T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ, PLAZMİT PROFİLLERİ VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Ahmet UYSAL

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan-2012
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ÇEŞİTLİ *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ, PLAZMİT PROFİLLERİ VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Ahmet UYSAL

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf DURAK
İkinci Danışman: Doç. Dr. Uğur ARSLAN

2012, IX+117 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Muhsin KONUK
Doç. Dr. Birol ÖZKALP
Doç. Dr. Cengiz AKKÖZ
Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN

Bu çalışmada; kuyu suları (43), çeşitli gıdalar (40) ve klinik örneklerden (47) izole ve identifiye edilen toplam 130 *Escherichia coli* suşu; genetik çeşitlilik, bazı antibiyotiklere duyarlılık ve plazmit profilleri yönünden araştırıldı. *E. coli* izolatlarının genetik ilişkilerini ve çeşitliliklerini tanımlamak için Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) metodu kullanıldı. PFGE sonuçları % 80 benzerlik oranına göre değerlendirildiğinde; *E. coli* suşları, 16 alt tiple temsil edilen 101 farklı pulsotipe ayrıldı. Analiz edilen 43 su izolatı arasında 30 farklı pulsotip ve altı alt tip görülürken; 40 gıda suşu 32 farklı pulsotipe ve altı alt tipe, 47 klinik izolat ise 39 farklı pulsotip ve dört alt tipe ayrıldı. Restriksiyon profilleri değerlendirildiğinde tüm suşlar arasında yüksek oranda genetik çeşitlilik görüldü. Genotipik analizler, farklı gruplara ait olan suşların köken olarak aynı olmadığını ve ilişkisiz izolat olarak belirlendiğini gösterdi. Antibiyotik duyarlılık testleri 15 farklı antibiyotiğe karşı, disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Su izolatlarının en fazla direnç gösterdiği antibiyotiğin ampisilin (% 97.67) olduğu; bunu % 9.3 ile tikarsilin/klavulanik asit, % 6.97 ile sefuroksim ve seftazidim'in takip ettiği görüldü. Gıda izolatlarının direnç oranlarının ampisilin'e karşı % 77.5, tikarsilin/klavulanik asit'e karşı % 30, tetrasiklin'e karşı % 22.5 ve sefalotin'e karşı % 14.5 olduğu belirlendi. Klinik izolatlarda direnç oranları; ampisilin'e karşı % 100, tikarsilin/klavulanik asit ve sefalotin'e karşı % 89.36, sefuroksim'e karşı % 87.24, tetrasiklin ve sefotaksim'e karşı % 80.85 olarak belirlendi. Suşların plazmit izolasyonları, alkali lizis yöntemi kullanılarak yapıldı. 43 su izolatının 19'u (% 44.18), 78.2-2.6 kb aralığında değişen boyutta 19 farklı plazmit bandı ve dört farklı plazmit profili gösterdi. 40 gıda izolatının 18'i (% 45), 64-1 kb arasında değişen boyutta 31 farklı plazmit bandı ve yedi farklı plazmit profili gösterirken; 47 klinik izolatın 27'si (% 57.44), 77.1-1.6 kb aralığında değişen boyutta 57 farklı plazmit bandı ve 22 farklı plazmit profili gösterdi. Üç grup için aynı boyutta plazmit belirlenmedi. İzole edilen *E. coli* suşlarında plazmitlerin rastgele dağılım gösterdiği ve antibiyotik direnç profilleri ile plazmitler arasında önemli bir ilişki kurulamadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik duyarlılık testi, *Escherichia* coli, plazmit profili, pulsed-field jel elektroforezi

ABSTRACT

Ph.D THESIS

TYPING OF VARIOUS *ESCHERICHIA COLI* STRAINS BY PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS METHOD, INVESTIGATION OF THEIR PLAZMID PROFILES AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES

Ahmet UYSAL

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Yusuf DURAK
Second Advisor: Assoc. Prof. Dr. Uğur ARSLAN

2012, IX+117 Pages

Jury
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Muhsin KONUK
Assoc. Prof. Dr. Birol ÖZKALP
Assoc. Prof. Dr. Cengiz AKKÖZ
Asst. Prof. Dr. Rüstem DUMAN

In this study, a total of 130 *Escherichia coli* strains isolated and identified from well waters (43), various foods (40) and clinical samples (47) were investigated in terms of their genetic diversity, susceptibility against some antibiotics and plasmid profiles. Pulsed-field gel electrophoresis method (PFGE) was used to characterize the genetic relationship and diversity of *E. coli* isolates. When the results of PFGE were evaluated according to similarity level of 80 %, the *E. coli* strains were seperated into 101 distinct groups representing 16 subtypes. While 30 different pulsotype and six different subtypes were revealed among 43 water isolates analyzed; 40 food isolates and 47 clinical isolates were divided into 32 and 39 different pulsotype, six and four subtypes, respectively. When the restriction profiles were evaluated, a great genetic diversity was seen among all strains. Genotypic analysis indicated that strains which belong to different groups were not identical and determined as unrelated strains. Antibiotic susceptibility tests were performed by using disc diffusion methods against 15 different antibiotics. Ampicillin was the most common antibiotic that water isolates resistant to (97.67 %), followed by ticarcillin/clavulanic acid (9.3 %), cefuroxime and ceftazidime (6.97 %). Resistance rates of food isolates were determined against ampicillin as 77.5 %, against ticarcillin/clavulanic acid 30 %, against tetracycline 22.5 % and against cephalothin 14.5 %. Resistance rates of clinical isolates were determined as 100 % against ampicillin, followed by 89.36 % against ticarcillin/clavulanic acid and cephalothin, 87.24 % against cefuroxime, 80.85 % against tetracycline and cefotaxime. Plasmid isolations of the strains were performed by using alkaline lysis method. 19 of 43 water isolates (44.18 %) exhibited 19 different plasmid bands in the range of 78.2 -2.6 kb and four different plasmid profiles. Although 18 of 40 food isolates (45 %) showed 31 different plasmid bands in the range of 64-1 kb and seven different plasmid profiles, 27 of 47 clinical isolates (57.44 %) revealed 57 different plasmid bands in the range of 77.1 kb-1.6 kb and 22 different plasmid profiles. Identical plasmid sizes were not detected for all three groups. It was concluded that the plasmids were distributed at random in the isolated *E. coli* strains and no remarkable relationship between antibiotic resistance patterns and plasmids could be established.

Keywords: Antibiotic susceptibility test, *Escherichia coli*, plasmid profile, pulsed-field gel electrophoresis

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora tezi olarak hazırlanmıştır. Araştırmada, farklı kaynaklardan izole edilen *Escherichia coli* izolatlarının pulsed-field jel elektrofez yöntemiyle tiplendirilmesi, plazmit profilleri ve bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Laboratuvar çalışmaları S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı, S.Ü. Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, S.Ü. Sağlık Hizmetleri MYO Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Konya Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışma konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren, desteğini ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK'a (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü); Pulsed-field jel elektroforez deney çalışmalarımın yürütülmesi, optimizasyonu, görüntülenmesi ve elde edilen sonuçların yorumlanmasının yanısıra, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar imkanlarının kullanılması konusunda da her türlü desteğini esirgemeyen ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Uğur ARSLAN'a (S.Ü. Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD); örnek toplama, plazmid profilleri ve biyokimyasal test çalışmaları ile fenotipik analizlerin yapılması sırasında her zaman yardımcı olan ve büyük emeği geçen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ'a (S.Ü. Sağlık Hizmetleri MYO Tıbbi Laboratuvar Bölümü); pulsed-field çalışmasının yürütülmesinde büyük emeği geçen, özveriyle çalışan ve yardımlarını esirgemeyen S. Ü. Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı personeline; su izolatlarını izole ve identifiye ederek yardımcı olan Sayın Biyolog İsmet OĞLAKKAYA'ya (Konya Halk Sağlığı Laboratuvarı); moleküler analizlerin yorumlanmasında yardımlarını gördüğüm İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvar personellerinden Sayın Uzman Evrim BALCI'ya; çalışmalarım sırasında maddi manevi desteğini gördüğüm ve moral düzeyimi her zaman üst düzeyde tutan değerli kardeşim ve meslektaşım Sayın Arş. Gör. Dr. Evren YILDIZTUGAY'a (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü); laboratuvar çalışmalarımda bir an olsun yanımdan ayrılmayan her türlü yardım ve özveriyi gösteren değerli kardeşim ve meslektaşım Sayın Arş. Gör. Erdoğan GÜNEŞ'e (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü); jel görüntülerinin alınmasında yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Tuna UYSAL'a (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü); *E. coli* V517 standart suşunu temin etmemde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e (Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD); plazmit ölçümlerinde ve moleküler analizlerde yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Cengiz BALOĞLU'na (Kastamonu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın başladığı ilk günden itibaren maddi manevi her türlü yardım ve desteğini bir an olsun esirgemeyen, gerek çalışmaların yürütülmesi gerekse tezimin yazım aşamasında büyük bir sabırla bana katlanma başarısını gösteren, moral kaynağım sevgili eşim Nazife UYSAL'a; bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve her zaman yanımda ve destekçim olan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü'ne (BAP **10101022** no'lu proje) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ahmet UYSAL
KONYA–2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **26**

3.1. Materyal 26
3.1.1. Bakteri suşları 26
3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler 26
3.1.3. Tampon ve çözeltiler 27
3.1.3.1. PFGE çalışmasında kullanılan çözeltiler 27
3.1.3.2. Plazmit DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler 28
3.2. Metot 30
3.2.1. Bakteri suşlarının izolasyonu 30
3.2.2. Suşların API 20E bakteriyel teşhis kiti ile identifikasyonu 30
3.2.3. Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) 31
3.2.3.1. İzolatların hazırlanması 31
3.2.3.2. İzolatların agaroza gömülmesi 32
3.2.3.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması 32
3.2.3.4. Hücre lizizinden sonra agaroz kalıpların yıkanması 32
3.2.3.5. *E. coli* DNA'sını içeren kalıpların *Xba*I RE ile kesimi 33
3.2.3.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi 33
3.2.3.7. Elektroforez 33
3.2.3.8. Sonuçların gözlenmesi ve analizi 34
3.2.4. Plazmit profil analizi 34
3.2.4.1. Plazmit izolasyonu 35
3.2.4.2. Agarozun hazırlanması ve örneklerin yürütülmesi 36
3.2.4.3. Plazmit büyüklüklerinin belirlenmesi 36
3.2.5. Antibiyotik duyarlılık testleri 36

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **38**

4.1. *E. coli* suşlarının kullanılan antibiyotiklere duyarlılık durumları 38
4.2. *E. coli* suşlarının plazmit profillerinin analizi 47
4.3. *E. coli* suşlarının PFGE analiz sonuçları 56

5. SONUÇ VE ÖNERİLER **99**

5.1. Sonuç 99
5.2. Öneriler 100

KAYNAKLAR 102

ÖZGEÇMİŞ 114

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	:	santigrat derece
cm	:	santimetre
g	:	gram
kg	:	kilogram
l	:	litre
mg	:	miligram
ml	:	mililitre
mm	:	milimetre
mM	:	milimolar
µg	:	mikrogram
µl	:	mikrolitre
µm	:	mikrometre
kb	:	kilo baz
Mb	:	mega baz
mDa	:	mega dalton
N	:	normal
nm	:	nanometre
pH	:	hidrojen gücü
U	:	ünite
V	:	volt

Kısaltmalar

CLSI	:	Clinical Laboratory Standarts Institute
DSMZ	:	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
NCTC	:	National Collection of Type Cultures
AM	:	Ampisilin
C	:	Kloramfenikol
AK	:	Amikasin
CN	:	Gentamisin
CTX	.	Sefotaksim
CAZ	:	Seftazidim
CXM	:	Sefuroksim
CIP	:	Siprofloksasin
TE	:	Tetrasiklin
KF	:	Sefalotin
NET	:	Netilmisin
MEM	:	Meropenem
AMC	:	Amoksisilin/klavulanik asit
TIM	:	Tikarsilin/klavulanik asit
TZP	:	Piperasilin/tazobaktam
TAE	:	Tris-Asetik asit-Etilen Diamin Tetra Asetat
TBE	:	Tris-Borik asit-Etilen Diamin Tetra Asetat
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetat
ÇAD	:	Çoklu antibiyotik direnci
DSS	:	Deney suşu su
DSG	:	Deney suşu gıda
DSK	:	Deney suşu klinik

1. GİRİŞ

Tarih boyunca değişik infeksiyon ajanlarının salgınlara yol açtığı ve bu ajanların bugün de yeni epidemiyolojik tipler ve ilaçlara dirençli mikroorganizmalar olarak karşımıza çıktığı görülmektedir. İnfeksiyon ajanlarının saptanması ve tanımlanmasında mikroskopi ve kültür gibi klasik tanı yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler önemini korumakla birlikte birçok infeksiyon etkeninin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Günümüzde, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak mikrobiyolojide de moleküler tanı yöntemlerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Kubar ve Yapar, 2000).

Moleküler epidemiyoloji: infeksiyon hastalıklarının tanısı, etkenin biyokimyasal ve moleküler seviyede tanımlanması ve tiplendirilmesi, patogenezden sorumlu genlerin saptanması, genetik duyarlılığın belirlenmesi, konak-patojen ilişkisi, konağın infeksiyonlara duyarlılığından sorumlu faktörlerin incelenmesi, virülans ve bulaşıcı olabilme yönünden farklılık gösterebilen suşların araştırılması, toplumlar ve akraba grupları arasında hastalığın yayılması, kontrolü ve etiyolojisine moleküler seviyede tanımlanan potansiyel genetik ve çevresel risk faktörlerinin katkısı, infeksiyon hastalıklarının aile içi ve toplumlar arasında yayılmasının önlenmesi üzerinde duran bir bilim dalıdır (Andrei ve Zervos, 2006; Feil ve Enright, 2004; Yamamoto, 2007; Durmaz, 2007).

Moleküler epidemiyolojik çalışmaların gelişmesiyle infeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu çalışmalarda tür içinde değişken ancak suşlarda sabit olan belirli bir genetik gösterge kullanılarak, salgın sırasında toplanan epidemiyolojik olarak ilişkili, aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. Yani "izolatlar aynı mı, farklı mı?" sorusuna yanıt aranmaktadır. Böylece infeksiyonun kaynağı ve yayılma yolları belirlenmektedir. Genel olarak salgın izolatları (epidemiyolojik yönden ilişkili izolatlar) klonal olarak da ilişkili olup, ortak bir kaynaktan köken alırlar. Klonal ilişkili mikroorganizmalar ortak virülans, biyokimyasal ve genetik özellikleri paylaşan, aynı türün üyesidirler. Bunlarda kromozomal rekombinasyonun sınırlı veya hiç olmadığı kabul edilmekte; kromozom, atasal hücreden yeni soylara bir bütün olarak geçmektedir. Burada gözlenen değişimin ana nedeni nokta mutasyon veya DNA segmentlerinin insersiyonu ve delesyonları şeklinde olan mutasyonlardır. Bu değişiklikler yeni soylara blok olarak aktarıldığından, uygun genetik göstergelerle (markır) izlenebilir ve suşlar

arasındaki genetik yakınlık saptanabilir. Bu bilgiler, hastanelerde ve toplumda hastalığın yayılmasını izlemede ve kontrol altına almada oldukça yararlıdır (Tompkins, 1998; Pfaller, 2001; Durmaz, 2007).

Mikroorganizmaların biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinden yararlanılarak cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılabilmektedir. Tür düzeyinde tanımlama infeksiyon hastalığının etiyolojisini aydınlatma bakımından yeterli olabilmektedir. Ancak, salgınlar esnasında izole edilen aynı tür içindeki birçok suşun birbiriyle klonal ilişkisinin olup olmadığını belirlemek için tür içinde farklılık gösterebilen varyantların saptanması gerekmektedir. Alt tipleme veya suş klasifikasyonu olarak ifade edilen bu tiplemede bazı fenotipik ve genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır (Durmaz, 2001).

Tiplendirmede kullanılan fenotipik yöntemlerin başlıcaları; 1) Biyotiplendirme, 2) Serotiplendirme, 3) Bakteriyofaj tiplendirmesi, 4) Bakteriyosin tiplendirmesi ve 5) Antibiyotiklere duyarlılık profilidir. Bakteriyofaj tiplendirmesi *Staphylococcus aureus,* serotiplendirme ise *Salmonella* türleriyle ilgili epidemiyolojik çalışmalarda hâlâ yararlı yöntemlerdir. Ancak daha geniş bakteri türlerinin tiplendirilmesinde kullanılabilecek metotlara ihtiyaç vardır. Ayrıca fenotipik yöntemler, iş yükü fazla, uzun zaman alan, çoğunlukla değişken sonuçlar veren yöntemlerdir. Bu durum araştırmacıları, ayrım gücü daha yüksek olan genotipleme yöntemlerini kullanmaya yöneltmiştir (Durmaz, 2001).

Bakteriyel moleküler tipleme yöntemlerinin ilk jenerasyonu plazmit profilinin belirlenmesidir. Ancak, bu yöntem yerini kromozomal DNA üzerinde yoğunlaşan; PFGE (pulsed-field jel elektroforezi), PCR-RFLP (polimeraz zincir reaksiyon-restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi), REP-PCR (tekrarlanan ekstrajenik palindromik element-polimeraz zincir reaksiyonu), RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), ARDRA (çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi), AFLP (çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi), MLST (Multilokus dizi tiplendirme) ve DNA dizi analizi gibi yeni moleküler yöntemlere bırakmıştır (Swaminathan ve Matar, 1993; Köksal, 1999; Matsumoto ve ark., 2000; De La Puente-Redondo ve ark., 2000; Aksu, 2007).

Escherichia coli, doğada yaygın olarak bulunan, genellikle sıcakkanlı hayvanlar olarak nitelendirilen memelilerin ve kuşların bağırsak florasında doğal olarak bulunan bir bakteridir. Bu bakteri, bağırsaktaki birçok fonksiyonuna ek olarak, özellikle B ve K vitamini sentezlemektedir. Dışkıda bulunmasından dolayı, içme ve kullanma suyunda *E. coli* varlığı kaynağın dışkı ile kirlendiğinin bir göstergesidir. 1982 yılından sonraki çalışmalarda *E. coli*'nin patojenik/toksijenik suşlarının bulunduğu, su ve gıdalar ile

alındığında zehirlenmelere, böbrek ve beyinde hasara yol açtığı, hatta ölüme neden olduğu belirlenmiştir (Riley ve ark., 1983; Manning, 2010).

Bu çalışmada Konya Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda incelenen su örneklerinden, çeşitli gıda maddeleri ve hastane klinik materyallerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının, klonal ilişkilerinin Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemi ile araştırılması; plazmit profilleri ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Escherichia coli (*E. coli*) ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından bir çocuğun dışkısından izole edilmiş ve önce *Bacterium coli commune* olarak, daha sonra 1919 yılında Castellani ve Chalmers tarafından *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır (Barnes ve Gros, 1997; Manning, 2010).

Escherichia coli, Eubacteria domaininde, Proteobacteria bölümü, Gamma proteobacteria sınıfı, Enterobacteriales takımı, *Enterobacteriaceae* ailesi, *Escherichia* cinsi içinde bir türdür. Bu cins içinde diğer türler de tanımlanmıştır ancak *E. coli* bunlar arasında en yaygını ve en önemlisidir (Winn ve ark., 2006). Tıbbi öneme sahip olmakla birlikte, insan ve bütün sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında kommensal olarak bulunan, bazı suşları insanlarda ve hayvanlarda bağırsak infeksiyonlarına yol açabilen, ayrıca bağırsak dışında da çok çeşitli infeksiyonlar oluşturabilen bir bakteridir. Bunun dışında besinlerde, suda, doğada, dışkı kontaminasyonunun indikatörü olarak araştırılan *E. coli*, genetik çalışmalarda en çok kullanılan bakteridir ve bakteri genetiğinin pek çok önemli bulgusu *E. coli* ile yapılan çalışmalar sonucu elde edilmiştir (Öztelli, 2004).

E. coli yaklaşık olarak 2-6 μm boyunda ve 1.0-1.5 μm eninde düz, uçları yuvarlak, çomak şeklinde, sporsuz bir bakteridir. Logaritmik üreme fazında genellikle 2–4 μm boyunda ise de eski kültürlerde ve bazen idrarda daha uzun filamanlar şeklinde görülebilmektedir. Granül içermez ve homojen boyanır. Peritrik kirpikleriyle hareketlidir, fakat hareketleri yavaştır. Hareketsiz suşları da vardır. Bazı suşları kapsüllüdür. Bakteriyolojik boyalarla iyi boyanır ve gram negatiftir (Ustaçelebi, 1999; Bilgehan, 2000; Berkiten, 2005).

E. coli, buyyon, peptonlu su ve jeloz gibi genel besiyerlerinde kolayca ürer, fakültatif anaeroptur (Bilgehan, 2000; Töreci, 2002). Optimal üreme 37 °C'de, nötral reaksiyonda ve oksijen varlığında gerçekleşir. Bu koşullarda logaritmik üreme fazında bakteri 20 dakikada ikiye bölünebilir (jenerasyon süresi) (Töreci, 2002). Optimum pH 7-7.2'dir ancak 18-44.5 °C arasında, pH 5-8 sınırlarında da daha yavaş olarak ürer (Ustaçelebi, 1999; Töreci, 2002). Özellikle 44 °C'de üreyebilmesi benzer bazı bakterilerden (*Enterobacter* ve *Serratia*) ayırt edici bir özelliğidir. Katı besiyerinde hafif kabarık, yuvarlak 2-3 mm çapında, parlak, S tipi koloniler yaparlar (Bilgehan, 2000).

E. coli'lerin glikozdan asit ve gaz oluşturması, laktoz, D-mannitol, D-sorbitol, L-arabinoz, L-ramnoz, maltoz, D-ksiloz, trehaloz ve D-mannozu fermente etmesi (Bilgehan, 2000; Töreci, 2002; Berkiten, 2005); adonitol, inositol, selobioz, eritrol, D-

arabitolü fermente etmemesi, nitratı nitrite indirgemesi önemli biyokimyasal özelliklerindendir (Töreci, 2002). *E. coli*'ler triptofandan indol (I) yaparlar. Metil kırmızısı (M) testi olumlu, Voges proskauer (V) testi olumsuzdur. Simmon'un sitratlı (C) besiyerinde üremezler yani IMVIC testleri (+, +, -, -) şeklindedir. Üreyi parçalayamazlar ve KCN besiyerinde üreyemezler (Bilgehan, 2000; Kaşkatepe, 2008).

E. coli'nin somatik (O), kirpik (H) ve kapsül (K) antijenleri vardır. Kauffmann tarafından antijenik özelliklerine göre 1944 yılında sınıflandırılmıştır. Buna göre hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritlerdeki O-spesifik polisakkarit zincirine göre serolojik olarak serogruplara, H ve K antijenlerine göre de serotiplere ayrılmaktadır. Bugüne kadar 170'in üzerinde O-antijeni, 50'nin üzerinde H-antijeni ve 100'den fazla K-antijeni tanımlanmıştır. 1000'den fazla antijenik tip mevcuttur. Antijenik yapılarının belirlenmesi özellikle, epidemiyolojik çalışmalarda yararlıdır (Bilgehan, 2000; Kaşkatepe, 2008).

Memelilerin ve kuşların normal bağırsak florasında bulunup, burada diğer flora bakterileri ve organizmalar ile denge içinde kaldığı sürece hastalık yapmaz. Ancak belli koşullar altında *E. coli*, insanlar ve hayvanlar için patojen olup, kanlı ve kansız diyare şeklinde ortaya çıkan bağırsak hastalıklarına neden olur (Manning, 2010).

Bağırsak kanalı dışına çıkıp diğer dokulara yerleşmeleri ve çeşitli klinik tablolara yol açmaları sık görülen durumlardır. Özellikle idrar yolları, safra kesesi ve safra yolları, akciğer, periton ve menenjlere ulaşan *E. coli* bakterileri önemli hastalıklara yol açarlar (Bilgehan, 2000; Öztelli, 2004).

Bağırsakta hastalık oluşturan *E. coli* suşları etki mekanizmalarına göre çeşitli gruplara ayrılırlar (Manning, 2010):

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC): Akut bakteriyel diyarenin dünya genelinde en sık saptanan nedenidir. ETEC, ısıya dirençli ve ısıya duyarlı olmak üzere iki çeşit enterotoksine sahiptir. Diğer barsak patojeni *E. coli* suşları gibi, fekal-oral yolla ve kontamine su ve besinlerle bulaşır (Töreci, 2002). Gelişmekte olan ülkelerde en çok iki yaşın altındaki çocuklarda ciddi seyirli diyareye neden olurken, mikroorganizmanın sıkça bulunduğu geri kalmış ülkelerde erişkinlerde kolera benzeri tabloya neden olmaktadır. Bu ülkelerde toplumun önemli bir kısmı, kısmen de olsa bu bakteriye karşı bağışıktır. Ancak gelişmiş ülkelerden ziyaret amacıyla bu ülkelere gelenler infeksiyonlara duyarlı olduğundan, ETEC'e bağlı ishaller turist ishali olarak bilinmektedir (Brooks, 2004; Manning, 2010).

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC): İlk kez 1955'de tanımlanmıştır. Bebeklerde ve iki yaş altındaki çocuklarda sık görülür. Hastanelerde, bebek servislerinde ve kreşlerde salgınlara yol açar. Erişkinlerde nadiren görülür (Söyletir ve Topçu, 2002). Bu suşlara bağlı ishal ETEC'den daha karmaşıktır. EPEC bağırsakta etkili herhangi bir toksin üretmez; bağırsak hücrelerine yapışma-bozma (attaching-effacing) adı verilen özel bir mekanizma ile sıkı bir şekilde tutunarak ishale neden olur (Söyletir ve Topçu, 2002). İnce barsak mukoza hücrelerine plazmit kontrolündeki pililer yardımıyla tutunarak o bölgedeki hücrelere (mikrovililere) zarar verir. İnflamatuar reaksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Berkiten, 2005).

Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC): Daha çok çocuklarda olmak üzere erişkinlerde de *Shigella*'ların yaptığı dizanteriye benzeyen, sürgünlere ve yüksek ateşe neden olan *E. coli* bakterileri bu grupta bulunurlar. Enterotoksin oluşturmazlar. Oluşturdukları hastalık; ateş, şiddetli karın krampları, kırıklık ve sulu diyare ile karakterize edilir. Sulu diyareyi takiben kanlı ve mukuslu dışkı ile seyreden ağır dizanteri oluşur. Kolon yüzeyindeki hücrelere saldırıp harabiyet yaptığından dolayı invaziv olarak adlandırılır (Töreci, 2002; Manning, 2010).

Enteroagregatif *E. coli* (EAggEC): Önceleri gelişmekte olan ülkelerde en çok çocuklarda görülen EAggEC, şimdilerde gelişmiş ülkelerde yeni yeni ortaya çıkan bir patojen olarak düşünülmektedir. EAggEC infeksiyonu geçiren çoğu insanda, ara sıra mukus ve kan ile birlikte görülen sulu diyare durumu gözlenmektedir. Bu *E. coli* suşları, Hep–2 (insan tek tabaka tümör hücresi) hücrelerine aderans özelliği olduğundan enteroaderan *E. coli* (EAEC) olarak da isimlendirilirler. İnvazyon özellikleri yoktur (Berkiten, 2005; Manning, 2010).

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC): Bu suş, diyareye, hemorajik kolite, öncesinde ateş ve mide kramplarıyla gelen şiddetli kanlı diyareye ve hemolitik üremik sendrom gibi ciddi bir komplikasyona yol açması nedeniyle gittikçe artan öneme sahiptir (Söyletir ve Topçu, 2002). Meydana getirdiği uzun süreli komplikasyonlar çocuklarda böbrek bozukluklarına ve ölüme yol açabilmektedir (Manning, 2010). İnvazyon yeteneği yoktur. Plazmit kontrolünde bir virulans faktörü ile *Shigella* toksinine benzeyen sitotoksin (Shiga toksin) sentezler [Shigella toksini üreten *E. coli* (STEC)] (Brooks, 2004; Berkiten, 2005). Bu grup içinde en çok çalışılan serotip, O157:H7 serotipidir. Bu suş tarafından salgılanan Shiga toksine; maymun böbrek hücre kültürü olan Vero hücre kültürüne sitotoksik etki gösterdiğinden, verotoksin de (VT) denir. Shiga toksin iç organların iç astarındaki dokularda bulunan, özellikle vasküler

endotelyal hücrelere zarar vererek hastalık sürecini kolaylaştırır. Shiga toksin ürettiği halde O:157 serotipinde olmayıp diğer grupta bulunan suşlar O26:H11, O111:H8 ve O118:H16'dır (Manning, 2010).

İnfeksiyon hastalıkların çalışma konusu, hastalığın yayılmasını ve epidemiyolojik analizini içerir. İnfeksiyonların bakteriyel etiyolojisi, izolatların identifikasyonu ve taksonomik sınıflandırılması tarih boyunca, biyotipleme, antimikrobiyal duyarlılık testleri, serotipleme, bakteriyofaj tipleme ve multilokus enzim elektroforezi gibi fenotipik analizlerle başarılmıştır. Bu analizler aynı zamanda epidemiyolojik değerlendirmelere temel olarak hizmet vermiştir (Holt, 1994; Tenover ve ark., 1997; Soll ve ark., 2007). Ancak, 1970'lerde moleküler biyolojinin etkisiyle, fenotipik karakterizasyonun sadece organizmanın temel genotipinin bir ifadesi olduğu ve bazı seviyelerde (büyüme şartlarına, büyüme fazına ve spontan mutasyonlara bağlı olarak gen ifadesinin değişimleri) organizmanın gerçek genetik kimliğinden çıkarıldığı daha açık hale gelmiştir. Böylece moleküler metotlar, moleküler epidemiyoloji teriminin doğuşuna neden olan epidemiyolojik analizleri içeren, klinikle ilgili alanlarda uygulanmaya başlamıştır (Goering, 2010).

Genotipik metotlar, ilk olarak agaroz jel elektroforezi ile ekstra kromozomal DNA içeriğini araştıran çalışmalarla başlamıştır. Daha sonra bu çok basamaklı süreç restriksiyon enzimlerinin ve probların gündeme gelmesiyle devam etmiştir. Böylece, kromozomların enzimler tarafından kesilmesiyle yüzlerce veya 10-30 parçaya bölünerek meydana gelen DNA restriksiyon örneklerindeki polimorfizm incelenebilmiştir (Tenover ve ark., 1997). Üçüncü nesil çalışmaların temelini pulsed field jel elektroforezi ve PCR oluştururken, epidemiyolojik analizlerde dördüncü nesil moleküler yaklaşımları DNA dizi analizi oluşturmuştur (Goering, 2004; Singh ve ark., 2006). Genotipik metotlar doğal varyasyonlara çok az maruz kalırlar. Buna rağmen, kromozomlarda DNA insersiyonu ve delesyonu, ekstra kromozomal DNA kazanılması ve kaybı ya da restriksiyon endonükleaz bölgelerinin oluşumuna veya kaybına neden olan rastgele mutasyonlardan etkilenebilirler (Tenover ve ark., 1997).

Bütün tiplendirme sistemlerinin, yaygın kullanılabilmesi için bazı kriterlere sahip olması gerekir (Arbeit, 1995).

Tiplendirebilirlik: Kullanılan yöntemin, bir tür içindeki tüm mikroorganizmaları tiplendirebilme yeteneğidir. Ayrım gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek olsa bile, yöntem; tür içindeki izolatların yalnızca % 50-60'ını tiplendirebiliyorsa epidemiyolojik

araştırmalarda kullanımı sınırlıdır. Serotiplendirme veya bakteriyofaj tiplendirmesi gibi bazı yöntemlerde, spesifik olarak aranan antijen ya da faj için özgül reseptörler türün bütün üyelerinde bulunmayabilir ve böylece tiplendirme yapılamaz (Durmaz, 2001). Genotipik yöntemlerle tiplendirilemeyen suş sayısı, fenotipik yöntemlere göre çok daha azdır. Bu durum, örneğin plazmit profil analizinde plazmit kaybına bağlı iken, PFGE tekniğinde genellikle endonükleazlarca kromozomal DNA'nın parçalanması nedeniyledir (Kato ve ark., 1994; Tenover ve ark., 1997).

Ayrım gücü: Tipleme yönteminin bir türün farklı suşları arasında etkin ayrım yapabilme özelliğidir. Kullanılan yöntemin ayrım gücü yüksek olmalı, ortak bir kaynaktan infekte olan kişilere ait izolatlar arasındaki bağlantıyı gösterebilmelidir. Aynı zamanda salgın kaynağından tamamen farklı bir coğrafik bölgeden izole edilen, epidemiyolojik yönden ilişkisiz izolatları açık olarak ayırt edebilmelidir. Aynı tür içindeki suşlar arasında maksimum ayrım çoğunlukla, hiyerarşik bir düzen içinde, iki tipleme yönteminin kullanılması ile başarılabilmektedir. Birinci yöntemle primer grup belirlenir. İkinci yöntem, primer grup içinde bulunan suşların farklı tiplere ayrımını sağlar. Ayrım gücü, yöntemin tekrarlanabilirliği ile ilişkilidir. Tekrarlanabilirlik azalınca, ayrım gücü kaybolur. Geleneksel fenotipik metotlardan antibiyogram tipleme, serotipleme ve biyotipleme, moleküler metotlardan daha düşük ayrım gücüne sahiptir (Swaminathan ve Matar, 1993; Arbeit, 1995; Durmaz, 2001).

Tekrarlanabilirlik: Belirli bir suş ile yapılan tekrarlarda aynı sonucun alınabilmesidir. Tekrarlanabilirlik, özellikle karşılaştırmaya imkan sağlayan güvenilir veri tabanı oluşturmak için önemlidir. Aynı koşullar uygulansa bile farklı günlerde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluklar olabilmekte, sonuçların güvenilirliği azalmaktadır. Zayıf tekrarlanabilirlik, metottaki teknik bir değişimi veya organizmanın in vivo ve in vitro aktarımı sırasında meydana gelen biyolojik değişimleri yansıtabilir (Olive ve Bean, 1999; Durmaz, 2001).

Stabilite: Aynı klondan gelen izolatların zaman içinde hep aynı tipi gösterebilme olasılığıdır. Yöntemin stabilitesi besiyerinin içeriği, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, bakteri yoğunluğu ve tekniğin belirleyeceği hedef bölgenin (markır) yapısal bütünlüğü gibi faktörlerden etkilenmektedir. Kültür koşulları ile ilişkili değişimlerin çoğu kontrol edilebilir. Ancak markırın stabilitesini kontrol etmek oldukça zordur. Bunun zayıf veya güçlü olarak ortaya çıkması durumlarında yöntemin stabilitesi etkilenebilmektedir. İki izolat, yalnızca bir veya daha fazla zayıf reaksiyonla (DNA

bandı gibi) birbirinden farklı görünüyorlarsa, bunların kesin ayrımını yapmak zor olabilmektedir (Durmaz, 2001).

Tekniğin kullanım kolaylığı, fiyatı, sonuç verme süresi ve sonuçlarının kolayca yorumlanabilir olması: Tipleme yöntemi basit ve ekonomik olmalıdır. Yöntemin kolay uygulanabilirliği ile klinik laboratuvarlarda yaygın kullanımı arasında ilişki vardır. Teknik olarak kompleks olan metotlar, rutin uygulamalardan ziyade referans laboratuvarlarında kullanılmaktadırlar (Tenover ve ark., 1997).

Yöntemin değişik mikroorganizma grubu veya fazla sayıda örneğin analizine uygunluğu: Bu özellik bazı klinik laboratuvarlar için önemli olmayabilir. Ancak, kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların yapıldığı laboratuvarlar için kritik olabilmektedir. Böyle durumlarda, maliyeti düşük, ayrım gücü yüksek olan REP-PCR gibi basit teknikler daha faydalı olabilir. Fakat mikroorganizmaların genetik profilleri ile ilgili referans bilgi bankaları oluşturulmak istendiğinde PFGE veya AFLP gibi metotlara gereksinim vardır. Ancak, bu iki metot bakteri ve fungusların tiplemesinde uygun olmakla birlikte, virusların tiplendirilmesinde en uygun yöntem baz dizi analizidir (Olive ve Bean, 1999).

Bu kriterlere bağlı olarak tiplendirme sistemlerinin karşılaştırılması çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Tiplendirme sistemlerinin karşılaştırılması (Durmaz, 2001)

	Tiplendirebilirlik	Tekrarlanabilirlik	Stabilite	Ayrım gücü	Uygulama kolaylığı	Yorumlama kolaylığı
Biyotipleme	Mükemmel	İyi	İyi	Zayıf	Kolay	Kolay
Antibiyotipleme	Mükemmel	İyi	Değişken	Zayıf	Kolay	Kolay
Serotipleme	İyi	İyi	İyi	Orta	Orta	Orta
Faj tipleme	Orta	Orta	Orta	Orta	Zayıf	Tam
Plazmit profil analizi	İyi	İyi	Değişken	İyi	Orta	İyi
Bölgeye özgü PCR-RFLP	Mükemmel	İyi	Mükemmel	Orta	Kolay	Kolay
REP-PCR	Değişken	İyi	Mükemmel	Yüksek	Kolay	Kolay
RAPD	Mükemmel	Orta	İyi	Yüksek	Kolay	Kolay
AFLP	Mükemmel	İyi	Mükemmel	Yüksek	Orta	Kolay
PFGE	Mükemmel	İyi	Mükemmel	Yüksek	Orta	Kolay
Dizi analizi	Mükemmel	İyi	İyi	Yüksek	Zor	Orta

Moleküler yöntemleri kullanacak olan araştırmacılar, laboratuvar ve klinik çalışmaların her ikisinin de beklentilerini karşılayacak uygulanabilir yöntem veya

yöntemleri seçmek durumundadır. Uygulanacak yöntemlerin seçilmesinde şu özellikler dikkate alınmalıdır: 1) Yöntem mümkün olduğunca geniş mikroorganizma grubuna uygulanabilmeli, 2) Yüksek ayrım gücü ve tekrarlanabilir özelliklere sahip olmalı, 3) Sonuçları kolayca yorumlanabilir olmalı, 4) Kurulması ve uygulanması kolay olmalı, 5) Kullanılan alet ve çözeltileri ucuz olmalıdır (Durmaz, 2007).

Bu kriterlerin tamamını karşılayacak tek bir yöntem olmadığı için sistemlerin kombinasyonunu kullanmanın gerekli olduğu belirtilmiştir (Preston ve ark., 2000; Shimizu ve ark., 2000; Goering, 2004; Barret ve ark., 2004). Tek merkezi ilgilendiren kısa süreli bir salgından izole edilen suşların ayrımı yapılacak ise, bir tipleme yöntemi yeterli olmaktadır. Ancak, ülke genelinde yapılacak olan kapsamlı epidemiyolojik çalışmalarda birkaç tipleme yönteminin birlikte kullanılması gerekmektedir (Tenover ve ark., 1995). Başlangıçta hızlı tarama sistemleri (plazmit profil analizi, PCR-bazlı metotlar gibi) ile klonal ilişkinin varlığı veya yokluğu test edilir. Eğer kullanılan hızlı yöntemin ayrım gücü yeterli değilse, güvenilir bir yöntemle doğrulama yapılabilir. Günümüzde bu ihtiyacı karşılayabilecek en iyi yöntem PFGE gibi görünmektedir (Tenover ve ark., 1995; Tenover ve ark., 1997; Goering, 2004).

Pulsed Field Jel Elektroforez (PFGE) teorisi

İlk tarif edildiği 1983 yılından sonra "pulsed field jel elektroforezi" birçok bakteriyel patojen için kullanılan moleküler epidemiyolojik analizler arasında "altın standart" metot haline gelmiştir (Goering, 2004). Tartışmalı hususlar olsa bile temel olarak PFGE teorisi DNA parçalarının agaroz jelde yürütülmesi esasına dayanır. Devamlı alan elektroforezi sırasında 30-50 kilobaz (kb)'dan daha büyük DNA'lar büyüklükleri ne olursa olsun aynı hızla hareket ederler ve jelde büyük, tek bir bant olarak görülürler. Ancak DNA, elektroforez sırasında farklı yönlere itilerek hareket edecek olursa bantlar birbirinden ayrılırlar. Jele uygulanan elektrik alanın her yön değiştirmesi ile daha küçük olan DNA parçaları daha hızlı yön değiştirirler ve böylece büyük DNA parçaları daha arkada kalmak üzere dizilirler (Hoşoğlu, 2007).

PFGE uygulamalarının esasları

Bir DNA'nın farklı boyutlardaki parçalarının elektroforez ile yürütülmesi 1970'lerin başında geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemde DNA sağlam olarak izole

edilir ve restriksiyon enzimleriyle kesilerek elde edilen küçük parçalar agaroz veya akrilamid içinde elektroforezle yürütülür. Bu metot esasta aynı kalmakla beraber ayrıştırma kurallarındaki çeşitlilik ile farklı uygulamalar ortaya çıkmıştır (Hoşoğlu, 2007).

Standart jel elektroforez metotlarında, moleküller statik elektrik alan altında hareket ederler. Elektrik alanının etkisi altında DNA parçaları, bir hat üzerinde yürüyerek ağırlıklarına göre dizilirler. DNA parçalarının hareketini etkileyen birçok faktör vardır. Jelin içeriği ve yoğunluğu, elektrik alanının gradienti, elektroforez tamponunun özellikleri ve sıcaklık en başta gelen faktörlerdir. Normalde standart metotla yapılan DNA elektroforezinde 20 kb'dan daha büyük parçalar aynı yöndeki sabit akımla yürütülerek ayrıştırılamaz. Başlangıçta büyük DNA parçalarını yürütmek için düşük yoğunluklu agaroz jelleri ve düşük voltaj gradienti kullanılmıştır. Ancak bu farklı şartlarda bile DNA parçalarının ayrıştırılması pek mümkün olmamıştır (Hoşoğlu, 2007).

1984 yılında David Schwartz yeni bir teknik olarak periyodik aralıklarla yönü değiştirilen elektrik alanının, DNA moleküllerini jel içinde ilk yerinden ayırıp bir hat üzerinde dizeceğini ileri sürmüştür. Özellikle agarozda 30-50 kb'dan 10 megabaza (10 Mb=10,000 kb) kadar olan büyük parçalar yürütülebilmektedir. Schwartz, bu yöntemin molekül boyutuna bağlı olacağını öne sürmüştür. Sonuçta bu metotla, yüzlerce kilobaz ağırlıktaki mantar kromozom parçalarının uzunlamasına başarıyla ayrıştırıldığını göstermiştir (Schwartz ve Cantor, 1984). Bu çalışmalar sırasında "orthogonal field alternasyon jel elektroforezi (OFAGE)", "transverse alternating field elektroforezi (TAFE)", "field inversiyon jel elektroforezi (FIGE)" ve "counter-clamped homogeneous elektrik field elektroforezi (CHEF)" gibi çeşitli alternatif elektroforetik teknikler tanımlanmıştır. Cihaz konfigürasyonlarında farklılıklar olmasına rağmen bu teknikler, farklı yönlerden belirli sürelerde verilen elektriksel akım (pulse) ile megabaz (Mb) büyüklüğündeki DNA parçalarını ayırma esasına dayanmaktadır. Sözedilen tekniklerin tümü pulsed field ekipman çeşitleri olmasına rağmen günümüzde birçok laboratuvar tarafından CHEF sistemi kullanılmaktadır (Goering, 2004).

PFGE yönteminde, sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısılı agaroza karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak (*in situ-lysis*) DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan, DNA'da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir.

Lizis işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Büyük olan kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA, oldukça az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi (RE) ile kesime uğratılmaktadır (*in situ digestion*). Daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır (Durmaz ve Durmaz, 2001).

Elektroforez sonucunda; jel etidyum bromürle boyanarak, her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir (Swaminathan ve Matar, 1993). Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımı ile değerlendirilerek suşların birbirleriyle olan ilişkileri ortaya konulmaktadır. Bilgisayara dayalı analizlerde, incelenen mikroorganizmalara ait PFGE profillerinin saklanması ile "veri bankası" oluşturulabilir. Böylece incelenen suş profillerinin, daha önce var olan verilerle karşılaştırılma imkânı oluşmaktadır (Olive ve Bean, 1999). PFGE'de yüksek kalitede DNA'nın elde edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle soğuk tampondaki hücrelerin hızlıca işlenmesi, erimiş agaroza eklemeden önce bakterilerin buzda tutulması ve agaroz kalıpların soğukta tutulması gerekmektedir (Maslow ve ark., 1993).

Restriksiyon enzimi (RE) seçerken göz önünde tutulması gereken birçok faktör vardır. Birincisi, bakteriyel DNA'nın G+C içeriğidir. Düşük G+C içerikli DNA'lar (örneğin *Staphylococcus aureus*), tanıma bölgesi G+C bakımından zengin olan RE (örneğin *Sma*I) ile muamele edildiğinde yeteri kadar kesilememektedir. İkincisi ise tanıma bölgesi uzun olan enzimler, kısa olanlara göre daha az sayıda kesim parçaları oluştururlar (Durmaz ve Durmaz, 2001).

Büyük DNA parçalarının agarozda ayrıştırılmasına etki eden çeşitli faktörler vardır. Bunlardan başlıcaları; agaroz konsantrasyonu, tampon konsantrasyonu, sıcaklık, pulse süresi, voltaj ve toplam elektroforez süresidir (Maslow ve ark., 1993). Yöntemin ayrım gücü oldukça yüksektir. Ancak zaman alıcı ve kompleks bir sistemdir. Ayrıca laboratuvarlar arasında hala standardizasyon problemi vardır (Tang ve ark., 2000).

Restriksiyon profillerinin analizi ve izolatların yakınlık derecelerine göre sınıflandırılması için öncelikle, ortak ya da salgın profili belirlenir. Ortak profil yoksa büyük olasılıkla izolatlar birbirleriyle ilişkisizdir (Epidemiyolojik olarak ilişkili suşlar arasında ortak profil olmaması nadir bir durumdur). Salgın suşunun profili belirlendikten sonra, buradaki bantların sayı ve boyutları diğer izolatlarınki ile

karşılaştırılır. Her bir izolatın profili, salgın suşuyla olan ilişkisine göre sınıflandırılır (Durmaz ve Durmaz, 2001).

PFGE ile elde edilen DNA profillerini yorumlamak ve bunları epidemiyolojik çalışmalarda kullanabilmek için, PFGE profillerinin nasıl karşılaştırılması gerektiğinin ve rastlantısal genetik olayların bu profilleri nasıl değiştirebileceğinin bilinmesi gereklidir. İdeal olarak, salgın suşlarının PFGE profilleri birbirleriyle aynı, epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlarınki ise farklı olması gerekir. Böyle olduğu zaman salgın suşunun tespit edilmesi kolay olur. Ancak, sık olarak nokta mutasyon, insersiyon ve delesyon gibi rastlantısal genetik olaylar, salgın süreci içinde PFGE profilini değiştirebilir. Bu durum, sonuçların değerlendirmesini zorlaştırır (Durmaz ve Durmaz, 2001).

PFGE yönteminde kromozomal benzerlikler karşılaştırılmaktadır (Goering, 2004). Tenover ve ark. (1995), ilişkiyi tarif edebilmek için bir yöntem geliştirmiştir. Buna göre, bant profillerine bakılarak, izolatların birbirleriyle ilişkilerinin derecelendirilmesi yapılabilmektedir. Bu kriterler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. PFGE profillerini yorumlama kriterleri (Tenover ve ark.,1995)

Kategori	Salgın suşu profiline göre meydana gelen genetik faklılık sayısı	Salgın suşundan farklılık gösteren bant sayısı	Epidemiyolojik yorum
Aynı	0	0	İzolat, salgının bir parçası
Yakın ilişkili	1	2-3	İzolat, salgınla yakın ilişkili
Olası ilişkili	2	4-6	İzolat, salgınla olası ilişkili
Farklı	≥3	≥7	İzolat, salgınla ilişkisiz

Aynı izolat: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar, genetik olarak farksız kabul edilir. Salgın suşu ile aynı profili gösteren izolatlar, epidemiyolojik olarak ilişkilidir. Epidemiyolojik verilerle desteklenen tek bant farklılığının da klonal ilişkiyi gösterdiği kabul edilmektedir (Smith ve ark., 2000). Birçok tür için yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, PFGE tarafından tiplendirilemeyen izolatların, diğer tipleme teknikleri ile de tiplendirilemediği belirlenmiştir (Gordillo ve ark., 1993; Olsen ve ark., 1994; Tenover ve ark., 1995).

Yakın ilişkili izolat: Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı olan izolatlar için kullanılır. İzolat salgın suşuyla yakından ilişkili olarak değerlendirilir ve epidemiyolojik

olarak, salgının bir parçası olma olasılığı yüksektir. Bu farklılık, bir nokta mutasyon, bir insersiyon veya bir delesyon gibi tek bir genetik olayla ilişkilidir. Örneğin, yeni bir restriksiyon bölgesi oluşturan spontan bir mutasyon, restriksiyon parçasını daha küçük iki parçaya ayırır. Orijinal büyük parçanın eksikliği bir bant farkına, yeni oluşan daha küçük iki parça da ek olarak iki bant farkına neden olur. Başka bir ifade ile test izolatıyla salgın suşu arasında üç bantlık bir fark oluşur. Bazı türlere ait suşların zaman içinde tekrar kültürleri yapıldığında ya da aynı hastadan arka arkaya izole edildiğinde iki-üç bantlık bir değişiklik gösterdiği de kaydedilmiştir (Sader ve ark., 1993; Tenover ve ark., 1995).

Muhtemelen ilişkili izolat: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı olan izolatlar için kullanılır. Bu değişim, iki bağımsız genetik değişikliğin (insersiyon/delesyon ya da restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı) sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu tarz bir değişiklik, uzun bir zaman sürecinde (≥6 ay) veya çok sayıda hastanın olduğu büyük salgınlarda toplanan izolatlar arasında gözlenmiştir. Epidemiyolojik yönden, bu izolat, salgın suşuyla olası ilişkili olarak değerlendirilir. Bu izolatlar salgın suşuyla aynı genetik soydan (lineage) olabilirler, ancak genetik olarak yakın ilişkili değildirler. Epidemiyolojik olarak ilişkili olma ihtimalleri daha azdır (Tenover ve ark., 1994; Tenover ve ark., 1995; Durmaz ve Durmaz, 2001).

İlişkisiz izolatlar: Bu izolatların DNA'sında, üç ya da daha fazla genetik olay sonucu oluşan değişikliklere bağlı olarak, salgın suşundan yedi ya da daha fazla bant farkı gözlenmektedir. Epidemiyolojik olarak, salgın suşuyla ilişkisiz oldukları kabul edilir (Tenover ve ark., 1995).

Salgın suşlarına ait DNA restriksiyon profilleri genelde "tip A"olarak rapor edilir. Salgın suşunun profili ile yakın ya da muhtemel ilişkili profiller, "tip A"nın alt tipleri olarak değerlendirilip tip A1, tip A2 olarak; salgın suşundan çok farklı olan ve ilişkisiz olarak sınıflandırılan profiller ise tip B, tip C olarak gösterilir (Durmaz ve Durmaz, 2001).

PFGE; *Salmonella* (Old ve ark., 1999), *Neisseria gonorrhoeae* (Van Looveren ve ark., 1999), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (Grady ve ark., 1999), *Acinetobacter baumannii* (Marcos ve ark., 1995; Durmaz ve ark., 2007), *Escherichia coli* (Preston ve ark., 2000; Durmaz ve ark., 2007) gibi birçok gram-pozitif ve gram-negatif bakterinin tiplendirilmesinde güvenle kullanılmıştır. Vankomisine dirençli enterokoklar, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis, Acinetobacter* türleri ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının tiplendirilmesinde, bu yöntemin ayrım gücünün,

diğerlerinden daha üstün olduğu belirtilmiştir (Durmaz ve Durmaz, 2001). PFGE uygulanmış farklı bakteri türleri, kullanılan restriksiyon enzimler ve oluşan bant sayıları Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. PFGE yöntemi ile genetik analizi yapılan bazı bakteriler (Tenover ve ark., 1995; Durmaz ve Durmaz, 2001)

Mikroorganizma	Restriksiyon	Yaklaşıkbant sayısı	Bant büyüklük aralığı (kb)
Gram pozitif organizmalar			
Enterococcus spp.	*Sma*I	15-20	5-400
Clostridium difficile	*Sma*I	10-15	10-900
	*Sac*II	10-15	10-900
Clostridium perfringens	*Sma*I	12	45–1640
	*Sac*II	10	45–1640
Staphylococcus aureus	*Sma*I	15-20	10-700
	*Csp*I	10-15	30-500
Staphy. spp.(koag. negatif)	*Sma*I	15-20	5-400
Streptococcus pneumoniae	*Sma*I	10-19	20-300
	*Apa*I	10-19	20-250
Streptococcus spp. (A ve B grubu)	*Sma*I	15-20	5-500
Gram negatif organizmalar			
Acinetobacter baumannii	*Sma*I	20-40	5-300
	*Apa*I	20-30	10-300
Campylobacter jejuni	*Sma*I	8-10	40-400
Enterobacter spp.	*Xba*I	20	10-700
Escherichia coli	*Xba*I	20	10-500
	*Not*I	12-15	10-700
	*Sfi*I	15-20	10-500
Haemophilus influenzae	*Rsr*II	10–12	10–500
Legionella pneumophila	*Sfi*I	10–15	50–700
Neisseria meningitidis	*Bgl*II	20–30	5–200
Proteus mirabilis	*Sfi*I	7–10	50–700
Pseudomonas aeruginosa	*Spe*I	20–25	10–70
	*Xba*I	40–50	10–300
Salmonella spp.	*Not*I	40–50	5–400
Shigella spp.	*Xba*I	15–23	10–700
	*Sfi*I	15–20	10–700
Vibrio cholerae	*Not*I	20–30	10–400

Kilo baz (kb) büyüklüğünden mega baz (Mb) büyüklüğüne kadar olan DNA parçalarının izolasyonu, analizi ve ayrılabilme yeteneği, bakteri ve insan gibi çeşitli organizmaların genom organizasyonlarının içeriğinin aydınlatılmasında yardımcı olmuştur (Basım ve Basım, 2001).

PFGE'nin kullanım alanları

Dempsey ve ark. (1991), PFGE tekniğinin ortaya çıkmasının ve büyük DNA parçalarını ayrıştırma özelliğinin, bakteriyel genom analizleri için yeni yaklaşımlar sağladığını bildirmişlerdir. Farklı enzimler kullanılarak oluşturulan DNA parçalarının PFGE analizinin, bakteriyel genomun büyük parçalardan küçük parçalar halinde hızlı bir şekilde ayrılmasını sağlayan güçlü bir teknik olduğunu vurgulamışlardır.

Correia ve ark. (1999), endonükleaz kullanılarak elde edilen DNA parçalarının PFGE analizinin, kromozomların parmak izi çıkarma ve fiziksel haritalamada faydalı olabilecek farklı grup örnekleri oluşturduğunu bildirmiş ve PFGE'nin, aynı türün farklı suşları arasındaki akrabalığın belirlenmesinde faydalı bir teknik olduğunu belirtmişlerdir.

PFGE'nin, bakteri türlerinin karakterizasyonunda faydalı olmasının yanı sıra, genom büyüklüğünün hesaplanması ve kromozom haritalarının oluşturulmasında da etkili bir metot olduğu kanıtlanmıştır (Churin ve ark., 1995; Basım ve ark., 1999).

Bourgeois ve ark. (1995), PFGE'nin genom karakterizasyonunda çok güçlü bir araç olduğunu ve 180'den fazla bakteriyel kromozomun fiziksel haritasının oluşturulmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Gardiner (1991), PFGE ile maya yapay kromozomu kütüphanelerinin oluşturulduğunu ve PFGE denemelerinin transgenik fare üretiminde kullanıldığını bildirmiştir.

PFGE yöntemi coğrafik karşılaştırmalarda da kullanılmıştır (Boxall, 1999).

Murray ve ark. (1990), üç farklı coğrafik bölgeden topladıkları enterokokların genomik DNA'larını karşılaştırmak için PFGE yöntemini kullanmışlardır. Amerika, Taylan ve Şili'de belirli bölgelerdeki bir hastaneden 1-2 ay süre ile örnekler toplanmış ve bir ülkede belirlenen suş tipi diğer ülkelerde görülmemiştir.

Modern taksonomi bakterileri, atasal ilişkilerine göre belirlemektedir. Genetik bağlantıları kullanan PFGE gibi metotlar taksonomi alanında gittikçe artarak kullanılmaktadır. RFLP analizleri genomda çok az bölge tarayabilmiş ve bu durumda düşük ayrım gücü gösterirken; PFGE, yüksek derecedeki polimorfizmleri belirleyebilmiştir (Grothues ve Tümmler, 1991).

Najdenski ve ark. (1994), *Yersinia enetrocolitica* genomik DNA'sının, Avrupa'daki tip suşları arasındaki heterojeniteyi belirlemek amacıyla PFGE metodunu uygulamışlardır. Fenotipik markırlar bir serotip içindeki suşları ayırmada başarılı

olamamıştır. Biyotip, serotip ve faj tipleri arasında yüksek derecede ilişki görülmüştür. PFGE yöntemi açık bir şekilde serotip O:5 grubuna dahil suşların patojen olan ve olmayanlarını birbirinden ayırt etmiştir. Araştırıcılar PFGE'nin, verilen izolatların kökeninin araştırılmasında, salgın koşullarında ve hastane infeksiyonu gibi durumlarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Murase ve ark. (1995), Japonya'da PFGE tekniğini epidemiyolojik bir araç olarak kullanmışlardır. Gıda zehirlenmelerinden, sporadik infeksiyonlardan ve infekte hastalardan elde ettikleri *Salmonella* suşlarının parmak izlerini çıkartmışlardır. Enzimlerle kesildikten sonra bant oluşturan 28 izolat analiz edilmiş ve çeşitli salgınlardan elde edilen suşlar birbirlerinden ayırt edilmiştir. Sonuçlara dayanarak PFGE tekniğinin, *Salmonella* salgınlarının epidemiyolojik analizinde çok yararlı olduğunu belirtmişlerdir.

Mahalingam ve ark. (1994), Malezya'nın çeşitli bölgelerinde meydana gelen ve iyi tanımlanmış iki kolera salgınını araştırmışlardır. Hasta bireylerden alınan ve çevresel örneklerden izole edilen suşlar çalışmada kullanılmıştır. Aynı zaman periyodunda sporadik olgulardan ve yakın coğrafik bölgelerden izole edilen suşlar karşılaştırılmıştır. Koleranın endemik olarak görüldüğü bölgelerden izole edilen suşlarda yüksek oranda farklılık belirlenmiştir. Multiple klonun Malezya'ya endemik olduğu ve sporadik durumları ortaya çıkardığı belirlenmiştir. Periyodik salgınların ise pulsed field örnekleriyle çok yakın ilişkili olan tek bir klon tarafından ortaya çıktığı tespit edilmiştir. PFGE bu çalışmada bireysel izolatları ayırmada çok faydalı bulunmuştur.

Barret ve ark. (1994), *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu eyaletler arası gıda kaynaklı salgında, kaynak olarak sığır kıyması ürünleri tüketiminin gösterildiği bir durumda, laboratuvar doğrulaması için izolatlara PFGE ve faj tipleme yöntemlerini uygulamış ve bulguları teyit için bu metotlar birlikte kullanılmıştır. Salgından etkilenen 26 insandan izole edilen suşlar, pişirilmemiş etten izole edilen 27 izolat ile aynı faj tipini ve aynı pulsed field tipini göstermiştir. Sadece, 102 sporadik örnekten biri aynı pulsed field tipi göstermiştir. İnfeksiyonların kaynağı belirlenememesine rağmen, salgınla eş zamanda alınan 15 sporadik örnek aynı pulsed field tipini göstermiştir. PFGE kadar hassas olmamasına rağmen faj tipleme, PFGE sonuçlarının yorumlanmasında iyi bir yardımcı yöntem olarak belirtilmiştir. Ayrıca faj tiplemenin, PFGE analizi yapmadan önce akraba olmayan suşların elenmesinde hızlı ve basit bir yöntem olduğu vurgulanmıştır.

Dib ve ark. (1996), hastane kaynaklı *Candida rugosa* salgınında, PFGE yöntemini tipleme metodu olarak değerlendirmişlerdir. Yanık ünitesinden dokuz izolat, farklı bir üniteden bir izolat ve daha uzaktaki bir referans laboratuvarından sekiz izolatın, PFGE yöntemi kullanılarak karyotipi çıkarılmıştır. Aynı hastanenin farklı bir ünitesinden elde edilen bir izolat farklı bir pulsed field tip göstermesine rağmen, yanık ünitesinden elde edilen dokuz izolatın tamamı aynı pulso tipi göstermiştir. Karşılaştırma için kullanılan referans laboratuvarına ait izolatlar ise tamamen farklı tipler göstermişlerdir. Araştırmacılar, PFGE'nin *C. rugosa* suşlarını ayırt etmede ve gelecekte bu suşun neden olduğu infeksiyonların belirlenmesinde bu metodun referans olarak kullanılabileceği kanısına varmışlardır.

Winters ve ark. (1993), 190 günlük bir sürede hastanenin yanık ünitesindeki hastalardan izole edilen dokuz metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşunu kültüre almışlardır. PFGE analizi ile elde edilen profil hemen hemen aynıdır ve ayırt edilememiştir. Bazı izolatlarda bir bant fazladan bulunmuş, suşların birinde büyük bir bant eksikliği belirlenmiştir. Çalışmada diğer bir analiz olan plazmit profilleme sonucunda ise üç farklı grup belirlenmiştir. Bu dokuz MRSA suşu, aynı suşun klonal türevleri olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada yine PFGE yönteminin hastane kaynaklı infeksiyonlarda oldukça yararlı olduğu vurgulanmıştır.

Fujita ve ark. (1995), 19'u insandan, ikisi hayvandan izole edilen *Campylobacter fetus* suşlarına PFGE analizi uygulamışlardır. 21 suş arasında 18 tip olmasına rağmen, suşların çoğu farklı parmak izi profili göstermiştir. DNA tipi, Penner sistemindeki serotiplerle ilişkili bulunmamıştır. Bakterinin coğrafi dağılımı tanımlanmamış olmasına rağmen, Amerika ve Japonya'dan izole edilen suşlar arasındaki DNA tipleri bazı varyasyonlar göstermiştir. PFGE'nin, *C. fetus* infeksiyonlarının epidemiyolojik olarak araştırılmasında diğer tipleme metotlarından daha kullanışlı olduğu belirlenmiştir.

Savor ve ark. (1998), bir hastanenin çeşitli ünitelerindeki hastalarından 15 aylık sürede izole edilen vankomisin dirençli 45 *Enterococcus faecium* suşuna PFGE metodunu uygulamışlardır. Şaşırtıcı derecede çeşitlilik, iki farklı enzim kullanılan Restriksiyon Endonükleaz Analizi (REA) tiplemede ve PFGE'de görülmüştür. Klinik epidemiyolojik çalışmalarda tek bir metot yerine birkaç metodun denenmesinin sonuçların doğru yorumlanmasında önemli olduğu görüşüne varmışlardır.

Izumiya ve ark. (1997), Japonya'da 1996 yılının Mayıs ve Ağustos ayları arasında 608'i sporadik olgulardan ve 19'u salgınlardan elde edilen toplam 825 enterohemorajik *E. coli* O157:H7 suşunun moleküler tiplemesini gerçekleştirmişlerdir.

PFGE ile *E. coli* O157:H7 izolatları; altısı tiplendirilen ve biri tiplendirilemeyen grup şeklinde sınıflandırılmıştır. Yedi salgından elde edilen 50 izolat ve sporadik hastalardan izole edilen 60 izolatta, 22 DNA fragmentinden sadece birinde farklılık tespit edilmiş ve aynı PFGE profillerini gösterdiği belirtilmiştir.

Gautom (1997), PFGE ile incelenen genomik DNA örneklerinin, organizmadaki farklı suşlar için yüksek derecede spesifik olduğunu ve salgınlardaki infeksiyöz hastalıkların epidemiyolojik araştırılmasında çok önemli olduğunu belirtmiş fakat süre ve iş gücü yoğunluğu gibi nedenlerin, bu duyarlı yöntemin kullanımını kısıtladığını bildirmiştir.

Feizabadi ve ark. (1997), Avusturalya'da paratüberkülozlu hayvanlardan izole ettikleri 35 *Mycobacterium paratuberculosis* suşunun tiplemesini PFGE yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada iki farklı enzim kullanılmış ve ilk enzimle yapılan çalışmada tüm suşlarda aynı PFGE profili görülmüştür. İkinci enzimle yapılan çalışmada küçük farklılıklar bulunan iki ayrı grup profili elde edilmiştir. Bu iki grup, bölge ya da hayvanlar hesaba katılmaksızın oluşturulmuştur. Bu çalışma Avusturalya'daki ruminantlarda bulunan *Mycobacterium paratuberculosis*'e ait iki PFGE tipinin olduğunu ortaya koymuş ve Avusturalya'daki paratüberküloz hastalığının ileri epidemiyolojik analizlerinde yöntemin uygun olduğu bildirilmiştir.

Liu ve ark. (1998), Tayvan'daki bir hastanede ESBL üreten ve sefalosporinlere karşı dirençli, 31 adet klinik *Klebsiella pneumoniae* suşunun epidemiyolojisini araştırmak amacıyla moleküler teknikler kullanmışlardır. PFGE analizleri sonucunda, beş grup (% 80'den fazla benzerlik gösteren) içerisinde bulunan 20 izolat ile birlikte, izolatlara ait 16 genotip tespit etmişlerdir. Geri kalan 11 izolat ise yüksek derecede genetik heterojenite göstermiştir. Belirlenen beş farklı profil, 31 izolat içerisindeki varyasyonun küçük olduğunu kanıtlamıştır. ESBL üreten *K. pneumoniae* suşlarının sayısındaki artış direnç plazmitlerinin varlığına bağlanmıştır.

Tamplin ve ark. (1996), kabuklu deniz ürünleri, deniz suyu ve sediment örneklerinden izole edilen 78 adet çevresel; hastanelerden izole edilen 53 adet klinik *Vibrio vulnificus* suşunun PFGE analizini yapmışlardır. Çevresel ve klinik örneklerin profilleri arasında yüksek oranda çeşitlilik görülmüştür. Bunun tersine ribotipleme sonucunda ribotip profilleri arasında mükemmel derecede benzerlik tespit edilmiştir. Çevresel ve klinik örneklerin ribotiplemesi sonucunda dört baskın grup ortaya çıkmıştır. PFGE'nin, klinik suşları çevresel suşlardan ayırt etme gücünün çok yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tenover ve ark. (1994), 59 *Staphylococcus aureus* ve bir adet *S. intermedius* suşunu 12 farklı metod kullanarak tiplendirmeye çalışmışlardır. Suşların tamamı antibiyogram, biyotip, immunoblot analizi, multi lokus enzim elektroforezi (MLEE), ribotip analizi, PFGE ve Field-inverison jel elektroforezi (FIGE) yöntemleriyle tiplendirilebilmiştir. İnsersiyon sekans (IS) tipleme ise suşların bazıları için değerlendirilebilir olarak tespit edilmiştir. Tamamı düşünüldüğünde DNA bazlı teknikler ve immunoblotlama, salgınla ilişkili suşlar arasında en iyi gruplamayı yapmıştır. 29 salgın suşunun 27'sini tanımlamışlardır. Buna rağmen epidemik olarak salgınla ilgisiz 3-8 arasındaki suşu aynı tip içinde gösterdiği bildirilmiştir. Faj tipleme, plazmit DNA'sı restriksiyon analizi ve antibiyogram analizi, 29 salgın suşu içinden 23-26 arasında değişen sayıda suşu tiplendirebilmiştir. Fakat 0-6 arasında değişen sayıda ilişkili olmayan suş salgın suşu olarak değerlendirilmiştir.

Olsen ve ark. (1994), *Salmonella enterica* serovar. *enteritidis* suşunu faj tipleme yöntemiyle alt gruplarını belirlemişler ve bunun sonucunda 44 farklı faj tipi elde etmişlerdir. Bu farklı faj tipleri daha ileri bir analiz olarak IS200, ribotipleme ve PFGE yöntemleriyle karakterize edilmiştir. PFGE 10 farklı profil göstermiş ve bu profiller 33 suşun 22'sinde yaygın olarak görülmüştür.

Krause ve ark. (1996), İskoçya'da 17 ay süreyle topladıkları 124 *E. coli* O157:H7 suşunu, PFGE ve faj tipleme yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. PFGE profilleri, Dice katsayısının kullanıldığı ve UPGMA tarafından oluşturulan dendogram sayesinde birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Toplamda 12 faj tipi belirlenirken, izolatların % 7.9'u bu metot ile tiplendirilememiştir. PFGE metodunun diğer metoda göre ayrım gücü yüksek bulunmuştur.

Grif ve ark. (1998), Avusturya'da insan, gıda ve veteriner kaynaklı toplam 47 adet *E. coli* O157:H7 izolatını beş farklı epidemiyolojik tipleme metodu ile değerlendirmişlerdir. Riboprinter kullanılarak yapılan otomatik mikrobiyal karakterizasyon sistemli ribotiplemenin, epidemiyolojik ilişkinin tespiti için uygun olmadığı belirtilmiştir. Tüm *E. coli*'lerden biri faj tipleme ile tiplendirilmiştir. RAPD-PCR parmak izi M13 ve 1247 primerleri kullanılarak yapılmıştır. Her iki metod, iki grup oluşturmuştur. Buna rağmen her iki dendogram, EHEC O157'nin çoğunu epidemiyolojik ilişkili alt gruplarda toplamıştır. Total DNA'nın XbaI ile kesildiği PFGE çok değerli bir subtipleme sistemi olarak vurgulanmıştır. Çoklu alt tipleme metodlarının sonuçları arasında büyük farklılıklar olabileceği belirtilmiştir.

Guyot ve ark. (1999), 32 çoklu direnç gösteren *E. coli* suşunu 13 böbrek hastasının idrarından izole etmişlerdir. 32 izolatın tamamı siprofloksasin, kotrimoksazol ve beta laktamaza dirençli olarak bulunmuştur. PFGE analizi ile bazı coğrafik gruplarda 32 suş arasında 17 genotipin poliklonal salgın gösterdiği ortaya konmuştur.

Eklund ve ark. (2001), 1990–2000 yılları arasında Finlandiya'da O157 olmayan Shiga toksini üreten 56 *E. coli* (STEC) izolatını; O:H serotipi, stx_1 ve stx_2 genleri, enterohemolizin üretimi ve 12 antimikrobiyal ajana duyarlılıkları yönünden karakterize etmişlerdir. Aynı serotipteki suşlar, total DNA'nın XbaI restriksiyonundan sonra PFGE ile genotiplendirilmiştir. O157 olmayan 56 izolatın, 29 serotipe ait olduğu belirlenmiştir. Suşların 34'ü (% 61) 7 serotipe ayrılmış ve her serotipte birden fazla izolat belirlenmiştir. Bu suşlardan O103:H2 izolatları yedi, O26:H11 izolatları dört ve geri kalanlar PFGE ile iki genotipe ayrılmıştır. Suşların % 79'u 12 antimikrobiyal ajana karşı duyarlı bulunmuştur. 42 suş enterohemolizin üretmiştir. 39 suşun *eae* genine sahip olduğu belirlenmiştir. 31 suş stx_2, 24 suş stx_1, bir suşun ise hem stx_1 hem de stx_2 genine sahip olduğu bildirilmiştir.

Avery ve ark. (2004), 51 *E. coli* O157 suşunun PFGE çeşitliliğini belirlemişlerdir. Bu durum, tek bir çiftlikten hep aynı mezbahaya yollanan hayvanlarda değerlendirilmiştir. Bu tekrarlayan işlem zincirinde ölü hayvan veya dışkıdan izole edilen 51 *E. coli* O157'den 11 farklı PFGE profili elde edilmiştir. Aynı zamanda altı izolatın PFGE çeşitliliği ikinci bir mezbahada da belirlenmiştir ve sadece iki PFGE profili bulunmuştur. Diğer taraftan, sağlıklı hayvan etlerinden, insan hastalığına neden olan perakende etlerden izole edilen 136 *E. coli* O157 izolatının PFGE çeşitliliği belirlenmiştir. Bu izolatlar 78 farklı PFGE profili göstermiştir. Sonuç olarak, aynı bölgeden alınan *E. coli* O157 izolatlarına ait klon profilleri, farklı bölgelerden alınan 36 *E. coli* izolatına göre önemli derecede benzerlik göstermiştir. Çapraz kontaminasyonların kaynağını izlemede izolatların PFGE tiplemesi iyi bir yöntem olarak belirtilmiştir.

Foley ve ark. (2004) çalışmalarında; sığır, gıda ve hasta insanlardan izole edilen 92 *E. coli* O157:H7 arasındaki farklılıkların tespitinde PFGE, multilokus sekans tipleme (MLST) ve REP-PCR yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda MLST, 5 profil oluşturmuş, REP-PCR 14 farklı profil, PFGE ise 72 farklı PFGE profili ortaya koymuştur. Elde edilen bu sonuçlarda PFGE yönteminin diğer iki yöntemden daha etkili olduğu görülmüştür.

Lu ve ark. (2004), sulama suyu ve ortak sedimanlardan izole edilen *E coli* suşlarının genetik yakınlıklarını PFGE yöntemi kullanarak belirlemiş ve *E. coli* PFGE modellerinin genetik stabilitesini değerlendirmişlerdir. Teksas- Meksika sınırındaki Rio Grande Nehri boyunca sulama kanalları ve sedimentlerinden 4 aylık bir süre boyunca izolatlar elde edilmiştir. 50 *E. coli* izolatına PFGE kullanılarak genotipleme yapılmıştır. Birbirini takip eden aylarda elde edilen izolatların benzer genotip model gösterdikleri görülmüştür.

Matsumoto ve ark. (2005), Japonya'daki Halk Sağlığı Merkezlerinde, PFGE analizinin güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla enterohemorajik *E. coli* O157 tespiti yapmışlardır. Sekiz halk sağlığı merkezinden, güvenilirliği değerlendirmek amacıyla farklı deneysel prosedürler kullanılmış ve belirlenen 14 O157 suşunun PFGE tiplendirmesi karşılaştırılmıştır. Üç merkezde 14 PFGE tipi, beş merkezde ise 13 PFGE tipi kendi protokolleri ve Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü protokolleri uygulanarak tespit edilmiştir. Bu sekiz merkezin dışındaki beş merkezde, 14 suşun tamamının PFGE parmak izi genotiplemesi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak Pulse Net Japonya kurulumu için PFGE protokollerinin standardize edilmesi gerektiği bildirilmiştir.

Pei ve ark. (2008), Japonya'da sporadik vakalar ve salgın vakalarından elde edilen 100 adet enterohemorajik *E. coli* O157:H7 izolatında, 7 farklı alt tip tanımlamışlardır. Bu işlemde PFGE kullanılmıştır ve BlnI veya SpeI restriksiyon enzimleri kullanılan denemelerde PFGE örnekleri ayırt edilemezken, XbaI enzimi kullanılan çalışmada *E. coli* O157:H7'lerde alt tipleme yapılmıştır. Bu suşların genetik akrabalığını incelemek amacıyla Multi Locus Variable–Number Tandem Repeat (MLVA-VNTR) analizleri de yapılmıştır. MLVA analizlerinde 7 alt tipin üçü ayırt edilemezken geri kalan 4 alt tip ileri derecede farklı gruplarda yer almıştır.

Sekse ve ark. (2009), 2006 baharında Norveç'te Shiga toksin üreten *E. coli* O103:H25'in neden olduğu ulusal salgını araştırmışlardır. Gıda ve çevresel kaynaklı 931 örnek toplanmış ve salgının kaynağının doğranmış etler ya da fermente sosisler olabileceği üzerinde durulmuştur. PFGE ile yapılan moleküler tiplendirme sonucunda, fermente sosisten izole edilen ve hastalardan elde edilen suşların aynı olduğu dolayısı ile salgının kaynağının sosis olduğu tespit edilmiştir.

Sánchez ve ark. (2010), İspanya'da 11 yıllık süreç içerisinde, shiga toksini üreten *E. coli* O157:H7 suşlarının fenotipik özelliklerini ve genetik ilişkilerini belirlemek amacıyla koyun, sığır, geyik dışkısı ve pastörize edilmemiş keçi sütünden izole 46 adet

suşu incelemişlerdir. Karakterizasyon PCR, faj tipleme ve PFGE teknikleriyle gerçekleştirilmiştir. Suşların % 67.4'ü PT14, PT34 ve PT54 faj tipleri içerisinde yer almasına rağmen toplam dokuz farklı faj tipi belirlenmiştir. PT54'ün en yaygın faj tipi olduğu bildirilmiştir. XbaI enzimiyle yapılan PFGE analizinde, 11 yakın ilişkili grubu içeren 33 farklı tip belirlenmiştir.

Cergole-Novella ve ark. (2011), Brezilya'nın São Paulo şehrinde shiga toksin üreten, 21'i insan infeksiyonu ve 11'i sığır dışkısından izole edilen 32 *E. coli* suşunun antimikrobiyal direnç profilini ve moleküler karakterizasyonunu araştırmışlardır. En yüksek direnç oranları sırasıyla, tetrasiklin (% 100), streptomisin (% 78) ve trimetoprim-sülfometaksazol (% 56) olarak belirlenmiştir. PFGE analizi, her bir serogrup içerisinde bulunan suşların çoğunun, genetik olarak % 80-97 oranında benzerlik göstererek aynı grupta bulunduğunu göstermiştir.

Harakeh ve ark. (2006) Lübnan'da çeşitli su kaynaklarından elde edilen *E. coli* izolatlarının bazı antibiyotiklere karşı direnç durumlarını araştırmışlar ve en yüksek direnci deniz sularında sefuroksim'e, en düşük direnç ise sefotaksim'e karşı; tatlı su örneklerinde ise en yüksek direnci sefuroksime, en düşük direnci ise gentamisin'e karşı belirlemişlerdir.

Alzahrani ve Gherbawy (2011), Suudi Arbistan'ın Al-Ahsa bölgesinde bulunan kaynak sularından izole ettikleri *E. coli* suşlarında antibiyotik direncini araştırmışlardır. Araştırmacılar en yüksek direnci ampisilin'e karşı belirlemişlerdir.

Ozgumus ve ark. (2007) bazı çeşme ve kaynak sularından izole edilen *E. coli* suşlarında antibiyotiklere karşı direnç durumunu araştırmışlar; en yüksek direnç ampisilin'e karşı, en düşük direnç ise kloramfenikol'e karşı belirlenmiştir.

Lei ve ark. (2010) hayvansal gıda ürünlerinden izole ettikleri *E. coli* suşlarında yapılan antibiyogram çalışmasında, suşların en yüksek dirençli olduğu antibiyotiğin tetrasiklin olduğunu ve direnç oranının % 86.5 olarak belirlendiğini bildirmişlerdir.

Senkel ve ark. (2003) elma suyu üretimi yapan bir gıda tesisinden *E. coli* suşları izole etmişlerdir. Bu suşlar üzerinde yapılan antibiyogram çalışmasında 17 farklı antibiyotik kullanılmış ve en yüksek direnç tetrasiklin'e karşı belirlenmiştir.

Ryu ve ark. (2012) balık ve deniz ürünlerinden elde ettikleri *E. coli* suşlarında antibiyotik direncini araştırmışlardır. Buna göre suşların en fazla oranda ampisilin'e dirençli oldukları belirlenmiştir.

Albayrak ve Kaya (2009); idrar, kan, yara yeri ve balgam gibi klinik örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarında, antibiyotik direncini araştırmışlardır. Araştırmacılar bu

çalışmaya paralel olarak genişlemiş spektrumlu beta laktamaz aktivitesini de araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre GSBL(+) suşlarda, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefalotin, sefazolin, sefuroksim, seftriakson direncini çok yüksek oranda olduğunu bildirmişlerdir.

Yavuzdemir ve ark. (2003) yatan hastalardan izole edilen GSBL pozitif 50 *E.coli* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılığını belirlemişlerdir. Buna göre suşların imipenem'e, amikasin'e, piperasilin/tazobaktam'a ve sefepim'e duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Kalem ve ark. (2008) idrardan izole edilen 178 *E.coli* suşunun ampisilin, trimetoprim/sülfametoksazol, ampisilin/sulbaktam, sefuroksim, siprofloksasin, nitrofurantoin, amikasin, gentamisin ve imipeneme duyarlılıklarını araştırmışlardır. İmipenem'e 178 (% 100), amikasin'e 157 (% 88.2), nitrofurantoin'e 151 (% 84.8), gentamisin'e 129 (% 72.5), sefuroksim'e 124 (% 69.7), siprofloksasine 111 (% 62.4), ampisilin/sulbaktam'a 92 (% 51.7), trimetoprim/sülfametoksazol'e 79 (% 44.4) ve ampisilin'e 39 (% 21.9) suş duyarlı bulunmuştur.

Arslan ve ark. (2010), 2004-2007 yılları arasında kan dolaşımı infeksiyonlarından izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını araştırmışlardır. GSBL üreten suşların, meropenem'e % 100, amikasin'e % 84, siprofloksasin'e % 19, piperasilin-tazobaktam'a % 79, trimetoprim-sülfametaksazol'e % 32 gentamisin'e % 37 oranında duyarlı oldukları belirlenmiştir. GSBL üretmeyen suşların duyarlılıkları, meropenem % 100, amikasin % 90, siprofloksasin % 84, piperasilin-tazobaktam % 97, trimetoprim/sülfametaksazol % 55, gentamisin % 88 ve amoksisilin % 28 olarak saptanmıştır.

Erdem ve ark. (2007) Türkiye'de çeşitli kaynaklardan izole edilen duyarlı ve çoklu dirençli *Salmonella* serotip *typhimurium* suşları içerisinden 55 suşun plazmit profillerini araştırmışlardır. İncelenen suşların 45'inin (% 82), büyüklükleri 1.0 ile 100 kb arasında değişen bir ile üç plazmit taşıdığı belirlenmiştir. En yaygın plazmitin 90 kb büyüklüğündeki plazmit olduğu ve bu plazmitin 35 suş (% 64) tarafından tek başına veya başka plazmitlerle birlikte taşındığı tespit edilmiştir.

Gakuya ve ark. (2001), farelerden izole edilen *E. coli*'lerde, plazmit taşımayan suşlarda da antibiyotik direncin belirlenmesine dayanarak, plazmitler ve antibiyotik direnç arasında çok yakın bir ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir. Buna rağmen suşların % 75'inde bulunan dirençten 90-100 mDa ve 55-65 mDa'lık plazmitlerin sorumlu olduğunu vurgulamışlardır.

Jan ve ark. (2009), üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *E. coli*'lerin % 50'sinden fazlasında çoklu antibiyotik direnci görüldüğünü; izolatların % 52.6'sının plazmit taşıdığını belirtmişlerdir.

Fei ve ark. (2003), bebeklerde ishale neden olan enteropatojenik *E. coli* (EPEC) suşlarının 22'sinde 1.0-30.9 mDa (mega dalton) aralığında bir ve daha fazla plazmit tespit etmişlerdir. Antibiyotik direnci ile ihtiva edilen plazmitler arasında kesin bir ilişki belirlenemediği bildirilmiştir.

Umolu ve ark. (2006) etlerden izole edilen *E. coli* suşlarında bazı antibiyotiklere karşı direnci ve suşların plazmit profillerini belirlemişlerdir. Bazı plazmitlerin çoklu antibiyotik direnci gösteren suşlarda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Chigor ve ark. (2010), yüzey suları ve insan dışkı örneklerinden izole ettikleri 184 *E. coli* suşunun, plazmit ve direnç profillerini belirlemişler; suşların % 42.9'unun dört ve daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiğini; 22 suşta plazmit bulunduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri suşları

Bu çalışmada; Konya İl merkezinde Mart 2009-Temmuz 2010 tarihleri arasında, çeşitli kuyu suyu örneklerinden 43 adet, çeşitli gıdalardan 40 adet ve hastane klinik materyallerinden 47 adet olmak üzere toplam 130 adet *Escherichia coli* suşu izole edilmiş ve kullanılmıştır. Su izolatları, Halk Sağlığı Laboratuvarı'na gelen kuyu suyu örneklerinden elde edilmiştir. Gıda izolatları, il merkezindeki çeşitli pastane, market ve pazarlardan alınan; dondurma, yaş pasta, tavuk eti, peynir ve sucuk gibi gıda örneklerinden izole edilmiştir. Klinik izolatlar ise Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır. *E. coli* V517 standart suşu Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler

Deney suşlarının izolasyonları ve kültürlerinin hazırlanmasında kullanılan; Brain Heart Infüzyon Broth (BHIB), Eosin Metilen Blue (EMB) Agar, Trypticase Soy Agar (TSA), Luria Bertani Broth (LBB) besiyerleri ticari olarak Difco (Becton Dickinson, NJ USA), Chromocult TBX Agar ve antibiyogram çalışmasında kullanılan Mueller-Hinton Agar (MHA) ticari olarak Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir. Suşların, tür teşhislerinin doğrulanmasında kullanılan API-20E bakteriyel identifikasyon test kiti, ticari olarak bioMérieux Industry (bioMerieux, Inc., Hazelwood, MO)'den sağlanmıştır.

Ampisilin (AM), Kloramfenikol (C), Amikasin (AK), Gentamisin (CN), Sefotaksim (CTX), Seftazidim (CAZ), Sefuroksim (CXM), Siprofloksasin (CIP), Tetrasiklin (TE), Sefalotin (KF), Netilmisin (NET), Meropenem (MEM), Amoksisilin/klavulanik asit (AMC), Tikarsillin/klavulanik asit (TIM), Piperasilin/tazobaktam (TZP) antibiyotik diskleri Bioanalyse (Tıbbi Malzeme San. Tic. Ltd. Şti, Türkiye) firmasından sağlanmıştır.

Fenol, kloroform, EDTA, D-glikoz, Tris-HCl, Trisma base, potasyum asetat, amonyum asetat, etil alkol, glasiyal asetik asit, etidyum bromür, borik asit, sodium laurly sulfat (Sodium dodesil sülfat), lizozim, proteinaz K gibi kimyasal maddeler Merck (Darmstadt, Germany)'ten, low melting point (LMP) agaroz, pulsed certified agaroz, N-Lauroylsarcosnie sodium salt, sodyum deoksikolat Sigma-Aldrich (Chemie GmBH, Germany)'ten, *Xba*I Restriksiyon enzimi ve RNAase A Fermentas (Thermo Fisher Scientific, USA) firmasından alınmıştır.

3.1.3. Tampon ve çözeltiler

3.1.3.1. PFGE çalışmasında kullanılan çözeltiler

Hücre Süspansiyon Tamponu (HST): 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 20 mM NaCl, pH 7.2)

Katı besiyerinde üretilen bakteri kültürlerinin süspansiyonu için kullanıldı. Karışım hazırlandıktan sonra otoklavda steril edildi ve +4 °C'de saklandı.

% 20'lik Sodyum Dodesil Sülfat:

SDS	20 g
Distile su	100 ml

20 g SDS 100 ml distile su içerisinde homojen şekilde çözüldü.

Hücre Lizis Solüsyonu I: 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 20 mM NaCl, pH 7.2

Bakterilerin hücre duvarının parçalanması işleminde kullanıldı. Karışım hazırlandıktan sonra otoklavda steril edildi. Örneklerin hazırlanması sırasında bu karışım 1/2 oranında steril ultra saf su ile sulandırıldı. Kullanmadan önce bu karışıma 2.5 mg/ml olacak şekilde lizozim ve 1.5 mg/ml proteinaz K eklendi.

Stok Lizozim çözeltisi (100 mg/ml):

Lizozim	100 mg
Enjeksiyonluk su	1 ml

Karışım hazırlandı ve vortekslenerek çözdürüldü. -20 °C'de saklandı.

Stok Proteinaz K çözeltisi (100 mg/ml):

Proteinaz K	100 mg
Enjeksiyonluk su	1 ml

Hücre Lizis Solüsyonu II (Proteinaz K çözeltisi): 0.5 M EDTA, % 1 sarkozil, 400 µg/ml proteinaz K

Proteinleri uzaklaştırmak için kullanıldı.

TE tamponu: 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM EDTA

Agaroz kalıplarının yıkanması işlemlerinde kullanıldı. Karışım hazırlandıktan sonra otoklavda steril edildi.

10X TBE tamponu (pH 8):

Trizma Base	108 g
Borik Asit	55 g
EDTA	9.3 g
Distile su	800 ml

Maddeler distile su içerisinde çözülerek hacim 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavda steril edildi. Stok olarak hazırlanan bu tampon, 0.5X olacak şekilde seyreltilerek tank tamponu olarak kullanıldı.

3.1.3.2. Plazmit DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

Solüsyon I: 50 mM Glukoz, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, 2 mg/ml lizozim (pH 8)
Solüsyon II: % 1 Sodyum dodesil sülfat (SDS) (% 10'luk stoktan hazırlanacak), 0.2 N NaOH
Solüsyon III: 60 ml 5 M Potasyum asetat, 11.5 ml glasiyal asetik asit, 28.5 ml distile su ile hazırlandı.
TE tamponu: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)
Fenol: Kloroform: İzoamil alkol: 25: 24: 1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

50X TAE tamponu (pH 8):

Trisma base	242 g

Glasiyal asetik asit	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8)	100 ml

Toplam hacim 1 litreye tamamlanarak pH 8'e ayarlandı. Daha sonra otoklavda steril edildi. Agaroz jel hazırlama ve jel yürütme sırasında stok tampon, 1X TAE şeklinde seyreltilerek kullanıldı.

Etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml):

Etidyum bromür	30 mg
Distile su	3 ml

Madde su içerisinde çözününceye kadar karıştırıldı. 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere dağıtılarak etrafı alüminyum folyo ile sarıldı ve +4 °C'de saklandı. PFGE ve plazmit profil analizinde DNA'yı görüntülemek amacıyla kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Bakteri suşlarının izolasyonu

Halk Sağlığı Laboratuvarına getirilen kuyu suyu örnekleri, membran filtrasyon yöntemiyle izole edildi. Önceden steril edilen membran filtrasyon cihazında (Sartorius), 0.45 µm por çaplı membran filtreler kullanıldı. Huni kısmına su numunesi kondu ve vakumlama ile filtrasyon tamamlandı. İşlemin ardından, membran filtre steril pens yardımıyla alınarak önceden hazırlanan Standart Laktozlu Tergitollü TTC Agar besiyerine yerleştirildi. Petri kutuları, tabanları alta gelecek şekilde 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu besiyerindeki sarı-turuncu renkli kolonilere oksidaz ve indol testi yapıldı. Oksidaz (-) ve İndol (+) reaksiyon veren bakteriler *E. coli* olarak belirlendi (Dufour ve ark., 1981; Kireçci ve ark., 2006). Bu izolatlar, Eosin Metilen Blue Agar besiyeri plaklarına ekildi ve bir gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İşlemin ardından S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'na getirilerek +4 °C'de saklandı.

Konya İl merkezinde bulunan çeşitli pazar, market ve pastanelerden; dondurma, yaş pasta, peynir, tavuk eti, sucuk gibi bazı gıda maddelerine ait numuneler, steril plastik kutulara alındı ve hızlı bir şekilde laboratuvara getirildi. Katı numunelerden aseptik şartlar altında, 1 g numune alınarak, içerisinde 9 ml Nutrient broth bulunan şişelere aktarıldı ve homojenizasyonu sağlandı. Etüvde 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra EMB besiyerine azaltma metoduyla ekim yapıldı. Dondurma örnekleri ise oda ısısında bırakıldı ve erimenin ardından homojenize edilen 0.1 ml örnek, EMB agar besiyerine yayma metoduyla ekildi (Anonim, 2005). 44 °C'de 24 saat inkübasyon süresi sonunda metalik parlaklıkta yeşil röfle veren koloniler (Şekil 3.1.A) *E. coli* olduğu şüphesiyle izole edilerek +4 °C'de saklandı.

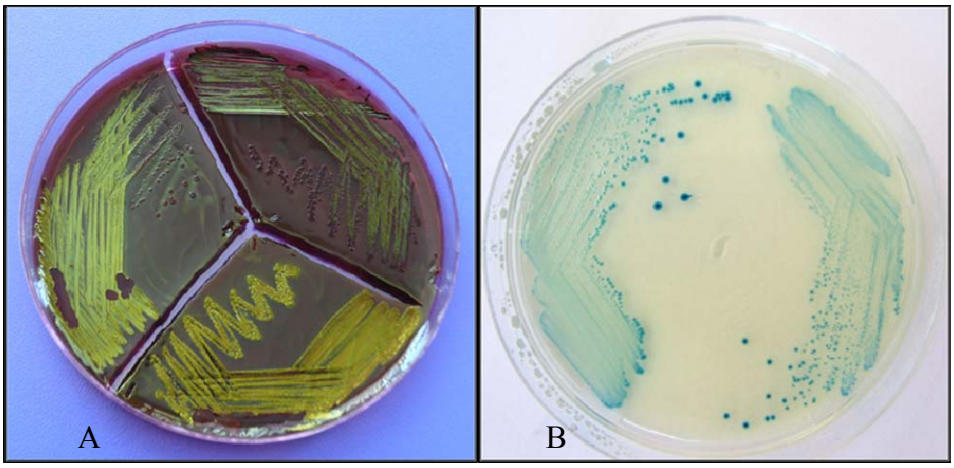
S.Ü. Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilen hastalara ait numuneler, kültüre alınarak *E. coli* olduğu belirlenen izolatlar EMB agar besiyerine aktarıldı ve inkübasyon süresi sonunda +4 °C'de saklandı.

3.2.2. Suşların API 20E bakteriyel teşhis kiti ile identifikasyonu

Suşların *E. coli* olup olmadıklarının doğrulanması amacıyla, içerisinde bir dizi biyokimyasal test ihtiva eden API 20E tanımlama sistemi kullanıldı. İşlemler, üretici

firma tarafından tavsiye edilen prospektüse göre yapıldı. Test striplerinin değerlendirilmesiyle oluşan sayılar, Apiweb^{TM} yazılımı kullanılarak sisteme girildi ve test edilen suşun türü, identifikasyon yüzdesi ile birlikte belirlendi.

API 20E sisteminde meydana gelebilecek teşhis hatalarına karşı, son olarak izolatlar Chromocult TBX (Tryptone Bile X-glucuronide) Agar besiyerine aktarıldı. Besiyeri bileşimindeki kromojen substrat 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glukuronid (X-β-D-glukuronid) *E. coli*'deki β-D-glukuronidaz enzimi ile 5-bromo-4-kloro-3-indolil ve β-D-glukuronid'e parçalanır, sonuç olarak *E. coli* kolonileri mavi-yeşil renkli olarak görülür (Şekil 3.1.B). Bu çalışma ile *E coli* olduğu doğrulanan suşlar çalışmada kullanıldı.



Şekil 3.1.A) EMB Agar besiyerinde *E. coli* kolonilerinin genel görünümü **B)** TBX Agar besiyerinde *E. coli* kolonilerinin genel görünümü

3.2.3. Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)

İzolasyonları ve identifikasyonları tamamlanan *E. coli* suşlarının genetik akrabalıklarını belirlemek amacıyla, bazı modifikasyonlar uygulanarak Durmaz ve ark. (2009) tarafından bildirilen PFGE metodu kullanıldı.

3.2.3.1. İzolatların hazırlanması

Triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi yapılan örneklerin, bir gecelik inkübasyondan sonra saflığı kontrol edildi. Buradaki tek koloniden tekrar triptikaz soy agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakıldı. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1

ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, 13,000 x g devirde 4 °C'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atılıp, pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlandı ve kırık buz içinde bekletildi.

3.2.3.2. İzolatların agaroza gömülmesi

HST içerisinde % 2'lik düşük erime ısılı agaroz (Low melting agaroz) hazırlandı. Bir balon içerisinde 0.1 g agaroz, 5 ml HST ile karıştırıldı ve mikro dalga fırında eritildi. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50 ^{o}C'lik su banyosuna konup, % 20'lik sodyum dodesil sülfattan (50 ^{o}C de ısıtılmış) 250 µl eklenerek iyice karıştırıldı. Agaroz-SDS karışımından 100 µl Ependorf tüplere dağıtıldı ve 50 °C'deki kuru ısı bloğunda bekletildi. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına yerleştirildi. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak, 50 °C'de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime ısılı agaroz-SDS karışımı bulunan tüpe eklendi. Bu karışımdan agaroz kalıplara 100 µl aktarıldı. Kalıplar, agaroz katılaşıncaya kadar +4 °C'de 10 dakika bekletildi.

3.2.3.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1.5 ml'lik steril ependorf tüplere, 500 µl hücre liziz solüsyon I dağıtıldı. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirildi. 37 °C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Liziz solüsyon I aspire edildi ve yerine 500 µl hücre liziz solüsyon II kondu. 55 °C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

3.2.3.4. Hücre lizizinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler +4 °C'de 15 dakika bekletildi. Dikkatlice hücre lizis solüsyonu II aspire edildi. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 1 ml TE tamponu aktarıldı ve 50 °C'de çalkalamalı su banyosunda 15 dakika yıkandı. TE tamponu ile yapılan bu yıkama işlemi aynı şekilde beş kez daha

tekrar edildi. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirildi.

3.2.3.5. *E. coli* DNA'sını içeren kalıpların *Xba*I RE ile kesimi

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 0.1X *Xba*I tamponu içine aktarıldı ve çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 10 dakika bekletildi. Sonra sıvı aspire edildi. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

10 µl 10X *Xba*I tamponu,

6 µl *Xba*I enzimi (20 U /µl) (Fermentas),

84 µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)

Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı kondu ve çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi. Kalıplar elektroforez için hazırlandı.

3.2.3.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

0.5X TBE ile % 1'lik 100 ml agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı.

RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna (*E. coli* ATCC 25922) ait kalıplar yüklendi. Örnek konan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek şartıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Sıcaklığı yaklaşık 45-50 °C'de olan agaroz dikkatli bir şekilde kaset içine döküldü. Oda ısısında 20-30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı ve tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 2000 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

3.2.3.7. Elektroforez

CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium), *E. coli* için elektoforez şartları: Başlangıç vuruş süresi 10 sn, bitiş vuruş süresi 50 sn, vuruş açısı 120°, akım 200 V (6 V/cm^2), sıcaklık 14 °C, elektroforez süresi 20 saat (TBE tamponu

pH=8.0) şeklinde uygulandı. Belirtilen şartlar 20 saat süre ile elektrodlar arasında sıra ile tekrarlanmıştır.

3.2.3.8. Sonuçların gözlenmesi ve analizi

Elektroforezden sonra jel, 5 μg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alındı ve 20 dakika boyandı. Jel, UV ışığa altında görüntülendi. Gel logic imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. GelCompar II (version 6.5) yazılım sistemi kullanılarak bant profilleri analiz edildi. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Tenover ve ark. (1995) tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi.

3.2.4. Plazmit profil analizi

Gıda kaynaklı patojenlerin epidemiyolojik analizinde kullanılan ilk genotipleme metotlarından biri plazmit analizidir (Mayer, 1988). Plazmitler, bakteri sitoplazması içinde bulunan ve en az bir replikasyon orijinine sahip, ekstra kromozomal dairesel DNA molekülleridir. Hücre bölünmesi sırasında, orijinal plazmitin kopyaları yeni hücrelere dağıtılır. Böylece aynı klona ait bakteriler tipik olarak aynı plazmitleri taşır. Bu durum bakteri izolatları arasında, karşılaştırmayı kolaylaştırmaktadır. Bazı plazmitlerin bulundukları bakteriye, taşıdıkları genlere bağlı olarak antibiyotiklere ve ağır metallere direnç ve virülans gibi özellikler kazandırdıkları bilinmektedir (Foley ve ark., 2009).

Çok sayıda plazmit izolasyon metodu tanımlanmıştır (Foley ve ark., 2009). Örneğin, Kado ve Liu (1981) tarafından tanımlanan metotta; kromozomal DNA'yı denatüre eden yüksek sıcaklık ve alkalin şartları altında, bakteri hücrelerinden bırakılan plazmitlerin selektif olarak izolasyonu yapılmaktadır. Bir diğer yöntem de alkali lizis metodudur (Birnboim ve Doly, 1979). Plazmit DNA'yı çöktürmek için, bakteriyel hücre süspansiyonundan fenol:kloroform karışımı ile hücre kalıntıları, proteinler ve kromozomal DNA uzaklaştırılır. Plazmit DNA'lar, jel elektroforez yöntemiyle ayrıştırılır, etidyum bromid ile boyandıktan sonra görülür hale getirilir. Genellikle süper

sarmal yapıda bir moleküler ağırlık standardı kullanılır ki bu işlem için boyutları bilinen süper sarmal yapılı plazmitleri içeren *E. coli* 39R861 (NCTC 50192) ve *E. coli* V517 (NCTC 50193) suşları kullanılabilir. Bu suşlardan elde edilen plazmitler, diğer izolatlara ait plazmitlerin boyutlarını belirlemek için aynı anda jelde yürütülür ve boyutları belirlenir (Foley ve ark., 2009). Plazmit bantlarının sayısı ve büyüklükleri, istenilen izolatın plazmit profilini belirlemek için analiz edilir (Nauerby ve ark., 2000). Farklı izolatların profilleri, farklı klonal bağlantıyı açığa çıkarmak amacıyla karşılaştırılır (Aktas ve ark., 2007; Foley ve ark., 2006).

3.2.4.1. Plazmit izolasyonu

E. coli izolatlarının plazmit profillerini belirlemek amacıyla, bazı modifikasyonlar uygulanarak Birnboim ve Doly (1979) tarafından belirlenen alkali lizis metodu uygulandı (Sambrook ve Russell, 2001).

Bakteriler Luria Bertani Broth besiyerinde (5 ml) 37 °C'de bir gece inkübe edildi. Kültür 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı ve 10,000 devirde, +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. 5 ml'lik besiyerinin tamamının kullanılması ve yeterince çökelti elde edilmesi için bu işlem 5 ml'lik miktar bitinceye kadar tekrar edildi. Çökelti üzerine 100 µl solüsyon I ilave edildi ve homojen bir karışım sağlanıncaya kadar vortekslendi ve buzda 5 dakika bekletildi. Üzerine 200 µl taze hazırlanmış solüsyon II eklendi, yoğunluğu değişinceye kadar alt üst edilerek karıştırıldı. Sonra, 150 µl solüsyon III ilave edildi, süt beyazı görünümü elde edilinceye kadar alt üst edilerek karıştırıldı. 5 dakika buzda bekletildi. 12,000 devirde, +4 °C'de, 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. Aktarılan süpernatant üzerine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol karışımı ilave edildi. 12,000 devirde, +4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Üst kısım temiz bir ependorfa alındı ve üzerine 0.5 ml soğuk etil alkol eklendi. 12,000 devirde, +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Alkol uzaklaştırıldı. Tekrar üzerine soğuk etil alkol ilave edildi ve 12,000 devirde, +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Alkol uzaklaştırıldı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra pellet, 70 µl TE'de çözüldü.

3.2.4.2. Agarozun hazırlanması ve örneklerin yürütülmesi

Plazmid izolatları, % 0.8 agaroz ile 1X TAE tamponu ile hazırlanan jel sistemlerinde, her kuyucuğa 18 µl+3 µl 6X yükleme boyası olacak şekilde yüklendikten sonra 100 volt elektrik akımı uygulanarak (~1.5 saat) elektroforez işlemine tabi tutuldu. Bu sistemlerde moleküler marker olarak *E. coli* V517 suşundan izole edilen plazmitler kullanıldı. Elektroforez işlemi sonrasında agaroz jeller, 366 nm dalga boyunda UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları alındı (UVP, GelDoc It™ Imaging System).

3.2.4.3. Plazmit büyüklüklerinin belirlenmesi

E .coli suşlarından izole edilen plazmitlerin büyüklüklerinin belirlenmesinde; moleküler büyüklükleri bilinen *E. coli* V517 suşuna ait plazmit markırlarının elektroforetik hareketlilikleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında tanımlanan doğrusal ilişkiden yararlanıldı (Macrina ve ark., 1978; Southern, 1979; Schaffer ve Sederoff, 1981). Marker plazmit DNA moleküllerinin agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak bakterilerden izole edilen plazmitlerin büyüklükleri saptandı (Elder and Southern, 1983).

3.2.5. Antibiyotik duyarlılık testleri

Bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık deneyleri, Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle, Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2008) önerileri doğrultusunda yapıldı. Duyarlılık deneyinde kullanılan antibiyotik diskleri Çizelge 3.2'de verildi.

Bakterilerin, Mueller-Hinton broth besiyerindeki 18-24 saatlik kültürlerinden, steril serum fizyolojik içerisine bir miktar aktarıldı ve 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan 0.1 ml kadar alındı ve steril pamuklu swap ile Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine yayıldı. Steril pens yardımıyla diskler besiyerine yerleştirildi. 37 °C'lik etüvde 16-18 saat inkübe edildi. Petri kutuları inkübasyondan sonra aydınlık bir ortamda incelendi. İnhibisyon zon çapı bir cetvel ile mm olarak ölçüldü. Zon çapları değerlendirilmesinde CLSI (2008) kriterleri esas alındı.

Çizelge 3.2. Kullanılan antibiyotik diskleri, konsantrasyonları ve inhibisyon zon çaplarının değerlendirilmesi (CLSI, 2008)

Kemoterapötik madde	Her diskin içerdiği miktar (µg)	Zon çapı (mm)		
		Dirençli (Resistant)	Orta Duyarlı (Intermediate)	Duyarlı (Susceptible)
Ampisilin (AM)	10	≤13	14-16	≥17
Kloramfenikol (C)	30	≤12	13-17	≥18
Amikasin (AK)	30	≤14	15-16	≥17
Gentamisin (CN)	10	≤12	13-14	≥15
Sefotaksim (CTX)	30	≤14	15-22	≥23
Seftazidim (CAZ)	30	≤14	15-17	≥18
Sefuroksim (CXM)	30	≤14	15-17	≥18
Siprofloksasin (CIP)	5	≤15	16-20	≥21
Tetrasiklin (TE)	30	≤14	15-18	≥19
Sefalotin (KF)	30	≤14	15-17	≥18
Netilmisin (NET)	30	≤12	13-14	≥15
Meropenem (MEM)	10	≤13	14-15	≥16
Amoksisilin/klavulanik asit (AMC)	20/10	≤13	14-17	≥18
Tikarsilin/klavulanik asit (TIM)	75/10	≤14	15-19	≥20
Piperasilin/tazobaktam (TZP)	100/10	≤17	18-20	≥21

İzolatların çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeksi, test organizmasının dirençli olduğu antibiyotik sayısının toplam denenen antibiyotik sayısına oranı ile hesaplandı (a/b). Burada "a" izolatın dirençli olduğu antibiyotik sayısını,"b" ise izolat üzerinde uygulanan toplam antibiyotik sayısını temsil eder. Hesaplanan ÇAD indeksi eğer 0.2'den daha büyükse organizmanın yoğun antibiyotik kullanılan bir kaynaktan geldiği; 0.2'ye eşit veya daha küçük ise, antibiyotiğin hiç kullanılmadığı ya da nadir kullanıldığı bir ortamdan geldiği kabul edilir (Krumperman, 1983).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *E. coli* suşlarının kullanılan antibiyotiklere duyarlılık durumları

Bu çalışmada identifikasyonları yapılmış 130 *E. coli* suşunun 15 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılık durumları araştırıldı.

Sudan izole edilen 43 adet *E. coli* suşunun antibiyogram sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sudan izole edilen *E. coli*'lerin kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli (R), orta duyarlı (I) ve duyarlı (S) suş sayıları ve % oranları

	R % (n)	**I** % (n)	**S** % (n)
TZP	0	0	100 (43)
TE	4.66 (2)	9.30 (4)	86.04 (37)
CTX	0	4.66 (2)	95.34 (41)
AM	97.67 (42)	2.33 (1)	0
CIP	0	0	100 (43)
TIM	9.31 (4)	0	90.69 (39)
AMC	4.66 (2)	0	95.34 (41)
KF	4.66 (2)	6.97 (3)	88.37 (38)
MEM	0	0	100 (43)
C	0	0	100 (43)
NET	0	6.97 (3)	93.03 (40)
AK	0	0	100 (43)
CN	0	4.66 (2)	95.34 (41)
CXM	6.97 (3)	0	93.03 (40)
CAZ	6.97 (3)	0	93.03 (40)

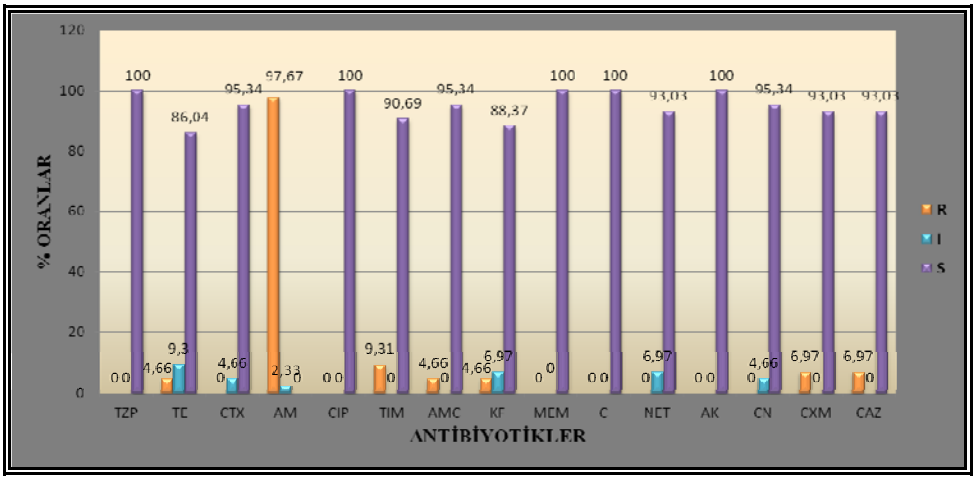
Buna göre; suşların tümü, beta laktam grubu antibiyotiklerden piperasilin/tazobaktam'a (TZP) karşı duyarlı bulundu. Aynı gruptan tikarsilin/klavulanik asit'e (TIM) karşı dört (% 9.31) suş dirençli olarak belirlenirken, geri kalan 39 suş (% 90.69) ise duyarlı bulundu. Beta laktam grubundan ampisilin'e (AM) karşı suşların 42'sinin (% 97.67) dirençli, birinin ise (% 2.33) orta duyarlı olduğu saptandı. Amoksisilin/klavulanik asit'e (AMC) karşı suşlardan ikisinin (% 4.66) dirençli, 41'inin ise (% 95.34) duyarlı olduğu belirlendi.

Beta laktam grubu sefalosporinlere karşı duyarlılık durumu: Birinci kuşak sefalosporin olan sefalotin'e (KF) karşı iki suş (% 4.66) dirençli, üç suş (% 6.97) orta duyarlı ve 38 suş (% 88.37) ise duyarlı olarak belirlendi. İkinci kuşak sefalosporin olan sefuroksim'e (CXM) karşı üç suşun (% 6.97) dirençli, geri kalan 40 suşun ise (% 93.03)

duyarlı olduğu saptandı. Üçüncü kuşak sefalosporinlerden biri olan sefotaksim'e (CTX) karşı suşların sadece ikisi (% 4.66) orta duyarlı, 41 suş ise (% 95.34) duyarlı bulunurken; üçüncü kuşak bir diğer sefalosporin olan seftazidim'e (CAZ) üç suş (% 6.97) dirençli ve geri kalan 40 suş (% 93.03) ise duyarlı olarak belirlendi (Çizelge 4.1).

Aminoglikozid grubu antibiyotiklerden amikasin'e (AK) karşı suşların tümü (% 100) duyarlı bulundu. Suşlardan ikisinin (% 4.66) gentamisin'e (CN) orta duyarlı, 41'inin (% 95.34) ise duyarlı olduğu tespit edildi. Aynı gruba ait netilmisin'e (NET) üç suşun (% 6.97) orta duyarlı, 40 suşun (% 93.03) ise duyarlı olduğu belirlendi (Çizelge 4.1).

Deney suşlarının tümünün (% 100), beta laktam grubu karbapenem olan meropenem'e (MEM) duyarlı olduğu belirlendi. Tetrasiklin'e (TE) karşı iki suşun (% 4.66) dirençli, dört suşun (% 9.30) orta duyarlı ve 37 suşun duyarlı olduğu saptandı. İkinci kuşak kinolon grubu antibiyotiklerden olan siprofloksasin'e (CIP) ve kloramfenikol'e (C) karşı suşların tümünün (% 100) duyarlı olduğu görüldü. Su suşlarının dirençli, orta duyarlı ve duyarlı sayılarının % oranları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Sudan izole edilen *E. coli* suşlarının dirençli, orta duyarlı ve duyarlı % oranları

Suşların dirençli olduğu antibiyotiklere göre direnç profili ve çoklu antibiyotik direnç indeksi belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Sudan izole edilen *E. coli* suşlarının direnç profilleri, suş sayıları, profilin suşlar arasındaki % dağılımı ve çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeksi

Direnç profili	Suş sayısı	%	Suş no	ÇAD indeksi
AM	36	85.71	DSS 1-7, 9, 10, 12-21, 23-38, 40	0.067
AM, TE	1	2.38	DSS 22	0.133
AM, AMC, KF	1	2.38	DSS 11	0.200
AM, TIM, CAZ, CXM	3	7.14	DSS 41, 42, 43	0.267
AM, TIM, AMC, KF, TE	1	2.38	DSS 39	0.333

DSS: Deney suşu su

Çalışma sonucunda; su suşlarının beş farklı direnç profili belirlendi. DSS 8 no'lu suşun kullanılan antibiyotiklerin tümüne karşı duyarlı olduğu saptandı. Suşlardan AM'e direnç gösteren suş sayısı 36 ve bu profilin dirençli su izolatları arasındaki dağılımı % 85.71'dir. Bu profili gösteren suşların numaraları Çizelge 4.2'de belirtilmiştir. Sadece Ampisilin'e direnç gösteren bu suşların çoklu antibiyotik direnç indeksi 0.067'dir. AM ve TE'ye direnç gösteren sadece bir suş (DSS 22) belirlendi. Bu suşun ÇAD indeksi 0.133 ve profilin suşlar arasındaki dağılımı % 2.38 olarak saptandı. Üç antibiyotiğe (AM, AMC ve KF) direnç profilini gösteren DSS 11 no'lu suştur. Bu profilin suşlar arasındaki dağılımının % 2.38 ve ÇAD indeksinin 0.2 olduğu belirlendi. DSS 41, 42 ve 43 no'lu suşların dört antibiyotiğe (AM, TIM, CAZ, CXM) direnç gösterdiği ve bu profilin suşlar arasındaki dağılımının % 7.14 olduğu görüldü. Bu profili gösteren suşların ÇAD indeksi 0.267'dir. Beş antibiyotiğe (AM, TIM, AMC, KF, TE) direnç gösteren profil, DSS 39 no'lu suşta belirlendi. Bu profilin suşlar arasındaki dağılımı % 2.38 ve ÇAD indeksleri 0.33 olarak belirlendi.

Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen 40 adet *E. coli* suşunun antibiyogram sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Gıdalardan izole edilen *E. coli*'lerin kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli (R), orta duyarlı (I) ve duyarlı (S) suş sayıları ve % oranları

	R % (n)	**I** % (n)	**S** % (n)
TZP	0	0	100 (40)
TE	22.5 (9)	15 (6)	62.5 (25)
CTX	10 (4)	0	90 (36)
AM	77.5 (31)	12.5 (5)	10 (4)
CIP	10 (4)	2.5 (1)	87.5 (35)
TIM	30 (12)	5 (2)	65 (26)
AMC	2.5 (1)	10 (4)	87.5 (35)
KF	14.5 (6)	17.5 (7)	67.5 (27)
MEM	0	0	100 (40)
C	10 (4)	0	90 (36)
NET	0	5 (2)	95 (38)
AK	0	5 (2)	95 (38)
CN	5 (2)	2.5 (1)	92.5 (37)
CXM	5 (2)	5 (2)	90 (36)
CAZ	7.5 (3)	0	92.5 (37)

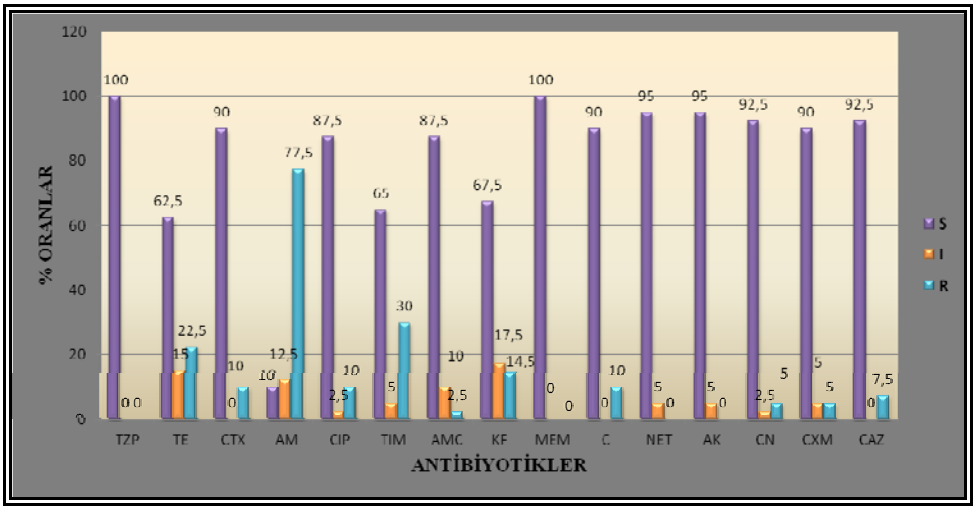
Bulgulara göre; gıdalardan izole edilen *E. coli*'lerin tümünün TZP'ye duyarlı olduğu belirlendi. TIM'a karşı suşların 12'sinin (% 30) dirençli, ikisinin (% 5) orta duyarlı ve 26'sının (% 65) duyarlı olduğu tespit edildi. Bir diğer beta laktam grubu antibiyotik olan AM'e karşı deney suşlarının 31'inin (% 77.5) dirençli, beşinin (% 12.5) orta duyarlı ve dördünün (% 10) duyarlı olduğu belirlendi. Suşların sadece biri (% 2.5) AMC'ye direnç gösterirken, dört suş (% 10) orta duyarlı ve 35 suş (% 87.5) duyarlı olarak bulundu.

Beta laktam grubu sefalosporinlerden KF'ye altı suş (% 14.5) direnç gösterirken, yedi suş (% 17.5) orta duyarlı ve geri kalan 27 suş ise duyarlı olarak bulundu. CXM'ye karşı iki suşun (% 5) dirençli, iki suşun (% 5) orta duyarlı ve 36 suşun (% 90) duyarlı olduğu görüldü. Üçüncü kuşak sefalosporin olan CTX'e dört suş (% 10) direnç gösterirken, 36 suş (% 90) ise duyarlı bulundu. Suşların 37'sinin (% 92.5) CAZ'a duyarlı, üçünün (% 7.5) ise dirençli olduğu saptandı.

Aminoglikozid gruplarından AK ve NET' e karşı iki suş (% 5) orta duyarlı, geri kalan 38 suş (% 95) ise duyarlı olarak belirlendi. İki suşun (% 5) CN'ye dirençli, bir suşun (% 2.5) orta duyarlı ve 37 suşun (% 92.5) duyarlı olduğu tespit edildi.

Gıda izolatlarının tümü (% 100) MEM'e karşı duyarlı olarak belirlendi. TE'ye dokuz suşun (% 22.5) dirençli, altı suşun (% 15) orta duyarlı ve 25 suşun duyarlı olduğu saptandı. Kinolon olan CIP'a dört suş dirençli bulunurken, sadece bir suş (% 2.5) orta

duyarlı ve 35 suş (% 87.5) ise duyarlı bulundu. Kloramfenikol'e dört suşun (% 10) dirençli, 36 suşun (% 90) ise duyarlı olduğu belirlendi. Suşların antibiyogram sonuçlarının % oranları Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Gıdalardan izole edilen *E. coli* suşlarının dirençli, orta duyarlı ve duyarlı % oranları

Gıdalardan izole edilen suşların direnç profili ve ÇAD indeksi Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Gıdalardan izole edilen *E. coli* suşlarının direnç profilleri, suş sayıları, profilin suşlar arasındaki % dağılımı ve çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeksi

Direnç profili	Suş sayısı	%	Suş no	ÇAD indeksi
AM	15	46.88	DSG 6, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 31, 32, 36	0.07
AM, KF	1	3.13	DSG 14	0.13
AM, TIM	1	3.13	DSG 7	0.13
AM, CAZ, CTX	1	3.13	DSG 13	0.20
AM, TIM, CN	1	3.13	DSG 40	0.20
AM, TIM, TE	5	15.63	DSG 5, 9, 30,35, 28	0.20
AM, TIM, CIP, C	1	3.13	DSG 39	0.27
AM, TIM, TE, KF	1	3.13	DSG 8	0.27
CAZ, CTX, CXM, KF	1	3.13	DSG 16	0.27
AM, CAZ, CTX, CXM	1	3.13	DSG 37	0.27
AM, TIM, KF, CTX	1	3.13	DSG 15	0.27
AM, TIM, TE, C, CIP	1	3.13	DSG 4	0.33
AM, TE, KF, CIP, C, CN	1	3.13	DSG 38	0.40
AM, TIM, TE, CIP, C, AMC, KF	1	3.13	DSG 3	0.47

DSG: Deney suşu gıda

Gıdalardan izole edilen 40 suştan sekizi (DSG 1, 2, 18, 23, 24, 29, 33, 34) kullanılan antibiyotiklerin tümüne duyarlı bulundu. Suşlar arasında birbirinden farklı 14 direnç profili belirlendi (Çizelge 4.4). Tek bir antibiyotiğe (AM) karşı gözlenen direnç profili baskın profil olup 15 suşta (% 46.88) gözlendi. Bu suşlara ait ÇAD indeksi 0.07'dir. Suşlar arasındaki ikinci baskın direnç profili, üç antibiyotiğe (AM, TIM, TE) karşı görülen profil olup beş suşta (% 15.63) gözlendi. ÇAD indeksi 0.2 olarak belirlendi. Bunların dışında, iki farklı antibiyotiği kapsayan iki direnç profili, üç farklı antibiyotiği kapsayan üç direnç profili, dört farklı antibiyotiği kapsayan beş farklı direnç profili, beş farklı antibiyotiği kapsayan bir direnç profili, altı ve yedi antibiyotiği kapsayan sadece birer direnç profili saptandı. Genellikle bu profillerin sadece birer suşta görüldüğü ve direnç gösteren suşlar arasındaki dağılımlarının % 3.13 olduğu tespit edildi. Yedi farklı antibiyotiğe dirençli olan DSG 3 suşunun en yüksek ÇAD indeksine (0.47) sahip olduğu saptandı. Üç ve daha fazla antibiyotiğe direnç gösteren suşlarda ÇAD indeksi 0.2 ve üzerinde bulundu (Çizelge 4.4). Dirençli suşlar arasında olan DSG 16'nın, diğer dirençli suşlardan farklı olarak Ampisilin'e direnç göstermediği belirlendi.

Çeşitli klinik kaynaklardan izole edilen 47 *E. coli* suşunun antibiyotik duyarlılık sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Klinik örneklerden izole edilen *E. coli*'lerin kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli (R), orta duyarlı (I) ve duyarlı (S) suş sayıları ve % oranları

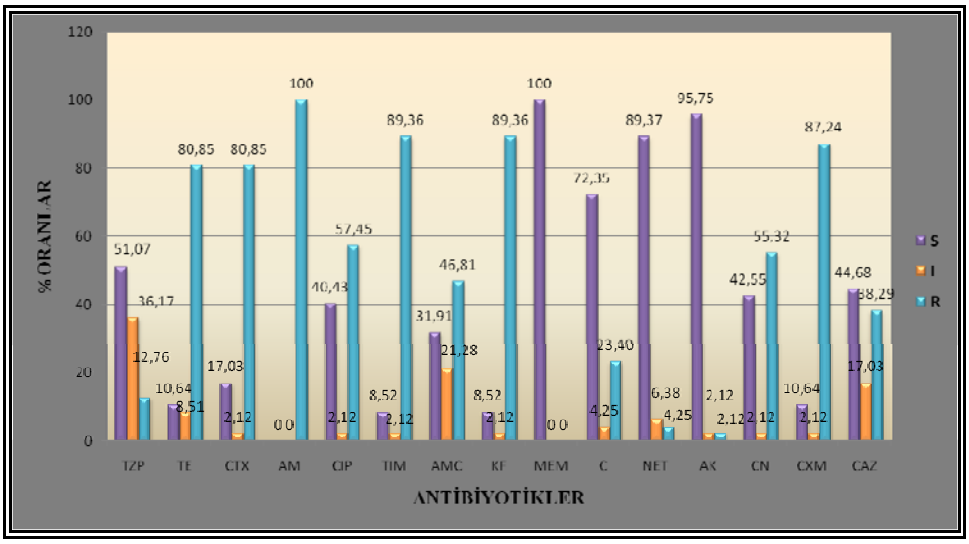
	R % (n)	**I** % (n)	**S** % (n)
TZP	12.76 (6)	36.17 (17)	51.07 (24)
TE	80.85 (38)	8.51 (4)	10.64 (5)
CTX	80.85 (38)	2.12 (1)	17.03 (8)
AM	100 (47)	0	0
CIP	57.45 (27)	2.12 (1)	40.43 (19)
TIM	89.36 (42)	2.12 (1)	8.52 (4)
AMC	46.81 (22)	21.28 (10)	31.91 (15)
KF	89.36 (42)	2.12 (1)	8.52 (4)
MEM	0	0	100 (47)
C	23.40 (11)	4.25(2)	72.35 (34)
NET	4.25 (2)	6.38 (3)	89.37 (42)
AK	2.12 (1)	2.12 (1)	95.76 (45)
CN	55.32 (26)	2.12 (1)	42.55 (20)
CXM	87.24 (41)	2.12 (1)	10.64 (5)
CAZ	38.29 (18)	17.03 (8)	44.68 (21)

Klinik suşlarda beta laktam grubu penisilinlere karşı en yüksek direnç % 100 oran ile AM'e gösterilmiş olup suşlardan hiçbiri bu antibiyotiğe karşı duyarlı bulunmadı. Direnç yüzdesi olarak ikinci sırada % 89.36 ile TIM yer aldı. Bu antibiyotiğe karşı sadece bir suş (% 2.12) orta duyarlı bulunurken, duyarlı suş sayısı dört (% 8.52) olarak belirlendi. Suşların 22'si (% 46.81) AMC'ye karşı direnç gösterirken, 10 suşun (% 21.28) orta duyarlı, 15 suşun (% 31.91) ise duyarlı olduğu saptandı. Penisilin grupları içerisinde en az direnç % 12.76 ile TZP'ye gösterildi. Bu ajana karşı 17 suş (% 36.17) orta duyarlı ve 24 suş (% 51.07) duyarlı bulundu (Çizelge 4.5).

Sefalosporinler değerlendirmeye alındığında; en fazla direnç 42 suş (% 89.36) ile KF'ye karşı görüldü. Suşların sadece biri orta duyarlı ve dördü (% 8.52) duyarlı olarak belirlendi. İkinci kuşak sefalosporin olan CXM'ye suşların 41'i (% 87.24) dirençli bulunurken bir suş orta duyarlı ve beş suş (% 10.64) ise duyarlı bulundu. CTX' e 38 suşun (% 80.85) dirençli, bir suşun orta duyarlı ve sekiz suşun (% 17.03) duyarlı olduğu tespit edildi. Sefalosporinler içerisinde en az direncin % 38.29 (18) ile CAZ'a karşı olduğu, suşların % 17.03 (8) oranında orta duyarlı ve % 44.68 (21) oranında duyarlı olduğu belirlendi.

Aminoglikozidlere karşı en fazla direnç (% 55.32) CN'ye görülürken, duyarlı suş sayısı 20'dir. AK'a karşı sadece bir suş (% 2.12), NET'e karşı iki suş (% 4.25) dirençli bulundu. Bu antibiyotiklere karşı duyarlı suş sayıları sırasıyla, 45 (% 95.76) ve 42 (% 89.37) olarak belirlendi.

MEM'e karşı suşların tümünün duyarlı olduğu görüldü. Suşlardan 38'i (% 80.85) TE'ye dirençli, dört suş (% 8.51) orta duyarlı ve beş suş (% 10.64) duyarlıdır. CIP'a karşı 27 suş (% 57.45) dirençli, 19 suş (% 40.43) ise duyarlı olarak belirlendi. C'ye, suşların 11'inin (% 23.40) dirençli, 34'ünün (% 72.35) ise duyarlı olduğu saptandı. Suşların direnç, orta duyarlı ve duyarlılık durumlarının % oranları Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Klinik örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarının dirençli, orta duyarlı ve duyarlı % oranları

Klinik suşların direnç profili ve ÇAD indeksleri belirlendi (Çizelge 4.6). Elde edilen verilere göre klinik suşlar içerisinde birbirinden farklı 36 direnç profili gözlendi. Bunlar içerisinde en yaygın profillerin durumları şöyledir: Sekiz farklı antibiyotiğe (AM, CTX, TE, TIM, AMC, KF, C, CXM) karşı gösterilen direnç profili üç suşta gözlendi (% 6.38). Bu profili gösteren DSK 9, 12, 28 no'lu suşlar olup ÇAD indeksleri 0.533 olarak belirlendi. Bir diğeri, dokuz antibiyotiğe (AM, CTX, TE, CIP, TIM, KF, CN, CXM, CAZ) karşı gösterilen profil olup üç suşta (DSK 18, 26, 39) % 6.38 oranında gözlendi. Bu suşların ÇAD indeksleri ise 0.600 olarak tespit edildi. Son olarak 11 antibiyotiğe (AM, CTX, TE, CIP, TIM, AMC, KF, CN, C, CXM, CAZ) karşı gösterilen profilin suşlar arasındaki dağılımı % 6.38 olup üç suşta (DSK 10, 11, 19) belirlendi. Bu suşlar için ÇAD indeksi 0.733 olarak tespit edildi (Çizelge 4.6).

Sadece bir suşun (DSK 36) tek bir antibiyotiğe direnç gösterdiği belirlendi. En fazla sayıda antibiyotiğe direnç gösteren, DSK 27 no'lu suş olup, 12 antibiyotiğe dirençli olduğu saptandı. ÇAD indeksi 0.800 olarak belirlendi ve bu değerin klinik suşlar içerisinde en yüksek değer olduğu gözlendi. Suşların geneline bakıldığında, tek antibiyotiği kapsayan bir, üç antibiyotiği kapsayan iki, dört antibiyotiği kapsayan bir, beş antibiyotiği kapsayan bir, altı antibiyotiği kapsayan yedi, yedi antibiyotiği kapsayan beş, sekiz antibiyotiği kapsayan yedi, dokuz antibiyotiği kapsayan beş, 10 antibiyotiği kapsayan dört, 11 antibiyotiği kapsayan iki ve 12 antibiyotiği kapsayan bir direnç profili tespit edildi (Çizelge 4.6).

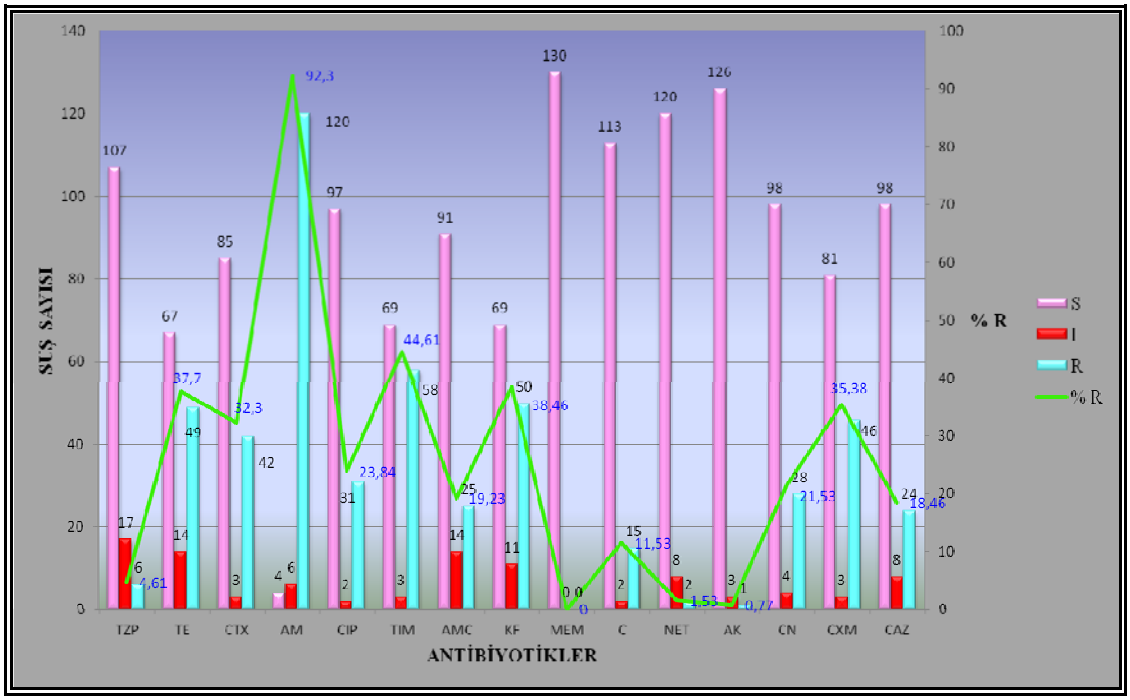
Çizelge 4.6. Klinik suşlara ait direnç profilleri, suş sayıları, profilin suşlar arasındaki % dağılımı ve çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeksi

Direnç profili	Suş sayısı	%	Suş no	ÇAD indeksi
AM	1	2.13	DSK 36	0.067
AM, KF, CXM	1	2.13	DSK 46	0.200
AM, TE, TIM	2	4.26	DSK 41, 43	0.200
AM, TE, CIP, C	1	2.13	DSK 17	0.267
AM, TE, CIP, KF, CXM	1	2.13	DSK 45	0.333
AM, TE, CIP, TIM, C, CN	1	2.13	DSK 42	0.400
AM, CTX, TE, TIM, KF, CXM	1	2.13	DSK 44	0.400
AM, CTX, TIM, KF, CN, CXM	2	4.26	DSK 31, 15	0.400
AM, CTX, AMC, KF, CXM, TZP	1	2.13	DSK 47	0.400
AM, CTX, TIM, KF, C, CXM	1	2.13	DSK 38	0.400
AM, CTX, TIM, AMC, KF, CXM	1	2.13	DSK 32	0.400
AM, CTX, TE, TIM, KF, CXM	1	2.13	DSK 29	0.400
AM, CTX, TE, TIM, KF, CXM, CN	1	2.13	DSK 2	0.467
AM, CTX, TE, TIM, KF, CXM, CAZ	1	2.13	DSK 6	0.467
AM, CTX, TE, CIP, TIM, KF, CXM	1	2.13	DSK 23	0.467
AM, TE, CIP, TIM, AMC, KF, C	1	2.13	DSK 30	0.467
AM, CTX, TE, TIM, KF, CN, CXM	1	2.13	DSK 33	0.467
AM, CTX, TE, TIM, KF, CN, CXM, CAZ	1	2.13	DSK 7	0.533
AM, CTX, TE, CIP, TIM, KF, CN, CXM	3	6.38	DSK 9, 12, 28	0.533
AM, CTX, TE, TIM, AMC, KF, C, CXM	1	2.13	DSK 14	0.533
AM, CTX, TIM, AMC, KF, CN, CXM, CAZ	1	2.13	DSK 21	0.533
AM, CTX, CIP, TIM, AMC, KF, CXM, CAZ	1	2.13	DSK 22	0.533
AM, CTX, TE, TIM, AMC, KF, CN, CXM	1	2.13	DSK 37	0.533
AM, CTX, TE, TZP, TIM, AMC, KF, CXM	1	2.13	DSK 25	0.533
AM, CTX, TE, CIP, TIM, AMC, KF, CXM, CAZ	2	4.26	DSK 3, 16	0.600
AM, CTX, TE, TZP, TIM, AMC, KF, CXM, CAZ	1	2.13	DSK 13	0.600
AM, CTX, TE, CIP, TIM, KF, CN, CXM, CAZ	3	6.38	DSK 18, 26, 39	0.600
AM, CTX, TE, CIP, TIM, AMC, KF, CN, CXM	2	4.26	DSK 34, 35	0.600
AM, CTX, TE, CIP, TIM, KF, NET, CN, CXM	1	2.13	DSK 40	0.600
AM, CTX, TE, CIP, TIM, AMC, KF, CN, CXM, CAZ	2	4.26	DSK 4, 5	0.667
AM, CTX, TE, CIP, TIM, KF, C, CN, CXM, CAZ	1	2.13	DSK 8	0.667
AM, TZP, TE, CIP, TIM, AMC, KF, NET, AK, CXM	1	2.13	DSK 20	0.667
AM, CTX, TE, CIP, TIM, AMC, KF, C, CN, CXM	1	2.13	DSK 24	0.667
AM, CTX, TE, CIP, TIM, AMC, KF, CN, TZP, CXM, CAZ	1	2.13	DSK 1	0.733
AM, CTX, TE, CIP, TIM, AMC, KF, CN, C, CXM, CAZ	3	6.38	DSK 10, 11, 19	0.733
AM, CTX, TE, CIP, TIM, AMC, KF, CN, C, CXM, CAZ, TZP	1	2.13	DSK 27	0.800

DSK: Deney suşu klinik

Su, gıda ve klinik örneklerden izole edilen toplam 130 adet suşun tümünün, kullanılan 15 antibiyotiğe karşı gösterdiği durumlar genel olarak değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Buna göre 130 suşun, 120'si (% 92.3) AM'e karşı dirençli bulundu. Direnç bakımından bu antibiyotik ilk sırayı aldı. Toplam suşların 58'i (% 44.61) TIM'a dirençli bulundu ve bu antibiyotiğe direnç AM'nin ardından ikinci sırayı aldı. Direnç bakımından üçüncü sırayı 50 suş (% 38.46) ile KF'nin, dördüncü sırayı ise 49 suş (% 37.7) ile TE'nin aldığı görüldü.

Antibiyotikler içerisinde, suşlar üzerinde en etkili antibiyotiğin MEM olduğu tespit edildi. Bu antibiyotiğin etkili olduğu suş sayısı 130 (% 100)'dur. Bu antibiyotiği ikinci sırada AK'nin takip ettiği ve 126 suş (% 96.92) üzerinde etkili olduğu belirlendi. NET'in, 120 suş (% 92.3) ile üçüncü; Kloramfenikol'ün ise 113 suş (% 86.92) ile dördüncü sırada yer aldığı saptandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Antibiyotiklere duyarlılık sonuçlarının genel değerlendirilmesi: Toplam duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) suş sayıları ve % R oranları

4.2. *E. coli* suşlarının plazmit profillerinin analizi

Çalışmada, izole edilen 130 *E. coli* suşunun plazmit izolasyonları yapıldı. Bakteri suşlarında bulunan plazmitlerin büyüklükleri *E. coli* V517 suşuna ait, büyüklükleri bilinen (54.2, 7.3, 5.6, 5.2, 3.0, 2.7, 2.1 kb) plazmitler kullanılarak belirlendi. Moleküler markırın elektroforezdeki göç mesafesi (Rf) ile ağırlıklarının logaritma 10 tabanındaki değerleri arasındaki ilişkiden faydalanılarak, eğri elde edildi. Bu eğriye göre, ağırlığı bilinmeyen plazmitlerin boyutları saptandı (Şekil 4.6). 130 suşun 64'ünde (% 49.23) plazmite rastlanırken, 66 suşta (% 50.77) plazmite rastlanmadı (Şekil 4.5, 4.7, 4.8).

İncelenen suşlarda belirlenen plazmit profilleri ve bu profili oluşturan plazmit büyüklüklerinin suşların kaynağına göre dağılımı Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. *E. coli* suşlarında belirlenen plazmit profil no'ları, büyüklükleri ve suşlara göre dağılımı

Profil no	Büyüklük (kb)	Su suşları	Profil no	Büyüklük (kb)	Gıda suşları	Profil no	Büyüklük (kb)	Klinik suşlar
1	**56.4**	DSS 1, 8	**1**	**60.1**	DSG 3, 9	**1**	**2.3**	DSK 1, 2, 6, 16
2	**3.7, 2.6**	DSS 1, 2	**2**	**5.7**	DSG 3, 18, 40	**2**	**5.9**	DSK 2, 3
3	**75.4**	DSS 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	**3**	**4.0**	DSG 2, 21, 22, 23	**3**	**5.2**	DSK 2, 7, 41
			4	**3.5**	DSG 1, 29	**4**	**3.6**	DSK 2, 6
4	**6.5**	DSS 34, 35, 36	**5**	**5.0, 2.3**	DSG 1, 30	**5**	**1.9**	DSK 2, 30, 31, 35, 47
			6	**5.3, 3.2**	DSG 31, 32, 36, 39	**6**	**4.0**	DSK 3, 42
			7	**45.4**	DSG 9, 38	**7**	**2.9**	DSK 7, 35
						8	**2.0**	DSK 7, 40
						9	**59.8**	DSK 12, 13, 14, 21
						10	**4.6**	DSK 12, 13, 35, 40
						11	**2.7**	DSK 12, 21, 28, 38
						12	**42.7**	DSK 16, 21
						13	**40.1**	DSK 25, 31
						14	**67.0**	DSK 28, 30, 40
						15	**4.9**	DSK 28, 42
						16	**2.2**	DSK 28, 35
						17	**12.9, 5.1**	DSK 31, 35
						18	**3.8**	DSK 31, 35, 41
						19	**77.1**	DSK 34, 45, 46
						20	**7.4**	DSK 34, 35
						21	**2.8**	DSK 41, 47
						22	**72.5**	DSK 42, 43

Sudan izole edilen suşlara ait plazmit sayıları, profilleri ve suş numaraları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Sudan izole edilen *E. coli* suşlarında plazmit sayıları, büyüklükleri ve profilleri

Suş no	Plazmit sayıları	Büyüklükleri (kb)	Profil no'ları
DSS1	3	56.4, 3.7, 2.6kb	1, 2
DSS2	3	36.2, 3.7, 2.6 kb	2
DSS3	0		
DSS4	0		
DSS5	4	51.2, 9.0, 4.4, 3.2 kb	
DSS6	2	47.4, 35.3 kb	
DSS7	1	78.2 kb	
DSS8	3	56.4, 5.2, 2.9 kb	1
DSS9	0		
DSS10	0		
DSS11	0		
DSS12	2	8.3, 3.8 kb	
DSS13	1	75.4 kb	3
DSS14	1	75.4 kb	3
DSS15	1	75.4 kb	3
DSS16	1	75.4 kb	3
DSS17	1	75.4 kb	3
DSS18	1	75.4 kb	3
DSS19	1	75.4 kb	3
DSS20	0		
DSS21	0		
DSS22	0		
DSS23	0		
DSS24	1	5.6 kb	
DSS25	0		
DSS26	0		
DSS27	0		
DSS28	0		
DSS29	0		
DSS30	0		
DSS31	1	11.3 kb	
DSS32	0		
DSS33	0		
DSS34	1	6.5 kb	4
DSS35	1	6.5 kb	4
DSS36	1	6.5 kb	4
DSS37	0		
DSS38	0		
DSS39	0		
DSS40	0		
DSS41	0		
DSS42	0		
DSS43	0		

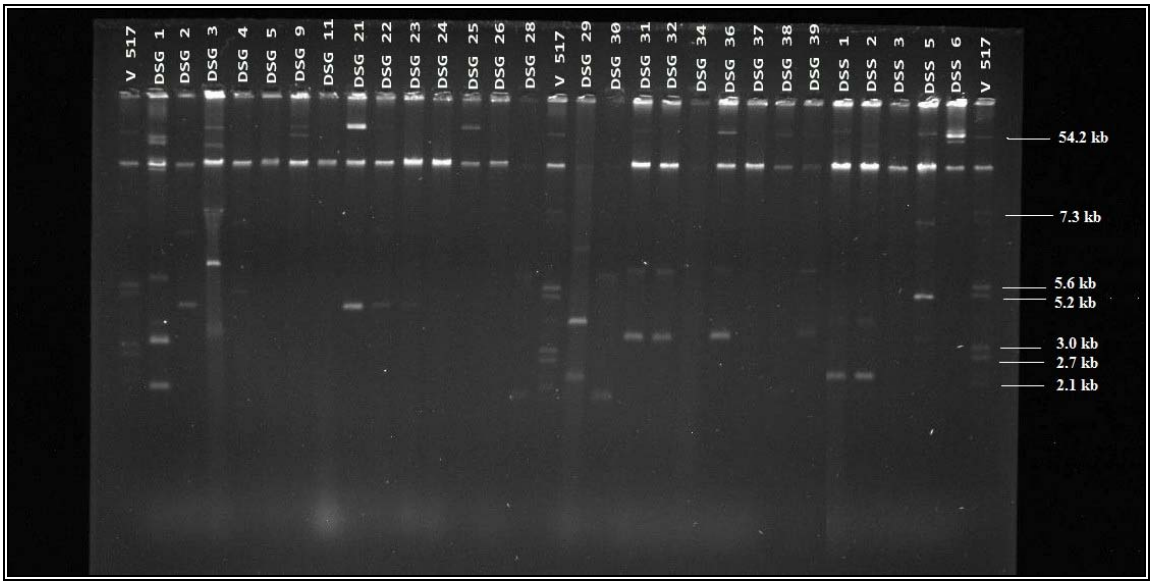
DSS: Deney suşu su

Klinik izolatlar ile ortak olan plazmitler

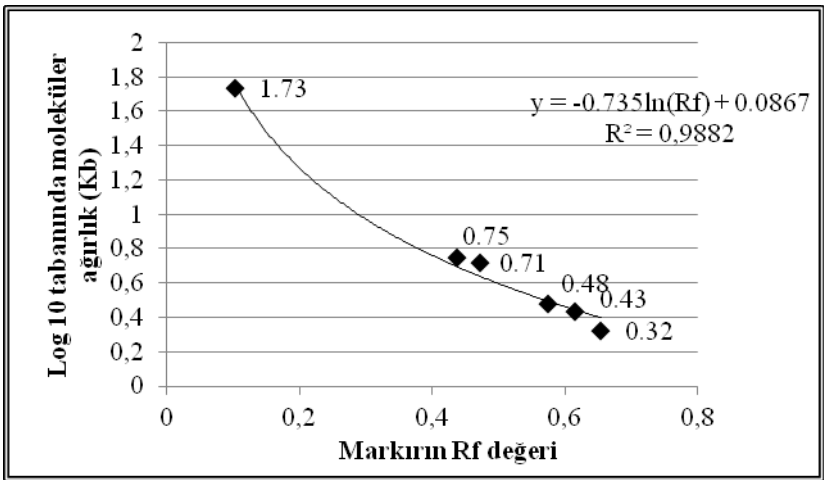
Gıda izolatları ile ortak olan plazmitler

Sudan izole edilen suşların 19'unda (% 44.18) plazmit tespit edilirken geri kalan 24 suşta (% 55.82) plazmite rastlanmadı. Tespit edilen plazmit büyüklüklerinin, 78.2 kb ile 2.6 kb arasında değiştiği görüldü. DSS 5 no'lu suşun dört plazmit, DSS 1, 2, 8 no'lu

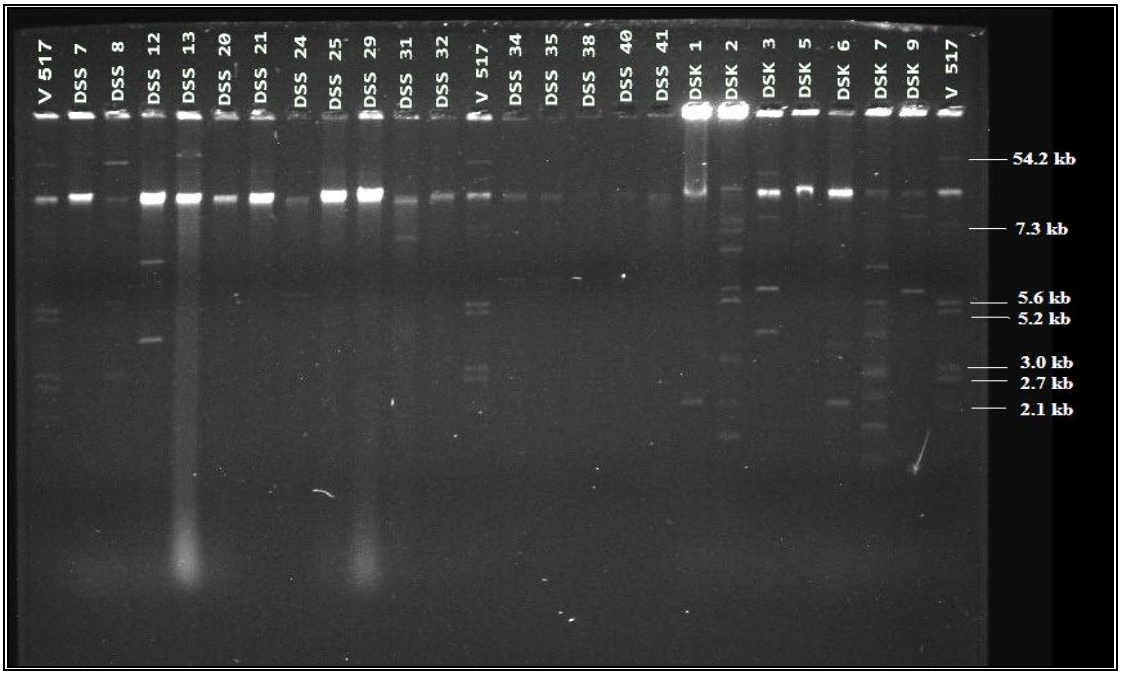
suşların ise üç plazmit taşıdığı belirlendi. En büyük plazmit boyutunun, DSS 7 no'lu suşta bulunan78.2 kb'lık plazmit olduğu saptandı. En küçük plazmitin ise DSS 1 ve 2 no'lu suşlardaki 2.6 kb'lık plazmitin olduğu belirlendi. Suşlar içerisinde farklı dört plazmit profili gözlendi (Çizelge 4.7, Çizelge 4.8). 1 no'lu profil: 56.4 kb, 2 no'lu profil: 3.7, 2.6 kb, 3 no'lu profil: 75.4 kb ve 4 no'lu profil: 6.5 kb olarak belirlendi. Agaroz jel elektroforezinde belirlenen plazmitler Şekil 4.5 ve 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. *E. coli* suşlarının agaroz jel elektroforezinde belirlenen plazmitleri (DSG 1-39, DSS 1-6 no'lu suşlar, V 517: Markır)



Şekil 4.6. Markırın jeldeki göç mesafesi (Rf) ve moleküler büyüklüğü arasındaki ilişki grafiği (Şekil 4.5'e göre çizildi)



Şekil 4.7. *E. coli* suşlarının agaroz jel elektroforezinde belirlenen plazmitleri (DSS 7-41, DSK 1-9 no'lu suşlar, V 517: Markır)

Gıdalardan izole edilen suşlar değerlendirildiğinde, 40 suşun 18'i (% 45) plazmit taşırken, geri kalan 22 suşun (% 55) plazmit taşımadığı belirlendi (Çizelge 4.9). Tespit edilen plazmit boyutlarının 64.4 kb ile 1 kb arasında değiştiği görüldü. En fazla sayıda plazmite sahip olan suşun, altı plazmit ile DSG 1 olduğu tespit edildi. Bu suşun plazmit büyüklükleri 44.8 kb ile 2.3 kb arasında değişmektedir. DSG 3, 18 ve 40 no'lu suşların dört plazmit, DSG 29, 31, 36 no'lu suşların üç plazmit, DSG 2, 4, 9, 21, 22, 30, 32 ve 39 no'lu suşların iki plazmit ve DSG 23, 25, 38 no'lu suşların ise sadece bir plazmit taşıdığı saptandı (Çizelge 4.9, Şekil 4.5).

Çizelge 4.9. Çeşitli gıdalardan izole edilen *E. coli* suşlarında plazmit sayıları, büyüklükleri ve profilleri

Suş no	Plazmit sayıları	Büyüklükleri (kb)	Profil no'ları
DSG1	6	44.8, 37.1, 5.0, 3.5, 3.1, 2.3 kb	4, 5
DSG2	2	8.0, 4.0 kb	3
DSG3	4	60.1, 34.4, 10.2, 5.7 kb	1, 2
DSG4	2	8.9, 4.4 kb	
DSG5	0		
DSG6	0		
DSG7	0		
DSG8	0		
DSG9	2	60.1, 45.4 kb	1, 7
DSG10	0		
DSG11	0		
DSG12	0		
DSG13	0		
DSG14	0		
DSG15	0		
DSG16	0		
DSG17	0		
DSG18	4	22.2, 5.7, 2.6, 1.7	2
DSG19	0		
DSG20	0		
DSG21	2	64.4, 4.0 kb	3
DSG22	2	58.1, 4.0 kb	3
DSG23	1	4.0 kb	3
DSG24	0		
DSG25	1	52.8 kb	
DSG26	0		
DSG27	0		
DSG28	0		
DSG29	3	6.4, 3.5, 2.5 kb	4
DSG30	2	5.0, 2.3 kb	5
DSG31	3	44.8, 5.3, 3.2 kb	6
DSG32	2	5.3, 3.2 kb	6
DSG33	0		
DSG34	0		
DSG35	0		
DSG36	3	44.1, 5.3, 3.2 kb	6
DSG37	0		
DSG38	1	45.4 kb	7
DSG39	2	5.3, 3.2 kb	6
DSG40	4	5.7, 2.7, 1.5, 1.0 kb	2

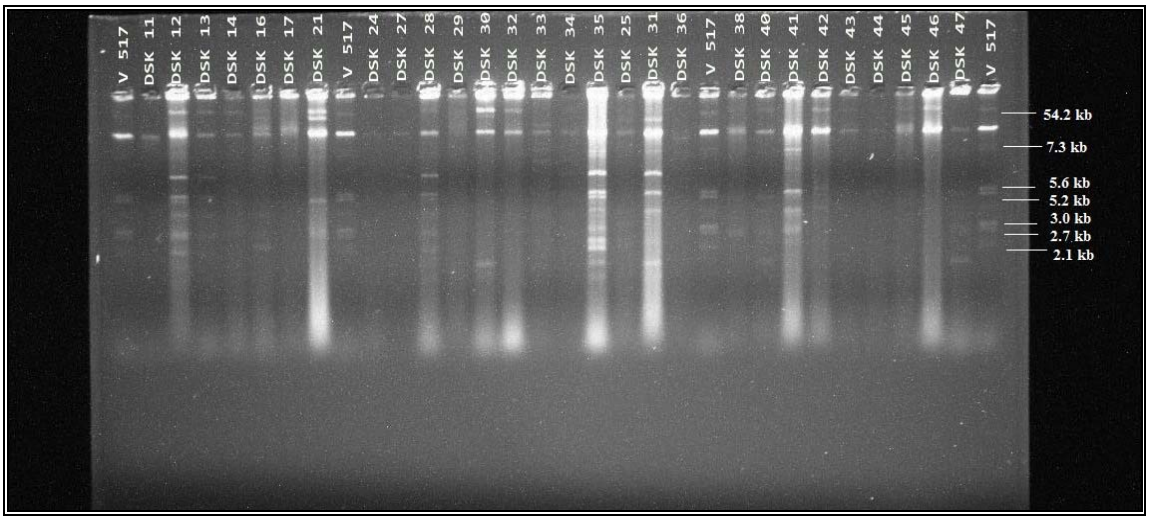
DSG: Deney suşu gıda

Klinik izolatlar ile ortak olan plazmitler
Su izolatları ile ortak olan plazmitler

Suşlar arasında, en büyük boyutlu plazmite sahip olan suşun DSG 21, en küçük boyutlu plazmite sahip suşun ise DSG 40 olduğu belirlendi. Birbirinden farklı yedi profil ortaya çıkarıldı (Çizelge 4.7). Buna göre; 1 no'lu profil: 60.1 kb, 2 no'lu profil:

5.7 kb, 3 no'lu profil: 4.0 kb, 4 no'lu profil: 3.5 kb, 5 no'lu profil: 5.0 ve 2.3 kb, 6 no'lu profil: 5.3 ve 3.2 kb, 7 no'lu profil: 45.4 kb olarak tespit edildi. Suşlardan DSG 1 (4 ve 5 no'lu profil), DSG 3 (1 ve 2 no'lu profil) ve DSG 9 (1 ve 7 no'lu profil)'un iki farklı profile sahip olduğu gözlendi. 6 no'lu profil ve 3 no'lu profil, plazmit taşıyan suşlar arasında en yaygın profil olarak belirlendi (Çizelge 4.9).

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen suşlara ait plazmitlerin belirlendiği agaroz jel görüntüleri, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. *E. coli* suşlarının agaroz jel elektroforezinde belirlenen plazmitleri (DSK 11-47 no'lu suşlar, V 517: Markır)

Klinik suşlar değerlendirildiğinde, 47 suşun 27'sinin (% 57.44) plazmit taşıdığı geri kalan 20 suşun (% 42.66) ise plazmit taşımadığı tespit edildi. Belirlenen plazmitlerin boylarının 77.1 kb ile 1.6 kb arasında değiştiği belirlendi. Suşlar içerisinde, en fazla plazmite sahip olan suşun 11 plazmit ile DSK 35 olduğu saptandı. İkinci sırada bu suşu, sekiz plazmit ile DSK 2, üçüncü sırada yedi plazmit ile DSK 12, dördüncü sırada ise altı plazmit ile DSK 7 ve 31 no'lu suşların izlediği belirlendi. En büyük boyuttaki plazmite sahip olan suşların DSK 34, 45 ve 46 olduğu; en küçük boyuttaki plazmite sahip olan suşun DSK 35 olduğu görüldü (Çizelge 4.10). Bulundurdukları plazmitlerin boyutlarına göre yapılan profilleme sonucunda suşlar içerisinde 22 farklı plazmit profili ortaya kondu (Çizelge 4.7, Çizelge 4.10). En fazla profil sayısını (7) DSK 35 no'lu suş gösterdi. Sekiz plazmit bulunduran DSK 2, beş; beş plazmit bulunduran DSK 28 ve altı plazmit bulunduran DSK 31 no'lu suşlar ise dört profil ortaya koydu.

Çizelge 4.10. Klinik örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarında plazmit sayıları, büyüklükleri ve profilleri

Suş no	Plazmit sayıları	Büyüklükleri (kb)	Profil no'ları
DSK1	1	2.3 kb	1
DSK2	8	14.5, 12.2, 9.3, 5.9, 5.2, 3.6, 2.3, 1.9 kb	1, 2, 3, 4, 5
DSK3	4	40.4, 15.2, 5.9, 4.0 kb	2, 6
DSK4	0		
DSK5	0		
DSK6	2	3.6, 2.3 kb	1, 4
DSK7	6	7.5, 5.2, 3.9, 2.9, 2.4, 2.0 kb	3, 7, 8
DSK8	0		
DSK9	2	15.1, 5.7 kb	
DSK10	0		
DSK11	0		
DSK12	7	59.8, 6.9, 4.6, 4.2, 3.5, 2.7, 2.1 kb	9, 10, 11
DSK13	4	59.8, 34.7, 6.7, 4.6 kb	9, 10
DSK14	1	59.8 kb	9
DSK15	0		
DSK16	4	63.3, 42.7, 26.6, 2.3 kb	1, 12
DSK17	0		
DSK18	0		
DSK19	0		
DSK20	0		
DSK21	4	59.8, 42.7, 4.4, 2.7 kb	9, 11, 12
DSK22	0		
DSK23	0		
DSK24	0		
DSK25	1	40.1 kb	13
DSK26	0		
DSK27	0		
DSK28	5	67.0, 7.0, 4.9, 2.7, 2.2 kb	11, 14, 15, 16
DSK29	0		
DSK30	3	67.0, 47.0, 1.9 kb	5, 14
DSK31	6	40.1, 12.9, 7.3, 5.1, 3.8, 1.9 kb	5, 13, 17, 18
DSK32	1	67.0 kb	14
DSK33	2	30.2, 9.6 kb	
DSK34	2	77.1, 7.4 kb	19, 20
DSK35	11	12.9, 11.2, 7.4, 5.1, 4.6, 3.8, 2.9, 2.5, 2.2, 1.9, 1.6 kb	5, 7, 10, 16, 17, 18, 20
DSK36	0		
DSK37	0		
DSK38	1	2.7 kb	11
DSK39	0		
DSK40	4	67.0, 4.6, 3.7, 2.0 kb	8, 10, 14
DSK41	5	13.3, 8.3, 5.2, 3.8, 2.8 kb	3, 18, 21
DSK42	4	72.5, 5.5, 4.9, 4.0 kb	6, 15, 22
DSK43	1	72.5 kb	22
DSK44	0		
DSK45	1	77.1 kb	19
DSK46	1	77.1 kb	19
DSK47	3	5.0, 2.8, 1.9 kb	5, 21

DSK: Deney suşu klinik Gıda izolatları ile ortak olan plazmitler Su izolatları ile ortak olan plazmitler

DSK 7, 12, 21, 40, 41 ve 42 no'lu suşların ise üç plazmit profili gösterdiği gözlendi.

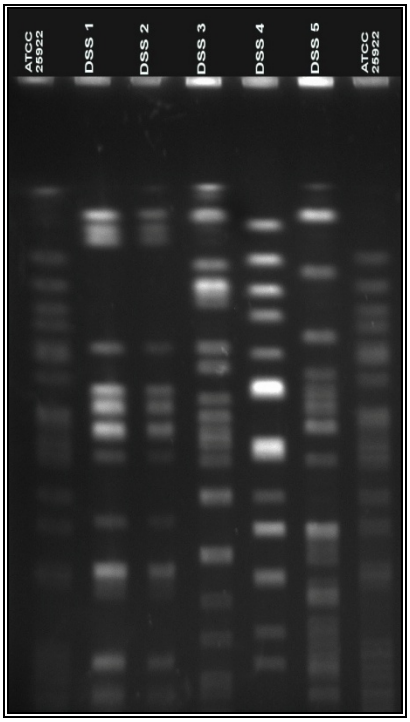
Su, gıda ve klinik örneklerin tümü plazmit yönünden değerlendirildiğinde; üç grup içerisinde de birbirine boyut olarak yakın plazmitler bulunmasına rağmen, her üçü için de ortak bir plazmite rastlanmadı. Gruplar arasında değerlendirme yapıldığında; su örneklerinde 2 no'lu profilde bulunan 2.6 kb'lık plazmit, gıda suşlarından DSG 18' de görüldü. Herhangi bir ortak profil içerisinde yer almayan ve DSS 5 suşunda görülen 3.2 kb'lık plazmit, gıda suşlarında 6 no'lu plazmit profilini gösteren DSG 31, 32, 36 ve 39 no'lu suşlarda belirlendi. Hem su hem de gıda suşlarının ortak profillerinde bulunmayan 4.4 kb'lık plazmit, DSS 5 ve DSG 4 suşlarında görüldü.

Su örneklerinin ortak profilinde yer almayan 5.2 ve 2.9 kb'lık plazmitler DSS 8 no'lu suşta gözlemlenirken, klinik örneklerde 7 no'lu profilde yer alan 2.9 kb'lık plazmit ile 3 no'lu profilde yer alan 5.2 kb'lık plazmitler DSK 7 suşunda birlikte gözlendi. 5.2 kb'lık plazmit ise DSK 41 ve DSK 2 no'lu suşlarda tek başına belirlendi. Klinik örneklerde 18 no'lu profilde yer alan 3.8 kb'lık plazmit; DSK 31 suşunda tek, DSK 35 suşunda ise 2.9 kb'lık plazmitle birlikte görülürken; DSS 12 no'lu suşta 8.3 kb'lık plazmit ile birlikte görüldü. Hem su hem de klinik suşların ortak profillerinde yer almayan 8.3 kb'lık plazmit DSK 41 suşunda, yukarıda bahsedilen 5.2 ve 3.8 kb'lık plazmitlerle birlikte görüldü.

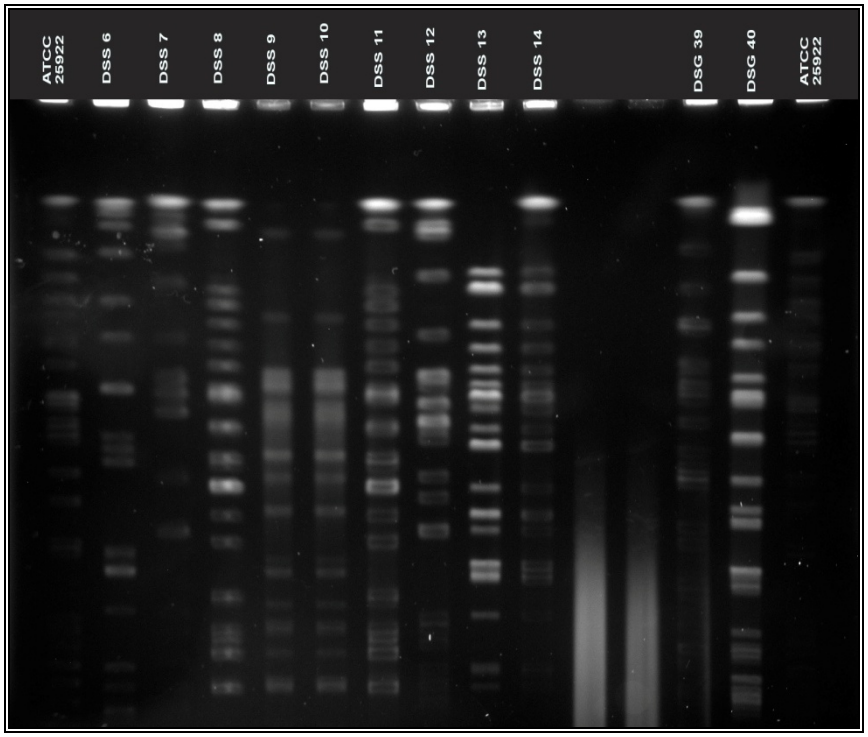
Gıda ve klinik suş grupları birlikte değerlendirildiğinde; altı farklı plazmit ortaklığı olduğu görüldü (2.3, 2.5, 2.7, 4.0, 5.0, 5.7 kb). Klinik örneklerde 1 no'lu ve gıda suşlarında 5 no'lu profilde bulunan 2.3 kb'lık plazmit; DSK 2 ve DSG 30 suşları için ortaktır. Ayrıca DSG 30 suşunun, klinik suşların plazmit profilinde olmayan fakat DSK 7 suşunda bulunan 5.0 kb'lık plazmiti de bulundurduğu belirlendi. DSG 2, 21, 22 ve 23 no'lu suşların, 5 no'lu plazmit profilinde bulunan 4.0 kb'lık plazmit yönünden DSK 3 ile ortaklığı olduğu gözlendi. DSG 3, 18 ve 40 suşlarının 2 no'lu profilinde bulunan 5.7 kb'lık plazmit, ortak profillerinde bulunmamasına rağmen DSK 9 suşunda belirlendi. Hem gıda hem de klinik suşların profillerinde olmayan 2.5 kb'lık plazmitin, DSK 35 ve DSG 29 için ortak olduğu saptandı. Klinik suşların 11 no'lu profilinde yer alan 2.7 kb'lık plazmitin; DSK 12, 21 ve 28 no'lu suşların yanı sıra DSG 40 suşunda da mevcut olduğu tespit edildi.

4.3. *E. coli* suşlarının PFGE analiz sonuçları

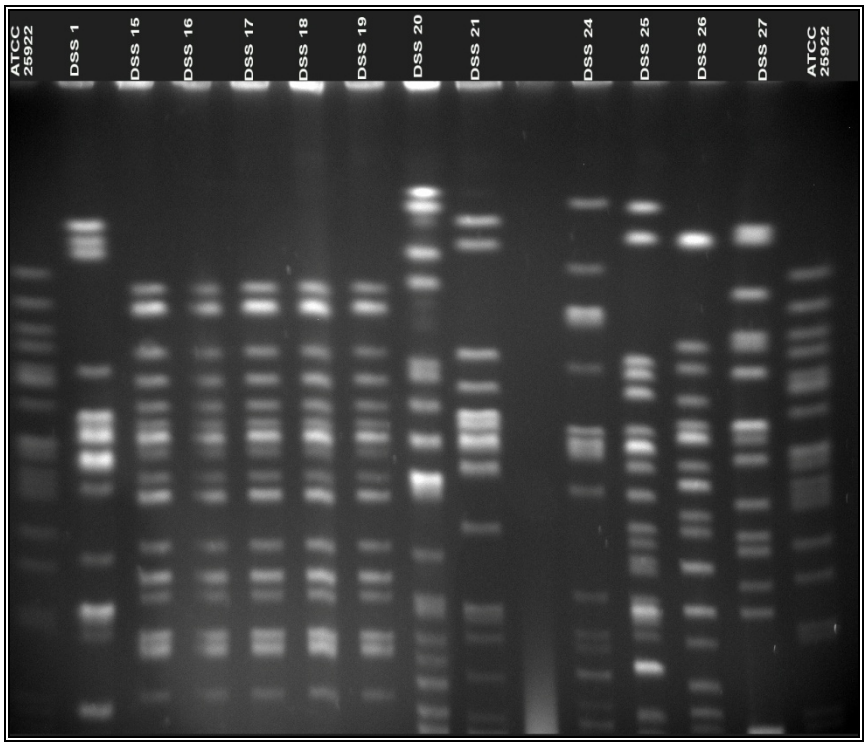
Çalışmada, Durmaz ve ark. (2009) tarafından önerilen PFGE metodu, bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. PFGE analizinde, DNA fragmanları oluşturmak amacıyla; *Xanthomonas badrii* bakterisinden elde edilen ve *E. coli* izolatlarına ait DNA'yı 5'...T/CTAGA...3' nükleotit dizisinden tanıyarak kesen *Xba*I restriksiyon enzimi kullanıldı. Elektroforez şartları: başlangıç vuruş süresi 10 sn, bitiş vuruş süresi 50 sn, vuruş açısı 120°, akım 200 V (6 V/cm^2), sıcaklık 14 °C, elektroforez süresi 20 saat olacak şekilde ayarlandı. Belirtilen şartlar elektrotlar arasında sıralı olarak 20 saat boyunca devam etti. Elektroforez işlemi sonrasında boyanarak elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.9-4.20'de gösterilmiştir. Elde edilen görüntülerde, suşların 10-23 arasında değişen sayıda bant oluşturduğu görüldü. Suşlar arasındaki muhtemel klonal ilişkiyi belirlemek amacıyla, elde edilen bant profilleri GelCompar II (version 6.5) yazılımı kullanarak değerlendirildi. Değerlendirmede tolerans % 0.5 olarak alındı. UPGMA metodu ile dendogram oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Dice benzerlik katsayısı (Dice similarity coefficient) kullanılarak suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Eşik değer (cut-off) olarak % 80 alınarak genotipler (PFGE tipleri) ve bunlara bağlı alt tipler belirlendi (Carrico ve ark., 2005; Akçimen, 2010).



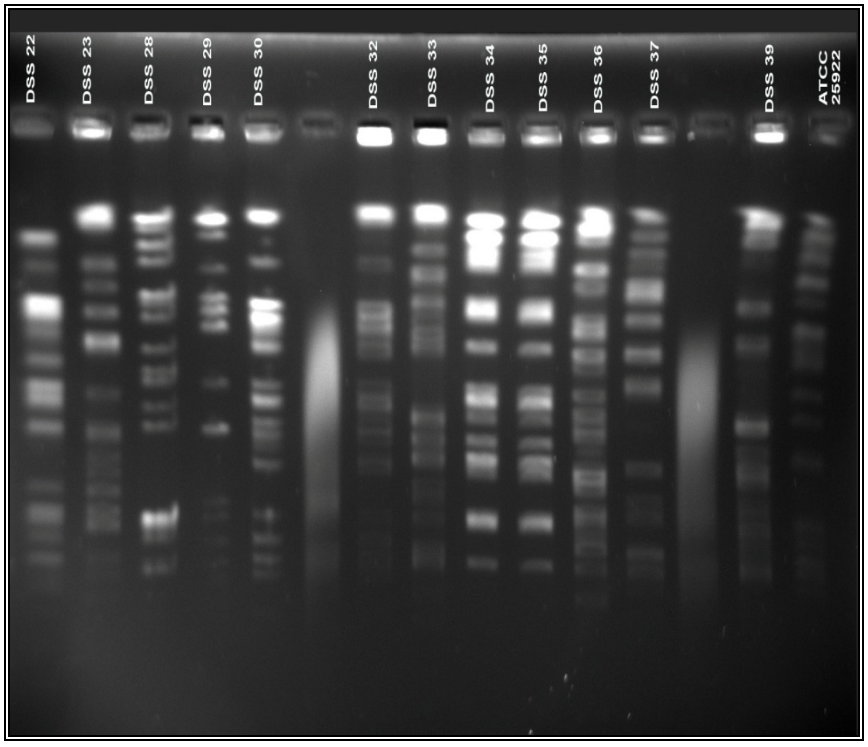
Şekil 4.9. DSS 1-5 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: E. coli ATCC 25922)



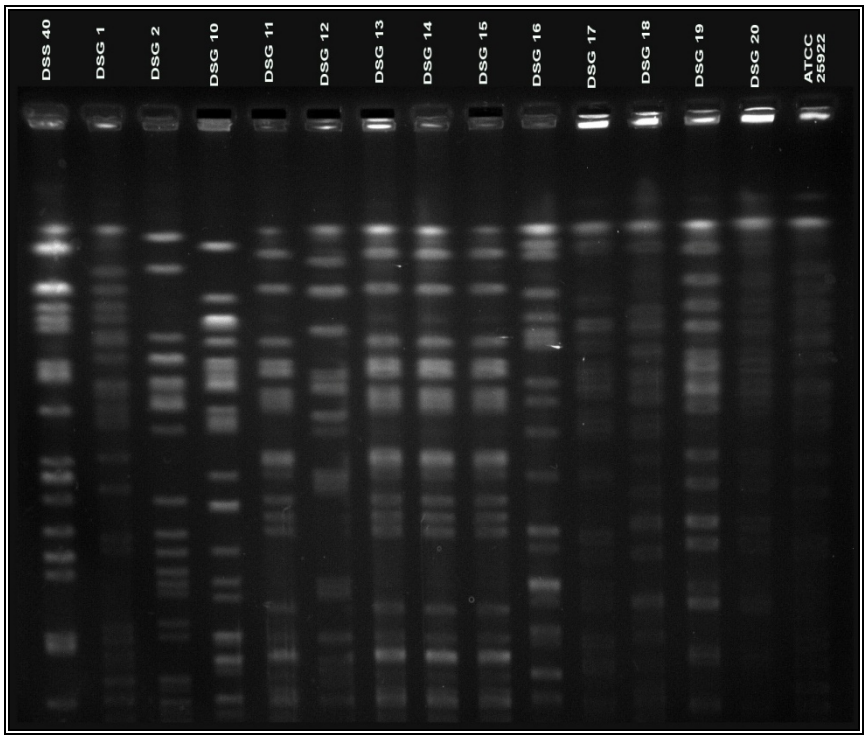
Şekil 4.10. DSS 6-14, DSG 39, 40 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



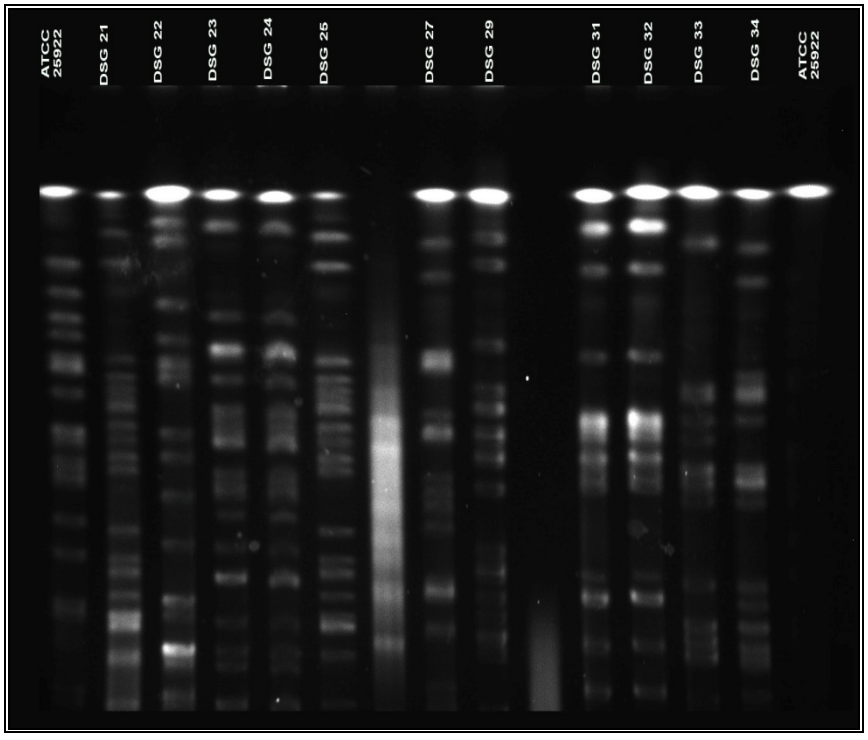
Şekil 4.11. DSS1, DSS 15-21, DSS 24-27 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



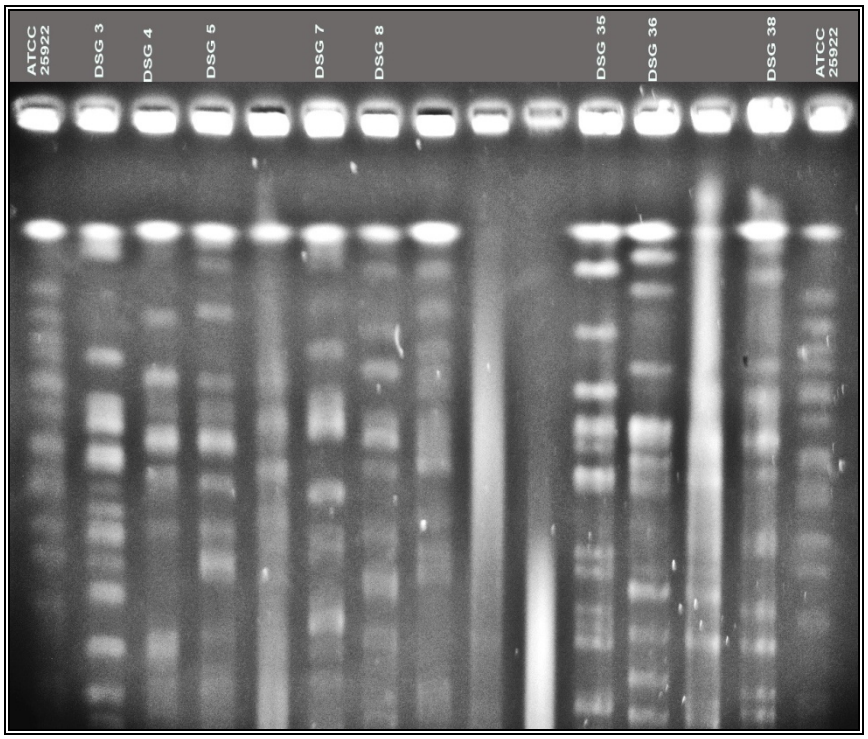
Şekil 4.12. DSS 22, 23, DSS 28-30, DSS 32-37 ve 39 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



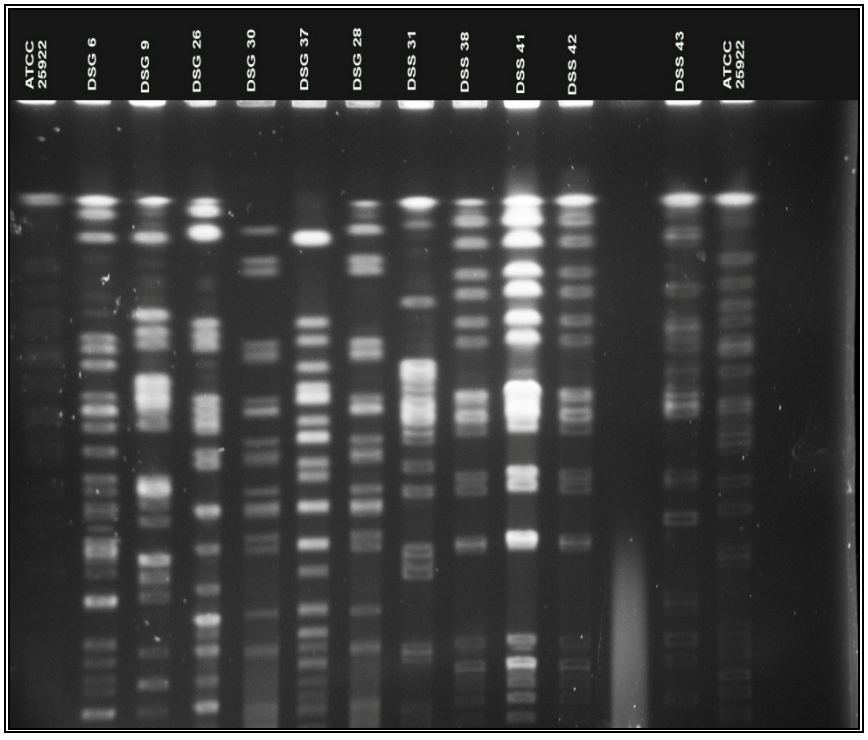
Şekil 4.13. DSS 40, DSG 1, 2, DSG 10-20 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



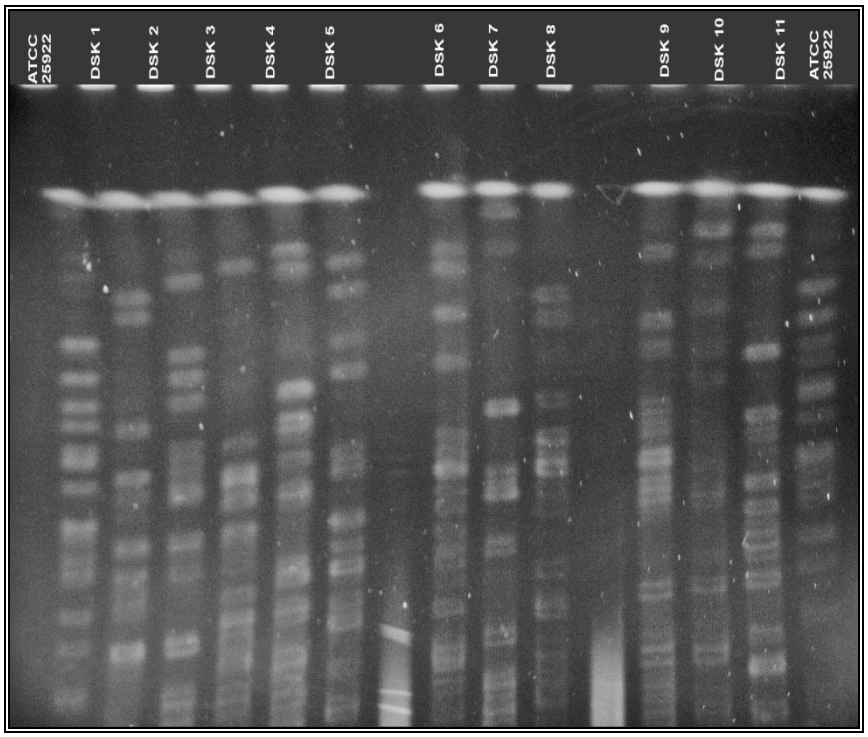
Şekil 4.14. DSG 21-25, 27, 29, DSG 31-34 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



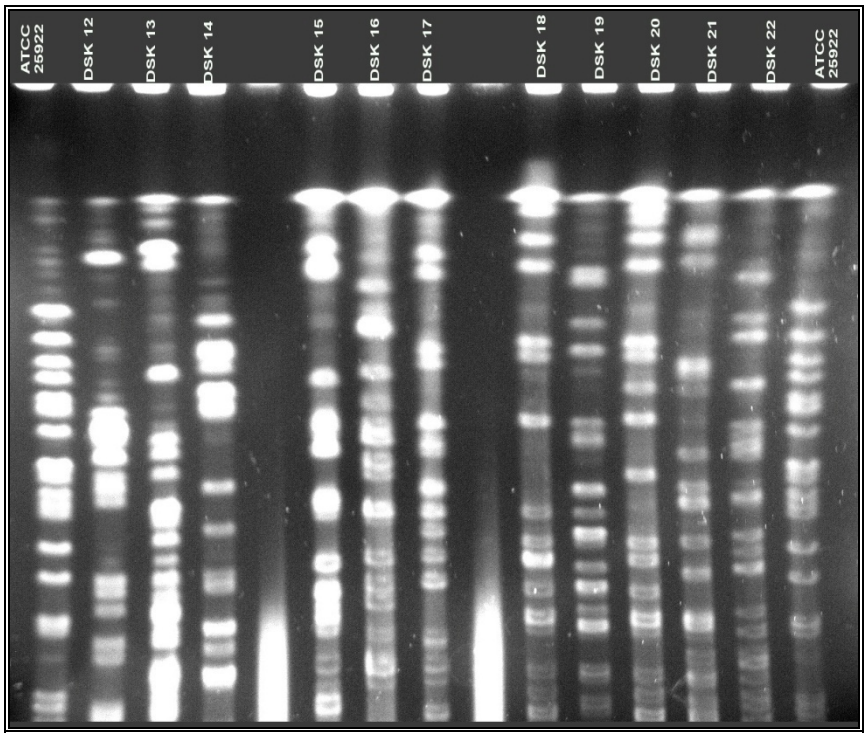
Şekil 4.15. DSG 3-5, 7, 8, DSG 35, 36, 38 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



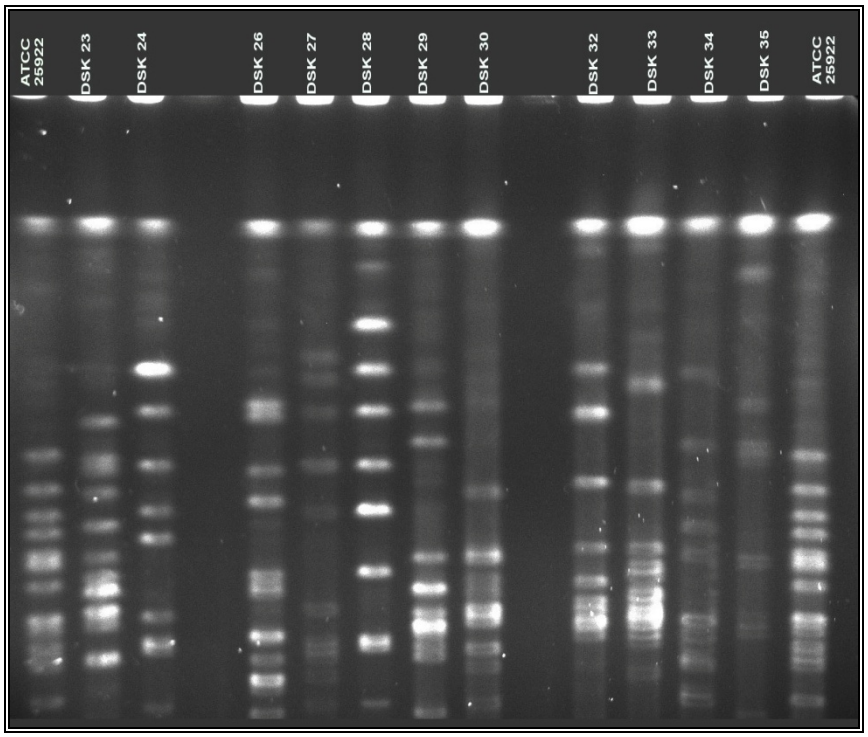
Şekil 4.16. DSG 6, 9, 26, 30, 28, 37, DSS 31, 38, 41-43 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



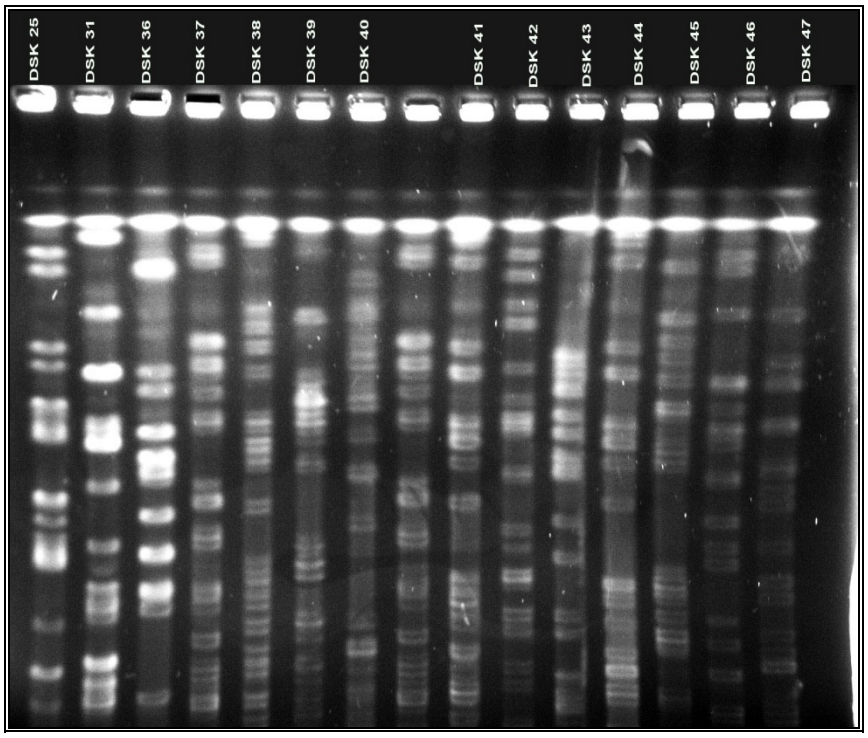
Şekil 4.17. DSK 1-11 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



Şekil 4.18. DSK 12-22 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



Şekil 4.19. DSK 23, 24, 26-30, 32-35 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri (Referans suş: *E. coli* ATCC 25922)



Şekil 4.20. DSK 25, 31, 36-47 no'lu suşların, *Xba*I ile elde edilen PFGE bant profilleri

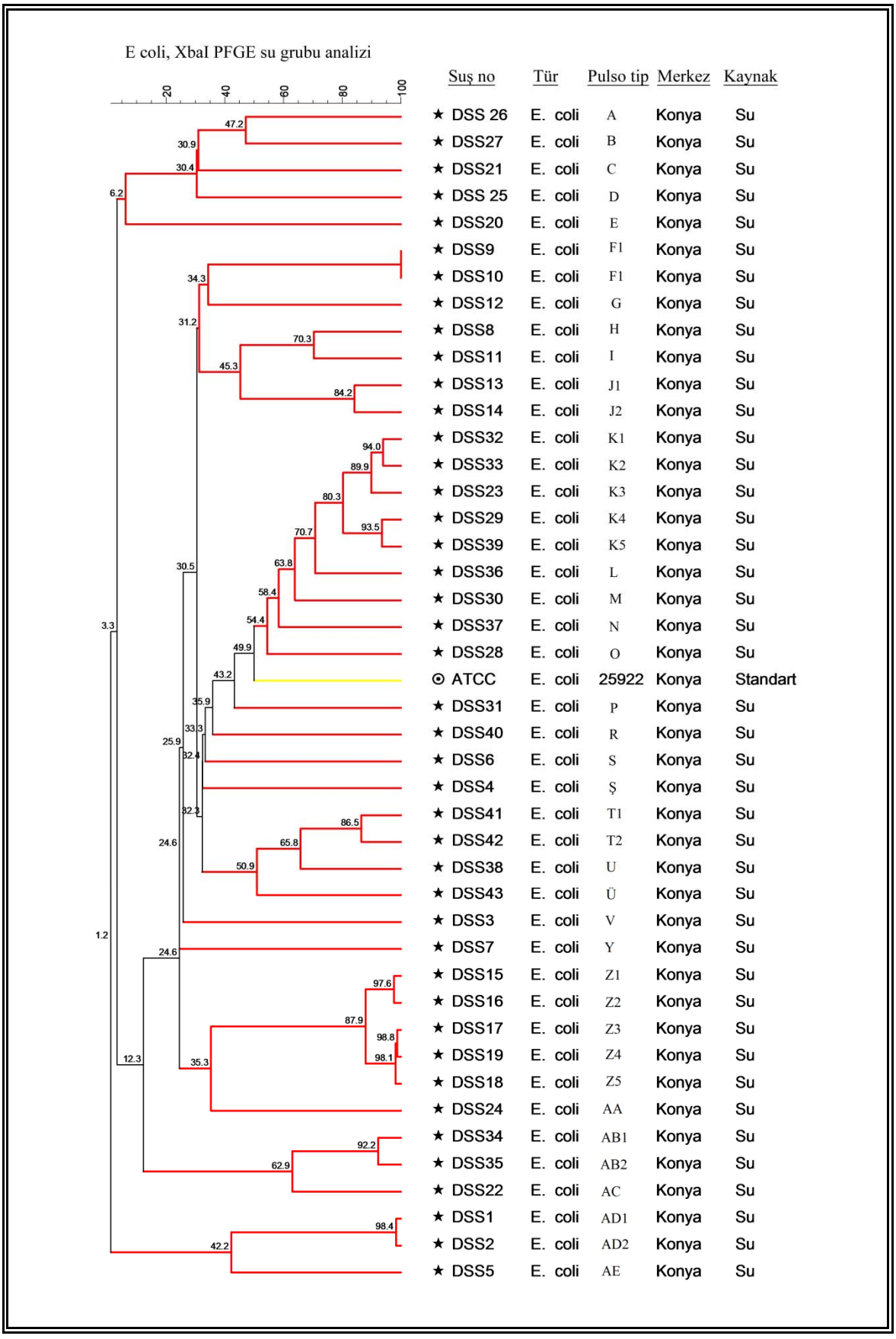
Sulardan izole edilen *E. coli* suşlarının, *Xba*I enzimiyle oluşturulan bant profilleri Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.16'da gösterilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri üzerinde yapılan UPGMA analizi ile Dice benzerlik katsayısına bağlı oluşturulan dendogram Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

Su izolatları arasında 30 farklı pulso tip belirlendi (A-AE). Bu gruplara bağlı, farklı altı alt tip saptandı. Gruplar içerisinde en fazla alt tipe sahip iki grup belirlendi. Bu iki büyük gruptan birincisi beş alt tip ile K (K1-K5) grubudur. DSS 32 (K1) ve DSS 33 (K2) no'lu suşlar arasında % 94 oranında benzerlik görüldü. Buna bağlı olarak bu iki suşun yakın ilişkili suşlar olduğu saptandı. K3 alt tipini gösteren DSS 23 ise, bu iki suş ile % 89.9 oranında benzerlik gösterdi. DSS 29 (K4) ve DSS 39 (K5) no'lu suşlar kendi aralarında % 93.5 benzerlik gösterdi. Bu iki suşun grup içerisindeki diğer üç suş ile benzerliğinin ise % 80.3 olduğu saptandı (Şekil 4.21).

İkinci büyük grubun ise, beş alt tiple Z (Z1-Z5) grubu olduğu görüldü. Bu alt tipler içerisinde en yüksek benzerlik oranı % 98.8 ile DSS 17 (Z3) ve DSS 19 (Z4) arasında olduğu; bu iki suşun ise DSS 18 (Z5) suşu ile % 98.1 oranında benzer olduğu dolayısı ile bu üç suşun yakın ilişkili izolat olduğu saptandı. Grup içerisinde, DSS 15 (Z1) ve DSS 16 (Z2) no'lu suşların % 97.6 oranında benzer, dolayısı ile yakın ilişkili izolatlar olduğu; diğer üç suş ile aralarındaki benzerliğin % 87.9 olduğu belirlendi (Şekil 4.21). Bu orana dayanarak olası ilişkili izolatlar oldukları düşünüldü.

DSS 9 (F1) ve DSS 10 (F1) no'lu suşların benzerlik oranı % 100 olarak belirlendi ve bu iki suşun aynı izolat olduğu saptandı. DSS 13 (J1) ve DSS 14 (J2) no'lu suşların muhtemel ilişkili izolatlar olduğu belirlendi. Olası ilişkili izolat durumu benzer şekilde; DSS 41 (T1) ve DSS 42 (T2) no'lu suşlar arasında, % 86.5 benzerlik oranına dayanarak belirlendi. DSS 1 (AD1) ve DSS 2 (AD2) no'lu suşların aynı kaynaktan geldiği yani klonal olarak % 98.4 oranında yakın ilişkili olduğu görüldü. DSS 34 (AB1) ve DSS 35 (AB2) no'lu suşların arasında ise % 92.2 oranında klonal benzerlik gözlendi (Şekil 4.21).

Yukarıda belirtilen altı grup içerisinde yer alan alt tiplerin dışında kalan suşlar ise ilişkisiz izolatlar olarak belirlendi. Bu suşlar arasındaki benzerlik % 1.2-70.7 oranları arasında değişen dağılım gösterdi. Su izolatları arasında genetik çeşitliliğin çok fazla olduğu; buna bağlı olarak da klonal ilişkilerinin az olduğu tespit edildi.



Şekil 4.21. Kuyu suyu örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının klonal ilişkisini gösteren dendogram (UPGMA, Dice, % 0.5 tolerans)

Gıdalardan izole edilen *E. coli* suşlarının, *Xba*I enzimiyle oluşturulan bant profilleri Şekil 4.10, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16'da gösterildi. Bu suşların bant profillerine dayanarak yapılan analiz sonucu elde edilen dendogram Şekil 4.22'de verildi.

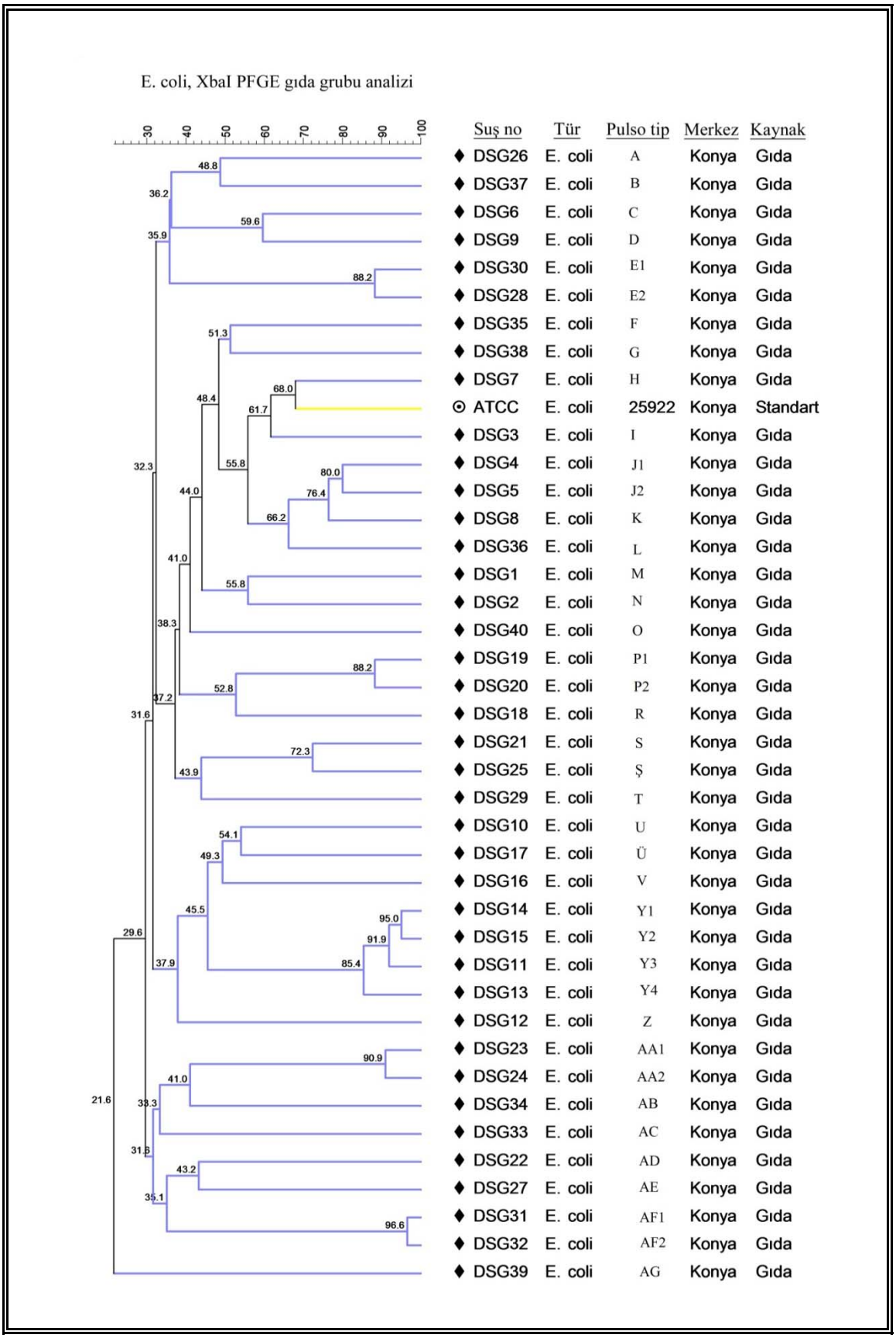
Gıda suşları arasında birbirinden farklı 32 pulso tip belirlendi (A-AG). Bu pulso tiplerin kendi içerisinde altı alt tipe ayrıldığı görüldü (Şekil 4.22). Bu gruplar içerisinde en fazla alt tipe sahip olan grup, dört alt tipe sahip Y grubudur (Y1-Y4). DSG 14 (Y1) ve DSG 15 (Y2) no'lu suşlar arasındaki genetik benzerliğin % 95 olduğu saptandı. Bu iki suşun yakın ilişkili suşlar olduğu belirlendi. DSG 11 (Y3) no'lu suşun ise, DSG 14 ve 15 no'lu suşlar ile % 91.9 oranında benzer olduğu dolayısı ile bu iki suş ile yakın ilişkili olabileceği tespit edildi. Aynı pulso tip içerisinde yer alan ve Y4 alt tipini gösteren DSG 13 no'lu suşun, diğer grup üyesi suşlara olan benzerliğinin % 85.4 olduğu saptandı (Şekil 4.22). Bu duruma göre diğer üç suş ile bu suşun muhtemel ilişkili suşlar olduğu belirlendi. Y pulso tipine ait olan bu dört suşun farklı zamanlarda farklı pastane ve marketlerden alınan dondurma örneklerinden kökenlendiği tespit edildi.

Dendogramda alt tip oluşturan diğer bir pulso tip, iki alt tipe sahip E grubudur (Şekil 4.22). E1 alt tipini gösteren DSG 30 ve E2 alt tipini gösteren DSG 28 no'lu suşlar % 88.2 oranına sahiptir. Bu noktadan hareketle, farklı dondurma örneklerinden izole edilen bu suşların muhtemel ilişkili suşlar olduğu belirlendi.

Dondurma kökenli olup alt tip oluşturan bir diğer grup J grubudur. Bu pulso tipe dahil olan ve iki alt tipe ayrılan suşlar ise DSG 4 (J1) ve DSG 5 (J2) no'lu suşlardır. Aralarındaki % 80 benzerlik oranına bağlı olarak bu suşların muhtemel ilişkili suşlar olduğu belirlendi. Benzer bir muhtemel ilişkili suş durumu, P pulso tipinde yer alan alt tip P1 (DSG 19) ve alt tip P2 (DSG 20) arasında da belirlendi. Bu iki suş arasında % 88.2 oranında klonal benzerlik tespit edildi. DSG 23 ve DSG 24 no'lu suşların, dendogramda AA pulso tipine dahil olduğu görüldü. Muhtemel ilişkili olarak değerlendirilen bu suşlar arasındaki genetik yakınlığın % 90.9 olduğu tespit edildi.

Dendogramda son alt tipi oluşturan grup AF grubudur. Bu gruba dahil olan, DSG 31 (AF1) ve DSG 32 (AF2) no'lu suşlar arasında % 96.6 oranında belirlenen genetik benzerliğe dayanarak, bu iki suşun yakın ilişkili suşlar olduğu tespit edildi.

Yukarıda belirtilen suşların dışında kalan suşlar arasında, genetik benzerlik oranları % 80'nin altında kalan bütün suşlar, genetik olarak ilişkisiz suş şeklinde kategorize edildi. Alt tip oluşturan gruplar ile olan benzerlikleri de dahil edildiğinde, ilişkisiz suşların, dendogramda % 21.6-76.4 oranları arasında değişen genetik benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.22).

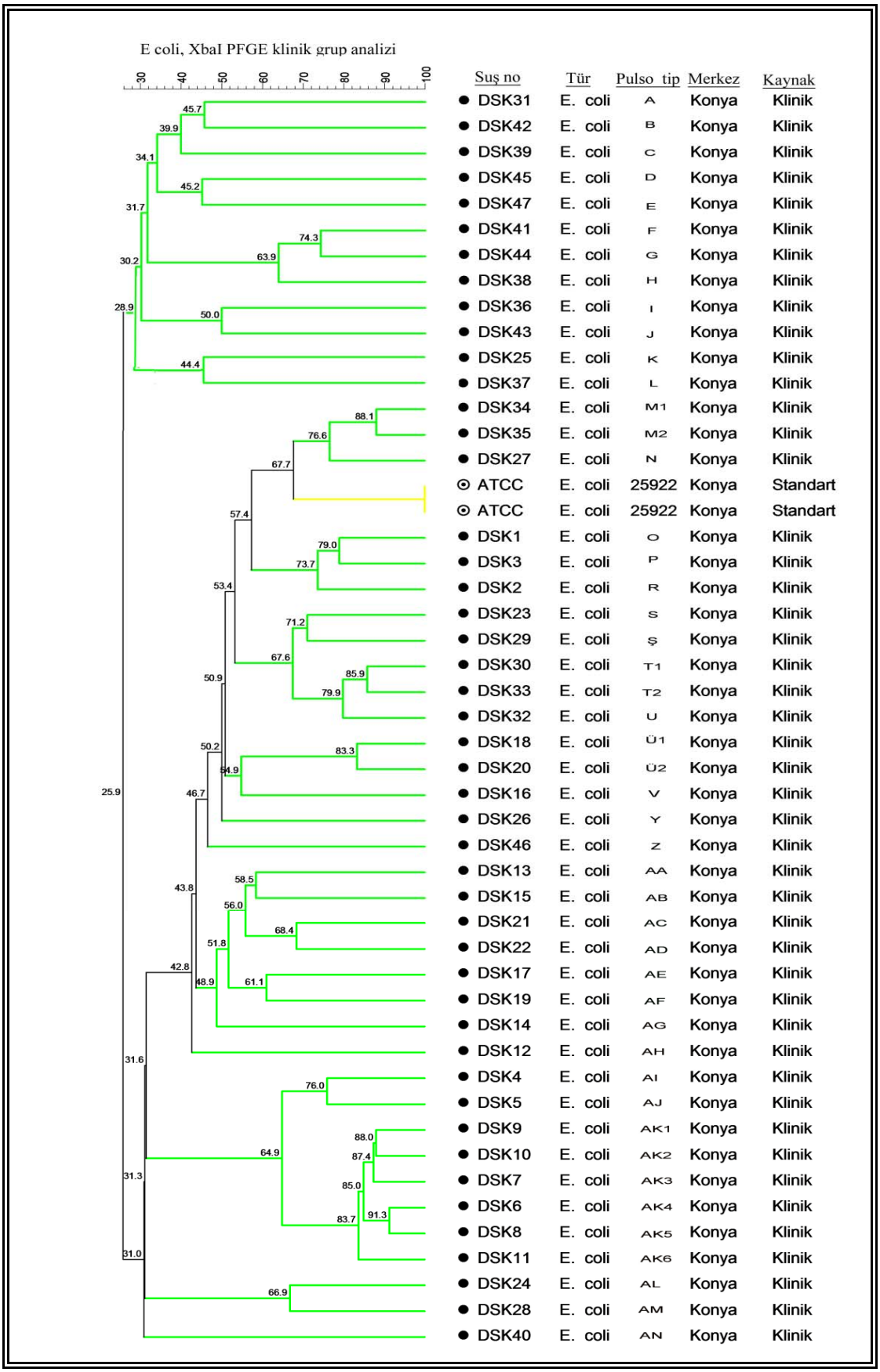


Şekil 4.22. Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının klonal ilişkisini gösteren dendogram (UPGMA, Dice, % 0.5 tolerans)

Çeştli klinik kaynaklardan izole edilen *E. coli* suşlarının, *Xba*I enzimiyle oluşturulan bant profilleri Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20'de gösterilmiştir. Bu suşların bant profillerine dayanarak yapılan analiz sonucu, elde edilen dendogram Şekil 4.23'de verilmiştir.

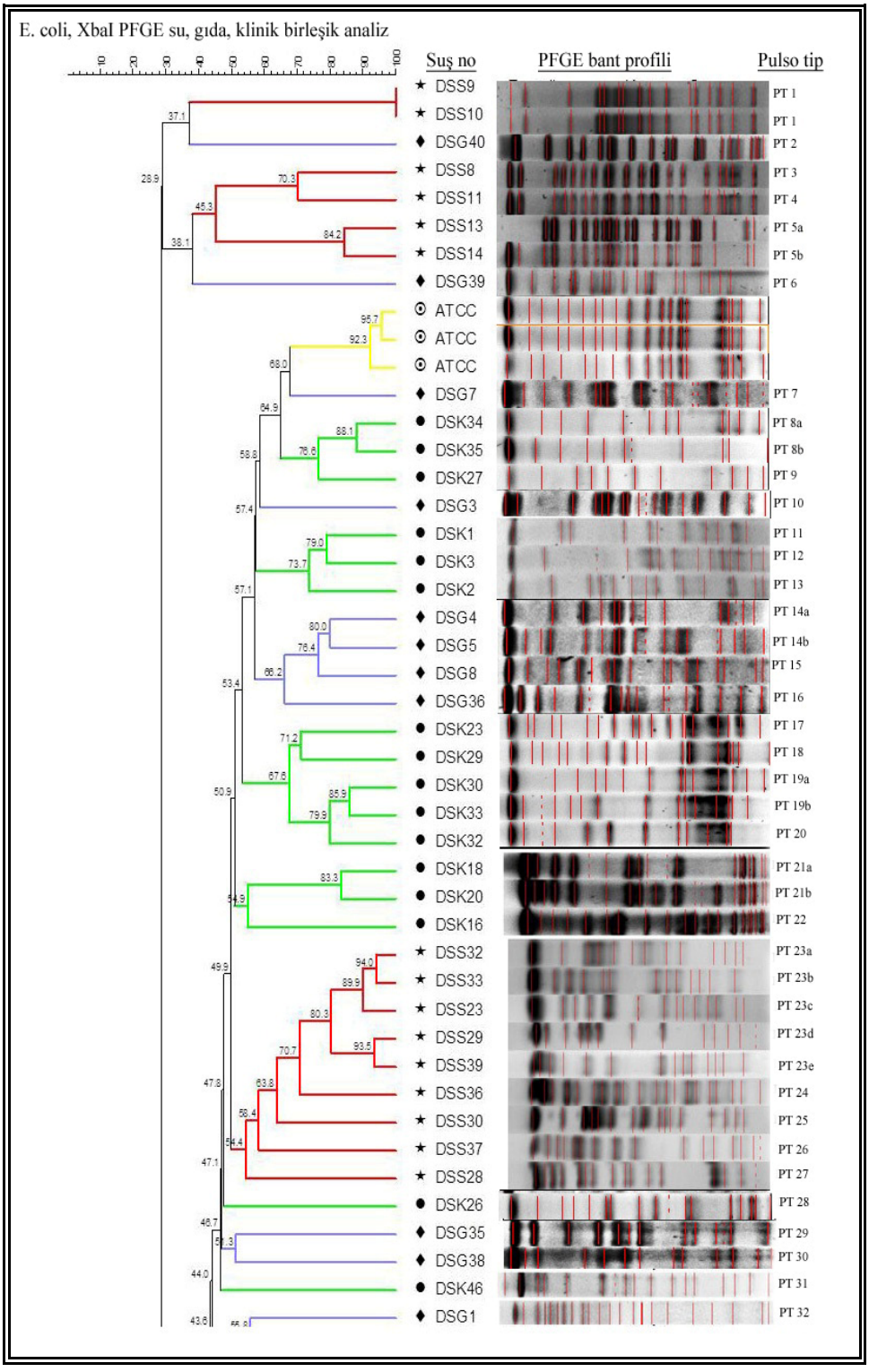
Klinik suşlar arasında birbirinden farklı 39 pulso tip belirlendi (A-AN). 39 grup içerisinde sadece dört grup kendi içerisinde alt tiplere ayrıldı (Şekil 4.23). En fazla alt tip bulunduran grup, altı alt tipe sahip AK grubudur (AK1-AK6). Grubun alt tiplerinden, DSK 6 (AK4) ve DSK 8 (AK5) no'lu suşlar arasında % 91.3 oranında klonal benzerlik saptandı. Bu iki suşun muhtemel ilişkili suşlar olabileceği düşünüldü. Benzer bir ilişki AK1, AK2 ve AK3 alt tipleri arasında görüldü. Bunlardan DSK 9 ve DSK 10 no'lu suşlar arasında % 88 oranında bir genetik yakınlık olduğu belirlendi. DSK 7 no'lu suşun (AK3), bu iki suş ile % 87.4 oranında akraba olduğu; bu oranlara bağlı yapılan değerlendirmede bu üç suşun muhtemel ilişkili suşlar olduğu tespit edildi. Yukarıda belirtilen beş suşun % 85 oranında klonal olarak ilişkili olduğu görüldü (Şekil 4.23). AK pulso tipine bağlı son alt tip, DSK 11 no'lu suşun oluşturduğu AK6'dır. Bu suş grubun diğer üyeleri ile kıyaslandığında, aralarında % 83.7 oranında genetik benzerliğin olduğu belirlendi. Suşların tamamı muhtemel ilişkili suşlar olarak tespit edildi. DSK 6 ve DSK9 no'lu suşların idrar yolları infeksiyonundan, DSK 10'un drenaj mayi'den izole edildiği belirlendi. DSK 7, 8 ve 11 no'lu suşların ise hangi klinik kaynaktan alındığı belirlenemedi.

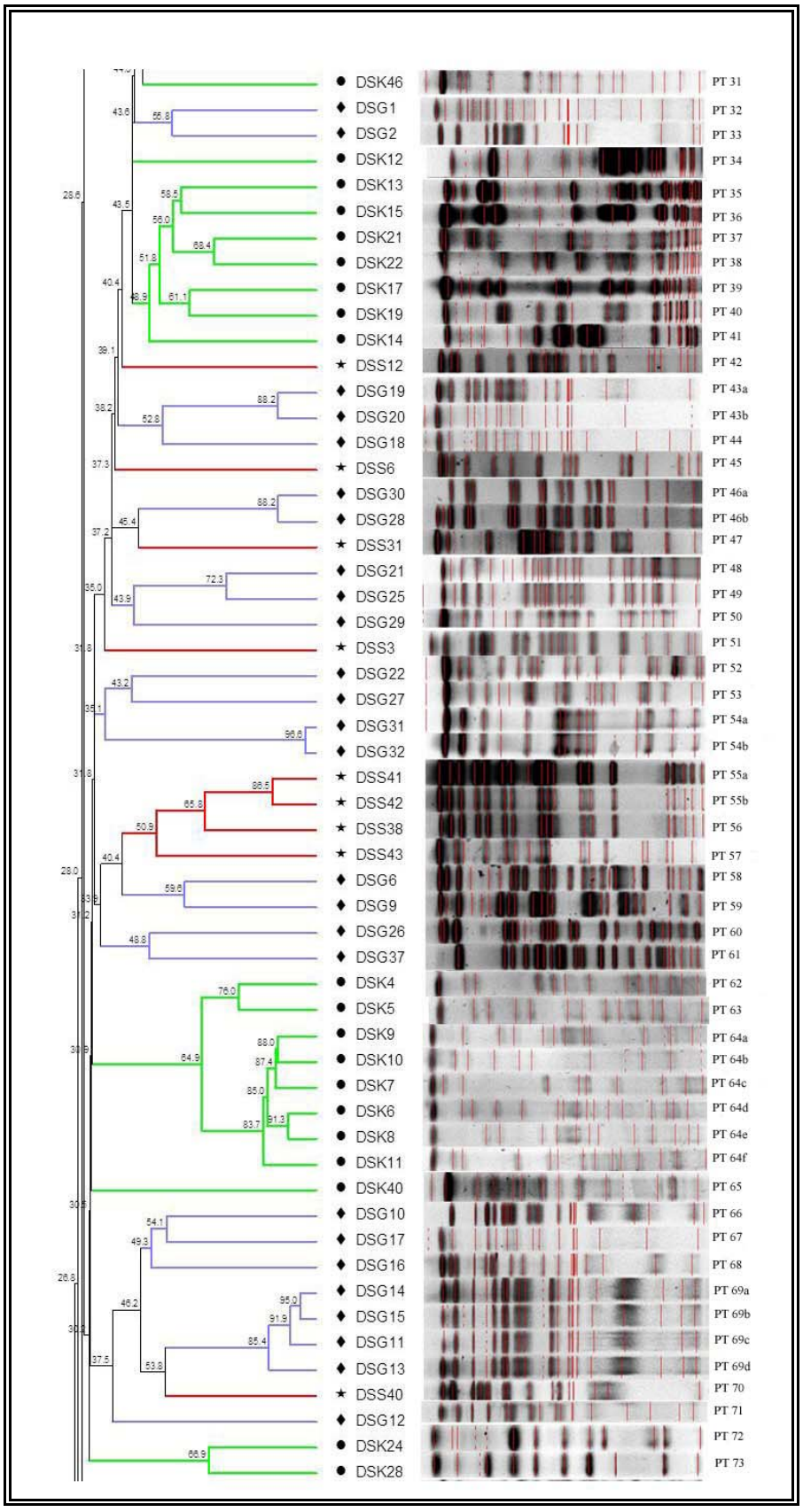
Dendogramda bir başka alt tip oluşturan grubun Ü grubu olduğu saptandı (Ü1, Ü2). Bu gruba bağlı DSK 18 (Ü1)ve DSK 20 (Ü2) no'lu suşlar arasındaki genetik benzerliğin % 83.3 olduğu ve idrar yolları infeksiyonundan izole edilen bu iki suşun muhtemel ilişkili izolatlar olduğu görüldü. DSK 30 ve DSK 33 no'lu suşların bulunduğu, T pulso tipi de iki alt tip gösterdi (T1, T2). Aralarındaki genetik yakınlık oranı % 85.9 olan bu iki suştan; DSK 30'un (T1) boğaz infeksiyonundan, DSK 33'ün (T2) ise idrar yolları infeksiyonundan izole edildiği ve buna rağmen muhtemel ilişkili suşlar oldukları saptandı. Klinik örnekler içerisinde alt tipe sahip son grup M pulso tipidir. Bu tipe bağlı DSK 34 (M1) ve DSK 35 (M2) no'lu suşlar arasındaki genetik benzerliğin % 88.1 olduğu; her iki suşun da idrar yolları infeksiyonundan izole edilmiş muhtemel ilişkili suşlar olduğu belirlendi. Belirtilen suşların dışında kalanlar ise ilişkisiz izolatlar olarak tespit edildi. Birçoğu benzer infeksiyonlardan izole edilmesine rağmen, klinik suşlar arasında yakın ilişkili ya da aynı suş gözlenmedi. Suşların genetik çeşitliliğinin yüksek, klonal ilişkilerinin ise zayıf olduğu belirlendi (Şekil 4.23).

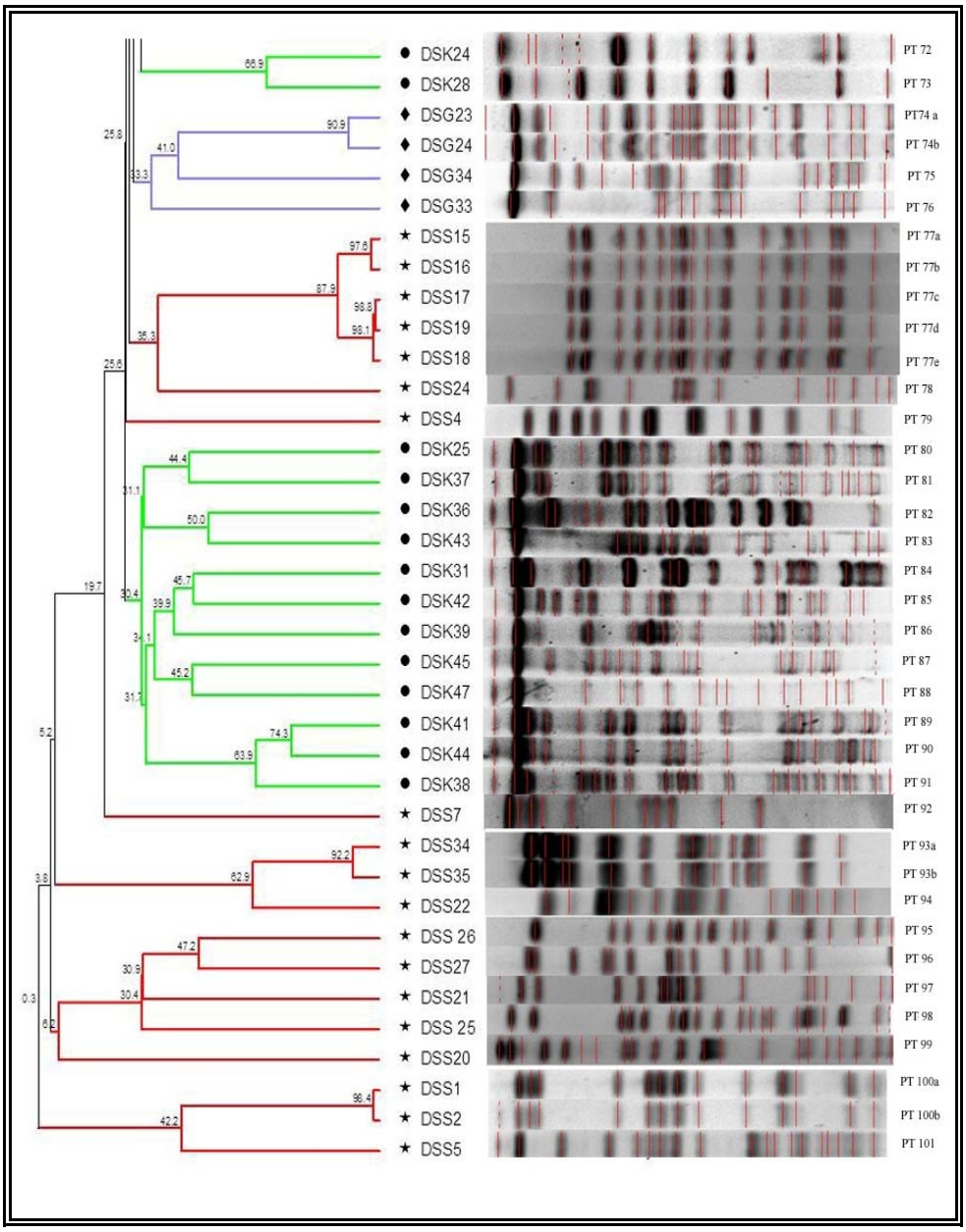


Şekil 4.23. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarının klonal ilişkisini gösteren dendogram (UPGMA; Dice, % 0.5 tolerans)

Su, gıda ve klinik suşlara ait klonal analizler, UPGMA yöntemine göre birleşik bir analizle değerlendirilerek, çalışmada kullanılan bütün suşların birbirlerine karşı olan genetik yakınlıkları yeniden değerlendirildi. Değerlendirme sonucu elde edilen birleşik analiz dendogramı, suşlara ait bant profilleri ve meydana gelen pulso tipler Şekil 4.24'de gösterilmiştir.




DSK46
DSG1
DSG2
DSK12
DSK13
DSK15
DSK21
DSK22
DSK17
DSK19
DSK14
DSS12
DSG19
DSG20
DSG18
DSS6
DSG30
DSG28
DSS31
DSG21
DSG25
DSG29
DSS3
DSG22
DSG27
DSG31
DSG32
DSS41
DSS42
DSS38
DSS43
DSG6
DSG9
DSG26
DSG37
DSK4
DSK5
DSK9
DSK10
DSK7
DSK6
DSK8
DSK11
DSK40
DSG10
DSG17
DSG16
DSG14
DSG15
DSG11
DSG13
DSS40
DSG12
DSK24
DSK28
PT 31
PT 32
PT 33
PT 34
PT 35
PT 36
PT 37
PT 38
PT 39
PT 40
PT 41
PT 42
PT 43a
PT 43b
PT 44
PT 45
PT 46a
PT 46b
PT 47
PT 48
PT 49
PT 50
PT 51
PT 52
PT 53
PT 54a
PT 54b
PT 55a
PT 55b
PT 56
PT 57
PT 58
PT 59
PT 60
PT 61
PT 62
PT 63
PT 64a
PT 64b
PT 64c
PT 64d
PT 64e
PT 64f
PT 65
PT 66
PT 67
PT 68
PT 69a
PT 69b
PT 69c
PT 69d
PT 70
PT 71
PT 72
PT 73



Şekil 4.24. Çalışmada kullanılan tüm *E. coli* suşlarının klonal ilişkisini gösteren birleşik dendogram ve oluşturulan pulso tipler (UPGMA; Dice, % 0.5 tolerans)

Dendogramdan elde edilen verilere göre; izole edilen bütün *E. coli* suşları arasında toplam 101 pulso tip belirlendi (Şekil 4.24). Bu pulso tiplere ait toplam 16 alt tip saptandı. 101 pulso tipin ortaya çıkması, klonal ilişki yönünden incelenen suşlar arasındaki benzerliğin düşük olduğunu gösterdi. Buna rağmen, PFGE yönteminin bu suşları ayırma gücünün yüksek olduğu ve genetik çeşitliliği belirleme yönünden oldukça başarılı bir yöntem olduğu görüldü.

Bütün suşları içerisinde bulunduran birleşik dendogram, bireysel olarak yapılan analizlerin ortalamasına dayandığından; su, gıda ve klinik suşlar için ayrı ayrı yapılan

analizlere hemen hemen çok yakın klonal ilişkiler birleşik dendogramda da gözlendi. Toplu analizde dikkati çeken bir durum; su izolatları ile gıda izolatları arasında değişen oranlarda benzerliklerin olmasıdır. Fakat değerlendirme kriterlerinde genetik benzerliğin; suşları aynı, yakın ve muhtemel olarak belirleyebilmesi için en az % 80 oranında benzerliğe sahip olması gerekmektedir (Akçimen, 2010). Bu oran bazı durumlarda % 90 ve üzeri olarak belirlenmektedir. Bu noktadan hareketle; su ve gıda izolatları arasındaki genetik benzerlik oranları % 80'den düşük olduğundan, bu suşlar ilişkisiz suşlar olarak belirlendi.

Analizde dikkati çeken bir diğer durum ise; klinik suşların hiç bir su ve gıda suşu ile yakın ve muhtemel ilişkisinin olmamasıdır. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen bu suşların, çevresel suşlarla klonal yönden tamamen ilişkisiz olduğu belirlendi. Gerek çevresel gerekse klinik suşların, kendi grupları içerisinde yakın ve muhtemel ilişkili izolatlarla alt tipler oluşturduğu gözlendi. Genellikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan PFGE yöntemi, çalışmamızda; çeşitli ortamlardan izole ve identifiye edilen suşların genetik benzerlik ve çeşitliliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

Bakteriler; yaygın olarak vücutta, gıdalarda ve çevrede bulunurlar ve kurdukları simbiyotik ve parazitik ilişkiler arasındaki hassas dengeden dolayı canlılar için önemlidirler. Çevrede bilinen bazı potansiyel patojen mikroorganizmalar arasında, koliform bakteriler ve özellikle de *E. coli*, su ve gıda kalitesinin belirlenmesinde araştırıcılar tarafından yoğun olarak araştırılmıştır (Manning, 2010). *E. coli* suşları 1980'lerde bazı ülkelerde meydana gelen salgınların kaynağı olarak tanınıncaya kadar, önemli bir patojen olarak düşünülmemiştir (Riley ve ark., 1983). Amerika'da bulunan Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) bir yıl boyunca *E. coli*'nin toksinojenik suşlarından kaynaklanan 73,000 vaka ve 61 ölüm durumunu bildirmiştir (Rangel ve ark., 2005). Çeşitli gıdalarda ve içme sularında bu patojenle ilgili haberlerin sıklığı, *E. coli* infeksiyonuna maruz kalma durumunu azaltmada, hızlı, doğru ve uygun maliyetli teşhis sistemlerine olan ihtiyacı göstermektedir. Bu bakteri doğada çok farklı kaynaklardan izole edilebilmekte olup bunların izolasyonları ve identifikasyonlarının yapılması çeşitli klasik yöntemlerle gerçekleşmektedir. Fakat bakterinin teşhisi yapılsa da bu mikroorganizmaların patojen suşlarıyla genotipik olarak benzer olup olmadığı ancak moleküler yöntemlerle belirlenmektedir (Foley ve ark., 2009). Faydalı ve zararlı mikroorganizmaların yayılmasını kontrol etmek için, tanımlanmalarını sağlayan pek çok metot geliştirilmiştir. PFGE, mikroorganizmaların genotipik karakterizasyonları için

yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek ayrım gücü ve tekrarlanabilirlik gibi özelliklerinden dolayı çoğu bakteriyel patojenin analizinde tercih nedenidir. Salgın araştırmalarında çok önemli bir araç olmasına rağmen sadece bu alanda değil; aynı zamanda çevrede bulunan mikroorganizmaların klonal ilişkileri ve genetik çeşitliliklerini belirlemekte de önemli bir yöntemdir (Goering, 2010). Çalışmamızda; su, gıda ve klinik kaynaklı *E. coli* suşlarının PFGE yöntemi ile benzerlik ve farklılıklarının ortaya konması ve bu doğrultuda klon kaynakları konusunda detaylı bilgilere ulaşmak amaçlanmıştır. Elde edilen verilere göre, izole edilen *E. coli* suşları arasında yüksek oranda genetik çeşitlilik tespit edilmiştir. Benzer şekilde Edberg ve ark. (1994), New Haven şehrinde su dağıtım sisteminden 23, kaynak sularından 5 ve şehir merkezindeki hastanelerin çeşitli ünitelerinden izole edilen klinik 28, toplam 56 *Enterobacter cloacae* suşunun klonal ilişkisini araştırmışlardır. Bu suşların tamamının birbirine benzer olup olmadığını, su dağıtım servisinden elde edilen suşlar ile kaynak sularından izole edilen suşların aynı olup olmadığını ve su dağıtım servisinden izole edilenlerin klinik suşlar ile benzer olup olmadığını belirlemek amacı ile PFGE metodunu uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, su dağıtım şebekesinden izole edilen suşların aynı olduğu, buna rağmen bu suşların hastaneden izole edilen suşlar ve kaynak suyundan elde edilen suşlardan tamamen farklı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı bölgedeki farklı kaynaklardan elde edilen suşlar arasında heterojenite olduğunu belirtmişlerdir. Aynı amaçla yapılan çalışmamızda, araştırmacıların kullandığı suştan farklı olarak, *E. coli* suşlarının homojenitesi ve heterojenitesi araştırılmıştır. Farklı gruplar arasında PFGE yöntemi ile yüksek oranda heterojenite belirlenmiştir. Suşlar farklı olmasına rağmen araştırmacıların elde ettiği sonuçlar ile bulgularımız örtüşmektedir. Sonuç olarak klinik izolatlar ve diğerleri arasında herhangi bir benzerlik görülmemiştir.

Parveen ve ark. (2001), haliç sularının kirliliği ile ilgili yaptıkları çalışmada; fekal kontaminasyonun kaynağını çeşitli yöntemlerle ortaya koymaya çalışmışlardır. İnsan kaynaklı (53) ve insan kaynaklı olmayan (51) toplam 104 adet *E. coli* suşu izole edilmiş; yağ asidi kompozisyonları yağ asidi metil ester yöntemi ile, O-serogrupları 181 spesifik O-anti serumu ile ve genetik ilişkileri PFGE metoduyla incelenmiştir. Yapılan bu fenotipik ve genotipik analizler sonucunda, gerek insan kaynaklı gerekse insan kaynaklı olmayan suşlar arasında herhangi bir akrabalık belirlenmemiştir. Yağ asiti metil ester yönteminin aksine; insan kaynaklı suşların PFGE profilleri, insan kaynaklı olmayan suşların profillerinden daha az genetik çeşitlilik göstermiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde, çevresel ve insanlarda çeşitli infeksiyonlardan izole edilen klinik

suşların klonal ilişkisi araştırılmıştır. Buradaki amaç, klinik kaynaklı suşlar ile gıda ve su kaynaklı çevresel suşların genetik olarak benzer olup olmadığını belirlemektir. Yapılan PFGE çalışması sonucunda bu suşların kendi aralarında benzerlik gösterdikleri fakat gruplar arasında ise ilişkisiz oldukları ortaya koyulmuştur (Şekil 4.21). Bu durum Parveen ve ark. (2001)'nın elde ettiği sonuçlarla uyumluluk göstermiştir. Araştırmacıların bulgularından farklı olarak çalışmamızda; insan kaynaklı olsun ya da olmasın gruplar içerisinde ve gruplar arasında çok fazla genetik çeşitlilik belirlenmiştir.

Casarez ve ark. (2007), doğal yüzey sularından izole ettikleri *E. coli* suşlarının genotip varyasyonlarını PFGE ve ERIC-PCR yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışma bölgelerinden belirli periyotlarla toplanan 650 örnekten 631 *E. coli* suşu izole edilmiştir. Bu suşlardan 76'sının restriksiyon enzimleriyle etkili bir kesim yapılamamasından dolayı çalışmalarda 555 suş kullanılmıştır. Değerlendirmede limit değer PFGE için % 70, ERIC-PCR için % 85 olarak belirlenmiştir. Analiz sonunda PFGE ile elde edilen genotip sayısı beklenildiği gibi ERIC-PCR'dan daha fazla bulunmuştur. 555 izolat 461 farklı pulsotip ortaya koymuştur. Bu pulsotiplerden 386'sı birer suş (% 84, 386/461), 62'si iki suş, 8'i üç suş, 4'ü dört suş ve bir tanesi de beş suş bulundurmuştur. ERIC-PCR'da ise 175 genotip meydana gelmiştir. Su izolatlarındaki PFGE genotip çeşitliliğine dayanarak; çalışılan su kütlelerinde, az oranda çevreye uyum sağlamış *E. coli* suşlarının baskın popülasyonlarla temsil edildiği ileri sürülmüştür. Çalışmamızda, kuyu sularından izole edilmiş 43 adet *E. coli* suşu, 30 farklı pulsotip oluşturmuştur (Şekil 4.21). Bunlardan 24 tanesi bireysel suşlar tarafından oluşturulan pulsotiplerdir ve su suşları içerisindeki oranı % 55.8'dir (24/43). Beş suş ihtiva eden iki pulsotip (K ve Z grupları), iki suş ihtiva eden dört pulsotip (J, T, AB, AD grupları) belirlenmiştir. Araştırmacıların çalışmada kullandıkları örnek sayısı göz önüne alındığında, incelenen su örneklerindeki genetik çeşitliliğin, bizim elde ettiğimiz orandan (% 69.7, 30/43) yüksek olması doğal bir sonuçtur. Çalışmamızda da benzer şekilde, PFGE yöntemi yüksek oranda genetik çeşitlilik ortaya koymuştur.

Du Preez ve ark. (2008), kırsal kesimde yaşayan insanların kullandığı içme suyu kaynaklarından ve bu suyun depolandığı çeşitli ortamlardan; bu insanlarda kontaminasyona yol açtığı düşünülen *E. coli* suşlarının kaynağını belirlemeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Bu doğrultuda, depolanmış su ve çevresel örneklerden izole edilen *E. coli*'lerin genetik akrabalıkları değerlendirilmiştir. Öncelikle 96 adet izolatın indol oluşturma özellikleri doğrulanmış; daha sonra, evdeki su depolama konteynırı, su içme kapları, bireylerin ellerinden swapla alınan numuneler, sığır gübreleri ve kaynak

suyundan izole edilen suşların, AFLP metodu ile genetik akrabalıkları araştırılmıştır. % 85 benzerlik oranına göre oluşturulan dendogramda, ellerden ve su içme kaplarından izole edilen *E coli* suşlarının aynı olduğu, benzer bir durumun da su depolama konteynırı ve kaynak suları arasında görüldüğü tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatlardan farklı su kaynakları ve çevresel izolatlar arasında yüksek oranda genetik çeşitliliğin ortaya çıktığı, buna rağmen kontaminasyonun üst basamaklarının belirlenemediği bildirilmiştir. Çalışmamızda PFGE yöntemi ile kuyu suyu örnekleri diğer gıda ve klinik izolatlar ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarında infeksiyonlara neden olan klinik suşlar ile gıda ve kuyu suyu örneklerinin ilişkisiz izolatlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24). Genetik akrabalığın ve özellikle de salgın suşlarının belirlenmesinde en çok tercih edilen PFGE yöntemi, çalışmamızda Du Preez ve ark. (2008)'nın çalışmasına benzer bir şekilde yüksek oranda genetik çeşitlilik ortaya koymuştur. Kuyu suları içerisinde aynı, yakın ilişkili ve muhtemel ilişkili izolatlar belirlenmesine rağmen; bu suşların klinik izolatlarla benzerlik göstermemesi, farklı bir moleküler yöntem kullanan Du Preez ve ark. (2008)'nın elde ettiği sonuçlarla uyum göstermektedir.

Ibekwe ve ark. (2011), California'nın Santa Ana Nehri havzası boyunca bulunan kanallar ve derelerden 12 ay süre ile yüzey suyu ve sedimen örnekleri toplamış ve buralardan izole edilen 600 adet *E. coli* suşunun yaygınlığını, genetik çeşitliliğini ve antibiyotik duyarlılıklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, dere ve kanallardaki sedimen örneklerinde görülen *E. coli* popülasyonunun yüzey sularında bulunandan daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Suşların genetik çeşitliliği PFGE yöntemi ile araştırılmıştır. Analiz sonucunda 465 izolat, 6 klonal grupta toplanmış ve her bir grup kendi içerisinde 10-137 arasında değişen klonal popülasyonlar ihtiva etmiştir. Kentsel kanallardan izole edilen suşlardaki genetik çeşitliliğin tarımsal kaynaklı olanlardan daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda yüzey suları izolatlarındaki genetik çeşitliliğin sedimen izolatlarından daha fazla olduğu ortaya koyulmuştur. 600 izolatın 144'ü (% 24) birden fazla antibiyotiğe direnç göstermiştir. Antibiyotik duyarlılık testinde ise en fazla çoklu antibiyotik direnci rifampin, tetrasiklin ve eritromisin'e karşı gözlenmiş olup, bu durum genellikle kentsel kanalların girişi ile ilişkilendirilmiştir. Bulgularımıza göre kuyu sularından izole edilen *E. coli*'lerde iki ve daha fazla antibiyotiğe karşı direnç oranı oldukça düşüktür (% 14.28). 42 suşta ampisilin'e karşı direnç gözlenmiş olup, sadece iki suş tetrasiklin'e dirençli olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Araştırıcılar antibiyotik direncinin artışına sebep olarak, kentsel kanalların nehir havzasına

karışımını göstermişlerdir. Bu sonuçtan yola çıkarak, kuyu sularındaki *E. coli*'lerde çoklu antibiyotik direnç oranının düşük olması, bu kaynaklara herhangi bir kentsel karışımın olmadığı ya da çok az olduğu ile ilişkilendirilebilir ve suşlar arasında belirlenen heterojenite araştırmacıların bulgularıyla uyumludur.

Çeşitli su kaynaklarından izole edilen *E. coli* suşlarının genetik karakterizasyonu belirlemeye yönelik çeşitli araştırmalar, farklı moleküler yöntemlerle de yapılmıştır. Parveen ve ark. (1999); akarsu ağızlarında insan ve insan dışı kaynaklardan izole edilen 238 *E. coli* suşunu ribotipleme yöntemiyle araştırmışlardır. Analiz sonucunda insan kaynaklı izolatlar 41, insan dışı kaynaklı izolatlar ise 61 ribotip göstermiştir. İnsan ve insan dışı kaynaklı izolatların tiplendirilebilirlik oranı % 82 olarak belirlenmiştir. Kon ve ark. (2007), Kanada'da bulunan Huron Gölü sahillerinin farklı noktalardan izole edilen *E. coli* suşlarının, karakterizasyonunu REP-PCR yöntemiyle yapmışlardır. Aynı bölgelerden alınan örneklerde yüksek benzerlik tespit edilmiş ve birbirlerine çok yakın REP-PCR profilleri belirlenmiştir. Farklı bölgelerden alınan örneklerde tespit edilen izolatların birbirlerinden çok farklı olduğunu bildirmişlerdir. Walk ve ark. (2007); Huron Gölü ve Michigan şehrinde bulunan Saint Clair Nehri kıyıları boyunca, farklı altı tatlı su kaynağından izole edilen *E. coli* suşlarının popülasyon genetiğini ve genetik çeşitliliğini belirlemek amacıyla Multilokus Enzim Elektroforezi (MLEE) ve Multilokus Sekans Tipleme (MLST) metotlarını uygulamışlardır. Çevresel kaynaklardan izole edilen *E. coli* popülasyonlarında, genetik çeşitliliği ortaya koyan bu şekilde bir çok çalışma olmasına rağmen; farklı moleküler metotlarla elde edilen genetik çeşitlilik ölçümlerinin direkt olarak karşılaştırılmasının zor olduğu bildirilmiştir (Walk ve ark., 2007).

Apun ve ark. (2006), Doğu Malezya'nın Sabah ve Sarawak şehirlerinde marketlerde satılan etlerde, O157:H7 ve O157 serogruplarında bulunan Shiga benzeri toksin üreten *E. coli*'lerin moleküler tiplendirmesini yapmışlardır. Bu amaçla, etlerden 51 *E coli* suşu izole edilmiş ve suşların doğrulanması yapılmıştır. 51 izolattan beşi O157:H7, dördü *E. coli* O157, ikisi O157 olmayan Shiga toksin üreten *E. coli* ve geri kalan 40 izolat ise Shiga toksin üretmeyen *E. coli* olarak belirlenmiştir. *Xba*I enzimi ile yapılan PFGE analizi sonucunda, 51 suşa ait 45 farklı genetik profil ortaya çıkarılmıştır. Tespit edilen beş O157:H7 suşu aynı genetik profili göstermiş ve aynı suş olarak belirlenmiştir. Dört O157 suşu iki farklı PFGE profili, O157 olmayan Shiga benzeri toksin üreten iki suş da yine iki farklı PFGE profili göstermiştir. Geri kalan *E. coli* suşları ise birbirinden çok farklı 40 pulsotip meydana getirmiştir. İki suş ise

tiplendirilememiştir. Sonuç olarak; Doğu Malezya'da marketlerde satılan etlerden izole edilen *E. coli*'ler arasında, yüksek oranda genetik çeşitlilik olduğu belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada; çoğunluğu market ve pastanelerde satılan dondurmalardan olmak üzere, tavuk etleri, yaş pasta, sucuk ve peynir gibi gıda örneklerinden izole edilen *E coli* suşları arasında da yüksek oranda heterojenite gözlenmiş olup, toplam 32 pulsotip ve buna bağlı altı alt grup belirlenmiştir (Şekil 4.22). Genellikle alt grup oluşturan suşların ise dondurmalardan izole edilen suşlar olduğu belirlenmiştir. Sonuçlarımızda görülen yüksek orandaki genetik çeşitlilik, araştırmacıların sonuçlarıyla uyum göstermektedir. PFGE yönteminin yüksek ayrıştırma gücünün olduğu yazarlar ve tarafımızdan teyit edilmiştir.

Wu ve ark. (2009), Danimarka'da bulunan domuz mezbahasında; karkas işlemlerinin tetrasiklin dirençli *E. coli* dağılımı üzerindeki etkisini incelemek ve karkaslarda bulunan *E. coli* popülasyonlarının genetik çeşitliliğini belirleyerek, karkaslarda *E. coli* tarafından meydana getirilen çapraz kontaminasyonun kökenini tespit etmeye yönelik bir araştırma yapmışlardır. Farklı beş aşama sonrasında, 105 karkastan örnekleme yapılmıştır. Defalarca örnekleme yapılmış 15 karkastan, dışkı, açıkta bırakılmış karkas, bölünmüş karkas ve dondurulmuş karkaslardan 422 *E. coli* izole edilmiş ve bu suşlara PFGE yöntemi uygulanmıştır. PFGE analizi sonucunda; açıkta kalan karkaslardan elde edilen suşların, dışkı ve bölünmüş karkaslardan elde edilenler ile karşılaştırıldığında genetik olarak yüksek oranda çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır. 13 karkasın (% 87), aynı gün kesilen aynı ya da farklı domuzlara ait dışkılardan izole edilen *E. coli*'ler ile kontamine olduğu; açıkta kalmış karkasların % 80'inin aynı *E. coli* 'ye ait PFGE alt tipini paylaştığı belirlenmiştir. Çalışmamızda PFGE yöntemi ile değerlendirilen gıda suşları, kendi içerisinde yüksek oranda genetik çeşitlilik göstermiştir. Genellikle açıkta satılan dondurmalardan izole edilen *E. coli* suşlarının, kendi içlerinde altı farklı alt grup oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.22). Bunların dışında kalan ve büyük çoğunluğu açıkta satılan dondurmalardan izole edilen suşlar arasında, genetik çeşitliliğin fazla olduğu ve alt grup gösterenler hariç 26 farklı pulsotip gösterdikleri gözlenmiştir. Dondurma örneklerinin alındığı market ve pastanelerde bulunan satıcılardan örnekleme yapılmadığı için kökeni belirlemeye yönelik bir araştırma yapılamamıştır. Gıda izolatları, su ve klinik izolatlar ile karşılaştırıldığında ise aralarında çok yakın bir genetik ilişkinin olmadığı (Şekil 4.24), dolayısı ile bu *E. coli*'lerin kökeninin, su ve klinik kaynaklı olmadığı söylenebilir.

Badri ve ark. (2009), kıyma, sosis, hindi eti ve kuyu suyu gibi örneklerden izole ettikleri 74 *E. coli* suşunun genetik çeşitliliğini PFGE yöntemiyle araştırmışlardır. Aynı zamanda PCR-RFLP yöntemiyle bu suşların farklı serotiplere ayrıldığı görülmüştür. Farklı serotiplere ait izolatlar arasında yüksek derecede polimorfizm, aynı serotipe ait suşlar arasında ise yakın ilişki belirlenmiştir. Toplamda 42 farklı pulsotip belirlenmiştir. Ayrıca aynı virülans faktörü taşıyan bazı suşların farklı PFGE profili gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar PFGE analizinin; potansiyel patojen *E. coli* suşları arasında, klonal karakterin ve genetik farklılıkların ortaya koyulmasında çok güçlü bir metot olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda PFGE yöntemiyle; tavuk etleri, peynir, sucuk, dondurma gibi gıda örneklerinden izole edilen *E. coli* suşları arasında, araştırmacıların tespit ettiği gibi yüksek oranda genetik çeşitlilik belirlenmiştir (Şekil 4.22). Çalışmada herhangi bir serotipleme ve virülans faktörü belirlemesi yapılmamıştır. Ayrıca kuyu sularından izole ettiğimiz suşlar ile gıdalardan izole edilen suşlar arasında belirli oranda genetik benzerlik olmasına rağmen, bu benzerliğin % 80'den daha az olmasından dolayı bu iki grup birbiriyle ilişkisiz olarak tespit edilmiş ve farklı PFGE tipleri göstermiştir (Şekil 4.24). Sonuçlarımız bu açıdan da yazarların sonuçlarıyla birebir uyuşmaktadır.

Thorsteinsdottir ve ark. (2010) İzlanda'da, sağlıklı domuz ve piliçlerden, domuz eti, piliç eti, mezbaha personeli ve ayakta tedavi gören hastalardan izole edilen antimikrobiyal dirençli *E. coli* suşlarının dağılımını ve genetik ilişkilerini incelemişlerdir. Toplamda 419 *E. coli* suşunun antibiyotik duyarlılıkları, mikrobroth dilüsyon metodu; dirençli suşların genetik ilişkileri ise PFGE yöntemiyle araştırılmıştır. Suşlar arasındaki enrofloksasin'e karşı belirlenen direnç oranları orta duyarlıdan yükseğe doğru sırasıyla; domuzların körbağırsağı ve etinde % 54.1 ve % 28, piliçlerde % 33.6 ve % 52, mezbaha personelinde ise % 39.1 olarak belirlenmiştir. Buna rağmen ayakta tedavi gören hastalarda ise bu oran % 23.1 ile orta dereceli bulunmuştur. *E. coli* suşlarının büyük bir kısmı (% 78.6) genetik yönden farklı bulunmuştur. Fakat piliç etlerinden ve mezbaha personelinden izole edilen suşlar arasında, aynı direnç profili ve pulsotip görülmüştür. Bu durum, antimikrobiyal dirençli *E. coli*'lerin hayvanlardan insanlara geçtiğini göstermiştir. Farklı direnç profilleri ve pulsotipler, İzlanda'daki üretim hayvanlarında geniş oranda dirençli *E. coli* popülasyonlarının varlığını ortaya koymuştur. Çalışmamızda tavuk etleri ve diğer gıda numunelerinden izole edilen *E. coli*'ler arasında, yakın ilişkili ya da muhtemel ilişkili suşlara rastlanmamıştır (Şekil 4.22). Çalışmamızdaki hastane kaynaklı suşlar ile gıda suşlarının ilişkisiz oluşu,

araştırmacıların tedavi gören hastalar ile gıda numuneleri arasında ilişki bulamayışı ile benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Ayrıca bulgularımızda, bir kinolon olan siprofloksasin'e (CIP) karşı gıda suşlarının direnci % 10 (4 suş) olarak belirtilmiştir (Çizelge 4.3). Bu oran araştırıcıların bulgularına göre daha düşüktür. Klinik suşlarda görülen kinolon direncinin ise % 57.45 (27 suş)'lik oran ile araştırmacıların bulduğu bütün direnç yüzdelerinden daha fazla olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.5). Su numunelerinin ise tamamı kinolon olan CIP'a karşı duyarlı bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Scott ve ark. (2006), üç aylık süreç içerisinde; besi sığırları arasında *E. coli* O157:H7 suşunun yayılışı ile ilgili olarak, genetik çeşitliliği belirlemeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada sığır grupları arasında, ahırlardan dışkı örnekleri (69) ve çevresel ağıl örneklerinden (29) izole edilen 95 adet *E. coli* O157:H7 suşunun genetik akrabalıkları PFGE yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. *Xba*I enzimi ile oluşturulan bant profillerinden elde edilen dendogramda % 80 benzerlik oranı göz önüne alınarak değerlendirme yapılmıştır. A, B ve C olmak üzere üç pulsotip meydana gelmiştir. Elde edilen verilere dayanarak, bir *E. coli* O157:H7 suşunun hızlı bir şekilde sığır grupları arasında yayıldığı belirlenmiştir. Aynı zamanda bu suşun çevredeki ağıllarda da kontaminasyon meydana getirdiği bildirilmiştir. Araştırıcılar, çiftliklerde direkt ya da dolaylı olarak *E. coli* O157:H7 yayılışının takibinde PFGE yönteminin çok iyi bir yöntem olduğu kanaatine varmışlardır. Çalışmamızda herhangi bir salgın durumu değerlendirilmemesine rağmen, PFGE yöntemi çevresel ve klinik suşlarımız arasında çok kesin bir ayrım yapmış ve birbirleriyle ilişkisiz olduklarını ortaya koymuştur. Bu kesin farkı ortaya koyan PFGE metodunun, suşlar arasında genetik benzerliğin belirlenmesinde iyi bir yöntem olduğu tarafımızdan da belirlenmiş ve bu doğrultuda araştırıcıların görüşü desteklenmiştir.

Başka bir çalışmada Rios ve ark. (1999), Şili'de hemolitik üremik sendrom vakalarından izole edilen klinik izolatlar, hayvansal kaynaklar ve gıdalardan izole edilen enterohemorajik *E. coli* suşlarının klonal ilişkilerini koloni blot hibridizasyon ve PFGE yöntemleriyle araştırmışlardır. Analizi yapılan 39 *E. coli* O157:H7 suşu arasında birbirinden farklı 37 profil ortaya koyulmuştur. Hemolitik üremik sendrom vakaları ve asemptomatik bireylerden elde edilen izolatlar arasında PFGE profillerinin geniş oranda dağılım gösterdiği; hemolitik üremik sendrom ve domuzlardan izole edilen O157 suşları arasında ise genetik akrabalığın görüldüğü bildirilmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak Şili'de, bazı farklı EHEC klonlarının yayıldığı; domuzların insan infeksiyonlarında önemli bir hayvansal kaynak olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda, belirli bir serotipe

yönelik araştırma ve serotipleme yapılmamıştır. Farklı klinik vakalardan izole edilen suşlar arasında klonal benzerlik oranı düşük bulunmuştur. Alt tipler genellikle idrar yolu infeksiyonundan izole edilen suşlar arasında meydana gelmiştir (Şekil 4.23). Çevresel suşların klinik suşlarla ilişkisinin olmadığı belirlenmiş olup; infeksiyon hastalıkları için kaynak teşkil etmedikleri söylenebilir.

Kariuki ve ark. (1999) Kenya'nın Kiambu bölgesinde, aynı çiftlikte tavuklarla yakın ilişkide bulunan 42 çocuğun dışkılarından ve 62 tavuğun anal yollarından *E. coli* izole etmişler ve bu suşların genetik akrabalıklarını incelemişlerdir. Antibiyotik duyarlılık denemeleri sonucunda iki büyük grup ortaya çıkmış; tavuklardan izole edilen 216 (% 87.1) suş ya tamamen duyarlı ya da sadece tetrasiklin'e dirençli olmalarına rağmen, çocuklardan izole edilen 144 (% 85.5) suş çoklu antibiyotik direnci göstermiştir. PFGE analizi ile 14 farklı grup ortaya çıkarılmıştır. Tavuklar arasında yedi farklı PFGE grubu oluşmasına rağmen, çocuklardan izole edilen suşlar arasında altı farklı grup belirlenmiştir. Sadece bir PFGE grubu, % 60 oranında bezerlik gösteren her iki gruptan izolatları içinde bulundurmuştur. Çalışma, aynı çiftlikte bulunan çocuklardan ve tavuklardan izole edilen *E. coli*'lerin bazı farklı genotipler göstermesine rağmen, bu iki kaynaktan gelen suşların farklı olduğunu ortaya koymuştur. Tetrasiklin'e karşı direnç, çocuk izolatlarında % 70.2 (118) ve tavuk izolatlarında % 59.7 (148) olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda 101 farklı pulsotipin ortaya çıkması suşlar arasındaki genetik ilişkinin az olduğunun bir göstergesidir. Araştırmacıların genotip analizinden elde ettiği sonuçlar ile çalışmamızdan elde edilen sonuçlar uyuşmaktadır. Yani gruplar arasında muhtemel ya da yakın ilişkiyi gösteren bir benzerlik yoktur. Ayrıca su izolatlarında % 4.66 (2), gıda izolatlarında % 22.5 (9) ve klinik izolatlarında ise % 80.85 (38) oranlarında tetrasiklin direnci gözlenmiştir. Klinik izolatlarımızda görülen tetrasiklin direncinin, araştırmacıların bulduğu direnç oranlarından daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca, hem çocuklardan hem de tavuklardan izole edilen her dört bireysel *E. coli* suşundan biri aynı plazmit profilini göstermiştir. En yaygın plazmit büyüklüklerinin 100 mDa'dan 110 mDa'a kadar olduğu bunların ise 24 mDa'lık plazmitlerle birlikte ya da tek başına bulunduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise ikili gruplar arasında aynı büyüklükte plazmitler olmasına rağmen, üç grupta da bulunan ortak bir plazmite rastlanmamıştır.

Perrin ve ark. (1999), idrar yolları infeksiyonlarından sorumlu, toplum ve nozokomiyal kaynaklı *E. coli* suşlarını; idrar yolları infeksiyonları tedavisinde geniş çapta kullanılan beta laktamlar, kinolonlar ve kotrimoksazol gibi antibiyotiklere karşı

dirençleri yönünden test etmişlerdir. Antibiyotik duyarlılık çalışmaları her suşun, çeşitli ilaçlara karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunu belirleyen Vitek ® automat sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca karşılaştırmalı olarak yapılan bu çalışmada iki grup arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla PFGE yöntemi kullanılmıştır. Toplum kaynaklı üriner *E. coli* suşları arasında görülen direnç durumları; amoksisilin'e % 30, kinolonlar'a % 4, florokinolonlar'a % 0 ve kotrimoksazol'e % 13 olarak belirlenmiştir. Nozokomiyal suşlar için direnç durumu; kinolonlar'a % 21, florokinolonlar'a % 10 ve kotrimoksazol'e % 33 olarak tespit edilmiştir. Nozokomiyal suşların beta laktamlara, kinolonlara ve kotrimoksazol'e, toplum kökenli suşlardan çok daha dirençli olduğu görülmüştür. PFGE sonuçları, toplum ve nozokomiyal suşlar arasında olağanüstü derecede genetik çeşitliliğin olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, büyük çoğunluğu idrar yolları infeksiyonlarından sorumlu klinik *E. coli* suşlarının, beta laktam grubu antibiyotikler olan ampisilin (AM), tikarsilin/klavulanik asit (TIM), amoksisilin/klavulanik asit (AMC), piperasilin/tazobaktam'a (TZP) karşı gösterdiği direnç oranları sırasıyla; % 100, % 89.36, % 46.81 ve % 12.76 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Ayrıca bir kinolon olan siprofloksasin'e (CIP) karşı direnç oranı % 57.45 olarak tespit edilmiştir. Klinik suşlarımızda görülen bu direnç oranları, araştırıcıların tespit ettiği oranlardan daha yüksektir. Çalışmamızda kotrimoksazol kullanılmamıştır. Araştırıcılar, toplum ve nozokomiyal kökenli gruplar arasındaki heterojenitenin çok yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; 47 klinik suşta 39 farklı PFGE tipinin görülmesi, test suşlarımız arasında da heterojenitenin yüksek olduğu görüşünü desteklemektedir.

Karlowsky ve ark. (2007), ayakta tedavi gören hastalarda idrar yolları infeksiyonlarından izole edilen, antimikrobiyal duyarlı ve çoklu antibiyotik direnci gösteren *E. coli* suşlarının, genetik akrabalık derecelerini belirlemeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar aynı zamanda bu suşları, nüfusa ve coğrafyaya bağlı olarak karşılaştırmalı bir şeklide incelemişlerdir. İlk grupta ampisilin, trimetoprim-sülfometaksazol (SXT), siprofloksasin duyarlı 70 adet *E. coli* suşu; ikinci grupta ise ilk gruptaki suşlarla hasta cinsiyeti, yaşı, izolasyon tarihi gibi durumlar karşılaştırılan ve aynı zamanda çoklu ilaç direnci gösteren 70 adet suş yer almıştır. Genetik akrabalığı belirlemek için PFGE yöntemi, ilaç duyarlılık ve direncini belirlemek için mikro broth dilüsyon yöntemi uygulanmıştır. PFGE, antimikrobiyal duyarlı izolatlar arasında altı izolat ihtiva eden iki grup ve beş izolat ihtiva eden sadece bir grup şeklinde sınırlı sayıda grup ortaya çıkarmıştır. Bunun tersine çoklu ilaç direnci gösteren suşlar içinde

ise 29 ve 11 izolat ihtiva eden iki büyük grup ortaya çıkarmıştır. Antimikrobiyal duyarlı ve çoklu ilaç direnci gösteren suşların içinde bulunduğu gruplar, demografik açıdan bu grupların dışında bulunan suşlara benzemektedir. Sonuç olarak araştırıcılar, ayakta tedavi gören idrar yolları infeksiyonu hastalarından izole edilen ve çoklu ilaç direnci gösteren *E. coli* suşlarında, aynı zaman periyodunda toplanan antimikrobiyal duyarlı ve demografik (hasta yaşı, cinsiyeti, izolasyon tarihi vb.) olarak karşılaştırılmış suşlardan çok daha yüksek derecede genetik homojenite belirlemişlerdir. Çalışmamızda klinik izolatlar içerisinde yer alan 47 suşun büyük çoğunluğu (31) idrar yolları infeksiyonlarından izole edilen suşlardır. Klinik suşlara ait dendogramda 39 farklı pulsotip meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.23). 39 pulsotip kendi içerisinde dört alt tipe ayrılmıştır. Alt tipe ayrılan grupların dışında kalan 35 grup, birer suşla temsil edilmektedir. Klinik suşların tamamı ampisilin'e, % 57.45'i ise siprofloksasin'e dirençli olarak bulunmuştur. 44 suş, dört ve üzeri antibiyotiğe karşı direnç göstermiş olup çoklu antibiyotik direnç indeksleri 0.267-0.800 arasında değişmektedir (Çizelge 4.6). Bu indeks değerleri bu suşların daha önce, dirençli bulundukları antibiyotiklerin yoğun kullanıldığı bölgelerden geldiğini göstermektedir (Krumperman, 1983). PFGE analizi sonucunda 47 suşun 39 pulsotip ortaya koyması, klinik suşlar arasında yüksek derecede genetik heterojenitenin ve çeşitliliğin olduğunun bir göstergesidir.

Genomik DNA'nın kesimine dayanan PFGE; ilk geliştirildiği ve kullanıldığı günden bu yana, klinik suşların epidemiyolojik ilişkilerinin araştırılmasında en çok tercih edilen ve bu ilişkiyi en güvenilir şekilde ortaya koyan altın standart bir metot haline gelmiştir. Her türlü genetik değişimi ve makro restriksiyon belirleyememesine rağmen, bu yöntemle görünebilir hale gelen PFGE profili toplam genomun % 90'ından fazladır. Aynı anda, DNA'da delesyon, dublikasyon, insersiyon ve nokta mutasyon gibi bazı genetik değişim sınıflarını belirleyebilmektedir (Kudva ve ark., 2002; Goering, 2010). Buna rağmen, sistemin laboratuvardan laboratuvara değişkenlik göstermesi, optimizasyon problemlerinin olması, pahalı cihazlar ve uzun sürede sonuç vermesi (4-5 gün) gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bazı durumlarda ise tiplendirilemeyen suşların varlığı da sistemin kullanımını sınırlamaktadır. Sonuç olarak bu gibi durumları aşmak ve geniş çapta mikroorganizma grubunu tiplendirebilmek için PFGE'nin, PCR tabanlı bazı moleküler tekniklerle kombine olarak kullanımının faydalı olacağı belirtilmiştir (Wu ve Della-Latta, 2006). Bu noktadan hareketle, farklı kaynaklardan izole edilen suşlarımızın ilerleyen zamanda, farklı moleküler yöntemler ve özellikle

dördüncü jenerasyon moleküler tipleme olan DNA dizi analizini yaparak genetik ilişkilerini doğrulamak ve biyoinformatiğe katkıda bulunabilmek amacını taşımaktayız.

Antibiyotiklere duyarlılık testi sonuçları değerlendirildiğinde, su izolatlarının birinci sırada % 97.67 oranında ampisilin'e (42 suş), ikinci olarak % 9.31 oranında tikarsilin/klavulanik asit'e (dört suş), üçüncü olarak % 6.97 oranında seftazidim ve sefotaksim'e (üçer suş) direnç gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Genel olarak klinik ve gıda izolatlarıyla kıyaslandığında, su izolatlarının kullanılan antibiyotiklere diğerlerinden daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu grup içerisinde beş farklı direnç profili belirlenmiş olup; en yaygın profilin, dirençli suşlar içerisinde % 85.71 (36 suş) oranında dağılıma sahip olduğu ve sadece Ampisilin'e karşı direnç gösterdikleri saptanmıştır (Çizelge 4.2). Çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indekslerine bakıldığında dört suşun 0.2 indeks değerinden daha yüksek bir değere sahip olduğu gözlenmiştir. Krumperman (1983)'a göre, 0.2 değerinden daha yüksek bir indeks değerine sahip olan suşların, direnç gösterdikleri antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı bir bölgeden geldikleri savunulmaktadır. Çalışmamızda, su izolatlarından DSS 41, 42 ve 43 no'lu suşlar, 0.267'lik bir ÇAD indeksi göstermiş olup AM, TIM, CAZ ve CXM antibiyotiklerinin yoğun kullanıldığı bir bölgeden geldikleri tespit edilmiştir. DSS 39 no'lu suşun ÇAD indeksi 0.333 olarak belirlenmiş ve AM, TIM, AMC, KF ve TE antibiyotiklerinin yoğun olarak kullanıldığı bölgelerden izole edildikleri tespit edilmiştir. Harakeh ve ark. (2006) Lübnan'da; deniz suyu, sediment ve tatlı su kaynaklarından izole ettikleri çevresel patojenik *E. coli* suşlarınının bazı antibiyotiklere karşı direnç durumunu araştırmışlardır. Deniz suyu izolatlarında en yüksek direncin % 73 oranında sefuroksim'e (CXM), en düşük direncin % 27 oranında sefotaksim'e (CTX) karşı olduğu belirlenmiştir. Tatlı su örneklerinde CXM'ye karşı en yüksek direnç % 100 oranında, en düşük direnç gentamisin'e karşı % 42 oranında olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar klinik izolatlarla yapılan çalışmaları karşılaştırmışlar ve elde ettikleri direnç oranlarının, klinik izolatlara göre iki katı fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda, su izolatlarının CXM'ye % 6.97 oranında dirençli olduğu; CTX ve gentamisin (CN)'e karşı ise tamamının duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu oranlar gıda izolatları için de düşük olarak tespit edilmiştir. Klinik izolatlarda ise bu üç antibiyotiğe karşı olan direnç CXM % 87.24, CTX % 80.85 ve CN % 55.32 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Bu değerler çalışmamızdaki çevresel izolatlardan elde edilen oranlardan ve araştırmacıların klinik suşlardan elde ettikleri değerlerden daha yüksektir. Alzahrani ve Gherbawy (2011), Suudi Arbistan'ın Al-Ahsa bölgesinde bulunan kaynak sularından

izole ettikleri *E. coli* suşlarında antibiyotik direncini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre suşların; ampisilin'e % 76.9, streptomisin'e % 65.4, kloramfenikol'e % 53.8 ve tetrasiklin'e % 50 oranında dirençli oldukları saptanmıştır. Çalışmamızda su izolatlarında görülen AM direnci % 97.67, TE direnci % 4.66 olarak belirlenmiş olup C'ye karşı suşların tamamı duyarlı olarak belirlenmiştir. Sonuçlarımıza göre AM direnci kuyu sularından izole edilen suşlarda, kaynak sularından izole edilen suşlara göre daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Buna rağmen TE direncinin, araştırmacıların sonuçlarıyla kıyaslandığında daha düşük olduğu görülmüştür. Bir başka çalışmada Sayah ve ark. (2005), Michigan şehrinde evcil hayvanlar, çiftlik çevresi, yabani hayvanlar, insan dışkıları ve yüzey sularından izole ettikleri *E. coli* suşlarında antimikrobiyal direnç profillerini araştırmışlardır. 12 antibiyotik ajan kullanılan çalışmada evcil hayvan kaynaklı suşlarda görülen antibiyotik direncin; insan, yabani hayvanlar ve yüzey sularında görülenlerden daha fazla olduğu belirlenmiştir. En fazla direnç gösterilen ajanlar tetrasiklin, sefalotin, sülfisoksazol ve streptomisin olarak bildirilmiştir. Yüzey sularında ise sadece sefalotin'e karşı % 80.6 oranında yüksek bir direnç belirlenmiştir. Sulardan elde edilen bu direnç oranı, kuyu suyu izolatlarından elde ettiğimiz % 4.66'lık sefalotin oranından çok daha fazladır. Araştırmacılar su örneklerinde ampisilin direncine rastlamazken çalışmamızda bu oran % 97.67 ile çok yüksek bir düzeydedir. Klinik suşlarımızda ise sefalotin direnci % 89.36, tetrasiklin direnci ise % 80.85 oranlarında olup, yazarların belirttiği değerlere yakın olarak görülmüştür. Gıda izolatlarında ise sefalotin'e direnç % 14.5 oranındadır. Wose Kinge ve ark. (2010), Güney Afrika'nın Mmabatho şehrindeki, baraj, atık su arıtma tesisi ve bölgedeki evlerden toplanan su örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarında; eritromisin, tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol ve norfloksasin'e karşı yaklaşık % 70 oranında direnç tespit etmişlerdir. Araştırıcılar test edilen suşların tamamının, tetrasiklin'e % 5-95, ampisilin'e % 10-80, kloramfenikol'e % 5-80, eritromisin'e % 50-80 gibi değişen oranlarda direnç gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre ampisilin'e direnç oranı araştırıcıların bulduğu değerden yüksek, tetrasiklin'e direnç oranı ise yazarların belirlediği en alt değerle uyumludur. Kloramfenikol'e karşı ise, su izolatlarının tamamı duyarlıdır. Türkiye'nin kıyı kesimlerindeki bazı çeşme ve kaynak sularından izole edilen *E. coli* suşlarında antibiyotik direncinin yaygın olarak ampisilin'e karşı % 47 oranında; bunu takiben % 19.6 oranında trimetoprim-sülfometaksazol'e, % 17.9 oranında amikasin'e, % 15.3 oranında netilmisin'e, % 13.6 oranında gentamisin'e, % 12.8 oranında tetrasiklin'e ve %

2.5 oranında kloramfenikol'e karşı dirençli oldukları belirtilmiştir (Ozgumus ve ark., 2007). Araştırmacılar çeşme ve kaynak suları arasında direnç yönünden önemli bir fark tespit etmemişlerdir. Bu verilere göre; kuyu suyu izolatlarında, kaynak suyu ve çeşme suyu izolatlarından daha fazla ampisilin direnci olduğu ve belirtilen diğer antibiyotiklere karşı kuyu suyu izolatlarının diğerlerinden daha duyarlı olduğu söylenebilir. Gana'da pet şişelerde satılan sularda yapılan bir araştırmada, *E. coli*'nin de içlerinde bulunduğu dokuz farklı bakteri su örneklerinden izole edilmiş; bazı suşların 4-7 arasında antibiyotiğe karşı dirençli oldukları ve % 50-87.5 oranında dirence sahip oldukları belirlenmiştir. Suşlar arasında en fazla direnç % 100 oranında ampisilin, flukloksasilin ve penisilin'e karşı gözlenmiş olup; gentamisin'e karşı duyarlı bulunmuşlardır. % 93.3 oranında eritromisin ve sefuroksim'e; % 20 oranında tetrasiklin'e dirençli oldukları görülmüştür (Tagoe ve ark., 2011). Ampisilin'e direnç oranları ve gentamisin'e duyarlılık bakımından araştırmacıların sonuçları ve kuyu suyu izolatlarından elde ettiğimiz sonuçlar uyum göstermektedir. Akure şehrinde bulunan kuyu sularında yapılan bir araştırmada, izolatların farklı antibiyotik duyarlılık profili gösterdiği bildirilmiştir (Oyetayo ve ark., 2007). Elde edilen bulgulara göre izolatların nitrofurantoin ve ampisilin'e karşı dirençli oldukları; norfloksasin, siprofloksasin, gentamisin'e karşı % 100, kloramfenikol'e karşı % 85.7, augumentin'e karşı % 28.5 ve sefuroksim'e karşı ise % 14.2 oranında duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Çalışmamızda, kuyu suyu izolatlarında belirlenen duyarlılık ve direnç oranları, araştırmacıların elde ettiği sonuçlarla büyük oranda uyum göstermektedir. Kloramfenikol'e duyarlılık % 100, amoksisilin/klavulanik asit'e duyarlılık % 95.3 ve sefuroksim'e duyarlılık ise % 93.03 olarak tarafımızdan belirlenmiş olup; izolatlarımızın araştırmacıların suşlarından daha duyarlı olduğu söylenebilir. Patoli ve ark. (2008), Hindistan'ın Hyderabad şehrindeki içme sularından izole edilen *E. coli* suşlarında belirlenen en yüksek direnç oranlarını: nalidiksik asit'e karşı % 92.6, ampisilin'e karşı % 88.8, seftriakson'a karşı % 40.7, siprofloksasin'e karşı % 37.0, seftazidim'e karşı % 25.2, sefotaksim'e ve gentamisin'e karşı % 18.5 olarak tespit etmişlerdir. Ampisilin hariç, genel olarak izolatlarımız araştırıcıların kullandığı antibiyotiklere karşı daha duyarlı olarak tespit edilmiştir.

Gıdalardan izole edilen suşların antibiyogram sonuçlarına bakıldığında; en yüksek direnç % 77.5 (31 suş) oranında ampisilin'e, ikinci sırada % 30 (12 suş) oranında tikarsilin/klavulanik asit'e, üçüncü sırada % 22.5 (9 suş) oranında tetrasiklin'e ve dördüncü sırada % 14.5 (6 suş) oranında sefalotin'e karşı belirlenmiştir. Suşlar arasında

14 farklı direnç profili tespit edilmiştir. Çizelge 4.4'de görülen ÇAD indeksleri değerlendirildiğinde; sekiz suşun (DSG 39, 8, 16, 37, 15, 4, 38 ve 3) 0.2'den daha büyük bir indeks değeri gösterdiği, DSG 3 no'lu suşun 0.47'lik bir değer ile en yüksek ÇAD değerine sahip olduğu ve yedi farklı antibiyotiğe direnç gösterdiği saptanmıştır. Bu verilere dayanarak sekiz suşun, direnç gösterdikleri antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı bölgelerden izole edildikleri kanaatine varılmıştır. Gıda suşlarının, su suşlarına göre daha fazla direnç profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Lei ve ark. (2010) bazı hayvansal gıda ürünleri üzerinde yaptıkları çalışmada, izole edilen *E. coli* suşlarının % 86.5 oranında TE'ye, % 64 oranında AM'e, % 47.8 oranında kloramfenikol'e (C) dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda gıda izolatlarında görülen AM direnci araştırıcıların elde ettiği orandan yüksek; TE direnci ise çok daha düşük olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). C'ye karşı direnç ise % 10 oranıyla yazarların değerlerinden oldukça düşük olduğu görülmektedir. Aslam ve Service (2006), ticari et paketleme tesislerinde hayvanların cildinden, yıkanmış karkaslardan, taşıyıcı cihazlardan, et parçalarından ve kıymalardan izole edilen *E. coli*'lerde sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle 15 antimikrobiyale karşı direnç durumlarını araştırmışlardır. İzolatların % 56'sı 15 antimikrobiyal ajana karşı duyarlı olarak bulunurken; tetrasiklin, ampisilin ve streptomisin'e karşı direnç oranları sırasıyla % 38, % 9 ve % 6 olarak saptanmıştır. Paketleme tesisinin hemen hemen her kesiminde antimikrobiyal direnç yaygın olarak belirlenmiş; en fazla oran taşıyıcı cihaz, kıyma ve et parçalarından alınan örneklerde tespit edilmiştir. Çalışmamızda gıda izolatlarında görülen AM direnci, araştırıcıların bulduğu oranlardan daha yüksek, TE direnci ise % 22.5 ile daha düşük olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca araştırıcılar RAPD yöntemiyle bu suşların genetik çeşitliliğini incelemişler ve dirençli *E. coli*'lerin büyük kısmının farklı profiller ortaya koyduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda; PFGE yöntemiyle gıda suşlarında çok sayıda pulsotip elde edilmiş olup, araştırmacıların bulgularına benzer sonuçlar tarafımızdan da gözlenmiştir. Senkel ve ark. (2003), elma sularından meydana gelen kontaminasyonu araştırmak üzere elma suyu, taze elma, elma püresi ve bazı ekipmanlardan izole ettikleri *E. coli*'lerin, 17 farklı antimikrobiyal ajana karşı antibiyotik duyarlılıklarını araştırmışlardır. İzolatların % 19'u en az bir antibiyotiğe dirençli bulunmuş; bu izolatların % 64'ü tetrasiklin'e, % 57'si streptomisin'e karşı dirençli olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, gıda izolatlarının % 80'i en az bir antibiyotiğe direnç göstermiştir. En fazla direnç ampisilin'e karşı belirlenmiştir. Araştırmacıların belirlediği tetrasiklin direnç oranı, bulgularımızdaki orandan daha

yüksek olarak gözlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar izolatlara PFGE metodu ile klonal ilişki analizi de uygulamış; 64 farklı profil gözlemişlerdir. Süreç başında alınan elma örnekleri ile süreç sonrası alınan elma suyu örneklerdeki suşların yakın ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. Çalışmamızda ise gıda izolatlarının yüksek heterojenite ve düşük benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Ticari olarak satılan yumurtalardan izole edilen *E. coli*'lerde antibiyotik direnç oranları en fazla % 42.9 oranında ampisilin'e, ikinci sırada % 40 oranında tetrasiklin'e, üçüncü sırada ise amoksisilin'e karşı belirlenmiştir (Arathy ve ark., 2011). İran'da geleneksel peynir, dondurma ve yoğurt örneklerinden izole edilen *E. coli* O157 serotipleri üzerinde yapılan antibiyogram çalışmasında, izole edilen suşlarda belirlenen en yüksek direnç oranları % 44.4 ile ampisilin ve gentamisin'e, % 33.3 ile eritromisin'e, % 11.1 ile amoksisilin ve tetrasiklin'e karşı belirlenmiştir. Suşların kloramfenikol, sefuroksim ve streptomisin'e karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Rahimi ve ark., 2011). Dondurmalarda yapılan bir diğer çalışmada Nabi ve ark. (2011), geleneksel dondurmalardan izole ettikleri *E. coli* izolatlarında antibiyotik direncini araştırmışlar ve amoksisilin ve amoksiklav'a karşı direnç oranını % 100 olarak belirlemişlerdir. İkinci sırada eritromisin'e karşı direnç oranını % 99.2 olarak tespit etmişlerdir. Ev yapımı beyaz peynirlerden izole edilen *E. coli*'lerde ampisilin'e karşı direnç % 28.3, sefuroksim'e karşı direnç % 8.5 olarak belirlenmiş; izolatların kullanılan diğer antibiyotiklere genel olarak duyarlı oldukları belirlenmiştir (Arslan ve Özdemir, 2008). İki farklı süt ürününde yapılan araştırmada Farzana ve ark. (2009), içlerinde *E. coli*'nin de bulunduğu bakteri grubunda yapılan antibiyogram çalışmasında, üriksin, kloramfenikol ve ampisilin'e karşı % 100 direnç belirlemişlerdir. Amikin, amoksil, seftran ve augumentin'e karşı duyarlılık % 100 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre gıda izolatlarında en yüksek direnç ampisilin'e (% 77.5) karşı belirlenmiş ve kloramfenikol'e karşı % 10 direnç gözlenmiştir. Amoksisilin/klavulanik asit'e kaşı duyarlılık % 87.5 oranında tespit edilmiş ve araştırmacıların sonucuna yakın olduğu görülmüştür. Sáenz ve ark. (2001), insan ve hayvan kaynaklı *E. coli*'lerin yanı sıra, tavuk ve hindi eti örneklerinden izole edilen suşlardaki direnç durumunu araştırmışlardır. 47 izolatın; nalidiksik asite ve tetrasiklin'e % 53, ampisilin'e % 47, amoksisilin/klavulanik asit'e % 13, gentamisin'e % 17 ve siprofloksasin'e % 13 oranında dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre, çeşitli gıdalardan izole edilen *E. coli* suşlarının ampisilin direnci araştırmacıların bulgularından daha fazla; tetrasiklin, gentamisin, amoksisilin/klavulanik asit' e olan

dirençleri daha az ve siprofloksasin'e karşı olan dirençleri araştırmacıların sonuçlarıyla benzer orandadır. Ticari olarak satılan balık ve deniz ürünlerinden izole edilen *E. coli*'lerde belirlenen antibiyotik direnç oranları tetrasiklin'e karşı % 30.7, streptomisin'e karşı % 12.8, sefalotin'e karşı % 11.7, ampisilin'e karşı % 6.7, tikarsilin'e karşı % 6.1 olarak bildirilmiştir (Ryu ve ark., 2012). Araştırmacıların elde ettiği sonuçlar bulgularımızla kıyaslandığında, gıda izolatlarımızdaki ampisilin direncinin yüksek, tetrasiklin ve sefalotin direncinin ise yakın olduğu görülmüştür.

Klinik kaynaklardan izole edilen suşların, beklenildiği gibi önceki iki gruptan daha fazla direnç oranlarına ve ÇAD indeksine sahip oldukları görülmüştür. Ampisilin'e karşı % 100 (47 suş), ikinci sırada tikarsilin/klavulanik asit'e ve sefalotin'e % 89.36 (42'şer suş), üçüncü sırada sefuroksim'e % 87.24 (41 suş) ve dördüncü sırada tetrasiklin'e ve sefotaksim'e % 80.85 (38 suş) oranında direnç belirlenmiştir (Çizelge 4.5). 43 suşun ÇAD indeks değerleri 0.2'den büyük olarak bulunmuş, dolayısı ile direnç gösterdikleri bu antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı bölgelerden geldikleri tespit edilmiştir. Klinik suşların, çoğunluğu idrar yolu infeksiyonlarından, vajinal akıntı, boğaz infeksiyonu, kan gibi çeşitli numunelerden izole edilmiştir. Suşlar arasında birbirinden farklı 36 direnç profili saptanmıştır (Çizelge 4.6). Bir suş (DSK 36) haricinde geri kalan suşlarda çoklu antibiyotik direnci gözlenmiştir. Elde edilen direnç oranları benzer çalışmalarla kıyaslanmıştır. Avrupa ve Kanada'da yapılan ECO-SENS çalışmasında, toplum kaynaklı komplike olmayan üriner sistem infeksiyonlarında patojenlerin prevalansı ve antibiyotik duyarlılıkları araştırılmış, buna göre *E. coli*'deki direnç oranları en sık ampisilin (% 30) ve sülfonamidler (% 29), takiben trimetoprim (% 15), trimetoprim-sülfometaksozol'e (% 14) ve nalidiksik asit'e (% 5) olarak bulunurken, amoksisilin/klavulanik asit'e, nitrofurantoin, fosfomisin, gentamisin ve siprofloksasin'e direnç % 3 olarak belirlenmiştir (Kahlmeter, 2003). Taşbakan ve ark. (2004), üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *E. coli'*lerde antibiyotiklere karşı direnç oranlarını trimetoprim-sülfometaksozol'e % 43, siprofloksasin % 39, levofloksasin % 38, amoksisilin/klavulanik asit % 11, gentamisin % 10, sefuroksim % 8 ve amikasin % 7 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen direnç oranları araştırmacıların bulgularından daha yüksek olarak saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Alós ve ark. (2005) İspanya'da yaptıkları çalışmada; üriner sistem infeksiyonlarından elde edilen 164 *E. coli*'nin % 57.3'ü ampisilin, % 25'i trimetoprim-sülfometaksozol'e, % 20.1'i nalidiksik asit, % 14'ü norfloksasin ve siprofloksasin'e dirençli bulunurken, nitrofurantoin ve fosfomisin direncini % 0 bulmuşlardır. Kaya ve

ark. (2006), dört yıl süre içerisinde (2000-2003) idrar yolları infeksiyonlarından izole ettikleri *E. coli* suşlarının, çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranlarının yıllara göre dağılımını belirlemişlerdir. *E. coli* suşlarının en fazla dirençli oldukları antibiyotiğin ampisilin olduğu görülmüştür. Dört yıl içerisinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmasa da direnç oranlarının % 50.5-66.4 arasında değiştiği bildirilmiştir. Dört yıl içerisinde sefuroksim direncinin % 9.6-32.1, seftazidim ve sefotaksim direncinin % 1-25, gentamisin direncinin % 4-16, siprofloksasin direncinin % 10-35 arasında değiştiği bildirilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre klinik suşlardaki direnç oranları; AM % 100, CXM % 87.2, CAZ % 38.2, CTX % 80.8, CN % 55.2, CIP % 57.4 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre 2011 yılına kadar geçen süreç içerisinde, klinik *E. coli* izolatlarının antimikrobiyallere karşı direnç oranlarında fazlaca bir artış olduğu söylenebilir. Nazir (2007), ishal durumu görülen bebeklerden izole edilen *E. coli* suşlarındaki ampisilin ve tetrasiklin direncini % 100, siprofloksasin ve kloksasilin direncini % 60 olarak bildirmiştir. Ampisilin ve siprofloksasin direnç oranları, elde ettiğimiz sonuçlarla birebir uyuşmaktadır. Tetrasiklin direnci ise klinik suşlarımızda daha yüksek orandadır. Bean ve ark. (2008), Londra'da nozokomiyal ve toplum kökenli idrar yolu infeksiyonlarından elde edilen *E. coli* suşlarında antimikrobiyal direncini araştırmışlardır. Nitrofurantoin'in % 93.7 duyarlılık oranıyla en etkili ajan olduğu belirlenmiştir. Toplum ve nozokomiyal kökenli izolatlara göre direnç dağılımları; ampisilin'e karşı % 53.9 ve % 65, amoksisilin/klavulanik asit'e karşı % 12 ve % 26.8, siprofloksasin'e karşı % 9.3 ve % 32.9, gentamisin'e karşı % 4.6 ve % 19.4 olarak tespit edilmiş ve nozokomiyal kökenli izolatların diğer gruptan daha dirençli oldukları görülmüştür. Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre ampisilin'e % 100, amoksisilin/klavulanik asit'e % 46.8, siprofloksasin'e % 57.4, gentamisin'e % 55.3 oranında direnç belirlenmiştir. Bulgularımıza göre, çeşitli klinik kaynaklardan izole edilen suşların, araştırmacıların her iki kaynaktan izole ettikleri suşlara göre daha fazla dirençli olduğu görülmüştür. Albayrak ve Kaya (2009); idrar, kan, yara yeri ve balgam gibi klinik örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarında, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) aktivitesi ve antibiyotik direnç oranlarını tespit etmişlerdir. Özellikle GSBL (+) suşlarda antibiyotik dirençlerinin diğer üretmeyen suşlardan daha fazla olduğu görülmüştür. Ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefalotin, sefazolin, sefuroksim, seftriakson'a direnç % 100 olarak belirlenmiştir. Suşların AM'e, CXM'e ve KF'ye direnç oranları bulgularımızla uyuşmaktadır. AMC direnç oranının ise bulgularımızdan daha yüksek bir değerde olduğu gözlenmiştir. Seftazidim'e direnç %

28.7, siprofloksasin'e % 35.6, gentamisin'e % 45.2 olarak gözlenmiş olup, bulgularımızın bu oranlardan daha yüksek olduğu söylenebilir. Cho ve ark. (2011); sağlıklı ve gönüllü bireylerden ve ishal vakası görülen hastalardan izole edilen *E. coli* suşlarında antibiyotik direncini araştırmışlardır. Ampisilin'e % 77, tetrasiklin'e % 66, gentamisin'e % 29.2 oranında direnç tespit etmişlerdir. Deveci ve ark. (2011), üç aylık süreç içerisinde idrar yollarından izole edilen *E. coli* suşlarında antibiyotik direnç oranlarını; siprofloksasin'e % 33.3, imipenem'e % 49.1, piperasilin/tazobaktam'a % 36.8, seftazidim'e % 45.6 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar suşların tamamının fosfomisin'e duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, büyük çoğunluğu idrar yolu infeksiyonları olmak üzere, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarında görülen antibiyotik direnç oranları, araştırmacıların elde ettiği sonuçlardan daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda su, gıda ve klinik kaynaklardan izole edilen toplam 130 suşun tamamı genel olarak değerlendirildiğinde; ilk dört sırayı alan antibiyotikler ve bunlara karşı belirlenen direnç oranları: AM % 92.3, TIM % 44.6, KF % 38.4, TE % 37.7 olarak gözlenmiştir (Şekil 4.4). Gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, beklenildiği gibi en yüksek direnç oranları klinik izolatlarda görülmüştür.

Enterobacteriaceae üyesi bakterilerde ampisilin direncine; TEM-1, SHV-1 gibi, hidrolitik olarak beta laktam halkasını parçalayan beta laktamaz grubu enzimler neden olmaktadır. Beta laktamazların plazmit tarafından kodlanan ve gelişmiş spektrumda katalitik aktivite gösterdiği 1980'lerden bu yana bilinmektedir. Çok sayıda GSBL-TEM, GSBL-SHV çeşitlerine ilaveten plazmit tarafından kodlandığı bilinen CTX-M gibi enzimler de bildirilmiştir (Cho ve ark., 2011). Ampisilin'e afinitesi olan bu enzimin *E. coli* suşlarında yüksek oranda sentezine bağlı olarak tüm yıllarda yüksek direnç oranları görülmektedir. Literatürdeki benzer çalışmalarda, ampisilin direncinin bölgeden bölgeye değişkenlik gösterse de genellikle yüksek oranlarda olduğu görülmektedir (Kaya ve ark., 2006). Kaynakları farklı olmasına rağmen suşlarımızda, bu antibiyotiğe karşı direncin yüksek olması literatürü destekler niteliktedir. Tetrasiklin direnci; dışarı atılma, ribozomal korunum, enzimatik inaktivasyon ve hedef modifikasyonu gibi mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Cho ve ark., 2011). Suşlarımızdaki tetrasiklin direncinin yüksek oluşu, bu antibiyotiğe karşı direnç mekanizmaları geliştiren suşların arttığının ve yayıldığının açık bir göstergesidir. Çalışmamızda, beta laktamaz inhibitörü olan tikarsilin/klavulanik asit'e karşı direncin, farklı gruplar arasında yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumdan yola çıkarak; beta laktamaz enzimlerin sentezindeki artışın

çevresel suşlarda da yaygınlaştığı söylenebilir. Bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği bu direnç, evrimin ve bakteri genetiğinin bir sonucudur. Direncin gelişimindeki ana sebep ise bilinçsiz bir şekilde antibiyotik kullanımıdır (Kaya ve ark., 2006). Mikroorganizmaların mevcut antibiyotiklere karşı hızlı bir şekilde direnç geliştirdiği göz önüne alınırsa, gelecekte infeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklerin yetersiz kalacağı açıktır. Giderek artan direnç oranları nedeniyle hastalara duyarlılık testi yapılmadan tedaviye başlanmamalı ve bu yolla tedavinin başarısız olmasına ve direnç gelişiminin artmasına engel olunmalıdır. Belirli aralıklarla hem klinik hem de çevresel suşlarda, artan antibiyotik direncinin takibinin yapılmasının faydalı ve gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Plazmit profilleri değerlendirildiğinde, su izolatlarının % 44.18'inde plazmite rastlanmıştır. Su grubu içerisinde birbirinden farklı dört plazmit profili belirlenmiştir. Tespit edilen plazmit büyüklüklerinin, 78.2 kb ile 2.6 kb arasında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.8). Suşların antibiyotik direnç ve plazmit profilleri kıyaslandığında; herhangi bir plazmit taşıyan ya da taşımayan 36 suşun tamamında AM' direnci gözlenmiştir. DSS 22 no'lu suş AM ve TE direnci göstermesine rağmen, herhangi bir plazmit taşımamaktadır. Aynı durum AM, AMC, KF direnci gösteren DSS 11; AM, TIM, CAZ, CXM direnci gösteren DSS 41, 42 ve 43; AM, TIM, AMC, KF, TE direnci gösteren DSS 39 no'lu suşlarda da gözlenmiştir. Bu durumda, izolatlarda görülen direncin kromozomal bir direnç olduğu düşünülebilir. Sulardan izole edilen *E. coli* suşlarında, antibiyotik dirençleri ve taşıdıkları plazmit ya da plazmitler arasında herhangi bir ilişki olmadığı söylenebilir. Suşların taşıdığı bazı plazmitler gıda suşları; bazıları ise klinik suşlar ile ortaktır (Çizelge 4.8). Buna göre; 2.6, 3.2, 4.4 kb'lık plazmitler gıda; 2.9, 3.8, 5.2, 8.3 kb'lık plazmitler ise klinik suşlar ile ortaktır. Ash ve ark. (2002), Amerika'daki nehirlerden izole edilen Gram (-) bakterilerde; ampisilin direncinin oldukça yüksek oranda olduğunu, aynı zamanda siprofloksasin, tetrasiklin, kloramfenikol ve kanamisin'e de direnç tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu direncin plazmit kaynaklı olduğunu belirlemişlerdir. Doğada, antibiyotiklere kendiliğinden dirençli bazı mikroorganizmalar bulunabilmektedir. Böyle mikroorganizmalar, toprak ve sudaki bazı mikroorganizmalardan ilave direnç genleri kazanarak, bu dirence sahip olabilirler. Bu durumda bu bakteriler, çevrede bulunan ve geniş oranda dirence sahip bakterilerin kaynağı haline gelebilirler (Ash ve ark., 2002). Araştırmacılar bu görüşe dayanarak direncin nehir ekosistemlerinde arttığını ve bunun plazmit vasıtasıyla hız kazandığını vurgulamışlardır. Kuyu sularındaki suşlarda çoklu antibiyotik direncinin

düşük çıkması ve plazmitlerin bu dirençle ilişkisinin olmaması; bu bölgelerde dirençli bakteri kaynaklarının, kuyu sularına henüz az miktarda sızdığını düşündürebilir. Nazir ve ark. (2005); nehir, musluk, gölet ve tahliye kanallarından alınan su örneklerinden *E. coli* suşlarını izole etmişler ve bu suşlara karşı en etkili antibiyotiği bulmak için antibiyogram çalışması yapmışlardır. Ayrıca araştırmacılar, suşların taşıdıkları plazmitleri ve bunların antibiyotik direnç ile olan ilişkilerini de belirlemişlerdir. Suşlarda görülen direnç oranları; penisilin G'ye % 94.4, amoksisilin'e % 50 ve ampisilin'e % 22.2 olarak belirlenmiştir. Duyarlılık oranları ise siprofloksasin'e % 88.8, norfloksasin'e % 83.3, gentamisin'e % 77.7, kloramfenikol'e % 72.2, tetrasiklin'e % 61.1 olarak tespit edilmiştir. Suşların 18'inde plazmite rastlanmış ve farklı kombinasyonlar oluşturan ve birbirinden farklı toplam 11 plazmit gözlenmiştir. Plazmitlerin büyüklüklerinin 2.4 kb ile 40.0 kb arasında değiştiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, elde ettikleri direnç profilleri ve plazmit profilleri arasında, kayda değer hiçbir karşılıklı ilişki olmadığını vurgulamışlardır. Çalışmamızda, su izolatlarında 19 farklı plazmit bandı belirlenmiştir ve plazmitlerin direnç profilleriyle ilişkisi tespit edilmemiştir. Elde edilen sonuçlar Nazir ve ark. (2005)'nın sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Sonuçlarımızda da benzer şekilde rastgele plazmit dağılımı gözlenmiştir. Alam ve ark. (2010) çalışmalarında nehir, gölet, musluk, tahliye, şişe ve kuyu suyu, piliç eti, kek ve bisküvi, insan ve hayvan dışkılarından izole ettikleri 78 *E. coli* suşunun antibiyotik direnç ve plazmit profillerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar suşların çoğunun ampisilin, siprofloksasin, streptomisin ve tetrasiklin'e dirençli olduğunu gözlemiştir. 54 suşta toplam 24 farklı plazmit bandı tespit edilmiş ve bu plazmitlerin boyutlarının 0.5-40 kb arasında değiştiği bildirilmiştir. Sulardan izole edilen dört suşta 38, 33.5, 3, 2, 1.9, 0.5 kb boyutunda plazmitler tespit edilmiştir. Direnç profilleri ve plazmit boyutu, sayısı ve profilleri arasında herhangi bir ilişki olmadığı; plazmitlerin suşlar arasında rastgele dağılım gösterdiği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda, araştırmacıların tespit ettiği sayıdan daha fazla plazmit bandı belirlenmiş ve rastgele dağılım gösterdikleri gözlenmiştir. Elde edilen bulgular ile araştırmacıların sonuçları birbirini desteklemektedir. Chigor ve ark. (2010), yüzey suları ve insan dışkı örneklerinden izole ettikleri 184 *E. coli* suşunda, plazmit ve direnç profillerini belirlemişler; suşların % 42.9'unun dört ve daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. 22 suşta plazmit belirlenmiş olup çoklu antibiyotik direncinin plazmit vasıtasıyla meydana geldiğini; plazmitlerin su ve klinik izolatlarında yaygın olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda plazmitlerin, kuyu suyu örneklerinde belirlenmesine

rağmen suşların gösterdiği direnç profillerinden sorumlu olmadıkları kanaatine varılmıştır.

Gıda izolatlarının 18'inin (% 45) plazmit taşıdığı tespit edilmiştir. Suşlar arasında yedi farklı plazmit profili belirlenmiş olup, birbirinden farklı toplam 31 plazmit bandı saptanmıştır (Çizelge 4.7, Çizelge 4.9). Plazmit boyutlarının 64.4 kb ile 1 kb arasında değiştiği tespit edilmiştir. Direnç ve plazmit profillerinin aralarındaki ilişkiye bakıldığında; sadece AM'e direnç gösteren 15 suş içerisinde DSG 21, 22, 25, 31, 32 ve 36 no'lu suşların değişen sayılarda ve büyüklüklerde plazmit taşıdıkları gözlenmiştir. AM, TIM, CN direnç profili gösteren DSG 40; AM, TIM, TE direnç profili gösteren DSG 30; AM, TIM, CIP, C direnç profili gösteren DSG 39; beş ve üzeri antibiyotiğe direnç gösteren DSG 3, 4, 38 no'lu suşlarda değişen sayılarda plazmit bantları belirlenmiştir. Direnç profili oluşturan ve belirtilen suşların dışında kalan diğer suşlarda herhangi bir plazmit bandına rastlanmamıştır. Tıpkı su izolatlarında olduğu gibi gıda izolatlarında da, plazmit ve direnç profilleri arasında karşılıklı bir ilişki olmadığı, belirlenen dirençlerin plazmitlere bağlı olmayıp kromozomal olduğu söylenebilir. Farklı bir görüş olarak; direnç gösteren fakat plazmit taşımayan suşlar için, plazmitlerinin kromozomla bütünleşerek epizom durumuna geçtiği de düşünülebilir. Fakat ispatı yapılamadığı sürece bu durum görüşten öteye geçememektedir. Direncin kromozomal ya da plazmite bağlı olup olmadığını belirlemenin en iyi yolu, konjugasyon deneyidir. Çalışmamızda böyle bir deney yapılmadığı için, direncin kromozoma bağlı olması durumu sadece tarafımızdan bir görüş olarak ortaya atılmıştır. Alam ve ark. (2010), gıda ürünlerinden izole edilen *E. coli*'lerde, tespit ettiğimizden daha az sayıda plazmit bandı belirlemiş olup, bunların direnç profilleriyle bir ilgisinin olmadığını vurgulamıştır. Bu durumda, her iki araştırmadan elde edilen sonuçlar birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Teophilo ve ark. (2002), karides ve balıklardan izole edilen *E. coli* suşlarının toksisitesini ve plazmit içeriğini belirlemişlerdir. Toksisite için serogrup tayini yapılmıştır. Antibiyogram sonuçlarına göre sadece dört suş dirençli bulunmuş; karides izolatı iki suş ampisilin, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfometaksozol'e; balıklardan izole iki suş ise tetrasiklin ve nitrofurantoin'e direnç göstermiştir. Dirençli suşlardan sadece balıktan izole iki suşun plazmit içerdiği; diğer dirençli suşlarda ise plazmite rastlanmadığı bildirilmiştir. Bu durumda direnç profilleri ve plazmitleri arasında herhangi bir ilişki görülememiştir. Bu sonuçlar, bulgularımızla uyumlu olarak görülmüştür. Etlerden izole edilen *E. coli* suşlarında yapılan araştırmada, ampisilin ve kloramfenikol'e suşların tamamı dirençli bulunmuş; nitrofurantoin'e % 90, tetrasiklin'e

% 78 ve sefuroksim'e % 73 oranında direnç tespit edilmiştir. Plazmit profilleme sonucunda, 23.1 ve 4.3 kb'lık plazmitlerin dört antibiyotiğe direnç gösteren profillerde bulunduğu bildirilmiştir (Umolu ve ark. 2006). Akter ve ark. (2011), marketlerde satılan taze sebzelerden izole edilen ve içlerinde *E. coli*'nin de bulunduğu mikroorganizma grubunda antibiyotik direnç ve plazmit profillerini araştırmışlardır. İzolatların çoğu, ampisilin ve oksitetrasiklin'e karşı dirençli bulunmuş; izolatlardan beşinin plazmit içerdiği bildirilmiştir. Belirlenen plazmitlerin antibiyotik direnci ile bağlantısının olup olmadığını doğrulamak için, profillemede belirlenen plazmitlerden bazıları jelden tekrar izole edilmiş ve transformasyon deneyi yapılmıştır. Deney sonucunda amoksisilin direncinin plazmit vasıtasıyla gerçekleştiği, sefiksim ve siprofloksasin direncinin plazmit ile herhangi bir bağlantısı olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda plazmitler ile antibiyotik profiller arasında herhangi bağlantı görülmemiştir. Fakat bu durumu doğrulamak için, transformasyon ya da konjugasyon deneyi yapılmamıştır. İki parametre arasındaki bağlantıyı net bir şekilde ortaya koymak için araştırmacıların yaptığı gibi plazmit ile ilgili daha ileri çalışma ve deneylere gereksinim olduğu kanaatine varılmıştır. Myaing ve ark. (2005), tavuk etlerinden izole edilen *E. coli* suşlarında sırasıyla; vankomisin, ampisilin, nalidiksik asit, trimetoprim, sefradin, tetrasiklin'e yüksek oranda direnç gözlemlemişlerdir. 12 antibiyotiğe direnç gösteren suşların % 93.8'inin, 11 antibiyotiğe direnç gösteren suşların ise % 90.5'inin plazmit içerdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar suşlarda görülen çoklu antibiyotik direncinin, organizmanın ihtiva ettiği plazmit sayısı ve içeriği ile ilişkili olabileceği görüşünü ortaya atmışlardır. Çalışmamızda ise gıda suşlarının, direnç ve plazmit profilleri arasında ilişki olmadığı belirlenmiştir. Bu görüş, çoklu antibiyotik direnci gösteren bazı suşların plazmit ihtiva etmemesine dayanarak ortaya atılmıştır. Plazmit ihtiva eden bazı suşların (DSG 1, 2, 18, 23, 29), kullanılan bütün antibiyotiklere duyarlı bulunması bu görüşü doğrular niteliktedir.

Klinik izolatların % 57.44'ünün plazmit taşıdığı belirlenmiştir. Suşların 46 (% 97.8)'sı çoklu antibiyotik direnci göstermiş ve suşlar arasında birbirinden farklı 57 plazmit bandı gözlenmiştir (Çizelge 4.10). Fazla sayıda çoklu antibiyotik direnç gösteren suş tespit edilmesine rağmen; bu durumu gösteren suşların bazılarının (DSK 34, 35, 40) plazmit taşıdığı, bazılarının ise (DSK 10, 11, 19, 20, 24, 27) plazmit taşımadığı görülmüştür. Hatta aynı direnç profilini gösteren suşların (DSK 31 ve 15), bir kısmının plazmite sahip olduğu bir kısmının ise plazmite sahip olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Aynı direnç profilini gösterip de plazmit ihtiva eden bazı

suşların ise ortak plazmitlerinin olmadığı belirlenmiştir (DSK 9, 12 ve DSK 41, 43). Bu durum plazmitlerin suşlar arasında rastgele dağılım gösterdiği ve meydana gelen direncin plazmit sayısı ve büyüklüğüyle bir ilgisi olmadığı görüşünü ortaya çıkarmıştır. Suşlarda görülen çoklu antibiyotik direncinin, kromozomal bir direnç olması durumu yüksek bir ihtimaldir. Karbasizaed ve ark. (2003), nozokomiyal infeksiyonlardan ve sağlıklı insan dışkısından izole edilen *E. coli* suşlarında, ağır metal ve antibiyotiklere karşı direnci belirlemiş ve plazmit profillerini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, suşların % 72'sinde çoklu antibiyotik direnci tespit etmiş; antibiyotiklere karşı elde edilen direnç oranlarını ampisilin % 100, trimetoprim-sülfometaksozol % 73.3, tetrasiklin % 53.3, kloramfenikol % 46.6, kanamisin % 20, gentamisin % 13.3, siprofloksasin % 20 olarak belirlemişlerdir. 25 suşta plazmit belirlenmiş; bunlardan 13'ünün aktarılabilen R plazmiti olduğu tespit edilmiştir. Nozokomiyal 8 suşun ise ağır metallere ve antibiyotiklere direnci kodlayan konjugatif plazmit ihtiva ettiği bildirilmiştir. Buna rağmen antibiyotik direnç ve plazmit profilleri arasında tutarlı bir ilişki olmadığını saptamışlardır. Çalışmamızda; klinik kaynaklı suşların direnç ve plazmit profilleri arasında tutarlı bir ilişki olmadığı ortaya konmuştur. Araştırmacıların bulguları ile sonuçlarımız birbirini desteklemektedir. Fei ve ark. (2003), bebeklerde ishale neden olan enteropatojenik *E. coli* (EPEC) suşlarında, çoklu antibiyotik direnç oranlarını ve plazmit profillerini araştırmışlardır. Suşların 22'sinde 1.0-30.9 mDa (mega dalton) aralığında bir ve daha fazla plazmit tespit etmişlerdir. Antibiyotik direnç fenotipinin aktarıldığını gösteren konjugasyon deneyi yapılmadığı için, antibiyotik direnç profili ve plazmitler arasında kesin bir ilişkiden bahsedilemeyeceğini; bu durumda plazmit ve antibiyotik direnç profili arasında doğrudan bir bağlantı olmadığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda çoklu antibiyotik direncin plazmit ya da transpozonlar olmadan da meydana gelebileceğini vurgulamışlardır. Çalışmamızda, plazmit taşımamasına rağmen 10, 11, 12 antibiyotiğe direnç gösteren suşların varlığı bu görüşü desteklemektedir. Aynı durum Teophilo ve ark. (2002) tarafından da belirlenmiştir. Celebi ve ark. (2007), idrar yolları infeksiyonlarına neden olan *E. coli*'lerde direnç ve plazmit profilini belirlemişler; en fazla direnç ampisilin'e, ardından amoksisilin/klavulanik asit'e, trimetoprim-sülfometaksozol'e, gentamisin'e ve siprofloksasin'e karşı belirlenmiştir. Araştırmacılar, çoklu antibiyotik direnci gösteren suşların bazılarının plazmit içermediğini, izole edilen suşların bazılarında çoklu antibiyotik direnci ve plazmit profillerinin birbiriyle ilgisi olmadığını bildirmişlerdir. Bu durum çalışmamızdan elde edilen sonuçlarımızı desteklemektedir. Benzer bir çalışmada

Ozbakır ve ark. (2010), farklı klinik materyallerden izole edilen *E. coli* suşlarında antibiyotipleme ve plazmit profil analizi gerçekleştirmiştir. Çalışmada, en fazla antibiyotik direnci ampisilin ve siprofloksasin'e karşı gözlenmiştir. Plazmit profillerinde, tek bant profillerinin yaygın olduğunu ve antibiyotip 1 grubuna giren suşlarda ampisilin direncinden tek plazmitin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Buna rağmen ampisilin direnci haricinde, diğer direnç profilleri ile ihtiva ettikleri plazmitler arasında kayda değer bir ilişki olmadığını vurgulamışlardır. Çalışmamızda da benzer şekilde direnç ve plazmit profilleri arasında tutarlı bir ilişki görülmemiş, sonuçlarımız araştırmacıların bulgularıyla uyumlu bulunmuştur. Shahriar ve Khair (2011), klinik materyallerden izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç ve plazmit profilleri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. 17 farklı antibiyotiğe karşı görülen en yüksek direnç oranları sırasıyla: sefaleksin, sefradin, okzasilin, penisilin ve vankomisin'e % 100; siprofloksasin, kloksasilin ve imipenem'e % 95.4; tetrasiklin'e % 63.3 olarak belirlemişlerdir. Belirlenen plazmitler ve direnç profilleri arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Aladağ ve ark. (2009), idrar yolu infeksiyonlarından izole *Klebsiella pneumoniae* suşlarında görülen, imipenem ve meropenem direnci ile plazmit boyutlarının herhangi bağlantısı olmadığını bildirmişlerdir. Jan ve ark. (2009), üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *E. coli*'lerin % 50'sinden fazlasında çoklu antibiyotik direnci görüldüğünü; izolatların % 52.6'sının plazmit taşıdığını belirtmişlerdir. Tek plazmit taşıyanların yanı sıra birden fazla plazmit taşıyan suşlar da tespit edilmiştir. 23 kb'lık plazmit taşıyan suşların çok yüksek antibiyotik direnç gösterdiği saptanmıştır. Gakuya ve ark. (2001), farelerden izole edilen *E. coli*'lerde, plazmit taşımayan suşlarda da antibiyotik direncin belirlenmesine dayanarak, plazmitler ve antibiyotik direnç arasında çok yakın bir ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir. Buna rağmen suşların % 75'inde bulunan dirençten 90-100 mDa ve 55-65 mDa'lık plazmitlerin sorumlu olduğunu vurgulamışlardır. Bu durumu destekleyen bir başka çalışma Kariuki ve ark (1999) tarafından yapılmış olup; aynı çiftlikte yakın ilişkide bulunan tavuk ve çocuklardan izole edilen *E. coli*'lerde antibiyotik direncinden 90-100 mDa'lık plazmitlerin sorumlu olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda, büyük moleküler ağırlıklı plazmit taşıyan suşlarda çoklu antibiyotik direnç görülmesine rağmen; aynı durumun küçük plazmit taşıyan suşlarda da görülmesi, plazmit büyüklüğüne göre direncin arttığı görüşüne uymamaktadır. Bulgularımıza göre plazmitler suşlar arasında rastgele dağılmış ve dirençten sorumlu olmadıkları düşünülmüştür.

Genotip analizinden elde edilen bulgular ile plazmit profillerinden elde edilen sonuçlar kıyaslandığında; su izolatlarında yakın ilişkili olarak belirlenen suşların bazılarında ortak plazmit profili görülmüş (DSS 15, 16, 17, 18, 19), bazıları ise aynı plazmit profilini göstermesine rağmen (DSS 1 ve 8) genotipik olarak ilişkisiz izolat şeklinde belirlenmiştir. Yakın ilişkili suşlardan DSS 34 ve 35 aynı plazmit profili gösterirken, bu iki suş ile aynı plazmit profiline sahip olan DSS 36 no'lu suşun diğer iki suş ile ilişkisiz olduğu belirlenmiştir. Bu durum, klonal benzerliğe göre ortak plazmit profiline sahip olma durumunun var olabileceğini, fakat kesinlik göstermeyeceği fikrini doğurmuştur. Yani tesadüfen ortaya çıktığını düşündürebilir. Benzer bir durum gıda suşlarında gözlenmiştir. Gıda izolatlarından DSG 31 ve 32 no'lu suşlar klonal olarak yakın ilişkilidir ve aynı plazmit profiline sahiptir. Fakat DSG 39 ve 36 no'lu suşlar, diğer iki suş ile aynı plazmit profilini göstermesine rağmen klonal olarak ilişkisizdir ve diğerleriyle benzerlik göstermemektedir. Klinik suşlarda ise, klonal ilişki gösteren suşların ortak plazmit profiline sahip olmadığı gözlenmiştir.

Standart plazmit analizindeki en büyük problemlerden biri, plazmitin yapısındaki değişimlerin (linear ya da süper sarmal olması), jel elektroforezi sırasında plazmitin göç özelliklerini etkileyebilmesidir (Foley ve ark., 2009). Eğer aynı plazmitin kopyaları farklı yapıda ise, jel üzerinde çok sayıda bant görülür ve bu durum plazmit analizini zorlaştırır. Diğer taraftan suşlar; benzer molekül ağırlığına sahip birlikte göç eden ve jel üzerinde tek bant halinde görülebilen multiple plazmitler içerebilirler. Bu sistemi sınırlayan noktalardan biri de suşlardaki plazmit kaybı ile ilgilidir (Hoszowski ve Wasyl, 2001). Plazmitler bakteri suşları arasında konjugasyon ile aktarılabilir ve seçici bir baskı altında kazanılan ya da kaybedilen hareketli yapılar şeklinde rol oynayabilirler. Bu durum doğru bir plazmit analizinin yapılmasını zorlaştırmaktadır. Çalışmamızda plazmit profil analizi, genotip analizi ile uyumsuz bulunmuş ve ilişkili izolatlar arasında plazmit dağılımının rastgele olduğu ve birbiriyle bağlantı göstermediği fikri ortaya atılmıştır. Tespit edilen plazmit profillerinin doğruluğunu kontrol etmek için, yakın gelecekte ilave çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Plazmitin yapısal değişimi ve birlikte göçten kaynaklanan problemi azaltmak ve bakteri suşları arasındaki ayrımı net bir şekilde sağlamak için; plazmitler jelden tek tek izole edilerek, Hind III gibi bir restriksiyon enzimiyle kesilebilir. Bu şekilde plazmit profillemede kullanılacak restriksiyon profilleri oluşturulabilir (Nauerby ve ark., 2000). İlerleyen zamanda hedeflenen çalışmalardan bir diğeri de; konjugasyon deneylerinin yapılarak, mevcut plazmitlerin alıcı hücrelere aktarılması ve dirençten sorumlu olup

olmadıklarının belirlenmesidir. Fenotipik olarak yapılacak bu analiz sonucunda, aktarılan plazmitlerin dirençten sorumlu olması durumunda ise, bu plazmitlerin dizi analizleri yapılacaktır. Hedeflenen çalışmalarla plazmitlerin karakterlerinin net bir şekilde ortaya koyulacağı görüşündeyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Bu çalışmada; kuyu suları, market ve pazarlarda satılan bazı gıdalar ve hastane klinik örneklerinden izole ve identifiye edilen toplam 130 *E. coli* suşu'nun genetik akrabalıkları, antibiyotik dirençleri ve bulundurdukları plazmitlerin boyut ve sayısına bağlı profilleri araştırılmıştır. Genetik ilişkileri değerlendirildiğinde; üç grupta bulunan izolatların tamamen birbirlerinden farklı oldukları belirlenmiştir. Ayrıca bu izolatların kendi grupları içinde alt tip oluşturup oluşturmadığı da tespit edilmiştir. Buna göre su grupları içerisinde genetik olarak yakın ve muhtemel ilişkili toplam altı alt tip gözlenmiştir. Gıda ve klinik kaynaklı izolatlar ile karşılaştırıldığında ise genetik olarak belirli oranda benzerlik göstermelerine rağmen, bu oran yakın veya muhtemel ilişkili izolat durumu için yeterli olmamış ve ilişkisiz olarak nitelendirilmiştir. Gıda izolatları arasında da alt tipler belirlenmiş ve bu gruptaki izolatların diğer gruptaki izolatlarla genetik ilişkisinin olmadığı çok net bir şekilde ortaya koyulmuştur. En fazla genetik çeşitlilik klinik kaynaklı izolatlarda gözlenmiş ve bu grupta toplam 39 pulsotip belirlenmiştir. Tüm izolatlar değerlendirildiğinde, toplam 101 pulsotip ile izolatlar arasında çok fazla genetik çeşitlilik ve az sayıda benzerlik tespit edilmiştir. Bu durumda çevresel suşların, klinik suşlara köken olarak uzak olduğu düşünülebilir. PFGE yönteminin, çevresel ve klinik izolatlar arasındaki genetik ilişkiyi ve çeşitliliği belirlemede çok iyi bir yöntem olduğu kanaatine varılmıştır. İzolatların antibiyogram sonuçlarına bakıldığında; kullanılan antibiyotiklere karşı en fazla direnç, beklenildiği gibi klinik izolatlar tarafından gösterilmiş; bu grupta 36 farklı direnç profili belirlenmiştir. Direnç ile ilgili ikinci sırayı gıda izolatları almıştır. Su izolatlarında az sayıda direnç profili görülmesine rağmen ampisilin direnç oranının yüksek olduğu görülmüştür. Genel olarak değerlendirildiğinde ise 130 suş arasında en fazla direnç sırasıyla; ampisilin (AM), tikarsilin/klavulanik asit (TIM), sefalotin (KF) ve tetrasiklin'e karşı gösterilmiştir. Suşların tamamı meropenem (MEM)'e duyarlı bulunmuştur. Plazmit profili açısından en fazla profil sayısına (22) sahip izolatların klinik grupta olduğu gözlenmiştir. Bunu sırasıyla yedi profil ile gıda ve dört profil ile su izolatları takip etmiştir. İkili gruplar arasında aynı büyüklükte ortak plazmitler olmasına rağmen, üç grup için aynı büyüklükte ortak bir plazmite rastlanmamıştır. Dirençli bazı suşlarda plazmit olmaması ve bazı duyarlı suşların plazmit ihtiva etmesi, mevcut plazmitlerin

direnç ile ilişkisinin olmadığı ve rastgele dağılım gösterdiğini düşündürebilir. Herhangi bir aktarım deneyi yapılmadığından, mevcut direncin kromozomal kaynaklı olabileceği görüşü ağırlık kazanmıştır.

5.2. Öneriler

İnsan, hayvan ve bitki organizmaları doğada yaygın bulunan mikroorganizmalar ile her zaman sıkı bir ilişki içerisindedir. Bu ilişki nadiren hastalık şeklinde ortaya çıkabilir. Son zamanlarda artan dünya nüfusuna bağlı olarak, bazı su ve gıda kaynaklarında meydana gelen kirlenmeler bu durumu doğrudan etkilemektedir. Özellikle su ve gıda kaynakları, çeşitli kentsel ve fekal atıklar ile kontamine olduğu durumda, patojen mikroorganizmaların çevreye yayılışı kolaylaşmaktadır. Bu durumda salgın yoluyla hastalık ve hatta ölümle sonuçlanan çok ciddi problemlere neden olabilmektedirler. Yapılan araştırmalara göre bir yıl içerisinde gıda ve su kaynaklı patojen bakterilerin sebep olduğu beş milyon infeksiyon vakası bildirilmiştir (Mead ve ark., 1999). Bu vakalardan etkilenenlerin yaklaşık 46,000 kadarı hastanede tedavi görmüş, 1500'ü ise hayatını kaybetmiştir. Meydana gelen can kayıplarının yanında, infeksiyondan etkilenen kişilerde iş gücü ve çok ciddi oranda maddi kayıplar meydana gelmiştir. Bu durumda, bakteriyel kontaminasyonların birincil kaynaklarının tespiti için epidemiyolojik araştırmalar yapılmakta ve toplum sağlığının korunması ve geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Günümüzde bu tarz zararlı bakteriyel ajanların hızlı tespiti ve genetik ilişkilerini belirlemeye yönelik moleküler tiplendirme yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, PFGE yönteminin tiplendirme ve yüksek ayrım gücü göze çarpmaktadır.

Meydana gelen salgınların ve kayıpların sorumlularından biri de *E. coli*'dir. Dünyada çok fazla çalışılmasına rağmen, toksinojen ve patojenik suşlarının meydana getirdiği ciddi sorunlar nedeniyle halen epidemiyolojik çalışmalar açısından önemli bir bakteridir. Sadece toksinojen ve patojen tipleri değil, bunların dışında kalan *E. coli*'lerin de su ve gıdalarda bulunması fekal kontaminasyonun en önemli göstergelerinden biridir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre kuyu suları ve çeşitli gıdalarda bu mikroorganizmanın bulunması, bu kaynaklarda bir kontaminasyon olduğunun göstergesidir. Bu grupların klinik izolatlarla çok yakın akrabalıklarının olmaması sevindiricidir. Buna rağmen, literatürden elde edilen bilgilerle kıyaslandığında bu gruplarda artan antibiyotik direnci gözden kaçmamıştır. Artan antibiyotik direnci her ne

kadar bakterilerdeki bazı mekanizmalar ve mutasyonlarla meydana gelse de en büyük nedenlerin başında bilinçsiz ve rastgele antibiyotik kullanımı gelmektedir. Bu noktada bireylerde antibiyotik duyarlılık testleri yapılmadan tedavi sürecine geçilmemelidir. Klinik suşların çevreye yayılma ve direnci aktarma durumları göz önüne alındığında, ilerleyen dönemlerde çevresel suşların da çoğu antibiyotiğe direnç kazanacağı bir gerçektir. Belirli aralıklarla direnç durumlarının belirlenmesi ve sürveyans çalışmalarının yapılması gereklidir. Açıkta satılan bazı gıda ürünlerinde *E. coli*'nin tespiti, hijyen konusunda eksikliklerin olduğunun göstergesidir. Halk Sağlığı Laboratuvarları ve belediyeler tarafından gerekli kontrollerin ve düzenlemelerin yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Elde ettiğimiz verilerin yapılacak tiplendirme ve direnç belirleme çalışmalarına ışık tutacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

Akçimen, B., 2010, Hastane infeksiyonlarından izole edilen vankomisin dirençli Enterokokların Pulsed field jel elektroforez yöntemi ile genotip tayini, Uzmanlık Tezi, *Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 2-116.

Aksu, B., 2007, MLST, BURST ve SCCmec yöntemlerinin prensip ve uygulamaları, *IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007*, Malatya, 47-50.

Aktas, Z., Day, M., Kayacan, C. B., Diren, S., Threlfall, E. J., 2007, Molecular characterization of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 541-545.

Akter, S., Un-Nabi, R., Rupa, A., Bari, M. L., Hossain, M. A., 2011, Antibiotic resistance and plasmid profiles in bacteria isolated from market-fresh vegetables, *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology*, 1, 140-149.

Aladağ, M. O., Durak, Y., Uysal, A., 2009, Investigation of imipenem and meropenem susceptibilities, plasmid profiles and ESBL characteristic of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections, *World Applied Sciences Journal*, 7 (3), 378-381.

Alam, M. J., Rahman, M .T., Siddique, M. P., Khan, M. F. R., Rahman, M. B., 2010, Antibiogram and plasmid profiling of *E. coli* isolates, *Int. J. BioRes.*, 1 (3), 1-7.

Albayrak, N., Kaya, Ş., 2009, Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimleri ve antibiyotik direnç oranları, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 39 (1-2), 16-21.

Alós, J. I., Serrano, M. G., Gómez-Garcés, J. L., Perianes, J., 2005, Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in relation to demographic and clinical data, *Clinical Microbiology and Infection*, 11 (3), 199-203.

Alzahrani, A. M., Gherbawy, Y. A., 2011, Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from water springs in Al-Ahsa Region, *African Journal of Microbiology Research*, 5 (2), 123-130.

Andrei, A. and Zervos, M. J., 2006, The aplication of molecular techniques to the study of hospital infection, *Arch. Pathol. Lab. Med*., 130 (5), 662-668.

Anonim, 2005, Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları, Ed: Halkman, A. K., *Başak Matbaacılık Ltd. Şti*., Ankara, 73-88.

Apun, K., Chang, P. P., Sim, E. U. H., Micky, V., 2006, Clonal diversity of *Escherichia coli* isolates from marketed beef in East Malaysia, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 661–667.

Arathy, D. S., Vanpee, G., Belot, G., Mathew, V., DeAllie, C., Sharma, R., 2011, Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* isolated from commercial chicken eggs in Grenada, West Indies, *West Indian Med. J.*, 60 (1), 53-56.

Arbeit, R. D., 1995, Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganims, In: Muray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Yolken, R. H. (eds), Manual of Clinical Microbiology, 6th edition, *ASM press,* Washington D. C., 190-208.

Arslan, S., Özdemir, F., 2008, Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from homemade white cheeses: prevalence and antibiotic susceptibility, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2361–2364.

Arslan, U., Dağı, H. T.,Yüksekkaya, Ş., Uysal, E., Tuncer, İ., 2010, Kan kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılığı ve genişlemiş

spektrumlu beta laktamaz oranı, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 40 (3), 169-174.

Ash, R. J., Mauck, B., Morgan, M., 2002, Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States, *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 713–716.

Aslam, M., Service, C., 2006, Antimicrobial resistance and genetic profiling of *Escherichia coli* from a commercial beef packing plant, *Journal of Food Protection*, 69 (7), 1508-1513.

Avery, S. M., Liebana, E., Hutchinson, M. L., Buncic, S., 2004, Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates associated with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meats and humans, *International Journal of Food Microbiology*, 92, 161-169.

Badri, S., Fassouane, A., Filliol, I., Hassar, M., Cohen, N., 2009, Clonal analysis of *Escherichia coli* strains isolated from food by pulsed-field gel electrophoresis, *Internet Journal of Food Safety*, 11, 44-49.

Barnes, J. H., Gross, W. B., 1997, Colibacillosis, In: Calnek, B. W., Barnes, J. H., Beard, C. W., Mac Dougald, R. L., Saif, Y. M. (Eds.), Diseases of Poultry, *Iowa State University Press*, Ames, Iowa, 131-141.

Barrett, T. J., Ribot, E. and Swaminathan, B., 2004, Molecular subtyping for epidemiology: issues in comparability of patterns and interpretation of data, In: Persing, D. H., Tenover, F. C., Versalovic, J., Tang, Y. W., Unger, E. R., Relman, D. A., White, T. J., (eds), Molecular Microbiology; Diagnostic Principles and Practice, *ASM Press*, Washington, D.C., 259-266.

Barrett, T. J., Lior, H., Green, J. H., Khakhria, R., Wells, J. G., Bell, B. P., Greene, K. D., Lewis, J., Griffin, P. M., 1994, Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing, *Journal of Clinical Microbiology,* 32 (12), 3013-3017.

Basım (Hacıoğlu), E., Basım, H., 2001, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology, *Turk J. Biol.*, 25, 405-418.

Basım, H., Stall, R. E., Minsavage, J., Jones, J., 1999, Chromosomal gene transfer among strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* by conjugation, *Phytopathology*, 89, 1044-1049.

Bean, C. D., Krahe, D., Wareham, D. W., 2008, Antimicrobial resistance in community and nosocomial *Escherichia coli* urinary tract isolates, London 2005-2006, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 7 (13), 1-4.

Berkiten, R., 2005, *Escherichia*, Tıbbi Mikrobiyoloji-2. Ed: Bozkaya, E., *Nobel Tıp Kitabevi*, 65-69.

Bilgehan, H, 2000, Klinik mikrobiyoloji (Özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları), 10. Baskı, *Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi*, İstanbul, 3-17.

Birnboim, H. C., Doly, J., 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acid Research*, 7 (6), 1513-1523.

Bourgeois, P. L., Lautier, M., Berghe, L. V. D., Gasson, M. J., Ritzenthaler, P.,1995, Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome: Comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403 revals a large genome inversion, *Journal of Bacteriology*, 177, 2840-2850.

Boxall, N., 1999, Pulsed-field gel electrophoresis: A tool for molecular, epidemiology, Master thesis, *Massey University Veterinary Studies*, New Zeland, 1-108.

Brooks, G. F., 2004, Enteric gram-negative rods (Enterobacteriaceae), In: Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A. (Eds.), Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbology, 23rd edition, *The Mc Graw-Hill Companies*, Boston, 248- 255.

Carrico, J. A., Pinto, F. R., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N. G., Frazao, N., de Lencastre, H., Almeida, J. S., 2005, Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5483-5490.

Casarez, E. A., Pillai, S. D., Di Giovanni, G. D., 2007, Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR, *Water Research*, 41, 3643-3648.

Celebi, A., Duran, N., Ozturk, F., Acik, L., Aslan G., Aslantas, O., 2007, Identification of clinic uropathogen *Escherichia coli* isolates by antibiotic susceptibility, plasmid and whole cell protein profiles, *Advances in Molecular Biology,* 1, 31-40.

Cergole-Novella, M. C., Pignatari, A. C. C., Castanheira, M., Guth, B. E. C., 2011, Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil, *Research in Microbiology*, 162 (2), 117-123.

Chigor, V. N., Umoh, V. J., Smith, S. I., Igbinosa, E. O., Okoh, A. I., 2010, Multidrug resistance and plasmid patterns of *Escherichia coli* O157 and other *E. coli* isolated from diarrhoeal stools and surface waters from some selected sources in Zaria, Nigeria, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 3831-3841.

Cho, S. H., Lim, Y. S., Park, M. S., Kim, S. H., Kang, Y. H., 2011, Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy persons and patients with diarrhea, *Public Health Res. Perspect.*, 2 (1), 41-45.

Churin, Y. N., Shalak, I. N., Borner, T., Shestakov, S. V., 1995, Physical and genetic map of the chromosome of the unicellular Cyanobacterium synechocystis sp. strain PCC 6803, *Journal of Bacteriology*, 177, 3337-3343.

Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI), 2008, Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing, Eighteenth informational supplement, *CLSI document M100-S18*, Wayne, PA, 34-38.

Correia, A., Martin, J. F., Castro, J. M., 1994, Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of aminoacid producing Corynebacteria: Chromosome sizes and diversity of restriction patterns, *Microbiology*, 140, 2841-2847.

De La Puente-Redondo, V. A., Del Blanco, N. G., Gutierrez-Martin, C. B., Garcia-Pena, F. J., Ferri, E. F. R., 2000, Comparision of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1016-1022.

Dempsey, J. A. F., Livaker, W., Madhure, A., Snodgrass, T. L., Cannon, J. G., 1991, Physical map of the chromosome of *Neisseria gonorrhoea* FA1090 with locations of genetic markers, including opa and pil genes, *Journal of Bacteriology*, 173, 5476-5486.

Deveci, Ö., Yula, E., Özer, T. T., Tekin, A., 2011, Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarına fosfomisin trometamolün ve bazı antibiyotiklerin in-vitro etkinliği, *Dicle Tıp Dergisi*, 38 (3), 298-300.

Dib, J. C., Dube, M., Kelly, C., Rinaldi, M. G., Patterson, J. E., 1996, Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms, *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (6), 1494-1496.

Du Preez, M., le Roux, W., Potgieter, N., Wenter, S. N., 2008, The genetic relatedness of *E. coli* associated with post-collection drinking water contamination in rural households, *Water S A*, 34 (1), 107-111.

Dufour, A., Strickland, E. R., Cabellit, V. J., 1981, Membrane filter method for enumerating *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology,* 5, 1152-1158.

Durmaz, B., Durmaz, R., 2001, Pulsed field gel electrophoresis, In: Durmaz, R. (eds), Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, 2. Baskı, *Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti.*, Adana, 161-168.

Durmaz, R., 2001, Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, 2. Baskı, *Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti.*, Adana, 139-147.

Durmaz, R., 2007, Moleküler tiplendirmenin temel ilkeleri, *IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007*, Malatya, 27-38.

Durmaz, R., Otlu, B., Çalışkan, A., Gürsoy, N., 2007, *Acinetobacter baumannii, Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinin moleküler tiplendirmesinde kullanılabilecek kısa süreli "pulsed-fıeld gel elektroforez" (PFGE) protokolü, *ANKEM Dergisi*, 21 (2), 113-117.

Durmaz, R., Otlu, B., Koksal, F., Hosoglu, S., Ozturk, R., Ersoy, Y., Aktas, E., Gursoy, N. C. and Caliskan, A., 2009, The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62, 372-377.

Edberg, S. C., Patterson J. E., Smith D. B., 1994, Differentiation of distribution systems, source water, and clinical coliforms by DNA analysis, *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (1), 139-142.

Eklund, M., Scheutz, F., Siitonen, A., 2001, Clinical isolates of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype, *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (8), 2829-2834.

Elder, J. K., Southern E. M., 1983, Measurement of DNA length by gel electrophoresis II: Comparison of methods for relating mobility to fragment length, *Analytical Biochemistry*, 128 (1), 227-231.

Erdem, B., Tekeli, A., Şahin, F., Koyuncu, E., Bayramova, M., Karasartova, D., 2007, Türkiye'de izole edilen *Salmonella enterıca* serotip typhimurium suşlarının plazmit profilleri ve randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analizi, *İnfeksiyon Dergisi*, 21 (3), 105-115.

Farzana, K., Akhtar, S., Jabeen, S., 2009, Prevalence and antibiotic resistance of bacteria in two ethnic milk based products, *Pak. J. Bot*., 41 (2), 935-943.

Fei, W. K., Radu, S., Cheah, Y. K., Benjamin, P. G., Ling, C. M., Hon, S. F., Harun, A., Lo, S. K., Liew, P. K., 2003, Antibiotic resistance, plasmid profile and RAPD-PCR analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) clinical isolates, *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 34 (3), 620-626.

Feil, E. J. and Enright, M. C., 2004, Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens, *Curr. Opin. Microbiol*., 7 (3), 308-313.

Feizabadi, M. M., Robertson, I. D., Hope, A., Cousins, D. V., Hampson, D. J., 1997, Differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis, *Australian Veterinary Journal*, 75 (12), 887-889.

Foley, S. L., Lynne, A. M., Nayak, R., 2009, Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens, *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 430-440.

Foley, S. L., Simjee, S., Meng, J., White, D. G., McDermott, P. F., Zhao, S., 2004, Evaluation of molecular typing methods for *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle, food, and humans, *Journal of Food Protection*, 67 (4), 651-657.

Foley, S. L., White, D. G., McDermott, P. F., Walker, R. D., Rhodes, B., Fedorka-Cray, P. J., Simjee, S., Zhao, S., 2006, Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar. *Typhimurium* isolates obtained from food animal sources, *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3569-3577.

Fujita, M., Fujimoto, S., Morooka, T., Amako, K., 1995, Analysis of strains of *Campylobacter fetus* by pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (6), 1676-1678.

Gakuya, F. M., Kyule, M. N., Gathura, P. B., Kariuki, S., 2001, Antimicrobial susceptibility and plasmids from *Escherichia coli* isolated from rats, *East African Medical Journal*, 78 (10), 518-522.

Gardiner, K., 1991, Pulsed-field gel electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 63, 658-665.

Gautom, R. K., 1997, Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day, *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (11), 2977–2980.

Goering, R. V., 2004, Pulsed-field gel electrophoresis, In: Persing, D. H., Tenover, F. C., Versalovic, J., Tang, Y. W., Unger, E. R., Relman, D. A., White, T. J., (eds), Molecular Microbiology; Diagnostic Principles and Practice, *ASM Press*, Washington, D.C., 185-196**.**

Goering, R. V., 2010, Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease, *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 866–875.

Gordillo, M. E., Singh, K. V., Murray, B. E., 1993, Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*, *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1570–1574.

Grady, R., Desai, M., O'Neill, G., Cookson, B., Stanley, J., 1999, Genotyping of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage type 15 isolates by fluorescent amplified-fragment lenght polymorphism analysis, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3198-3203.

Grif, K., Karch, H., Schneider, C., Daschner, F. D., Beutin, L., Cheasty, T., Smith, H., Rowe, B., Dierich, M. P., Allerberger, F., 1998, Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 32 (3), 165-76.

Grothues, D., Tümmler, B., 1991, New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species, *Molecular Microbiology*, 5, 2763–2776.

Guyot, A., Barrett, S. P., Threlfall, E. J., Hampton, M. D., Cheasty, T., 1999, Molecular epidemiology of multi-resistant *Escherichia coli*, *Journal of Hospital Infection*, 43, 39-48.

Harakeh, S., Yassine, H., El-Fadel, M., 2006, Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments, *Environmental Pollution*, 143, 269-277.

Holt, J. G., 1994, Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition *Williams&Wilkins*, Baltimore.

Hoszowski, A., Wasyl, D., 2001, Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Mbandaka isolates, *Veterinary Microbiology*, 80, 139-148.

Hoşoğlu, S., 2007, Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) prensip ve uygulamaları, *IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007*, Malatya, 39-46.

Ibekwe, A. M., Murinda, S. E., Graves, A. K., 2011, Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from human and animal sources uncovers multiple resistances from human sources, *PLoS ONE*, 6 (6), e20819, doi:10.1371/journal.pone.0020819.

Izumiya, H., Terajima, J., Wada, A., Inagaki, Y., Itoh, K. I., Tamura, K. and Watanabe, H., 1997, American society for microbiology molecular typing of

enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 ısolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (7), 1675–1680.

Jan, N., Meshram, S. U., Kulkarni, A., 2009, Plasmid profile analysis of multidrug resistant *E. coli* isolated from UTI patients of Nagpur City, India, *Romanian Biotechnological Letters*, 14 (5), 4635-4640.

Kado, C. I., Liu, S. T., 1981, Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *Journal of Bacteriology*, 145, 1365–1373.

Kahlmeter, G., 2003, Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens in uncomplicated cystitis in Europe, The ECO.SENS study, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22 (Suppl2), 49-52.

Kalem, F., Gündem, N. S., Arslan, U., Tuncer, İ., 2008, İdrar örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında antimikrobiyal duyarlılığı, *ANKEM Dergisi*; 22 (4), 193-197.

Karbasizaed, V., Badami, Z., Emtiazi, G., 2003, Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran, *African Journal of Biotechnology*, 2 (10), 379-383.

Kariuki, S., Gilks, C., Kimari, J., Obanda, A., Muyodi, J., Waiyaki, P., Hart, C. A., 1999, Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (2), 472-476.

Karlowsky, J. A., Kasloff, S., Nichol, K. A., Hoban, D. J., Zhanel, G. G., 2007, Genetic relatedness of multidrug-resistant *Escherichia coli* cultured from geographically diverse outpatient, midstream urine specimens, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58, 283-287.

Kaşkatepe, B., 2008, Üriner sistem enfeksiyonlarından elde edilen *Escherichia coli*'lerde siprofloksasin ve levofloksasin'in subinhibitör konsantrasyonlarına karşı in vitro direnç gelişiminin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-70.

Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Ueno, K., Ushijima, H., Hashira, S., Abe, T., 1994, Application of typing by pulsed-field gel electrophoresis to the study of *Clostridium difficile* in a neonatal intensive care unit, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2067-2070.

Kaya, O., Akçam, F. Z., Uyar, C., Demir, C., Yaylı, G., 2006, 2000-2004 yılları arasında izole edilen üropatojen *Escherichia coli* suşlarında artan antibiyotik direnci, *S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 13 (4), 22-26.

Kireçci, E., Savaşçı, M., Uslu, H., 2006, Kars ve Sarıkamış çevresindeki içme suyu kaynaklarından membran filtrasyon yöntemi ile *Escherichia coli* izolasyonu, *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 1 (1-2), 29-32.

Kon, T., Weir, S. C., Howell, E. T., Lee, H., Trevors, J. T., 2007, Genetic relatedness of *Escherichia coli* isolates in interstitial water from a Lake Huron (Canada) Beach, *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (6), 1961-1967.

Köksal, F., 1999, Moleküler biyolojik tiplendirme yöntemlerinin hastane infeksiyonlarında kullanımı, *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 3, 189-195.

Krause, U., Thomson-Carter, F. M., Pennington, T. H., 1996, Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing, *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (4), 959-961.

Krumperman, P. H., 1983, Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods, *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 165–170.

Kubar, A., Yapar, M., 2000, Mikrobiyolojide moleküler tanı yöntemleri, *Mikrobiyolojide Kullanılan Yöntemler Ders Ve Uygulama Kursu, 16-20 Ekim*, Ankara, 49-61.

Kudva, I. T., Evans, P. S., Perna, N. T., Barrett, T. J., Ausubel, F. M., Blattner, F. R., Calderwood, S. B., 2002, Strains of *Escherichia coli* O157:H7 differ primarily by insertions or deletions, not single-nucleotide polymorphisms, *Journal of Bacteriology*, 184, 1873–1879.

Lei, T., Tian, W., He, L., Huang, X. H., Sun, Y. X., Deng, Y. T., Sun, Y., Lv, D. H., Wu, C. M., Huang, L. Z., Shen, J. Z., Liu, J. H., 2010, Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China, *Veterinary Microbiology*, 146, 85-89.

Liu, P. Y., Tung, J., Ke, S., Chen, S., 1998, Molecular epidemiology of extended-spectrum beta -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan*, Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2759-2762.

Lu, L., Hume, M. E., Sternesc, K. L., Pillaia, S. D., 2004, Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates in irrigation water and associated sediments: Implications for source tracking, *Water Research*, 38, 3899-3908.

Macrina, F. L., Kopecko, D. J., Jones, K. R., Ayers, D. J., McCowen, S. M., 1978, A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules, *Plasmid*, 1 (3), 417-420.

Mahalingam, S., Cheong, Y. M., Kan, S., Yassin, R. M., Vadivelu, J., Pang, T., 1994, Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (12), 2975-2979.

Manning, S. D., 2010, Escherichia coli infections, consulting ed: Babcock, H.; foreword by Heymann, D. L., second edition, *Chelsea House Publishers*, New York, 1-99.

Marcos, M. A., Jimenez de Anta, M. T., Vila, J., 1995, Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Journal of Medical Microbology*, 42, 328-335.

Maslow, J. N., Slutsky, A. M., Arbeit, R. D., 1993, Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, In: Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C., White, T. J., (eds), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, *ASM Press*, Washington DC, 563-572.

Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H. C., Depaola, A., Kim, Y. B., Albert, M. J., Nishibuchi, M., 2000, Pandemic spread of an 03:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 578-85.

Matsumoto, M., Suzuki, Y., Nagano, H., Yatsuyanagi, J., Kurosawa, H., Kobayashi, K., Yamaoka, K., Horikawa, K., Kudaka, J., Terajima, J., Watanabe, H., Miyazaki, Y., 2005, Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis analysis performed at selected prefectural institutes of public health for use in PulseNet Japan, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58, 180-183.

Mayer, L. W., 1988, Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 1, 228–243.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V., 1999, Food-related illness and death in the United States, *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625.

Murase, T., Okitsu, T., Suzuki, R., Morozumi, H., Matsushima, A., Nakamura, A., Yamai, S., 1995, Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections, *Microbiology and Immunology*, 39 (9), 673-6.

Murray, B. E., Singh, K. V., Heath, J. D., Sharma, B. R., Weinstock, G. M., 1990, Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *Journal of Clinical Microbiology,* 28 (9), 2059-2063.

Myaing, T. T., Saleha, A. A., Arifah, A. K., Raha, A. R., 2005, Antibiotic resistance and plasmid carriage among *Escherichia coli* isolates from chicken meat in Malaysia, In: Makkar, H. P. S., Viljoen, G. J. (Eds.), Applications of Gene-Based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries, *IAEA Press*, Netherlands, 521-527.

Nabi, S. F., Hossein, M. D., Mortaza, M. M., Mohammad, G., 2011, Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from traditional ice cream in Gonabad, *Ofogh-e-Danesh Journal*, 16 (4), 1-4.

Najdenski, H., Iteman, I., Carniel, E., 1994, Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2913-2920.

Nauerby, B., Pedersen, K., Dietz, H. H., Madsen, M., 2000, Comparison of Danish isolates of *Salmonella enterica* serovar. *enteritidis* PT9a and PT11 from hedgehogs *Erinaceus europaeus* and humans by plasmid profiling and pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3631-3635.

Nazir, K. H. M. N. H., 2007, Plasmid profiles and antibiogram pattern of *Escherichia coli* isolates of calves feces and diarrhegenic stool of infants, *J. Bangladesh Soc. Agric. Sci. Technol.*, 4 (1-2), 149-152.

Nazir, K. H. M. N. H., Rahman, M. B., Nasuriddin, K. M., Akhtar, F., Khan, M. F. R., Islam, M. S., 2005, Antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* isolated from water and its relation with plasmid profile analysis, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (11), 1610-1613.

Old, D. C., Rankin, S. C., Crichton, P. B., 1999, Assessment of strain relatedness among Salmonella serotypes Salinatis, Duisburg, and Sandiego by biotyping, ribotyping, IS200 fingerprinting, and pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1687-1692.

Olive, D. M., Bean, P., 1999, Principles and applications of methods for DNA-based typing of microorganims, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1661-1669.

Olsen, J. E., Skov, M. N., Threlfall, E. J., Brown, D. J., 1994, Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing, *Journal of Medical Microbology*, 40, 15–22.

Oyetayo, V. O., Akharaiyi, F. C., Oghumah, M., 2007, Antibiotic sensitivity pattern of *Escherichia coli* isolated from water obtained from wells in Akure Metropolis, *Research Journal of Microbiology,* 2, 190-193.

Ozbakir, G., Avcioglu, N. H., Bilkay, I. S., 2010, Determination of antibiotic resistance and plasmid DNA profiles of *Esherichia coli* strains isolated from clinical materials, *International Journal of Agriculture & Biology*, 12, 724–728.

Ozgumus, O. B., Celik-Sevim, E., Alpay-Karaoglu, S., Sandalli, C., Sevim, A., 2007, Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey, *The Journal of Microbiology*, 45 (5), 379-387.

Öztelli, Y., 2004, Bayburt ili merkez ilçede içme sularında enterohemorajik *Escherichia coli* (O157:H7)'nin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, 1-42.

Parveen, S., Hodge, N. C., Stall, R. E., Farrah, S. R., Tamplin, M. L., 2001, Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*, *Water Research*, 35 (2), 379-386.

Parveen, S., Portier, K. M., Robinson, K., Edmiston, L., Tamplin, M. L., 1999, Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7), 3142-3147.

Patoli, A. A., Patoli, B. B., Mehraj, V., 2008, High prevalence of multi-drug resistant *Escherichia coli* in drinking water samples from Hyderabad, *Gomal Journal of Medical Sciences*, 8 (1), 23-26.

Pei, Y., Terajima, J., Saito, Y., Suzuki, R., Takai, N., Izumiya, H., Ishihara, T. M., Ohnishi, M., Miura, M., Iyoda, S., Mitobe, J., Wang, B., Watanabe, H., 2008, Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61, 58-64.

Perrin, M., Donnio, P. Y., Heurtin-Lecorre, C., Travert, M. F., Avril, J. L., 1999, Comparative antimicrobial resistance and genomic diversity of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in the community and in hospitals, *Journal of Hospital Infection*, 41, 273–279.

Pfaller, M. A., 2001, Molecular approaches to diagnosis and managing infectious diseases: Practicallity and costs, *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 312-318.

Preston, M. A., Johnson, W., Khakhria, R., Borczyk, A., 2000, Epidemiologic subtyping of *Escherichia coli* serogroup O157 strains isolated in Ontario by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2366-2368.

Rahimi, E., Chaleshtori, S. S., Parsaei, P., 2011, Prevalence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from traditional cheese, ice cream and yoghurt in Iran, *African Journal of Microbiology Research*, 5 (22), 3706-3710.

Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., Swerdlow, D. L., 2005, Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002, *Emerging Infectious Diseases*, 11 (4), 603-609.

Riley, L W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., Mc Gee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L.,1983, Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype, *New England Journal of Medicine*, 308, 681-685.

Rios, M., Prado, V., Trucksis, M., Arellano, C., Borie, C., Alexandre, M., Fica, A., Levine, M. M.,1999, Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products, *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (3), 778-781.

Ryu, S. H., Park, S. G., Choi, S. M., Hwang, Y. O., Ham, H. J., Kim, S. U., Lee, Y. K., Kim, M. S., Park, G. Y., Kim, K. S., Chae, Y. Z., 2012, Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood, *International Journal of Food Microbiology*, 152, 14–18.

Sader, H. S., Pignatari, A. C., Leme, I. L., Burattini, M. N., Tancresi, R., Hollis, R. J., Jones, R. N., 1993, Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas*

aeruginosa isolated from an outbreak in an intensive care unit, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,* 17, 13–18.

Sáenz, Y., Zarazaga, M., Brinas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2001, Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 353-358.

Sambrook, J., Russell, D. W., 2001, Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS, In: Molecular clonning a laboratory manual volume1, 3rd edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 31-34.

Sánchez, S., Martínez, R., Rey, J., García, A., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Herrera-León, S., Echeita, A., Alonso, J. M., 2010, Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants, *Veterinary Microbiology*,142 (3-4), 445-449.

Savor, C., Pfaller, M. A., Kruszynski, J. A., Hollis, R. J., Noskin, G. A., Peterson, L. R., 1998, Comparison of genomic methods for differentiating strains of *Enterococcus faecium*: assessment using clinical epidemiologic data, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3327-3331.

Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y., Miller, R. A., 2005, Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (3), 1394-1404.

Schaffer, H. E. Sederoff, R. R., 1981, Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels, *Analytical Biochemistry*, 115 (1), 113-122.

Schwartz, D. C., Cantor, C. R., 1984, Seperation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient electrophoresis, *Cell*, 37, 67-75.

Scott, L., McGee, P., Minihan, D., Sheridan, J. J., Earley, B., Leonard, N., 2006, The characterisation of *E. coli* O157:H7 isolates from cattle faeces and feedlot environment using PFGE, *Veterinary Microbiology*, 114, 331–336.

Sekse, C., O'Sullivan, K., Granum, P. E., Rørvik, L. M., Wasteson, Y., Jørgensen, H. J., 2009, An outbreak of *Escherichia coli* O103:H25-bacteriological investigations and genotyping of isolates from food, *International Journal of Food Microbiology*, 133, 259-264.

Senkel, I. A. Jr., Jolbitado, B., Zhang, Y., White, D. G., Ayers, S., Meng, J., 2003, Isolation and characterization of *Escherichia coli* recovered from Maryland apple cider and the cider production environment, *Journal of Food Protection*, 66 (12), 2237-2244.

Shahriar, M., Khair, N. Z., 2011, Correlation of plasmid with drug resistance of clinical isolates of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology Research*, 3 (1), 1-5.

Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H., Takagi, M., Nagase, N., Sasaki, A., Kawano, J., 2000, Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3746-3749.

Singh, A., Goering, R. V., Simjee, S., Foley, S. L., Zervos, M. J., 2006, Application of molecular techniques to the study of hospital infection, *Clin. Microbiol. Rev*., 19, 512-530.

Smith, D., Willshaw, G., Stanley, J., Arnold, C., 2000, Genotyping of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: comparison of isolates of a prevalent phage type by fluorescent amplified-fragment length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis analyses, *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (12), 4616-4620.

Soll, D. R., Pujol, C., Lockhart, S. R., 2007, Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms, In: Murray, P. R., Baron, E. J.,

Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Pfaller, M. A. (Eds.), Manual of Clinical Microbiology, *ASM Press*, Washington D. C., 129–151.

Southern, E. M., 1979, Measurement of DNA length by gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 100 (2), 319-323.

Söyletir, G., Topçu, A. W., 2002, *Escherichia coli* infeksiyonları, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Cilt 2., Ed: Topçu, A. W., Söyletir, G., Doğanay, M., *Nobel Tıp Kitabevi*, 754-758.

Swaminathan, B., Matar, G. M., 1993, Molecular typing methods, In: Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C., White, T. J. (eds), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, *ASM Press*, Washington, 26-50.

Tagoe, D. N. A., Nyarko, H., Arthur, S. A., Birikorang, E., 2011, A Study of antibiotic susceptibility pattern of bacteria isolates in sachet drinking water sold in the Cape Coast Metropolis of Ghana, *Research Journal of Microbiology,* 6, 153-158.

Tamplin, M. L., Jackson, J. K., Buchrieser, C., Murphree, R. L., Portier, K. M., Gangar, V., Miller, L. G., Kaspar, C. W., 1996, Pulsed-field gel electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (10), 3572-3580.

Tang, Y. W., Waddington, M. G, Smith, D. H., Manahan, J. M., Kohner, P. C., Highsmith, L. M., Li, H., Cockerill, F. R., Thompson, R. L., Montgomery, S. O., Persing, D. H., 2000, Comparison of protein a gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1347-1351.

Taşbakan, M. I., Pullukçu, H., Yamazhan, T., Arda, B., Ulusoy, S., 2004, Toplum kökenli üriner sistem infeksiyonlarından soyutlanan *Escherichia coli* suşlarına fosfomisinin in-vitro etkinliğinin diğer antibiyotiklerle karşılaştırılması, *ANKEM Dergisi*, 18 (4), 216-219.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., 1997, How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists, Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America, *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.,* 18 (6), 426-439.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B., 1995, Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing, *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2233-2239.

Tenover, F. C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G. A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W. R., Kreiswirth, B., Eisner, W., Maslow, J., McDougal, L. K., Miller, J. M., Mulligan, M., Pfaller, M. A., 1994, Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 407-415.

Teophilo, G. N. D., Vieira, R. H. S. F., Rodrigues, D. P., Menezes, F. G. R., 2002, *Eschericha coli* isolated from seafood: toxicity and plasmid profiles, *International Microbiology*, 5, 11-14.

Thorsteinsdottir, T. R., Haraldsson, G., Fridriksdottir, V., Kristinsson, K. G., Gunnarsson, E., 2010, Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland, *Zoonoses Public Health*, 57 (3), 189-96.

Tompkins, L. C., 1998, Molecular epidemiology in infectious diseases, In: Gorbach, S. L., Bartlett, J. G., Blacklow, N. R. (Eds), Infectious Diseases, 2nd ed. *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, 28-35.

Töreci, K., 2002, *Escherichia* türleri, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Cilt 2., Ed: Topçu, A. W., Söyletir, G., Doğanay, M., *Nobel Tıp Kitabevi*, 1564-1575.

Umolu, P. I., Ohenhen, E. R., Okwu, I. G., Ogiehor, I. S., 2006, Multiple antibiotic resistant index and plasmid of *Escherichia coli* in beef in Ekpoma, *The Journal of American Science*, 2 (3), 1-3.

Ustaçelebi, Ş., 1999, Temel ve klinik mikrobiyoloji, *Güneş Kitabevi*, İstanbul, 319-357.

Van Looveren, M., Ison, C. A., Ieven, M., Vandamme, P., Martin, I. M., Vermeulen, K., Renton, A., Goossens, H., 1999, Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2183-2188.

Walk, S. T., Alm, E. W., Calhoun, L. M., Mladonicky, J. M., Whittam, T. S., 2007, Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches, *Environmental Microbiology*, 9 (9), 2274-2288.

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., 2006, The Enterobacteriaceae, In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed., *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, 211-308.

Winters, M. A., Goering, R. V., Boon, S. E., Morin, R., Sorensen, M., Snyder, L., 1993, Epidemiological analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* comparing plasmid typing with chromosomal analysis by field inversion gel electrophoresis, *Medical Microbiology Letters*, 2, 33-41.

Wose Kinge, C. N., Atabe, C. N., Kawadza, D. T., 2010, Antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from different water sources in Mmabatho locality, North-West Province, South Africa, *South African Journal of Science*, 106 (1/2), 1-6.

Wu, F., Della-Latta, P., 2006, Pulsed-field gel electrophoresis, *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, part I, 143-157.

Wu, S., Dalsgaard, A., Vieira, A. R., Emborg, H. D., Jensen, L. B., 2009, Prevalence of tetracycline resistance and genotypic analysis of populations of *Escherichia coli* from animals, carcasses and cuts processed at a pig slaughterhouse, *International Journal of Food Microbiology*, 135, 254–259.

Yamamoto, S., 2007, Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*, *J. Infect. Chemother.*, 13 (2), 68-73.

Yavuzdemir, Ş., Aysev, A.D., Güriz, H., 2003, Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapan *E.coli* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*; 33: 126-9.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ahmet UYSAL
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Hadim / 04.04.1981
Telefon : 0332 223 1881
e-mail : ahuysal@selcuk.edu.tr, asistahmet@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Erbil Koru Yab. Dil. Ağır. Lisesi/Selçuklu/Konya	**1999**
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi /Selçuklu /Konya	**2003**
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi /Selçuklu /Konya	**2006**
Doktora	:	Selçuk Üniversitesi /Selçuklu /Konya	**2012**

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2004	Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi	Araştırma Görevlisi

UZMANLIK ALANI

Mikrobiyoloji, Moleküler Mikrobiyoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Aladağ, M. O., Durak, Y., Uysal, A., 2009, Investigation of imipenem and meropenem susceptibilities, plasmid profiles and esbl characteristic of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections*, World Applied Sciences Journal*, 7 (3), 378-381.

Uysal, A., Durak, Y., Aladağ, M. O., 2010, Investigation of mutagenic effects of some plant growth regulators on Salmonella/microsome test system, *Fresenius Environmental Bulletin*, 19 (10), 2170-2175 (**Yüksek Lisans Tezinden**).

Maltaş, E., Uysal, A., Yıldız, S., Durak, Y., 2010, Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Vitex agnus castus* L., *Fresenius Environmental Bulletin*, 19 (12b), 3094-3099.

Durak, Y., Keleş, F., Uysal, A., Aladağ, M. O., 2008, Konya yöresi ev yapımı yoğurtların mikrobiyolojik özelliklerinin araştırılması, *SÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22 (44), 113-117.

Durak, Y., Aladağ, M. O., Uysal, A., Akın, D., 2010, Konya ve civarı gıda sektöründe çalışan işçilerin boğaz ve burun kültürlerindeki *Staphylococcus aureus* dağılımı, *SÜ Selçuk Gıda ve Tarım Bilimleri Dergisi*, 24 (4), 30-32.

Aladağ, M. O., Durak, Y., Uysal, A**.**, Ekmekci, N. and Akın, D., 2009, Investigation of bacteria in the biofilm occurring at water bath used in laboratory, *Microbiologia Balkanika 2009 (6th Balkan Congress of Microbiology)*, *Book of Abstract*, *page 44*, 28-31 Ekim, Ohrid, Makedonya (Sözel Bildiri).

Durak, Y., Uysal, A., Aladağ, M. O. and Akın, D., 2009, Identification of group A beta-haemolytic streptococci with the API 20 strep system isolated from throat cultures, *Microbiologia Balkanika 2009 (6th Balkan Congress of Microbiology)*, *Book of Abstract*, *page 51,* 28-31 Ekim, Ohrid, Makedonya (Sözel Bildiri).

Uysal, A., Durak, Y. and Aladağ, M. O., 2009, Antibiotic resistance pattern of group A beta-haemolytic streptococci isolated from throat cultures, *Microbiologia Balkanika 2009 (6th Balkan Congress of Microbiology)*, *Book of Abstract*, *page 111,* 28-31 Ekim, Ohrid, Makedonya (Sözel Bildiri).

Durak, Y., Akın, D., Uysal, A., Aladağ, M. O., 2010, Antimutagenic activity of fruit extracts of *Celtis glabrata* Steven ex Planch, *Power of Microbes In Industry and Environment 2010 (Central European Symposıum on Industrıal Microbiology and*

Microbial Ecology, *Book of Abstract*, *page 39,* 22-25 Eylül, Malinska/Hırvatistan (Sözel Bildiri).

Uysal, A., Akın, D., Aladağ, M. O., Durak, Y., 2010, A study on the antimutagenicity of various extracts of leaf of *Celtis glabrata* Steven ex Planch by using Ames / Salmonella /microsome test system, *Power of Microbes In Industry and Environment 2010 (Central European Symposıum on Industrıal Microbiology and Microbial Ecology*, *Book of Abstract*, *page 138,* 22-25 Eylül, Malinska/Hırvatistan (Poster Bildiri).

Aladağ, M. O., Akın, D., Durak, Y., Uysal, A., 2010**,** Investigation of antimutagenic effects of *Celtis glabrata* Steven ex Planch core extracts, *Power of Microbes In Industry and Environment 2010 (Central European Symposıum on Industrıal Microbiology and Microbial Ecology, Book of Abstract*, *page 49,* 22-25 Eylül, Malinska/Hırvatistan (Poster Bildiri).

Uysal, A., Durak, Y., Aladağ, M. O., 2007, Bazı bitki gelişim düzenleyicilerin Salmonella/mikrozom test sisteminde mutajenik etkilerinin araştırılması, *15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, *Bildiri kitabı*, 28-31 Ekim, Antalya, Poster Bildiri (**Yüksek Lisans Tezinden**)

Aladağ, M. O., Durak, Y., Özkalp, B. ve Uysal, A., 2007, Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen *Klebsiella pneumoniae*'ların imipenem ve meropeneme duyarlılıkları, plazmid profilleri ve ESBL özelliğinin araştırılması, *15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Bildiri kitabı,* 28-31 Ekim, Antalya (Poster Bildiri).

Aladağ, M. O., Durak, Y. ve Uysal, A., 2008, Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen *Klebsiella pneumoniae'*ların sefalosporin türü antibiyotiklere duyarlılıkları ve plazmid profillerinin araştırılması, *19. Ulusal Biyoloji Kongresi*, *Bildiri kitabı*, 23-27 Haziran, Trabzon (Poster Bildiri).

Uysal, A., Koç, Z. E., Coşkun, A., Aladağ, M. O. ve Ekmekçi, N., 2008, İmidazol grubu içeren bazı fenilendiaminlerin antimikrobiyal etkilerinin araştırılması, *19. Ulusal Biyoloji Kongresi*, *Bildiri kitabı*, 23-27 Haziran, Trabzon (Poster Bildiri).

Durak, Y., Uysal, A., Aladağ, M. O., Akın, D. ve Ekmekçi, N., 2009, Ticari yoğurt örneklerinden canlı laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve sayımı*, 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Bildiri kitabı,* 13-16 Aralık, Antalya (Poster Bildiri)

Durak, Y., Keleş, F., Ateş, A., Uysal, A., 2005, Konya yöresi taze ev yapımı yoğurtların mikrobiyolojik özelliklerinin araştırılması*, 14. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, *Bildiri kitabı*, 31 Ağustos-2 Eylül, Eskişehir (Poster Bildiri).

Durak, Y., Sorkun, K., Ekmekçi, N., Uysal, A., Aladağ, M. O., 2011, Investigation of antimutagenic effects of some local honey kinds in Turkey by Salmonella/microsome test system (Ames Assay), *Microbiologia Balkanika 2011 (7th Balkan Congress of Microbiology), Book of Abstract*, *page 20*, 25-29 Ekim, Belgrad, Sırbistan (Sözel bildiri)

Gunes, E., Durak, Y., Uysal, A., Aladağ, M. O., Akın, D., 2011, Investigation of methicillin resistance by different methods in *Staphylococcus aureus* strains which ısolated from various sources, *Microbiologia Balkanika 2011 (7th Balkan Congress of Microbiology), Book of Abstract*, *page 21*, 25-29 Ekim, Belgrad, Sırbistan (Poster bildiri).

Aladağ, M. O., Durak, Y., Uysal, A., Gunes, E., 2011, Detection of ESBL producing and antibiotic susceptibilities in *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary system infection, *Microbiologia Balkanika 2011 (7th Balkan Congress of Microbiology), Book of Abstract*, *page 15*, 25-29 Ekim, Belgrad, Sırbistan (Poster bildiri).