1.3.2.	Nümerikal Sınıflandırma	6
1.3.3.	Genetik Sınıflandırma	6
1.3.4.	Antijenik Sınıflandırma	6
1.3.5.	Fajla Tiplendirme	7
1.3.6.	Kemotaksonomi	7
1.4.	<i>Enterobacteriaceae</i>'nin Sınıflandırılması	7
1.4.1.	Enterobacteriaceae'nın yaygın cinsleri	8
1.4.1.1.	Citrobacter türleri	8
1.4.1.2.	Enterobacter türleri	8
1.4.1.3.	Erwinia türleri	8
1.4.1.4.	Escherichia türleri	8
1.4.1.5.	<i>Hafnia alvei</i>	9
1.4.1.6.	Klebsiella türleri	9
1.4.1.7.	<i>Morganella morganii</i>	9
1.4.1.8.	Pantoea türleri	9

1.4.1.9.	Proteus türleri	10
1.4.1.10.	Providencia türleri	10
1.4.1.11.	Rahnella türleri	10
1.4.1.12.	Salmonella türleri	10
1.4.1.13.	Serratia türleri	10
1.4.1.14.	Shigella türleri	11
1.4.1.15.	Yersinia türleri	11
1. 5.	Koliformların Sınıflandırılması	11
1.6.	<i>Escherichia coli</i> 'nin Sınıflandırılması	13
1.6.1.	Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>	13
1.6.2	Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>	13
1.6.3.	Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>	14
1.6.4.	Verositotoksinojenik <i>Escherichia coli</i>	14
1.6.5.	Enteroagregative <i>Escherichia coli</i>	16
1.6.6.	Diffuz aderent <i>Escherichia coli</i>	16
1.6.7.	Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>	16
1.6.8.	Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i>	16
1.7.	<i>Escherichia coli</i> 'nin Rutin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri	17
1.7.1.	En Muhtemel Sayı Yöntemi	17
1.7.2.	Katı Besiyeri Yöntemi	17
1.7.3.	Membran Filtrasyon Yöntemi	18
a.	Toplam Enterobacteriaceae'nın İzolasyonu	18
b.	Coli-aerogenes bakteriler izolasyonu	18
c.	Koliform bakteri izolasyonu	19
d.	Fekal koliform bakterilerin izolasyonu	19
e.	<i>Escherichia coli</i> izolasyonu	19
f.	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 nin izolasyonu	19
1.8.	<i>Escherichia coli</i> 'nin hızlı İdentifikasyon teknikleri	19
1.8.1.	Selektif besiyerlerine dayalı yöntemler	19
1.8.1.1.	LST-MUG yöntemi	19
1.8.1.2.	Kromojenik-fluorojenik substrat + MUG yöntemi	20

1.8.1.3.	API20E yöntemi	20
1.8.2.	Antikor-Antijen kompleksine dayalı yöntemler	21
1.8.2.1.	İmmunoblotting ve İmmunopresipitasyon metotları	21
1.8.2.2.	Radyoimmunoassay yöntemi	21
1.8.2.3.	immunofluoresan tekniği	22
1.8.3.	Enzime dayalı yöntem	22
1.8.3.1.	ELİSA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	22
1.8.4.	Gene Dayalı Analizler	22
1.8.4.1.	PCR (Polymerase Chain Reaction)	22
1.8.4.2.	Hibridizasyon yöntemi	23
2.	MATERYAL VE YÖNTEM	25
2.1.	MATERYAL	25
2.2.	YÖNTEM	26
2.2.1.	İzolatların saflık kontrollerinin yapılması ve stoklanması	26
2.2.2.	Gram Boyama	26
2.2.3.	Oksidaz testi	27
2.2.4.	Katalaz testi	27
2.2.5.	Glukozdan Asit ve gaz üretme yeteneği (37° C)	27
2.2.6.	İndol testi	27
2.2.7.	Sitrat testi	28
2.2.8.	Karbonhidrat kullanım testleri	28
3.	BULGULAR	30
3.1.	İndol negatif izolatlar	38
3.2.	Sitrat pozitif izolatlar	41
3.3.	Katalaz negatif izolatlar	43
3.4.	Maltoz negatif izolatlar	44
3.5.	Mannitol negatif izolatlar	45
3.6.	Trehaloz negatif izolatlar	45
3.7.	Salisin pozitif izolatlar	47
3.8.	Selobiyoz pozitif izolatlar	48
3.9.	Eskülin pozitif izolatlar	50

3.10.	Myoinozitol pozitif izolatlar	51
3. 11.	Adonitol pozitif izolatlar	53
3. 12.	Sorbitol negatif izolatlar	55
3.13.	Laktoz negatif izolatlar	57
3.14.	Glukoz negatif izolatlar	57
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ	58
5.	ÖZET	81
6.	SUMMARY	82
7.	KAYNAKLAR	83
8.	ÖZGEÇMİŞ	96

Simgeler ve Kısaltmalar		<u>Sayfa</u>
		<u>no</u>
α	Alfa	16
APHA	Amerikan Halk Sağlığı Kuruluğu	17
B	Beta	19
DAEC	Diffusively adherent <i>Escherichia coli</i>	16
EHEC/VTEC	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i> / Verositotoksin <i>Escherichia coli</i>	14
EIEC	Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>	14
EMB	Eosin Metilen Blue	19
EMS	En Muhtemel Sayı Yöntemi	17
EPEC	Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>	13
ETEC	Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>	13
FEEC	Fakültatif Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>	16
GUD	β-D Glukronidase	20
HUS	Hemolitik Üremik Sendrom	15
ISO	Uluslararası Standartlar Örgütü	17
MAR	Multiple antibiyotik resistans	69
μ	Mikron	7
NMEC	Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i>	16
SAM	Selobiyoz, Adonitol ve Myo-inozitol kombinasyonu	73
SMAC	Sorbitol MacConkey Agar	29
TSE	Türk standartlar enstitüsü	17
TSA	Triptik Soy Agar	17
UPEC	Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>	16
VL	Violet Red Bile Laktoz Agar	25
VRB, VG	Violet Red Bile Glukoz Agar	25

Şekiller dizini		<u>Sayfa</u>
		<u>no</u>
Şekil 1	Yaşamın siklusu	2
Şekil2	Evrensel Filojenik Ağaç	3

Tablolar Dizini		<u>Sayfa</u>
		<u>no</u>
Tablo 1.	Glukoz pozitif izolatlarla yapılan temel izolasyon testlerine göre gruplandırma	30
Tablo 2.	Tipik <i>Escherichia coli</i> izolatlarının 17 farklı şeker fermantasyonuna ait pozitif test sonuçları	33
Tablo 3.	Sorbitol negatif özellik gösteren <i>E. coli</i> izolatlarının fermantasyon sonuçları	34
Tablo 4.	<i>E. coli</i> izolatları içerisinde salisin, eskülin ve myo-inozitolinozitol testlerinde pozitif özellik gösteren izolatların fermantasyon yetenekleri	35
Tablo 5.	Toplam 126 suş içerisinde tipik <i>E. coli</i> olmamayı belirlemede (eliminasyonda) testlerin etkinliği	36
Tablo 6.	İndol negatif izolatların test sonuçları	39
Tablo 7.	Sitrat pozitif izolatların test sonuçları	41
Tablo 8.	Katalaz negatif izolatların test sonuçları	42
Tablo 9.	Maltoz negatif izolatların test sonuçları	43
Tablo 10.	Mannitol negatif izolatların test sonuçları	44
Tablo 11.	Trehaloz negatif izolatların test sonuçları	45
Tablo 12.	Salisin pozitif izolatların test sonuçları	46
Tablo 13.	Selobiyoz pozitif izolatların test sonuçları	48
Tablo 14.	Eskülin pozitif izolatların test sonuçları	49
Tablo 15.	Myoinozitol pozitif izolatların test sonuçları	51
Tablo 16.	Adonitol pozitif izolatların test sonuçları	53
Tablo 17.	Sorbitol negatif <i>E. coli</i> haricindeki sorbitol negatif izolatların test sonuçları	55
Tablo 18.	Laktoz negatif izolatların test sonuçları	56
Tablo 19.	Glukoz negatif izolatların test sonuçları	57

ÖNSÖZ

E. coli, gıda kaynaklı bakteriyel etkenlerin başlıcalarından bir tanesidir. Ayrıca bu tür, gıda ve su kaynaklarının dışkı kaynaklı kirlenmelerinin tespit edilmesinde indikatör olarak kabul edilen mikroorganizmaların başında gelmektedir. Bunun nedeni, bu türün dışkı kaynaklı bulaşmaya iyi bir indikatör olması ve kolayca üretilmesi, izole ve identifiye edilebilmesidir. Bununla birlikte bu türün farklı sınıflandırmalara tabi tutulduğu görülmektedir. Biyotipten ziyade serotip ve genotip analizleri ile yapılan sınıflandırma metotlarının, rutin izolasyon yapan analizler için yeterince kolay, hızlı ve ucuz olmadıkları bildirilmektedir. Oysa biyotip özellikleri bu avantajları daha kolay sağlar niteliktedir. Bazı biyotipik özellikler etkenin gıda veya klinik materyalden ilk izolasyonunu kolaylaştırmada kullanılmaktadır. Bu biyotipik özellikleri çıplak gözle görünür kılmak için besi yerlerine şekerler, boyalar, bazı kromojenik ve florojenik maddeler katılmaktadır. Bu suretle elde edilen çok sayıda besi yeri ve bu besi yerleri ile özdeş çok sayıda metot bildirilmiştir.

Günümüzde bu metotlar bir taraftan karşılaştırmalı olarak farklı kaynaklardan elde edilen suşlar da kullanılarak karşılaştırılırken diğer taraftan da daha iyi besi yeri ve metot arayışına yönelik gayretler devam etmektedir. Tüm bu gayretlerin değişmeyen kuralı daha güvenilir, hızlı, kolay ve ucuz yöntemler bulmaktır. Varılan noktada bilinen fenotipik özellikler ile veya mevcut besi yerlerinin kullanılması durumunda izole edilemeyen ve atipik olarak değerlendirilebilen suşların tespit edilmesi, metotların ve besi yerlerinin yeniden gözden geçirilme gereğini ortaya çıkarmıştır. Örneğin, laktoz negatif, indol negatif, sorbitol pozitif veya negatif patojen *E. coli* suşlarını bir tek metot kullanarak izole etmenin koşulu araştırıldığı zaman, mevcut otoritelerin onayladığı izolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin tekrar gözden geçirilme gereği ortaya çıkmaktadır. Katı besi yerinin selektifliği arttıkça tüm patojen *E. coli* suşlarının da tipik özellikte üremesinden feragat edilmiş olmaktadır. Mevcut metotlar ve besi yerleri genel olarak bir suşa karşı iyi çalışmakla birlikte diğer suşların yok sayılmasına ve çalışmayı dar kapsama sokmaya neden olmaktadır. Örneğin toksin, toksin geni veya diğer virulens genlerini belirlemek güvenilir olmakla birlikte yukarıda bildirilen olumsuzluklardan dolayı rutin hale gelememektedir. Geldiği durumda da çalışmayı daraltmaktadır.

Örneğin *E. coli* O157:H7, gıdalarda rutin olarak taranması gereken bir *E. coli* suşudur. Bu suş, sorbitol negatif, sefixim ve tellurit dirençli olup besi yerine de bu özellikler kazandırılarak izole edilmektedir. Daha sonra sıvı kültürde üretilerek serolojik olarak O157 ve ardından H7 fenotipi tespit edilmekte ve araştırma tamamlanmaktadır. Bu metotla bir tek suş, bu suşun sadece sorbitol negatif, sefixim ve tellurit dirençli alt suşları izole ve identifiye edilmiş olacaktır. Diğer varyantlar göz ardı edilecek, çalışılmış bir konuda en dar kapsamlı bilgi birikimi sağlanmış olacaktır. Oysa, ilk izolasyon besi yerinde tüm *E. coli* tipleri tipik üremeli, daha sonra ayırma, eliminasyon, doğrulama ve gruplandırma testlerine tabi tutularak, tüm elde edilen *E. coli* izolatlarının stoklanması, değerlendirilmesi daha derin bilgi birikimine ve daha ekonomik sonuçlar almaya katkı sağlayacaktır. Belki de bir veya birden çok bakteri hakkında biyotip, serotip ve genotip araştırma grupları ayrı ayrı kurulmalı ve ortak çalışmalar yapmalıdırlar. Bu çalışmada farklı kaynaklardan izole edilen *E. coli* izolatlarının 17 farklı şekeri kullanma özellikleri test edilmiş ve bu şekerlerin ilk izolasyonda veya bu aşamadan hemen sonraki ayırma, elimine etme ve gruplandırma faaliyetlerinde kullanılabilme olanakları araştırılmaya çalışıldı.

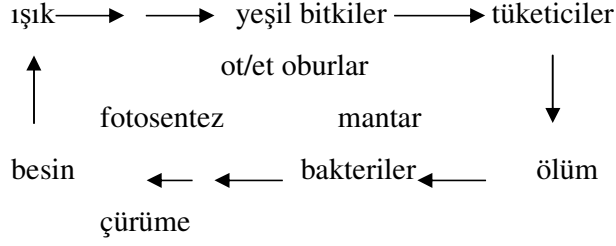
Çalışmada emeği geçenlere sırasıyla, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abamüslüm Güven, Danışmanım Doç. Dr. Murat Gülmez, Araştırma Görevlisi Dr. Berna Duman, Öğretim Üyeleri Yrd. Doç.Dr. Leyla Vatansever, Yrd. Doç. Dr. Nebahat Bilge Oral, Araştırma Görevlisi Dr. Çiğdem Sezer' e bilimsel katkılarından; Annem Tamam, babam Peker, ablam Fatma, eşim Engin, oğlum Umut ve kardeşlerim Züleyha, Divane, Doğan ve Ayşegül'e manevi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1. Mikroorganizmalar ve Sağlıkla İlişkisi

Mikroorganizmaların keşfinden önce, doğada var olan bütün canlıların hayvan ve bitki kaynaklı olduğu düşünülürdü. 1600'li yıllarda Antony van Leeuwenhoek tarafından mikroskobun bulunmasıyla, hayvan ve bitkilerin yanı sıra mikroskobik canlıların da var olduğu ortaya çıkmış, bu canlıların insanlarda hastalık yaptığı ortaya çıkınca önemleri artmış ve günümüzde bile hala üzerlerinde araştırma yapılmaya devam edilmiştir (14).

Mikroorganizmaların çoğunun, insan ve hayvan türlerinin yaşamı ve sağlığı üzerine etkileri vardır. Bakteriler, canlıların yaşam siklusunun temel elemanları arasında yer almaktadır. Her yerde bulunabilen bakteriler, çürüme olayında aktif rol oynamakta ve çürümeyi gerçekleştirerek yaşam için gerekli olan besinleri ayrıştırmaktadır. Bu ayrıştırıcılar tarafından parçalanan besinlerin ışık karşısında fotosentezi sonucu yeşil bitkiler oluşmakta ve temel olmayan üreticiler tüketici canlı elemanlar türemektedir. Çürüme olayı ile meydana gelen kimyasal maddeler toprağa karışır ve bunları topraktan alan bitkiler gelişir. Bitkileri ot/et oburlar, yani hayvan ve insanlar kullanarak yaşamlarını sürdürürler (Şekil 1). Bu süreci başlatan bakterilerdir. Bakteriler, bitkilerin fotosentez yoluyla havaya verdiği karbondioksiti serbest karbon haline çevirirler. Aynı zamanda atmosfere yılda 20 bin ton karbondioksit vererek tabii karbon siklusunu temin ederler. Bitki ve hayvanların ölü vücutlarındaki karbon ve azotu çürüme olayı ile serbest hale getirerek diğer canlılar tarafından kullanılmasını da sağlamaktadırlar. Organik maddelerin birbirine dönüşmelerini, örneğin hidrojen sülfidi okside ederek sülfüre çevirir ve yeşil bitkilerin kükürt kaynağını temin ederler. Yeşil algler dünyanın oksijenini sağlayarak yaşamın temel ihtiyacına büyük katkıda bulunurlar (88).



Şekil 1. Yaşamın siklusu

Mikropların canlılar üzerindeki ikinci etkileri insan ve hayvanların sağlıkları ile ilgilidir. İlk bakışta mikrop deyince insanlar korkar. Çünkü mikroplar insan, hayvan ve bitkilerde birçok salgın hastalık yaparak toplumun ekonomik düzenini bozduğu, harplere, göçlere, uygarlıkların yıkılışına, kıtlık ve sefaletlere neden olmaktadır. Bulaşıcı hastalıkların muhtelif asırlarda meydana getirdikleri korkunç ölüm rakamlarına bakılınca, bugün yeryüzünde insan ve hayvan nesillerinin nasıl olup da kalmış olduklarına hayret edilebilir. On dördüncü yüzyılda, Çin’de başlayarak Hindistan, İran, Kafkasya ve Türkiye üzerinden Avrupa’ya yayılmış olan veba salgınında 23 milyon insan ölmüş ve ağır hastalar ölmeden önce gömülmüştü. Veba salgınına Yahudilerin neden olduğu ve yaydığı sanılarak, halk Yahudileri kitle halinde öldürmeye başlamış, nihayet Papa V. Clemens bu katliamı zorlukla önleyebilmiştir. Yüzyıllar önce hastalık, tanrının insanlara verdiği bir ceza olarak nitelendirilmiş, bazı ülkelerde bulaşıcı hastalıkları bazı şahısların yaydığı sanılarak birçok masum insan feci şekilde öldürülmüş, sonuç olarak din adamı-doktor ilişkisi ortaya çıkmıştır. Dinler, bazı yiyecek ve içecekleri men ederek insanları temizliğe itmiş, mikroplarla meydana gelen hastalıklardan insanları korumaya çalışmıştır. Alkol yasaklanmış, sünnet geleneği konmuştur. Erkek çocukların sünnet olması ile cinsel bulaşan bazı hastalıklardan korunma sağlanmıştır. Domuz etinin bazı dinlerce yasaklanma nedeni, domuz eti yenildiği zaman insanlara geçen ‘trişin’ denilen hastalık yüzündendir. Fareden tikslenme, veba hastalığının korkunç oluşundandır. Cüzzamlı hastaların boyunlarına takılan çingirak, hastaların gelişlerini belli ederek, hastaliksız insanların uzaklaşmasıyla hastalıklardan korunma vasıtası olmuştur (88).

1.2.1. Prokaryotik mikroorganizmalar

Mikroorganizmaların tümü prokaryotikler içerisinde. Bunların hücre yapıları basittir ve tek bir kromozomdan oluşan çekirdek etrafında çekirdek zarı yoktur. Ayrıca sitoplazmada zarla çevrili organel bulunmaz.

1.2.1.1. Bakteriler: Mikroskopla incelendiğinde görülebilen, prokaryotik hücre yapısına sahip; yuvarlak (sferik) biçimli, çomak (silindirik) biçimli, sarmal (spiral) biçimli ve pleomorfik bakteriler olmak üzere morfolojik yapılarına göre 4 gruba ayrılan mikroorganizmalardır (14).

Bergey's Manual'e göre bakteriler 4 bölümde toplanmıştır. Bunlardan;

Gracillucutes bölümünde gram negatif mikroorganizmalara,

Firmicutes bölümünde gram pozitif mikroorganizmalara,

Tenericutes olarak adlandırılan bu bölümde, değişik yapıdaki mikroorganizmalara, (fototrofik, fotosentetik, tomurcuklananlar, kılıflı, monfotosentetik)

Mendosicutes bölümünde ise mantarlara yer verilmektedir (16).

Gracillucutes, Firmicutes ve Tenericutes bölümleri eubacteria grubu ve Mendosicutes bölümü ise archeobacteria grubu olarak tanımlanmaktadır.

Archaeobacteria grubunda bulunan bakterilerin yaşam koşulları diğer gruba göre farklılık gösterir. Şöyle ki bu grup bakterileri, tuzlu, asit oranı ve sıcaklık derecesi yüksek ortamları daha çok severler. Örneğin sıcak su kaplıcaları, tuz tabakaları, bataklık çamurları ya da sığır, koyun gibi ruminantların sindirim sistemlerinde yaşarlar (105).

1.2.1.2. Mavi-yeşil Algler: Prokaryotik hücre yapısı gösterdiği için alglerden ayrı olarak siyanobakteriler adı altında bakteriler içerisinde incelenmektedirler (105).

1.2.2. Ökaryotik mikroorganizmalar

Bütün bitki ve hayvanlar, funguslar, algler ve protozoonlar ökaryotik mikroorganizmalardır. Bunların temel ayırıcı özelliği kromozomal yapılarının bir zar sistemi ile sitoplazmadan ayrı olmasıdır (3).

Algler klorofil içerdiklerinden dolayı çoğunlukla yeşil renklidirler. Havadaki serbest azotu toprağa bağlayarak verimliliği artırırlar. Bunlar fotosentetik mikroorganizmalardır.

Protozoonlar tek hücreli, fotosentez yapmayan ökaryotik mikroorganizmalardır. Bir kısmı bakteri ve diğer mikroorganizmaları tüketerek doğadaki dengenin korunmasında rol alırlar (105).

Mantarlar da protozoonlar gibi klorofilli olmadıklarından fotosentez yapmazlar. Çok hücrelidirler, üreme tarzları ve yaşama döngüleri, nukleolus içermeleri, hücre içi organellerinin olması gibi özelliklere sahiptirler (14).

1.2.3. Virüsler

Genetik materyalleri (DNA, RNA) eşleyememelerinden dolayı bütün biyolojik sistemlerden ayrılarak prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin bulunduğu sınıfların içerisine girmezler. Bunlar aynı zamanda bağımsız bir metabolizma da içermezler. Enfekte ettikleri hücreler dışında metabolik faaliyet, hareketlilik ve çoğalma gibi özellikleri göstermezler. Virüslerde çoğalma konakçı hücreye tutunma, viral nükleik asit replikasyonu için gereken enzimlerin kullanılması ile transkripsiyonu, viral yapıların tespiti ve de salınım aşamalarını içermektedir (3).

1.3. Bakterilerin Sınıflandırılması

a. Doğal (Filojenik) Sınıflandırma: Bu sınıflandırmada, mikroorganizmaların birbirlerine çok benzeyenleri ve aynı kökenden gelenleri bir araya toplamak, ayrı karakterde olanları çıkarmak amaçlanmıştır. Benzerlik kavramı içine morfolojik, kültürel, fizyolojik, biyokimyasal, kimyasal, serolojik, patolojik ve benzeri özellikler de bulunmaktadır (14).

b. Nümerik Sınıflandırma: Fransız zoolog M. Adanson tarafından 1757'de yapılmış ve kendi adı ile anıldığı için Adansonian sınıflandırması da denilmiştir. Bu sistemde mikroorganizmaların benzeyen ve benzemeyen yönleri değerlendirilir. Böylece taksonomik uzaklık, ortak olan karakterlerin toplam karakterlere oranından hesaplanır. Bu yöntemde birçok fenotipik özelliklere (görülebilir ya da saptanabilen) ihtiyaç vardır. Benzer özellik gösterenlere pozitif, benzer özellik göstermeyenlere de negatif puan verilerek değerlendirmeleri yapılır. Benzerlik indeksi hesaplamaları % olarak yapılır ve S harfi ile simgelenir. Birbirine benzer durumlarda $S=100$, benzerliğin olmadığı durumlarda da $S=0$ olur. Böylece mikroorganizmaların sıralanmalarında 100 ile 0 arasında benzerlik indeksinden yararlanılır (14).

c. Genetik Sınıflandırma: Son zamanlarda, mikroorganizmaların birbirine benzerlikleri ya da ayrılıklarını tespit etmede, alışlagelmiş yüzeysel ve değişken benzerliklerinden daha çok, genetik materyalleri, özellikle DNA'ları, aralarındaki homojenlik durumlarına dayanan daha tutarlı bir sınıflandırmaya gidilmektedir. Bu şekildeki sınıflandırma bakterilerin nükleik asit analizlerini gerektirmekte ve bu işlem için de iki önemli yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan biri, DNA'ların baz sıralarının % olarak açılımını gösterir, diğeri ise mikroorganizmalar arasında $DNAX$ DNA ya da $DNAX$ RNA hibridizasyon oranlarını belirler.

d. Antijenik Sınıflandırma: Genetik sınıflandırma kadar genellenemeyen antijenik sınıflandırmada bazı bakteri familya veya cinslerini içeren ve bunların antijenik yapılarını esas alan analizlere dayanarak, tür içindeki sınıflandırmaya yardımcı olur. Genetik sınıflama kadar genelleme yapılamamasının nedeni ise, cins veya türler içerisinde çok fazla antijenik değişimler ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır. Mesela *S. pneumoniae*, kapsül yapısına göre 75'ten fazla antijenik tipe, *P. multocida* kapsuler polisakkaridlerine göre 4 antijenik tipe (A, B, C, D) ve *L. Monocytogenes* 8'den fazla serotipe ayrılmaktadır. Antijenik sınıflandırmada başlıca iki özellik dikkate alınmaktadır. Bunlardan birincisi yüzey antijenik moleküller (pilus, flagella, kapsül, hücre duvarı, mukoid tabaka), ve ikincisi de pütrifiye proteinlere karşı hazırlanmış antiserumlarla, çeşitli bakterilerden elde edilen homolog proteinler arasındaki yapısal benzerliklerin incelenmesidir (16).

e. Fajla Tiplendirme: Türler içi veya türler arası ilişkiyi tespit etmede yararlanılan bu sınıflandırmada aynı türe ait suşlar, kendilerine özgü fajlara göre gruplara ayrılabilirler. Ancak insan, sığır veya diğer hayvanlardan izole edilen etkenlerin aynı faj setleri ile reaksiyon vermedikleri, türlere özgü bazı spesifitelerin bulunması nedeniyle fajla sınıflandırma çok sınırlı kalmaktadır. Yeni izole edilen etkenlerin teşhisinde fajlardan da yararlanılmaktadır. Ancak, bazı fajların tür spesifiteleri çok sınırlıdır. Her yönü ile kesin teşhisi yapılan bir mikroorganizma, (*Aeromonas hydrophila* gibi) kendi türüne özgü fajlarla reaksiyon vermeyebilir. Bundan dolayı etkenin teşhisinde rolleri az olmakta veya tam yararlı olmamaktadır (14).

f. Kemotaksonomi: Bu sınıflandırmada bakterilerin kimyasal özellikleri esas alınır. Bakterilerde çok değişken olan yapısal özellikler nedeniyle genetik sınıflandırma kadar tutarlı değildir ve spesifitesi daha azdır. Bakterilerin kimyasal özellikleri genetik özellik gösterse dahi bunların yetiştiği ve ürediği besi yerinin kimyasal yapısı, osmotik basıncı, pH, vs. gibi çevresel koşullardan fazlasıyla etkilenmekte ve değişebilmektedir. İncelenebilen kimyasal özellikler arasında, başlıca hücre duvar bileşenleri, lipid bileşenleri, çeşitli proteinlerin amino asit sıraları ve türleri, enzimatik özellikleri, pillus ve flagella proteinlerinin bileşimi gibi özellikler vardır (14).

1.4. *Enterobacteriaceae*'nin Sınıflandırılması

Gram negatif, çubuk şeklinde 0,3-1x1-6 µm boyutunda peritrik flagellasından dolayı bazıları hareketli, endospor ya da mikrokist oluşturmayan mikroorganizmalardır. Hem oksijenli hem oksijensiz ortamda üreyebilirler. Peptonda iyi gelişirler, halofilik değildirler, D-glukoz ve diğer karbonhidratların fermentasyonu esnasında gaz ve asit oluştururlar. Bazı türleri 25-30°C' de daha iyi gelişse de çoğu türleri 37°C' de daha iyi gelişme gösterirler. *Shigella dysenteria* tip 1 hariç, oksidaz negatif ve katalaz pozitiflerdir. Dünya çapında yaygındırlar, toprakta, suda, bitkide ve hayvanda bulunabilirler.

1.4.1. Enterobacteriaceae'nin yaygın cinsleri

1.4.1.1. Citrobacter türleri

Suda ve gıdada çevresel kontaminasyonla yer alır. İnsan ve hayvanların dışkımasının normal florasında fırsatçı bir patojen olarak bulunur ve normal ortamlarda hızlı gelişirler (104). On bir türü olan Citrobacter'in 9 türü klinik materyallerden izole edilmiştir. Koloniler genellikle düzgün ve suludur fakat mukoid ve kaba suşları da mevcuttur. Citrobacter'in bazı suşları Salmonella polivalent antiserumunu aglutine ettiğinden biyokimyasal olarak Salmonella türlerine benzer ve bu da yanlış identifikasyona yol açar. Verisitoksijenik Citrobacter freundii'nin gıda kaynaklı gastroenteritislere ve hemorajik üremik sendroma neden olduğu bildirilmiştir (16).

1.4.1.2. Enterobacter türleri

Geniş çapta suda, toprakta ve bitki yüzeylerinde izole edilir. Barsak ve dışkıda bulunan fırsatçı patojen bir mikroorganizmadır (104). Sadece 8'i klinik materyallerden izole edilebilen 11 türü mevcuttur. Uygun agarda hızlı ürerler, glukozu gaz ve asit oluşturarak fermente ederler. Peritrik flagellalarından dolayı hareketlidirler, bazı suşları kapsüllerinde K antijeni taşırlar.

1.4.1.3. Erwinia türleri

Bitki patojeni oluşu için çoğunlukla fitomikrobiyolojistler ve fitopatolojistler tarafından çalışılmıştır. Bu sınıfla ilgili çalışma çok azdır. İnsanlardan ve hayvanlardan izolasyonu nadir bildirilmiştir (16). Erwinia, mısır, patates, elma ve diğer tahıl ürünlerinde yumuşak sünmeye neden olur (104).

1.4.1.4. Escherichia türleri

Sıcakkanlı hayvanlarda barsak kommensalidir. Önemli bir barsak patojenidir. Vücudun diğer bölgelerinde fırsatçı patojendir. Dördü insanlarda hastalık meydana getiren 6 türü vardır. En yaygın izole edileni Escherichia coli'dir. Escherichia coli spesifik hastalıklarla ilişkisi olan bir çok serotipe sahiptir(16). Birçok Escherichia coli suşu enterotoksin ya da diğer virulens faktörleri içerebilir. Bazı suşları K antijeni ile kapsüllenmiştir (104).

1.4.1.5. *Hafnia alvei*

Toprak, su, hayvan dışkısı ve süt ürünlerinde bulunur. Fırsatçı patojen bir mikroorganizmadır. *Hafnia* tek bir tür içerir o da *Hafnia alvei*'dir. Uygun ortamda hızlı bir şekilde gelişir ve genellikle hareketlidir. Hareketliliğinin 30°C'de 37°C' ye nazaran daha fazla olduğu söylenebilir (104).

1.4.1.6. *Klebsiella* türleri

Klebsiella cinsi adını 19. Asırın sonlarında yaşamış olan mikrobiyolog Edwin Klebs'ten almıştır. Toprak, su ve insan dışkısında bulunur. Meyve ve sebzelerde de bulunan bu mikroorganizmanın bazı türleri önemli fırsatçı patojendir (16). *Klebsiella* 5 tür ve 4 alt tür içerir. Özellikle *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella ozaenea*, *Klebsiella rhinoskleromatis* ve *Klebsiella aerogenes* olarak adlandırılan 4 tür günümüzde *Klebsiella pneumonia*'nın alt türü olarak sınıflandırılır. *Klebsiella pneumonia* *subspecies aerogenes* en çok izole edilen türdür. Hepsı uygun ortamda hızlı gelişir, hareketli değildir ve kapsüllüdürler. Fakültatif anaeropturlar ve en uygun üreme ısıları 37°C'dir. Ancak *K. pneumoniae* dışındaki suşlar 4-44°C'de ürerler. 55°C'de 30-45 dakikada yıkımlanırlar. *K. pneumoniae* suşlarının nişastayı en geç 4 gün içerisinde gaz oluşturarak parçalamaları diğer enterik bakterilerden kolaylıkla ayırt edilmesini sağlar (21).

1.4.1.7. *Morganella morganii*

Bu cins tek bir tür içerir, o da *Morganella morganii*'dir. Peritrik flagella ile hareketlidirler, fakat bazı suşlar 30°C'de flagella şekillendiremezler.

1.4.1.8. *Pantoea* türleri: Bitki patojenidir.

1.4.1.9. *Proteus* türleri

Toprakta, kirli sularda ve hayvan barsağında bulunan fırsatçı bir patojendir. Üçü hastalığa neden olan 4 türü vardır. Bütün suşları üreaz pozitif ve hareketlidir. Kanlı agar üzerinde zon veya film üreterek kümelenirler. Polimiksin B ve kolostine dirençlidir (16).

1.4.1.10.Providencia türleri

Providencia orijinal olarak proteus türlerine benzer. Fakat bunlar üreaz negatiftirler. İçlerinden 3'ü hastalık yapan 5 türü vardır. Hepsisi hareketlidir, fakat kümelenmezler. Polimiksin B ve kolostine dirençlidirler (16).

1.4.1.11.Rahnella türleri

Akuatik bir mikroorganizmadır fakat süt üretim tesislerinde de izole edilmiştir (16).

1.4.1.12.Salmonella türleri

İnsan, sıcakkanlı hayvanlar ve vücut ısısı ortama göre değişen hayvanların önemli bir patojenidir. Salmonella ve Arizona'nın serotipleri günümüzde 2 tür adı altında düşünülmektedir. Birincisi *Salmonella bongori* ikincisi *Salmonella enterica* dır. Bunlar altı alt türe ayrılır. 1-*Salmonella enterica*, 2-*Salmonella salamae*, 3a-*Salmonella arizonae*, 3b-*Salmonella diarizonae*, 4-*Salmonella houteane*, 6-*Salmonella indica*. Çoğu serotip hareketlidir. *Salmonella paratyphi* A hariç çoğu H₂S oluşturur (16).

1.4.1.13.Serratia türleri

Toprak, su ve bitki yüzeylerinde bulunur. İnsanların ve hayvanların fırsatçı patojenleridir. Özellikle sığırlarda mastitise neden olur. Serratia 10 tür (fakat sadece ikisi yaygın olarak klinik materyallerden izole edilmektedir) ve 2 alt tür içerir. En çok izole edilen 2 tür *Serratia liquaficiencia* ve *Serratia marcacescence*'tir. *Serratia marcacescence* 20°C'de kırmızı bir pigment üreterek gelişir. Türlerin çoğu hareketlidir. Bu sınıfın üyeleri karakteristik olarak lipaz, DNase ve jelatinase üretirler. Polimiksin B ve kolostin'e dirençlidirler.

1.4.1.14.Shigella türleri

İnsan ve diğer primatların barsak patojenleridir. *Shigella dysenteria*, *Shigella flexineri*, *Shigella boydy*, *Shigella sonnei* olarak 4 türü vardır. Özellikle *Shigella dysenteria* olmak üzere bütün Shigella türleri yüksek oranda infektiftir.

1.4.1.15. Yersinia türleri

Geniş çapta toprak, su, hayvan ve gıdalarda bulunur. Değişken olarak patojendir. Yersinia 11 tür içerir. Bütün türler uygun ortamda hızlı bir şekilde gelişirler. *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* ve *Yersinia pseudotuberculosis* insan ve hayvan patojenleri olarak bilinen türleridir. *Yersinia enterocolitica* insanlarda enteritise, *Y. pestis* vebaya, *Y. ruckeri* balıklarda hastalıklara neden olur (16). *Yersinia pestis* hızlı üremez fakat kanlı agarda 24 saat inkübasyondan sonra diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden daha küçük koloniler oluşturur. *Yersinia pestis* her zaman hareketsizdir. Diğer türler 37°C'de hareketsiz 30°C'de hareketlidirler (104).

1.5. Koliformların Sınıflandırılması

Enterobacteriaceae familyasında yer alan fakültatif anaerob, gram negatif, sporsuz, laktozdan asit ve gaz oluşturan çubuk şeklindeki mikroorganizmalardır. Citrobacter, Enterobacter, Escherichia ve Klebsiella bu grupta yer almaktadır.

Doğada koliform grubu mikroorganizmalara sıkça rastlamak mümkündür. Koliform grubu mikroorganizmaların hepsi dışkı kökenli değildir. İnsan ve sıcakkanlı hayvanların alt sindirim sistemlerinde gelişen grup, fekal koliform olarak tanımlanmakta ve bunların varlığı kesinlikle fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak gösterilmektedir. Bu grubun en yaygın üyesi *E. coli*'dir. Grubun diğer üyeleri toprak ve bitki kökenli saprofit koliformlardır.

İlk olarak Eijkman (36)'ın çalışmasında belirlenen fekal koliformlar toplam koliformların yüksek ısıda gelişen ve laktozu fermente eden ayrıca termotolerant olarak bilinen alt grubu olarak belirtildi. Fekal koliformların analizi su, kabuklu ve kabukluların elde edildiği suyun analizi hariç 45,5°C'de yapılır. Su, kabuklu ve kabuklu suyunun analizi ise 44,5°C'de yapılır (38). Fekal koliform grubunun çoğunluğu *E. coli*'den ibarettir. Fakat bu ısıda laktozu fermente edebilen Klebsiella gibi diğer enterikler de fekal koliform olarak belirtilmektedir (43).

1892 yılında Shardingier *E. coli*'nin fekal bir kontaminasyonun, bir indikatörü olduğunu ileri sürmüştür. Bunun nedeni, *E. coli*'nin yaygın bir şekilde insan ve hayvan dışkısında bulunması ve diğer yerlerde bulunmamasıdır. Üstelik *E. coli* glukozu fermente etme yeteneğinden dolayı kolay bir şekilde izole edilir, bundan dolayı bilinen diğer gastrointestinal patojenlerden daha kolay izole edilir. *E. coli*'nin

gıda ve suda bulunması fekal kontaminasyonun bir göstergesi olmasının yanı sıra bilinen diğer patojenlerin varlığını ortaya koyma ihtimalinin de göstergesidir. Sağlık risklerinin indirekt bir indikatörü olarak *E. coli*'nin kullanım konsepti güvenilir olsa da uygulama komplikedir. Çünkü ortamda laktozu fermente edebilen Enterobacter, Klebsiella ve Citrobacter gibi diğer enterik bakteriler fenotipik olarak *E. coli*'ye benzemektedir. Bu yüzden bunlar kolay bir şekilde belirlenemez. Bunun sonucunda koliform terimi bu grup enterik bakterileri içine alan bir terim olarak tanımlanmaktadır. Koliformlar taksonomik bir sınıflandırmaya sahip değildir fakat laktozu 35°C'de 48 saatte fermente ederek asit ve gaz oluşturan gram negatif, fakültatif anaerob, çubuk şeklindeki bakteriler grubunda yer alırlar (44). Koliformların izolasyonları düşük maliyetli ve kısa süreli olduğu için Salmonella ve Shigella gibi spesifik patojen mikroorganizmaların varlığını tespit etmede indikatör olarak kullanılmaktadırlar. Bu nedenle hiçbir gıda maddesinde, içme ve kullanma sularında, deniz ve göllerde *E. coli* ve fekal koliform bulunmasına izin verilmez. Fekal koliformlar 44,5 °C' de laktozu fermente ederek gaz oluştururlar (33). Koliformların bulunması su ya da gıda üretim yerlerinde sanitasyon kalitesinin bir indikatörü olarak kullanılır. Fekal koliformlar kabuklu ve kabuklunun elde edildiği su için standart indikatördür. *E. coli* ise fekal kontaminasyonun ya da hijyenik olmayan üretimin bir indikatörüdür(8).

Escherichia coli fekal bir kontaminasyonun göstergesi olması yanında genetik yapısı en iyi bilinen canlı olma özelliğine de sahiptir. Suşlarının bir çoğu zararsız olan bu bakterinin bazı suşları insanlarda arteriosklerozis, hemolitik üremik sendrom ve çeşitli immünolojik hastalıklar, menenjit, septisemi ve şiddetli ishaller gibi insan ve hayvanlarda ölüme sebebiyet veren enfeksiyonlara neden olmaktadır (33).

1.6.*Escherichia coli*'nin Sınıflandırılması

Escherichia coli, Alman pediatrist Theodor Escherich tarafından 1885 yılında identifiye edildi ve *Bacterium coli commune* olarak adlandırıldı (41). Barsak dışı enfeksiyonlarda patojenliği anlaşılmış ve 1919 yılında Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins adı önerilinceye kadar *Bacterium coli* adı kullanılmıştır

(21). *Escherichia coli*, normal barsak florasında zorunlu anaerob bakterilerden 100 kat daha az bulunmasına rağmen, rutin dışı kültürlerinde sıklıkla izole edilen bir bakteridir. Barsak dışı vücut bölgelerinde önemli bir fırsatçı patojendir. 1960'lı yıllardan beri bazı *E. coli* kökenlerinin barsakta patojen olduklarına ilişkin bilgiler artmaya başlamıştır (40). *E. coli*'nin barsaklarda oluşturdukları infektifite mekanizmalarına çeşitli isimler verilmiştir. Bunlar;

Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC): Bu suşlar bir ya da daha çok verosittoksin üretirler. İshaller sulu ve kanlıdır. Gelişmiş ülkelerde infantil diyarelerin sebebidir. Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC) salgını kontamine bazı et ürünlerinin yanı sıra kontamine içme suyunun tüketimi ile ilgilidir. Yetişkin insanlarda EPEC'in infektif dozu 10^6 organizmadır. EPEC' in patojenitesi bağlayıcı ve yok edici lezyonlara neden olan intimin proteinini içerir (57). Fakat bakterinin barsak hücrelerine yapışıp lokalize olmasını sağlayan EPEC adherens faktör olarak bilinen plazmid-encoded proteinini de içerir. Hastalık sırasında ateş yüksektir, Shiga benzeri toksinleri yüksek seviyelerde üretmezler (44). Serovarları O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142, O158'dir (16).

Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC): Genellikle düşük bir ateşe neden olabilirler ya da ateş görülmez. Sulu bir ishale neden olurlar ve tipik gastroenteritis etmenidirler. Turist ishali olarak tanımlanan hastalıklara ve özellikle sıcak mevsimlerde bebek ishallerine neden olurlar. Infektif dozları yüksektir. Yetişkin insanlarda doz en azından 10^8 hücre olarak belirlenmiştir. Fakat gençler, yaşlılar ve hastalar daha düşük hücre seviyesinde hastalığa duyarlı olabilirler. Infektif dozu yüksek olduğundan dolayı Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC)'nin analizi gıdalarda yüksek seviyelerde *E. coli* bulunmadıkça yapılamaz. ETEC belirlenirse kontamine gıdaların potansiyel tehlikesinin de göz önünde bulundurulması gerekir (33). Kolonizasyon faktörü ajanlara sahiptir. Hem ısıya duyarlı (LT, 86 kDa) hem de ısıya dirençli ve 30 dakika kaynatmaya dirençli toksin (ST, 4kDa) üretirler. Ayrıca kolera toksini (CT) de üretirler (44).

Serovarları, O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O73, O78, O80, O85, O114, O115, O128ac, O139, O148, O149, O153, O159, O166, O167, O169'dur (16).

Enteroinvaziv *Escherichia coli* (EIEC): Enteroinvaziv *E. coli* suşları genellikle laktoz negatif ya da laktozu geç fermente eden, lizini dekarboksilize etmeyen, anaerojenik, hareketsiz olma gibi atipik özellikler taşıyan mikroorganizmalardır. Diğer enterovirulent tiplerden farklı olarak, invaziv özellik taşırlar ve fekal lökositlere rastlanır. Mukoid ve kanlı bir dışkı görülür. Ateş yüksektir, enterotoksin yapmazlar. Bu gruba giren bakterilerde enfektif doz düşüktür (32). Enteroinvaziv *Escherichia coli* ve *Shigella* genetik olarak neredeyse aynıdır ve yaygın olarak birçok antijene sahiptir. *Shigella*, 10 ile birkaç yüz hücre oranında infektif doza sahip iken Enteroinvaziv *Escherichia coli* (EIEC)'nin sağlıklı yetişkinlerde enfeksiyon meydana getirmesi için en az 10^6 organizmaya ihtiyacı vardır. Tipik *E. coli*'nin aksine EIEC hareketsiz, lizini dekarboksilize etmeyen, anaerojenik, laktozu fermente etmeyen mikroorganizmalardır. EIEC'in patojenitesi temel olarak kolonik dokulara invaze olması ve onları tahrip etmesine dayanır (44). Bergey's Manuel'de *E. coli*'nin ve *Shigella*'nın 4 türünün DNA tabanında incelendiğinde tek türü oluşturduğu belirtilmiştir. *Shigella* metabolik olarak *E. coli*'nin inaktif biogrubudur. Enteroinvaziv *E. coli*'nin patojenitesi temel olarak kolonik dokulara invaze olması ve onları tahrip etmesine dayanır (16).

Enteroinvaziv *E. coli*'nin serovarları, O28ac, O29, O112, O124 (*Shigella dysenteriae* 3 ile aynı), O136, O143 (*Shigella boydii* 8 ile aynı), O144, O152 (*Shigella dysenteriae* 12 ile aynı), O164 ve O167'dir (16).

Verositotoksinojenik *Escherichia coli* (VTEC): Verositotoksin *Escherichia coli* ya da Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) vero hücrelerine karşı (vero hücreleri: Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü) sitotoksin üreten *E. coli* suşlarıdır. EHEC suşları çeşitli toksinler oluştururlar ve bunlardan sadece bir kaç tanımlanabilmiştir. EHEC, hemorajik kolitis ya da potansiyel olarak ölümcül olan hemolitik üremik sendrom (HUS)'a yol açabilen kanlı diyareye neden olur. İlk kez 1955 yılında tanımlanmış olan hemolitik üremik sendrom (HUS), en fazla ölüme neden olan hastalıktır. Sulu ve çok kanlı bir dışkı görülür ancak ateş yoktur. EHEC verotoksin ya da Shiga toksin üretimi ile belirgindir. 1982 yılında O'Brien ve arkadaşlarının bu verotoksin ile *Shigella dysenteriae* tip 1'in şigatoksini arasındaki yakın ilişkiyi göstermesiyle, bu mikroorganizma literatürde *Shigella* benzeri toksin üreten *E. coli*

(STEC) olarak adlandırılmıştır (84). Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) suşları kanlı ishal ve hemolitik üremik sendroma yol açmaktadırlar. EHEC suşları lizojen bir bakteriyofaj tarafından kodlanan, vero hücrelerine toksik etki gösteren, protein sentezini inhibe eden Shiga-toksin benzeri verotoksin salgılamaktadırlar. Birçok Şigatoksin üreten *E. coli* serotipi vardır. Bilinen tek bir EHEC serotipi vardır O157:H7 (63, 39).

EHEC, abdominal kramplarla birlikte, hafif sulu ishalden ağır seyreden kanlı ishale kadar değişebilen çeşitli klinik tablolara neden olabilir. Dışkıda inflamatuvar hücre genellikle yoktur ama çok şiddetli olgularda antibiyotiğe bağlı kolit ile karıştırılabilir. Hemorajik kolitin en önemli özelliği hemolitik üremik sendrom gibi morbidite ve mortalitesinin yüksek olmasıdır. EHEC daha çok yaşlı bakımevlerinde ve çocuk yuvalarında salgınlara neden olur. EHEC serotip O157:H7 suşu ise Kuzey Amerika ve Avrupa'da sık görülen salgınlara neden olmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde tüm ishal olgularının %0,8-3'ünden, kanlı ishallerin %15-36'sından bu bakteri sorumludur. Ülkemizde yapılan çalışmalar *E. coli* O157:H7 suşunun çok sık rastlanılan bir etken olmadığını düşündürmektedir (40).

Hemolitik kolitise neden olan EHEC prototipi O157:H7 dünya çapında en sık karşılaşılan hastalık sebebidir (44). *Escherichia coli* O157:H7' nin infeksiyöz dozu 10–100 hücredir. EHEC infeksiyonu çoğunlukla gıda ve su kaynaklıdır(10). Ayrıca pişmemiş sığır eti (50), çiğ süt (98), soğuk sandviçler (64), pastörize edilmemiş elma suyu (11), ve sebzeler (29) infeksiyona kaynak teşkil eder. *E. coli* O157:H7 nin fenotipik olarak *E. coli*'den ayrımı sorbitolu çok az ya da hiç fermente etmemesi, glukuronidase aktivitesine sahip olmaması ile yapılıdır (81). Kesin tanı antiserumla konur (40). Bu uygulamalar sıklıkla bu patojeni gıdalardan izole etmede kullanılır (51).

Enteroagregatif *Escherichia coli* (EaggEC: EAEC): Bu suşlar hayvanlarda epidemiyolojik çalışmalardan sonra ortaya çıkmıştır. Tropik ülkelerde, çocuklarda süreklilik gösteren ishale ve ayrıca her yaşta akut diyareye neden olan bir virotipdir (54). Enteroagregatif *E. coli* mikroskop altında tuğla yığını görüntüsü veren, otoaglutinasyona yol açan birbirine yapışık bakterilerdir (22). Bu organizmanın serolojik karakterleri ve neden olduğu klinik hastalıklar henüz tam olarak tespit edilememiştir (16).

Difuz Aderent *Escherichia coli* (DAEC): Enteroagregatif *E. coli*'den daha az karakterize edilmiştir (16). Daha önceden EPEC grubunda yer alan ve Hep-2 hücre modeline göre difüz adezyon ile karakterize edilen bu grup Diffusively adherent *Escherichia coli* (DAEC) olarak adlandırılmıştır. Çocuklarda süreklilik gösteren diyareye neden oldukları bildirilmiştir (54).

Barsak dışında oluşturdukları enfeksiyonlar ise;

Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC): Sistitis ve pyelonefritise sebebiyet veren bu suşlar sıklıkla hastalardan izole edilmiştir (12). Birçok virulens faktör taşıdığı ve bu virulens faktörlerden en önemlisinin P fimbria olduğu, bunun P grubu kan antijenlerine bağlandığı ve bu antijenin üroepitelyanın %99'unda bulunduğu, aerobaktin ile α -hemolizin salgıladığı bildirilmiştir (21).

Neonatal Meningitis *Escherichia coli* (NMEC): *Escherichia coli*'lerin %80'i yeni doğanlarda meningitis yapmaktadır. Meningitise neden olan ve %80 kadarı da Niesseria meningitidis antijenine benzer K1 kapsül antijeni içeren bu etkenlere daha çok anne dışkısında rastlanılmaktadır (12). Ayrıca azda olsa yaşlılarda da menenjitte sebep olurlar ve mortalitesi yüksektir (40).

Bu grupların dışında fakültatif enteropatojenik *Escherichia coli* (FEEC), önceleri shiga benzeri toksin oluşturanlar (shiga like toxin; SLTEC) olarak adlandırılmış olmakla beraber, son zamanlarda doğrudan shiga toksin (Stx; çoğul formda Stxs) oluşturanlar (STEC) şeklinde tanımlanmış olması (90), diyare oluşturanlar (DEC) (78) gibi grupların başka gruplar ile de tarif edilebilmesi (109), kana yayılıp sepsis nedeni olmaları, travma ve apandisit sonrası peritonit yapmaları, septik artrit, endoftalmit, karaciğer apsesi, osteomyelit, prostat ile ilgili enfeksiyonlar, sinüzit ve diğer enfeksiyonlar ile diyareye neden olan *E. coli*'lerin enfeksiyon veya intoksikasyon etmeni olarak gruplandırılması (37) bu konudaki terminolojiyi zorlamaktadır (54).

1.7. *Escherichia coli*'nin Rutin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri

Herhangi bir gıda maddesinde *Escherichia coli*, total koliform ya da fekal koliformların izolasyonu ve sayılması için kullanılan metotlar, koliform grup

aranmasını kapsamakta (33) ve hemen hepsi laktozun fermentasyonuna dayanmaktadır (8).

1.7.1.En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi: Koliform grup bakteriler, fekal koliform grup bakteriler ve *E. coli* sayılmasında kullanılan bu yöntem varsayma, doğrulama, tamamlama fazından ibaret multibasamaklı istatistiksel bir metottur (8).

Türk Standartlar Enstitüsü (TSE), Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) ve American Public Health Association (APHA)'nin belirlediği uygun besiyerlerine numunelerin ekimleri yapılarak *E. coli*, koliform ve fekal koliform varlığı belirlenebilir (33).

1.7.2. Katı besiyeri yöntemi: Bu yöntemden izolasyon amaçlı sayım çalışmalarında yararlanır. Daha çok katı besiyeri olarak Violet Red Bile (VRB) Agar kullanılır(33). Koliformların katı besiyerinde izolasyonu için kullanılan VRB Agar neutral red içermektedir. Buda laktozu fermente eden kolonilerin pembe renkte üremesini sağlamaktadır (43).

VRB Agar dışında, Petrifilm VRB yöntemi de kullanılabilir. VRB Laktoz Agar besiyeri kullanımı tavsiye edilen bu yöntemde besiyeri katılaştırıcısı olarak agar yerine soğuk suda çözülebilen bir madde kullanılır ve kurutulduktan sonra üzeri plastik film ile kaplanmış halde kullanıma hazır olarak sunulmaktadır.

E. coli sayımında Triptik Soy Agar (TSA) besiyeri de kullanılmakta ve dökme plak yöntemi ile hazırlanan petriyerler 35°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra, besiyeri üzeri ikinci katman olarak VRB Agar ile kaplanıp 44.5°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmaktadır.

Koliform grup bakteri aranmasında kullanılan diğer katı besiyerleri ise; Enrichment Lauryl Sulphate Aniline Blue Agar, Fecal Coliform Agar, Brilliant Gren Agar Endo Agar ve benzerleridir (33).

1.7.3. Membran filtrasyon yöntemi: Su ve diğer sıvı gıdaların analizinde kullanılan bir yöntemdir (43). Koliform ve fekal koliformların laktozun fermentasyonuna bağlı olarak oluşturdukları aldehitin ölçümüne dayanmaktadır (33). Örnek, membran filtreden geçirilerek bakterilerin filtre üzerinde tutulması

amaçlanmıştır. Bu filtreler daha sonra uygun bir besiyeri üzerine arada hava kalmayacak şekilde yerleştirilerek oluşan koloni sayısına bakarak materyaldeki mikroorganizma sayısı belirlenir. Örnekte az sayıda mikroorganizmanın bulunması halinde bu yöntemle belirlenmesi ve inkübasyondan sonra filtrelerin tekrar kullanılabilmesi, filtrasyon tekniğinin önemini ve avantajını vurgulamaktadır. Bu yöntemle göre, fekal koliform sayımında filtre TSA besiyerine yerleştirildikten sonra katı gıdalar için 25°C’de 4–5 saat, diğer gıdalar için 35°C’de 4–5 saat inkübe edilerek dejenere olmuş, stres altındaki bakterilerin tekrar aktivite kazanmalarını sağlayarak ön inkübasyon uygulanmaktadır. Daha sonra filtreler buradan m-FC Agar besiyerine alınır ve 44.5°C’de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda bir ya da daha fazla mavi renkli koloni gelişimi görülen alanlar işaretlenerek sonuç değerlendirilir.

Tamponlanmış Tripton Bile Agar, m-ENDO Agar, besiyeri emdirilmiş steril pedler, membran Tergitol–7 kullanılan diğer besiyerleridir.

Türk Standartlar Enstitüsü(TSE), Amerikan Halk Sağlığı Kuruluşu(APHA) ve Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) koliform ve *E. coli* için kullanılan standart analiz yöntemlerini belirlemişlerdir.

Türk Standartlar Enstitüsü (TSE) ve Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO)’nün koliform grup mikroorganizma aramak için kullanılan standart analiz yöntemlerine göre, örnek hazırlanıp dilusyonları yapıldıktan sonra 5 dilusyondan 3’er adet Lauryl Sulfat Triptoz Broth besiyerine 1’er ml ekim yapılır ve 37⁰ C’de 24–48 saat inkübe edildikten sonra pozitif sonuç veren tüpler muhtemel koliform olarak değerlendirilir.

TS 6063/ISO 7251’e göre *E. coli* aranmasında analize koliform grupta olduğu gibi örnek hazırlanarak dilusyonlarından sonra 5 dilusyondan 3’ er adet LST besiyerine 1 ml ekim yapılır ve 37⁰ C’de 24-48 saat inkübasyon işleminden sonra pozitif sonuç veren tüpler su banyosunda 44.5⁰C’de tutulan *E. coli* (EC) Broth besiyerine ekim yapılmakta ve gaz oluşumu için yine 44.5⁰C’de 24-48 saat inkübe edilmektedir. Gaz oluşumu gözlenen tüpler fekal koliform olarak değerlendirilmektedir.

Amerikan Halk Sağlığı Kuruluşu tarafından özellikle suların mikrobiyolojik analizinde kullanılmak üzere önerilen Amerikan Standartları metoduna göre koliform grup/fekal koliform/*E. coli* aranmasında %0,5 Laktoz Broth kullanılmaktadır. Bu yöntemle göre; her biri 20 ml Laktoz Broth besiyeri içeren 15 adet tüpe 5x10 ml, 5x1 ml ve 5x0.1 ml olacak şekilde ekim yapılmakta ve tüpler 35⁰C’ de 24–48 saat

inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonunda gaz oluşturan bu tüplerden EMB agara sürme yapılmakta ve 35⁰C' de 24 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Eğer bu besiyerinde tipik *E. coli* kolonileri oluşmuş ise tamamlama testi yapılmakta, oluşmamış ise teste burada son verilmektedir (33).

Rutin izolasyon ve identifikasyon yöntemleri özetlenecek olursa;

a) Toplam Enterobacteriaceae'nın İzolasyonu: Safra varlığında bu grup bakteriler glukozdan asit oluşturarak gelişir. Violet Bile Glucose Agar bu amaçla kullanılan bir besiyeridir.

b) Coli-aerogenes bakteriler izolasyonu: Safra ya da benzer selektif ajanların varlığında 30° C'de laktozdan asit ve gaz oluştururlar.

c) Koliform bakteri izolasyonu: Safra ya da diğer benzer selektif ajanlar varlığında 35–37°C' de laktozdan asit ve gaz üreterek gelişirler.

d) Fekal koliform bakterilerin izolasyonu: Safra ya da diğer benzer selektif ajanların varlığında 44–45.5°C' de laktozdan asit ve gaz üreterek gelişirler. Burada ısı kritik nokta olarak belirlendiğinden bu test daima ısı banyosunda yapılmalıdır.

e) *Escherichia coli* izolasyonu: 44–45,5°C' de laktozdan asit ve gaz oluşturan koloniler İndol pozitif, Metil red pozitif, Voges proskauer negatif, Sitrat negatif (IMVİC) testleri uygulandıktan sonra *E. coli* tip1 olarak değerlendirilir. Fakat şunu belirtmek gerekir ki verositotoksijenik *E. coli* O157:H7, 44°C' de çok zayıf bir şekilde gelişir. Buna ilaveten çoğu taksonomist Shigella'nın (Enteroinvaziv *E. coli*'nin bazı serovarları ile benzer özelliklerinden dolayı), *Escherichia* sınıfından ayırt edilmesinin imkânsız olduğunu düşünürler (56).

f) *Escherichia coli* O157:H7 (VTEC)' nin izolasyonu: İzolasyon %1 sorbitol içeren MacConkey (SMAC) Agarda yapılır. Bu besiyeri sefiksim ve potasyum tellurit eklenerek elde edilen besi yeri olan CT-SMAC agar daha fazla selektif edilebilir. Plaklar 37°C' de inkübe edilir. Renksiz koloniler analiz edilir (56).

1.8. *Escherichia coli*'nin hızlı İdentifikasyon teknikleri

1.8.1. Selektif besiyerlerine dayalı yöntemler

1.8.1.1. LST-MUG yöntemi: Son yıllarda *E. coli* belirlenmesinde kullanılan 4-methyleumbelliferyl (MUG), Lauryl Sulfate Tryptose (LST) besiyerine katılarak *E. coli*'nin yapısında bulunan β -D glucuronidase enzimi sayesinde 4-methyleumbelliferon'a dönüşür. 4-methyleumbelliferon 365 nm uzunluğundaki UV ışığına maruz kaldığında besiyerinde ya da koloni etrafında mavimsi floresan vererek koloninin tanımlanmasını kolaylaştırır. MUG başlıca LST ve VRB agar olmak üzere *E. coli*'nin izole edilebileceği bütün besiyerlerine rahatlıkla eklenebilir. Fakat *E. coli*'nin, Eosin Metilen Blue (EMB) agarda oluşturduğu yeşil floresan MUG'un oluşturduğu mavimsi floresanı baskılayabileceğinden, EMB agara MUG ilave edilmesi sahte negatif sonuçlara yol açabilir (35). *E. coli*, gaz üretmeyenleri dahil %95'i β -D glucuronidase enzimini üretir. *E. coli* O157:H7 β -D glucuronidase enzimini üretmez (42).

β -D glucuronidase *Enterobactereacea* familyasının diğer üyeleri tarafından nadir üretilir. Shigella %44–59, Salmonella %20–29 arasında β -D glucuronidase (GUD) üretir.(90). β -D glucuronidase üreten diğer *Enterobactereacea* familyası üyelerine indol testi uygulanarak elimine edilebilir. Çakır ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada MUG' la izole edilen *E. coli*'lerin indol testi ile doğrulanmasına gerek olmadığını belirtmiştir (32).

IMVIC testi ile yaklaşık 4–5 gün süren *E. coli* analizi besiyerine MUG ilavesi ile 24–48 saate düşürülebilmektedir. LST MUG metodunun AOAC tarafından *E. coli*'nin soğutulmuş ve dondurulmuş gıdalardaki analizi için uygun olduğu belirtilmiştir.

1.8.1.2. Kromojenik-fluorojenik substrat + MUG: *E. coli* aranması amacıyla en yaygın kullanılan besiyeri olan Lauryl sülfat MUGX-GAL (LMX) brotudur. Bu besiyerinin içeriğinde bulunan Kromojenik substrat (5-Bromo–4-kloro–3-indol- β -D galaktopiranozid), koliformlar tarafından parçalanmakta ve yeşil renk oluşmaktadır. Yine bu besiyeri içerisinde bulunan MUG, *E. coli* varlığında parçalanmakta ve mavi floresan vermekte ve bu analizin sonucu 18 saat içerisinde elde edilmektedir (93).

1.8.1.3. API20 E: API20 E test çubuğu, gram negatif enterik bakterilerin identifikasyonunda kullanılan 20 seçkin test kompartımanını içerir. Kompartımanların içerisinde bulunan maddeler dehidredir. Her bir kompartımanın içeriği bakteriyel süspansiyonla rehidre edilebilir. Bazı kompartımanlar pH değişimine bağlı olarak farklı renklere sahiptir. Diğer kompartımanlar üretilen son ürüne bağlı olarak reaktiflerle identifiye edilmek zorundadır (13).

1.8.2. Antikor-Antijen kompleksine dayalı yöntemler

1.8.2.1. İmmunoblotting ve İmmunopresipitasyon metotları

Bu metotların bilinen belirli antijen ya da antikorların seviyesini ölçmek için yararlı oldukları bildirilmektedir. Özellikle kompleks bir miks türden bilinmeyen antijenleri identifiye ve karakterize etmek için immunoblotting yararlı bir şekilde kullanılır.

İmmunoblotting'de kompleks karışım analitik separasyon jeli içerisinde çözündürülür, daha sonra moleküller spesifik antiserumlar vasıtası ile bireysel antijenlerin identifikasyonu için membranlara (blot) taşınır. Bazı durumlarda antijenler, jel separasyon ya da blotting prosedürü ile denatüre olurlar. Böylece epitopları yıkılır ve özel antijenlere bağlanamayabilirler. Bu durumlarda antijen ve antikor bağlanarak identifikasyonun yerine immunopresipitasyon gerekebilir. Bu teknikte, bilinen antikora karşı homolog antijenin varlığını belirlemek için, bir tüpteki antijenin üzerine antikor konularak iki sıvının temas yüzeyinde presipitasyonun oluşmasıdır. Antijen-antikor testi birkaç dakika içinde şekillenmesine rağmen presipitat çok yavaş meydana gelir ve çoğunlukla 1-2 gün içerisinde tamamlanır (99).

1.8.2.2. Radyoimmunoassay

Solid faz üzerindeki antijen-antikor kompleksine radyoizotop işaretli (genel olarak işaretleme iyot gibi gamma yazıcı izotoplarla yapılır) antijen bağlanması ile olur. İşaretli ajanlar, bağlanma bölgesinde antijenlerle ve doymuş antikorlarla bir konsantrasyonda karıştırılır(66). Daha sonra bilinmeyen konsantrasyonlarda işaretlenmemiş antijen artan miktarlarda eklenir. Antikor, işaretlenmiş antijenleri

işaretlenmemiş antijenlerden ayırt edemez ve iki tür, antijen-antikorun bağlanma bölgesine ulaşabilmek için yarışır. İşaretlenmemiş antijenlerin konsantrasyonları arttığı zaman çoğu işaretlenmiş antijen bağlanma bölgesinde işaretlenmemiş antijenlerle yer değiştirir. Solüsyon içerisinde serbest kalmış antijenlerin miktarları gamma-counter cihazı ile ölçülerek işaretlenmemiş antijenlerin konsantrasyonları belirlenebilir (66).

1.8.2.3. İmmunofluoresan tekniği

Hücre, doku bölümünde bağlı olan antikorlar floresan bir boya ile işaretlenerek antikor molekülleri görülebilir. İmmunofloresan olarak bilinen bu teknikte en yaygın kullanılan floresan boyalar, fluorescein ve rhodamine'dir. Her iki boya antikorun spesifitesini etkilemeksizin antikorun Fc bölgesi ile birleştirilebilir. Her iki boya bir dalga boyundaki ışığı absorbe eder ve daha uzun dalga boyunda ışık yayar. Yayılan ışık genellikle UV ışığı kaynağı ile desteklenen floresan mikroskopu ile görülür (66).

1.8.3. Enzime dayalı yöntem

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

1970'li yıllardan beri immunoassay performansına karşı standart olan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), ölçümde kullanılır. Belki de en yaygın kullanılan, en iyi anlaşılan immunoassay yöntemidir. ELISA birçok formatta geliştirilmiştir. Konakçı antikor üretimine cevabı ya da infeksiyon ajanındaki antijenleri belirleyebilir. Solid faz üzerinde antijenin bazı determinantlarına spesifik antikorların, diğer determinant gruplarına da enzim işaretli antikorların bağlanması ve substrat aracılığı ile enzim aktivite düzeyinin foto kolorimetre ile ölçülmesi prensibine dayanır (6).

1.8.4. Gene Dayalı Analizler

1.8.4.1. PCR (Polymerase Chain Reaction): Son yıllarda *E. coli*'nin belirlenmesinde sıkça karşılaşılan doğrulama analizleri gibi problemler gene dayalı belirleme metotları ile elimine edilmektedir (59). Gen prob teknolojisi sadece

belirlemeyi hızlandırmakla kalmaz aynı zamanda ek doğrulama testlerini de elimine eder. Hızlı gene dayalı metotlar arasında en iyi bilineni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. PCR yüksek derecede duyarlılık ve spesifite sağlar, ayrıca birkaç saat içerisinde sonuç verir. Son yıllarda *E. coli*'nin belirlenmesinde direkt DNA tabanlı metotlarının kullanımı dikkat çekmiştir.

β -D glukronidase (GUD) ile kodlanmış art arda dizili *uidA* geni ve glutamatdekarboksilaz (GAD) ile kodlanmış *gadA-B* geni en sık kullanılan probdur (73). *uidA* ve *gad A-B* genleri, çoğu *E. coli*'de belirlenmiştir (74). Çeşitli çalışmalar *Shigella* türleri *E. vulneris* ve *E. fergusonii* gibi en azından çok sayıda bakterinin *uidA* genotip analizinde sahte pozitif sonuç verdiğini göstermiştir (97). Buna ilaveten PCR hedef organizmada bulunan bütün DNA'ları tespit eder ve canlı hücreler ile canlı olmayan hücreler arasındaki farkı belirleyemez (70). Buda içilebilir suda su güvenliği ve suyun işlenmesi ile ilgili canlı ve ölü organizmalar arasındaki farkı belirtmede önemlidir (61).

Bazı araştırmacılar ribozomal RNA'nın canlı organizmanın belirlenmesi için kullanılabilirliğini göstermiştir (111). Fakat rRNA'nın canlı organizmalarda iyi bir indikatör olup olmadığı meçhuldür, çünkü uzun süre boyunca ölü hücrelerde takılı kalır (110). Bunun aksine yarı ömürleri sadece birkaç dakika olan çoğu mRNA türü hızlı bir şekilde canlı bakteri hücrelerini dolaşır (106). Bu kısmi olarak farklı ortamlarda çok stabil olan degradatif enzimin (RNase) etkisine bağlıdır. mRNA'nın belirlenmesi bu yüzden canlı hücrelerin ya da örnek hazırlanırken ölen hücrelerin iyi bir indikatörü olabilir (104).

1.8.4.2. Hibridizasyon yöntemi: Hücre kültürüne ait genetik materyallerdeki spesifik genlerin, işaretli problarla (bilinen parçası) ortaya konması ve sayısal olarak çoğaltılması esasına dayanır (66).

Bu çalışmadan önce yapılan kaynak taramasında farklı biyotiplere ait *E. coli* izolatlarının bilinen rutin izolasyon ve identifikasyon metotlarında kullanılan testlerde ortaya çıkardıkları, tipik reaksiyon yerine atipik reaksiyon göstermesine rağmen enfeksiyonlardan sorumlu tutulduğu ve bu konuda gün geçtikçe daha çok kaynak ortaya konduğu görüldü. Bu nedenle mevcut durumda kullanılan rutin izolasyon testlerinin giderek daha detaylı olarak irdeleneceği ve bu metotların

zamanla belki de köklü bir şekilde deęiőeęi tarafımızdan öngörüldü. Bu durumda farklı kaynaktan *E. coli* izolasyonu için farklı besiyerleri ile farklı metotların kullanılmasının ardından belki de her bir kaynağa göre farklı doğrulama ve tamamlama testleri önerilecektir. Bu bilgiler ışığında 4 farklı kaynağa ait *E. coli* ve Violet Red Bile Glucose Agar (VG, Oxoid, CM485) besiyerinde üreyen tipik glukoz pozitif ve atipik renksiz kolonilerin temel doğrulama testleri ile birlikte, 17 farklı şekeri kullanıp kullanamadıkları araştırılmaya çalışıldı. Böylece, örnekler ve kullanılan şekerler bakımından ortaya çıkan farklar ortaya konmaya, *E. coli* izolasyonunda ve identifikasyonunda kullanılabilircek şeker testlerinin veya kombinasyonlarının tespit edilmesi amacına ulaőılmaya çalışıldı.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada farklı gıdalar ve gıda kontaminasyonuna neden olabilecek bir kaynak olan dışkı örnekleri materyal olarak seçilerek bu materyallerin içerdiği koliformların fenotipik testlerle kaç gruba ayrılabilceği, örnekler arasında koliform profili bakımından benzerliklerin olup olmadığı, rutin fenotipik testlerle bu örneklerden fekal koliform ve *Escherichia coli* izolasyonu ve ön identifikasyonu yapılırken, kullanılan şeker testlerinin mevcut rutin işlemleri ne oranda kolaylaştırdığı araştırılmaya çalışıldı.

2.1. MATERYAL

Araştırmada, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülmekte olan çalışmalarda bıldırcın dışkısı, musluk suyu ve çiğ süt örneklerinden izole edilen şüpheli koliformlardan rast gele seçilen 200 adet izolat, analizler için kullanıldı. Aynı zamanda Kars ili satış yerlerinden steril poşetler içerisine alınarak laboratuvara getirilen, her biri 100–120 g ağırlığındaki tavuk kanat örneklerinden, steril svap ile Violet Red Bile Glucose Agar (VG, Oxoid CM485) yüzeyine yapılan ekim ve 37 °C’de 24 saat, aerobik koşullarda inkübasyon sonucunda her bir örneğe ait besiyeri üzerinde üreyen kırmızı renkli tipik kolonilerden 5’er adet ve atipik (glukoz negatif) gri kolonilerden 5’er adet olmak üzere, toplam 82 adet tipik ve 47 adet atipik koloni araştırmada kullanıldı.

Araştırmada toplam olarak 282 şüpheli koliform (tavuk kanadından izole edilen 82, sudan izole edilen 20, bıldırcın dışkısından izole edilen 50 ve çiğ süttten izole edilen 130 izolat) ve 47 adet koliform besiyerinde üreyen atipik koloni olmak üzere 329 adet izolat kullanıldı. Analizler için Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni Teknolojisi Ana Bilim Dalı içerisindeki laboratuvarlarda bulunan alet ve ekipmanlardan yararlanıldı.

Besi yeri olarak Violet Red Bile Glucose Agar ve Violet Red Bile Lactose Agar (Oxoid CM107) besiyerleri hem izolatların saflık kontrollerinde hem de glukoz ve laktozu kullanıp kullanmama testlerinde kullanıldı. Zenginleştirme ortamı olarak Nutrient broth (Oxoid CM1) ve stok ortamı olarak yatık Nutrient Agar (Oxoid, CM3)

kullanıldı. Karbonhidrat kullanımını belirlemede fenol red ve kristal viyole ilave edilmiş Nutrient Agar kullanıldı.

2.2.YÖNTEM

2.2.1. İzolatların saflık kontrollerinin yapılması ve stoklanması

Tüm koloniler Nutrient Broth içerisinde zenginleştirildi ve VG katı besiyerleri üzerine öze ile ekimleri yapılarak saflık kontrolü yapmak amacıyla, petriler 37 °C'de 18 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tipik kırmızı kolonilerin birinden öze ile VL katı besiyeri üzerine tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. Bu besiyeri de aynı koşullarda inkübe edildikten sonra her petriden seçilen bir kırmızı koloniden iki yatık Nutrient agar üzerine ekim yapıldı. Tüpler 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, tüplerden bir tanesi doğrudan +4 °C'de stok suş olarak kullanılırken, diğerleri ile diğer testler yapıldı. Toplam olarak kullanılan 329 adet izolatın her birine aşağıdaki testlerin her biri uygulandı.

2.2.2.Gram Boyama

Bir öze yardımcı ile alınan şüpheli koloniler lam üzerine aktarıldı ve lamın üzerine ince bir film tabakası şeklinde yayıldı. Havada iyice kuruduktan sonra bakterilerin lam üzerine tespiti (fiksasyon işlemi) için lamın alt yüzü üç kez Bunzen beki alevinden geçirildi. Gram boyamaya hazır hale gelen preparat üzerine kristal viyole boyasından damlatıldı ve 1 dakika bekledikten sonra iyot-lugol çözeltisi ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırıldı. Daha sonra preparata iyot-lugol çözeltisi damlatılarak 2 dakika daha bekledikten sonra distile su ile yıkayarak iyot-lugol çözeltisinden arındırmaya çalışıldı. Preparat üzerine %96'lık etil alkol damlatıldı ve 10–15 saniye beklendi. Distile su ile tekrar yıkandı, safranin damlatılarak 20–30 saniye beklendi. Distile su ile yıkanan preparatlar havada kurumaya bırakıldı ve immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelendi. Mikroskopta pembe-kırmızı renkli bakteriler Gram negatif, mor renkli bakteriler ise Gram pozitif olarak değerlendirildi (10).

2.2.3.Oksidaz

Şüpheli koloniler NA içerisine ekildi ve 35 °C’ de 24–48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üreyen koloniler kullanılarak oksidaz testi yapıldı.

1,4-tetrametil parafineldiamin dihidriklorit’in distile su içerisinde hazırlanmış %1’lik solüsyonunun emdirildiği ıslak kurutma kâğıtları kullanıldı. Kağıtlar üzerine kolonilerin birinden steril platin öze ile alınan bir miktar mikroorganizma nokta tarzında bulaştırıldı.30 sn içerisinde oluşan mavi renk oksidaz pozitif reaksiyon olarak kabul edildi.

2.2.4. Katalaz

Saf ve taze kültürlerden iğne uçlu öze ile bir koloni alındı, temiz bir lam üzerinde belirlenen alana yayıldı. Hidrojen peroksitin (H₂O₂, Merck 8597) %30’luk solüsyonundan bir damla lam üzerine konuldu ve yine öze ile solüsyon ve kültürün karışması sağlandı. Gaz kabarcıklarının görülmesi reaksiyon açısından pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.5. Glukozdan Asit ve gaz üretme yeteneği (37° C)

Her bir izolat, içerisinde Lauryl sulphate Tryptose (LST, Merck, 1,10266) ve Durham tüpleri bulunan deney tüplerine ekildi. Tüpler 37°C’ de 48 saat inkübe edildi. Asit ve gaz oluşumu gözlenen ve gözlenmeyen tüplerin test sonuçları kaydedildi.

2.2.6. İndol testi

Triptofanlı bir besiyeri olan Tryptone water (Oxoid, CM87) alınarak 121°C’de 15 dakika steril edildi. Sonra şüpheli kolonilerden iğne uçlu öze ile alınarak ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 0,3 ml Kovacks Ayıracı (Merck, 2–216) damlatıldı. Tüp çalkalanarak yaklaşık 10 dakika bekledikten sonra tüp yüzeyindeki koyu kırmızı renkte halka oluşumu pozitif, renk oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi. Böylece bakterilerin triptofanı enzimatik hidrolize uğratarak indol oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiş oldu.

2.2.7. Sitrat testi

Bu testte, bakterinin tek karbon kaynağı olan sitratı kullanıp kullanmadığı araştırıldı. Şüpheli kolonilerden yatık Simons'Sitrat Agar'a (Oxoid, CM155) öze ile yüzeye sürme şeklinde ekim yapıldı ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Çok fazla miktarda inokulum alınmamasına özen göstererek organik madde alınımı engellenmiş oldu. Yeşil renkli besiyerinde besiyerinin maviye dönüşmesi üremenin pozitif olduğunu gösterdi. Besiyeri renginin değişmemesi ve üreme olmaması negatif olarak kabul edildi.

2.2.8. Karbonhidrat kullanım testleri

Bir erlen içerisine 250 ml distile su ve toz madde olan Nutrient Agar'dan (NA, Oxoid CM67) 7 gram alındı. Nutrient Agar içerisine renk indikatörleri ilave edilerek karbonhidrat fermentasyon besiyeri hazırlandı ve bu besiyeri tüm şekerlerin test edilmesi amacı ile kullanıldı. Bu besiyerini hazırlamak için; Nutrient agar hazırlandı, otoklavdan önce fenol red ve kristal viyole boyalarının %2'lik solüsyonlarından besiyeri içerisinde her birinden %0,1 oranında olacak şekilde ilave edildi. Besi yeri otoklavlandıktan ve soğutulduktan sonra şekerlerden bir tanesi ilave edildi. Bu amaçla filtre ile sterilize edilen şekerlerin her birinin %10'luk solüsyonlarından besiyerinin otoklav işleminden sonra 60 °C'de her bir şeker ayrı ayrı olmak üzere %1 oranında ilave edildi. Besiyeri içerisine katılan şeker karıştırıldıktan sonra besiyeri petrilere bölündü ve katılaştıktan sonra şeker testlerinde kullanıldı. Böylece içerisinde bir şeker buluncak şekilde hazırlanan katı besi yerine tüm suşlar Gülmez ve Ark. (115)'nın Camguilhem ve Milon (60) tarafından bildirilen metodu modifiye ederek kullandıkları şekilde kullanıldı. Besiyeri petrisi alttan 20 eşit kare olacak şekilde çizildi. Her bir karenin ortasına halka uçlu öze ile VG besi yeri üzerinde üretilen izolattan alınıp orijinal koloni büyüklüğünde olacak şekilde 1-2 mm genişliğinde, yuvarlak bir alana koloniden alınan kısım gözle görülecek şekilde bolca ekim yapıldı. Petrilerin üzerindeki ekim yerlerinde 37 °C'de en geç 6 saat içerisinde görülen pembe veya kırmızı renk, test edilen izolatanın besiyeri içerisindeki şekeri kullanabildiğini gösterdi.

Araştırmada yukarıda saflık kontrolleri esnasında kullanılan glukoz ve laktoz besi yerleri haricinde tüm testlerde şeker kullanma besiyeri olarak renk maddeleri içeren

Nutrient Agar kullanıldı. Bu besi yeri içerisinde aşağıdaki şekerlerin her biri ayrı ayrı katıldı:

1. Sakaroz (saccharose, Merck, 1.07651)
2. Galaktoz (galactose, Merck, 1.04062)
3. Dulsitol (dulcitol, Fluka, 44590)
4. Ksiloz (ksiloz, Merck,1.08689.0100)
5. Ramnoz (rhamnose, Merck, 1.04736)
6. Glukoz (VG besi yeri içerisinde)
7. Laktoz (VL besi yeri içerisinde)
8. Maltoz (maltose, Merck,1.05912.0025)
9. Mannitol (mannitol, Merck,5982)
10. Trehaloz (trehalose, Sigma,T9531-5G)
11. Salisin (salicin, Fluka,84150)
12. Selobiyoz (cellobiose, Fluka,22150)
13. Eskülin (esculin, Fluka,02350)
14. Myo-inozitol (myo-inositol, Fluka 57570)
15. Adonitol (adonitol, Fluka 02240)
16. Sorbitol (sorbitol MacConkey Agar, SMAC Oxoid CM813B içerisinde)
17. Sorboz (sorbose, Fluka 85541)

3.BULGULAR

Yapılan bu çalışmada, 4 farklı kaynaktan VG besi yeri üzerinde üreyen ve glukozu fermente ederek pembe-kırmızı renk oluşturan kolonilerden, her örnekten 5 koloni olmak üzere seçilerek stoklanan toplam olarak 282 adet koloni kullanıldı. Katı besiyerinde 17 adet şekeri kullanıp kullanmadığı yanı sıra, Gram boyama, oksidaz, katalaz, indol ve sitrat testlerine tabi tutuldu. Ayrıca sadece kanat örneklerine ait olmak üzere her örnekten 5 adet, laktoz negatif olan gri renkli kolonilerden 47 adet seçildi ve yukarıda bildirilen testlere tabi tutuldu. Böylece toplam olarak 329 adet koloni izolat incelenmiş oldu. Bu iki gruba ait bulgular ayrı ayrı verildi. Glukoz negatif olan 47 adet izolata ait bulgular Tablo 19’da verildi.

Test edilen 329 adet izolatın hepsi Gram negatif ve oksidaz negatif özellik göstererek tipik *E. coli* oldukları yönünde bulgu verdi. Katalaz testi sonucuna göre kanat örneklerine ait olan 6 adet izolatın katalaz negatif özelliği gösterdiği, diğer 323 adet izolatın katalaz pozitif özellikte koliformlara dahil olabilecekleri anlaşıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Glukoz pozitif izolatlara yapılan temel izolasyon testlerine göre gruplandırma.

Örnek	Sayı	Gram negatif	Oksidaz negatif	Katalaz pozitif	Glukoz-gaz	Koliform	İndol pozitif	Sitrat negatif	Laktoz pozitif	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (%)	Diğer*
Dışkı	50	50	50	50	50	50	45	50	50	38	76	12
Su	20	20	20	20	20	20	16	20	20	16	80	4
Süt	130	130	130	130	130	130	91	87	130	49	38	81
Kanat	82	82	82	76	82	76	78	81	78	53	65	29
Toplam	282	282	282	274	282	276	230	238	278	156	-	126
%	100	100	100	97	100	97	82	84	99	55	55	45

* : *E.coli*’den diğer testlerle ayrılabilen suş sayısı

E. coli olarak tanımlanan 156 adet izolatın her biri 17 adet şekeri fermente edip etmeme özelliklerine göre değerlendirildi. Bu değerlendirmelerin sonucu tablolar halinde verildi. Amaç, tipik *E. coli* özelliği gösteren izolatların şekerleri fermente etme özelliklerine göre dağınık veya homojen gruplar oluşturma özelliklerini ortaya çıkarmak, atipik veya *E. coli* olmayan floranın da tipik *E. coli*

özelliğinden farklı şeker fermentasyonu özelliklerine sahip olup olmadıklarını tespit etmek ve tipik *E. coli* izolatlarının ilk izolasyon besiyerinde isabetli olarak seçilmesi ve hızlı identifikasyonunda kullanılacak şekerlerin tespit edilmesi amacıyla kullanılabilir nitelikte bulgulara ulaşmak idi.

İzole edilen 156 adet tipik *E. coli* izolatının 17 adet şekerin fermentasyonu bulgularına bakılarak 4 grupta toplanabileceği gözlemlendi. İlk grupta yer alan sakaroz, galaktoz, dulcitol ve ramnozdan oluşan 5 şekeri, izolatların farklı oranlarda fermente ettikleri gözlemlendi (Tablo 2). Bu şekerlere “değişken şekerler”, bunların oluşturduğu gruba ise “değişken şeker grubu” adı verildi. İzolatların bu şekerlerin her birini en az %30 ve en fazla %76 oranında fermente ettiği görüldü. İkinci grup şekerleri (glukoz, laktoz, mannitol, maltoz ve trehaloz), test edilen tipik *E. coli* izolatları en az %94 oranında fermente etti (Tablo 2). Bu grup şekerlere “pozitif şekerler”, bunların oluşturduğu gruba ise “pozitif şekerler grubu” adı verildi. Üçüncü grup şekerler ise tipik *E. coli* ’nin fermente edemediği şekerler olan salisin, sellobiyoz, eskülin, myoinozitol ve adonitolden ibaret olup, 156 izolatın sadece 11 tanesi bu şekerlerden her hangi birini fermente etti. Bu şekerlere “negatif şekerler”, bunların oluşturduğu gruba ise “negatif şeker grubu” adı verildi. Dördüncü grup içerisinde sorbitol ve sorboz yer almakta idi ve bu şekerler de değişken olmakla beraber bazı örneklerle ait izolatlarda mutlak pozitif veya mutlak negatif özellik gösterdikleri görüldü. Bu şekerlere de “ilave şekerler”, bunların oluşturduğu gruba ise “ilave şeker grubu” adı verildi. Değişken şekerlerin yer aldığı 1. Grup şekerlerin fermentasyon sonuçları dikkate alınarak izolatların biyotiplendirilmesinin, 2. Grup şekerlerin fermentasyon sonucuna bakarak her hangi bir katı besiyerinde tipik *E. coli* özelliği gösterebilecek kolonilerin seçiminde isabetli davranmanın, 3. Grup şekerlerin ise, selektif izolasyon veya ayırıcı besiyerlerinin bileşimine katılarak *E. coli* izolasyonunda işlemlerin kolaylaştırılabilmesinin mümkün olduğu sonucuna varıldı.

Tablo 2’de bildirilen 2. ve 3. Grup şekerlere ait net pozitiflik ve negatiflik özellikleri dikkate alınarak *E. coli* ’nin izolasyonu ve kesin identifikasyonunda bu özelliklerden faydalanma olanağı mümkün gözükmektedir. İkinci grup şekerleri fermente edebilen ve 3. Grup şekerleri fermente etmeyen izolatların tipik *E. coli* özellikleri gösterdiği tespit edildi. Birinci grup şekerlerde ise net pozitif veya negatif

fermantasyon tablosu ortaya çıkmadığı için bu şekerleri kullanarak *E. coli* izolasyonu veya hızlı identifikasyonu yapmanın mümkün olmadığı, ancak *E. coli*'nin biyotiplendirilmesinde veya biyotip-serotip-genotip arasındaki ilişkinin araştırılmasında kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Birinci grupta yer alan 5 şekerle ilave olarak, sorboz da benzer sonuçlar verdiği için benzer amaçlarla kullanılabilecek bir şeker olarak tespit edildi (Tablo 2). Dışkı ve su örneklerinde sorboz pozitif izolat elde edilemedi. Oysa süt örneklerinden izole edilen 49 izolatın 14 (%29)'ü ve kanat örneklerinden izole edilen 53 izolatın 13 (%25)'ünde sorboz fermentasyon testi pozitif bulunmuştur. Bu farkın gerçekten var olup olmadığına daha geniş kapsamlı araştırmalar ile ortaya konması gerektiği sonucuna varıldı. İkinci grup şekerlerin katıldığı bir besiyerinde fermentasyon özelliğinin tespit edilmesi ve 3. Grup şekerlerin katıldığı bir besiyerinde fermentasyonun gözlenmemesi, identifiye edilen izolatın tipik *E. coli* olduğunu doğrulayabilir nitelikte bir bulgu olarak değerlendirildi. Özellikle inkübasyonun 44.5-45.5 °C'de yapılması identifikasyonu daha da güçlendirecektir. Özellikle sellobiyoz ve adonitol şekerlerinin mutlak negatif sonuç vermeleri bu şekerlerin kullanılma olanaklarının daha isabetli olacağını gösteren bir bulgu olabilir (Tablo 2).

Sorbitol en az %91 oranında pozitif reaksiyon verdi ve toplam 156 izolat içerisinde sorbitol negatif izolat oranının %9 olduğu tespit edildi (Tablo 2). Şayet, *E. coli* O157:H7 gibi izolatların araştırılması söz konusu ise bu şekerin fermentasyonundan yararlanılabilir. Aksi takdirde *E. coli* izolasyonunda sorbitol testinin pozitiflik oranının 2. grup şekerlerden daha düşük olduğu ve pozitif reaksiyona dayalı tarama testlerinde 2. Grup şekerlerden sonra dikkate alınabileceği sonucuna varıldı.

Tablo 2. Tipik *Escherichia coli* izolatlarının 17 farklı şeker fermantasyonuna ait pozitif test sonuçları.

Örnek	İzolat sayısı	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****	
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz
Dışkı	38	2	28	28	29	22	38	38	38	38	38	-	-	1	-	-	38	-
Su	16	14	11	9	11	8	16	16	16	16	16	-	-	-	-	-	13	-
Süt	49	32	33	28	35	10	49	49	49	49	40	2	-	-	5	-	49	14
Kanat	53	28	43	19	45	7	53	53	50	51	53	-	-	3	-	-	50	13
Toplam	156	76	115	84	120	47	158	156	153	154	147	2	-	4	5	-	150	27
İzolatların fermantasyon yetenekleri (%).																		
Örnek	İzolat sayısı	Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz
Dışkı	38	5,3	74	74	76	58	100	100	100	100	100	-	-	2,6	-	-	100	-
Su	16	88	69	56	69	50	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-	81	-
Süt	49	65	67	57	71	20	100	100	100	100	82	4,1	-	-	10	-	100	29
Kanat	53	53	81	36	85	13	100	100	94	96	100	-	-	5,7	-	-	95	25
Toplam	156	48	73	53	76	30	100	100	98	99	94	1,3	-	2,5	3,2	-	94	17

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

İzole edilen 156 adet *E. coli* izolatından 6 tanesi (%3) sorbitol negatif özellik gösterdi (Tablo 3). Bu izolatların 2. Grup şekerleri fermente ettiği, 3. Grup şekerleri fermente edemediği tespit edildi. Bu izolatların sadece 1 tanesinin ramnoz pozitif, 1'er tanesinin ise sakkaroz ve ksiloz negatif özellik gösterdiği görüldü. Sorboz testinde tüm izolatlar negatif özellik gösterdi. Sorbitol negatif izolatların seçilmesi ve bunların tipik *E. coli* olup olmadıklarının tespitinde 3. Grup şekerler ile birlikte ramnoz ve sorbozun kullanılabilmesi üzerinde durulabilir. Ayrıca 1. Grup diğer şekerler sorbitol negatif izolatların biyotiplendirilmesinde kullanılabilir nitelikte olabilir.

Tablo 3. Sorbitol negatif özellik gösteren *E. coli* izolatlarının fermantasyon sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler ****	
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz
1	91	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	107	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	118	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	130	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	131	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	132	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Toplam		5	2	6	5	1	6	6	6	6	6	0	0	0	0	0	0	0

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulcitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myoinozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

Toplam olarak 156 adet tipik *E. coli* izolat arasından 10 tanesi 3. Grup şekerleri fermente etme yeteneği göstererek onlardan farklı özellik sergiledi (Tablo 4). Bu izolatlara ait fermantasyon sonuçları Tablo 4'te verilmiştir. Bu tablo incelendiğinde, selobiyoz ve adonitol sonuçlarının mutlak negatif olduğu, sadece 1 izolatın salisini fermente ettiği, 4 izolatın eskülini ve 5 izolatın ise myoinozitolü fermente ettiği görülmektedir. Ayrıca bu izolatların 9 tanesi sorbitol pozitif ve 1 tanesi sorbitol negatif özellik göstermiştir. Bu izolatların 1 tanesi hariç, tamamı ramnoz negatif özellik göstermiştir. Tipik *E. coli* seçiminde ve ileri identifikasyonlarda kullanılacak şekerler salisin, selobiyoz ve adonitol oldukları takdirde bir sorun olmayacak ve bu izolatlar da değerlendirme içerisine alınacaktır, oysa eskülin ve myoinozitolun negatif özellikleri üzerinde durulduğunda bu izolatların ihmal edileceği ortaya çıkmıştır. Negatif şekerleri içeren bir besiyeri kullanılması ve burada renksiz kolonilerin seçilmesi durumunda ramnoz ile birlikte salisin, selobiyoz ve adonitol şekerlerinden yararlanılması bu grup izolatların elde edilmesini sağlayacaktır. Bu izolatların 2. grup şekerlerde mutlak pozitif oldukları, 1. grup şekerlerin ise diğer tipik *E. coli* izolatlarında olduğu gibi değişken olduğu gözlenmiştir. Sorbitol negatiflik sadece 1 şuşta görülmüştür. Bu bulgular ışığında, sorbitol negatif özellikli tipik *E. coli* izolatlarının 3. Grup şekerlerde neredeyse mutlak negatif özellik ortaya

çıkarken (Tablo 3), 3. Grup şekerleri fermente eden tipik *E. coli* izolatlarında sorbitol pozitif özellik ortaya konmuştur (Tablo 4).

Tablo 4. *E. coli* izolatları içerisinde salisin, eskülin ve myo-inozitol testlerinde pozitif özellik gösteren izolatların fermantasyon yetenekleri.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****	
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz
1	73	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
2	92	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
3	111	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
4	162	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
5	218	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
6	256	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
7	257	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
8	265	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
9	281	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
10	319	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
Toplam		7	7	7	7	9	10	10	10	10	10	1	0	4	5	0	9	4

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulcitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

Toplam olarak test edilen 282 adet suştan 156 tanesi *E. coli* olarak tespit edildikten sonra geriye kalan 126 adet suşun *E. coli* olmadığı tespit edildi. Bu izolatların 17 farklı şekeri kullanması, indol, sitrat ve katalaz testlerinde *E. coli* özeliğine zıt özellik sergilemesi bakımından elde edilen sayısal değerler ve her bir test içerisinde bu değerlerin % oranları Tablo 5'te verilmiştir. Daha sonra her bir testin elimine ettiği suşların diğer testlerin her birindeki reaksiyonunu ortaya koyan tablolar Tablo 5'teki test dizilimine göre sıralanmıştır.

Tablo 5. Toplam 126 suş içerisinde tipik *E. coli* olmamayı belirlemede (eliminasyonda) testlerin etkinliği.

		1. Grup şekerler*						2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat Katalaz		
Atipik	Sayı	Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I-	Si+	K-	
İnd -	51	29	38	8	42	20	51	51	50	49	40	2	22	3	21	12	50	22	I	14	0	
%	40	57	75	16	82	39	100	100	98	96	78	4	43	6	41	24	98	43	I	27	0	
Sit +	43	37	35	17	37	16	43	43	43	42	26	2	24	4	25	14	43	24	15	S	0	
%	34	86	81	40	86	37	100	100	100	98	60	5	56	9	58	33	100	56	35	S	0	
Kat -	7	2	4	1	7	0	7	7	7	7	7	0	0	0	0	1	3	3	0	0	K	
%	6	29	57	14	100	0	100	100	100	100	100	0	0	0	0	14	43	43	0	0	K	
Mal -	23	9	12	12	16	12	23	23	Mal	22	22	0	2	0	1	0	19	3	0	0	0	
%	18	39	52	52	70	52	100	100	Mal	96	96	0	9	0	4	0	83	13	0	0	0	
Man -	6	0	5	0	5	1	6	5	4	Man	6	0	1	0	1	0	1	4	0	0	0	
%	5	0	83	0	83	17	100	83	67	Man	100	0	17	0	17	0	17	67	0	0	0	
Trel -	36	24	32	11	29	10	36	36	36	36	Tre	1	21	0	14	15	35	12	0	17	0	
%	29	67	89	31	81	28	100	100	100	100	Tre	3	58	0	39	42	97	33	0	47	0	
Sal +	9	6	8	4	7	2	9	8	9	9	7	Sal	6	1	2	1	8	4	0	2	0	
%	7	67	89	44	78	22	100	89	100	100	78	Sal	67	11	22	11	89	44	0	22	0	
Sel +	64	45	49	22	49	21	64	63	61	63	43	6	Sel	11	25	22	62	33	23	24	0	
%	51	70	77	34	77	33	100	98	95	98	67	9	Sel	17	39	34	97	52	36	38	0	
Esk +	17	7	11	5	16	10	17	17	17	17	17	1	11	Esk	3	3	14	5	3	4	0	
%	13	41	65	29	94	59	100	100	100	100	100	6	65	Esk	18	18	82	29	18	24	0	
Myo+	41	37	30	15	30	19	41	41	40	39	27	2	25	3	Myo	21	41	35	21	25	0	
%	33	90	73	37	73	46	100	100	98	95	66	5	61	7	Myo	51	100	85	51	61	0	
Ado +	41	30	36	16	33	14	41	41	41	40	26	2	22	3	21	Ado	37	23	12	14	1	
%	33	73	88	39	80	34	100	100	100	98	63	5	54	7	51	Ado	90	56	29	34	2	
Sorb -	17	3	12	12	15	3	17	16	13	12	16	1	2	2	0	4	Sor	6	1	0	4	
%	11	18	71	71	88	18	100	94	76	71	94	6	12	12	0	24	Sor	35	6	0	24	
Lak -	4	2	1	2	3	0	4	Lak	3	3	4	1	1	0	0	0	3	0	0	0	0	
%	3	50	25	50	75	0	100	Lak	75	75	100	25	25	0	0	0	75	0	0	0	0	
Glu - ^a	47	6	28	6	24	15	Glu	28	31	12	45	1	1	1	4	0	11	15	1	0	2	
%	100	13	60	13	51	32	Glu	60	66	26	96	2	2	2	9	0	23	32	2	0	4	

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulcitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

^aGlukoz negatif suşlar 126 adet suştan ayrı olarak kanat örneklerinden seçilerek testlere tabi tutulmuştur.

Tablo 5 incelendiğinde tipik *E. coli* suşlarının negatif olduğu salisin ve eskülin şekerlerinin eliminasyonda sırayla %7 ve % 13 oranında etkili olduğu ve düşük

seviyede eliminasyon sağladıkları görülmektedir. Oysa selobiyoz %51, myo-inozitol ve adonitol ise %33 oranında eliminasyon sağlayarak eliminasyonda daha başarılı olmuşlardır. Bu bulgular Tablo 11'in bulguları ile de teyit edilmiştir.

Glukoz pozitif olan suşlardan sadece 4 (%3) tanesi laktoz negatif bulunmuş olup bu iki testin test edilen suşlarda paralel seyrettiği gözlenmiştir. Başka bir deyişle laktoz testi ve glukoz testi zıt etkili olmadıkları için eliminasyonda etkili olmamışlardır. Bu yönden incelendiğinde tipik *E. coli*'nin pozitif reaksiyon verdiği laktoz, mannitol ve maltoz testlerinden daha ziyade 126 suşun 36 (%29) tanesini elimine eden trehaloz testi eliminasyonda daha başarılı görülmüştür.

Temel testlerden olan ve rutin olarak kullanılan indol, sitrat ve katalaz testlerinden sadece indol testi anlamlı düzeyde eliminasyon sağlamış ve 126 suşun 51 (%40) tanesini elimine etmiştir. Bu düzeyde eliminasyon bile, selobiyoz eliminasyon düzeyinin altında kalmıştır. Selobiyoz testinin indol testinden daha başarılı eliminasyon sağladığı ortaya çıkmıştır.

Tablo 5'te *E. coli* olmayan 126 adet izolat içerisinde her bir test tarafından elimine edilen suş sayısı ve bu sayı içerisinde diğer testlerin sonucuna göre tipik *E. coli* özelliği gösteren sayı ve % oranları verildi. Bu tablonun ilk sütunundaki dizilime bağlı kalınarak her bir testin elimine ettiği sayıdaki suşların her birinin diğer testlerde verdikleri sonuçlar tablolar halinde aşağıda verilmiştir

3.1. İndol negatif izolatlar

Tespit edilen toplam 51 adet indol negatif izolatın tamamı katalaz pozitif olarak tespit edildiği için katalaz testinin gerekli olmadığı sonucu bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Toplam 51 adet izolat arasından 14 izolat, sitrat pozitif özelliği göstererek *E. coli* olmadığını göstermiştir. Üçüncü Grup şekerlerden *E. coli*'nin mutlak negatif olduğu selobiyoz, myo-inozitol ve adonitol testlerinde sırasıyla 22, 21 ve 12 izolatın pozitif olduğu ve *E. coli*'den ayrıldığı görülmektedir. İkinci Grup şekerlerden sadece trehaloz önemli sayıda olmak üzere 11 adet izolatın negatif fermentasyon sonucuyla ayrılabilirdiği görülmüştür. Söz konusu 11 izolatın yukarıda bildirilen 3. Grup şekerler içerisindeki üç şekerden en az bir tanesi ile de elimine edildiği görülmüştür. Bu nedenle trehaloz testi ile 3. Grup şekerlerden veya bunlardan birinin birlikte kullanılmasının eliminasyonda etkili olmadığı tespit

edilmiştir. Buna benzer olarak 2. Grup şekerlerden maltozun da kullanılması sadece 2 adet izolatın daha eliminasyonunu sağlayacağı ve bu nedenle de kullanılmasının ekonomik olmayacağı ortaya çıkmaktadır. İndol negatif 51 izolat arasında 21 izolatın indol negatiflik hariç, tipik *E. coli* özelliği gösterdiği ortaya konmuştur. İkinci Grup şekerlerde pozitif ve 3. Grup şekerlerde negatif özellik sonucuna göre bu izolatlar tipik *E. coli* özelliği göstermiştir. Myo-inozitol pozitif özellik kullanıldığında sitrat testine gerek kalmadığı ortaya çıkmaktadır. İndol testi yapılacak ise, 3. Grup şeker testlerinden sonra yapılması daha ekonomik olabileceği bulgusu ortaya çıkmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. İndol negatif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	İ	Si	K
1	103	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
2	108	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
3	110	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
4	119	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
5	139	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
6	140	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
7	141	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
8	142	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
9	163	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
10	171	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
11	185	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
12	189	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
13	199	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
14	200	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
15	201	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
16	202	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
17	204	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
18	205	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
19	206	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
20	207	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
21	210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
22	214	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
23	216	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
24	217	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
25	219	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
26	248	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
27	250	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
28	252	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
29	255	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
30	258	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
31	259	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
32	270	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
33	292	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
34	293	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
35	294	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
36	295	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
37	296	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
38	297	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
39	298	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
40	299	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
41	300	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
42	305	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
43	306	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
44	307	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
45	308	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
46	309	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
47	310	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
48	311	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
49	312	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
50	313	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
51	314	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Toplam		29	38	8	42	20	51	51	50	49	40	2	22	3	21	12	50	22	0	14	51
%		57	75	16	82	20	100	100	98	96	78	4	43	6	41	24	98	43	0	27	100

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.2. Sitrat pozitif izolatlar

Toplam olarak 43 adet izolatın sitrat pozitif özelliği ile *E. coli* özelliği göstermediği, bu izolatların tamamının toplamı 130 adet olan süt kaynaklı izolatların arasında yer aldığı, diğer örneklerle ait izolatlar arasında sitrat pozitif izolata rastlanmadığı görüldü. Bu bulgu sitrat testinin sadece süt örneklerinde *E. coli* izole etmede etkili olacağını ortaya koymaktadır. Üçüncü Grup şekerler, sitrat pozitif izolatların eliminasyonunda önemli derecede etkili oldu. Myo-inozitol ile 25, selobiyoz ile 24 ve adonitol ile 14 izolat elimine edilebildi. Myo-inozitol, adonitol ve selobiyoz kombinasyonu toplam olarak 33 izolatu elimine etmektedir. Bu 3 şekerin kombine eliminasyonundan sonra sitrat pozitif olarak atipik reaksiyon gösteren 43 suştan geriye 10 adet izolat kalmaktadır. İkinci Grup şekerlerden mannitol 1 izolatu, trehaloz ise 17 izolatu elimine etmektedir. Glukoz, laktoz ve maltoz, pozitiflik bakımından tüm izolatların *E. coli* özelliği gösterdiği görüldü. Trehaloz pozitif özellik ile myo-inozitol negatif özellik birleştiğinde 25 artı 6 olmak üzere toplam 31 izolatu elimine edildiği görüldü (Tablo 7). Bu bulgular süt örneklerinde *E. coli* araştırılırken besi yerine laktoz yerine trehaloz ilave edilmesinin daha yararlı olacağına işaret etmektedir. Aynı zamanda sitrat testinin süt örneklerinden *E. coli* izolasyonunda önemli olduğu, tavuk eti, su ve kanatlı dışkısında önemli olmayabileceği bulgusu ortaya çıkmaktadır. Selektif besi yerine veya ayırıcı besi yerine selobiyoz, myo-inozitol veya trehalozdan birinin katılması tercihi, ekonomik açıdan önemli bir konu olarak ortaya çıkmıştır.

Tablo 7. Sitrat pozitif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat Katalaz		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	209	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
2	211	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
3	212	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
4	213	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
5	215	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
6	216	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	
7	217	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	
8	218	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
9	221	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	
10	222	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
11	223	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
12	230	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
13	233	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
14	237	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
15	238	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
16	239	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
17	240	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	
18	241	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
19	242	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
20	252	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	
21	254	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
22	257	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
23	258	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	
24	267	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
25	278	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
26	283	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
27	291	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
28	296	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	
29	297	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	
30	299	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	
31	301	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
32	302	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
33	303	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
34	308	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	
35	309	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	
36	310	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	
37	311	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	
38	312	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	
39	313	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
40	314	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
41	321	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
42	323	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	
43	324	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	
Toplam		37	35	17	37	16	43	43	43	42	26	2	24	4	25	14	43	24	28	43	43
%		86	81	40	86	37	100	100	100	98	60	5	56	9	58	33	100	56	65	100	100

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz;

Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-

inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.3. Katalaz negatif izolatlar

Toplam olarak 7 adet katalaz negatif izolat tespit edildi (Tablo 8). Bunların tamamı salisin, selobiyoz, eskülin, ramnoz ve sitrat negatif özellikleri ile birlikte trehaloz ve indol pozitif özellikleri ile tipik *E. coli* özelliği göstermiştir. Bir tanesi tipik *E. coli* özellikten sadece adonitol pozitif reaksiyonla ayrılmıştır. Bu izolatların hepsi kanat örneklerine aittir. İzolatların 4 tanesi sorbitol negatif özellik göstererek *E. coli* içerisindeki sorbitol negatiflik oranından yüksek bir değer olarak tespit edilmiştir. Katı besiyeri olan VL besiyerinden laktoz pozitif veya VG besiyerinden glukoz pozitif izolatların seçiminden sonra doğrulama deneylerinde katalaz testinin 282 izolattan sadece 7 tanesini elimine edeceği için diğer testler kadar yararlı olmayacağı bulgusu ortaya çıkmaktadır. Lakin kanat örneği haricinde diğer üç grup örnekten elde edilen koloniler arasında katalaz negatif izolat tespit edilememiştir. Bu bulgu aynı zamanda seçilecek doğrulama testlerinin incelenen örneğin tipine ve, veya ilk izolasyon besiyerine ve hatta metoda bağlı olarak seçilmesinin gerekliliğinin tartışılmasını gündeme getirmeye neden olabilir nitelikte bulunmuştur.

Tablo 8. Katalaz negatif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat Katalaz		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	15	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
2	46	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
3	52	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
4	53	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
5	54	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
6	55	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
7	121	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Toplam		2	4	1	7	0	7	7	7	7	7	0	0	0	0	1	3	3	7	0	0

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.4. Maltoz negatif izolatlar

Maltoz negatif izolatların 15 tanesi kanat ve 8 tanesi dışkı örneklerinden izole edilmiştir (Tablo 9). Bu izolatların 3. Grup şeker testleri ile elimine edilemeyeceği, sadece 2 izolatın selobiyoz ve 1 izolatın myo-inozitol pozitif olduğu görülmüştür. Tüm izolatlar mutlak sitrat negatif ve 1 izolat hariç diğer izolatların hepsi indol pozitif olması nedeni ile bu iki testin de ayırırda yararlı olmadığı görülmektedir. Sorbitol ve mannitol pozitiflik paralel seyrettiği için ayırırda mannitol testinin kullanılması sorbitol negatif *E. coli* izolatlarının da elde tutularak değerlendirmeye katılmasını sağlayacağı için doğru kabul edilebilir nitelikte bir bulgudur. Mannitol ile laktoz test sonuçları da paralellik göstermiştir.

Tablo 9. Maltoz negatif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler		İndol Sitrat		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	1	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
2	2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
3	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	
4	5	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	
5	10	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
6	57	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
7	62	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
8	65	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
9	97	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	
10	101	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	
11	113	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
12	114	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
13	115	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
14	120	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
15	123	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
16	165	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
17	173	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
18	176	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
19	177	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
20	178	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
21	185	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
22	193	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
23	196	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	
Toplam		9	12	12	16	12	23	23	0	22	22	0	2	0	1	0	19	3	22	0	23
%		39	52	52	70	52	100	100	0	96	96	0	9	0	4	0	83	13	96	0	100

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, mannitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.5. Mannitol negatif izolatlar

Toplam olarak 5 adet izolat kanat örneklerinden ve 1 adet izolat süt örneklerinden, izole edilen izolatlar arasından mannitol negatif özellik göstermiştir (Tablo 10). Altı adet izolatın tamamı glukoz ve trehaloz pozitif bulunurken 1 izolat laktoz negatif ve 2 izolat maltoz negatif bulunmuştur. Üçüncü Grup şekerlerden sadece selobiyoz ve myo-inozitol birer adet izolatı elimine etmiştir. Sorbitol negatif 5 izolat ile mannitol negatif olan bu Gruptaki izolatlar arasında paralellik görülmüştür.

Tablo 10. Mannitol negatif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat Katalaz		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	8	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
2	10	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
3	17	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
4	41	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
5	62	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
6	201	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Toplam		0	5	0	5	1	6	5	4	0	6	0	1	0	1	0	1	4	5	0	6

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, mannitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.6. Trehaloz negatif izolatlar

Trehaloz negatif 36 izolattan 1'i kanat, 1'i dışkı ve 34'ü süt örneklerine ait idi (Tablo 11). Süt örneklerine ait 34 izolatın tamamının glukoz ve laktoz pozitif olması ve trehaloz negatif olması önemli bir bulgu olup trehalozun ayırıcı özelliğine işaret etmektedir. Trehaloz negatif 34 adet izolatın 21 tanesi selobiyoz testi, 15 tanesi adonitol testi ve 14 tanesi myo-inozitol testi ile elimine edilebilir nitelikte bulundu. İndol testi, 12 adet izolatı ve sitrat testi ise 17 adet izolatı elimine edebildi. Selobiyoz testi en önemli ayırıcı test olarak bulunurken 2. Grup şekerlerin hiç birinin trehaloz negatif izolatların eliminasyonunu sağlayamadığı görüldü.

Tablo 11. Trehaloz negatif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler		İndol Sitrat		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	57	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
2	199	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	
3	200	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	
4	202	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	
5	209	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
6	210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	
7	213	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
8	216	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	
9	217	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	
10	220	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
11	226	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
12	227	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
13	228	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	
14	232	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
15	233	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
16	234	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
17	235	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
18	236	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
19	238	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
20	239	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
21	240	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
22	241	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
23	242	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
24	243	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
25	244	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
26	245	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
27	246	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
28	247	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
29	299	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	
30	300	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	
31	301	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
32	302	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
33	303	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
34	308	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	
35	309	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	
36	310	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	
Toplam		24	32	11	29	10	36	36	36	36	0	1	21	0	14	15	35	12	24	17	36
%		67	89	31	81	28	100	100	100	100		3	58		39	42	97	33	67	47	100

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.7. Salisin pozitif izolatlar

Salisin pozitif olan 9 izolatın 5 tanesi kanat ve 4 tanesi süt örneklerine ait idi (Tablo 12). Kanat izolatlarının hepsi, süt örneklerine ait izolatların 1 tanesi olmak üzere toplam 6 izolat selobiyoz testinde pozitif sonuç vermiştir. Eskülin 1 adet izolatı, myo-inozitol 2 adet izolatı ve adonitol 2 adet izolatı elimine ederken, indol ve sitrat testleri 2 adet izolatı elimine edebildi.

Tablo 12. Salisin pozitif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat Katalaz		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	23	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
2	93	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
3	116	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
4	122	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
5	127	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
6	228	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
7	281	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
8	297	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
9	310	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Toplam		6	8	4	7	2	9	8	9	9	7	9	6	1	2	1	8	4	7	2	9

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.8. Selobiyoz pozitif izolatlar

Toplam olarak 64 adet selobiyoz pozitif izolatın 8 tanesi kanat, 2 tanesi dışkı ve 54 tanesi süt örneklerine ait idi (Tablo 13). Süt örneklerine ait izolatların 24 tanesi sitrat, 23 tanesi indol, 25 tanesi myo-inozitol, 22 tanesi adonitol ve 11 tanesi eskülin testleri ile elimine edilebildi. Myo-inozitol ve adonitol birlikte 29 izolatı elimine edebildi. Myo-inozitol, 25 adet izolatı elimine etmesi nedeniyle adonitol ile birlikte kullanılması ekonomik olmayabilir. Bu 29 izolata ilave olarak 5 izolat daha indol testiyle ve 6 izolat daha sitrat testiyle elimine edilerek, süt örneklerine ait 54 izolatın 40 tanesinin elimine edilme olasılığı yönünde bulgu elde edilmiştir. Trehaloz testi her ne kadar 21 izolatı elimine etmiş ise de, myo-inozitol ve adonitol testlerine ilave

olarak kullanılması durumunda 5 adet ilave izolatın eliminasyonunu sağladığı ve etkisi indol ve sitrat ile eşit olduğu için bu üç testten birinin seçilmesinin ekonomik açıdan önemli olacağı bulgusuna varıldı.

Tablo 13. Selobiyoz pozitif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler		İndol Sitrat		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
2	23	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
3	50	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
4	51	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
5	93	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
6	116	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
7	122	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
8	127	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
9	196	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
10	199	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+		
11	200	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+		
12	201	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+		
13	202	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+		
14	204	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
15	205	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
16	206	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
17	207	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
18	208	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
19	209	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+		
20	210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+		
21	211	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
22	212	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
23	213	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+		
24	215	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
25	216	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+		
26	217	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+		
27	220	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+		
28	221	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
29	229	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
30	231	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
31	238	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+		
32	239	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+		
33	240	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+		
34	241	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+		
35	242	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+		
36	243	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+		
37	255	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
38	266	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
39	275	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
40	278	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		
41	282	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
42	298	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
43	299	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+		
44	300	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+		
45	301	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+		
46	302	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+		
47	303	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+		
48	304	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		
49	305	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+		
50	307	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+		
51	310	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+		
52	311	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
53	312	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
54	313	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
55	314	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
56	315	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
57	316	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
58	317	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		
59	324	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
60	325	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+		
61	326	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		
62	327	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
63	328	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
64	329	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
Toplam		45	49	22	49	21	64	63	61	63	43	6	64	11	25	22	62	33	41	24	64
%		70	77	34	77	33	100	98	95	98	67	9	100	17	39	34	97	52	64	37	100

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulcitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol;

Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.9. Eskülin pozitif izolatlar

Toplamı 17 adet olan eskülin pozitif izolatın, 11 tanesi selobiyoz testinde pozitif reaksiyon verip elimine edilme özelliği gösterdi (Tablo 14). Salisin, myo-inozitol ve adonitol testlerinin etkili olmadığı ortaya çıktı. İkinci Grup şekerlerin hiç biri eliminasyonda etkili olmadı. Toplam 17 izolattan sadece 1 tanesi ksiloz testinde negatif, diğerleri pozitif özellikte homojen özellik gösterdi. Süt örneklerine ait izolatların tamamı ramnoz pozitif iken, kanat ve dışkı örneklerine ait izolatlar ramnoz negatif özellik gösterdi. Bu bulgu eskülin pozitif izolatlar arasında örnekler ile ramnoz testi arasında bir bağlantının olabileceğine işaret etmektedir.

Tablo 14. Eskülin pozitif izolatların test sonuçları.

No	1. Grup şekerler*						2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup		İndol			
	Kod	Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K	
1	50	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	
2	51	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
3	84	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	
4	92	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	
5	93	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
6	111	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	
7	162	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	
8	163	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	
9	313	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	
10	314	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	
11	323	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	
12	324	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	
13	325	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
14	326	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
15	327	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
16	328	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
17	329	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
Toplam	7	11	5	16	10		17	17	17	17	17	1	11	17	3	3	14	5	14	4	17	

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulcitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.10. Myoinozitol pozitif izolatlar:

Toplam olarak 41 adet myo-inozitol pozitif izolatın 40 tanesi st rneklelerine ait idi (Tablo 15). Bu izolatların 25 tanesi sitrat, 20 tanesi indol testi ile elimine edilebildi. nc Grup ekerlerden selobiyoz 24 adet izolatı, adonitol ise 21 adet izolatı elimine etti. İndol ve sitrat test kombinasyonu 32 izolatı elimine ederek sitratın 7 izolatı daha fazla eliminasyon sağladı. Selobiyoz ve adonitol kombinasyonu 30 adet izolatı elimine ederek selobiyoz 6 izolat daha fazla sayıda eliminasyon sağladı. St rneklelerine ait toplam 40 adet izolatın indol ve sitrat testinden sonra tipik *E. coli* zelliği ile ortaya çıkan 7 adet izolatın 3 tanesini adonitol elimine etti. Sitrat ve adonitol test kombinasyonu 40 izolattan 35 tanesini elimine etti. Trehaloz, 2. Grup, diğer ekerlerden farklı olarak daha yksek sayıda negatif sonuç verdi. Toplam 41 suştan 14 tanesi trehaloz negatif sonuç verdi.

Tablo 15. Myoinozitol pozitif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat			
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K	
1	196	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
2	200	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
3	201	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
4	203	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
5	204	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
6	206	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
7	207	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
8	208	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
9	209	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
11	211	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
12	212	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	213	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
14	214	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
15	215	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
16	216	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
17	217	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
18	218	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
19	219	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
20	220	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
21	252	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
22	256	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
23	257	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
24	265	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
25	296	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
26	297	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
27	299	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
28	301	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
29	302	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
30	303	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	308	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
32	309	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
33	310	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
34	311	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
35	312	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
36	313	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
37	314	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
38	319	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
39	321	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	322	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
41	323	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Toplam		37	30	15	30	19	41	41	40	39	27	2	25	3	41	21	41	35	20	25	41	
%		90	73	37	73	46	100	100	100	95	66	5	61	7	100	52	100	85	49	61	100	

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myoinozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.11. Adonitol pozitif izolatlar

Toplam olarak 41 adet adonitol pozitif izolatın 9 tanesi kanat, 1 tanesi dışkı ve 31 tanesi süt örneklerine ait idi (Tablo 16). Bu izolatların 11 tanesi indol testiyle ve 14 tanesi sitrat testiyle elimine edildi. İndol ve sitrat testleri birlikte 31 izolatın 22 tanesini elimine etti. Bu 31 izolatın 21 tanesi myo-inozitol testiyle ve 20 tanesi de selobiyoz testiyle elimine edildi. Salisin ve eskülin testi ise eliminasyonda etkili olmadı. Selobiyoz ve myo-inozitol testleri birlikte 26 izolatu elimine etti. İndol ve sitrat kombinasyonu ile selobiyoz ve adonitol kombinasyonunun birlikte sadece 2 izolatu daha elimine edebildiği için bu 4 testin hepsinin birlikte identifikasyonda kullanılması ekonomik görünmemektedir. Selobiyoz ve myo-inozitol test kombinasyonunu kullanmanın yeterli olduğu sonucuna varıldı. Her ne kadar trehaloz testi süt örneklerine ait olan 31 adet izolattan 14 tanesini elimine ettiyse de selobiyoz ve myo-inozitol test kombinasyonuna ilave edildiğinde sadece 3 izolat daha elimine etmesi nedeniyle kullanılmasının ekonomik yönünün dikkate alınması gerektiği sonucuna varıldı. İkinci Gruptaki diğer şekerlerin eliminasyonda etkili olmadığı tespit edildi.

Tablo 16. Adonitol pozitif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler			İndol Sitrat		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K	
1	44	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+		
2	52	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-		
3	84	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+		
4	85	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+		
5	86	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+		
6	87	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+		
7	88	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+		
8	90	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+		
9	93	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+		
10	199	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+		
11	200	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+		
12	201	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+		
13	202	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+		
14	203	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+		
15	204	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+		
16	205	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+		
17	206	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+		
18	207	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+		
19	208	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+		
20	209	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
21	210	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+		
22	211	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
23	212	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
24	220	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+		
25	222	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+		
26	232	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+		
27	234	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+		
28	235	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+		
29	237	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+		
30	239	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+		
31	243	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+		
32	296	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+		
33	297	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+		
34	299	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
35	301	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
36	302	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
37	303	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
38	304	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+		
39	321	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+		
40	322	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+		
41	323	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Toplam		30	36	16	33	14	41	41	41	40	26	2	22	3	21	41	37	23	29	14	40	
%		73	88	39	80	34	100	100	100	98	63	5	54	7	51	100	90	56	71	34	98	

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz;

Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.12. Sorbitol negatif izolatlar

Tespit edilen toplam 24 adet sorbitol negatif izolatın 20 tanesi kanat örneklerine, 3 tanesi su örneklerine ve 1 tanesi dışkı örneğine ait olduğu tespit edildi (Tablo 17). Bu Grup içerisinde sadece 22 adet mannitol pozitif ve 24 adet glukoz pozitif izolat tespit edildi. Bu iki testin sorbitol negatif izolatlar arasından tipik *E. coli* tespit etmede yararlanılabilecek nitelikte olduğu ortaya çıktı. Kanat örneklerinden 82 adet glukoz pozitif izolata karşılık 47 adet glukoz negatif izolat seçilerek analizlere tabi tutulmuş idi. Bu izolatlardan 36 tanesinin sorbitol negatif Grup içerisinde yer aldığı görüldü. Bir başka ifade ile, 60 adet sorbitol negatif izolat içerisinde 36 tanesi glukoz negatif ve 36 tanesi mannitol negatif olarak, tipik *E. coli*'den farklı olduğu ortaya çıktı. Her iki şekerin birlikte kullanılması durumunda ise sadece 5 adet izolatın daha elimine edileceği ve bu nedenle her iki şekerin birlikte eliminasyonda kullanılmasının ekonomik olmayacağı sonucuna varılmıştır. Bu bulgular, örneğin sorbitol negatif özellikteki patojen *E. coli* izolatlarının izole edilmesinde kullanılan selektif izolasyon ve ayırıcı besiyerleri içerisinde glukoz veya mannitolun ilave edilmesi, atipik izolatların elimine edilmesine katkı sağlayacak bir uygulama olarak tespit edilmiştir.

İkinci Grup şekerlerin fermentasyonu sonucuna bakıldığında, sadece 17 adet izolat, 5 adet şekerin hepsini de fermente ederek tipik *E. coli* özelliği gösterdiği ortaya çıktı. Söz konusu 17 izolattan 7 tanesi ise 3. Grup şekerlerden en az bir tanesini fermente etme yeteneği göstermiş ve elimine olmuştur. Geriye kalan 11 izolattan 4 tanesi katalaz pozitif özelliği ile elimine olmuştur. Bu bulgular ışığında sadece 7 adet sorbitol negatif izolatın tipik *E. coli* olması olasılığının en yüksek olasılık olduğu tespit edilmiş oldu. Ancak *E. coli* 'nin eskülin pozitif izolatlarının da olduğu, sadece selobiyoz, myo-inozitol ve adonitol negatif, 2. Grup şekerlerin 5'ine de pozitif reaksiyon göstermesi yanı sıra, katalaz pozitif özellik de dikkate alındığında tipik izolat sayısı 8'e çıkmaktadır. Bu izolatlardan 185 kodlu izolat mannitol negatif özelliği ile elimine edilebilecek bir özellik göstermiştir. Diğer 91, 107, 111, 118, 130, 131 ve 132 kodlu izolatların sorbitol negatif *E. coli* olabileceği sonucuna varıldı. Bu izolatlardan sadece 1 tanesi ramnoz pozitif özellik göstermiştir. Analiz edilen örneklerden, sorbitol negatif *E. coli* araştırılacağı durumlarda bu bulguların ışığında

ortaya çıkan tablodan yararlanılarak testlerin dizayn edilmesinin yararlı olabileceği sonucuna varıldı.

Tablo 17. Sorbitol negatif *E. coli* haricindeki sorbitol negatif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat Katalaz		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	8	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
2	10	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3	17	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
4	23	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
5	41	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
6	44	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
7	51	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
8	53	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
9	54	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
10	55	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11	57	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
12	62	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
13	84	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
14	87	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
15	88	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
16	121	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
17	185	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Toplam		3	12	2	15	3	17	16	13	12	16	1	2	2	0	4	0	6	1	0	13

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulsitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.13. Laktoz negatif izolatlar

Laktoz negatif izolatların tamamı kanat örneklerine ait olup 4 izolatın 4'ü de glukoz pozitif bulunmuştur (Tablo 18). Bu Grup izolatların sayısı az olup sağlıklı bir değerlendirme yapmaya olanak vermemektedir.

Tablo 18. Laktoz negatif izolatların test sonuçları.

		1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat Katalaz		
No	Kod	Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	62	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
2	125	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
3	126	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
4	127	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Toplam		2	1	2	3	0	4	0	3	3	4	1	1	0	0	0	3	0	4	0	4

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulcitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol; Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

3.14. Glukoz negatif izolatlar

Kanat örneklerinin ekildiği VG besiyerinden 82 adet glukoz pozitif ve 47 adet glukoz negatif koloni seçilerek testlere tabi tutulmuştur. Böylece glukoz yerine kullanılma olasılığı olan şekerin veya şekerlerin mevcudiyeti araştırılmıştır. Toplam olarak test edilen 47 adet glukoz negatif izolatın eliminasyonunda indol ve sitrat testleri etkisiz kaldı. Şayet *E. coli* taramasında sorbitol negatif izolatlar ihmal edilecek ise bu durumda sadece 11 adet izolatın sorbitol pozitif olduğu bulgusu önem kazanmaktadır. Üçüncü Grup şekerlerin hiç birinin eliminasyonda etkili olmadığı görülmüştür. İkinci Grup şekerlerden laktoz 19 izolatı, maltoz ise 16 izolatı elimine ederken en etkili eliminasyonu 35 izolat ile manitol sağlamıştır. Kanat örneklerinde, tipik *E. coli* kolonisi seçiminde manitol testinin yararlı olabileceği olasılığı ortaya çıkmıştır. Ancak bu şekeri, diğer 82 adet glukoz pozitif izolat arasından tespit edilen 53 adet tipik *E. coli* izolatının (Tablo 1) sadece 2 tanesinin fermente etmediği gözlemlendi (bulgular ayrıca verilmedi). Bu sonuca göre manitol ve glukoz pozitif özelliğin paralel bulgu verdiği ortaya çıkmaktadır. Aynı durumun laktoz için de geçerli olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 19. Glukoz negatif izolatların test sonuçları.

No	Kod	1. Grup şekerler*					2. Grup şekerler**					3. Grup şekerler***					4. Grup şekerler****		İndol Sitrat Katalaz		
		Sak	Gal	Dul	Ksi	Ram	Glu	Lak	Mal	Man	Tre	Sal	Sel	Esk	Myo	Ado	Sor	Srz	I	Si	K
1	6	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
2	7	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
3	9	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
4	12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
5	13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
6	14	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
7	16	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
8	18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
9	19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
10	20	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
11	21	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
12	22	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
13	24	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
14	25	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
15	26	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
16	27	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
17	28	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
18	29	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
19	30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
20	31	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
21	32	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
22	33	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
23	34	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
24	35	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
25	36	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
26	37	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
27	38	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
28	39	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
29	40	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
30	42	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
31	43	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
32	45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
33	47	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
34	48	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
35	49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
36	58	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
37	59	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
38	60	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
39	61	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
40	63	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
41	67	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
42	68	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
43	69	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
44	70	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
45	71	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
46	72	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
47	73	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
Toplam		6	28	6	24	15	47	28	31	12	45	1	1	1	4	0	11	15	46	0	45
%		13	60	13	51	32	100	60	66	26	96	2	2	2	9	0	23	32	98	0	96

*Sak, sakaroz; Gal, galaktoz; Dul, dulcitol; Ksi, ksiloz; Ram, ramnoz. **Glu, glukoz; Lak, laktoz; Mal, maltoz; Man, manitol;

Tre, trehaloz. ***Sal, salisin; Sel, selobiyoz; Esk, eskülin; Myo, myo-inozitol; Ado, adonitol. ****Sor, sorbitol; Srz, sorboz.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırma, laktoz içeren katı bir ön izolasyon besiyerinden seçilen kolonilerden, *E. coli* olanları en hızlı, ekonomik ve doğru tespit etmek amacıyla ve tespit edilen *E. coli*'nin 17 farklı şekeri kullanabilme yetenekleri dikkate alınarak, hem izolasyon ve identifikasyon hem de biyotiplendirmek ve elde edilen biyotiplerin literatür bilgi ışığında hangi grup serotip veya patotibe ait olduğu konusunda tartışmak amacıyla yapılmıştır.

İlk izolasyon besiyerlerinden seçilen kırmızı renkli glukoz ve laktoz pozitif koloniler içerisinde *E. coli* oranı, bu oranın incelenen farklı kaynaklara göre değişip değişmediği konusu da ayrıca araştırılmış ve literatür bilgi ile karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır.

E. coli izolasyonu ve identifikasyonunun mümkün olduğu kadar hızlı yapılması, antibiyotik direncinin tespit edilmesi ve tipinin belirlenmesi, hem tedavide hem de epidemiyolojik çalışmalarda önemli konulardır. Her ne kadar genetik yöntemlerle de günümüzde mikroorganizmaların genotipinin ve patojenite faktörü genlerinin tespiti mümkün ise de bu analiz şekli ile hızlı olmak için örnekten doğrudan veya örneğin birkaç saatlik ön zenginleştirmesinden alınan materyalden yararlanılmaktadır. Oysa bu durumda elde, yani besiyeri üzerinde izole ve identifiye edilen bir mikroorganizma kalmamaktadır. Bu durum, epidemiyolojik çalışmalarda kaynak israfına neden olmaktadır. Hastalıkların koruma ve kontrolünde epidemiyolojik çalışmaların birinci derecede önemli olduğu bilinen bir gerçektir. Bu nedenle laboratuvar ağları kuran ve ulusal düzeyde epidemiyolojik çalışmalarda bu ağları kullanan ülkelerde her türlü materyalden izole edilen mikroorganizmaların identifikasyonu, kodlanması ve stoklanması ile epidemiyolojik çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Ülkemizde böyle bir gayret ve alt yapının olmayışı, geniş suş stoklarına sahip olmamaya ve bilgi kaynaklarının israfına neden olmaktadır. Oysa ülkemizde de bazı hastalık etkenlerini öncelikli tutmak koşuluyla laboratuvar ağları içerisinde epidemiyolojik çalışmaların yapılmasını suş ve suşlara ait bilgi bankasının oluşturulmasını, daha sonraki çalışmalarda bu bankalardan yararlanılmasını kolaylaştırmak amacıyla kamu otoritesi harekete geçmek zorundadır.

Yoğun suş izolasyonu ve identifikasyonu yapan merkezler için özellikle zaman ve ekonomi kazancı sağlamak amacıyla basit, ucuz, hızlı ve doğru tiplendirme prosedürlerinin bulunması ve uygulanması şarttır. Günümüzde böyle prosedürler *E. coli* için de bulunmuş ve ticari kit olarak pazarlanmaktadır. Bu kitlerin maliyeti dahi gelişmekte olan ülkeler için yüksek olabilir. Keza bu kitler arzulanan düzeyde zaman tasarrufu da sağlamayabilir. Dolayısıyla ülkemiz gibi kaynakları sınırlı olan ülkelerde epidemiyolojik çalışmaları kapsamı ve uygulanacak metodoloji ülkeye has olabilir. Bu çalışmanın sonucunda ülkemizde *E. coli* ile ilgili yapılacak bir epidemiyolojik çalışma içerisinde ilk izolasyon besiyerinden seçilen şüpheli kolonilerden *E. coli* identifiye etmek, identifiye edilen suşların hangi biyotiplere ait olduğunu tespit etmek ve bu bilgilerden yararlanarak *E. coli* serotip ve patotipleri ile biyotipleri arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmak, bu bilgiden de yararlanarak daha iyi izolasyon ve identifikasyon teknikleri oluşturmak mümkün olacaktır.

İlk izolasyon besiyerinden şüpheli koloni seçimi, koloninin besiyeri içerisindeki maddeleri kullanarak oluşturduğu koloni tipi ve rengi dikkate alınarak yapılır. Burada hatalı pozitif suş seçimi söz konusu olduğunda besiyerinin performansı düşük olarak kabul edilir. Bu durumda besiyerinin yeterince selektif olmadığı söylenir. Hatalı olarak seçilen suş izolasyon ve identifikasyon işlemine alındığı zaman oldukça büyük külfete ve daha da önemlisi hatalı bir karar vermeye, hatta kararsız kalmaya neden olacaktır. İlk izolasyon besiyeri içerisine katılan antibiyotikler ve diğer antimikrobiyel maddeler besiyerinin bir tür mikroorganizmaya has olmasına yarayan ilave maddelerdir. Bununla birlikte bu tür mikroorganizmanın koloni morfolojisinin tipik hale getirilmesi için şeker, lizin, arginin ve ornitin gibi protein tabiatlı maddeler, yine bazı florojenik ve kromojenik maddeler ilave edilmektedir. Son birkaç yılda bu maddeleri içeren daha selektif besiyerleri üretilmiş ve pazarlanmaktadır. Bu besiyerlerinin bazen bir tek suşa spesifik olduğu da görülmektedir. Örneğin SMAC besiyeri sorbitol negatif *E. coli* O157:H7 izolasyonu amacıyla kullanılan bir besiyeridir. Tüm çalışmalarda sadece bu besiyeri kullanılmış olsaydı *E. coli*'lerin içerisinde sorbitol negatif olan suşların sadece O157:H7 serotipine ait olduğu bilgisine körü körüne inanmak devam edecekti. Oysa ilk izolasyon besiyerinde üreyen negatif ve pozitif özellikli suşların birlikte bazı testlere tabi tutulması sonucunda sorbitol pozitif olup da patojen olan *E. coli* O157 suşlarının da mevcut

olduğu ortaya konmuştur. Benzer durum *E. coli* türü içerisinde patojenitesi ispatlanmış birçok suşun, farklı metabolik özelliklerde olduğunu ortaya koymuştur. Lakin günümüzde aynı serotipe ve patotipe ait olan farklı izolatların bir şekeri kullanma özelliğinin farklı olduğu tespit edilmiştir. Son yıllarda biyotip, fenotip ve genotip temelli, karşılaştırmalı izolasyon ve identifikasyon çalışmalarından sonra bir tür mikroorganizmanın ilk izolasyonu hakkındaki yöntemlerin tekrar gözden geçirilmesi gereğini ortaya çıkaracak nitelikte bulgu vermektedir. Örneğin glukoz ve/veya laktöz negatif patojen *E. coli* suşlarının izolasyonu ve hastalıklardan sorumlu tutulması bu şekerlere dayalı ilk izolasyon besiyerlerini her durumda yeterli olmadığını ortaya çıkarmıştır. Bu besiyerlerinden hastalık etkeni suşlar araştırılırken, pozitif reaksiyonlu tipik koloniler ile birlikte birkaç negatif reaksiyonlu atipik kolonilerin seçimi ve testlere tabi tutulması gereğini ortaya koymaktadır. Bu durumda da ileri izolasyon ve identifikasyon aşamalarında iş, zaman ve ekonomi kaybı ortaya çıkacaktır. Bu kayıpları önlemek için elde edilen yeni bulgular ışığında mevcut yöntemler tekrar gözden geçirilerek, yeni yöntemlere yönelme durumu ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, biyotiplendirmenin, serotiplendirme ve genotiplendirmeden daha ucuz ve elde suş kolonisi bıraktığı için yararlı ve etkili bir yöntem olduğu, biyotip, genotip ve serotip arasında suşların patojenitesi üzerinde etkili bir korelasyonun olduğunu yapılan çalışmalar ortaya koymuştur. Biyotiplendirme genellikle şeker fermentasyonu, ornitin dekarboksilasyonu ve H₂S üretilip üretilmediği yönünden yapılmaktadır. *Enterobacteriaceae* içerisinde *E. coli*'nin bazı şekerleri mutlak fermente ettiği bazılarını da mutlak fermente edemediği dikkate alınarak hızlı identifikasyon kitleri örneğin API 20 E kiti ve benzeri kitleri üretilmiştir. Ancak bu durumda yukarıda belirtilen sakıncaların ortaya çıkması kaçınılmaz olacak ve bilinen tipik özelliğe aykırı özellik gösteren istisna patojen suşlar göz ardı edilmiş olacaktır.

Bu çalışmada toplam 17 adet şeker ve renk indikatörü katkılı katı bir besiyeri içerisine ayrı ayrı %1 oranlarında katılarak diferansiyel agarlar elde edildi. Toplam olarak 282 adet laktöz pozitif, oksidaz pozitif, Gram negatif suşun bu şekerlerin her birine gösterdiği metabolik reaksiyonun pozitif veya negatif olduğu araştırıldı. Araştırma sonucunda bu özelliklere ilave olarak glukozdan ve laktözdan asit ve gaz üretme yeteneği gösteren, sitrati kullanamayan, katalaz pozitif ve indol negatif suşlar

tipik *E. coli* olarak değerlendirildi. Bu sürecin uzun, zahmetli ve masafli olduğu gerçeği karşısında tipik *E. coli* suşlarının bir diferansiyel agar üzerinde renkli veya renksiz koloni oluşturma yeteneğine bakılarak, daha hızlı ve ekonomik olarak identifiye etmenin mümkün olup olmadığı araştırıldı. Bu araştırma sonucunda yukarıda bildirilen testlerden tipik *E. coli* olarak 156 adet suş izole edildi. 282 suşun geri kalan 126 adedi ise *E. coli* olmayan suşlar olarak tespit edildi (Tablo 1). Bu suşlar da *E. coli* suşlarıyla birlikte şeker testlerine tabi tutularak *E. coli* ile paralellik ve zıtlık oluşturduğu şekerler tespit edilmeye çalışıldı. Bu bulgu ışığında literatür bilgiye ters düşmeden yeni selektif diferansiyel agarların önerilme olanağı üzerinde duruldu. Sonuçta tüm suşlar içerisinde 9 tanesi salisin, 17 tanesi eskulin, 41 tanesi myo-inozitol, 41 tanesi adonitol tarafından elimine edildi (Tablo 5). En fazla eliminasyon 64 suş ile selobiyoz tarafından meydana getirildi. Selobiyoz yalnız başına 126 adet olan *E. coli* haricindeki suşların yaklaşık yarısını elimine etti. Selobiyoz dan sonra en etkili olan şeker miyo-inozitol ve adonitol olduğu, bu şekerlerin fenol red indikatörü içeren katı bir besiyerine birlikte ilave edilip hızlı spot test yapıldığında sadece iki suş salisin'e ve 4 suş eskülin'e eliminasyon için ihtiyaç duyar. Sonuçta 126 suştan sadece 6 suşu elimine etmek için salisin ve eskülin ilave etmenin gerekli ve ekonomik olmayacağı ortaya çıkmaktadır. Bu durumda ilk izolasyon besiyerinden seçilen şüpheli kolonilerin salisin, eskülin, myo-inozitol ve adonitol kombinasyonu (SEMA) içeren bir katı besiyerine spot test biçiminde ekilmesi ve 3-6 saat sonra kırmızı olanların eliminasyonu ve renksiz olanların tipik *E. coli* olarak kabul edilmesi hızlı, kolay, ekonomik ve mantıklı bir yöntem olabileceği gerçeği ortaya çıkmaktadır. Ancak bu yöntemin gerçekten doğru çalışıp çalışmadığı çok daha geniş çalışmalar ile ve serotip- genotip çalışmalarıyla desteklenerek ortaya konmalıdır.

Bu çalışmada indol testinin elimine ettiği 51 adet suşun 31 tanesi sema testi ile elimine edilebildi. SEMA testi yapıldıktan sonra indol testi yapılması daima doğru olacaktır. Lakin SEMA testi içerisindeki selobiyoz 64 adet suş tarafından fermente edilmiştir. Bu değer bu şekerin yalnız başına indoldan daha fazla suşu elimine ettiğini göstermektedir (Tablo 5). Ancak SEMA testinden sonra gerekli ise, bir başka deyişle çok sayıda suşun elde kalması durumunda veya ihtiyaç var ise indol testi yapıldığında elde çok daha az suşun kalacağı ortaya çıkmaktadır. Lakin 51 suştan 21

tanesini sema testinden sonra yapılacak indol testi ile ayırabilmek mümkün olmuştur (Tablo indol). Sitrat bu suşlardan sadece bir tanesini elimine edebilmiş ve bu durum sitrat testine ihtiyaç olmadığını ortaya koymuştur. Sitrat testinin elimine ettiği 43 adet suşun 36'sının esma testi ile elimine edilmesi bu bulguyu teyit etmektedir. Bu çalışmada tipik *E. coli*'nin 3. Grup şekerleri fermente etmediği, 2. Grup şekerleri fermente ettiği kabul edilmiştir. Lakin biyotip şemalarında da bu durum net olarak ortaya konmuştur. İkinci Grup şekerlerden ilk izolasyon besiyerine ilave etmede glukoz veya laktoza alternatif olarak düşünülen ve test edilen diğer üç şekerden mannitol 6 suşu, maltoz 23 suşu ve trehaloz 36 suşu elimine etmiştir. Maltoz ve/veya trehaloz şekerlerinin besiyerine katılması sonucunda elde edilecek yararı net olarak ortaya çıkarmak için daha detaylı araştırmalara ihtiyaç olduğu tespit edilmiştir.

Birinci Grup şekerlerin mutlak pozitif ve mutlak negatif sonuç vermediği, ancak bazı grup izolatlarında mutlak değere yakın reaksiyon vermeleri bu testlerin alt biyotiplendirmelerde veya bazı örnek tiplendirmelerinde kullanılma olanaklarının daha yüksek olasılıklı olabileceği üzerinde daha fazla araştırma yapma gerçeği ortaya çıkarılmıştır.

Katalaz testi sadece 7 suşu elimine etmiştir. Bu sonuca göre katalaz testinin gereksizliği veya son planda kullanılabileceği ortaya çıkmıştır. Bu 7 suşun sadece bir tanesi adonitol tarafından elimine edilebilmiştir. Bu durum esma testinin katalaz negatifleri elimine etmede etkili olmadığı ancak katalaz negatif suş sayısının çok az olması böyle bir eliminasyona ihtiyaç olmayacağına işaret etmektedir (Tablo 6).

Çok farklı serogruba ait patojen *E. coli*'lerin hızlı teşhisini sağlayabilecek yöntemlerin geliştirilmesi öncelikli bir konudur (79). Murphy ve ark. (79) kıymanın bir gece zenginleştirilmesinden sonra triplex PCR yöntemiyle *E. coli* O26, O11 ve O157'yi izole edebildiklerini, bu yöntemin 24 saat aldığını ve gıda zincirinde riski azaltmada etkili olacağını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, gıdalardan *E. coli* O157 izole etmek için kullanılan bir metodun bulunduğunu, ancak bu metodun sorbitol negatif koloni seçme prensibi ile çalışması nedeniyle, sorbitol pozitif patojen *E. coli* O157 suşlarının izolasyonunu sağlamadığını, O26 ve O11 için ise bir geçerli metod olmadığını, lakin bu suşların da sorbitol negatif ve pozitif izolatlarının olduğunu bildirmişlerdir. Katı besiyerine şeker ilave etmek ve şeker fermentasyonuna göre koloni seçmenin diğer floranın da yoğunluğu nedeni ile başarı ile kullanılmadığı,

örneğin ramnoz ilave edilmiş MacConkey agar O126 suşu için selektif katı besiyeri olarak önerilmiş ise de diğer kromojenik besiyerlerinde olduğu gibi bu besiyerinin de bazı suşların seleksiyonuna olanak vermeyeceği, bu nedenlerden dolayı spesifik *E. coli* serogruplarını tanımlama ve daha fazla bilgi olanağı verdiği için PCR yönteminin gerektiği bildirilmiştir (79). Monday ve ark. (75) 200 adet STEC serotipi içerisinde patojen olarak öne çıkan O157:H7 ve diğer O26 ve O111 serotipleri haricindeki O103, O121 ve O145 suşların patojenitesinin tespit edilmesinde multiplex PCR metodu kullanılmasını önermiştir. Araştırmacılar, biyotiplendirmenin koloni kullanılarak yapılmasından dolayı yararlı olduğunu, ancak STEC içerisinde hastalık yapan EHEC tiplerinin ayırımını yapamayacağı, “O” tiplendirmesinin ise patojenite ile ilgili olmaması nedeniyle ve *E. coli* ile EHEC suşlarının aynı O tipi içerisinde olduklarını ifade ettikten sonra, patojen tiplerin kesin olarak ayırımında multiplex PCR kullanılmasını önermiştir. Bu çalışmada olduğu gibi her bir patotip için bir genetik şifre kullanılmaktadır. Araştırmacılar bu çalışmada 9 farklı suş için 9 çift gen dizisi kullanmışlardır. Bu kadar patojenite belirleyici gen primeri bir örnekten veya izole edilen bir suştan patojenite tespit etmede kullanılmaktadır. Bu şekilde bir uygulama sonucunda multiplex PCR tekniği kullanılmış ve test edilen organizmanın patojenik tipi tespit edilmiştir. Bu metodun sonuçları kesin olmakla birlikte rutin uygulamalarda kullanılamayacak kadar zor ve pahalıdır.

İshali tavşan dışkılarından izole edilen 575 adet izolatu Camguilhem ve Milon (27) kendi basitleştirilmiş biyotip modeli ile kullandıkları 5 farklı şeker testiyle 72 adet O103 serotipinin 70 tanesi ramnoz pozitif ve yüksek patojenitede, ramnoz negatifleri ise düşük patojenitede bulmuşlardır. Dokuz adet O68 suşunun 4 tanesi de ramnoz pozitif bulunmuştur. Fenotipik özelliklerin ve hatta ramnozun bile tek başına patojenite faktörü olabildiği bildirilmiştir. Biyotipler sorboz, dulsitol, rafinoz, sükroz ve ramnoz ile belirlenmiş, hiçbirinde mutlak veya büyük oranlı pozitiflik bulunamamıştır. Okerman ve Devrise (85), kullandıkları biyotiplendirme şeması içerisinde rafinoz, dulsitol, sükroz, sorboz, ramnoz ve selobiyoz olmak üzere 6 şeker dahil etmiştir. Crichton ve Old (30) ise biyotiplendirme şeması içerisinde dulsitol, rafinoz, sorbitol şekerleri ile ornitin dekarboksilasyonu testlerini kullanmıştır. Peeters ve ark. (91), sağlıklı ve hasta tavşanlardan izole ettikleri *E. coli* suşlarını Crichton ve Old (30) şeması içerisinde yer alan 4 şekeri kullanarak 16 biyotipe ayırmıştır.

Biyotipler ve patojenite ile serotip dağılımı arasında bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (91). Tespit edilen 18 biyotip arasından suşların büyük çoğunluğu 3. Grupta yoğunlaşmıştır. Toplam 568 suştan 13 suşun selobiyoz pozitif olduğu, bunlardan 11 tanesinin Biyotip 12'ye ait olduğu tespit edilmiştir. Okerman ve Devrise (85) biyotip şemasına göre 6 şeker kullanıldığı zaman ise 18 biyotipin ortaya çıktığı bildirilmiştir. Araştırmacılar biyotip özelliklerin patojenite ve klinik bulgular gibi özellikleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Penteado ve ark (92) da serotip, biyotip ve patojenite arsında pozitif ilişki olduğunu ortaya koymuş, yaptıkları çalışmada *E. coli* O132:H2:B30 olarak adlandırdıkları suşun predominant EAEC olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu suşun ramnoz negatif olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da Camguilhem ve Milon (27) biyotiplendirme şeması kullanılmıştır.

Lecomil ve ark (69) insan, sığır, koyun, domuz ve tavuk orijinli 23 *E. coli* O26 suşunun iki gruba ayrıldığını, birinci Grupta ramnoz ve duasitol negatif olan EPEC ve EHEC suşlarının, ikinci Grupta ise ramnoz ve duasitol fermente eden EPEC suşlarının yer aldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar birçok evcil hayvanın insan enfeksiyonlarında O26 EPEC ve EHEC suşlarının rezervuarı olabileceğini bildirmişlerdir. Crichton ve Taymor (31) mikrokuyucuk plaklarında rafinoz, sorbitol, ornitin, duasitol ve ribozu birinci aşamada, ramnoz, lisin dekarboksilaz ve hareket testlerini ikinci aşamada uygulayarak klinik *E. coli* izolatlarının başarılı ve güvenli biyotiplendirme yapılabileceğini ve biyotiplerin diğer tiplendirme teknikleri ile de identifiye edilmesi, lokal, epidemiyolojik sorunları çözümede kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir. Lehmacher ve Bockemühl (68), sorboz kullanımı ile patojenite ve evrimsellik arasında bir ilişkinin olduğunu, serotip ve patotip tespitinde sorboz kullanım özelliğinin yararlı bir test olabileceğini bildirmişlerdir. Sorboz içeren selektif bir katı besiyerinin üzerinden sorboz negatif suşların ETEC izolasyonunda kullanılmasının uygun olacağı bildirilmiştir. Patojenik gruplardan en düşük %9 oranında ETEC suşlarında ve en fazla %93 oranında NMEC suşlarında sorboz pozitiflik tespit edilmiştir.

Nicoletti ve ark. (82), Somoli'de laktoz negatif EPEC, ETEC, EIEC ve diğer patojen grup *E. coli* üyelerini tespit etmişlerdir. Rychert ve ark. (96) sığır dışkılarından

ve sudan laktoz negatif *E. coli* izole etmişler ve bunların antibiyotik direncinin daha az kolisinojenik özelliğinin daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır.

Kaweck ve Flyermans (65) nükleer reaktöre soğutucu su sağlayan göldeki *E. coli*'ler laktoz pozitif iken, soğutma işinden sonra suşların laktoz negatif olduklarını izlemişlerdir. Bu durumu mevcut testlere göre suyun temiz olduğu sonucuna neden olduğu belirtilmiştir. Aguile ve ark. (2), 59 adet ishal etkeni sorboz negatif suşu ısıya dirençli enterotoksin üreten suşlar olduğunu ve bu ilişkinin klinik laboratuvarlarında şüpheli identifikasyonda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Sağlıklı ve ishalleri tavşanlardan izole edilen *E. coli* gruplarının farklı olduğu, ishalleri hayvanlarda ramnoz negatif suşlar, özellikle O103:K:H2 ve biyotip B14'ün daha fazla oranda enfeksiyondan sorumlu olduğu bildirilmiştir (23). *Eae* tespiti önerilmekle birlikte serogrup ve biyotiplerinin tespitinin yüksek patojeniteye sahip suşların tespitini doğru olarak tanımlamasında yardımcı olabilir nitelikte bulunmuştur.

Paciorg (89), 427 adet ishalleri yeni doğan bebekten 427 izolat ve 52 sağlıklı bebekten 150 izolatı serotip ve genotip analizine tabii tutmuşlardır. İshal vakalarında O18, O2, O44, O86, O26, O127 serogrupları tespit edilmiştir. Hem sağlıklı hem de hasta bireylere ait izolatların birçok patojen tip içerdiği ortaya konmuştur. Ülkemizde böyle bir gayret olmamakla birlikte ishal etkenlerinin ulusal düzeyde stoğunun yapılması ve kayıt altına alınmasının çok yararlı olacağı bir gerçektir. Bu durumda farklı serotip, biyotip veya genotipe sahip suşların seçimine olanak veren besiyerleri ve yöntemlere ihtiyaç vardır. Aynı zamanda gıda-enfekte bireyin dışkı-ara kontaminasyon kaynağı üçgenindeki fenotip-serotip-genotip ilişkilerinin araştırılması oldukça gerekli, iddialı ve disiplinli çalışmalara zemin hazırlayacaktır.

Amstey ve Casian-Colon (5), sezeryandan sonra gelişen septisemi vakasından sorumlu olarak üç farklı *E. coli* biyotipinin tespit edilmesi ve dördüncü biyotipin üriner ve genital kanalda izole edildiğini, bu nedenle septisemi kaynağının tespit edilemediğini, ilk izolasyon besiyerinde koloni seçiminin doğru yapılmasının ve bu gibi vakalarda antibiyotik direnç testinin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada olduğu gibi kontamine gıdalarda birden çok serotipi bir arada bulmak olasılığı yüksektir. Yani bir gıda, birden çok serotip ile aynı anda kontamine olabilir. Bu durumda bir tek besiyerinden izole edilen tipik koloniler araştırmayı oldukça dar

bir çerçeveden gözleme olumsuzluğuna sokacaktır. Oysa belkide VG veya VL besiyeri üzerinde 10–20 koloni seçilip hızlı bir biyotiplendirme ardından serotip tayini yapılması, gerekli görülürse genotip ve aderenz testleri yapılabilir.

Bedtelheim ve ark. (18) farklı rasyonlarla beslenen sığırların dışkılarından izole ettikleri 474 adet *E. coli* suşunun 52 serotipe ve 9 VTEC serogrubuna ayrıldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar melaslı yem ile beslenenlerin dışkılarından 30 serotip, yeşil ot ile beslenenlerin dışkılarından 17 serotip izole etmişlerdir. Bu gibi çalışmalar çevresel kontaminasyonun kaynağı olan dışkıda *E. coli* popülasyonunda değişiklik yapan faktörleri ve popülasyonda meydana gelen değişikliklerin insan ve hayvan sağlığına olası etkileri üzerinde durmaya yardım etmektedir. Bu çalışma ise farklı kaynaklardan alınan *E. coli* ve *E. coli* olmayan suşların temel kültürel izolasyonuna temel teşkil edecek fermentasyon testleri önermek amacıyla yapılmıştır.

Sainz ve ark. (101) Meksika'ya özgü bir fermente içecekte bulunan *E. coli* tiplerini tespit etmek için VG besiyerine ekmiş, oradan seçtikleri kolonilerin API 20 kiti ile *E. coli* doğrulamasını yapmış, 170 somatik (O), 56 flagellar (H) antiserumu kullanarak serotiplendirmiş, bilinen 7 patojenite gen primeri kullanarak patojenite testi yapmış ve hücre kültürü ile aderenz özelliklerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar O8, O11, O18, O20, O88 ve O173 olmak üzere 6 serotipe ait çok sayıda serotip izole etmişler ve bu suşların diarejenik olup insan sağlığını bozabilecek patojenik özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Hara-Kudo ve ark. (55) *E. coli* O26 suşuna özgü olarak geliştirilen CT-O26 besiyerini test etmişlerdir. Bu besiyerinin CT-RMAC besiyerinden daha etkili olduğu ortaya konmuştur. Bu besiyerinde temel olarak CT-RMAC besiyerinden farklı BICIG adlı kromojenik maddeyi içermesidir. Araştırmacılar, büyük mavi koloni oluşturan O119, O161 ve O26 suşları laktozu fermente ederken, O101, O111, O113, O145 ve O157 suşları ramnozu fermente etmeyip yeşil küçük koloniler oluşturduklarını ve diğerlerinden kolayca ayrılabilindiklerini ortaya koymuştur.

Lebaron ve ark. (67) tarafından suları filtre ettikten sonra filtre üzerinde 10 ml pepton water ve son MUG konsantrasyonu 167 mg/l olacak şekilde MUG ilave edilmiştir. Bu amaçla içerisinde eritilmiş MUG ve Triton-X–100 bulunan 50 ml su kullanılmıştır. Erlen 44°C'de inkübe edilirken içerisinde oluşan metil-umbelli-fenol

miktarı pikomol düzeyinde 360 nm UV florometre ile ölçülmüştür. Bu yöntemin NPM-mikroplate metodundan daha iyi olduğu ve plaj sularının analizi için bulunacak hızlı yöntemlere kaynak teşkil edebileceği bildirilmiştir.

Ware ve ark. (112) 5 yıl süreyle elde ettikleri 34 adet *E. coli* O157:H7 suşunun her birinin farklı bir biyokimyasal özellik gösterdiğini, bu suşlardan 20 tanesinin hareketsiz veya geç hareketli olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu bulgular ışığında mevcut bilinen yöntemler ve ticari kitler kullanarak *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarında hatalı teşhislerin yapılma olasılığının olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar ramnoz, sükroz, laktoz, glukoz negatif suşlar ortaya koymuşlardır.

Buckalew ve ark. (26) sularda fekal koliform ve *E. coli* izolasyonunda colileft DTS metodunu MF metotlarından daha ucuz, basit ve hızlı olduğunu tespit etmişlerdir. Besiyerinin poşet içerisinden analiz edilecek suya karıştırılmasının kolaylığından bahsedilmiştir.

Fujisawa ve ark. (48) sefiksime tellürit sorbitol salisin MacConkey medium ile *E. coli* O157:H7 izolasyonu yapılırken MUG reaksiyonunun okunması kolonilerin yoğun olduğu durumda oldukça zordur. Bu sorunun yapılacak ileri araştırmalarda çözülmesi gerekmektedir. Buradan seçilen kolonilerin tekrar bu besiyeri yüzeyine sürülmesi gerekmektedir.

Francy ve Darner (34) yüzme sularında *E. coli* izolasyonunda kullanılan 3 farklı yöntemi karşılaştırmışlardır. Bu yöntemlerin farklı oranda hatalı pozitif ve negatif sonuçlar verdiğini ortaya koymuşlardır. Bu nedenle analiz metotları arasındaki oldukça fazla olan farklılıkların ortadan kaldırılıp doğru çalışan standart metotlar önermenin gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Parveen ve ark (102) *E. coli* kontaminasyon kaynaklarını tespit etmek için uygun bir yöntemin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Multiple antibiyotik resistans (MAR) gibi hücre duvarı yağ asitlerine ve jel elektroforegramına bakılarak yapılan tiplendirmenin henüz başarıyla uygulanabildiğinin söylenemediği, bunda çevresel ve suşa bağlı değişkenlerin önemli olduğu bildirilen bu çalışmada serotiplerin çoğunun da sorunu çözemediği ortaya konmuştur.

Buckwold ve ark. (47), her ne kadar API 12 sistemi var ise de yeterli olamayacağını ve daha pratik biyotiplendirme yöntemleri olması gerektiğini

vurgulamıştır. Araştırmacılar idrar yolu enfeksiyonundan izole ettikleri 979 adet *E. coli* suşunun biyotiplendirmesinde 17 farklı test kullanmış ve 78 biyotip elde etmişlerdir. Şeker fermentasyon testlerini katı besiyerinde çok noktayla inokülasyon yapma tekniği ile sıvı kültürden ekim yapıldıktan sonra ekim noktalarının arası steril scalpel ile kesilmiştir. Adonitol, laktoz, rafinoz ve sukrozda koloninin kırmızı olması, lisin dekarboksilaz, melibiyoz ve ramnoz testlerinde ise besiyerinin de renk değiştirmesi önemsenmiştir. Araştırmada sorbitol, maltoz ve ksiloz testleri %92–98 oranında pozitif sonuç verdiği için biyotiplendirmede etkili bulunmamıştır. Oysa dulcitol, arginin hidrolizi ve ornitin dekarboksilasyon testleri %19 – 63 arasında değişen oranlarda pozitif sonuç vermiştir. Araştırmacılar API 12 test sisteminde yer alan testlerden sadece 4 tanesinin ayrımda etkili olduğu, kendi yöntemlerinin ise inokülüm konsantrasyonunu ayarlamaya gerek olmadığı için API sisteminden üstün olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar agara ekim yönteminin çok sayıda suş test etmeye daha elverişli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırma sonucunda suşların %67' sinin 11 biyotip içerisinde toplandığı tespit edilmiştir.

AB içme suyu yönetmeliğinde (98/83/EC) içme sularında koliform ve *E. coli* sayımında membran filtrasyon yöntemiyle TTC agar ve ternitol -7 agar kullanılması önerilmiştir (113). Bu yöntemde en az 48 saate ihtiyaç duyulmaktadır. ISO/TIS standart 16649'da ise TBX agar gibi içerisinde BCIG gibi kromojenik maddeler içeren katı besiyeri kullanılması önerilmektedir. Bu besiyerlerinin maliyetleri yüksektir. Dianez ve ark. (113) AB standardında küçük bir modifikasyon yaparak analiz süresini 24 saate düşürmüş ve bu sayede kromojenik/florojenik besiyerleri kadar başarılı sonuç alınarak bu besiyerlerinin maliyetinden kurtulmanın mümkün olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar 100 ml suyu filtre ettikten sonra filtreyi Tellitol-7 agarda 37°C'de 24 saat inkübe edip filtreyi TBX agara transfer etmişlerdir. inkübasyon 44°C'de 2 saat sürmüştür. Bu sayede referans metotlar kadar başarılı olan bu yöntemi önermişlerdir. Besiyerinde üreyen tipik renkli kolonilerin sayımıyla koliform ve *E. coli* sayımının yeterli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Okerman ve Devriesel (85) *E. coli* biyotiplendirme ve patojenite belirleme çalışmasında tavşan orijinli suşlarda selobiyoz, dulcitol, rafinoz, ramnoz, sorboz, sukroz, ornitin ve hareket testlerinde 4 biyotip çıktığını ve tavşanlarda patojenik

suşların tespitinde bu yöntemin kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada biyotip ile patotip arasında bir ilişki olduğu ortaya konmuştur.

Horman ve Hanninen (58), birçok standart koliform/*E. coli* sayım yöntemini karşılaştırmış ve sularda Colileft 18 ve Adicult gibi metotların 24 saat içerisinde başarılı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Oysa bazılarının o kadar başarılı olmadığı ortaya konmuştur.

York ve ark. (114) 1064 adet klinik önemi olan izolatu (indol pozitif, oksidaz negatif, kanlı agar da yaygın üremeyen, Gram negatif, çubuk, selektif agarlarda üreyen) API 20 E gibi test kitlerine karşılık hızlı ve ucuz test kombinasyonu ile *E. coli* identifikasyonunu sağlamaya çalışmışlardır. Sonuçta EMB veya MacConkey gibi katı besiyerlerinden seçilen kırmızı kolonilere hemoliz, L-PYRRolidonly- beta-naftilamid (PRY), MUG testleriyle laktoz ve indol pozitif, oksidaz negatif testlerinden sonra *E. coli*'yi %99 doğrulukla tanımlayabileceklerini, bu yöntemin kitlere göre %75 daha ucuz ve daha az zaman harcayarak başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Hızlı sonuç bildirilmesi gereken durumlarda bu yöntemin önemli olduğu belirtilmiştir. Toplam 1000 adet *E. coli* suşunun 932 tanesi MUG pozitif, 894 tanesi laktoz pozitif, 294 tanesi hemoliz pozitif olarak tespit edilmiştir.

Osec (87)'in yaptığı çalışmada insan ve hayvan kaynaklı toplam 90 adet *E. coli* O157'nin insana ait 23 adet, sığıra ait 29 adet suşun tamamı ile domuz dışkısına ait 38 adet suşun 11'inin STEK olduğu ve insanda 14 suş, sığırda 21 suşun ise H7 olduğunu tespit etmiştir. Domuz suşlarının tamamı sorbitolu fermente etmiştir. İlginç olarak bu suşların hiçbiri indol pozitif bulunmamıştır. Benzer şekilde sadece domuz suşları maltoz negatif bulunmuştur. Yine domuz suşlarından 23 tanesi MUG pozitif bulunmuştur. 90 suşun tamamı ID 32 E test sistemi ile 10 biyotipe ayrılmış, ancak 14 test tüm suşlarda negatif bulunmuştur. Bu testler üreaz, L-arabitol, 5-ketoglukonat, lipaz, beta-glukosidaz, n-asetil-beta glukozaminidaz, D-arabitol, alfa-glukosidaz, inositol, adonitol, paratinoz, selebiyoz, alfa maltosidaz, malonat, L-aspartik asit akrilamidaz'dır. 7 test tüm suşlarda pozitif sonuç vermiştir. Bu testler alfa galaktosidaz, beta galaktosidaz, trehaloz, mannitol, fenolred, glukoz, L-arabinoz'dur. Sığır dışkısına ait 9 izolat ile domuz dışkısına ait 9 izolat ramnoz negatif, diğerleri ramnoz pozitif bulunmuştur. En değişken testler ornitin, arginin, lizin, sakaroz, ramnoz ve galakturonat testleri olarak ortaya konmuştur. Sorbitol pozitif hiçbir suş

indol pozitif bulunmamıştır. Araştırmacılar bu çalışmada ortaya çıkan fenotipik bulguları domuz *E. coli* O157 suşları ile sığır ve insan O157 suşları arasında bir fark olduğunu ve insan enfeksiyonlarında domuz suşlarının daha az rol oynayacağını tespit etmişlerdir.

Murinda ve ark. (77) Amerika'da 4 çiftlikte barındırılan hayvanların dışkılarında ve diğer kontaminasyon kaynaklarından *Campylobacter*, *Listeria* ve *Salmonella* gibi başlıca patojenlerle birlikte sorbitol pozitif ve negatif STEK suşlarını araştırmışlardır. Araştırmalar hem sorbitol negatif olan STEK O157:H7 ve hem de sorbitol pozitif olan STEK serotiplerinden O157:H7, O26:H11, O111 ve O103 izole etmişlerdir.

Leclercia adecarboxylate'nin fenotipik olarak *E. coli*'ye benzeyen ve insanda oportunistik patojen olan bir bakteri olduğu, bu bakterinin lizin dekarboksilasyonu, malonat asimilasyonu, arabitol ve sellebiyozdan asit oluşturması, fakat adenitol ve sorbitolden asit oluşturamaması *E. coli*'den ayrımını sağladığı bildirilmiştir (107). Bu çalışmada biyokimyasal testlerin yeterli olmadığı fosfolisin duyarlılık testinin yapılması ile bu suşun *E. coli*'den ayrılmasının kolaylaştığı bildirilmiştir.

Baston ve ark. (15), STEK O26 insanlar için oldukça patojenik bir suş olmasına rağmen bu suşa ait rutin kültürel izolasyon ve identifikasyon yönteminin olmadığını, bu organizmayı rutin analizlerle tespit edecek ayırıcı selektif besiyerlerinin geliştirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar suşun üyelerinin %66'sının ramnoz negatif olduğunu bildirmiştir. İncelenen 41 adet O26, 22 adet O111, 6 adet O157 ve 4 adet generik *E. coli* suşunun 27 adet şekerin her birini fermente edip etmedikleri araştırılmış ve tüm suşlarda dekstroz, galaktoz, laktoz, trehaloz ve mannitolün mutlak pozitif; selebiyoz, melezitoz, inositol (O26'nın %4,9'u pozitif), adonitol, eskulin, inulin ve salisin mutlak negatif; ramnoz sırayla %53,7, %86,4, %100 ve %100; sorbitol %92,5, %64,7, %7,14, %80 pozitif olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde dulsitol, sukroz, arabinoz, turanoz, rafinoz gibi şekerlerin değişken olduğu tespit edilmiştir.

Bouhaddioui ve ark. (25) 100 adet insan, hayvan ve deniz ürünü kaynaklı *E. coli* suşunu API 20E testi ile ve spesifik reaktif besiyerleri ile tanımlamaya çalışmışlardır. Suşlar 4 anabiyotip testi ile 11 biyotipe, 6 ilave test ile 43 biyotipe ayrılmıştır.

Araştırmacılar bu metodun *E. coli* suşlarını doğrulamada kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada da bazı şekerlerin izolasyon ve identifikasyonda kullanılmasının gereksiz olduğu, bazılarının ise kullanılmasının yukarıda bildirilen sonuçlara benzer şekilde etkili olduğu ortaya ıktı. Sadece 7 adet suş katalaz negatif bulunmuş ve bu nedenle bu testin tipik *E. coli* izolasyonunda gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır (Tablo 8). Bu suşların tamamının kanat örneklerine ait olması ise katalaz negatiflik ile örnek tipi arasında bir ilişki olup olmadığı konusunda araştırma yapılabileceği izlenimi vermektedir. Benzer şekilde sadece 6 izolatta mannitol negatiflik ortaya çıkmıştır. Bu nedenle mannitol testi de katalaz testi gibi yararlı bir ayırıcı test olma özelliği göstermemiştir.

Test edilen 282 adet suştan 23 tanesi maltoz negatif bulunmuştur (Tablo 9). Bu suşların 3. Grup şeker ve maltoz haricindeki 2. Grup şeker testlerine tabi tutulması sonucunda sadece 5 tanesinin elimine edilebilmesi ile maltoz testinin yerine konulacak bir testin bu çalışmada kullanılan testler arasında ortaya çıkmadığını göstermiştir. Maltoz negatif suş oranının yaklaşık %8 kadar olması da bu testin tipik *E. coli* izolasyonunda önemli olmayıp, 3. Grup şeker testlerinden sonra gerekli ise uygulanması gerektiği üzerinde durulabilir.

Toplam olarak 36 adet suş trehaloz negatif, bunlardan 34 tanesinin süt orijinli olduğu tespit edildi (Tablo 11). Bu bulgular ile Tablo 7'deki sitrat pozitif izolatlara ait bulgular karşılaştırıldığında, süt ve muhtemelen süt ürünlerinde tipik *E. coli* izolasyonu yapılırken sitrat ve trehaloz testlerinde ihtiyaç olabileceği ortaya çıkmaktadır. Bu iki testin incelenen örneğe göre değişkenlik gösterip gösterilmediği daha detaylı araştırmalarla ortaya konmalıdır. Tablo 11 incelendiğinde 36 adet trehaloz negatif izolatın 27 tanesinin 3. Grup şekerlerden selobiyoz, adonitol ve myo-inozitol kombinasyonu (SAM) ile elimine edildiği, 17 tanesinin ise sitrat testi ile elimine edildiği görülmektedir. SAM testinin ardından sitrat testi yapılması durumunda sadece 1 adet suş daha elimine edilmiş idi. Bu sonuç, SAM testinin ardından sitrat testinin yapılmasının gereksiz olduğu sonucuna işaret etmektedir. Hem Tablo 7 ve hem de Tablo 11'in bulguları dikkate alındığında sitrat pozitif ve trehaloz negatif, yani tipik *E. coli* araştırmasında atipik olduğu tespit edilen suşların yaklaşık olarak %70' inin SAM testi ile elimine edildiği ortaya çıkmaktadır. Bu

sonuca göre özellikle süt örneklerinde tipik *E. coli* seçiminde SAM testinin önemli görev yapacağı ortaya çıkmaktadır.

Salisin pozitif izolat sayısı 9 olup toplam suşların yaklaşık %3'ü kadardır (Tablo 12). Bu nedenle bu şekerin 3. Grup şekerlerle birlikte kullanılmasına gerek olmadığı, zira 6 suşu selobiyoz ile elimine etme olanağı olduğu Tablo 12'de görülmektedir. Eskülin pozitif 17 suşun 11 tanesi selobiyoz ile elimine edilmekte idi (Tablo 14). Geriye kalan 6 adet suş için eskülin testi yapmaya gerek olmayacağı, en azından rutin *E. coli* tarama testlerinde durumun böyle olacağına kanaat getirilmiştir.

Selobiyoz, 64 adet suş ile en azla eliminasyon yapan şeker olmuştur (Tablo 13). Bu suşların içerisinde 28 adet suşun eliminasyonunda adonitol ve myo-inozitol kombinasyonu etkili olmuştur. Bu düzeyde eliminasyon yeterli olmayıp SAM'a ihtiyaç olduğu görülmektedir. Zira selobiyozdan sonra adonitol 41 adet ve myo-inozitol 41 adet olmak üzere en etkili eliminasyon şekerleri olduklarını ispatlamışlardır (Tablo 13). Tablo 15'te myo-inozitol pozitif olan 41 adet suşun 40 tanesinin süt örneklerine ait olması, Tablo 16'da ise 41 adet adonitol pozitif suşun 31 tanesinin de süt örneklerine ait olması bu testlerin özellikle süt ve muhtemelen süt ürünlerinde *E. coli* analizinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Bu iki tablo incelendiğinde selobiyoz, myo-inozitol ve adonitol kombinasyonunun süt örnekleri başta olmak üzere yararlı olacağı, sitrat testinin bu testlerden sonra yapılmasının yararlı olabileceği ortaya çıkmaktadır. Tipik *E. coli* tespitinde trehaloz testi kullanılacak ise özellikle süt örneklerinde glukoz ve laktoz yerine trehaloz şekerinin ilk izolasyon besisi yerine ilave etmenin doğru olabileceği ortaya çıkmaktadır. Trehaloz hem salisin pozitif (Tablo 13), hem myo-inozitol pozitif (Tablo 15) ve hem de adonitol pozitif (Tablo 16) suşların eliminasyonunda etkili olacaktır. Ancak daha detaylı olarak araştırılması gerekir.

Finne ve ark. (46), chromocult coliform agarın MacConkey agardan daha başarılı koloni seçimine ve *E. coli* izolasyonuna olanak verdiğini bildirmiştir. Bir materyalden *E. coli* türü içerisinde spesifik bir grubun izolasyonunda kullanılan besiyerleri daha fazla selektivite kazandırmak için araştırmalar devam etmektedir.

Sızkal ve Pal (108), EIEC suşlarının dışkıdan izolasyonunu kolaylaştıran besiyerlerini araştırmıştır. Araştırmacılar bu suşların dışkıdan izolasyonunda

moleküler ve immünolejik identifikasyon testlerinde kullanılmak üzere katı besiyerinden koloni seçerken daha isabetli davranmak için MacConkey veya EMB besiyerleri ile birlikte XLD besiyerinin de kullanılmasını önermiştir. Analiz edilecek örneğin özelliğine göre besiyeri geliştirmek çabaları giderek artmaktadır. Örneğin Chromogenic urinary tract medium (UTI medium) gibi besiyerleri geliştirilmiştir. Bu besiyerleri içerisine konan kromojenik ve florojenik maddeler, besiyerinin selektivitesini ve ilave edilen sodyum azid ve safra asitleri gibi maddeler ile daha saf tipik koloni verilmesi sağlanmaya çalışılmaktadır (45). Buna rağmen mevcut durumda tek veya çoklu ilave teste ihtiyaç vardır.

E. coli O157:H7'nin identifikasyonu sorbitol negatiflik üzerine kurulmuştur. Ancak sorbitol pozitif O157 ve diğer non-O157 serotiplerin izolasyonu için henüz bir metot bulunamamıştır. (94). Posse ve ark. (96) klinik STEK izolatlarının serotip, genotip ve API 50 test kiti kullanarak fenotip yönünden karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, bu çalışmanın sonucunu başlıca non-157 STEK klinik izolatları için yeni izolasyon araçlarının geliştirilmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Klinik örneklerde koliform grubu mikroorganizmalar önemsenmemekle birlikte *E. coli*'nin neden olduğu enfeksiyonlarda ve Re-enfeksiyonlarda izolasyon ve identifikasyon yapılmaktadır. Gıda, dışkı ve su örneklerinde aynı zamanda sayım da yapılmaktadır. Sayım işleminde katı besi yeri veya çoklu tüp metotları kullanılmaktadır. Bu metotların etkinliğini artırmak ve süreyi kısaltmak için *E. coli*'ye has özellikler olan MUG ve ONPG pozitiflik, laktozdan asit ve gaz oluşturmak, indol pozitiflik ve oksidaz negatiflik dikkate alınarak birçok hızlı, ekonomik ve pratik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler özellikle var-yok testlerinde etkili olmaktadır (100). Oysa ileri identifikasyonlarda biyotip, serotip ve genotip önemsenmekte, bu sayede de yeni tipler identifiye edilebilmektedir. Varılan noktada *E. coli* O157:H7'de olduğu gibi birçok test sonucuna göre tipik *E. coli* özelliği göstermeyen patojen suşların tespit edilmesi araştırmacıları biyotiplendirme konusunda yeni ve detaylı çalışmalara sevk etmiştir. Biyotiplendirme ileri identifikasyonların bir ön basamağı olarak başlangıçta tür içerisindeki benzeşen grupları ayırmak ve sonra yapılacak serotip ve genotip tayininde bu gruplardan örnekleme yoluyla birkaç suş seçmek ve analize tabi tutmak suretiyle maddi olanak ve zaman kazanılmaya çalışılmaktadır. Özellikle tekrarlayan kontaminasyonlar

ve/veya enfeksiyonlarda orjin tespitinde biyotip çalışmaları rutin ve ucuz olduğu için öncelikle başvurulan yöntemler olmaktadır. Basit birkaç şeker fermentasyon testi sonucunda önceki biyotipler ile benzerliklerin araştırılması diğer tiplendirme yöntemleriyle kıyaslanamayacak kadar avantajlıdır. Her ne kadar biyotiplendirme yalnız başına ileri identifikasyonda yeterli olmasa da çok sayıda analiz yapılan, bu nedenle iş hacmi yüksek olan merkezler için bu yöntemler oldukça elzem olarak kullanılmaktadır. Biyotiplendirmede en yaygın kullanılan sistem API test sistemidir. Ancak bu sistemin uygulanmasındaki bazı zorluklar ile ekonomik yönü dikkate alındığında daha basit ve hızlı biyotiplendirme yöntemlerine ihtiyaç olduğu öne sürülebilir. Katı bir besiyerine ilk izolasyon besiyerinden bir öze ile bolca kültür alıp içerisinde bilinen şeker ve renk indikatörü bulunan başka bir katı besiyeri üzerine nokta tarzında ekim yapıldığı takdirde 3-6 saat içerisinde net olarak gözlemlendiği bildirilmiştir. Gülmez ve ark. (53), bu yöntemi kullanarak en hızlı, en ekonomik ve güvenilir şekilde biyotiplendirme yapmanın mümkün olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar yukarıda bildirilen metodu kullanarak Sorbitol MacConkey agara salisin, ramnoz, sellebiyoz ve MUG ilave etmiş ve bu besiyerini diferensiyel agar olarak *E. coli* O157:H7 hızlı ön identifikasyonda kullanmışlardır. İlk izolasyon besiyerinden alınan sorbitol negatif koloniler bu besiyerinde %96 oranında atipik kırmızı renk oluşturmuşlardır. Böylece *E. coli* O157:H7 olamayacaklarını ortaya koymuşlardır. Bu örnekten de anlaşıldığı gibi genel olarak bakteri türlerinin, bu çalışmada ise *E. coli*'nin biyotiplendirilmesinde benzer bir yöntem kullanılırsa ileri identifikasyon için zaman kayıpları, iş gücü kayıpları ve ekonomik kayıpların önüne geçilmiş, geliştirilmek istenen yeni yöntemlere kaynak teşkil edilmiş bakteriyoloji konuları daha derinlemesine araştırılmaya uygun hale getirilmiş olacağı kanaatine varılmıştır.

Myerowitz ve ark (80) API 20 E test kiti kullanarak biyotiplendirme ile K1 antijeninin varlığı arasında istatistiksel önemde bir ilişkinin olduğunu ancak biyotiplendirmenin doğrudan K1 antijen varlığında göstermediğini ortaya koymuşlardır.

Gülhan ve ark. (52), 12 farklı tür hayvanın her birinin dışkılarından 50 adet olmak üzere izole ettikleri 600 adet *E. coli* izolatının biyokimyasal, enterotoksijenik ve verotoksijenik özelliklerini incelemiştir. Araştırmacılar sadece sığır, buzağı, koyun

ve kuzu dışkılarından VTEC izole ederken, bu hayvanların yanı sıra kedi, köpek ve kanatlıların dışkılarından hem VTEC hem de ETEC izole etmişlerdir. Araştırmada tespit edilen O157, K99, O1:K1 ve O78:K80 serotiplerinde hayvan türlerine göre yukarıda bildirildiği şekilde bir kümelenme görülmemiştir. Bildirilen serotipler incelenen her tür hayvanın dışkisından izole edilmiştir. Araştırmada suşların sadece %0.5'inin mannitol negatif, %11.2'sinin indol negatif, %63,9'unun dulcitol negatif, %70'inin adonitol negatif, %99.7'sinin sitrat negatif olduğu tespit edilmiştir.

Bielaszewska ve ark. (20), Non-EHEC O157 grubu içerisinde yer alan EHEC O26:H11 ve atipik EPEC O26:NM suşları arasındaki genotipik benzerlikler bu iki suşun aynı evrimsel yoldan geçtikleri ve patojenitede genetik determinantlarının bulgu verecek nitelikte olduğunu ortaya koymuşlardır.

Her ne kadar STEC O157:H7 suşu üzerinde rutin taramalar ve detaylı araştırmalar yapılmış ise de non-O157 STE. coli suşları (O26, O45, O103, O111, O121 ve O145) hakkında detaylı araştırmalar yapılmamıştır (7). Bu nedenle bu suşların insidensi, gidişatı ve epidemiyolojisi detaylı olarak anlaşılmış değildir. Araştırmacılar Stx EIA metodu kullanımının Amerika'da yaygınlaştığını, bunun da kültür yöntemindeki tiplendirme olanaklarını ortadan kaldırdığını ve sonuçta yukarıda bildirilen tek taraflı yönelmeye katkı sağladığı bildirilmiştir. Bu durum karşısında STEC pozitiflik tespit edilen örneklerin daha üst laboratuarlara gönderilerek ileri izolasyon ve identifikasyonda kullanılması gerektiği önerilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar Stx EIA yöntemi SMAC besiyerinden renksiz koloni seçerek yapılan rutin taramanın ortaya koyamadığı, non-O157 STEC suşlarını da ortaya koyduğu için avantajlı olduğunu, ancak kültür metodu yerine konamayacağını bildirmişlerdir.

Pohl ve ark. *E. coli* K99 suşunun izolasyonunda selektif sitrat-adonitol besi yerini önermişlerdir. Bu besiyeri üzerinde tipik koloniler sarı ve atipik kolonilerin mavi üredikleri bildirilmiştir. *E. coli* olmayan sitrat pozitif izolatların tamamının süt örneklerine ait olması sitrat testinin süt örneklerinde yapılmasının yararlı olabileceğine işaret etmektedir. Ancak sitrat pozitif olan 43 izolatın 33 tanesini SAM testi ile elimine etme olanağı ortaya çıkmıştır. Bu durumda sitrat testinden önce SAM testinin yapılmasının daha uygun olacağı düşünülebilecektir. Trehaloz ve myo-inozitol testlerinin kombinasyonu da 31 izolatu elimine etmiştir (Tablo 7). Ancak trehaloz pozitif, myo-inozitol negatif özellik gösterdiği için bu iki testin bir tek

besiyerinde yapılması uygun değildir. Fakat trehaloz, süt örneklerinde sitrat ve laktoz pozitif 43 adet izolatin 25 tanesini elimine ettiği için süt örnekleri ilk izolasyon besiyerine trehaloz ilave etme yerinde bir karar olabilir gibi görünmektedir. Bu konunun detaylı olarak araştırılması gerekir.

Lu ve ark. (71), Chromogenic Coliform and *Escherichia coli* Agar (CCEA)'ın VRBA'dan daha üstün özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Prats ve ark (95), Chromocult agar gibi glukuronidaz aktivitesine dayalı reaksiyon veren besiyerlerinin kullanılmasının temiz su kaynaklarının hijyenik kalitesini belirlemede yeterli olabileceğini bildirmişlerdir. Filius ve ark. (45), 3 farklı kromojenik agar ile MacConkey agarı karşılaştırmış ve Koliform/*E. coli* izolasyonunda en az hatalı pozitif ve negatif sonucu elde etmek için Chromogenic UTI medium ve CHROM agar ikilisinin en başarılı bulunduğu bildirilmiştir. Böylece en doğru ve hızlı identifikasyon yapma olanağının elde edildiği bildirilmiştir. Olstadt ve ark (86), Amerika Çevre Koruma Dairesi (Environmental Protection Agency, EPA) tarafından onay verilen ve suların hijyenik kalitelerinin belirlenmesinde kullanılan 9 farklı metodu karşılaştırmışlardır. Bu metotların ortak özellikleri, kullanılan besiyerlerinin enzim varlığını tespit etmeye yarayacak maddeler içermesidir. Bu metotlar arasında önemli düzeyde farkların ortaya çıktığı ve koliform ve *E. coli* varlığını tespit etmede aynı başarıyı göstermedikleri ortaya konmuştur.

Bonadonna ve ark. (24), koliform grup bakterilerin yeniden taksonomisinde ortaya çıkan karışıklıklardan sonra sulardan koliform ve *E. coli* sayımında önerilen ISO standardında da bazı yetersizlikler ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu metodun koliform ve *E. coli*'nin önemli bir kısmını tayin edemediğini ve grup dışındaki bakterileri hatalı olarak koliform ve *E. coli* olarak kabul ettiğini, oysa DTS/Colilert metodunun ise bu konuda daha iyi olduğunu ortaya koymuşlardır. Bernasconive ark.(17) da ISO metodunun benzer olumsuzluklarından bahsetmiş ve kromojenik m-ColiBlue24 agar ve Colilert 18/Quanty Tray teknolojisi kullanarak koliformların ve *E. coli*'nin daha kısa sürede ve ilave doğrulama testine gerek duyulmadan tespit etme olanağının olduğunu bildirmişlerdir. Morita ve ark. (76), koliformların izolasyonu ve sayımında standart olarak kullanılan VRB agarın araştırmacıların karşılaştırdıkları ve farklı tabakalardan ibaret olan Sanita-kun Coliforms metodundan daha düşük performans gösterdiğini, özellikle dondurulmuş

süt örneklerinde VRB besiyerinde koliform sayılarının önemli düzeyde düşük tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Yapılan araştırmalarda patojenite karakterleri bakımından mevcut bilgiler ışığında atipik *E. coli* olarak tanımlanan suşlar hem gıda hem de klinik materyallerden izole edilmektedir (28, 4). Bununla birlikte tipik *E. coli* özlelikler bakımından farklı olan *E. coli* suşlarının da enfeksiyonlara neden olduğu yönünde raporlar artmaktadır.

Nicoletti ve ark. (83), Somali’de çocukların ishaline neden olan 64 adet laktoz negatif *E. coli* suşu izole etmişlerdir. Bu suşların 23 tanesinin O4 serotipine ait olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, bu serotipin Somali’de aderent-hemolitik *E. coli*’nin ishallerdeki rolü tartışılmıştır.

Beutin ve ark. (19), Almanya’da hasta insanlardan 3 yıl süre ile izole ettikleri 677 adet STEC suşunun tiplendirilmesini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada 41 adet serotipin daha önce insan patojeni veya izolatu olduğunun bildirilmediğine dikkat çekilmiştir. Araştırmacılar yeni serotiplerin de enfeksiyonlardan sorumlu olduğunu tespit etmişlerdir. Beutin ve ark. (19), 219 adet gıda kaynaklı STECsusunun gruplandırılmasında ve düşük veya yüksek risk oluşturan grupların belirlenmesinde serotip tayini ve Stx geninin varlığının tespit edilmesinin yararlı olduğunu bildirmişlerdir.

Flores Abuxapqui ve ark. (1), biyolojik ve moleküler testlerin pahalı ve zor olduğunu bildirdikten sonra yaptıkları araştırmanın sonucunda küçük diagnostik laboratuvarları için daha ucuz ve kolay olan mukus oluşturma, lizin ve ornitin dekarboksilasyonu ve hareket testlerinden ibaret 4’lü bir testi enteroinvaziv *E. coli* lerin ön identifikasyonunda kullanmayı önermişlerdir.

Nishikawa ve ark (103) Japonya’da yaptıkları araştırmada ishallerden izole ettikleri *E. coli* suşlarının sporadik ishallerde salmonelladan yaygın olduğunu, *E. coli* %73 oranında ishal etkeni olarak izole edilirken, salmonellanın %6.8 oranında ishal etkeni olarak izole edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmada sadece EHEC değil diğer patotiplerin de yaklaşık oranlarda ishal etkeni oldukları, ishale neden olan *E. coli*’nin tiplendirilmesinde PCR uygun iken, serotiplendirmenin uygun olmadığı, bu etkenlerin patojenik gruplarını belirlemede yeni metotlara önemle ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir. Gordon ve ark. (49), farklı cinsiyet ve farklı yaştaki bireylerin

arasındaki morfolojik, fizyolojik ve beslenme farklılıkları taşıdıkları *E. coli* genotipleri üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada sadece 4 adet suş ikinci defa spot test yöntemi ile laktoz testine tabi tutulduğunda laktoz negatif olduğu gözlenmiştir (Tablo 18). Bu düzeyde hatalı pozitiflik gözlenmesi, ilk izolasyon besi yerinden tipik kolonilerin öze ile alınarak diferensiyel özellikli bir katı besiyerine spot test yöntemi ile ekilmesinin güvenilir olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada glukoz veya laktoz içeren selektif bir ilk izolasyon besiyeri üzerinden yeterli sayıda tipik koloni seçtikten sonra 17 adet farklı şeker testinin tipik *E. coli* tespitinde ve biyotiplendirmede hangi olanaklarla kullanılabileceğini tespit etmek amacıyla 282 koloni ve aynı zamanda sadece kanat örneklerine ait kolonilerden atipik olan glukoz negatif 47 adet koloni de aynı sayıda şeker ile test edildi. Toplam 47 adet suştan sadece 6 tanesi 3. Grup şekerler ile elimine edilebildi. Bu bulguya göre 3. Grup şekerlerin hatalı pozitif koloni seçiminin ortaya çıkaracağı olumsuzlukları gideremeyeceği ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte 3. Grup şekerler glukoz negatif *E. coli* izolasyonunda da kullanılabilceğini göstermiştir. Ancak daha önce de değinildiği gibi süt örneklerinde tipik *E. coli* izole etmede ilk izolasyon besiyeri içerisine laktoz yerine trehaloz kullanılması önerilmişti. Tablo 19'daki gibi laktoz yerine trehaloz kullanılması durumunda kanat örneklerine ait ilk izolasyon katı besiyerinde 26 adet laktoz negatif suşun trehaloz pozitif olarak üreyeceği, bu durumda pozitif reaksiyonlu suş sayısının artacağı ortaya çıkmaktadır. Bu tablodan anlaşılacağı gibi laktoz, maltoz ve mannitol sonucu daha önceki tablolarda paralellik gösterirken, trehaloz sonucunun farklı olması *E. coli* türü içerisinde trehaloz pozitif ve negatifliğin fenotip, serotip ve genotip belirlemede hangi sonuçları vereceğinin detaylı olarak araştırılması gereğini ortaya çıkarmaktadır.

Mikroorganizmaların fenotipik özelliklerinin tespit edilmesi temel mikrobiyolojinin konularından biri olarak öncelikli mikrobiyolojik tiplendirme çabaları içerisinde ortaya çıkmıştır. *E. coli*, biyotipik özellikleri en çok araştırılan bakterilerden biridir. Bunun nedeni *E. coli*'nin hijyen indikatörü olarak kabul edilmesi ve gıda ve su örneklerinde rutin olarak araştırılmasıdır. *E. coli*'nin tiplendirilmesi üzerinde araştırmalar detaylandırıldıkça, yeni biyotipler, serotipler ve genotipler ortaya çıkarılmaktadır. Biyotip çalışmalarında elde edilen bulgularda

bilinen tipik *E. coli* özelliğinden farklı özelliklerde olan suşların hastalık etkeni olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu bulguların ardından biyotip, serotip ve genotip arasında ilişkilerin olup olmadığı ve elde edilecek bazı benzerliklerin daha hızlı, daha ucuz ve daha kolay bir şekilde izolasyon ve identifikasyon yapmada kullanılabilme olanakları araştırılmaya başlamıştır. Bu konuda yukarıda bildirildiği gibi bazı benzerlikler ve temsiller tespit edilmiştir. Bu konu hakkında araştırmaların daha da detaylanarak devam ettirileceği tahmin edilmektedir. Bu çalışmanın aksine daha geniş kapsamlı araştırmalar yapılarak incelenen örneklerde mikroflora içerisindeki tipik *E. coli* izolatlarının benzerlikleri, bunların fenotipik, serotipik, genotipik ve patojen karakterleri arasındaki benzerlikleri, bulaşma kaynağı ve iklim koşulları ile ilişkilendirilerek daha değerli bulgular elde edilecektir. Bu bulgular öncelikle basit, hızlı ve ucuz izolasyon ve identifikasyon tekniklerinin tespitine, belki de her bir örnek için ayrı bir metot önermeye yol açacaktır. Mevcut durumda temel izolasyon besi yeri olarak kabul edilen Violet Red Bile lactose agar besiyeri, IMVIC testleri, API test kitleri hakkında alternatif öneriler sunulmaktadır. Bir tek suş, örnek olarak *E. coli* O157:H7 araştırılması için Sorbitol MacConkey Agar kullanılmakta iken, sorbitol pozitif *E. coli* O157 suşlarının da hastalıklardan sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Özetle, izolasyon ve identifikasyon yöntemleri de bu bulgularla birlikte değiştirilmek zorunda kalmaktadır. Mevcut durumda konu hakkında bir karmaşa yaşanmaktadır. Daha detaylı araştırmalar ile bu karmaşadan kurtulmak kolay olabilecektir.

Yapılan bu çok dar kapsamlı çalışma sonucunda, gıda ve dışkı örneklerinden tipik *E. coli* izolasyonunda ilk izolasyon katı besiyeri içerisinde laktoz yerine trehaloz ilave etmenin avantaj ve dezavantajlarının detaylı olarak araştırılması, ilk izolasyon besiyerinden seçilen kolonilere IMVIC testi yerine selobiyoz, adonitol ve myo-inozitol (SAM) kombinasyonu ile hazırlanmış diferensiyel (ayırıcı) bir katı besiyeri üzerinde spot test yöntemi ile ekim yapılması, 3–6 saat içerisinde kırmızı renkte üreyen kolonilerin elimine edilmesi, renksiz kolonilerin ise en muhtemel *E. coli* olarak kabul edilmesi, şayet elde çok sayıda suş kalmış ise önce indol ve gerekli ise sitrat testlerinin yapılması *E. coli* izolasyonu ve identifikasyonunda hızlı, ucuz ve basit bir yöntem olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, glukoz, laktoz, maltoz, mannitol ve trehalozdan ibaret 5'li şeker grubundan sadece trehalozun farklı bulgular verdiği

ve bu durumun detaylı olarak araştırılması gerektiği sonucuna varıldı. Sakkaroz, galaktoz, dulsitol, ksiloz, ramnoz ve sorboz ise yukarıda bildirilen identifikasyon testlerinden sonra biyotiplendirme çalışmalarında kullanılabilir nitelik göstermiştir. Bu yöntemlerin son yıllarda oldukça yaygın olarak kullanılmaya başlanan kromojenik ve florojenik besiyerleri ile kombine edilmesi durumunda ortaya çıkacak olan tablo merak konusu olabilir niteliktedir. Dar kapsamda yapılan bu çalışmanın daha geniş kapsamda yapılması ve hali hazırda stoklarda bulunan tanımlanmış binlerce suşa uygulanması, geniş saha çalışmalarının yapılması *E. coli* izolasyonu ve identifikasyonuna yeni bir boyut kazandırabilir.

5. ÖZET

E. coli hijyen indikatörüdür ve gıda ve su örneklerinden *E. coli* izolasyonu ve identifikasyonu standart bir işlemdir. Bu standart işlem için geçerli metotların son yıllarda detaylı epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabilecek kadar *E. coli*'nin tüm suşlarını izole etmeyi garanti etmediği anlaşılmıştır. Besi yerleri spesifik hale getirildikçe ortaya koyduğu bakteriyel etkenler de bir suşa ve hatta bir alt suşa kadar düşmektedir. Bu durum epidemiyolojik araştırmalar için uygun değildir. *E. coli*'nin epidemiyolojik araştırılmasında bu türün tüm üyelerinin izolasyonunu sağlayacak bir katı besiyeri ile ilk izolasyona başlamak gerekir. Bunun için kullanılan besiyerleri içerisinde laktoz ve fenol red gibi renk indikatörü boyalar yer almaktadır. Bu besiyerinden koloni seçiminin ardından bu kolonilerin *E. coli* olup olmadığını doğrulamak için en az 18 saat gerekmektedir. Bu çalışma, ilk izolasyon besiyerinden elde edilen şüpheli koloniler arasından en ekonomik, basit ve hızlı bir şekilde tipik *E. coli*'nin izolasyonunu ve gruplandırılmasını sağlayabilecek şekerlerin tespit edilmesi amacıyla yapıldı. Sonuçta, süt örneklerinde *E. coli* izolasyonunda kullanılacak ilk izolasyon besiyerine laktoz yerine trehaloz katmanın bir seçenek; laktoz yerine selobiyoz, adonitol ve myo-inozitol (SAM) ilave etmenin ve bu besiyeri üzerinde üreyen renksiz kolonileri seçmenin başka bir seçenek; SAM besiyerinin ayırıcı agar olarak kullanılabileceği de seçeneklerden biri olarak tespit edilmiştir. Sakaroz, galaktoz, dulsitol, ksiloz, ramnoz ve sorbozun hepsi veya bir kaç biyotip profilleri oluşturmada kullanılabilir. Bu testlerin katı besiyeri üzerinde yapılması her zaman elde koloni bıraktığı için daha avantajlıdır. Katı identifikasyon ve biyotiplendirme besi yerleri üzerine koloniden spot ekim, 3–6 saat inkübasyondan sonra renkli veya renksiz kolonilerin seçimi gerekmektedir. Bu yöntemler epidemiyolojik araştırmalar ve yoğun iş yükü olan laboratuvarlar için kolay, ucuz ve kabul edilebilir düzeyde hızlı olarak değerlendirilmiştir. Daha detaylı araştırmalar ile türe ait serotip, biyotip ve genotipler arasındaki ilişki ile incelenen örneğin özellikleri arasındaki ilişkilerin net olarak ortaya çıkarılması gerekmektedir.

6.SUMMARY

E. coli is a hygiene indicator, and isolation and identification of *E. coli* from foods and water is a standard procedure. It is understood in last years that the methods used in these standard procedures do not guarantee isolating all strains of all strains of *E. coli* in detailed epidemiological investigations. When media became more specific, then targeted organism became only one strain or substrain. This situation is not appropriate for epidemiologic investigations. For epidemiologic investigations *E. coli*, it is necessary to start with a plating medium that enable to isolation of all strains of this organism. For this reason, the medium contains lactose and color indicator dyes such as phenol red. A minimum 18 h is necessary for isolation and identification of strains selected from this plating medium. In this study, it is aimed to determine the fast, cheap and easy way of isolation and grouping of typical *E. coli* strains selected from primary isolation medium by using carbohydrates. Finally, it is determined that addition of trehalose to primary isolation medium for lactose may be one choice only for analysis of dairy samples; addition of cellobiose, adonitol and myo-inositol combination (CAM) for the lactose, then selection of colorless colonies from the medium may be another choice; and use of CAM medium as differential medium may also be one another choice. Saccharose, galactose, dulcitol, xylose, rhamnose and sorbose may be used in combinations for making biotype profiles. Making these test on plating medium is advantageous since colony of strains remains in hands after analysis. Spot inoculation from one plating medium to other biotyping or identification plating medium and selection of colored or colorless colonies after incubation of the medium for a 3 to 6 h is needed. These methods were evaluated as fast, easy and cheap for epidemiological investigations especially carried out in busy laboratories. More detailed investigations should be made for the determining correlations between serotypes, biotypes and genotypes comparatively with type of sample analysed.

7.KAYNAKLAR

1. Abuxapqui, F.JJ., Suárez, H.G.J., Heredia, N.M.R., Puc Franco, M.A., Vivas Rosel, M.L.: Four biochemical tests for identification of probable enteroinvasive *Escherichia coli* strains. *Rev Latinoam Microbiol.* 41(4): 259–61, 1999.
2. Adalberto, A., Valdes-Dapena, M., Ramirez, M., et al.: Study of correlation between negative sorbose *E. coli* strains and their enterotoxin-producing capacity. *Rev Cubana Med Trop.* vol.58, no.1, 0–0, 2006.
3. Akçelik, M.: Mikroorganizmalar ve Taksonomik Özellikleri. İn: Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. Halkman, A.K.(Edt.): 2. baskı, Başak matbaacılık. Ankara, 2000.
4. Alikhani, MY., Mirsalehian, A. and Aslani, M.M.: Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. *J Med Microbiol.* 55, 1159–1163, 2006.
5. Amstey, M. S., Casian-Colon, A. E.: Septicemia due to multiple biotypes of *Escherichia coli* *Obstetrics & Gynecology.* 90: 667–668, 1997.
6. Andreotti, P.E., Ludwig, G.V., Peruski, A.H., Tuite, J.J., Morse, S.S., Peruski Jr, L.F.: Immunoassay of Infectious agents. Reprinted with permission from *BioTechniques* 35: 850–859, 2003.
7. Anon.: Laboratory-Confirmed Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* - Connecticut, 2000—2005. *MMWR*, January 19, 2007 / 56(02);29-31. (İnternet Materyali: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5602a2.htm>. Erişim Tarihi. 2008).
8. Anonim: American Public Health Association. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3rd(Edt.). APHA, Washington, DC, 1992.
9. Anonim: American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th(Edt.). APHA, Washington, DC, 1998.

10. Anonim: Centers for Disease Control and Prevention. 1993. Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 42: 258–263. 1992–1993.
11. Anonim: Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 45: 44, 1996.
12. Anonim: [Http://www.ifr.brsc.ac.uk / Public/FoodInfoSheet](http://www.ifr.brsc.ac.uk/Public/FoodInfoSheet), (İnternet Materyali Erişim Tarihi. 2008).
13. Anonim: [Http://www.ifr.brsc.ac.uk / Public/FoodInfoSheet](http://www.ifr.brsc.ac.uk/Public/FoodInfoSheet), (İnternet Materyali Erişim Tarihi. 2007).
14. Arda, M.: Temel Mikrobiyoloji. 2. baskı, 13–15. Ankara, 1999.
15. Batson, S.D., Murinda, S.E., Nguyen, L.T., Oliver, S.P.: Phenotypic and genetic characterization of *E. coli* O26 isolates from North America using carbohydrate fermentation and genes encoding virulence factors. http://animalscience.ag.utk.edu/annual_reports_all.html, 2002.
16. Don J, Brenner., Noel R, Krieg., John G. Holt(Edt.).Facultatively Anaerobic Gr negative Rods. In Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology. Vol.1.410–419, 1983.
17. Bernasconi, C., Volponi, G., Bonadonna, L.: Comparison of three different media for the detection of *E. coli* and coliforms in water. Water Sci Technol. 54 (3): 141–5, 2006.
18. Bettelheim, K.A., Kuzevski, A., Gilbert, R.A., Krause, D.O., McSweeney, C.S.: The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. Journal of Applied Microbiology, 98: 3, 699-709, 2005.
19. Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K. and Albrecht, N.: Identification of Human-Pathogenic Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Food by a Combination of Serotyping and Molecular Typing of Shiga Toxin Genes. Applied and Environmental Microbiology. 73(15): 4769–4775, 2007.
20. Bielaszewska, M., Sonntag, A.K., Schmidt, M.A., Karch, H.: Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in

- atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. *Microbes and Infection*. 9(7): 891–897, 2007.
21. Bilgehan, H.: “*Escherichia*” Prof. Dr. Hakkı Bilgehan,: Klinik Mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, 10. baskı, 3–17, İzmir, 2000.
 22. Bilgin, Y.: *Escherichiae coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacterbaumannii ve Staphylococcus aureus* suşlarında çeşitli aminoglikozidlerin duyarlılıklarının araştırılması (uzmanlık tezi) İstanbul, 2006.
 23. Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Balaguer, L., Mourino, M., Juarez, A., Jansen, W.H.: O serogroups, biotypes, and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 12, 3101–3107, 1996.
 24. Bonadonna, L., Cataldo, C., Chiaretti, G., Coccia, A., Semproni, M.: A new method for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in water intended for human consumption. *Ig Sanita Pubbl.* 61(6): 569–84, 2006.
 25. Bouhaddioui, B., Aissa, R.B., Boudabous, A.: Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from man and seafood. *Bull Soc Pathol Exot.* 91(4): 6–283, 1998.
 26. Buckalew, D.W., Hartman, L.J., Grimsley, G.A., Martin, A.E , Register, K.M.: A long-term study comparing membrane filtration with Colilert defined substrates in detecting fecal coliforms and *Escherichia coli* in natural waters. *Journal of Environmental Management.* 80(3): 191–197, 2006.
 27. Camguilhem, R., Milon, A.: Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains. *J Clin Microbiol.* 27(4): 743–747, 1989.
 28. Carneiro, L.A.M., Lins, M.C., Garcia, F.R.A., Silva, A.P.S., Mauller, P.M., Alves, G.B., Rosa, A.C.P., Andrade, J.R.C., Freitas, A.C., Almeida and Queiroz, M.L.P.: Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from

- pasteurised milk. *International Journal of Food Microbiology*. 108(1): 15–21, 2006.
29. Como-Sebetti, K., Reagan, K.S., Alaire, S., Parrott, K., Simonds, C.M., Hrabowy, S. et al.: Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 46: 741–744, 1997.
 30. Crichton, P. B., Old, D. C.: Biotyping of *Escherichia coli*. *The Journal of Medical Microbiology*. 12(4): 473–486, 1979.
 31. Crichton, P.B., Taylor, A.: Biotyping of *Escherichia coli* in microwell plates. *Br J Biomed Sci*. 52(3):173–7, 1995.
 32. Çakır, İ., Doğan, B.H., Başpınar, E., Keven, F., Halkman, A.K.: The need for confirmation in coliform and *E. coli* Enumeration in Foods . *Turk J. Vet. Anim. Sci.*26, Received, 1049–1053, 2001.
 33. Çakır, İ.: Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları, Koliform Grup Bakteriler ve *E. coli*, (Edt.) : Halkman, A. K. 2. baskı, Başak matbaacılık. 335–343. Ankara, 2000.
 34. Dona, S., Franczy and Robert, A. Darner.: Comparison of methods for determining *Escheiichia coli* concentrations in Recreational waters, *Wat. Res.* 34(10): 2770–2778, 2000.
 35. Doyle, M.P., Schoeni, J.L.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2394–2396, 1987.
 36. Eijkman, C.: 1904. Die garungsprobe bei 46° als hilfsmittel bei der trinkwasseruntersuchung. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig.* 37: 742. Almanca (Alınmıştır: P, Feng., Stephen, D. Weagant., Michael, A. Grant.: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Revised: 2002-September.: *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edt, Revision A, Chapter 4, 1998.
 37. Eley, A.R.: Infective Bacterial Food Poisoning. In "Microbial Food Poisoning. Ed A.R. Eley. Chapman & Hall London, 191, 15-35, 1992.
 38. Entis, P.: Hydrophobic grid membrane filter/MUG method for total coliform and *Escherichia coli* Enumeration in foods: collaborative study. *J. Assoc. Anal. Chem.* 72: 936–950, 1989.

39. Erdem, B.: “*Enterobacteriaceae*” Prof. Dr. Ş, Ustaçelebi. (Edt.): Temel ve Klinik mikrobiyoloji, 1. baskı, 471–515. 1999.
40. Erdem, B.: *Enterobacteriaceae*, In: Ustaçelebi Ş, (Edt.): Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı, sf.471–515. Ankara, 1999.
41. Escherich, T.: Die darmbakterien des neugeborenen und sauglings. Fortshr. Med. 3:5–15–522, 547–554, 1885. (Alınmıştır: P, Feng. , Stephen D. Weagant. , Michael A. Grant. : Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Revised: 2002-September.: Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, Chapter 4, 1998).
42. Feng, P., Hartman, P.A.: Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1320–1329, 1982.
43. Feng, P., Weagant, S.D., Grant, M.A.: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 4, Revised. 2002.
44. Feng, P., Weagant, S.D.: Bacteriological Analytical Manual, 8th (Edt), Revision A, 2002
45. Filius, P.M.G., Van Netten, D., Roovers, P.J.E., Vulto, A.G., Gyssens, I.C., Verbrugh H.A., Endtz, H.P.: Comparative evaluation of three chromogenic agars for detection and rapid identification of aerobic Gram-negative bacteria in the normal intestinal microflora. Clinical Microbiology and Infection. 9(9): 912-918, 2003.
46. Finney, M., Smullen, J., Foster, H.A., Brokx, S., Storey, D.M.: Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* from faecal samples from healthy subjects. J Microbiol Methods. 54(3): 353–8, 2003.
47. Frederick, J., Buckwold, A.R., Ronald, G.K., Harding, M., Thomas, J., Marrie, Linda Fox., Claudette Cates.: Biotyping of *Escherichia coli* by a simple multiple-inoculation agar plate technique. Journal of Clinical Microbiology. 10(3): 275–278, 1979.
48. Fujisawa, T., Sata, S., Aikawa, K., Takahashi, T., Yamai, S., Shimada, T.: Evaluation of sorbitol-salicin MacConkey medium containing cefixime and tellurite (CT-SSMAC medium) for isolation of *Escherichia coli* O157:H7

- from raw vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1–2): 161–163, 2002.
49. Gordon, D.M., Stern, S.E. and Collignon, P.J.: Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology* 151, 15–23, 2005.
50. Griffin, P.M., Tauxe, R.V.: The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other Enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome, *Epidemiol, Rev.* 13: 60–98, 1991.
51. Griffin, P.M.: *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*.: In Blaser MJ, Simith PD, Ravdin Jİ, Greenberg HB, Guerrant RL. (eds.). *Infections of the gastrointestinal tract*. New York. Raven Pres. 739–61, 1995.
52. Gülhan, T.: Sağlıklı Görünen Hayvanların Dışkılarından İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Biyokimyasal, Enterotoksijenik ve Verotoksijenik Özelliklerinin Belirlenmesi. *YYÜ. Vet. Fak. Derg.* 14 (1): 102–109, 2003.
53. Gülmez, M., Vatansever, L., Güven, A., Duman B., Sezer, Ç. “Use of salicin-cellebiose-4-methyumbelliferyl- β -D glucuronide-sorbitol MacConkey (SRC-MUG-SMAC) differential agar fort he presumptive identification of *Escherichia coli* O157:H7 from primary isolation step”. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29, 1137–1141, 2005.
54. Halkman, A.K., Noveir, R.M., Doğan, B.H.: *Escherichia coli* O157:H7 Serotipi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 2001.
55. Hara-Kudo, Y., Ikedo, M., Komatsu, O., Yamamoto, S., Kumagai, S.: Evaluation of a chromogenic agar medium for isolation of *Escherichia coli* O26. *Food Control*. 13(6–7): 377–379, 2002.
56. Harigan, W.F.: *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3.baskı.166–167, 1998
57. Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J.B., Dougan, G., Phillips, A.D.: Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli*

- adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect. Immun.* 6: 1570–1578, 1998.
58. Hörman, A., Hänninen, M.L.: Evaluation of the lactose Tergitol-7, m-Endo LES, Colilert 18, ReadyCult Coliforms 100, Water-Check-100, 3M Petrifilm EC and DryCult Coliform test methods for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples. *Water Research.* 40(17): 3249–3256, 2006.
 59. Hu, Y., Zhang, Q., Meitzer, J.C.: Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 87: 867–876, 1999.
 60. Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kuda, Y., Saito, N.Y.N., Konuma, H., Kumagai, S.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1532–1535, 1998.
 61. Jeffrey, W. H., Nazaret, S., Von Haven, R.: Improved method for recovery of mRNA from aquatic samples and its application to detection of mer expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1814–1820, 1994.
 62. Jill E, Clarridge.: Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology reviews*, Vol.17, No. 4. 840–862, 2004.
 63. Karch, H., Bielaszewska, M.: Sorbitol-fermenting Shiga toxin –producing *Escherichia coli* O157:H7 strains: Epidemiology phenotypic and molecular characteristics, and Microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol* 39: 2043–2049, 2001.
 64. Karmali, M.A.: Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol. Rev.* 2: 15–38, 1989.
 65. Kasweck, K.L., Fliermans, C.B.: Lactose Variability of *Escherichia coli* in Thermally Stressed Reactor Effluent Waters *Appl Environ Microbiol*, 36(5): 739-746, 1978.
 66. Kuby, J.: *Immunology: Antigen- Antibody Interactions*, 3. (Edt) .Chapter 6. 156-164, Pub: Feeman, 1998.

67. Lebaron, P., Henry, A., Lepeuple, A.S., Pena, G., Servais, P.: An operational method for the real-time monitoring of *E. coli* numbers in bathing waters. *Marine Pollution Bulletin*. 50(6): 652–659, 2005.
68. Lehmacher, A., Bockemühl, J.: l-Sorbose utilization by virulent *Escherichia coli* and Shigella: Different metabolic adaptation of pathotypes. *International Journal of Medical Microbiology*, 297: 4, 245–254, 2007.
69. Leomil, L., Pestana de Castro, A.F., Krause, G., Schmidt, H., Beutin, L.: Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species *FEMS Microbiology Letters*, Volume 249, Issue 2, 335-342, 2005.
70. Lindahl, T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715, 1993.
71. Lu MF., Wu QP., Cai ZH., et al.: Evaluation on effects of chromogenic medium in rapid detection of Coliform and *Escherichia coli*. (English *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2007 Jul; 41(4):307–10 (abstract).
72. Manafi, M.: Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *Int. J. Food Microbiol.* 31: 45–58, 1996.
73. Martins, M.T., Rivera, I.G., Clark, D.I., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., Olson, B.H.: Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of β -glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide media. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2271–2276, 1993
74. McDaniels, A.E., Rice, E.W., Reyers, A.L., Johnson, C.H., Haugland, R.A., Atelma, G.N.Jr.: Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotype and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -D- glucuronidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3350–3354, 1996
75. Monday, S.R., Beisaw, A., Feng, P.C.H.: Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes.* 21(4): 308–311, 2007.
76. Morita, H., Ushiyama, M., Aoyama, S., Iwasaki, M., Andrews, W.H., Betts, R., Brodsky, M.H.: Evaluation of the Sanita-kun Coliforms, a

- Dehydrated Medium Sheet for Coliform Detection: *Performance-Tested Method* 100402. 1060-3271: 89, 399-416, 2006.
77. Murinda, S.E., Nguyen, L.T., Nam, H.M., Almeida, R.A., Headrick, S.J., Oliver, S.P.: Detection of sorbitol-negative and sorbitol-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Foodborne Pathog Dis.* 1(2): 97–104, 2004.
 78. Murinda, S.E., Roberts, R.F., Wilson, R.A.: Evaluation of colicins For Inhibitory Activity Against Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains, Including Serotype O157:H7. *Appl Envr Micro.* 62(9): 3196-3202, 1996.
 79. Murphy, M., Carroll, A., Walsh, C., Whyte, P., O'Mahony, M., Anderson, W., McNamara, E., Fanning, S.: Development and assessment of a rapid method to detect *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in retail minced beef. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 210 (2): 155–161, 2007.
 80. Myerowitz, R.L., Albers, A.C., Yee, R.B., Orskov, F.: Relationship of K1 antigen to biotype in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology.* 124–127, 1977.
 81. Nataro, J.P., Kaper, J.B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 132–201, 1998.
 82. Nicoletti, M., Superti, F., Conti, C., Calconi, A. and Zagaglia, C.: Virulence factors of lactose-negative *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Somalia. *J Clin Microbiol.* 26(3): 524–529, 1988.
 83. Nicoletti, M., Superti, F., Conti, C., Calconi, A., Zagaglia, C.: Virulence factors of lactose-negative *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Somalia. *J Clin Microbiol.* 26(3): 524–529, 1988.
 84. O'Brien, A.D., La Veck, G.D., Thompson, M.R., Formal, S.B.: Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect Dis,* 146: 763–769, 1982.
 85. Okerman, L., Devriese, L. A.: Biotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* strains from rabbits. *Journal of clinical microbiology.* 22(6): 955–958, 1985

86. Olstadt, J., Schauer, J.J., Standridge, J., Kluender, S.: A comparison of ten USEPA approved total coliform/ *E. coli* tests. *J Water Health*. 5(2): 267–82, 2007.
87. Osek, J.: Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans, cattle and pigs. *Veterinarná Medicína*. 49(9): 317–326, 2004.
88. Özbal, Y.: Tıbbi mikrobiyolojiye giriş ve mikroorganizmaların canlılar alemindeki yeri. http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Temel_tip/Mikrobiyoloji/Yusuf_Ozbal/y.%C3%B6zbal/D%C3%B6nem%20I.pdf. 2008.
89. Paciorek, J.: Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. *J. Med. Microbiol* 51: 548–556, 2002.
90. Park, S., Worobo, R., Durst, R.: *Escherichia coli* O157:H7 As an Emerging Foodborne Pathogen: A Literature Review. *Critical Reviews in Food Sci and Nutrition*. 39: (6), 481-502, 1999.
91. Peeters, J.E., Geeroms, R., Orskov, F.: Biotype, serotype, and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infect Immun*. 56(6): 1442–1448, 1988.
92. Penteadó, A.S., Ugrinovich, L.A., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Andrade, J.R.C., Corrêa, S.S., Pestana de Castro A.F.: Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *Veterinary Microbiology*. 89(1–2): 41–51, 2002.
93. Pitkanen, T., Paakkari, P., Ilkka, T.M., Tanski, H.H., Paulin, L., Hainnen, M.L.: Comparison of media for Enumeration of Coliform Bacteria and *Escherichia coli* in non-disinfected water. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 522–529, 2007.
94. Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., Herman, L.: Metabolic and genetic profiling of clinical O157 and non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*. 158(7): 591–599, 2007.

95. Prats, J., Garcia-Armisen, T., Larrea, J., Servais, P.: Comparison of culture-based methods to enumerate *Escherichia coli* in tropical and temperate freshwaters. *Letters in Applied Microbiology*. 46 (6): 243–248, 2008.

Revision A, 1998. Revised: 2002.

96. Richard L, Myerowitz., Albers, A.C., Yee, R.B., Orskov, F.: Relationship of K1 antigen to biotype in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 124–127, 1977
97. Rice, E.W., Covert, T.C., Johnson, S.A., Reasoner, D.J.: Detection of *Escherichia coli* in water using a colorimetric gene probe assay. *J. Environ. Sci. Health A* 30: 1059–1067, 1995.
98. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, G.S., Johnson, L.M. , Hargett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L. : Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escheichia coli* serotype O157:H7. *N. Engl. J. Med.* 308: 681–685, 1983.
99. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.: *Immunological Techniques*. In: *Immunology*, 4.edition. Chapter 28. Edt: Louise Cook. Pub: Dianne Zack. London, 1996.
100. Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., Roubin, M.R., Laurent, P.: Detection and enumeration of coliforms in drinking water, Current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. 49(1): 31–54, 2002.
101. Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurión, D., Navarro, A., Molina, J., Inzunza, A., Cravioto, A., Eslava, C.: Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 71(2–3): 169–176, 2001.
102. Salina, P., Nancy C, Hodge., Robert, E.S., Samuel, R.Farah. and Mark, Tamplin.: Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*. *Wat. Res.* 35(2): 379–386, 2001.
103. Sarantuya, J., Nishi, J., Wakimoto, N., Erdene, S., Nataro, J.P., Sheikh, I.M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M., Miyata, K., Kawano, Y.: Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent

- pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. J Clin Microbiol. 42 (1): 133–9, 2004.
104. Sela, M., Anfinsen, C.B., Harrington, W.F.: The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochem. Biophys. Acta* 26–502, 1957.
105. Sert, S.: Genel mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No:195 Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzurum, 1997.
106. Sheridan, G.E.C., Masters, C.I., Shallcross, J.A., Mackey, B.M.: Detection of Mrnaby reverse transcription PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1313–1318, 1998.
107. Stock, I., Burak, S., Wiedemann, B.: Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adecarboxylata* strains. *Clin Microbiol Infect.* 10(8): 724–33, 2004.
108. Szakál, D., Pál, T.: Comparison of media for the selective culture of enteroinvasive *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22(4): 235–41, 2003.
109. Tunail, N.: Mikrobiyel İnfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. (Alınmıştır: Bilgin,Y.: *Escherichiae coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacterbaumannii* ve *Staphylococcus aureus* suşlarında çeşitli aminoglikozidlerin duyarlılıklarının araştırılması (uzmanlık tezi) İstanbul, 2006.
110. Uyuendaele, M., Basliaansen, A., Debevere, J.: Evaluation of the NASBA nucleic acid amplification system for assessment of the viability of *Campylobacter jejuni*. *Int. J. Food Microbiol.* 37: 13–20, 1997.
111. Van der Vilet, G.M.E., Schepers, P., Schukkink, R.A.F., Van Gemen, B., Klatser, P.R.: Assessment of mycobacterial biability by RNA amplification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1959–1965, 1994.
112. Ware, J.M., Abbott, S.L., Janda, J.M.: A new diagnostic problem isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains with aberrant biochemical properties. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 38(3): 185–187, 2000.

113. Yáñez, M.A.V., Catalán, C.V.: A simple and cost-effective method for the quantification of total coliforms and *Escherichia coli* in potable water. *Journal of Microbiological Methods*. 65(3): 608–611, 2006.
114. York, M.K., Baron E.J., Clarridge, J.E., Thomson, R.B., Weinstein M.P.: Multilaboratory Validation of Rapid Spot Tests for Identification of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 38(9): 3394–3398, 2000.

8.ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Kars' ta doğdum. İlk ve orta öğretimini Kars'ta tamamladım. 1998 yılında giriş yaptığım Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2003 yılında mezun oldum. 2003–2005 yılları arasında Migros Türk A.Ş.'de Veteriner Hekim olarak görev yaptım. 2004–2005 eğitim öğretim yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladım. Evli ve bir çocuk sahibiyim. Yabancı dilim İngilizcedir.