

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**EKSTRAİNTESTİNAL ENFEKSİYONLARDAN İZOLE
EDİLEN VE VİRULANS FAKTÖRLERİ TANIMLANAN *E. coli*
SUŞLARININ FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN TESPİTİNDE
RAPD YÖNTEMİNİN ÖNEMİ**

Başak BEDİR

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA-2016

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**EKSTRAİNTESTİNAL ENFEKSİYONLARDAN İZOLE
EDİLEN VE VİRULANS FAKTÖRLERİ TANIMLANAN *E. coli*
SUŞLARININ FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN TESPİTİNDE
RAPD YÖNTEMİNİN ÖNEMİ**

Başak BEDİR

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2015-5188 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

**Tez no:.....
ADANA-2016**

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 09/08//2016

İMZA

Adı Soyadı

Başak BEDİR

Kayıtlı Olunan Program.....: Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tezin Konusu.....: Ekstraintestinal Enfeksiyonlardan İzole Edilen ve Virulans Faktörleri Tanımlanan *E.coli* Suşlarının Filogenetik İlişkilerinin Tespitinde RAPD Yönteminin Önemi

Tezin Türü.....:

Yüksek Lisans :

Doktora :

Danışmanın Adı-Soyadı.....: Prof. Dr.Fatih KÖKSAL

Danışmanın İletişim Bilgileri:

Telefon.....: 0322 338 60 60 - 3480

E-Posta.....: fkoksal@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri:

Telefon.....: 0507 914 76 82

E-Posta.....: basakbedir@hotmail.com

Adresi.....: Yeni Baraj mh. 68062 sk. Hatice Hatun Evleri A blok 6/16
Seyhan/ADANA

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitim sürecimde tezimin belirlenmesinde ve hazırlanmasında bana yardımcı olan hoşgörü ve alçakgönüllülükle katkılarıyla her konuda destek veren danışman hocam Prof.Dr. Fatih KÖKSAL' a,

Hayatımın her alanında olduğu gibi Yüksek Lisans çalışmalarım da bana maddi manevi destek olan, akademik anlamda ahlaki değerlerini, karakterini ve tecrübelerini örnek aldığım bu yola girmemde büyük etkisi olan babam Doç.Dr. Hasan BEDİR' e, hayata karşı bakış açımı şekillendiren umutsuzluğa kapıldığım her an ışık olan annem Uzm. Matematik Öğr. Zafer BEDİR' e, hayattaki en değerli varlığım olan kardeşim Eren BEDİR' e, gerek akademik anlamda gerekse tecrübeleri ile yanımda olan kuzenim Dr.Selin ONAYLI'ya,

Çalışmamda büyük emeği olan her zaman beni destekleyen ve mükemmel bir insan olan Dr. Melda MERAL' e, akademisyenliğini de örnek aldığım Yrd. Doç.Dr. Tülin GÜVEN GÖKMEN' e, zamanlarını ayırıp fedakarlıkta bulunarak bu teze eli değmiş olan Dr. Feride AKIŞ' a, Dr.Evrim KARAMAN' a, Uzm.Suna KIZILYILDIRIM' a, bu yola beraber başladığımız dostum Serap ÖZEN' e, günün hangi saati olursa olsun bana zaman ayıran ve tecrübelerini paylaşarak her konuda yardımcı olan Uzm. Emel YARAR' a, çalışmalarımızı ortak gerçekleştirdiğimiz her zaman akademik anlamda yol gösterici olan Öğr.Gör.Uzm.Cansu ÖNLEN' e ,zor zamanlarımda başaracağım konusunda bana olan inançları ile destek vererek yanımda olan arkadaşlarım Ali ÜÇKAYABAŞI' na, Uzm.Fırat KARSLI' ya, Mat.Öğr. Meriç GÜVERCİN'e, iyi niyeti ve ahlaki ile manevi desteğini her zaman hissettiğim doktor adayı Onur KÜÇÜKKILINÇ'a,

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyelerine her konudaki destek ve katkılarından dolayı bölüm sekreterimiz Suna GÖKMEN' e ve tüm anabilim dalı çalışanlarına, Sağlık Bilimleri Enstitü sekreteri Sn. Ferhat DİKEL'e öğrenci işleri sorumlusu Sn. Kader ORDU başta olmak üzere tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına değerli katkılarından, desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Başak BEDİR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KABUL ve ONAY	II
ETİK BEYAN FORMU	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET-ANAHTAR SÖZCÜKLER	XI
ABSTRACT-KEY WORDS	XII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>E.coli</i>	3
2.1.1. <i>E.coli</i> Tarihçesi	3
2.1.2. Morfolojisi ve Boyanma Özellikleri	4
2.1.3. Üreme Özellikleri ve Kültür Karakterleri	4
2.1.4. Biyokimyasal Özellikleri	5
2.1.5. Direnç	5
2.1.6. Genom Özellikleri	5
2.1.7. Hücre Duvarı ve Antijenik Yapısı	6
2.1.7.1. LPS ve Somatik (O) Antijenleri	6
2.1.7.2. Flagella ve Flagella (H) Antijenleri	6
2.1.7.3. Kapsül ve Kapsül (K) Antijenleri	7
2.1.7.4. Fimbria ve F Antijenleri	7
2.1.8. Patogeneizde Rol Oynayan Virulans Faktörleri	8
2.1.8.1. Endotoksin	8
2.1.8.2. Aerobaktin ve Siderofor	8
2.1.8.3. Hemolizin	8

2.1.8.4. Sitotoksik Nekrotizan Faktör(CNF)	9
2.1.8.5. Sitoletal Distending Toksinler(CDT)	9
2.1.8.6. Serum Direnci	9
2.1.8.7. Kolisin	9
2.1.9. Sınıflandırma	10
2.1.9.1. <i>E coli</i> ' nin tiplendirilmesi	10
2.1.9.1.1. Fenotipik Yöntemler	10
2.1.9.1.1.1. Patotiplendirme	11
2.1.9.1.1.1.1. Kommensal <i>E.coli</i>	11
2.1.9.1.1.1.2. İnPEC	11
2.1.9.1.1.1.3. ExPEC	14
2.1.9.1.1.2. Fizyolojik Özelliklere Göre	15
2.1.9.1.1.2.1. Serotiplendirme	15
2.1.9.1.1.2.2. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)	15
2.1.10. Moleküler Teknikler	16
2.1.10.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	17
2.1.10.1.1. Restriction Fragment Length Polimorphism (PZR-RFLP)	17
2.1.10.1.2. Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)	18
2.1.10.1.3. Random Amplified Polymorphic Dna (RAPD)	19
2.1.10.1.4. Amplified Length Fragment Polymorphisms (AFLP)	21
2.1.10.1.5. Multilocus Sequence Typing (MLST)	22
2.1.11. Tedavisi	22
2.1.12. Korunma ve Kontrol	23
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	
3.1. Test Suşlarının Klinik Materyal, Hasta Cinsiyet Grupları ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı	24
3.2. Test Suşlarının Çoğaltılması, Fenotipik ve Genotipik Özelliklerine Göre İdentifikasyonu	26
3.3. Çalışmaya Dahil Edilen ExPEC Suşları ve Virülans Genlerinin Doğrulanması	27
3.3.1. DNA Ekstraksiyon ve Amplifikasyon İşlemlerinde Kullanılan	

Kimyasal Solüsyonlar ve Enzimler	29
3.3.2. Genotipik İdentifikasyon	31
3.3.2.1. DNA Ekstraksiyonu	31
3.3.2.2. PCR Yöntemi İle Beta-D-Glukorinidaz Enzim Aktivitesi İle CDT ve CNF Toksin Genlerinin Belirlenmesi	31
3.4. Klonal İlişkinin <i>XbaI</i> -PFGE ve RAPD ile Araştırılması	33
3.4.1. <i>XbaI</i> -PFGE Protokolü	34
3.4.1.1. İzolatların Hazırlanması	34
3.4.1.2. İzolatların Agaroz Gömülmesi	34
3.4.1.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması	35
3.4.1.4. Hücre Lizisinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkanması	35
3.4.1.5. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın RE ile Kesilmesi	35
3.4.1.6. Elektroforez Jelinin Hazırlaması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi	36
3.4.1.7. Sonucun Analizi	37
3.4.1.8. PFGE Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar	38
3.5. Randomly Amplified Polimorfik DNA(RAPD)	38
3.5.1. OPA9, OPA10, OPA11 Primerleri İle Amplifikasyon	39
3.5.2. Fragmentlerin Agaroz Gel Elektroforezi İle Tespiti	39
3.5.3. Görüntüleme Ve Bant Profillerinin Analizi	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	20
Şekil 3.1. Hastaların Materyal Dağılımı	24
Şekil 3.2. Hastaların Cinsiyet Dağılımı	25
Şekil 3.3. İzolatların Alındığı Klinik ve Poliniklere Göre Dağılımı	26
Şekil 3.4. Çalışmaya Dahil Edilen Materyallerin Alındığı Hastaların Yaşlara Göre Dağılımı	26
Şekil 3.5. Endo Besiyeri	27
Şekil 3.6. Kanlı Besiyer	27
Şekil 3.7. EMB Besiyerinde <i>E.coli</i> 'nin Metalik Refle Vermesi	27
Şekil 3.8. <i>E. coli</i> 'nin IMVIC Test Sonuçları	27
Şekil 3.9. 120 bp'lik Beta-D-Glukuronidaz Enzimi Kodlayan Gen Bölgesine Ait Bant Profilini Gösteren Jel Görüntüsü	28
Şekil 3.10. 411 bp'lik CDT-1 Toksin Genini Kodlayan Gen Bölgesine Ait Bant Profilini Gösteren Jel Görüntüsü	28
Şekil 3.11. 350 bp'lik CDT-4 Toksin Genini Kodlayan Gen Bölgesine Ait Bant Profilini Gösteren Jel Görüntüsü	28
Şekil 3.12. 1111 bp'lik CNF Genini Kodlayan Gen Bölgesine Ait Bant Profilini Gösteren Jel Görüntüsü	28
Şekil 3.13. 1240 bp'lik CNF-2 Gen Bölgesine Ait Bant Profilini Gösteren Jel Görüntüsü	28
Şekil 3.14. 757 bp CNF-3 Genini Kodlayan Gen Bölgesine Ait Bant Profilini Gösteren Jel Görüntüsü	28
Şekil 4.1. PFGE Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri	41
Şekil 4.2. PFGE Sonucu Elde Edilen Dendogram	42
Şekil 4.3. RAPD Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri	43
Şekil 4.4. RAPD Sonucu Elde Edilen Dendogram	44

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Örneklerin Cinsiyete, Alındığı Klinik ve Polikliniklere Göre Dağılımı	25
Tablo 3.2. PCR Sonucunda Beta-D-Glukorinidaz ve CDT, CNF toksin genlerine ait değerlerin oranı	29
Tablo 3.3. Agaroz Kalıplarda Kullanılan Enzim Tampon Oranı-su	36
Tablo 3.4. Agaroz Kalıplarda Kullanılan Enzim, Enzim Tamponu ve Su Oranı	36
Tablo 3.5. Elektroforez Şartları	37
Tablo 4.1. İzolatların OPA-9(10 Dimerli) Primeri ile Elde Edilen Dendogram Sonuçlarının OPA-11 Dimeri ile Elde Edilen Dendogramdaki Karşılığı	45
Tablo 4.2. Tek Üyeli Küme ve Aynı Alt Küme İçinde Toplanan Suşların Virülans Faktörleri	47
Tablo 4.3. Kümelenme Özellikleri ve Virülans Faktörleri Aynı Olan Suşların Virülans Faktörleri ve Kliniklere Göre Dağılımı	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDT	: Cytotolethal Distending Toxin
CNF	: Cytotoxic Necrotizing Factor
DAEC	: Diffüz Aderans Gösteren <i>E. coli</i>
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
EAggEC	: Enteroagregativ <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EHEC	: Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EMB	: Eozin Metilen Mavisi
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC(STEC)	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
ExPEC	: Ekstraintestinal Patojenik <i>E. coli</i>
HST	: Hücre Süspansiyon Tamponu
IMVIC	: Indol, Metil Kırmızısı, Voges Proskauer ve Sitrat
LPS	: Lipopolisakkarit
MHB	: Müller Hinton Besiyeri
MLST	: Multilocus Sequence Typing
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
STL	: Shiga Like Toxin
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyon
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA
RE	: Restriksiyon Enzimi
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
TBE	: Trismabase, Borik Asit, EDTA
TE	: Tris-Hcl, EDTA
UPEC	: Uropatojenik <i>E. coli</i>
USİ	: Uriner Sistem İnfeksiyonu
USP	: Uropatojen Spesifik Protein

ÖZET

Ekstraintestinal Enfeksiyonlardan İzole Edilen ve Virülans Faktörleri Tanımlanan *E. coli* Suşlarının Filogenetik İlişkilerinin Tespitinde RAPD Yönteminin Önemi

İntestinal ekosistemin kommensal üyesi olmakla birlikte her türlü çevre şartına karşı yüksek rekombinasyon-mutasyon yeteneği ile büyük bir uyum gösteren *E. coli* suşları, yüksek GC oranına sahip olmakla birlikte ilginç şekilde genomik plastisite özelliğine sahiptir. Diğer taraftan bu özelliklerinin yanı sıra klasik besiyerlerinde hızlı üreme yeteneğini koruyan *E. coli*, prokaryotlardaki spontan DNA transfer olaylarının açıklanması için iyi bir modeldir. Genomda kodlanan yapısal genlerin yanı sıra, patojenite adaları (PI), plazmidler, bakteriyofajlar ve transpozonlar gibi mobil genetik elemanlarda kodlanan, esasen mikroorganizmaların içinde buldukları mikro çevre şartlarına uyum sağlamasında rol oynayan ancak bazen mikroorganizmaya farklı virülans özellikler de kazandıran proteinlerin kodlandığı, genlerin transferi ile kendilerinde olmayan yeni virülans özellikler de kazanabilirler.

İntestinal kaynaklı ExPEC suşlarının özel genotiplerin mutasyonu sonucunu oluşturduğu yoksa rastgele mutasyonlarının ExPEC suşlarını oluşturduklarının bilinmesi bu suşların toplumdaki hareketlerinin izlenmesi ve enfeksiyon kontrol protokollerinin oluşturulabilmesine imkan sağlayacaktır. Bu amaçla yapılacak epidemiyolojik sürveys da klinik ile ilişkisine dayalı patotipleme, fizyolojik özellikler, (MLEE) veya antibiyotik duyarlılık kalıplarının tespiti gibi düşük ayırım gücüne sahip fenotipik yöntemlerin yerine veya yanında genomdaki spesifik dizileri tanıyan nükleik asit amplifikasyon bazlı ve/veya restriksiyon enzimlerinin de kullanıldığı, filotipleme, PCR, PCR-RFLP, PFGE ve (MLST) gibi sekanslama yöntemlerine ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu çalışmada extra intestinal sistemden izole edilen ve bazı virülans genleri gösterilmiş ExPEC izolatlarının muhtemel klonal ilişkilerini tespit amacı ile, üç farklı kısa oligonükleotid dizisinin kullanıldığı RAPD ve XbaI-PFGE yöntemlerinin ayırım güçlerini tespiti amaçladık. Çalışmada farklı klinik örneklerden izole edilen 155 ExPEC suşu kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ExPEC, CDT, CNF, PFGE ve RAPD

ABSTRACT

Significance of RAPD Method For The Detection of Filogenetic Relation Between Virulence Factors Identified *E. coli* Strains Isolated From Extraintestinal Infections

The importance of RAPD method in the investigation of filogenetic relation of *E.coli* strains isolated from Extraintestinal infections and virulence factors of which are determined. *E. coli* strains which are the commensal members of intestinal ecosystem and which are adapted to any environmental condition due to its great recombination mutation ability have not only high potential of GC but also an interesting genomic plasticity feature. In addition to these features, *E. coli* which can rapidly grow in classic medium is a good model accounting for DNA transfer cases. In fact, they may gain new virulence features which do not exist in them with the gene transfer in which proteins playing a role in the adaptation of microorganism to any micro environment, yet providing microorganism with different virulence are coded.

Whether intestinal ExPEC strains are developed as a result of special genotype mutation or random mutation developed ExPEC strains is of great importance for the tracking the signs of these strains in the society and for the infections control protocols. Thus instead of together of with phenotypic methods which have a low level of differentiation such as clinical patotypes, physiological features multilocus enzyme electrophoresis phylotypic, such methods as PCR, PCR-RFLP, PFGE and Multilocus Sequence Typing (MLST) sequencing which are based on nucleic acid amplification and can determine specific sequence and/or in which restriction enzymes are used are needed.

In this study; We aimed at investigating the determination power of RAPD and XbaI-PFGE in which three different short oligonucleotide sequences were used in order to determine the possible clonal relation ExPEC isoates some virulence genes of which were shown in the the strains isolated from extra intestinal system. In the study, 155 ExPEC strains isolated from various clinical samples were used.

Key words: ExPEC, CDT, CNF, PFGE and RAPD

1. GİRİŞ VE AMAÇ

E. coli' nin bazı suşları memelilerde intestinal floranın kommensal özellik gösteren normal üyesi iken diyarejenik suşlar olarak tanımlanan bir grubu gastrointestinal sistemde (İnPEC), ekstra-intestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) olarak tanımlanan bir grup da intestinal sistem dışında bütün vücut kompartmanlarında güçlü patojenik etki gösterirler. Böylece konak ile ilişkilerine göre *E. coli* genus üyelerinin klasik olarak kommensal non-patojenler, intestinal patojenler ve intestinal sistem dışı patojenler olarak üç major gruba ayırmak mümkündür¹.

Non-patojen suşlar intestinal sistemde kolonize olurlar, enfeksiyon oluşturmazlar ve sistem dışını çıkmazlar. Virülans ile ilgili gen kodlanmaz veya genomda az sayıda düşük virülans gösteren proteine ait gen kodlanır. İnPEC suşlar virülans genleri yönünden çeşitlilik gösterirler ve şarta bağlı olarak düşük sosyo-ekonomik düzeyli toplumlarda bebeklerde mortal seyredilen ishalleri hastalıklara yol açarlar. Nadirde olsa intestinal sistem dışındaki enfeksiyonlardan izole edilebilirler^{1,2}.

ExPEC suşları ise morbidite kadar mortalitenin de önemli sebepleri arasındadır. Bu suşlar klinik materyallerden en sık izole edilen gram negatif bakteriler arasında ilk sıralarda yer alırlar. ExPEC suşları sebebi ile yılda en az 2 milyon hastanın kaybedildiği tahmin edilmektedir. ExPEC suşlarının sadece insanlarda değil ekonomik öneme sahip ev ve çiftlik hayvanlarında da önemli ekonomik kayıplara yol açan hastalıklara sebep olduğu, ayrıca hayvanlardan insanlara bulaşarak sepsis gibi mortal enfeksiyonlara da yol açabildiği gösterilmiştir^{3,4}.

E.coli izolatlarının “phylogrouping triplex PCR” yöntemi ile A, B1, B2, C, D, E ve F olarak adlandırılan yedi filogenetik gruba ayrıldıkları, ExPEC suşlarının genel olarak B2 ve D filogenetik grubunda yer almalarına karşılık kommensal ve İnPEC suşlarının A ve B1 filogenetik grubunda yer aldıkları iddia edilmiştir^{2,5,6}.

E. coli dış membran hemin reseptör geni (*chuA*) ve tam olarak karakterize edilmemiş bir proteini kodlayan (*yjaA*) geni ile farazi lipas esteraz geninin bir parçasını kodlayan bir DNA fragmentinin kombinasyonun baz alındığı filogruplamanın, yapılan az sayıdaki çalışma ile henüz geniş kabul görmemişken, EHEC' in buzağılarda non-patojen olmasına karşılık insanlarda dizanterik formda ishalleri İnPEC ve intestinal bulgusu olmayan bazı insanlarda hemolitik üremik sendrom olmaksızın üriner sistem enfeksiyonu oluşturması sebebi ile

ExPEC olarak kabul edilmesi mecburiyeti, yine filogrup A içerisinde yer alan bazı non-patojen *E. coli* suşlarının ExPEC gibi sepsisli hastalardan izole edilmesi gibi tartışmalı konumlandırmalar sebebi ile, virülans genlerinin transferini izah için kesin sınırlayıcı veya belirleyici olamayacağı görülmüştür^{1,7}.

Toplamda 700' den fazla serotipi bulunan *E. coli* suşları arasından; delesyon, insersiyon ve tek nokta mutasyonları ile çok daha fazla sayıda, tahminen tabiatta 2010' den fazla, genotipin ortaya çıkması, beklenen bir sonuçtur. İn-vivo şartlarda intestinal sistemde in-vitro şartlarda da kanalizasyon sistemlerinde virülans ile ilgili taşınabilir genetik bilgilerin transferini yapabilen avirülan veya düşük virülans genlerine sahip *E. coli* suşları, virülan *E.coli* suşlarından veya mikroçevredeki farklı bakterilere ait virülans genleri kazanarak patojenitelerini artırır⁸. İnsersiyon, rekombinasyon ve spontan mutasyon yolu ile virülans özellikler kazanma yeteneği *E. coli* genotiplerinin tamamında mı yoksa farklı genom özelliklerine sahip bazı özel *E. coli* suşlarında mı görülmektedir ve bu transfer hangi şartlarda gerçekleşir gibi önemli soruların cevabı hâlâ bilinmemektedir. Bilindiği gibi ExPEC suşları intestinal sistemde bir patolojiye sebep olmadan kolonize olup çoğalmaya devam ederler^{5,9}.

Rezervuarı intestinal sistem olan bu suşlar sahip oldukları adhezyon, hücrel immunsistemden kaçış ve konak hücre yapısını değiştirebilen bazı efektör proteinler gibi genom veya mobil elementler ile taşınan spesifik virülans faktörlerinin transferi yolu ile evrilerek üriner sistem, kan dolaşımı ve MSS gibi vücut bölgelerine de yayılıp kolonize olma, çoğalma ve enfeksiyon oluşturma yeteneği kazanırlar^{4,10}. Mesela UPEC serogenotipleri suşlar intestinal kaynaklıdır, ancak büyük intestinal *E. coli* suşları UPEC değildir. ExPEC grubu *E. coli* suşlarında, özellikle UPEC suşlarında bulunan ve adezyon ve invazyon ile ilişkili proteinlerin kodladığı genlerin yer aldığı PI'ların, kolon kanseri, Crohn hastalığı, İnflammatory Bowel Diseases (IBDs) ve granülamatöz kolitli hastalıklar ile ilişkili mukuzal adeziv-invaziv *E. coli* (AIEC) suşlarında da görüldüğünü bildiren yayınların son yıllarda artmış olmasıdır^{11,12}.

Klinik önemi giderek artan ExPEC suşlarda virülansı sağlayan ve güçlendiren gen transferinin yanı sıra evrimin hangi genom özelliğine sahip suşlarda gerçekleştiğinin bilinmesi hem enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesi hemde duyarlı kişilerin belirlenmesi yönünden önemlidir. Bu sebeple farklı klinik materyallerden izole edilen ExPEC suşları ile yapılacak, popülasyonun fenotipik ve genotipik süreyans yöntemlerinin kullanıldığı epidemiyolojik çalışmalar ihtiyaç vardır. Bu çalışmalardan elde edilecek epidemiyolojik veriler *E. coli* suşlarındaki gen plastisitesini izah açısından önemli olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

E. coli insanlar ile sıcakkanlı vertebralılar ve reptillerde dahil olmak üzere çok sayıdaki hayvanın gastrointestinal sisteminde, özellikle kalınbağırsaklarında, yerleşik kommensal veya simbiyotik özellik gösteren major flora bakterisidir. Ancak bazı patojen virülans faktörlerine sahip olan suşlar bebek ve çocuklar ile yaşlılarda intestinal sistemde bazı özel suşları ile de bütün yaş gruplarında intestinal sistem dışında yüksek mortaliteye yol açabilen enfeksiyonlara sebep olabilirler. Yüksek gen transfer yeteneğine sahip olan *E. coli* suşları gen mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda model mikroorganizma olma özelliğine sahiptir^{2,5,14}.

2.1. *E. coli*

Escherichia coli (*E. coli*) başta insan olmak üzere bütün vertebralı memeli hayvanlarda kolon mikro-florasının majör aerobik bakterisi olup, Enterobacterecea ailesi gram negatif bakteri türleri arasında enfeksiyon sorumlusu olarak klinik materyallerden en sık izole edilen üyesidir^{2,15}.

2.1.1. *E. coli*' nin Tarihçesi

İlk olarak Alman mikrobiyolog ve pediatrist olan Theodor Escherich (1885) bakteriler ve sindirim sistem hastalıkları arasındaki ilişkiyi araştırdığı çalışmasında sağlıklı bireylerin gaita örneklerinden de izole ettiği hızlı üreyen bu bakterinin kolonda yaygın olarak görüldüğünü fark etmiş ve bakteriyi kolonda yaygın bulunan bakteri anlamına gelen “Bacterium coli commune” olarak adlandırmıştır. Mikroorganizma isimlerinin yeniden düzenlendiği ve sadece iki ismin kullanıldığı nomenklatür çalışmalarında *Castellani* ve *Chalmer* tarafından (1919) bu mikroorganizmanın isminin bakteriyi ilk olarak Theodor Escherichin çalışmalarına izafeten, *E. coli* olarak değiştirilmesi teklif edilmiş ve kabul edilerek Tıp literatürüne bu isimle geçmiştir^{14,16}.

İnsan hastalığıyla ilgili ilk *E. coli* bakterisi olan Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) suşu 1940-1950' li yıllarda bulunmuş, ilk olarak 1980 'li yıllarda ABD' de *E. coli* O157:H7' nin klinik önemi açıklanmış, birçok morbidite ve mortalite ile ilişkilendirilmiştir¹⁷.

Toplum kaynaklı (%80-85) ve birçok antibiyotiğe dirençli olan hastane kaynaklı (%50) üriner sistem enfeksiyonların en sık etkeni *E. coli*' dir^{18,19}.

2.1.2. Morfolojisi ve Boyanma Özellikleri

E. coli, 0,3-0,7 µm en ve 1.0-6.0 µm boyunda sıklıkla peritrik flagellalı hareketli olmasına rağmen bazen hareketsiz, sporsuz, gram-negatif basildir. Bazı kültürde kısa ve koka benzer, bazı kültürlerde de normalden uzun Y harfi gibi dallanan filamentli yapıdadır^{1,20}.

Enterobacteriaceae ailesi içinde yer alan *E. coli* diğer koliform bakterilerle birlikte insan ve hayvan barsak florasında normal olarak bulunan en yaygın fakültatif anaerob bakteridir. Nadiren kapsül oluştururlar, Polisakkarit yapısında M antijeni içeren bir mikrokapsül ve biyofilm oluşturan suşlarda hücre duvarı üzerinde mukopolisakkarit yapısında slime tabaka bulunur^{1,2}.

2.1.3. Üreme Özellikleri ve Kültür Karakterleri

Enterobacteriaceae ailesi içinde yer alan *E. coli* diğer koliform bakterilerle birlikte insan ve hayvanlarda kalın barsaklarda özellikle kolon ve çekumda simbiyot veya kommensal olarak yerleşen, fakültatif anaerob enterobacteriaceae üyesi en yaygın bakteridir^{14,21}.

Doğumdan sonraki 40 saat içinde barsaklara yerleşir. Doğumu takip eden ilk yıl gaitanın gramında 10^7 - 10^9 cfu miktarına ulaşan *E. coli* daha sonra diğer flora bakterilerinin de kolonizasyonu ile sayısal olarak 10^5 - 10^7 cfu' e kadar geriler²².

Bağırsaklar dışında gaita ile kontamine nemli toprak ve suda uzun süre canlılığını korur. Bu sebeple 42°C de üreyen *E. coli* Tip-I sulardaki gaita kontaminasyonunun tespiti için indikatör olarak kullanılır².

E. coli in-vitro şartlarda hızlı ürer. Optimal üreme sıcaklığı 37°C, pH'sıda 7.2 olan *E. coli* 18-44.5°C ve pH 5-8 aralığında da hayatini korur. Bazı laboratuvar suşları 48°C'da da üreyebilir. Bilinen besleyici besiyerlerinde multiplikasyon süresi 15-25 dakika kadardır. Zenginleştirilmemiş peptonlu su, buyyon ve jeloz gibi kanlı besiyerlerinde 16-24 saatte 2-3 mm çapında ortası kabarık, düzgün kenarlı, pigmentizsiz S tipi koloniler oluştururlar. Özellikle idrar yolu infeksiyonlarından izole edilen bazı *E.coli* suşları kanlı besiyerinde hemoliz yapabilir. Eozin Metilen Blue (EMB) besiyerinde laktozu fermente ederek metalik refle veren yeşil koloniler, MacConkey agar besiyerinde safrayı presipite ve laktozu fermente ederek kırmızı renkli koloniler oluştururlar^{2,25}.

Eskimiş besiyerlerinde kenarları düzgün olmayan, kuru görümlü R- tipli mukoid koloniler de görülmektedir. Sıvı besiyerlerinde hareketli suşlar homojen bulanıklık oluştururlar².

2.1.4. Biyokimyasal Özellikleri

E. coli non-oksidan fermentatif bakteridir. Güçlü katalaz aktivitesine sahip olmasına rağmen nitratları nitritlere indirgeyebilmesi ve karbonhidratların çoğunu asit ve gaz oluşturarak fermente etmesi sebebi ile hem aerob hemde fakültatif anaerop şartlarda kolaylıkla üreyebilir^{23,24}.

Filogenetik olarak ilişkili oldukları düşünülen fizyolojik özellikleri ile benzer oldukları Shigellalardan laktozu fermente edebilme yetenekleri ile ayrılırlar. Glikozu etanol ve CO₂ ile birlikte asetik asit, suksinik asit ve laktik asit gibi son ürünler oluşturarak fermente eder. Yüksek karbonhidratlardan D-mannitol, D-sorbitol, L-arabinoz, L-ramnoz, maltoz, D-ksiloz, trehaloz ve D-mannozu fermente ederler, ancak; adonitol, inositol, sellobioz, eritrol, D-arabitolü fermente edemezler. IMVIC testinde sonuç; (+,+,-,-) İndol üretimi testi %98, Metilkırmızısı testi % 99 pozitif, Voges-Proskauer testi % 100 negatif ve Sitrat kullanım testi %99 negatif sonuçlar vermesi benzerlik gösterdiği *A. aerogenes*'den ayırt edilmesini sağlar^{2,21,25}.

2.1.5. Direnç

E. coli 60°C ısıda 30 dakika, oda ısısında uygun ortamda olmak koşulu ile 8°C' ye kadar olan ısılarda canlılığını koruyabilen oldukça dayanıklı bir bakteridir. Dezenfektanlara karşı dirençsizdir.²³ *E. coli* ile Salmonella ve Shigella gibi bakteriler arasında, malaşit yeşili, brillant yeşili, sodyum tetratiyonat, fuksin, bizmut sitrat, sodyum sülfat, sodyum deoksikolat, safra, safra tuzları, selenit tuzlarına karşı daha az dirençleri olmasından yararlanılarak selektif besiyerleri geliştirilmiştir. %7 NaCl içeren besiyerlerinde üreyemezler. Böyle besiyerleri bu özelliği sayesinde *E. coli*' nin üremesini engeller ve dışkı örneklerinden stafilokok izolasyonunun sağlanmasında yardımcı olur²⁶.

2.1.6. Genom Özellikleri

E.coli'nin genom yapısına ait tam DNA dizisi ilk olarak 1997 yılında yayınlanmıştır²⁷. (K-12 laboratuvar suşu), 4,6 milyon bp uzunluğundaki dairesel DNA molekülü 4288 protein kodlayan genleri, 7 rRNA operonu, 86 tRNA geni içermektedir. Yaklaşık 40 yıl boyunca yapılan yoğun genetik çalışmalar sonucu kodlama yoğunluğunun 118 bp çifti ile genler arasında ortalama mesafenin çok yüksek olduğu bulunmuştur. Genomun önemli sayıda transpoze edilebilen genetik elementler, tekrar elementleri, gizli profajlar ve bakteriyofaj artıkları içerdiği gözlemlenmiştir²⁸.

Günümüzde *E. coli* türlerinin tamamen tanımlanmış birkaç yüz genomik dizisi mevcuttur, *E. coli* suşlarına ait genomik dizi bilgisi 2014' ten önce tam anlamıyla önce literatüre eklenmemiştir. Bu genom dizilerinin karşılaştırılması önemli miktarda çeşitlilik göstermektedir. Genomun yaklaşık %80' i izolatlar arasında değişiklik gösterirken yalnızca yaklaşık %20'si her bir izolatta olan dizileri temsil eder^{27,29}.

Herbir genom tek başına 4,000-5,500 arası gen içermektedir ancak bütün *E.coli* suşları arasındaki farklı genlerin toplam uzunluğu 16,000 dir. Bu büyük çeşitliliğin 2/3'sinin türler arasındaki yatay geçiş sırasında meydana geldiği kabul edilmiştir⁹.

2.1.7. Hücre Duvarı ve Antijenik Yapı

E. coli gram negatif bir bakteridir ve karakteristik olarak gram negatif bakteri hücre duvarına sahiptir. Sitoplazmik membrandan sonra gelen periplazmik boşluğun üzerini kros bağları olmayan ince bir peptidoglikan tabaka örter. Dış membranın omurgasını ise lipopolisakaritler (LPS) oluşturur. LPS duvarın içerisinde yer yer porin proteinleri ile flagella ve fimbria uzantıları yer alır. *E. coli* hücre duvarında yer alan LPS somatik antijen, flagellar proteinlerde kodlanan H kirpik antijenleri, fimbria proteinleri tarafından kodlanan F fimbria antijeni ve kapsüllü suşlarda görülen K antijenleri de bakterinin serotiplendirilmesinde kullanılır^{21,23,25}.

2.1.7.1. LPS ve Somatik (O) Antijenleri

LPS yapı hücre duvarının omurgasını oluşturur. LPS yapının distalinde yer alan ve hücre duvarına gömülü olan Lipid-A endotoksin özelliğindedir ve hemen üzerinde yer alan kor polisakariti gibi bütün gram negatif bakterilerde ortak özelliğe sahiptir¹.

Kor polisakaritin üzerinde yer alan ve hücre dışında eksprese edilen ve sayıları 1-40 arasında değişen oligosakkarit zincirler bakteriye O antijeni özelliğini kazandırır. O antijenleri 100°C ısıya 2,5 saat, %96' lık alkole 4 saat dayanır. Asitlere dayanıklıdır. Formaldehit karşısında etkinliğini yitirir¹⁶.

2.1.7.2. Flagella ve Flagella (H) Antijenleri

E coli genellikle peritrik flagellalı ve hareketli bakteridir. Kemoatraktan bir bakteri olan *E.coli* 'de mikroçevresindeki kimyasalları algılayıp, uzaklaşmak veya metabolize etmek amacı ile yaklaşmayı sağlamak üzere hareketlendirilen flagella motoruna beş transmembran proteini yön verir. Hareketli suşlarda bulunur³⁰.

Flagellin proteinlerinden oluşan sarmal bir yapıdır, Flagellin proteinini oluşturan

aminoasit dizilimlerdeki farklılıklar antijene tip spesifik özellik kazandırır. Bugüne kadar 56 farklı (H1-H56) antijenik tipi tespit edilmiştir. H antijeni protein yapısı sebebi ile ısıya, alkole ve aside duyarlı iken formaldehite dirençlidir³¹.

2.1.7.3. Kapsül ve Kapsül (K) Antijenleri

Bazı *E. coli* suşlarında hücre duvarının üzerinde büyüklüğü suşlara göre değişebilen 50-100 kDa ağırlığında asidik polisakkaritlerden oluşan mukoid yapıda kapsül bulunur. Bakteriyi konak savunma sistemlerine karşı koruyan ve bakteriye virülans özellik kazandıran kapsül tabakası tip spesifik antijenik özellikte taşır. Bu güne kadar 60 farklı K antijen tipi tanımlanmıştır. Özellikle yeni doğan menenjitinden sorumlu olan K1 suşları mortal seyreden enfeksiyonlara sebep olabilir. K antijenleri önceden L, A, B şeklinde 3 alt tip olarak gruplandırılmasına rağmen bugün A antijeni grup 1 kapsüller polisakkarit olarak, B ve L antijenleri ise grup 2 kapsüller polisakkaritler olarak adlandırılmaktadır^{1,28}.

-*L antijeni*: Isıya dayanıksız bir antijen olan L antijenine sahip *E. coli* suşları genellikle fareler için toksiktir.

-*A antijeni*: Bu antijene sahip suşların kolonileri M tipi mukoid ve opaktır. Kapsüllü bakterilerin polisakkaritleridir.

-*B antijeni*: Sadece B antijeni patojeniteden sorumludur. Çocuklardaki epidemik diyare etkeni *E. coli* suşları arasında da gözlemlenen B antijenleri L antijenine benzer şekilde, sıcaklığa duyarlıdır³².

2.1.7.4. Fimbria ve F Antijenleri

Fimbrialar, bakterinin hücre duvarında bulunan protein alt ünitelerinden oluşan ince, saç benzeri adeziv organellerdir. Bakterinin sitoplazmasından orijin alarak hücre duvarı boyunca yerleşmiş olan fimbriaların çok sayıda ve farklı karakterlere sahip tipleri belirlenmiştir. Adezinler, bakterinin üriner sistemin epitel hücrelerinde bulunan glikoprotein ve glikolipidlere bağlanarak üriner sisteme dahil olmasını sağlar^{32,33}.

E. coli serotipinin antijenik formülü sırası ile O, K, H ve F antijenleri ile ya da bu antijenlerden gözlenenleri ile yazılarak belirtilir. Mesela O78: H20, O18: K1: H7 ya da O6: K2: H1: F7 gibi. Hareket ve fimbriya gözlenmeyen suşlar H-, F- olarak gösterilebilir. Kauffman'ın serotip şemasına göre *E. coli*'de 190'dan fazla O, 56 H ve 80 K antijeni tanımlanmıştır^{1,28}.

2.1.8. Patogenezde Rol Oynayan Virülans Faktörleri

E. coli' de virülans faktörleri; hücre yüzeyinde ve hücre içinde üretilen olarak ikiye ayrılır. Yüzeyde üretilenler konak hücrelerin yüzeyine tutunmada, doku invazyonu, biyofilm oluşumu veya sitokin indüksiyonu gibi rolleri de olabilen farklı fimbria şekillerinden ibarettir. Hücre içinden dış ortama salgılanan virülans faktörleri ise demirin sınırlı olduğu ortamlarda bakterinin üremesine yardımcı olurlar³².

2.1.8.1. Endotoksin

Tüm aerobik ve bazı anaerobik gram negatif bakterilerde bulunan bir virülans faktörüdür. Bu toksinin aktivitesi lipopolisakkaridin lipid A komponenti ile ilişkilidir. Hücre duvarının parçalanması sonucu ortaya çıkan Lipid A etkisini makrofajların sitokin oluşturması ve salgılanmasını arttırarak gösterir³⁴.

2.1.8.2. Aerobaktin ve Siderofor

Tüm hücreler için gerekli bir mineral olan demiri *E. coli* oksijen transportu ve depolanması, DNA sentezi, elektron transportu ve peroksit metabolizması için kullanır³².

E. coli'de siderofor aerobaktin sistemi, demir elde edilmesi için en etkili sistemdir. Aerobaktin, iki lizin ve bir sitrat molekülünden oluşmuş küçük bir moleküldür³⁵.

E. coli tarafından salgılandıktan sonra demiri konakçının demir bağlayan ve hücre duvarı reseptör proteinlerinden ekstrakte eder. Aerobaktin sistemi beş gen operonu tarafından kodlanmaktadır. Bu genler iucA, iucB, iucC, iucD ve iutA genleridir. Aerobaktin sentezi için gerekli enzimleri ilk dört gen kodlarken; hücre duvarı reseptör proteinini beşinci gen kodlamaktadır. Demir alımını iuc geni kodlarken, demir alımı için gerekli reseptör geni iut genidir. Diğer genler transport mekanizmasında kullanılmaktadır. Aerobaktin üretimi demir konsantrasyonlarına bağlı olarak düzenlenmektedir^{35,36}.

2.1.8.3. Hemolizin

Genellikle üriner sistem ve ekstra intestinal infeksiyonlara neden olan *E. coli*' ler tarafından sentezlenen alfa hemolizin ve hücre ilişkili beta hemolizin olmak üzere iki tiptir. Isıya duyarlı ekstraselüler proteinlerden oluşan alfa hemolizin ısıya duyarlı ekstraselüler proteinlerden oluşan plazmidler tarafından veya kromozomal olarak determine edilir^{37,38}.

2.1.8.4. Sitotoksik Nekrotizan Faktör (CNF)

Uropatojenik *E. coli*' lerde en iyi tanımlanmış olan virulans faktörlerinden biri CNF-1 (Sitotoksik Nekrotizan Faktör-1)'dir³⁹. CNF' nin üriner sistem infeksiyonlarındaki spesifik rolü henüz tam olarak anlaşılamamış olup çoğunlukla alfa hemolizin ile birlikte üretilir. CNF-1 üretimi genel olarak üriner sistem enfeksiyonunu tetiklemekte olup, konakçının hücre fonksiyonlarında ve morfolojisinde bozukluklara, hücre siklusunun durmasına ve hücrenin lizisine neden olmaktadır. CNF-1, idrar kesesi epitel hücrelerine invazyon ve tutunmayı sağlayarak, nötrofil lökositleri öldürme kapasitesini artırır bu yüzden yangısal reaksiyonlara neden olarak üriner sistem epitel hücrelerini apoptozis ile öldürür^{36,40}.

2.1.8.5. Sitoletal Distending Toksinler (CDT)

İlk olarak 1987 yılında genç bir hastadan izole edilen patojenik *E.coli* suşundan izole edilmesi ile gözlemlenmiştir⁴¹.

1994 yılında Scott ve Kaper tarafından başka bir *E.coli* suşundan cdt-A, cdt-B, cdt-C olarak adlandırılan CDT operonu klonlanmıştır⁴². Bilinen bütün CDT' ler proteobakteri filumunda bulunan gama ve epsilon sınıfındaki gram negatif bakterilerce üretilir. CDT üreten bakteriler genellikle mide ve barsak gibi mukozal bölgelerde kalıcı infeksiyonlarla ilişkilidir. Bütün CDT toksinleri hedef hücre DNA'sına zarar verebilecek genotoksinler bulundurmaktadır. Cytolethal distending toksinler (CDT) Dnaz aktivitesi gösteren bazı gram negatif bakteriler tarafından üretilen heterotoksin sınıfındadır^{43,44,45}.

Bu toksinler belirli memeli hücrelerinde G2/M hücre siklusunda bloke olmasını tetikler. Etkilenen hücrelerin apoptozis ile ölmesine neden olur. CDT toksini üretenler genellikle kendisini ısrarla konak hücreye kolonize eden bakterilerdir^{46,47}.

2.1.8.6. Serum Direnci

Serumda bulunan komplement sistemi aktivitesi ile bakteriler etkisiz hale gelmektedir. Hücre duvarında lokalize olan Lipid A Antikor yokluğunda komplement sistemin klasik yolunu aktive eder. Bakterilerin duyarlılığı serumun öldürücü etkisine rağmen, serum inkubasyonundan sonra bakterilerin tekrar üremeleri veya dilüe edilmiş serum konsantrasyonlarında üretilmelerine bakılarak belirlenir. 1/16'dan büyük serum dilusyonlarının komplement aktivitesi için yetersiz olduğu saptanmıştır³⁶.

2.1.8.7. Kolisin

E. coli tarafından sentezlenen ve bir bakteriyosin olan kolisinler, *E.coli*' nin yakın

ilişkili olduğu, Shigella ve Salmonella gibi türler üzerinde öldürücü etkisi olan maddelerdir. Kolisinler bakterinin sitoplazmik membranında porlar açıp, endonükleaz etkisi göstererek kromozomal DNA'yı parçalayıp, protein, mürein ve lipopolisakkarit sentezini inhibe ederek etkilerini gösterirler³⁶.

2.1.9. Sınıflandırma

Horizontal DNA transferi yapabildiği için yüksek düzeyde fenotipik ve genotipik farklılıklar gösterebilen *E. coli* suşlarının sınıflandırılmasında, taksonomi alanında moleküler yöntemlerin kullanılmaya başlaması ile birlikte diğer birçok bakteri türünde olduğu gibi önemli değişimler yaşamış ancak bu değişimler bilinen *E. coli* klinik yansımalarını etkilemediği gibi *E. coli*'nin benzer bakteriler ile olan filogenetik uzaklığını da etkilememiştir. *E. coli*; prokaryotların sınıflandırılmasında Enterobactereceae ailesi içerisinde bir tür olarak yerleştirilmiştir²¹.

2.1.9.1. *E. coli*'nin Tiplendirilmesi

Mutasyon ve rekombinasyon olaylarına açık olan ve bu sayede farklı fizyolojik çevre şartlarına uyum sağlayarak çoğalmayı sürdürebilen *E. coli* suşlarının tip bazında konak mikroorganizma ilişkileri, enfeksiyon yetenekleri ile epidemiyolojik özelliklerinin tespiti ve kontrolü için fenotipik ve genotipik farklılıkları baz alan çok sayıda tiplendirme yöntemi kullanılmıştır. Bu bağlamda *E. coli* suşlarının hastalık oluşturma yetenekleri ve lokalizasyonları ile hücre duvarında eksprese ettikleri veya ortama sekrete ettikleri enzim ve toksinleri gibi markerlar, antibiyotik duyarlılık paternleri gibi fenotipik özellikleri ile klonal bazda ayırım gücüne sahip gendeki delesyon, insersiyon ve tek nokta mutasyonlarının gösterildiği genotipik özellikleri hedef alan yöntemler denenmiştir^{22,48}.

2.1.9.1.1. Fenotipik Yöntemler

Özellikle klinik öneme sahip birçok mikroorganizmanın tiplendirilmesinde olduğu gibi *E. coli* tiplendirilmesinde de başlangıçta fenotipe dayalı yöntemler yoğun olarak kullanılmıştır²².

Bu yöntemler düşük sensitivite ve spesifiteleri, laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliklerinin düşük olması uygulanmalarının sıklıkla özel ekipmanlara ihtiyaç duyması, tecrübeye ihtiyaç duyulması, pahalı ve zaman alıcı yöntemler olmaları sebebi ile ya terk edilmiş veya moleküler teknikler ile modifiye edilerek daha yüksek ayırım gücü ve tekrarlanabilirlik sağlanmaya çalışılmıştır. Bu yöntemler konak mikroorganizma ilişkisinin

temel alındığı klinik gözleme dayalı patolojik tiplendirme (patotip) ve bakterinin fizyolojik özelliklerinin baz alındığı tiplendirme olarak iki alt başlıkta toplanabilir^{48,49}.

2.1.9.1.1.1. Patotiplendirme

Bu tiplendirme kalın barsak florasının kommensal üyesi olan *E. coli*' nin kolonizasyon enfeksiyon oluşturma özellikleri dikkate alınarak yapılmıştır. Bu tiplendirmede

1-Kommensal *E. coli*,

2-İnPEC ve

3-ExPEC suşlar olmak üzere *E. coli* 3 grup içerisinde değerlendirilmiştir⁵⁰.

2.1.9.1.1.1.1. Kommensal *E. coli*

Bu grupta yer alan *E. coli* suşları sıcakkanlı vertebralı hayvanlar gibi insanlarda da kalın barsaklarda kommensal olarak yer alırlar. İntestinal sistem dışına çıkmazlar ve hastalık oluşturabilecek virülans faktörleri ya yoktur veya az sayıda ve etkisizdir. Ancak bu suşlar üriner kateter gibi invaziv enstruman uygulamalarında, üreter veya safra kanalı obstrüksiyonu gibi lokal savunma sistemlerinin etkisiz kaldığı hallerde veya genel immun sistemi baskılanmış hastalarda, perfore peritonitliler olduğu gibi yüksek bakteri yoğunluğu ile temas halinde intestinal sistem dışı enfeksiyonlardan primer patojen veya sekonder enfeksiyon ajanı olarak izole edilebilirler^{2,30}.

2.1.9.1.1.1.2. İnPEC

Bu grupta yer alan *E. coli* suşları kommensal suşlar gibi kolon ve çekumda yerleşirler. Ancak sahip oldukları farklı toksin ve enzimler ile alt intestinal sistemde sekretuar, inflamatuvar veya dizanterik özellikte ishalle seyreden hastalıklara sebep olurlar. Bu hastalıklar bazen bebek ve yaşlılarda yüksek mortalite ile seyredebilir bazende EHEC enfeksiyonlarında görülen hemolitik üremik sendromda (HUS) olduğu gibi ekstra intestinal klinik patolojilere yol açabilir. Patotiplendirme ile *E. coli* suşları sahip oldukları enfeksiyon mekanizmaları ile 6 alt tipe ayrılırlar^{2,30,51}.

1-Enterotoxigenic E. coli (ETEC): Su ve gıda hijyenine önem verilmeyen toplumlarda ve bu bölgelere seyahat edenlerde bütün yaş gruplarında görülen bol sıvı ve elektrolit kaybı ile seyreden ishallerden sorumludur⁵¹.

Turist ishallerinin % 30-70' inden bu patotipde yer alan suşlar sorumludur. Bu tip suşlar yüzeylerinde bulunan adezyondan sorumlu olan ve kolonizasyon faktör I (CF-I) veya koli yüzey proteinleri (CS) antijenleri olarak tanımlanan proteinler yardımı ile ileal lopa

enterositlerin yüzeylerine tutunurlar. Bu suşlar sahip oldukları plazmidde kodlanan ısıya duyarlı (TL) ve ısıya dirençli (TS) toksinler yardımı ile kolera benzeri sekretuvar tip ishallerde yol açarlar. Ribozomlarda 72 aminoasit uzunluğunda küçük bir pretoksin olarak üretilen TS toksin proteazlar yardımı ile kesilerek yaklaşık 19 aminoasitlik aktif STa parçası ile bağlanmadan sorumlu 42 amino asit uzunluğundaki STb parçalarına ayrılırlar. TL toksin kolera toksininde olduğu gibi bir aktif A parçası ile bağlanmadan sorumlu 5 B parçasından oluşan heteroheksamerik (AB₅) yapıya sahiptir. Kolera toksinine benzer mekanizma ile hücre içerisine transloke olan A parçası hücre içi siklik AMP miktarını artırarak hücre transmembran regülatör kanallarını (CFTR) sürekli olarak açık tutarak hücre dışına sıvı elektrolit kaybını yani sekresyonu artırır. Bu patotip içerisinde yer alan *E. coli* suşlarının tespitinde TL ve TS toksinlerin gösterilmesi, 25 kadar CS antijen ve serotipleme yöntemleri kullanılmışsa da bu yapıların stabil olmaması sebebi ile genel bir sınıflandırma mümkün olamamıştır^{52,53}.

2-Enteropathogenic E. coli (EPEC): Bu grup içerisinde yer alan *E. coli* suşları 1970'li yılların başlarına kadar kommensal flora bakterileri olarak kabul edilmişlerdir. Daha sonra ishallerde kalın barsak biyopsi örneklerinden izole edilerek, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki 2 yaş altı bebeklerde görülen ishallerden sorumlu tutulmuşlardır⁵⁴. Bu suşlar sahip oldukları patojenite adasında yer alan *eae* geninde kodlanan efektör protein intiminin yardımı ile mikrovilluslardaki enterositlerin dış membran proteinlerine saldırırlar ve mikrovillusların yapı ve fonksiyonlarını bozarlar⁵⁵.

Lümen absorpsiyon azalır, sıvı birikir, sekretuvar tip ishal başlar. Daha sonra kriptlerden villuslara hücre replasmanı durur, ülseratif lezyonlar oluşur. Bu grupta yer alan suşlar antijenik özellikleri ve virülans faktörleri yardımı ile diğer *E. coli* suşlarından ayrılırlar. Antijenik olarak 12 serogrup; O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 ve O158 EPEC patotipinde yer alır. Son yıllarda bu patotipin süreyansında *eae* gen polimorfizmide kullanılmaya başlanmıştır⁵⁶.

3-Enteraggative E. coli (EAEC): Turistik ishallerden ikinci derecede sorumlu patotipler bu grupta yer alır. Gelişmişlik farkı gözetmeksizin tüm dünyada özellikle bebek ve çocuklar arasında görülen bol sulu ancak zaman zaman mukus ve kanında karıştığı ishallerden giderek artan sıklıkta izole edildikleri bildirilmiştir⁵². Persistent ishallerden sorumlu tutulmuşlardır. İntestinal mukozaya kolonizasyon 55-65 MDa büyüklüğündeki pAA plazmidinde kodlanan aggregative adherence fimbriae yardımı ile olur. AAF dışında çok sayıda adezyon faktörü ve toksin kodlandığı düşünülmekte ancak patofizyolojik olaylar ve epidemiyolojik özellikler konusunda kesin bilgiler bulunmamaktadır^{52,57}.

4-Enterohemorrhagic E. coli (EHEC): Shiga toksijenik *E. coli* (STEC) ve Vero toksijenik *E. coli* (VTEC) olarak da tanımlanan bu suşlar fekal oral yolla bulaşır. Şigellosis benzeri dizanterik tablonun hakim olduğu hastalık çocuk ve yaşlılarda HUS’unda şekillenmesi ile mortal seyredebilir. Bu patotip içerisinde yer alan suşlarda yapı ve biyolojik aktivitesi ile *Shigella dysenteriae* ile homolog olan Vero hücrelerinde sitopatolojik etki yaratan, bakteriyofajla taşınan genomda kodlu bir sitotoksin olduğu tespit edilmiştir⁵⁸. Bu patotiplerde de genomda EPEC suşlarında görülen ve epitele saldırıyı düzenleyen intimin ve intiminin hücre içerisine translokasyonunu sağlayan proteinleri kodlayan *eae* ve *tir* genlerinin yer aldığı enterocyte effacement (LEE) bulunur. Bakteri enterosite saldırır ve adheze olur. Bu esnada sekrete edilen Shiga benzeri toksin ETEC TL toksini gibi 6 parçalıdır. Toksinin B₅ subünitlerinin oluşturduğu halka insan enterositlerde ve böbrek hücre yüzeyinde yer alan globotriaosylceramides (Gb3s)’ bağlanarak sitotoksik özelliğe sahip A subününün hücre içerisine girişini sağlar. A subüniti hücre ölümünü uyarır⁵⁹.

Bu patotipin ilk üyesi 1983 yılında dizanterik formda seyreden koliti olan bir hastanın gaitasından izole edilerek EHEC O157:H7 olarak tanımlanmıştır. Daha sonra etki mekanizması ve virülans faktörlerinin tespiti ile sinonim isimlendirmeler yapılmıştır. Fekal oral yolla et, et ürünleri ve salata ile de bulaşan bu patotipin 50 cfu miktarındaki bakteri ile enfeksiyon oluşturabilmesi EHEC enfeksiyonlarının kısa sürede sporadik epidemi ve pandemiye dönüşmesine yol açarken, HUS’ile ilişkisinin gösterilmesinde hastalığın boyutlarını intestinal sistemden renal sistem taşımıştır. Başlangıçta O157:H7 serotipi ile tanımlanan EHEC suşlarının bu serotiple sınırlı kalmadığı günümüzde insanlarda hemorajik enterokolit tablosuna yol açabilen 380 kadar serotipin tespit edildiği bildirilmiştir. Bu serogruplar içerisinde en sık izole edilenler arasında O26, O45, O91, O103, O111, O113, O121, O145 serogrubuna ait serotipler yer almaktadır. Bu karmaşayı engellemek için EHEC için bir seropatotipleme şeması oluşturulmuştur. Bu şemada klinik ile korele edilmiş SPT-A, SPT-B, SPT-C, SPT-D ve SPT-E olarak gruplandırılmış beş seropato tip bulunmaktadır. SPT-E dışındaki patotiplerin tamamı insanlardaki pandemik, epidemik veya sporadik olarak HUS ve hemorajik kolit vakalarından izole edilen serotiplerden oluşmaktadır^{60,61}.

5-Enteroinvasive E. coli (EIEC): Dizanterik formda ishalden sorumludur. Uzun süredir bu suşlar ile ilişkilendirilen vaka bildiri bulunamamıştır. Genomik ve fizyolojik özellikleri ile *Shigella*’lara benzerler. Kommensal *E. coli* suşlarıintestinal epitele invazyonu sağlayan Tip III sekresyon sisteminin kodlandığı 30 kb’lık gen kümesi ihtiva eden invaziv plazmid (pINV) kazanarak EIEC patotipine evrilirler. Bu suşlarda enterotoksijenik aktivite gösteren ve Sen olarak adlandırılan 63 kDa’luk bir başka toksin daha üretilir. EIEC patotipi

içerisinde O28ac, O29, O112ac, O121, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159, O164, O167 ve O173 serotipleri yer alır^{53,62}.

6-Diffusely adherent E. coli (DAEC): Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerdeki 1,5-5 yaş arası çocuklarda görülen sekretuar tip ishallere izole edilirler. Ancak akut başlayan ishallerin kronik inflamatuvar ishallerle dönüşme riski yüksek bulunmuştur. Patofizyolojik özellikleri ve virülans faktörleri hakkında çok şey bilinmemekle beraber Afa-Dr adezinler ailesine mensup mannos dirençli iki tip adezinin intestinal hücre adezyonunda etkili olduğu gösterilmiştir^{52,64}.

2.1.9.1.1.1.3. ExPEC

Sağlıklı bireylerin yaklaşık olarak %20' sinde alt intestinal sistemde asemptomatik kolonizasyon gösterebilen *Extraintestinal patojenik E.coli* patotipde yer alan *E. coli* suşları sahip oldukları virülans faktörleri yardımı ile gastrointestinal sistem dışına yayılabilir, kolonize olabilir ve hastalık oluşturabilirler⁵.

Özellikle üriner sistem enfeksiyonları, yenidoğan menejit, sepsis, hastane kökenli pnömoniler, deri yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit ve intra abdominal enfeksiyonlardan en sık izole edilen enterobacteracea ailesi mensubu gram negatif çomaklar bu patotipde yer alırlar. İnsanlar arasında artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak tanımlanan bu patotip suşlardan bazılarının özellikle kanatlılarda da intestinal sistem dışında hastalık oluşturması zoonotik karakterli bulaş riskinin akla getirmektedir¹³. Ancak bazı virülans faktörlerinin bazı ExPEC grupları için spesifik olduğunun iddia edilmesi bu ihtimali uzaklaştırmış, ExPEC suşlarının gerek kommensal gerekse İnPEC suşlarından filogenetik olarak farklı evrimleştiklerinin ispatı olarak kabul edilmiştir. Mesela Tsh ve CoIV plazmitleri sadece kanatlılardan izole edilen ekstra intestinal pathogenic *E.coli* (APEC) suşlarında bulunurken, K1 kapsülü yenidoğan menenjitinden sorumlu *E. coli* (NMEC) suşlarında, Sat ve Usp proteinleride uropathogenic *E.coli* (UPEC) suşlarında gösterilmiştir^{49,65}.

Diğer taraftan kısa süre önce yapılan iki farklı çalışmada sadece APEC suşlarında bulunduğu iddia edilen CoIV plazmidi için marker olarak kabul edilen *iss* geninin NMEC suşlarının tamamına yakınında da bulunduğu gösterilmiştir. ExPEC suşlarının tiplendirilmesinde filogenetik gruplandırılmanın en geçerli yöntem olduğu ve ExPEC suşlarının filogenetik olarak A, B1, B2 ve D olarak tanımlanan 4 major gruba dağıldıkları, grup sayısının C, E ve F minor gruplar ile 7'ye çıktığı bildirilmiştir.⁶ İnsanlarda hastalık oluşturan yüksek virülans genlerine sahip ExPEC suşlarının B2 grubunda yoğunlaştığı, düşük oranda da olsa D grubunda da yine insan patojenlerinin yer aldığı gösterilmiştir. A ve B1

filogenetik gruplarında ise kommensal veya düşük virülans gösteren suşlar yer alır. Ancak InPEC ve kommensal *E. coli* suşlarının ekstraintestinal enfeksiyonlardan da izole edilmiş olması ve *E. coli*'nin yüksek rekombinasyon yeteneği filogenetik sınıflandırma ve farklı filogenetik yapı ile evrimleşme iddiasını zayıflatmaktadır. ExPEC suşları arasında giderek artan plazmid aracılı beta-laktam direnci bu suşların klinik önemini artırmaktadır. Bu suşların tiplendirilmesinde serotipleme veya virülans faktörlerine göre yapılan tiplendirmenin çok uygun olmadığı belirtilmiştir^{38,55,67}.

2.1.9.1.1.2. Fizyolojik Özelliklere Göre;

Fenotipik tiplendirmede kullanılan yöntemlerin çoğu mikroorganizmaya ait biyokimyasal özellikler, antijenik yapı, sekrete edilen enzim ve toksinlerin özelliklerini temel almıştır. Biyokimyasal özelliklerin kullanıldığı yöntemler zaman alıcı, emek yoğun, pahalı ve düşük tekrarlanabilirlik gibi intrinsik sebeplerle kullanılmamakta olup, daha çok antijenik özelliklerin kullanıldığı serotipleme, antibiyotik duyarlılık paternleri, multilokus enzim elektroforezi ve toksin tiplendirilmesi kullanılmaktadır⁶⁸.

2.1.9.1.1.2.1. Serotiplendirme

E. coli suşlarının tiplendirilmesinde en sık kullanılan sistem bakterinin hücre duvarında eksprese edilen ve konakda spesifik antikor cevabına yol açan somatik O antijeni, H flagella antijeni ve K kapsül antijenine karşı grup ve tip spesifik antikorlar ile yapılan serotiplendirmedir. Kauffman tarafından 1940 yılında geliştirilen bu yöntem ile *E. coli* suşları LPS yapıdaki O antijenlerine göre 190' dan fazla serogruba ayrılırken, H antijenlerine göre 56, kapsül antijenlerine göre de 80' den fazla serotipe ayrılırlar⁶. Bu yöntemle yapılan tiplendirme fenotipik tiplendirme yöntemlerinin düşük ayırım gücü ve uygulanabilirliği gibi ortak sebeplerden dolayı kullanımı sınırlanmış, O antijenini kodlayan genlerin hedef alındığı PCR bazlı yöntemler ile kullanılabilirliği artırılmaya çalışılmıştır^{69,70}.

2.1.9.1.1.2.2. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

Bakterilerin fenotipik özelliklerine göre tiplendirilmesinde suda çözünür hücresel housekeeping enzimlerin mobil bir matriksde elektroforetik miğrasyonlarının kıyaslandığı MLEE yöntemi ilk olarak 1980' li yıllarda kullanılmıştır, MLEE' nin sınıflandırma ve epidemiyolojik ilişkiyi tespitiye yönelik diğer fenotipik yöntemlerden farklı, allel profillerinin tamamını elektroforetik tip olarak verebilmesidir. Bu yöntem hücre içi enzimlerin elektroforetik hareket yeteneğine göre karakterize edilmesini esas alır ve organizmaları

oluşturdukları elektromorfo tiplerine göre diğerlerinden ayırır. Bu elektroforetik tiplerden populasyon karakterizasyonu için objektif bir databaz oluşturulabilir. Genellikle, MLEE ile 20 kadar housekeeping enzimde doğal olarak yüksek değişkenlik gösteren lokuslar hedef alınır, bu sebeple teknik monolokus enzim elektroforezinden çok daha yüksek ayırım gücüne sahiptir^{71,72}.

Bakteriler bölünme, çoğalma, enerji transferi gibi hayati fonksiyonları düzenleyen çoğu yapısal işleve sahip izoenzimler üretmektedir. Bu izoenzimler farklı katalitik özelliği ve bu sebeple farklı elektroforetik hareket yeteneği gösterirler. Enzim çeşitliliği, primer izoenzim ve alloenzimler gibi direkt veya posttranslasyonel modifikasyonla oluşan sekonder izoenzimler gibi indirekt genetik faktörlere bağlıdır. İzoenzimler farklı hücre komponentlerinde dağılıbilir ve en azından iki farklı gen ile kodlanırlar. Benzer substrat spesifitesi olan enzimleri kodlayan multipl lokuslar gen duplikasyonları oluşumunu sağlar. Nokta mutasyonlarının sonucu olarak, duplike genlerin kodladığı aminoasitlerin kompozisyonu değişir ve elektroforezde farklı hareket yeteneğine sahip enzimler tespit edilir. Elektroforetik hareketteki farklılıklar şarj ve/veya büyüklük farklılığı ile oluşur. Bakterilerin mutasyona uğramayan genlerinde görülen farklı yapıların listelenmesi yaklaşımı MLEE yöntemiyle tespit edilmiştir⁷³.

Her ne kadar MLEE küresel bakteriyel epidemiyolojide önemli bir rol üstlenmiş olsa da teknik olarak elverişsizdir ve rutin araştırmalar için adapte edilememiştir. Ayrıca farklı laboratuvarlarda elde edilmiş sonuçların karşılaştırılması da zordur⁷⁴. Patojenik ve non patojenik *E. coli* suşları arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada *mdh* house keeping gen bölgesinin patojen suşlarla yakın ilişkili olduğu tespit edilmiştir. MLEE yöntemi ile *E. coli* 'nin tiplendirilmesine yönelik bir başka çalışmada da MLEE' nin ayırım gücünün genotipik yöntemlere kıyasla daha düşük olduğu gösterilmiştir⁷⁵.

2.1.10. Moleküler Teknikler

Rutin incelemelerde klasik fenotipik yöntemlerin önemini hala koruyor olmasına rağmen, genotipik yöntemler mikroorganizmaların tam olarak karakterizasyonu ve klonal düzeyde ayırt edilmesine katkıda bulunmaktadır. Gün geçtikçe gelişmekte olan teknoloji mikrobiyoloji alanına sunduğu yenilikler ile moleküler tanımlama teknikleri ve farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük yarar sağlamaktadır⁴⁸. Bu yöntemlerin etkin bir şekilde kullanımını maliyet ve deneyimli personel ihtiyacı önemli ölçüde etkilese de, avantajları ve dezavantajları ile bu yöntemlerden tüm dünyada yaygın olarak

yararlanılmaktadır. Son yıllarda ülkemizde de bu tür yöntemlerin kullanıldığı bilimsel araştırmalar hız kazanmıştır. Araştırmalarda en çok kullanılan moleküler tanımlama yöntemlerinin başında PCR, PCR-RFLP, PFGE (Darbeli Alan Jel Elektrofrezisi), AFLP, RAPD ve MLST protokolleri gelmekte olup bunlara her gün yeni bir moleküler teknik içeren çalışma eklenmektedir^{68,76,77,78}.

2.1.10.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PCR doğal DNA replikasyon işleminin temel bileşenleri kullanılarak DNA' nın tüpler içinde çoğaltılması ya da kopyalanması kısaca in vitro olarak DNA çoğaltma yöntemidir. Reaksiyonlar farklı sıcaklıklardaki denatürasyon, annealing ve extension olarak gerçekleşen üç olayın döngüler halinde tekrarına dayanmaktadır. PCR ile DNA fragmentleri çoğaltılabilir ve çok küçük örneklerden analizler için yeterli miktarlar elde edilebilir. PCR cihazı kullanılarak günümüzde pek çok marker belirleme yöntemi geliştirilmiştir⁷⁹.

PCR temelli olarak tespit edilen polimorfizmler;

- a) Kullanılan primer tipine,
- b) PCR koşullarının sıklığına (stringency),
- c) DNA parçacıklarının ayırımına ve
- d) DNA parçacıklarının belirlenme yöntemlerine bağılı olarak, rasgele (RAPD) ya da özgün (AFLP, RFLP ve mikrosatelit gibi) olabilmektedir^{79,80}.

2.1.10.1.1 Restriction Fragment Length Polimorphism (PZR-RFLP)

Restriksiyon endonükleazların çift iplikli DNA' yı özel tanıma bölgelerinden kesmesi esasına dayanan yöntemde, PZR ile çoğaltılan DNA bölgesi restriksiyon enziminin kesimine tabi tutulur ve oluşan DNA parçaları jel elektrofrezisi ile fragment büyüklüklerine göre ayrılırlar. Kesim sonucu oluşan kesim parçacık modellerine göre, kesim noktasının varlığı veya yokluğuna göre suşlar arasındaki farklılıklar tespit edilmektedir⁸¹.

Bu yöntemde suşlar arasında tespit edilebilen polimorfizm, enzim tanıma bölgesinde meydana gelen bir nükleotidin eklenmesi, bir nükleotidin eksilmesi veya bir nükleotidin değişmesi şeklinde ortaya çıkan nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır ve DNA' da oluşan mutasyonlar fragment sayısını değiştirmektedir. Bu yöntemde rutin PCR reaksiyonunda olduğu gibi uzun oligonükleotid primerler kullanıldığı için oldukça güvenilir bir çoğaltım yapılmaktadır. Çoğaltılan lokus ya da gen hakkında önceden bilgi sahibi olunmasının gerekliliği tekniğin bir eksikliği olarak ifade edilmektedir. Ayrıca çalışılacak

lokuslar için özgün primerlerin hazırlanması zaman ve maliyet gerektiren bir süreçtir. Çalışmanın içeriğine bağlı olarak kullanılacak olan kesim enzimleri de maliyeti artıran diğer unsurlar olarak ele alınmalıdır^{82,83,84}.

Genomda kodlama yapan ve yapmayan bölgelerde restriksiyon enzim tanıma bölgelerinin dağılımı farklıdır. Restriksiyon enzimleri 1000-20000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir ve sıklıkla *EcorI*, *ClaI*, *HindIII* ve *Hinfi* kullanılmaktadır. RFLP analizi ile *E. coli*' nin kromozomal ve ekstra-kromozomal DNA'sının restriksiyon profilleri belirlenmektedir. RFLP yöntemi kolaylıkla uygulanabilen duyarlı bir yöntemdir ancak enzim seçimi önemlidir. Çok sayıda ya da çok yakın bantları değerlendirmek mümkün olmayabilir. Az sayıda mikroorganizma ile çalışıldığında değerlendirme nispeten kolay iken, sayı arttıkça kıyaslanma güçleşmektedir^{83,84}.

2.1.10.1.2. Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

İlk kez 1982 yılında Schwartz ve arkadaşları tarafından iki değişken elektriksel alan kullanılarak 50 Kb' den daha büyük DNA moleküllerinin ayrıştırıldığı sistemi tanıtmasıyla ortaya çıkmıştır. Pulsed field jel elektroforez yöntemi ile total genomun bir restriksiyon enzimi ile hazmı sonucu ortaya çıkan bant polimorfizmi değerlendirilmektedir^{85,86}.

Düşük erime ısıyla agaroz ile sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakterilerin karıştırılarak küçük kalıplar içine dökülmesi ile uygulanan bu yöntemde deterjan ve enzim yardımı ile agaroz içindeki bakteri hücreleri parçalanarak DNA izolasyonuna tabi tutulmaktadır. Protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması lizis işlemi sonrası kalıpların yıkanması veya diyalize edilmesi ile sağlanmaktadır. Agaroz jel içinde kalan bakteriyel DNA kısmen az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır^{87,88}.

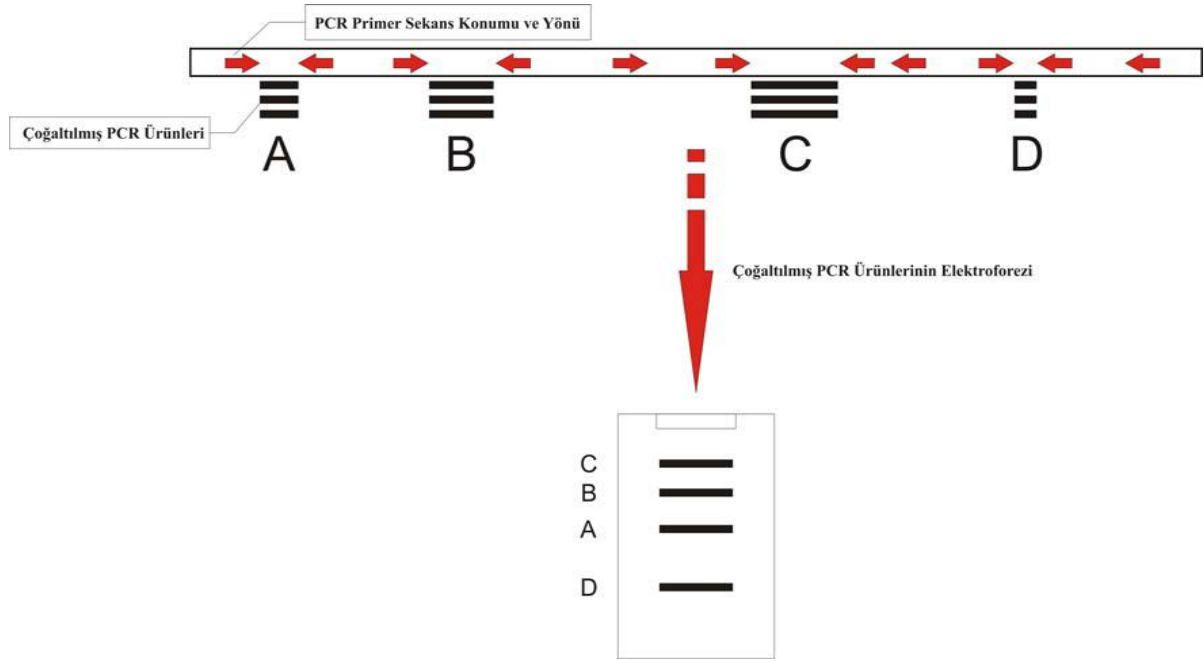
Kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilerek belli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. Elektrik akım yönünün periyodik olarak değiştirilmesi ve jeldeki DNA fragmentleri üzerine belirlenen aralıklarla düz akım gönderilebilmesi sonucu, 50kb' dan daha büyük DNA molekülleri bile kolaylıkla ayrıştırılabilmekte ve genomun tamamını değerlendirmek mümkün olmaktadır, Elektroforez sonrası jelin Ethidium bromid ile boyaması sonrası jeldeki DNA fragmentleri UV ışıkta görüntülenmekte ve elde edilen bant polimorfizmi gözle veya bilgisayar programları kullanılarak değerlendirilmektedir. PFGE ile elde edilen bant paternlerine göre hem kromozomal DNA' nın büyüklüğü tahmin edilebilmekte, hem de suşların klonal olarak

ilişkilendirilmeleri mümkün olmaktadır. PFGE oldukça yüksek ayırım gücü olan, sonuçları tekrarlanabilir ve kolay yorumlanabilir bir yöntem olduğu için genotipik identifikasyonda, özellikle hastane enfeksiyonlarının sürveyansında referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Yöntemin en önemli dezavantajları pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyması, oldukça fazla zaman/iş gücü gerektirmesi ve hala pek çok tür için standart protokollerin oluşturulamamış olmasıdır⁸⁹.

Bu yöntem türe spesifik bir yaklaşımı gerekli kılmaktadır ve genellikle tür içi ayırım veya ilişkilerin ortaya konulmasında zahmetli bir yöntem olarak kabul edilmektedir^{90,91}.

2.1.10.1.3. Randomly Amplified Polimorphic DNA (RAPD)

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polimorphic DNAs) ilk defa 1990' da Williams ve arkadaşları tarafından PCR temel alınarak rastgele seçilmiş primerlerin kullanılması ile ortaya çıkmıştır^{92,93,94}. (Welsh ve McClelland 1990; Williams vd. 1990). RAPD, bütün PCR temelli yöntemlerin en basitidir. RAPD markörleri, küçük (10 baz), %50' den çok Guanin ve Sitozin'den meydana gelmiş, rastgele seçilmiş primerler tarafından PCR ile çoğaltılmış nispeten daha kısa DNA fragmentlerinden (yaklaşık 200–2000 baz çifti uzunluğunda) oluşmaktadır. Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması sağlanır. Oligonükleotit primerleri polimeraz zincir reaksiyonunun anahtarındır. Oluşan parçaların sayısı ve büyüklüğü; primerin nükleotid dizisine ve kalıp DNA' da bu diziye komplementer dizinin varlığına bağlı olarak araştırılan genomu özgü bir desen (patern) verir. Bu sistemle, genom dizisi hakkında hiçbir şey bilinmeyen DNA'lar çalışılır. Primer bağlanmasıyla, polimeraz enzimi 5'→3' yönünde çalışarak DNA moleküllerini çoğaltır ve bunlar agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezi ile birbirinden ayrılıp uygun boyalarla boyanarak izlenebilir. (Şekil 2.1) Düşük sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında, seçilen primerler, kromozom üzerinde hem kendilerine özgün bölgelere, hem de özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirlerine olan uzaklıkları değişik olacağından agaroz elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayısı ve büyüklükleri de farklı olacaktır. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan bir mutasyon (delesyon veya insersiyon) bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır^{95,96}.



Şekil 2.1. RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)⁹⁵

Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır. Aynı bant profilini gösteren izolatlar filogenetik olarak ilişkili şeklinde yorumlanabilir. Bant profilleri benzer olan izolatlar yeni primerlerle tekrar test edilmeli veya diğer tiplene yöntemleriyle çalışılmalıdır. RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı çoğaltma değişkeni vardır. En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır. Tekniği etkileyen diğer temel değişkenler arasında; $MgCl_2$ konsantrasyonu, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denaturasyonu, primer karışımları önem taşımaktadır^{94,97}.

Bununla beraber PCR' da oluşan çelişkili sonuçlardan; yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir^{98,99}.

RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğundan bir RAPD tekniğini optimize etmek oldukça zor olabilmektedir¹⁰⁰.

Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden önce yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir^{100,101}.

Uygulanma kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntem diğer moleküler genetik yöntemlere göre daha hızlı ve daha ucuzdur. RAPD sistemi prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, taksonomik çalışmalar, genetik varyasyonun belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması ve salgınlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır¹⁰¹.

2.1.10.1.4. Amplified Length Fragment Polymorphisms (AFLP)

AFLP temelde RFLP ve RAPD-PCR tekniklerinin bir arada kullanıldığı ve tanımlamada özellikle RFLP ve RAPD-PCR' da olduğu gibi tür-suş düzeyinde oldukça yüksek oranda başarıya ulaşan ve son yıllarda diğer genotipik yöntemlere alternatif olarak sunulan bir tekniktir. Teknik, uygun koşullarda amplifiye edilecek olan kalıp DNA' yı yaratmak için DNA fragmanlarının uçlarına eklenmiş olan çift zincir DNA adaptörlerini tanıyan primerlerle seçici amplifikasyonu gerekli kıldığından elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir özellik sergilemektedir¹⁰².

AFLP çalışmalarında kullanılan restriksiyon endonükleazların her biri DNA üzerinde spesifik bir bölgeyi veya sekansı tanımakta ve kesim işlemi neticesinde DNA fragmanları meydana gelmektedir. Farklı hedef sekansları tanıyan pek çok farklı restriksiyon enzimlerinin eş zamanlı kullanımları farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA fragmanının oluşmasına sebep olacaktır. İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına pre-selektif amplifikasyon adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranır ve daha sonra PCR tekniği kullanılarak istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere artırılır¹⁰³.

Genelde her bir AFLP reaksiyonunda yaklaşık 30-80 restriksiyon fragmanı beraber amplifiye olduğundan ve denatüre koşullarda gerçekleşen jel elektroforez sisteminde tespit edilebildiklerinden teknik DNA polimorfizmin tespiti için oldukça güçlüdür ve tür-alt tür seviyesinde ayırım sağlayan bir tekniktir¹⁰⁴.

Tekniğin çok geniş bir alanı taraması, az miktarda iş gücüne gereksinim duyması, kısa sürede neticelenmesi ve yorumlanabilmesinin oldukça kolay oluşu en temel avantajlarından olup bu yeni tekniğe olan ilgiyi arttırmaktadır. Bununla beraber, analiz için gerekli olan DNA miktarı çok az olmakla beraber ulaşılan bilgi oldukça fazladır. Analiz öncesi DNA sekansına ait bir bilgiye gerek yoktur ve diğer tekniklere kıyasla AFLP' nin tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. Diğer yandan AFLP yöntemi diğer moleküler yöntemlere kıyasla zaman, maliyet duyarlılık ve özel beceriler istemesi gibi dezavantajlara da sahiptir¹⁰⁵.

2.1.10.1.5. Multilocus Sequence Typing (MLST)

MLST, moleküler biyolojide kullanımı giderek artan ve mikroorganizmaya ait birden çok lokusun tiplendirilmesinde kullanılan bir tekniktir. Yöntem ilk olarak 1990 yılında Prof. Dr. Brian Spratt, Martin Maiden, Dominique Caugant, Ian Feavers ve Mark Achtman tarafından geliştirilmiştir. MLST uygulamasından önce bakteri izolatları genellikle, jelde DNA fragmentlerine bakarak karakterize edilmekteydi. Fakat bu yöntemlerin çoğunda elde edilen verilerle laboratuvarlar arasında karşılaştırma yapmak çok zor olmaktadır. MLST, ilk olarak meningokoksik menenjit ve septisemiye neden olan, *Neisseria meningitidis* üzerinde çalışılmıştır. Daha sonra bu teknik, çok sayıda bakteriyel patojenin moleküler analizinde yaygın olarak kullanılabilir hale gelmiştir. Bu yöntemle virulan veya antibiyotiklere dirençli klonların tiplendirilmesi yanında, klonların evrimsel gelişimi de izlenebilmektedir¹⁰⁶.

MLST, temel metabolik fonksiyonu kodlayan “house-keeping” genlerdeki değişikliğin DNA dizi analizi ile gösterilmesidir. Yöntemde yedi “housekeeping” genin yaklaşık 450-500 baz çiftlik fragmentlerinin dizi analizi çıkarılmaktadır. Hedef gene ait her bir lokus için, her farklı dizilim farklı bir allel numarası ile gösterilmekte ve böylece suşa ait bir allelik profil tanımlanmaktadır. Tanımlanan allelik profiller, dizi tipi (sequence type=ST) olarak ifade edilmektedir. Belirlenen allelik profiller, MLST veri bankasındaki (<http://www.mlst.net>) bilinen allellerle kıyaslanarak, tespit edilen allel profilinin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi hakkında bilgi edinmek mümkün olabilmektedir. Elektronik ortamda saklanabilir verilerin oluşturulabilmesi MLST'nin en önemli avantajlarından birisidir. Bu sayede yeni izolatlar daha öncekilerle kolay bir şekilde karşılaştırılabilmekte ve verilerin daha kolay paylaşımı mümkün olabilmektedir^{106,107,108}.

Bir MLST çalışması için öncelikle kültür veya numunenin hazırlanması gerekmektedir. Sonra sırası ile DNA izolasyonu, MLST genlerinin PCR ile amplifikasyonu, PCR ürünlerinin saflaştırılması, dizi analizi ve sonuçların bilgisayar ortamında sorgulanması gerekmektedir. MLST çok fazla avantaja sahip olmasına rağmen çeşitli zorluklara da sahiptir. Bu zorlukların başında 7 allel üzerinde çok düşük hata oranına sahip dizi analizi yapma zorunluluğu gelmektedir. Çoğu laboratuvar için bunları sağlayabilmek oldukça pahalı ve zaman alan bir süreçtir^{106,107,109}.

2.1.11. Tedavi

ExPEC suşları, daha çok toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarından sorumlu olmakla birlikte, hastane enfeksiyonu etkeni de olabilmektedir. Toplumdan kazanılmış ve

yatan hastalarda gelişen çeşitli *E. coli* enfeksiyonlarında antibiyotik duyarlılıkları farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca bu enfeksiyonlarda tedavinin genellikle ampirik olarak başlatılması ve buna bağlı olarak da artan direnç problemi sebebi ile etkenlerin antibiyotik duyarlılıklarının bilinmesi gerekli hale gelmiştir^{110,111}.

Dünya genelinde çeşitli yöntemlerle yapılan çok merkezli çalışmalarda farklı coğrafik bölgelerde *E. coli* suşlarında GSBL üretiminin % 1-74 arasında değiştiği bildirilmektedir. Üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde en fazla kullanılan antimikrobiyaller amoksisilin, trimetoprim-sulfametoksazol, aminoglikozitler, sefalosporinler ve kinolonlardır^{112,113}.

Sistit tedavisinde birinci seçenek kotrimaksazoldür, ancak dirençli suşlarla gelişen tabloda tedavi alternatif olarak kinolon grubu ile (norfloksasin, ofloksasin, ciprofloksasin) sağlanmaktadır^{114,115}.

E. coli suşları arasında tüm önemli antibiyotik sınıflarına direnç mekanizmaları bulunmaktadır. Bu TEM, SHV, CMY, CTX-M türleri de dahil olmak üzere geniş spektrumlu β -laktamaz (penisilinler ve sefalosporinler) ve karbapenemaz (NDM-1, oksa-48 tipi) üretimini içerir. Özellikle CTX-M-15 ExPEC arasında en sık görülen GSBL' dir¹¹⁶.

Florokinolonlara ve Aminoglikozidlere direnç plasmid veya kromozomal olarak kodlanmış transferazlar, ya da hücre içine antimikrobiyal alımını azaltma mekanizmaları ile gerçekleşir. *E. coli* O25b:ST131 dahil yeni dirençli ExPEC klonlarının, hızlı yayılması, ekstra-intestinal hastalığın lokalize salgınlarına yol açtığı bilinmektedir. Antibiyotiğe dirençli *E. coli* suşları giderek yaygınlaşmaktadır¹⁰².

Antibiyotik dirençli ExPEC suşlarına bağlı İYE olguları tedavi süresini uzatmakta, prostat biyopsisi sonrasında komplikasyonları artırmakta ve bakteriyemili hastalarda kötü sonuç için bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle çalışmalar bakterinin antijenik yapılarını (O-polisakkarit) hedef alan aşı üretimine yönelmiştir^{117,118}.

2.1.12. Korunma ve Kontrol

E. coli doğal olarak barsak florasında bulunması nedeni ile korunması zordur. Ancak Kişisel temizlik, dezenfeksiyon, temiz su ve yiyeceklerin tüketilmesi gibi önlemler korunmada faydalı olması için gereklidir^{60,119}. Bunun yanı sıra şehirlerdeki altyapı sistemlerinin de uygun bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir⁶⁰.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmamızda ExPEC suşlarının atasal ilişkilerine PFGE ve RAPD yöntemleri ile ışık tutabilmek amacı ile Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı da dahil olmak üzere bölge hastanelerinde Eylül 2015-Nisan 2016 tarihleri arasında intestinal sistem dışı enfeksiyonlara ait klinik materyallerden izole edilen ve ExPEC suşlara ait CNF-1, CNF-2, CNF-3 ve CDT-1, CDT-2, CDT-3, CDT-4 toksin geninden en az bir tanesine sahip oldukları tip spesifik PCR ile gösterilmiş 155 *E. coli* suşu kullanılmıştır.

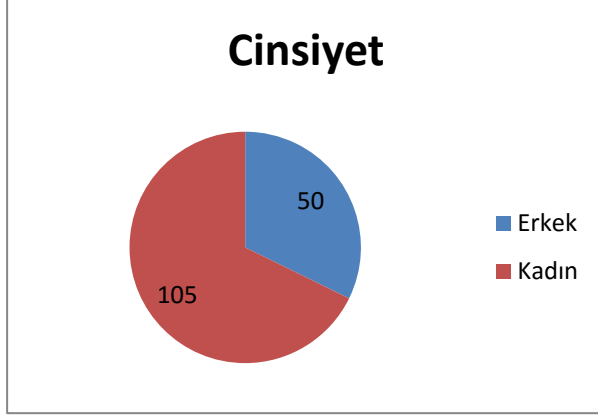
3.1. Test Suşlarının; Klinik Materyal, Hasta Cinsiyet Grupları ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Çalışmada kullanılan ExPEC suşlarının virülans özellikleri Anabilim Dalımızda sürdürülmekte olan bir başka proje de tanımlanmış olup, ExPEC tanımına uyan ve çalışmaya dahil edilen suşların 134' ü (%86.4' ü) UPEC suşları olup örneklerden bir tanesi steril vücut sıvılarından izole edilmiştir (Tablo 3.1).



Şekil 3.1. Hastaların Materyal Dağılımı

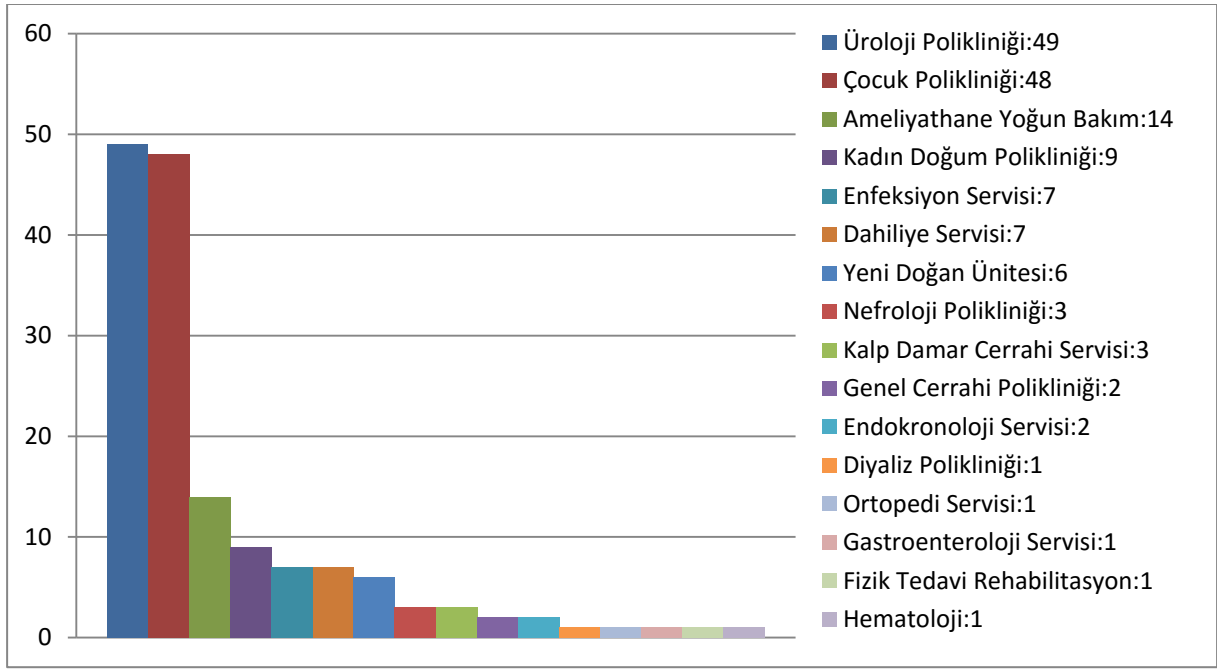
Test suşlarının, yoğunlukla kadın hastalardan izole edildiği (Tablo 3.1.) ve suşların % 31.6 (49/155)'sının üroloji servisindeki izlenen hastalara ait örneklerden izole edilmiş olduğu, bunu %30.96 (48/155) örnek ile pediatri servislerindeki hasta örneklerinden izole edilen ExPEC suşlarının izlediği görülmüştür (Tablo 3.1, Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Hastaların Cinsiyet Dağılımı

Tablo 3.1. Örneklerin Cinsiyete, Alındığı Klinik ve Polikliniklere Göre Dağılımı

Klinik ve Poliklinikler	Kadın	Erkek	Toplam
Çocuk Polikliniği	36	12	48
Üroloji Polikliniği	31	18	49
Genel Cerrahi Polikliniği	1	1	2
Yeni Doğan Ünitesi	4	2	6
Ameliyathane Yoğun Bakım	8	6	14
Enfeksiyon Servisi	3	4	7
Nefroloji Polikliniği	2	1	3
Hematoloji Servisi	-	1	1
Kalp Damar Cerrahi Servisi	2	1	3
Dahiliye Servisi	4	3	7
Endokronoloji Servisi	2	-	2
Kadın Doğum Polikliniği	9	-	9
Ortopedi Servisi	1	-	1
Gastroenteroloji Servisi	1	-	1
Fizik Tedavi Rehabilitasyon	1	-	1
Diyaliz Polikliniği	1	-	1
Toplam	105	50	155



Şekil 3.3. İzolatların Alındığı Klinik ve Poliniklere Göre Dağılımı

Çalışmaya dahil edilen ispatlanmış ExPEC suşlarının 81(% 52.25)' i 10 yaş altı çocuk hastalara 6 (%3.87)' sıda 70 yaş üstü hastalara ait izolatlardır.



Şekil 3.4 Çalışmaya Dahil Edilen Materyallerin Alındığı Hastaların Yaşlara Göre Dağılımı

3.2. Test Suşlarının Çoğaltılması, Fenotipik ve Genotipik Özelliklerine Göre İdentifikasyonu

Test suşları %5 kanlı agar, ENDO agar ve EMB besiyerine ekilip, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Suşlar IMVIC testi ile fenotipik olarak tanımlandıktan sonra genotipik olarak da *E. coli*' de yapısal olarak bulunan Beta-D-glukoronidaz enzimi kodlayan gen bölgesine PCR yöntemi ile bakılarak doğrulanmıştır.



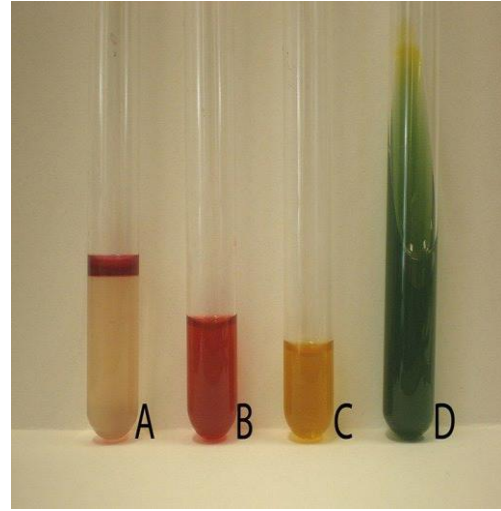
Şekil 3.5. Endo Besiyeri



Şekil 3.6. Kanlı Besiyeri



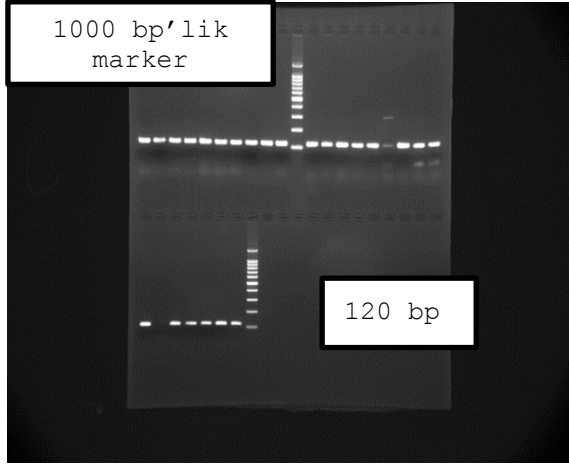
Şekil 3.7. EMB Besiyerinde *E.coli* 'nin Metalik Refle Vermesi



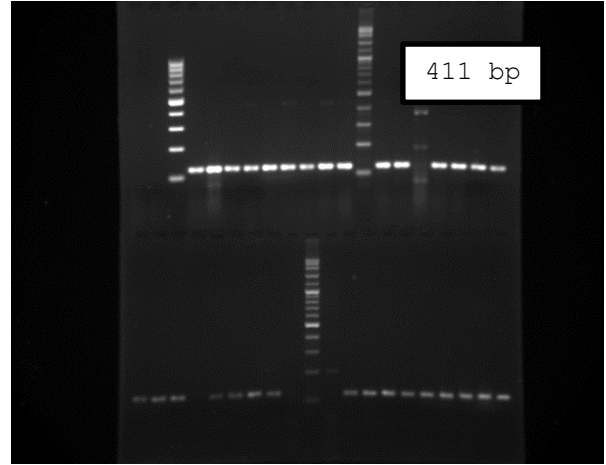
Şekil 3.8. *E. coli*'nin IMVIC test sonuçları

3.3. Çalışmaya Dahil Edilen ExPEC Suşları ve Virülans Genlerinin Doğrulanması

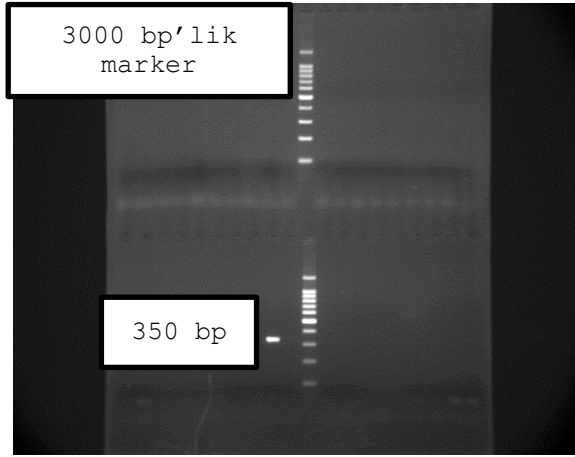
Çalışmaya dahil edilen ExPEC suşlarının Beta-D-glukoronidaz enzimi kodlayan 120 bp'lik gen bölgesi pozitif. Bu suşlar ExPEC suşlarında bulunan, CNF-1, CNF-2, CNF-3 ve CDT-1, CDT-2, CDT-3 ve CDT-4 toksin genleri gibi, en önemli 7 virülans gen bölgesinden en az birisi pozitif olan suşlar arasından seçilmiş ve çalışma esnasında doğrulanmıştır (Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14).



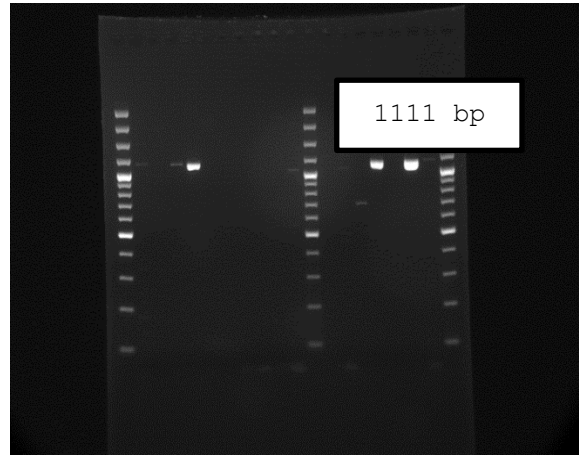
Şekil 3.9. 120 bp'lik Beta-D-glukuronidaz enzimi gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü



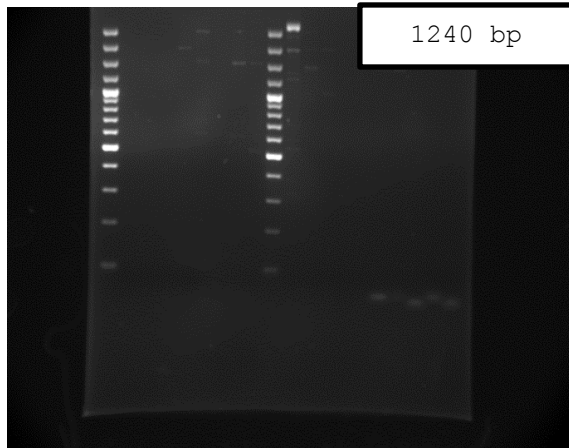
Şekil 3.10. 411 bp'lik CDT-1 toksin genini kodlayan gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü



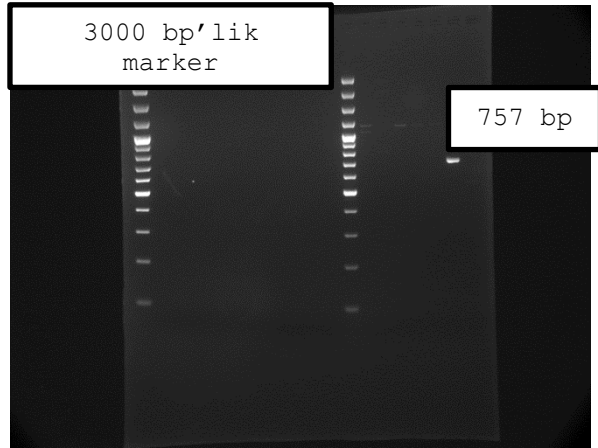
Şekil 3.11. 350 bp'lik CDT-4 toksin genini kodlayan gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü



Şekil 3.12. 1111 bp'lik CNF-1 genini kodlayan gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü



Şekil 3.13. 1240 bp'lik CNF-2 gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü



Şekil 3.14. 757 bp CNF-3 genini kodlayan gen bölgesine ait bant profilini gösteren jel görüntüsü

Bu suşlardaki tespit edilmiş virülans gen/gen kombinasyonları ile suşların izole edildikleri klinik materyallere göre dağılımı aşağıda verilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. ExPEC suşlarındaki CDT ve CNF Toksin Genlerinin dağılımı.

	İdrar	Aspirasyon	Yara	Kan	Diğer	Toplam
	134	9	4	7	1	155
CDT-1	16	4	2	1	0	23
CDT-2	1	0	0	0	0	1
CDT-3	1	1	0	0	0	2
CDT-4	2	0	0	0	0	2
CNF-1	2	0	0	0	0	2
CNF-2	9	0	0	0	0	9
CNF-3	4	0	0	0	0	4
İkili kombin.	45	3	0	1	1	50
Üçlü kombin.	31	0	2	4	0	37
Çoklu kombin.	23	1	0	1	0	25
Toplam	134	9	4	7	1	155

3.3.1. PCR Bazlı çalışmalar için DNA Ekstraksiyon ve Amplifikasyon İşlemlerinde Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar ve Enzimler

TE Buffer

Tris HCl (SIGMA T-3253): 0,1576 gr

EDTA (AMRESCO 0105-500): 0,0372 gr

Distile Su: 100 ml

(pH 8.0)

dNTP Karışımı

(25µmol her biri) (Fermentas R0181)

(2,5 mM herbiri, toplam 10mM)

dATP (100 mM): 25 µl

dCTP (100 mM): 25 µl

dGTP (100 mM): 25 µl

dTTP (100 mM): 25 µl

Distile su: 900 µl.

-20°C' de saklandı.

Marker

Gene Ruler 200bp DNA Ladder Plus (Fermentas SM0323)

Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas SM0323)

Gene Ruler 50bp DNA Ladder (Fermentas SM0323)

Taq DNA polimeraz enzimi

(Fermentas EP0402) 5U/ µl

10X PCR tampon çözelti

25 mM MgCl₂

10xTBE Solüsyonu

Tris-base (SIGMA T-1503): 108gr

Borik Asit (MERCK 1.00165.0500): 55gr

EDTA (AMRESCO 0105-500): 7,44gr

(pH 8.4) ve Ultra pure su ile 1000ml 'ye tamamlandı.

Etidyum bromid

Etidyum bromid (Sigma E8751) (1000X, 5mg/ml): 0,5g

Distile su: 100ml

Işıktan korumak için aliminyum folyo ile kaplandı. +4°C' de saklandı.

3.3.2. Genotipik İdentifikasyon

3.3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

1- Tür düzeyinde tanımlanan bakterilerden kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı.

2- Bir gece 37°C' de inkübe edilecek ve saflığı kontrol edilecektir.

3- Tek koloniden tekrar kanlı agar besiyerine, tek koloni pasajı yapılarak 37°C' de bir gece inkübasyona bırakıldı.

4- Saf olarak elde edilen *E. coli* kolonilerinden serum fizyolojik ile Mc Farland 5 bulanıklığında süspansiyonlar elde edilecektir.

5- Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 500µl ependorf tüpe alınarak, 13.000 xg de 3 dakika santrifüj edilecektir.

6- Üst sıvı(supernatant kısmı) atıldı ve pelletin üzerine 250 µl 1X TE buffer (20mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) eklendi

7- 1,5 mllik ependorflarda ekstraksiyonu yapılanaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

8- 95°C’ de, 15 dakika kuru ısı bloğunda bekletildi.

9- 1,5-2 saat -20°C’ de bekletilerek daha sonra tekrar 95°C’ de 15 dk ısı bloğunda bekletildi

10- 13.000 xg de 3 dakika santrifüj edildi.

11- Supernatandan 500 µl alınarak üzerinde çalışmak üzere 1,5 mllik yeni ependorflara alındı altta kalan sıvı atıldı.

3.3.2.2. PCR Yöntemi ile Beta-D-Glukorinidaz Enzim Aktivitesi ile CDT ve CNF Toksin Genlerinin Belirlenmesi

Beta-glukorinidaz enzim aktivitesini kodlayan gen bölgesi *uidA* için PCR yönteminde;

Reaksiyon Karışımı:

12.5µl Master Mix,

0.2 µl *uidA-F* ve 0.2 µl *uidA-R* primeri,

5 µl Kalıp DNA,

7.1 µl distile su ile totalde 25 µl PCR karışımı ile çalışıldı.

uidA Primerleri;

F-ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGT ve R-AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG
(120 bp)

PCR Reaksiyonu;

94°C’de 5 dakika İlk denatürasyon

94°C’de 1 dakika Denatürasyon

55°C’de 1 dakika Bağlanma(Annealing)

72°C’de 1 dakika Uzama(Extension)

72°C’de 10 dakika Son Uzama

4°C’ de ∞

} 30 siklusda gerçekleştirildi.

CNF toksin gen bölgeleri için PCR yönteminde;

Reaksiyon Karışımı;

12.5µl 2X Phire Green Hot Start II PCR Master Mix,
0.2 µl CNF-F ve 0.2 µl CNF-R primerleri,
5 µl Kalıp DNA,
7.1 µl distile su ile totalde 25 µl PCR karışımı ile çalışıldı.

CDT toksin gen bölgeleri için PCR yönteminde;

Reaksiyon Karışımı;

12.5µl Master Mix,
0.2 µl CDT-F ve 0.2 µl CDT-R primerleri,
5 µl Kalıp DNA,
7.1 µl distile su ile totalde 25 µl PCR karışımı ile çalışıldı.

CNF-1 Primerlerleri:

F-GGGGGAAAGTACAGAAGAATTA ve R-TTGCCGTCCACTCTCACCAGT
(1111bp)

CNF-2 Primerlerleri:

F-TATCATACGGCAGGAGGAAGCACC ve R-GTCACAATAGACAATAATTTTCCG
(1240bp)

CNF-3 Primerlerleri:

F-TAACGTAATTAGCAAAGA ve R- GTCTTCATTACTIONTACAGT
(757 bp)

CDT-1Primerlerleri:

F-CAATAGTCGCCACAGGA ve R-ATAATCAAGAACACCACCAC
(411 bp)

CDT-2 Primerlerleri:

F-GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG ve R-TTTGTGTTGCCGCCGCTGGTGAAA
(556 bp)

CDT-3 Primerlerleri:

F-GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG ve R-TTGTGTCGGTGCAGCAGGGAAAA
(555bp)

CDT-4 Primerlerleri:

F- CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC ve R-TTGCTCCAGAATCTATACCT
(350bp)

PCR reaksiyonu ;

94°C’de 5 dakika İlk denatürasyon
94°C’de 1 dakika Denatürasyon
55°C’de 1 dakika Bağlanma(Annealing)
72°C’de 1 dakika Uzama(Extension)
72°C’de 10 dakika Son Uzama
4°C’ de ∞

} 30 siklusda gerçekleştirildi.

PCR sonucunda oluşan bant profilleri CDT-1, CDT-2, CDT-3, CDT-4 ve *uidA* için %2’ lik agaroz jelde 120 V’da yaklaşık 1 saat yürütülerek görüntülendi ve değerlendirildi. CNF-1, CNF-2, CNF-3 için %1,8’ lik agaroz jelde tek tarak kullanarak 120 V’da yaklaşık 2 saat yürütülerek görüntülendi ve değerlendirildi.

3.4. Klonal İlişkinin *XbaI*-PFGE ve RAPD ile Araştırılması

İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkinin değerlendirilmesinde Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) yöntemi ile Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA(RAPD) yöntemi kullanılmıştır. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar, hastanelerde ve toplum içinde enfeksiyon etkenlerinin yayılma dinamiğini anlama ve kontrol etmede PFGE, moleküler epidemiyolojik yöntemler arasında tiplendirebilirliği, tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü ile öne çıkan, kullanılabilen uygun bir yöntemdir bununla birlikte RAPD yönteminin de kullanılabilirliği çalışmamızda değerlendirilmiştir.

3.4.1. XbaI-PFGE Protokolü

Çalışmamızda ExPEC suşlarının klonal ilişkisini tespit için kullandığımız ve altın standart olarak kabul edilen PFGE yönteminde klinik materyallerden en sık izole edilen gram negatif çomaklar olan *Klebsiella*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *Acinetobacter*(KEPA) için kullanılan protokol uygulanmıştır.

3.4.1.1. İzolatların Hazırlanması

1- Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden tek koloni ekimi yapıldı.

2- Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi.

3- Buradaki tek koloniden tekrar uygun besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

4- Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, tüplerde 2 ml Hücre süspansiyon tamponu (HST) ile süspansiyon edilerek bakteri yoğunluğu yaklaşık McFarland 5-6 bulanıklığı olacak şekilde ayarlandı.

5- 1ml bakteri süspansiyonu 13000g x 3dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1ml HST eklenerek ve pipetaj yapıldı.

3.4.1.2. İzolatların Agaroz Gömülmesi

1- HST içerisinde %2' lik low melting agaroz hazırlandı. 0.2 g agaroz, 10 ml'lik balona konularak üzerine 9 ml HST eklendi, yavaşça karıştırılarak agarozun erimesi sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutuldu, çıkarıldıktan sonra hafifçe karıştırıldı ve tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C' lik su banyosuna konuldu. %10 sodyum dodesil sülfat solüsyonundan 1 ml eklenerek ependorf tüplere, 200 µl dağıtıldı ve 45-50°C' deki su banyosunda (veya kuru ısı bloğunda) bakteri süspansiyonundan eklenene kadar bekletildi.

2- Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip altları bantla kapatıldıktan sonra buz kalıplarına oturtularak -20°C 15-20 dk bekletildi.

3- Bakteri süspansiyonundan (ependorflara dağıtılan agaroz miktarı ile eşit olacak şekilde 150-200 µl) 200 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 200 µl düşük erime ısılı agaroz bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı

4- Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından 100 µl hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına dağıtıldı.

5- Kalıplar, agaroz katılacağına kadar +4°C' de, 20-30 dakika bekletildi. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılması sağlanmaktadır.

3.4.1.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

1- 5 ml'lik steril kısa kapaklı tüplere, her örnek için 0,5 ml Lizis I solüsyonu konuldu ve 1,5mg /ml proteinaz K ve 2,5mg/ml lizozim eklendi.

2- İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan tüplere çıkarılarak üzerine hazırlanan lizis I solüsyonu eklendi ve 37°C' de, 1 saat çalkalamalı su banyosunda hafif yatık pozisyonda yerleştirilerek bekletildi.

3- Daha sonra içerisine 400ug/ml Protinaz K eklenen Lizis II tamponuna alınarak 55 °C' de 2 saat inkübe edildi.(su banyosunda)

3.4.1.4.Hücre Lizisinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkınması

1- Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletildi ve dikkatlice lizis solüsyonu aspire edildi.

2- Daha sonra agaroz kalıpları önce 4 ml ultrapür saf su ile 3 defa, 50°C' de, 15 dakika ve 4 ml 1XTE tamponuyla 3 defa, 50°C' de 15 dakika süre ile yıkandı ve TE' si değiştirildi.

3- Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu ve enzimle kesilene kadar +4°C' de muhafaza edildi.

3.4.1.5 Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın RE ile Kesilmesi

1- DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Parçalardan her biri, 100 µl 1x enzim tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C' de 10-15 dakika bekletir. (Diğer parçalar ise sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde +4 derece saklandı) 30 dk sonrasında sıvı aspire edildi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Agaroz Kalıplarda Kullanılan Enzim Tampon-Su Oranı

	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E.coli</i>
Steril enjeksiyon su	90ul	90ul	90ul	90ul
Enzim tamponu	10ul	10ul	10ul	10ul
Σ	100ul	100ul	100ul	100ul

2- Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Agaroz Kalıplarda Kullanılan Enzim, Enzim Tamponu ve Su Oranı

	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E.coli</i>
Steril enjeksiyon su		87ul	87ul	87ul
Enzim tamponu	10ul	10ul	10ul	10ul
Enzim	SpeI:	(ApaI:30U) 3ul	(XbaI: 30U) 3ul	(XbaI: 30U) 3ul
Σ	100ul	100ul	100ul	100ul

3- Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 30°C’ de 4 saat inkübe edildi.

4- İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

5- Kalıplar elektroforez için hazır hâle getirildi.

3.4.1.6. Elektroforez Jelinin Hazırlaması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi

1- 100 ml 0.5x TBE (44.5 mM Trisma base, 44.5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8.0) içinde %1.1’ lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı.

a-1,1 g “Pulsed-Field Certified Agarose” balona konuldu.

b- Üzerine 100 ml 0.5 x TBE eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.

c-Balonun ağzına aliminyum folyo kapatılarak mikrodalgada önce 60 saniye tutuldu daha sonra, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı ve tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutuldu.

d-Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C’ lik su banyosuna konuldu.

2- Agaroz dökülecek kaset hazırlanarak, sızdırmaması için etrafı bantlandı. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu.

3- RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Tarağın iki kenarına ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar veya moleküler standart marker yüklendi.

4- Kurutma kâğıdı veya kağıt havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alınarak maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.

5- Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz dikkati bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü.

6- Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı.(İstenirse çukurlar %1' lik agarozla doldurulabilir.)

7- Agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mililitre 0.5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilerek Elektroforeze tabi tutuldu.

Tablo 3.5. Elektroforez Şartları

Elektroforez Şartları	<i>E. coli</i> ,<i>Acinetobacter</i>, <i>Klebsiella</i>
İnitial time	5sn
Final time	30sn
Voltaj	6v/cm
Süre	20 saat
Akım	150-160 mA

3.4.1.7. Sonucun Analizi

1- Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınıp 20 dakika boyandı.

2- Sonra UV ışığı altında görüntülendi.

3- Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.

4- GelCompar II yazılım sistemi (version 5.0 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1, 7, 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1,5 olarak alındı. Bant profilleri %80 benzerlik gösteren izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi ve büyük harfle isimlendirildi. Aynı küme içerisindeki subtipler ise rakamlar ile gösterildi.

3.4.1.8. PFGE Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

Pulsed field jel elektroforez yönteminde kullanılan solüsyonlar laboratuvarımızda aşağıda tarif edildiği gibi hazırlandı.

a-Hücre süspansiyon Tamponu (1x/100ml) pH:8,0

100mM Tris-HCl 1,576gr

100mM EDTA 3,722gr

100 ml ultra pure su ile tamamlanır. NaOH pelleti ile pH ayarlanır.

b-Lizis I solüsyonu (1x/100ml) pH:8,0

50mM Tris-HCl 0,788gr

50mM EDTA 1,861gr

100 ml ultra pure su ile tamamlanır. NaOH pelleti ile pH ayarlanır.

****PFGE kalıpları bu solüsyonda lizisten önce 2,5mg/ml lizozim ve 1,5mg/ml Proteinaz K eklenmelidir.

c-Lizis II solüsyonu (1x/100ml) pH:8,5

500mM EDTA 18,61gr

100 ml ultra pure su ile tamamlanır. Ancak EDTA'nın çözülebilmesi için NaOH pelleti eklenir. pH 8,22ye ayarlandığında 1gr N-lauryl sarkozin eklenir.

****Bu solüsyona 400ug/ml proteinaz K eklenmelidir.

d-TE solüsyonu (1x/1000ml) pH:7,6

10mM Tris-HCl 1,576gr

0,1mM EDTA 0,0372gr

100 ml ultra pure su ile tamamlanır. NaOH pelleti ile pH ayarlanır.

e-TBE solüsyonu (10x/1L)

Tris base 107,8gr

Borik Asit 55gr

EDTA 7,44gr

1L ultra pure su ile tamamlanır.

f-%10 SDS Solüsyonu

3.5. Randomly Amplified Polimorfik DNA(RAPD)

Yanmen Wang ve arkadaşlarının metoduna uygun olarak yapılan RAPD yöntemi ile bakteri DNA'sı random seçilmiş OPA-9(10 Dimerli) ,OPA-9(11 Dimerli) ve OPA-11 primerleri ile düşük annealing ısısında amplifikasyona tabii tutulmuştur. Non spesifik olarak

DNA üzerinde random bağlanan oligolarla elde edilen amplikonlar agaroz jelde elektroforeze tabii tutularak elde edilen amplikonların polimorfizmine göre klonalite tayini yapılmıştır.¹³³.

3.5.1. OPA-9, OPA-10, OPA-11 Primerleri ile Amplifikasyon

E. coli izolatlarından elde edilen DNA ekstraktları, random amplifikasyon

için kısa oligolardan hazırlanan;

OPA-9 (10 dimerli); 5'-GGG TAA CGC C-3'

OPA-9 (11 dimerli); 5'- GGG TAA CGC CG -3'

OPA-11; 5'-CAA TCG CCG T-3' primerleri kullanıldı.

Reaksiyon Karışımı;

5 U Taq Polymerase 1 µl,

10x Taq Polymerase PCR buffer 2,5 µl,

Her bir dNTP'den (2mM) 2,5 µl,

MgCl₂ 3,5 µl,

1 µl primer (100pmol/ µl stok solüsyondan),

5 µl DNA,

(100ng/µl) ve steril distile su ile toplam 25 µl'ye tamamlanan PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cycler) aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı:

PCR Reaksiyonu;

94°C'de 4 dakika İlk Denaturasyon

94°C'de 1 dakika Denaturasyon

36°C'de 1 dakika Bağlanma (Annealing)

72°C'de 1 dakika Uzama (Extension)

72°C'de 10 dakika Son Uzama

4°C 'de ∞

} 44 siklus

3.5.2. Fragmentlerin Agaroz Gel Elektroforezi ile Tespiti

Amplifikasyon işlemi sonrasında oluşan farklı büyüklükteki fragmentlerin varlığını gösterebilmek amacı ile amplikonlar elektrikli ortamda agaroz jel içerisinde migrasyonel seperasyona tabii tutuldu. Bu işlem aşağıdaki şekilde yapıldı;

1. % 2'lik agaroz jel 1xTBE solüsyonu ile hazırlandı.

a. Bir balon içerisine tartılarak konulan 2 gr agaroz (Sigma Agarose A5093-500G) üzerine 100 ml 1xTBE ilave edildi.

- b. Karışım homojenizasyon sağlanana kadar mikrodalga fırında eritildi.
 - c. Oda ısısında 60°C'nin altına düşmeyecek şekilde bekletilerek soğutuldu.
 - d. Eriyik haldeki agaroz içerisine 10 mg/ml'lik etidyum bromid stok solüsyonundan 5 µl eklenerek, % 0,5 mg/ml son konsantrasyon elde edildi.
 - e. Hazırlanan % 0,5 ethidium bromid içeren % 2' lik agaroz jel, önceden hazırlanmış ve tek tarak yerleştirilmiş olan jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.
 - f. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek jel kalıbının katılaşması sağlandı.
 - g. Jel kalıbı elektroforez tankına (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.
2. Örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerindeki 1µl loading buffer tamponuna karıştırıldı. İlk ve 7. kuyuya DNA markeri (Fermentas O'Range Ruler,100bp Ladder, Lot: 0302) ve diğer kuyulara her birine bir örnek olacak şekilde bu karışımdan yüklendi.
 3. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) çalıştırılarak 120 V akım verildi. Yaklaşık 1saat 40 dk olmak üzere Brom fenol mavisinin jeldeki migrasyonu takip edilerek, boya jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

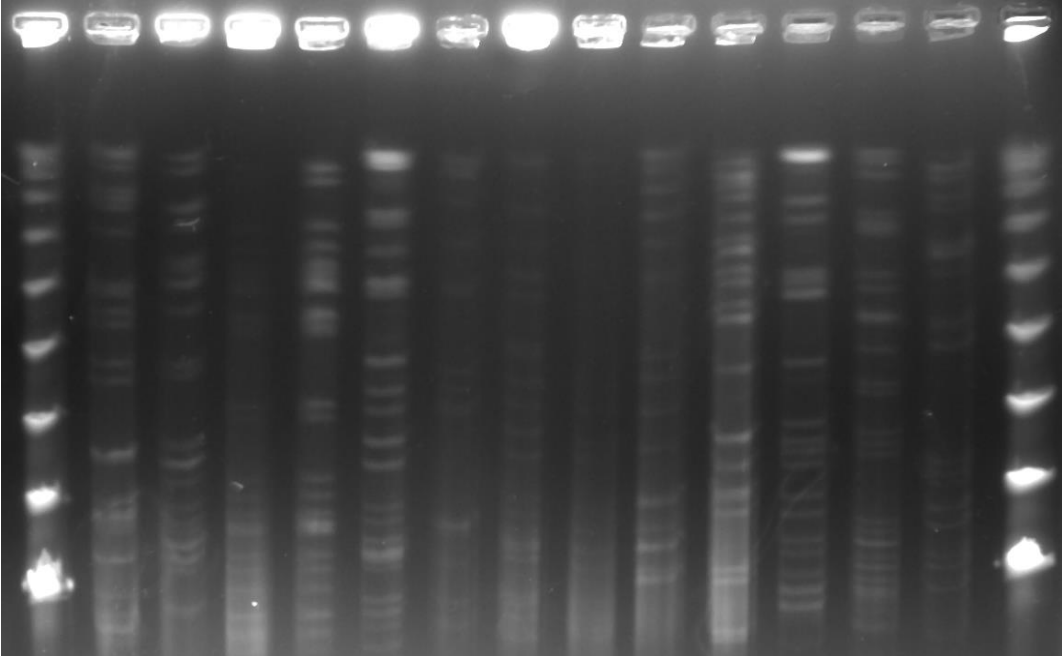
3.5.3. Görüntüleme ve Bant Profillerinin Analizi

- 1- Elektroforezden sonra jel UV ışığa altında görüntülendi. Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.
- 2- GelCompar II yazılım sistemi (version 5.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan 2 adet standart (1.ve 7. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" kullanılarak bant profillerinin, dendrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı.

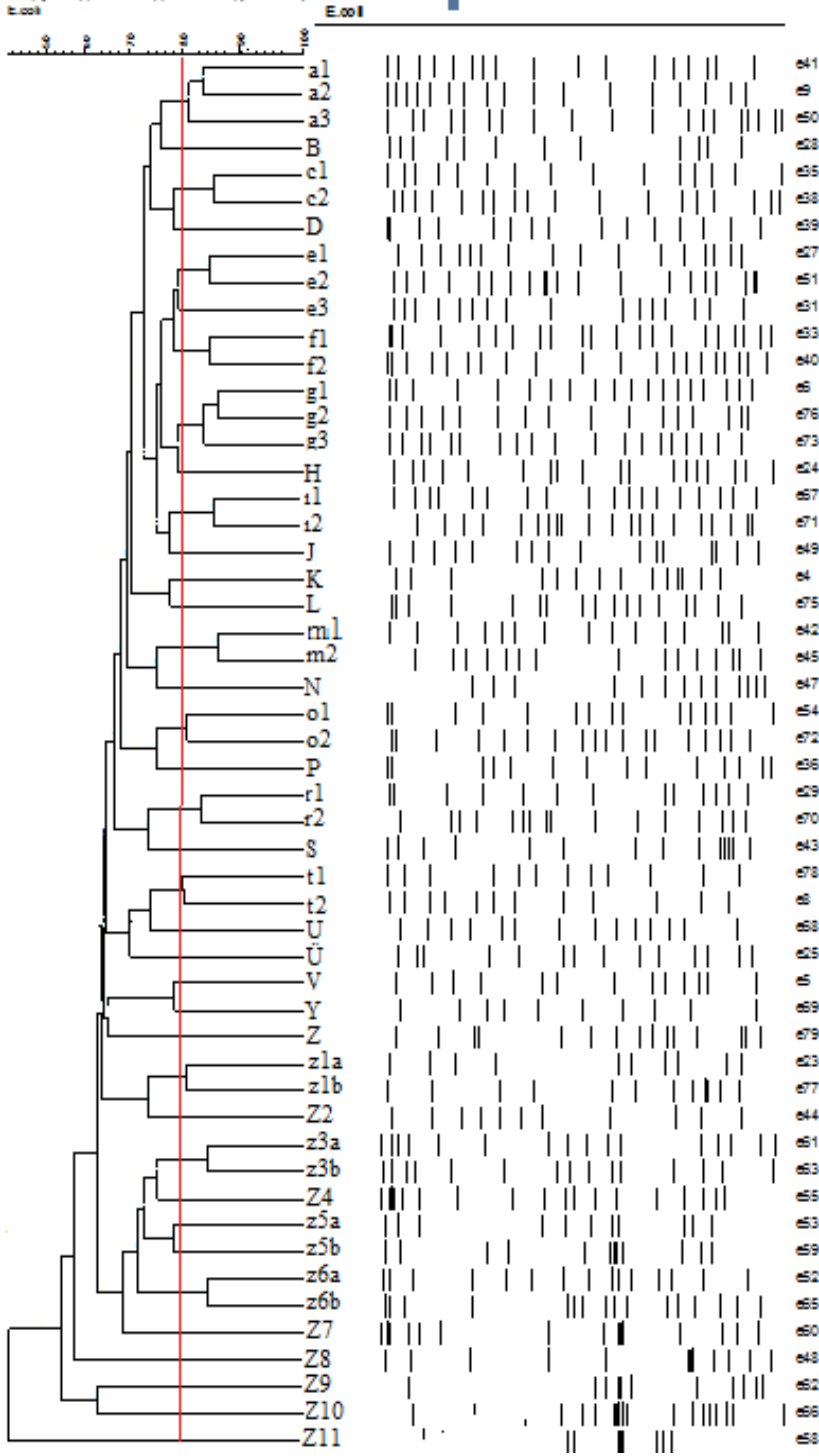
4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarında çeşitli klinik materyallerden izole edilen ve PCR ile en az bir olmak üzere ExPEC izolatları ile ilişkilendirilen virülans genlerin tespit edilmiş (Önen C. Doktora tez çalışması) 155 *E. coli* suşu klonal ilişkilerinin tespiti yönünden PFGE ve RAPD yöntemleri ile değerlendirildiği çalışmamızda:

ExPEC olduğu bilinen 155 suşun filogenetik ilişkileri tespit etmek amacıyla, XbaI-PFGE ile yapılan tüm genom DNA fragment polimorfizm analizinde % 80 benzerlik baz alındığında test izolatlarının en büyüğü 5 üyeli olmak üzere 106 büyük küme, % 85 benzerlik baz alındığında ise en büyüğü 3 üyeli olmak üzere 128 büyük küme içerisine dağıldıkları görüldü. Ancak % 85 benzerlik ile elde edilen küme sayısının daha diskriminatif olmasına karşılık kıyas zorluğuna yol açacağı düşüncesi ile % 80 benzerliğin esas alındığı PFGE sonuçları klonal ilişkilendirmede kullanıldı (Şekil 4.2). Böylece test suşlarının iki tane (Z23 ve Z38) 5 üyeli, 8 tane (A,E,G,Z60,Z64,Z80,Z83 ve Z88) üç üyeli ve 15 tane de iki üyeli (C,F,I,M,O,R,Z2,Z3,Z5,Z6,Z24,Z56,Z58,Z73 ve Z76) , olmak üzere kümelendikleri görüldü. Buna karşılık 81 suş tek üyeli kümelere dağıldı.



Şekil 4.1. PFGE Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



Şekil 4.2. PFGE Sonucu Elde Edilen Dendrogram

Üç farklı kısa oligo dizisi OPA-9 (10 dimerli), OPA-9 (11 dimerli), OPA-11 primerleri kullanılarak yapılan ExPEC suşlarının RAPD yöntemi ile klonal kümelerinde de % 85 benzerlik esas alındığında, 11 bp'lik OPA-9 primeri ile 95 küme oluştuğu, bu sayıdaki kümenin ayırım gücü yüksek olmasına karşılık kullanılabilirliğinin düşük olacağından elde edilen sonuç değerlendirme dışı tutuldu. Diğer iki primer ile sırası ile;

OPA-11 primeri ile 17 küme elde edilmiş, bunlar;

53 elemanlı G,

44 elemanlı H,

31 elemanlı İ,

6 elemanlı N,

4 elemanlı Ö,

alt kümeleri ve birer elemanlı diğer alt kümelere oluşmuştur.

OPA-9 (10 dimerli) primeri ile 59 küme elde edilmiş bunlar;

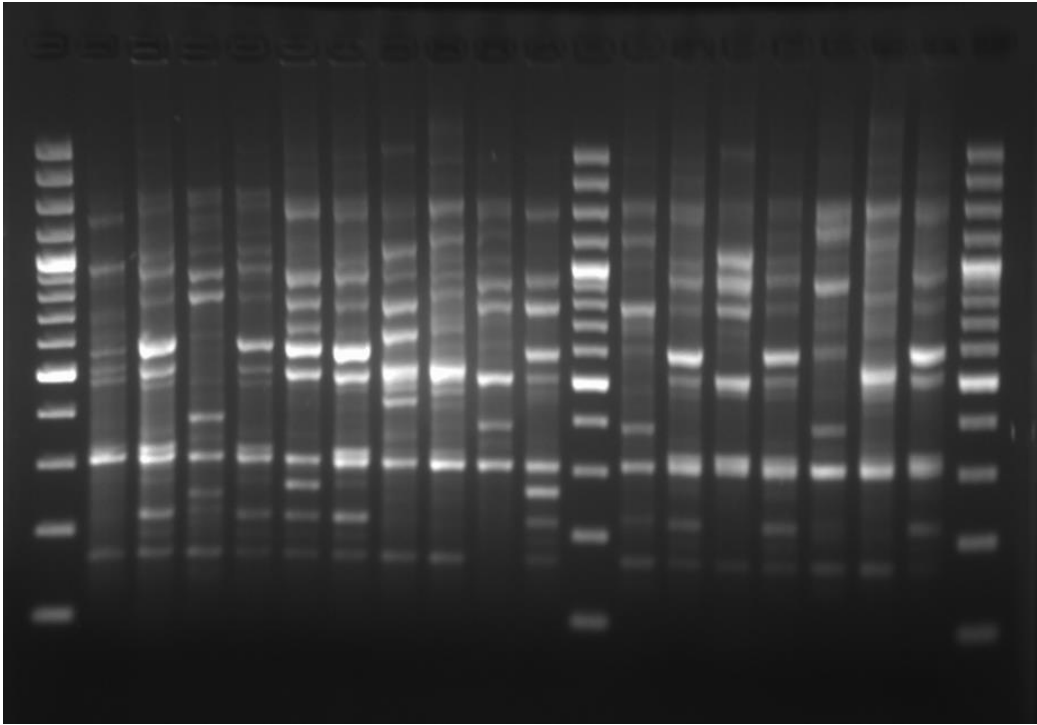
8 elemanlı; C, Z₅,

7 elemanlı; H, Z₃, Z₆, Z₇,

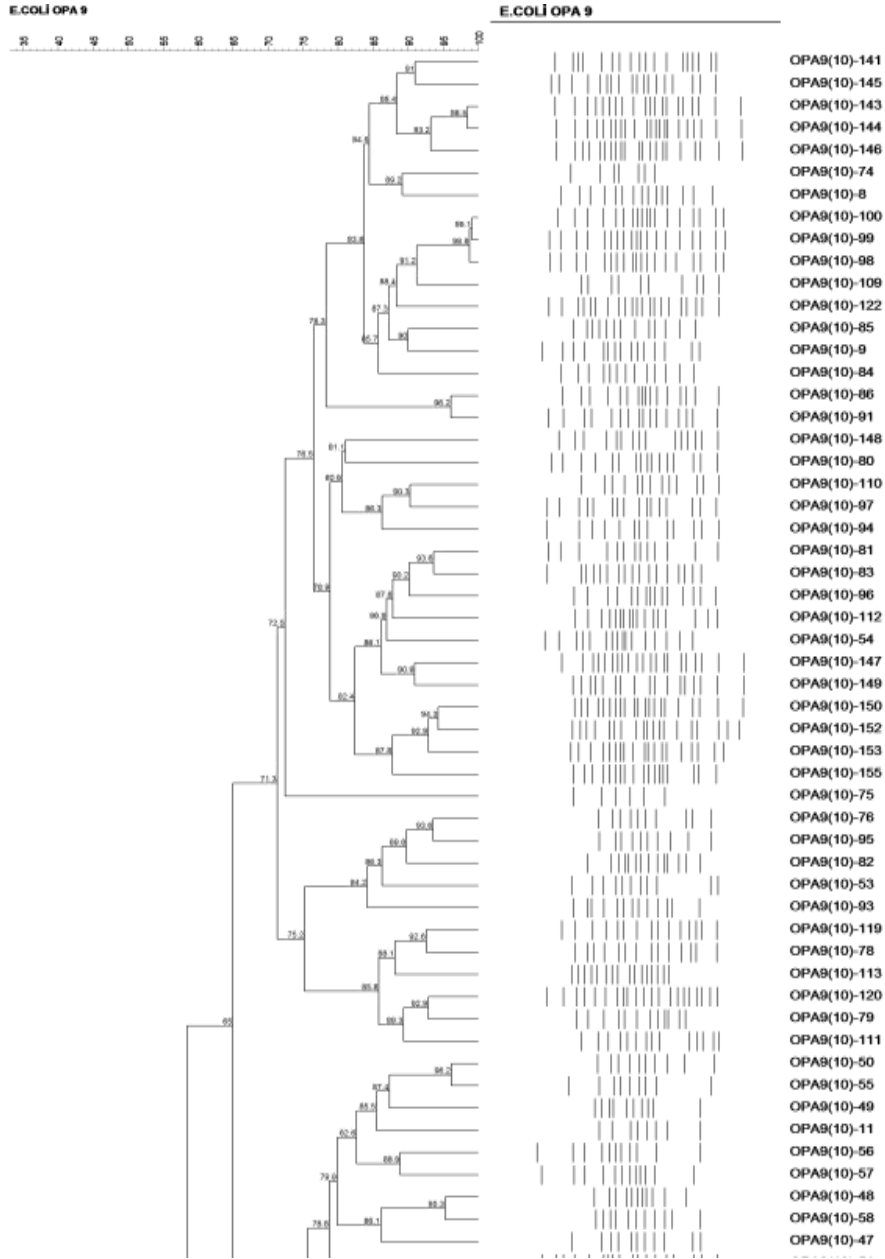
6 elemanlı; L kümesi,

5 elemanlı; A, İ, T, Z₉,

4 elemanlı; I, J, M, Ş, Z₂₁



Şekil 4.3. RAPD Sonucu Elde Edilen Bant Profilleri



Şekil 4.4. RAPD Sonucu Elde Edilen Dendogram

ExPEC suşlarının 2 farklı primerin kullanıldığı RAPD ve XbaI-PFGE ile elde edilen klonal kalıpları kullanılan sistemlerin kıyaslanma ve kabul edilebilirliği yönünden karşılaştırıldı (Tablo 4.1.);

Tablo 4.1. OPA-9 Primeri ile Elde Edilen Kümeler ve Altkümelerin OPA-11 Primeri ile Elde Edilen Alt Kümelerdeki Karşılığı Gösterilmektedir.

OPA-9*	Alt Küme	Suş No	PFGE	OPA-11	OPA-9*	Alt Küme	Suş No	PFGE	OPA-11
A	a1	141	z23a	g15	M	m1	50	a3	h17
	a2	145	z24a	g22		m2	55	z23b	m1
	a3	143	z76b	g45		m3	49	z23c	k2
	a4	144	z60a	g46		m4	11	z23e	i6
	a5	146	z80a	g47	N	n1	56	z24b	c1
B	b1	74	z60b	g2	O	n2	57	J	h33
	b2	8	t2	i9		o1	48	Z8	k1
C	c1	100	z64a	h4	Ö	o2	58	Z11	h25
	c2	99	z23d	h5		o3	47	N	g3
	c3	98	z73a	h41		ö1	51	e2	h27
	c4	109	z80b	g17	R	ö2	52	e3	h30
	c5	122	Z12	g6		r1	154	Z4	g37
	c6	85	z83a	a	r2	123	z56a	g7	
	c7	9	a2	i10	S	s	139	z60c	g5
	c8	84	z83c	e	Ş	ş1	105	z38a	g13
D	d1	86	z58a	h34		ş2	107	z38b	g9
	d2	91	z58b	h14		ş3	103	z38d	h38
E		148	z73b	g49		ş4	88	z38e	h11
F		80	z64c	h8	T	t1	106	z76a	g23
G	g1	110	z80a	g24		t2	108	Z16	g25
	g2	97	z80b	h2		t3	104	Z35	h44
	g3	94	z80c	h1		t4	101	Z27	h39
H	h1	81	Z15	h9		t5	8	Z33	b
	h2	83	Z47	h16	U		124	z64b	g26
	h3	86	Z34	h34		ü1	18	Z81	n5
	h4	112	Z49	g29	Ü	ü2	7	Z31	i13
	h5	54	z88a	h21		ü3	73	Z46	g1
	h6	147	z88b	g44		V		19	Z13
	h7	149	z88c	g52	Y	y1	20	g1	i8
I	i1	150	Z48	g32	Z	y2	6	g3	i4
	i2	152	Z18	g34		z1	22	Z36	n3
	i3	15	Z14	g35		z2	5	V	i12
	i4	15	Z78	g36		z3	71	i2	h20
İ		75	L	f	Z ₁		72	o2	g8
J	j1	76	g2	h18	Z ₂	z ₂ 1	46	Z17	g4
	j2	95	Z79	h40		z ₂ 2	59	z5b	g79
	j3	82	Z19	h15	Z ₃	z ₃ 1	10	Z32	i5
	j4	53	z5a	h32		z ₃ 2	12	Z77	i29
K		93	Z29	h12		z ₃ 3	15	Z72	o1
L	l1	119	Z40	g51		z ₃ 4	13	Z20	i7
	l2	78	t1	d2		z ₃ 5	114	Z30	g18
	l3	113	Z74	g16		z ₃ 6	115	Z37	g10
	l4	120	Z75	h42		z ₃ 7	117	z6a	g14
	l5	79	Z	h36	Z ₄		118	Z50	g20
	l6	111	Z21	g28					

OPA-9*	Alt Küme	Suş No	PFGE	OPA-11	OPA-9*	Alt Küme	Suş No	PFGE	OPA-11	
Z ₅	z ₅ 1	131	Z89	g48	Z ₁₃		31	Z67	i27	
	z ₅ 2	16	z3a	i17	Z ₁₄	z ₁₄ 1	36	P	ö2	
	z ₅ 3	45	z3b	i31		z ₁₄ 2	37	Z39	-	
	z ₅ 4	63	Z90	-		z ₁₄ 3	35	c ₁	ö1	
	z ₅ 5	43	S	İ2	Z ₁₅	z ₁₅ 1	38	c ₂	İ1	
	z ₅ 6	17	Z71	n4		z ₁₅ 2	39	D	i14	
	z ₅ 7	129	Z53	ı	Z ₁₆	z ₁₆ 1	41	a1	i3	
	z ₅ 8	130	Z70	g50		z ₁₆ 2	42	m1	i1	
Z ₆	z ₆ 1	137	Z54	g39	Z ₁₇	z ₁₇ 1	1	Z55	j	
	z ₆ 2	138	Z82	g40		z ₁₇ 2	27	e1	n2	
	z ₆ 3	132	Z22	g30	Z ₁₈		26	Z68	n1	
	z ₆ 4	134	z38c	g41			62	Z9	h24	
	z ₆ 5	135	Z59	g42	Z ₁₉	z ₂₀ 1	61	m2	h22	
	z ₆ 6	133	Z87	g31		z ₂₀ 2	68	U	h23	
	z ₆ 7	136	Z41	g38	Z ₂₀		28	B	i21	
Z ₇	z ₇ 1	116	Z69	g19	Z ₂₂	z ₂₂ 2	66	Z10	c2	
	z ₇ 2	21	Z45	i26		z ₂₂ 3	29	r1	ö3	
	z ₇ 3	33	f1	ö4		z ₂₂ 4	30	Z28	i22	
	z ₇ 4	40	f2	i15	Z ₂₃	z ₂₂ 5	127	Z57	g43	
	z ₇ 5	10	Z61	i5			128	Z42	g53	
	z ₇ 6	14	Z52	i11		Z ₂₄	z ₂₄ 1	25	Ü	i28
	z ₇ 7	44	Z2	i30			z ₂₄ 2	67	ı1	h31
Z ₈		60	Z7	h6		z ₂₄ 3	4	K	i25	
Z ₉	z ₉ 1	121	Z66	h43	Z ₂₅		65	z6b	h19	
	z ₉ 2	90	Y	h10	Z ₂₆		24	H	i19	
	z ₉ 3	77	Z25	d1	Z ₂₇		64	Z51	h29	
	z ₉ 4	92	z1a	h13	Z ₂₈	z ₂₈ 1	23	Z84	n6	
	z ₉ 5	69	z1b	h35		z ₂₈ 2	3	Z65	i24	
Z ₁₀		87	Z44	h7	Z ₂₉		70	R2	h28	
Z ₁₁	z ₁₁ 1	14	Z85	i11	Z ₃₀		2	Z27	i16	
	z ₁₁ 2	15	Z26	i12	Z ₃₁		125	Z63	g11	
Z ₁₂	z ₁₂ 1	32	Z62	i20	Z ₃₂		126	Z43	g12	
	z ₁₂ 2	34	Z86	i23						

İki farklı RAPD primeri ile yapılan klonal tiplendirme çalışmalarında OPA-11 ile elde edilen küme sayısı ile OPA-9 (10 dimerli) ile elde edilen küme sayısı arasında, sırası ile 17 ve 59, büyük fark olması iki primer ile elde edilen sonuçların korelasyonunu anlamsızlaştırdı. Mesela OPA-11 ile elde edilen en büyük küme olan 53 üyeli G kümesinin elemanlarının OPA-9 (10 dimerli) ile elde edilen 25 farklı küme içerisine, ikinci büyüklükteki 44 üyeli H kümesinin de yine OPA-9 (10 dimerli) ile yapılan klonal dağılımda 24 küme içerisinde yer aldıkları görüldü. Ancak OPA-9 (10 dimerli) ile oluşan 5 üyeli A kümesinin tamamının OPA-11 ile oluşan G kümesi içerisinde olması benzer şekilde Z6 kümesi içerisinde yer alan 7 suşun OPA-11 ile elde edilen G kümesi içerisinde, J kümesi içerisinde yer alan 4 suşun tamamının da OPA-11 ile oluşan H kümesi içerisinde yer aldıkları görüldü. OPA-9 (10 dimerli) ile elde edilen ve R ile Z32 kümeleri arasında isimlendirilen 42 küme içerisinde yer alan 98 suşun OPA-11 de yer alan 17 kümeye dağıldığı görüldü. Ancak her iki primer ile de

% 100 homolog olan suşlara rastlanmadı. Ayırım gücünün yüksekliği için klonal küme sayısının kabul edilebilir çokluğu dikkate alındığında OPA-9 (10 dimerli) RAPD-PCR, OPA-11 RAPD PCR' a göre daha değerli bulundu. Bu sebeple OPA-9 (10 dimerli) ile elde edilen küme dağılımı XbaI-PFGE ile elde edilen küme dağılımı ile kıyaslandı.

Çalışmaya dahil edilen ExPEC suşları XbaI-PFGE ile 106 büyük küme içerisine dağılmışlardır. Küme sayısı OPA-9(10 dimerli) RAPD ile 59 olarak belirlenmiştir. Test suşlarından 42(%27.09)' inin her iki yöntem ile benzer küme ve alt küme dağılımı gösterdikleri, bunlardan 25'inin alt küme 17 sininde tek üyeli kümelerde yer aldıkları tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Tek Üyeli Küme ve Aynı Alt Küme İçinde Toplanan Suşların Virülans Faktörleri

Suş No	PFGE	OPA9	Virülans genleri	Suş No	PFGE	OPA9	Virülans genleri
84	z83a	c6	CNF-1,CDT-4,CNF-3	16	z3a	z ₅ 2	CDT-2, CNF-1
85	z83b	c8	CDT-2, CNF-3	45	z3b	z ₅ 3	CDT-2, CNF-1, CNF-2
86	z58a	d1	CNF-1, CDT-2	92	z1a	z ₉ 4	CDT-2,CDT-3
91	z58b	d2	CNF-1, CDT-2	69	z1b	z ₉ 5	CDT-2,CDT-3,
110	z80a	g1	CDT-3, CNF-1	75	L	i	CDT-1,CNF-1,CNF-2
97	z80b	g2	CNF-1, CNF-2, CDT-4	28	B	z ₂₁	CDT-1
94	z80c	g3	CNF-2, CDT-3	24	H	z ₂₆	CNF-1, CDT-3, CDT-4
54	z88a	h5	CDT-1, CDT-2	60	Z7	z ₈	CDT-2, CDT-3, CNF-3
147	z88b	h6	CNF-3	87	Z44	z ₁₀	CDT-1,CDT-4, CNF-1
149	z88c	h7	CDT-4, CNF-2	93	Z29	k	CDT-1, CNF-3
55	z23b	m2	CDT-1, CDT-3, CNF-2,CNF-3	19	Z13	v	CDT-1,CDT-4,CNF-1
49	z23c	m3	CNF-2	118	Z50	z ₄	CDT-1, CDT-3
11	z23e	m4	CNF-2	31	Z67	z ₁₃	CNF-2
51	E2	ö1	CDT-3,CNF-2	26	Z68	z ₁₈	CDT-1, CDT-3, CNF-1,CNF-3
52	E3	ö2	CDT-4	62	Z9	z ₁₉	CDT-4, CNF-2
105	z38a	ş1	CDT-1,CNF-1, CNF-3	70	R2	z ₂₉	CDT-2, CDT-3, CNF-3
107	z38d	ş2	CDT-4, CNF-1,	2	Z27	z ₃₀	CDT-4,CNF-2, CNF-3,
103	z38b	ş3	CDT-1, CDT-4,	125	Z63	z ₃₁	CDT-2,CNF-2, CNF-3,
88	z38e	ş4	CDT-1, CDT-4	126	Z43	z ₃₂	CDT-1,CNF-2, CNF-1,
20	g1	y1	CDT-2, CDT-4	128	Z42	z ₂₃	CDT-1, CDT-4, CNF-1
6	g3	y2	CDT-2, CDT-3, CNF-1,CNF-2	64	Z51	z ₂₇	CDT-4, CNF-2,

XbaI-PFGE ve OPA9-RAPD ile benzer şekilde klonal olarak ilişki içerisinde oldukları gösterilen veya her iki genotipleme yöntemi ile de tek üyeli kümeler içerisinde yer alan 42 ExPEC suşundan sadece 13 (%30.9)' ünün, bir başka ifade ile de klonal ilişki ve virülans faktörleri arasında muhtemel bir ilişkinin sorgulandığı 155 suştan sadece 13 (%8.38)' ünün

gerçek anlamda ilişkili olabileceği görülmüştür. Ancak bu suşlarında izole edildiği klinik örneklerin farklı kliniklerden alındığı görülmüştür (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kümelenme Özellikleri ve Virülans Faktörleri Aynı Olan Suşların Virülans Faktörleri ve Kliniklere Göre Dağılımı.

Genler	Suş No	Klinik Materyal	Servis
CDT-2,CNF-1	86	İdrar	Yeni Doğan Ünitesi
	91	İdrar	Üroloji
CNF-2	49	İdrar	Dahiliye
	11	Yara	Ortopedi
CDT-2, CDT-3	92	İdrar	Üroloji
	69	İdrar	Çocuk Polikliniği
CDT-1,CDT-4	103	İdrar	Çocuk Polikliniği
	88	İdrar	Üroloji
CDT-4, CNF-2	62	İdrar	Dahiliye
	64	Yara	Ortopedi
CDT-1,CDT-4 CNF-1	19	İdrar	Çocuk Polikliniği
	87	İdrar	Üroloji
	128	İdrar	Yenidoğan

5.TARTIŞMA

İnsan ve vertebralı hayvanların kalın barsaklarında yaygın kommensal flora bakterisi olan *E.coli*' nin bazı suşları intestinal sistemde hastalıklara sebep olurken çok sayıdaki serotipin yer aldığı ExPEC suşları intestinal sistem dışında kolonize olabildikleri bütün doku ve organ sistemlerinde mortal seyredabilen toplum veya hastane kökenli ciddi enfeksiyonlara sebep olurlar. Bu suşlar intestinal sistem dışında da kolonize olarak çoğalmalarına yardım eden çok sayıdaki virülans faktörüne sahiptirler. Ancak sadece ExPEC suşlarına ait bu virülans faktörlerinin yanı sıra konağa ait faktörlerde bu suşların hastalık oluşturmalarına yardım eder. Bu sebeple ExPEC suşlarının kommensal suşlardan farklı ancak intestinal sistem dışında fırsatçı patojenler olduğu söylenebilir.

Klinik Mikrobiyoloji yönünden intestinal kommensal *E. coli* suşları ile ExPEC suşları arasındaki muhtemel atasal ilişkinin varlığının gösterilmesi önemlidir. Yani patojen suşlar kommensal suşların sonradan veya mikroçevreden virülans genleri kazanmış rekombinasyon-delesyon mutantlarıdır yoksa patojen suşlar bazı ortak virülans faktörlerine sahip olan kanatlı patojen *E. coli* suşları gibi atasal olarak kommensal suşlardan farklı evrilmiştir. Her iki halde de cevabın evet olması halinde ExPEC enfeksiyonlarından korunma ve kontrol programlarının oluşturulması için mutasyona duyarlı suşların veya atasal olarak patojen özelliklere sahip suşların moleküler yöntemler ile izlenmesi önemli olacaktır. *E. coli* suşlarının gerek enfeksiyon mekanizmalarının sorgulanması ve epidemiyolojik özelliklerinin tespiti gerekse taksonomik identifikasyonu ve flogenetik ilişkiler ve evriminin aydınlatılması amacı ile yapılan; fizyolojik özellikler, antijenik özellikler, MLEE, antibiyotiklere duyarlılık kalıplarının tespiti ve hastalık oluşturma yeteneklerine göre yapılan patotipleme gibi fenotipik ve PCR ile filotipleme, PFGE, MLST, ve sekans analizi gibi genom özelliklerini tek nokta mutasyonlarına kadar irdeleyen genotipik özelliklere dayalı sınıflandırmalar yapılmıştır. İnsan ExPEC suşlarının evrim özellikleri ve muhtemel kaynaklarının tespiti için patotipleme ile kombine edilebilecek ideal bir genotiplendirme yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır. Nitekim dünya genelinde bu amaçlara yönelik olarak yapılan çalışmalarda ExPEC için insan kalın barsağı dışında insan çeşitli başta evcil hayvanlar olmak üzere çok sayıdaki hayvan türünün intestinal sistemi, hayvansal gıda ürünleri ve kanalizasyonların kaynak olabilecekleri gösterilmiştir.

Biz en azından aynı coğrafi bölgede yaşayan hastalara ait farklı klinik örneklerden

izole edilen ExPEC suşları arasında bir atasal ilişkinin varlığını tespit amacı ile planladığımız çalışmamızda muhtemel klonal ilişkiyi tespit amacı ile RAPD-PCR ve PFGE yöntemini baz aldık. RAPD-PCR bakterilerde sürveyans amaçlı kullanılabilir genetik bilginin temininde, genom ile ilgili ön bilgiye ihtiyaç duymayan hızlı, basit, ucuz ve kolay ancak tekrarlanabilirliği düşük moleküler bazlı bir yöntemdir. Bu sebeple de iyi standardize edilmiş bir protokoller çerçevesinde çalışılmalıdır. Buna karşılık bakteride tüm genomun kontrollü şartlarda spesifik enzim hidrolizi sonucu oluşan band paternlerinin araştırıldığı PFGE yöntemi hem iyi standardize edilmiş, hemde tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü yüksek, genotipik sürveyans için altın standart olarak kabul edilmiş moleküler bir yöntemidir. Bu çalışmada seçtiğimiz antibiyotiplemede son derece karmaşık ve patotipleme ile korelasyonları güç olan fenotipik sürveyans metodları içerisinde en çok kullanılan yöntemdir.

Çalışmamızda izolatların tür tayinlerinin yapıldığı fenotipik yöntemlerin dışında, spesifik primer dizileri kullanılarak PCR yöntemi ile CDT ve CNF virulans faktörlerinin varlığı araştırılmış ve bu proteinleri kodlayan genlerdeki polimorfizm ile bu izolatların total genomlarının RAPD ve PFGE yöntemleri ile filogenetik olarak araştırılarak, RAPD ve PFGE yönteminin suşlar arasındaki polimorfizmi göstermede ve klonal ilişkinin belirlenmesinde yol gösterici olacağı düşünülerek gerçekleştirilmiştir.

Klonal ilişkinin ortaya çıkarılabilmesi için ExPEC suşlarının tanımlanması, birbirleri ile benzerlikleri ve farklılıklarının ortaya konularak tiplendirilmeleri gerekmektedir. Tiplendirmede kullanılacak yöntemler test edilen suşlardan kesin sonuçlar çıkartabilmeli, yer ve zaman bağımlılığı olmaksızın her çalışmada aynı sonuçları üretmeli ve epidemiyolojik olarak ilgisiz suşları belirleyebilmelidir¹²⁰.

PFGE yöntemi suşlar arası klonal ilişkinin belirlenmesinde; tekrarlanabilirlik, yüksek ayırım gücü ve kantite edilebilir sonuçlar üretmesi sebebi ile diğer birçok önemli bakteriyel ajanda “altın standart” olarak kabul edilmektedir ve diğer moleküler testler PFGE yöntemi ile kıyaslanmaktadır. RAPD ve AFLP yöntemi kıyaslanan yöntemlerden olup, nispeten daha basit, ucuz ve hızlı ancak tekrarlanabilirliği düşük bir yöntemdir. Bu sebeple RAPD reaksiyon koşulları büyük ölçüde standardize edilmelidir¹²¹.

Bunun yanında RAPD tekniğinin zaman, maliyet, duyarlılık ve özel beceriler gerektiren AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve PFGE (Pulse-Field Gel Electrophoresis) yöntemlerine kıyasla zaman ve maliyet açısından daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Birçok araştırmacı tarafından farklı kaynaklardan izole edilen *E.coli* suşları ile yapılan çalışmalarda RAPD yöntemi kullanılmış ve sonuçları tartışılmıştır.

Mitsuda ve arkadaşlarının Temmuz 1996 yılında Japonya’ da bir ilkokulda 800’ den

fazla kişiyi etkileyen salgında; 2,109 öğrenci ile 118 çalışandan, alınan örneklerde gıda kaynaklı diyare etkeni ETEC suşları izole edilmiş, RAPD ve PFGE yöntemi ile filogenetik ilişkileri araştırılmıştır. Çalışmada suşların genotipik analizi yapılarak %100 benzerlik gösteren 6-7 bant elde edilmiş, PFGE'nin epidemiyolojik çalışmalarda güvenilir olarak tercih edilmesine rağmen RAPD yönteminin kullanılabilirliği de kanıtlanmıştır. RFLP yöntemine göre daha hızlı sonuç verdiği, iş gücü, beceri, zaman ve maliyet bakımından da PFGE'ye alternatif olabileceği desteklenmiştir¹²².

Hannah ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınlanan çalışmasında; Mart-Mayıs 2002 tarihleri arasında ABD'nin Idaho eyaletinin başkenti Boise'deki devlet hastanesinin laboratuvarına gelen klinik örnekler ile Şubat-Nisan 2002 tarihleri arasında marketlerden temin edilen taze veya donmuş sığır ve tavuk örnekleri arasındaki ilişki çalışılmıştır. Dirençli ve dirençsiz toplam 502 *E. coli* suşu ile yapılan PFGE ve RAPD moleküler analiz çalışmasında 166 suşun ExPEC suşu olduğu tespit edilmiştir. (tüm örneklerin %19'u). Bu suşların RAPD sonucunda 12 küme oluşturacak şekilde % 80 benzerlik oranı gösterdiği, PFGE'de elde edilen küme sayısının çok fazla olması sebebi ile RAPD sonuçlarının daha kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir¹²³.

Suardana ve arkadaşları 2013 yılında Endonezya'nın Bali kentinde insan ve hayvanlardan izole edilen 19 örnekte *E.coli* O157:H7 suşunu RAPD yöntemi ile analiz etmişler, OPA-9 ve OPA-24 arası 10 farklı primer kullandıkları çalışmalarında sonuçların %70 benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak RAPD yönteminin AFLP ve PFGE yöntemine oranla daha avantajlı, yorumlanması kolay restriksiyon enzimlerinin kullanılmaması nedeniyle kullanımın kolay olduğu tespit edilmiştir¹²⁴.

Johnson ve arkadaşları 2002 yılında ABD' de yapmış oldukları çalışmada; kanatlılarda kullanılan florokinolonlara dirençli *E. coli* suşlarının da gıda yolu ile insanlara geçişini araştırmışlar, Minnesota' da kümes hayvanları ve insan örneklerinden izole edilen 169 ExPEC suşunu RAPD ve PFGE yöntemleri ile karşılaştırmışlar, her iki yöntem ile de benzer sonuçlar elde ettiklerini ve suşların %40 oranında benzer olduklarını bildirmişlerdir¹²⁵.

Biz de iki yıllık bir periyotta farklı klinik ve örneklerden izole edilen ve virülans gen profilleri çıkartılmış 155 ExPEC suşunu OPA-9 ve OPA-11 RAPD ve XbaI-PFGE ile klonal ilişkinin tespiti yönünden değerlendirdiğimiz çalışmamızda OPA9-RAPD-PCR ile 59, OPA-11-RAPD-PCR ile 17 ve PFGE yöntemi ile 106 küme elde ettik. Bizim OPA-11 primerler ile elde ettiğimiz sonucun ayırım gücü diğer iki yöntemle elde edilen küme sayısı ile kıyaslanınca oldukça düşüktü. Buna karşılık OPA-9 RAPD-PCR ile elde edilen küme sayısında Mitsuda ve arkadaşları, Johnson ve arkadaşları, Hannah ve arkadaşları ile Suardana ve arkadaşlarının

bildirdikleri gibi PFGE ile elde edilen küme sayısından daha az ve dolayısı ile kolay yorumlanabilirdi. Ancak bizim çalışmamız bu çalışmalardan farklı olarak kısa süreli bir salgın analizinden çok ExPEC suşlarının ortaya çıkış ve yayılışında klonal ekspansiyonun mu yoksa mobil elementler ile taşınan virülans faktörlerinin mi belirleyici olduğunu göstermekti. Bu sebeple tercih edilen yöntemin daha uzun soluklu bir sürveyans için kullanılabilir olması önemliydi. Biz bu sebeple daha yüksek ayırım gücü gösteren OPA-9 ve PFGE sonuçlarını tartışılmaya değer bulduk.

Johnson R, J. ve arkadaşlarının 2003 yılında yayınlanan çalışmasında; 2001, 2002, 2003 yılları arasında New York, Buffalo Üniversitesinde ve Minneapolis'te çeşitli semptomatik bulgular gösteren 4 ExPEC suşlu hastanın kan, idrar, periton, vücut sıvısından 10 farklı örnek alınarak izolatlar arasındaki ilişki RAPD PCR yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada farklı hastalardan alınan, farklı klinik örneklerdeki izolatlar arasında benzerlik olduğu gösterilmiştir. Buna göre 2. hastanın kan, psoas kası, omuz ve ayak bileğinden 3. hastanın kan ve BOS'undan ve 4. Hastanın kan örneğinden izole edilen *E. coli* suşlarının aynı küme içerisinde yer aldığı ve RAPD yöntemi ile hızlı ve başarılı bir şekilde tespit edilmiştir¹³.

George L. ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınlanan çalışmasında; Bangalore' de idrar yolu enfeksiyonu olan 352 gebe kadının üriner sisteminden 29 çoklu ilaç direnci (ÇİD) olan *E.coli* tespit edilmiştir. Suşlar arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek amacıyla OPV 12, OPA 13, OPA 08, OPR 08, OPU 17, OPA 11, OPU 14, OPD 19, OPS 03, OPA 10, OPD 20 primerleri ile RAPD PCR'ı çalışılmıştır. Her bir örnekte ortalama 8 olmak üzere 5 ile 13 arası 100-500 bp arası değişen bant profili gösterilmiştir. Çalışmada OPA 19 ve OPA 17 primerleri ile anlamlı sonuçlar elde edilirken, OPA 19' da 10 küme, OPA 17' de ise 8 küme, 5 farklı subtip gösterilmiş ve gebe kadınlarda üriner sistem enfeksiyonları ile dirençli *E.coli* suşları arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir¹²⁶.

RAPD-PCR ile filogenetik ilişkilendirmede geniş zaman aralığında alınan klinik materyal ile yapılan çalışmada, yani uzun soluklu sürveyans da, küme sayısının fazla olması beklenen bir sonuçtur. Bizim 155 klinik izolatta OPA-9 primerleri kullanarak yaptığımız RAPD sonucunda elde ettiğimiz ve tartışmaya değer bulduğumuz 59 küme George L. ve arkadaşlarının 29 MDR-*E. coli* suşu ile ve OPA-19 primerleri kullanarak yaptıkları RAPD sonucu elde ettikleri 10 küme ile oran yönünden benzerlik göstermektedir.

Ancak literatürde bizimle benzer amacı güden, benzer yöntemlerin kullanıldığı uzun soluklu sürveyans çalışması daha doğrusu virülans genleri dağılımı ile bu virülans genlerine sahip suşlar arasındaki muhtemel klonal ilişkiyi testite yönelik çalışma bulunmamaktadır. ExPEC suşlarının evrimi ve flogenetik özellikleri kısa sürede çok tartışılmış olmasına

rağmen PFGE gibi klonal ilişkinin tespitinde altın standart kabul edilen bir yöntemin veya tekrarlanabilirliği düşük olmasına rağmen uygulama ve yorum kolaylığına sahip RAPD-PCR bazlı çalışma yok denecek kadar az ve eksiktir. Bu sebeple klonal ilişkiyi amaçlayan çalışmalar iki virülans geni ile bir kısa DNA zincir analizinin baz alındığı filotiplemeyi adres göstermektedir. Bu klinik kullanım için kolaylık sağlayan 4 ana grup veya tali gruplar ile 8 filogruba karşılık gelmektedir. Oysa soru tamamı intestinal kökenli olan ExPEC suşlarının genomda taşıdıkları sıcak bölgeler yardımı ile insersiyon delesyon mutasyonları sonucu kommensal suşlardan mı köken aldıkları yoksa bu suşların flogenetik yani evrimsel olarak kommensal suşlardan farklı suşlar olup, farklı evrildiklerimidir.

Biz çalışmamızda bu sorulara cevap aradık. ExPEC oldukları bu suşlar için belirleyici olan 7 virülans geni çalışılarak tanımlanmış, farklı zaman dilimlerinde farklı kliniklerde yatan hastalara ait farklı örneklerden izole edilen 155 suşun klonal ilişki yönünden, PFGE ile 106 ve RAPD ile 57 olmak üzere oldukça çok sayıda gen küme grubuna dağıldıklarını gördük. Her iki yöntem ile elde edilen ortak küme veya tek üyeli küme dağılımları değerlendirildiğinde yöntemlerin uygunluk oranının %27.09 (42/155) olduğunu gördük. İki yöntem arasındaki düşük benzerlik beklenen bir sonuçtur. PFGE ile genom çok daha duyarlı olarak tanımlanmakta olup, suşların bir aylık bekleme sürecinde bile yaşadıkları hasara bağlı olarak enzimatik hidrolizde birkaç bant farkı yaşadıkları bilinmektedir. Bizim bir başka bulgumuz da her iki yöntem ile benzer klonal ilişki tespit edilen 42 suştan 3'ü tek üyeli olmak üzere toplam 13 suşun virülans faktörleri dağılımlarının da benzer olduğu görülmüş, sonuç olarak olup 155 suş içerisinde sadece %8.38' i için aralarında atasal bir ilişkinin varlığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak ExPEC suşlarının klonal ilişkilerinin tespitinde OPA-9-RAPD-PCR ve XbaI-PFGE yöntemlerinin uygulanabilir ve yorumlanabilir olduğu, ancak ExPEC suşlarının ortak bir atadan evrilmiş suşlardan değil farklı virülans genlerinin kazanıldığı delesyon, rekombinasyon olayları sonucu ortaya çıkan suşlar oldukları kanısına varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Virülans faktörleri bilinen ExPEC suşlarının filogenetik özelliklerine ışık tutmak amacı ile klonal düzeyde ilişkilerin; 3 farklı kısa oligo dizisinin kullanıldığı RAPD-PCR ve XbaI-PGFE yöntemleri ile sorgulandığı çalışma sonunda;

- a- XbaI-PFGE yönteminin, kolay yorumlanabilir olduğu görülerek tartışılmaya değer bulunan OPA9-RAPD-PCR'a göre ayırım gücünün daha yüksek olduğu,
- b- İki yöntem arasında suşların küme grup/alt gruplarına dağılımlarında benzerlik oranının % 27 gibi düşük düzeyde kaldığı.
- c- Virülans faktörleri dağılımı ile klonal düzey tespit amaçlı kullanılan iki yöntemin sadece 13 (%8.38) örnek için potansiyel bir klonal ilişkiyi gösterdiği ancak bu ilişkili suşların farklı servislerde yatan farklı hasta örneklerinden izole edilen suşlar olmaları sebebi ile bir salgından bahsetmek yerine tesadüfi mutasyon tanımının daha doğru olacağı,
- d- ExPEC suşlarının klonal ekspansiyon sonucu değil ya tesadüfi veya genlerinde mutasyona açık belirli sıcak bölgeye sahip suşlar arasından yine delesyon rekombinasyon olayları sonucu ortaya çıktıkları,
- e- Birçoğunun kanatlı ve gıda kökenli patojenler ile ilişkili oldukları gösterilen insan sağlığı yönünden giderek artan öneme sahip bu suşların tedavisi ve kontrol protokollerinin hazırlanmasında hayati öneme sahip olan genetik sürveyansın PFGE veya RAPD yerine filotipleme gibi daha basit ve yorumlanması kolay yöntemler ile yapılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Topçu AW, Soyletir G, Doğanay G.** Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevleri, 2 cilt 3.basım **2008**: 1564-1574.
2. **Bilgehan H.** Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları (Uygulama Konuları İle), 5. Baskı. İzmir, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, **2009**: 425-454.
3. **Antao EM, Wieler LH, Ewers C.** Adhesive Threads of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Gut Pathogen, **2009**; 1: 22. doi:10.1186/1757-4749-1-22
4. **Foxman B.** Epidemiology of Urinary Tract Infections: Incidence, Morbidity, and Economic Costs. *Am J. Med*, **2002**; 113:5-13.
5. **Johnson JR and Russo TA.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*” *J Lab Clin Med. J Lab Clin Med*, **2002**; 139:155-162.
6. **Clermont O, Bonacorsi S and Bingen E.** Rapid and Simple Determination of The *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, **2000**; 66: (10)4555–4558.
7. **Bidet P, Bonarcorsi S and Bingen E.** Virulence Factors and Pathophysiology of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Archives de Pédiatrie*, **2012**; 19: 80-92. doi:10.1016/S0929-693X(12)71279-4.
8. **Hacker J, Blum-Oehler G and Muhldorfer I, Tschäpe H.** Pathogenicity Islands of Virulent Bacteria: Structure, Function and Impact on Microbial Evolution. *Mol Microbiol*, **1997**; 23: 1089–1097.
9. **Zhaxybayeva O, Doolittle WF.** Lateral Gene Transfer. *Current Biology*, **2011**; 21(7):R242-6. doi:10.1016/j.cub.2011.01.045. PMID 21481756.
10. **Arman D, Leblebicioğlu H.** Uriner Sistem İnfeksiyonlarının Tedavisi. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara, **2003**; 1: 9-14.
11. **Vranes J, Schonwald S, Sterk-Kuzmanovic N, Ivancic B.** Low Virulence of *Escherichia coli* Strains Causing Exacerbation of Chronic Pyelonefritis *Acta. Clin. Croat* **2001**; 40: 165-170.
12. **Silveria WD, Benetti F, Lancelotti M, Ferreira A, Solferini VN, Brocchi M.** Biological and Genetic Characteristics of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*, **2001**; 43(6): 303-310.
13. **James R. Johnson JR, Gajewski A, Lesse AJ and Russo TA.** Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2003**; 41(12): 5798–5802.
14. **Unat EK.** “*Escherichia coli*” Prof. Dr. Ekrem Kadri Unat, Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi. Dergah Tıp yayınları, **1986**; 2.baskı, cilt 1: sayfa 546.
15. **Arda M.** Temel Mikrobiyoloji. 2. Baskı, Ankara: Medisan Yayınevi, **2000**.
16. **Zarakolu Köşker PI.** Enterobacteriaceae. içinde: Tıbbi Mikrobiyoloji, Başustaoglu AC, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M, Yapar M (çeviri editörleri). Medical Microbiology, Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 6. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık, **2010**: 301- 307.
17. **Lawson J M.** Update on *Escherichia coli* O157:H7. *Curr Gastroenterol Rep*, **2004**; 6 (4): 297-301.
18. **Taşbakan MI, Pullukçu H, Sipahi OR, Yamazhan T, Arda B, Ulusoy S.** A Pooled Analysis of The Resistance Patterns of *Escherichia coli* Strains Isolated from Urine Cultures in Turkey: A Comparison of The Periods 1997-2001 And 2002-2007. *Turkish Journal Of Medical Sciences*, **2011**; 41: 557- 564, doi:10.3906/sag-1006-893.

19. **Arslan H, Azap OK, Ergonul O, Timurkaynak F, Urinary Tract Infection Study Group.** Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *J Antimicrob Chemother*, **2005**; 56(5): 914-918.
20. **Öztelli Y.** Bayburt İli Merkez İlçede İçme Sularında Enterohemorajik *Escherichia coli* (O157:H7)' nin Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, **2004**.
21. **Öngen, B.** Escherichia infeksiyonları ve Klebsiella infeksiyonları. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2008**: 197-205, 221-226.
22. **Arslan Aİ.** İdrar Yolları Enfeksiyonu Etkeni *E. coli*' lerin Adezinleri ile Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişkinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, **2010**.
23. **Berkiten R.** Fakültatif Anaerob Gram Negatif Çomaklar. İçinde: Bozkaya E. (editör). Tıbbi Mikrobiyoloji 2, 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, **2005**: 51- 68.
24. **Sharon AL, O'Connor J, Robin T, Zimmer BL and Janda JM.** Biochemical Properties of a Newly Described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*, *J.Clin. Microbiol*, **2003**; 41: 4852-4854. doi:10.1128/JCM.41.10.4852-4854.2003
25. **Baysal B.** *Escherichia coli*. İçinde: Cengiz T, Mısırlıgil A, Aydın M (editörler). Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji, 1. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, **2004**: 454- 458.
26. Microbeonline, Online Medical Microbiology guide. <http://microbeonline.com/imvic-tests-principle-procedure-and-results/> **2014**.
27. **Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW.** Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol*. **2010**; 60(4):708-20. doi: 10.1007/s00248-010-9717-3.
28. **Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y.** The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. **1997**: 1453-1462.
29. **Meier-Kolthoff JP, Hahnke RL, Petersen JP, Scheuner CS, Michael VM, Fiebig AF, Rohde CR, Rohde MR, Fartmann BF, Goodwin LA, Chertkov OC, Reddy TR, Pati AP, Ivanova NN, Markowitz VM, Kyrpides NC, Woyke TW, Klenk HP, Göker M.** Complete Genome Sequence of DSM 30083^T the Type Strain (U5/41^T) of *Escherichia coli* and a Proposal for Delineating Subspecies in Microbial Taxonomy. *Standards in Genomic Sciences*, **2014**; 9: 2. Doi:10.1186/1944-3277-9-2.
30. **Chen EM, Kasturi SS.** DeJa Review. Çeviri: Aygün G. DeJa Vu Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, **2009**: 59- 61.
31. **Yeniiz E.** Çeşitli Gruplarda Dışkıda *Escherichia coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması. Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Servis Şefliği. Uzmanlık tezi, İstanbul: Gülhane Askeri Tıp Akademisi, **2005**.
32. **Demir M.** Patojen *Escherichia coli* Suşlarında Siderofor ve Diğer Virulans Faktörlerinin Araştırılması ve Patojenitedeki Rollerinin Cilt İnfeksiyon Modeliyle Gösterilmesi. Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Denizli: Pamukkale Üniversitesi, **2001**.
33. **Mulwvey MA.** Adhesion and Entry of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiology*, **2002**; 4: 257-271.
34. **Emody L, Kerenyi M, Nagi G.** Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agent* **2003**; 22: 29-33.

35. Lane MC, Lockatell V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel JR, Johnson DE, Mobley HLT. Role of Motility in The Colonization of Uropathogenic *Escherichia coli* in The *Urinary Tract*. *Infect. Immun.* **2005**; 73: 7644- 7656.
36. Johnson JR. Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **1991**; 4(1): 80- 128.
37. Sussman M, Gally DL. The Biology of Cystitis: Host and Bacterial Factors. *Annu. Rev. Med.* **1999**; 50: 149- 158.
38. Kucheria R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS. Urinary Tract Infections: New Insights into a Common Problem. *Postgrad Med J.* **2005**; 81(952):83-6.
39. Lerm M, Selzer J, Hoffmeyer A, Rapp UR, Aktories K, Schmidt G. Deamidation of Cdc42 and Rac by *Escherichia coli* Cytotoxic Necrotizing Factor 1: Activation Of C-Jun N-Terminal Kinase in HeLa cells. *Infect Immun.* **1999**; 67(2):496-503.
40. Andreu A, Stapleton AE, Lockman HA, Xercavins M, Fernandez F, Stamm WE. Urovirulence Determinants in *Escherichia coli* Strains Causing Prostatitis. *J. Infect. Dis.* **1997**; 176: 464- 469.
41. Dreyfus, Lawrence, A. "Cytolethal Distending Toxin", in D. Burns; et al. Bacterial Protein Toxins, Washington, DC: ASM Press, **2003**: 257–270.
42. DA Scott and JB Kaper. Cloning and Sequencing of The *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Infection and Immunity*, **1994**; 62(1): 244–251.
43. Rasika N Jindasa, Stephen E. Bloom, Robert S. Weiss and Gerald E. Duhamel. Cytolethal Distending Toxin: a Conserved Bacterial Genotoxin That Blocks Cell Cycle Progression, Leading to Apoptosis of a Broad Range of Mammalian Cell Lineages. *Microbiology*, **2011**; 157(7): 1851–1875. doi: 10.1099/Mic.0.049536-0.
44. Maria Lara-Tejero, Jorge E. Galan. CdtA, CdtB and CdtC form a Tripartite Complex that is Required for Cytolethal Distending Toxin Activity. *Infectious Immunity*, **2001**; 69(7):4358–4365. doi: 10.1128/IAI.69.7.4358-4365.2001. PMC 98507. PMID 11401974.
45. Cherilyn A. Elwell, Lawrence A. Dreyfus. Dnase I Homologous Residues in Cdtb are Critical for Cytolethal Distending Toxin-Mediated Cell Cycle Arrest. *Molecular Microbiology*, **2000**; 37(4):952-963 doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02070.x.
46. Lina Guerra, Ximena Cortes-Bratti, Riccardo Guidi, Teresa Frisan. The Biology of Cytolethal Distending Toxins. **2011**; 3(3): 172–190. doi: 10.3390/toxins3030172.
47. De Rycke J & Oswald E. Cytolethal Distending Toxin (CDT): a Bacterial Weapon to Control Host Cell Proliferation. *FEMS Microbiol Lett.* **2001**; 203: 141–148.
48. Durmaz, R, Oflu, B, Çalışkan, A, Gürsoy, N. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella Türlerinin* Moleküler Tiplendirilmesinde Kullanılabilir Kisa Süreli “Pulsed Field Gel” Elektroferez (PFGE) Protokolü, **2007**.
49. Johnson JR, Russo TA. Molecular Epidemiology of Extraintestinal Pathogenic (Uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol*, **2005**; 295: 383- 404.
50. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis: A molecular approach, 1th ed. Washington DC: ASM Press, **1994**.
51. Cerna-Cortes JF, Gómez-Aldapa CA, Rangel-Vargas E, Ramírez-Cruz E, CastroRosas J. Presence of Indicator bacteria, Salmonella and Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes on Mung Bean Sprouts from Public Markets in Pachuca, Mexico. *Food Control*, **2013**; 31: 280- 283.

52. **Donnenberg MS. Enterobacteriaceae.** In: **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.** eds. Mandell Douglas and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases, 6th ed Philadelphia: Churchill Livinstone, **2005**: 2567-2587.
53. **Thapar N, Sanderson I.** Diarrhoea in Children: an Interface Between Developing and Developed Countries. *The Lancet*, **2004**; 363: 641- 653.
54. Eriřim: (http://www.ivytech.net/twmwphy/text_pg/pro=cell.htm)
55. **Yamamoto S, Nakano M, Terai A, Yuri K, Nakata K, Nair GB, Kurazona H, Ogawa O.** The Precence of the Virulence Island Containing The Usp Gene in Uropathogenic *Escherichia Coli* is Associated with Urinary Tract Infection in an Experimental Mouse Model. *J. Urol.* **2001**; 165:1347- 1351.
56. **Başustaoglu A.** Klinik Mikrobiyoloji 9. Baskı, Atlas Kitapçılık, **2007**: 670-685.
57. **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC.** Manual of Clinical Microbiology Volume 1, 8th ed. Washington, ASM Press, **2003**: 654- 659.
58. **Serter D, Ertem E, Gökengin D.** Baslıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları. 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, **2000**: 250- 261.
59. **Kobayashi H, Shimada J, Nakazawa M, Morozumi T, Pohjanvirta T, Pelkonen S, Yamamoto K.** Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin- Producing *Escherichia Coli* from Healthy Cattle in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, **2001**; 67: 484- 489.
60. **Çiçek E, Savaşan S.** Ege Bölgesi'ndeki Sığırların Süt ve Dışkı Örneklerinden *Escherichia coli* O157:H7 İzolasyonu ve Verotoksinlerinin Belirlenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **2010**; 21: 51- 56.
61. **Girard F, Batisson I, Frankel GM, Harel J, Fairbrother JM.** Interaction of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Porcine Intestinal Mucosa: Role Of Intimin and Tir in Adherence. *Infection and Immunity*, **2005**; 73: 6005- 6016.
62. **Karapınar M, Gönül SA.** Gıda Kaynaklı Hastalıklar. İçinde: Ünlütürk A, Turantas F. Gıda Mikrobiyolojisi, 1. Baskı. İzmir, Mengi Tan Basımevi, **1998**: 109- 164.
63. **Robins- Browne RM, Hartland EL.** *Escherichia coli* as a Cause Of Diarrhea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **2002**; 17: 467- 475.
64. **Şahin İ, Başoğlu B.** Gıda Mikrobiyolojisi 2. Baskı, Bursa: Dora Basım- Yayın Dağıtım Ltd. Şti. **2011**: 34- 38.
65. **Hooton TM.** Pathogenesis of Urinary Tract Infections: an Update. *J. Antimicrob.* **2000**: 1- 7.
66. **Terai A, Yamamoto S, Mitsumori K, Okada Y, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O.** *Escherichia coli* Virulence Factors and Serotypes in Acute Bacterial Prostatitis. *Int. J. Urol.* **1997**; 4: 289- 294.
67. **Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL.** Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **2001**; 183: 78- 88.
68. **Ünal, N, İstanbulluoğlu E.** İnsan ve Sığır Kökenli *Staphylococcus Aureus* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Özelliklerinin Araştırılması. *Ankara Ün. Vet. Fak. Derg.* **2009**; 56: 119-126.
69. **Özgür M.** *Escherichia coli* ve *Escherichia coli* infeksiyonları. In: Özel Mikrobiyoloji. 5. Baskı. Ed: Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, Özgür M, Diker KS. Medisan Yayınevi. Ankara. **1999**: 45- 50.
70. **Özgür M.** *Escherichia coli* infeksiyonları. Aydın N, Paracıkoğlu J. eds. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). ilke-Emek Yayınları, Ankara, **2006**: 110- 116.

71. **Domig JK, Mayer HK, Kneifel W.** Methods Used for The Isolation, Enumeration, Characterisation and Identification of *Enterococcus* Spp.2. Pheno- And Genotypic Criteria. *International Journal Of Food Microbiology*, **2003**; 88: 165–188.
72. **Tomayko JF, Murray BE.** Analysis of *Enterococcus faecalis* Isolates From Intercontinental Sources by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis *Journal of Clinical Microbiology* **1995**; 33:2903-2907.
73. **Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS.** Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Population Genetics and Systematics. *Appl Environ Microbiol*, **1986**; 51(5):873-84.
74. **Enright MC and Spratt BG.** Multilocus Sequence Typing. *Trends Microbiol*, **1999**; 7:482-487.
75. **Pupo GM, Karaolis DK, Lan R, Reeves PR.** Evolutionary Relationships Among Pathogenic and Nonpathogenic *Escherichia coli* Strains Inferred From Multilocus Enzyme Electrophoresis and mdh Sequence Studies. *Infect Immun*. **1997**; 65(7):2685-92.
76. **Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G.** Development of a Set of Multiplex PCR Assays for The Detection of Genes Encoding Important B-Lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, **2010**; 65: 490-5.
77. **Çakır P, Güven, K.** Gıda ve İnsan Kaynaklı *Staphylococcus aureus* Strainlerinin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, **2007**: 97
78. **US E, Erdem B, Tekelli A, Gerçeker D, Saran B, Bayramova M, Şahin F.** Salmonella serotip Enteridis izolatlarının plazmid profil analizi ve “Pulsed Field” jel elektroforezi ile incelenmesi. *Mikrobiyol. Bül.* **2011**; 45(2): 210-227.
79. **Williams FE, Varanasi U, Trumbly RJ.** The CYC8 and TUP1 Proteins Involved in Glucose Repression in *Saccharomyces Cerevisiae* are Associated In a Protein Complex. *Mol Cell Biol*. **1991**; 11(6):3307-16.
80. **Black WC.** PCR with Arbitrary Primers: Approach With Care, *Insect Mol Biol*. **1993**; 2(1):1-6.
81. **Durmaz R.** Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji 2. Baskı, Adana, Nobel Kitabevi, **2001**: 149-160.
82. **Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW.** Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet*. **1980**; 32(3): 314–331.
83. **Hall LC.** Application of Molecular Typing to The Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Pathol*. **1998**;51(4): 270–274.
84. **M. Carmen de Vicente and Theresa Fulton.** Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity: learning module, *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, **2005**; Volume 3, Issue 3: 421-421.
85. **Schwartz DC, Cantor CR.** Separation of Yeast Chromosomesized Dnas by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Cell*, **1984**; 37: 67–75.
86. **Gardiner K.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, **1991**; 63: 658-665.
87. **Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ.** Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin. Microbiol. Rev*. **2006**; 19: 512-530.
88. **Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Björkroth KJ, Franz CMAP, Foulquié MMR, Revets H, De Vuyst L, Swings J, Kersters K, Dellaglio F, Holzapfel WH.** Intraspecies Genomic Groups in *Enterococcus faecium* and Their Correlation with Origin and Pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, **2002**; 68:1381-1391.

89. **Moschetti G, Blaiotta G, Villani F, Coppola S.** Nisin Producing Organisms During Traditional Fior Di Latte Cheese Making Monitored by Multiplex-PCR and PFGE Analysis, *Int. J. Of Food Microbiol.* **2001**; 63(1-2),109-116.
90. **Gordillo ME, Singh KV and Murray BE.** Comparison of Ribotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Subspecies Differentiation of Strains of *Enterococcus faecalis*, *J. of Clinical Microbiol.* **1993**; 31(6);1570-1574.
91. **Patterson JE and Kelly CC.** Pulsed-field Gel Electrophoresis as an Epidemiologic Tool for Enterococci and Streptococci, *Methods in Cell Biol.* **1998**; 20: 233-239.
92. **Williams, JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV.** DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, **1990**; 18: 6531-6535.
93. **Welsh J and Mc Clelland M.** Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nuc. Acids Res.* **1990**; 18,7213-7218.
94. **Williams, JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV.** DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nuc. Acids Res.* **1990**; 25;18(22):6531-6535.
95. **Atienzar FA, Cordi B, Donkin ME, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH.** Comparison of Ultraviolet-Induced Genotoxicity Detected by Random Amplified Polymorphic DNA with Chlorophyll Fluorescence and Growth in a Marine Macroalgae, *Palmaria Palmata*. *Aquat Toxicol.* **2000**; 50(1-2):1-12.
96. **T. Säull C, Lind-Halldén, C. Halldén,** Primer Mixtures in RAPD Analysis. *Hereditas*, **2000**; 132:203–208. Doi:10.1111/j.1601-5223.2000.00203.x
97. **Aljanabi SM, Forget L, Dookun A.** An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide and Polyphenol Free Sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1999**; 17-281. Doi:10.1023/A:100769292950
98. **Weeden NF, Timmerman GM, Hemmat M, Kneen BE, and Lodhi MA.** Inheritance and Reliability of RAPD Markers, in: Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Symposia Series, Minneapolis. *Joint Plant Breeding*, **1992**; 12-17.
99. **Hansen J, Sato M, Glascoe J. and Ruedy R.** A Common Sense Climate Index: is Climate Changing Noticeably *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**; 4113-4120.
100. **Halldén C.** Characterization and Use of a Multiplex PCR Based System: Random Amplified Polymorphic DNA, (Ph.D. Thesis), Department Of Genetics, Lund University, Lund **1998**.
101. **Tingey SV and Del Tufa JP.** Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiology*, **1993**; 101, 349-352.
102. **Huys G, Coopman R, Janssen P. and Kersters K.** High-Resolution Genotypic Analysis of The Genus *Aeromonas* by AFLP Fingerprinting. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, **1996**; 46, 572-580.
103. **Babalola OO.** Molecular Techniques: An Overview of Methods for The Detection of Bacteria. *African Journal Of Biotechnology*, **2003**; 2, 710-713.
104. **Mueller UG. and Wolfenbarger LL.** AFLP Genotyping and Fingerprinting. *Trends Ecol Evol.* **1999**; 14(10):389-394.
105. **Voss A, Loeffen F, Bakker C, Klaassen C.** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. *Emerging Infectious Disease*, **2005**; 11:1965-1966.

106. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, and Spratt BG. Multilocus Sequence Typing: a Portable Approach to the Identification of Clones Within Populations of Pathogenic Microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1998**; 95: 3140-3145.
107. Feil E. Molecular Evolution, Recombination and Population Structure of Microbial Pathogens. *IMS, Imperial College*, **2007**.
108. Aanensen DM, Spratt BG. The Multilocus Sequence Typing Network: Mlst.Net. *Nucleic Acids Resarch*, **2005**; 33: 728–733.
109. Hazımoğlu Ş, *Staphylococcus aureus* Suşlarında Pantonvalentine Lökosidin (Pvl) Genlerinin Araştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, AYDIN: Adnan Menderes Üniversitesi, **2011**.
110. Altındış M. Hemşireler için Mikrobiyoloji, 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **2010**: 184- 186.
111. Hamaide AJ, Martinez SA, Hauptman J, Walker RD. Prospective Comparison of Four Sampling Methods (Cystocentesis, Bladder Mucosal Swab, Bladder Mucosal Biopsy And Urolith Culture) To Identify Urinary Tract Infections in Dogs with Urolithiasis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **1998**; 34: 423-430.
112. Taşbakan MI, Pullukçu H, Yamazhan T, Arda B, Ulusoy S. Toplum Kökenli Üriner Sistem İnfeksiyonlarından Soyutlanan *Escherichia coli* Suşlarında Fosfomisinin İnvitro Etkinliğinin Diğer Antibiyotiklerle Karşılaştırılması. *Ankem Dergisi*, **2004**; 18: 216-219.
113. Kaçmaz B, Aksoy A, Sultan N. İdrar Örneklerinden İzole Edilen *Escherichia coli* İzolatlarında Oral Antibiyotiklere Karşı Direncin Araştırılması. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **2007**; 64:11-15.
114. http://www.hastaneinfeksiyonlaridergisi.org/managete/fu_folder/1997-01/html/1997_1-1-021-030.htm
115. Akata F. Üriner Sistem İnfeksiyonlarında Uygun Antibiyotik Kullanımı. *Klinik Dergisi*, **2001**; 14:114-123.
116. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. *Escherichia coli* ST131: The Quintessential Example of an International Multiresistant High-Risk Clone. *Adv Appl Microbiol* **2015**; 90: 109–54.
117. Williamson DA, Barrett LK, Rogers BA, Freeman JT, Hadway P, Paterson DL. Infectious Complications Following Transrectal Ultrasound-Guided Prostate Biopsy: New Challenges in The Era of Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis*, **2013**; 57: 267–74.
118. Leibovici L, Shraga I, Drucker M, Konigsberger H, Samra Z, Pitlik SD. The Benefit of Appropriate Empirical Antibiotic Treatment in Patients With Bloodstream Infection. *J Intern Med* **1998**;244:379–86.
119. Teker B. Mikrobiyoloji 1 Baskı, Ankara: Özkan Matbaacılık, **2009**.
120. Livermore DM, Brown DFJ. Detection of Beta Lactamase-Mediated Resistance. *J Antimicrob Chemother* **2001**; 48(1): 9-64.
121. Ramos JR, Telles MP C, Diniz-Filho JAF, Soares TN, Melo DB and Oliveira G. Optimizing Reproducibility Evaluation for Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Genetics and Molecular Research* **2008**; 7:1384- 1391.
122. Mitsuda T, Muto T, Yamada M, Kobayashi N, Toba M, Aihara Y, Ito A, Yokoto S. Epidemiological Study of a Food-Borne Outbreak of Enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:NM by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **1998**; 652–656 Vol. 36, No. 3
123. Hannah E, Johnson J, Angola F, Haddadin B, Williamson J, Samore M. Molecular Analysis of Antimicrobial-Susceptible and Resistant *Escherichia coli* from Retail Meats and Human Stool and Clinical Specimens in a Rural Community Setting. *Foodborne Pathogens And Disease*, **2009**; volume 6, number 3,

doi: 10.1089/fpd.2008.0176.

- 124. Suardana W, Artama W, Widiasih D. and Mahardika I.** Genetic Diversity of *Escherichia coli* O157:H7 strains using random amplified polymorphic DNA (RAPD) *International Research Journal of Microbiology*, **2013**; Vol. 4(2): 72-78, (IRJM) (ISSN: 2141-5463). Available online <http://www.interestjournals.org/IRJM> Copyright © 2013 International Research Journals.
- 125. Johnson J, Murray A, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA and Smith KE.** Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2003**; 47(7): 2161–2168
- 126. George L H, Prasad M.P.** Determination of Genetic Diversity Among Antibiotic Resistant *E. coli* Strains using RAPD Molecular Markers. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, **2015**; 3 (2): 20-25.

ÖZGEÇMİŞ

05.11.1989 tarihinde Adana'da doğdu. İlköğretim Eğitimini 2003 yılında Adana Kolejinde tamamladıktan sonra Lise Eğitiminden 2006 yılında Bilimkent Kolejinden mezun oldu. 2006 senesinde Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde başladığı lisans eğitiminden 2010 senesinde mezun oldu.2014 Güz döneminde Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.