

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

***Escherichia coli* GENOTİPLERİNİN PFGE İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevda ALTINTAŞ

EKİM 2017
TRABZON



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

***Escherichia coli* GENOTİPLERİNİN PFGE İLE BELİRLENMESİ**

Sevda ALTINTAŞ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ YÜKSEK MÜHENDİSİ”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11.09.2017
Tezin Savunma Tarihi : 11.10.2017**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İlhan ALTINOK

Trabzon 2017

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında
Sevda ALTINTAŞ Tarafından Hazırlanan**

***Escherichia coli* GENOTİPLERİNİN PFGE İLE BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 19 / 09 / 2017 gün ve 1719 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. İlhan ALTINOK

Üye : Prof. Dr. Erol ÇAPKIN

Üye : Doç. Dr. Şevki KAYIŞ


.....
.....
.....

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. İlhan ALTINOK'a, çalışmamın yapım aşamasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Erol ÇAPKIN'a, verilerimin elde edilmesinde Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul TERZİ'ye ve çalışmamın her aşamasında desteğini hissettiğim aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Sevda ALTINTAŞ
Trabzon 2017

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Escherichia coli* Genotiplerinin PFGE ile Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İlhan ALTINOK’un sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 11/10/2017

Sevda ALTINTAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Enterobacteriaceae Familyası.....	3
1.3. <i>Escherichia coli</i>	4
1.3.1. Mikrobiyolojik Özellikler.....	5
1.3.2. Antijen Yapıları ve Tiplendirilmesi	5
1.3.3. Patogenezi.....	6
1.4. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılan Antibiyotikler.....	6
1.5. Moleküler Yöntemler	8
1.5.1. Pulsed-Field Gel Electroforez (PFGE).....	8
1.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	13
1.5.3. Restriksiyon Enzimleri	14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	15
2.1. Materyal.....	17
2.1.1. Örnek Temini	17
2.2. Metot	17
2.2.1. Çalışmada Kullanılan Solusyonlar	17
2.2.2. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi	18
2.2.3. Pulsed-Field Gel Electroforez (PFGE) Aşamaları	19
2.2.3.1. Plug Hazırlama	20
2.2.3.2. Enzimle Kesim	21
2.2.3.3. Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE) İşlemi.....	21
2.2.3.4. Görüntüleme.....	21

2.2.3.5. Analiz	22
3. BULGULAR	23
3.1. Antibiyotik Direnç Genlerin Sonuçları	23
3.2. PFGE Sonuçları	25
4. TARTIŞMA.....	30
5. SONUÇ	36
6. ÖNERİLER	37
7. KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ	



Yüksek Lisans

ÖZET

“*Escherichia coli* GENOTİPLERİNİN PFGE İLE BELİRLENMESİ”

Sevda ALTINTAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. İlhan ALTINOK
2017, 44 Sayfa

Bu çalışmada, Trabzon ve Rize illerindeki tatlı sularda bulunan 7 farklı gökkuşağı alabalığı tesisinin giriş-çıkışındaki su ve sedimentten izole edilen 75 *Escherichia coli* izolatlarının eritromisin (*ereA* ve *ereB* geni) ve florfenikol (*florR* geni) dirençliliklerine göre genotipik yanının değişip değişmediği belirlenmiştir. Bu bağlamda genomik DNA’lar *XbaI* ve *ApaI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek pulse field jel elektroforez (PFGE)’de yürütülmüştür. *XbaI* enzimi ile kesildikten sonra yapılan PFGE analizi sonucunda genomik DNA’larının benzerlik oranları %93 baz alındığında 4 temel kümede (X1-X4) gruplandırılmıştır. Bu sonuçlara göre tüm izolatlar arası benzerlik oranları %79.1 olup, TASWG 0411, TASSC 0811, TASSC 0211, SURWG 1010 ve AASG 0810 suşları diğer gruplardan ayrıldığında geri kalan suşların benzerlik oranları %85.1 olmaktadır. *ApaI* enzimi ile kesildikten sonra yapılan PFGE analizi sonucunda çalışılan suşlar 4 temel kümede (A1-A4) gruplandırılmıştır. A1 kümesi en büyük küme olup bünyesinde toplam suşların %51’ini barındırmaktadır. Antibiyotik direnç genlerine bakılan *E. coli* izolatlarında en fazla *ereB* direnç geni belirlenirken *ereA*, *ereB* ve *florR* geni varlıkları ile PFGE genotipi arasında bir ilişkiye rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *E. coli*, PFGE, Kesici Enzim, Antibiyotik Direnç Geni.

Master Thesis

SUMMARY

GENOTYPING of *Escherichia coli* BY PFGE

Sevda ALTINTAŞ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Fisheris Technology Program
Supervisor: Prof. Dr. İlhan ALTINOK
2017, 44 Pages

In the present study, 75 *Escherichia coli* isolated from seven different fish farms located in Trabzon and Rize. Water and sediment samples were taken from water inlet and outlet. Isolates were screened in the presence of erythromycin (*ereA* and *ereB*) and florfenicol (*floR*) genes. Potential relationship between antibiotic resistance genes and Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) profile was determined. For this purpose, genomic DNA of the strains was digested with *XbaI* and *ApaI* restriction enzymes separately and run on the PFGE. Based on 93% similarity ratio, strains were grouped in 4 clusters (X1-X4) after cutting with *XbaI*. The similarity ratios among all isolates were 79.1%, and when TASWG 0411, TASSC 0811, TASSC 0211, SURWG 1010 and AASG 0810 strains of were separated from the other groups, similarity ratio was increased to 85.1%. Similar to *XbaI* restriction enzyme profile, after digesting bacterial DNA with *ApaI*, strains separated in 4 clusters (A1-A4). Largest cluster was A1 and it contained 51% of the strains. It was determined that the most common antibiotic resistance gene was *ereB* followed by *ereA* and *floR*. There was relationship was found between presence of antibiotic resistance genes and PFGE profile.

Key Words: *E. coli*, PFGE, Restriction Enzyme, Antibiotic Resistance Gene.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>E. coli</i> 'nin mikroskop görüntüsü	4
Şekil 2. Pulse Field Gel Electrophorez sistemi görüntüsü.....	9
Şekil 3. PFGE'nin yaygın olarak kullanılan türleri	11
Şekil 4. Genetik olayların PFGE bant profillerine yansıması: A) kontrol, B) salgın suş profili, C) yeni bir restriksiyon bölgesinin oluşması, D) bir restriksiyon bölgesinin kaybolması, E) DNA parçasının insersiyonu. DNA parçasının delesyonunu "O" kaybedilen bandı, "*" kazanılan bandı ifade etmektedir	13
Şekil 5. PFGE'nin pratik aşamaları	20
Şekil 6. Su ve sedimentten izole edilen <i>E. coli</i> prevelansı.....	23
Şekil 7. <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik direnç genleri	24
Şekil 8. PZR görüntüsü, M: Marker, A: <i>ereA</i> , F: <i>florR</i>	25
Şekil 9. <i>E. coli</i> suşlarının <i>XbaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucu oluşan bant profilleri	26
Şekil 10. <i>E. coli</i> suşlarının <i>XbaI</i> enzimi ile kesimi sonrası elde edilen dendrogram	27
Şekil 11. <i>E. coli</i> suşlarının <i>ApaI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim sonucu oluşan bant profilleri	28
Şekil 12. <i>E. coli</i> suşlarının <i>ApaI</i> enzimi ile kesimi sonrası elde edilen dendogram	29

TABLÖLÄR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan bazı antibiyotikler	7
Tablo 2. PFGE kalıplarını yorumlama kriterleri	12
Tablo 3. PZR reaksiyonunda kullanılan primerler	19
Tablo 4. Antibiyotik direnç genleri belirlenirken kullanılan PZR protokol	19
Tablo 5. <i>XbaI</i> veya <i>ApaI</i> enzimleri için prosedür	21
Tablo 6. Su girişı (WG), su çıkışı (WÇ), sediment giriş (SG), sediment çıkış (SÇ) noktasında izole edilen <i>E. coli</i> 'lerin antibiyotik direnç genleri	24



SEMBOLLER DİZİNİ

ARGs	: Antibiotic Resistance Genes
Bp	: Baz çifti
°C	: Derece Santigrat
CHEF	: Contour-Clamped Homojen Elektrik Alanları
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetikasit
Erm	: Erythromycin resistant methylase
EIEC	: Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EHEC	: Enterohemorajik <i>E. coli</i> suşları
EMB	: Eosin Methylen Blue Agar
EPEC	: Enteropatojen <i>E. coli</i>
ETEC	: Enterotoksik <i>E. coli</i>
FIGE	: Alan inversiyon jel elektroforezi
g	: Gram
kb	: kilobaz
MgCl	: Magnezyum klorür
MIC	: Minimum inhibitor concentration
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
RGE	: Rotating gel electrophoresis
RE	: Restriksiyon Enzimi
PFGE	: Pulse Field Gel Elektrophoresis
rpm	: Dakika Devir Sayısı
TAE	: Tris Acetate EDTA
TAFE	: Transvers-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi
TBE	: Tris Borate EDTA
TE	: Tris EDTA
TSA	: Tryptic Soy Agar
UPGMA	: Unweighted pair-group method analysis

V	: Voltaj
vd.	: ve diđerleri
W	: Volt
μ	: Mikron
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
%	: Yüzde
∞	: Sonsuz



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Su, insanlar tarafından; tarım arazilerinin sulanması, içme suyu, turizm, ulaşım, enerji ve su ürünleri yetiştiriciliği gibi faaliyetlerde kullanılmaktadır (Egemen ve Sunlu, 1996). Suyun bu gibi faaliyetler için kullanımı sularda kirlilik ve bakteri oluşumu gibi sonuçları da beraberinde getirmektedir. Tatlı sularda bakteri varlığı kirlilikle oluşabileceği gibi doğal olarak birçok bakteri de su ortamında bulunabilmektedir.

Su ortamında bulunan toplam koliform bakteri sayıları bazen su kirliliğini ya da kirlenme derecesini belirlemek için de kullanılmaktadır. Bu organizmalar dışkı kontaminasyon indikatörleri kadar kesin değildir, çünkü birçoğu toprakta ve suda yaşayabilir ve çoğalabilir. Akarsulardan alınan bir numunede yüksek sayıda fekal koliform bakteri bulunursa, mutlaka insan kökenli olmasa da yakın zamanda dışkı kontaminasyonunun olduğunu göstermektedir (Anonim, 2017a).

Koliform bakteriler yaşadıkları doğal kaynaklar ile dışkı, toprak, su ve bitki örtüsü gibi yerlere bağlı olarak değişimler göstermektedir. Bu grubun en önemli özelliği yaşadıkları ortamlara sıkı sıkıya bağlı olmalarıdır (Munsuz ve Ünver, 1995). Bu nedenle koliform grupları suyun kalitesinin belirlenmesinde kullanılan önemli indikatör organizmalardır. Nitekim bu grup içinde yer alan organizmalardan patojen (hastalık yapıcı) olanlar olduğu gibi patojen olmayanları da mevcuttur. İçlerinde en belirgin olan *Escherichia coli* olup, bu bakterilerin patojen formu olduğu gibi patojen olmayan formuda vardır. *E. coli*'nin patojen olmayan formu su kirliliğinin tespitinde yararlı bir indikatördür. Bu nedenle herhangi bir su ortamında *E. coli* belirlenirse bu ortama kanalizasyon karıştığı anlamına gelmektedir. *E. coli* karıştığı ortamda doğal olarak 15-20 günde kendiliğinden kaybolmaktadır (Lugal Göksu, 2003).

Dışkı kökenli gram negatif basiller (çubuk şekilli bakteriler) tüm sıcakkanlı hayvanların sindirim kanallarında bulunmaktadır ve çoğu patojenik değildir. Özellikle bağırsaklarda bulunan bu bakteriler besinlerin ayrıştırılmasında oldukça önemlidir. Ayrıca K, E ve bazı B vitaminlerinin sentezinde de önemli rol oynamaktadır (Heperkan, 2007). Bağırsaklarda bulunan özellikle *E. coli*'lerin bağırsak kanalından çıkıp diğer organlara yerleşmesi sonucunda da hastalıklar meydana gelmektedir ve su ürünleri yetiştiriciliğinde

çevre şartlarının uygunsuzluğundan dolayı birçok hastalık oluşmaktadır. Hastalıkların tedavisinde genellikle antibiyotik ve kimyasallar kullanılmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıklara karşı oksitetrasiklin, florfenikol, sarafloksasin, eritromisin, sülfonamidler ve trimetoprim gibi birçok antibiyotik kullanılmaktadır (Topal vd., 2015).

Bu antibiyotiklerin çoğu yeme karıştırılarak verilmektedir. Yemin bir kısmı balıklar tarafından tüketilse de tüketilmeyen kısım ya suda çözünür ya da dibe çöker. Yetiştiricilikte kullanılan ilaçlar ortamda uzun süre kalabilmekte, ortamdaki bakteriler kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanabilmektedir. Genellikle düşük tozlarda antibiyotiklerin uzun süre kullanılması veya tavsiye edilen süreden daha uzun bir süre antibiyotiklerin kullanılması gibi nedenlere bağlı olarak dirençleri artar ve buna bağlı olumsuz sonuçlar gözlenebileceği gibi (Altınok, 2016; Lugal Göksu, 2003) kullanılan bu antibiyotikler besin zinciri yoluyla ya da su ekosistemiyle diğer canlıları da olumsuz yönde etkilemektedir (Topal vd., 2015).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıklarının tedavisi sırasında antimikrobiyal maddeler çevresindeki suya salınmaktadır. Eritromisin ve diğer makrolidlere direnç genellikle ribozomal hedef bölge değişiklikleri ile meydana gelmektedir. Eritromisin esterazlar *E. coli*'den izole edilmektedir ve antibiyotiğin lakton halkasını hidrolize ederek etki göstermektedirler. Bu direnç plazmidle aktarılmaktadır. Kloramfenikol asetiltransferaz ise gram (+) ve gram (-) bakterilerin kloramfenikol direncinden sorumludur. Enzim plazmid veya kromozomlar üzerinde olabilen genler tarafından sentezlenmektedir (Ertürk, 2010).

Bakterilerin kazandığı direnç neticesinde meydana gelen değişiklikler ve genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla moleküler teknikler kullanılmaktadır. Günümüzde moleküler biyolojide hızlı ilerlemenin büyük kısmı, DNA moleküllerini ayırma, çoğaltma ve görüntüleme yeteneklerine bağlıdır. Bu amaçla kullanılan en yaygın teknik standart agaroz jel elektroforezidir. DNA moleküllerinin konvansiyonel jel elektroforezi, DNA'yı katı bir matriste (diğer bir deyişle agaroz veya poliakrilamid) yerleştirerek ve molekülleri, statik bir elektrik alanı altında jelden göç ettirmek suretiyle gerçekleştirilir. 100 ile 200 baz çifti (bp) ile 50 kilobaz çifti (kb) arasındaki DNA fragmanları geleneksel jel elektroforez teknikleri ile rutin olarak ayrılmasına rağmen 50 kb çiftinin üzerindeki moleküllerin büyüklüğü nedeniyle jellerin ayırma gücü yetersiz kalmaktadır. Kullanılan jeller çok düşük agaroz konsantrasyonları nedeniyle oldukça kırılmandır ve çoğu uygulama için ayırma yeterli olamamaktadır (Gardiner, 1991).

Pulse field jel elektroforez (PFGE)'nin gelişimiyle birlikte rutin olarak ayrılabilen ve analiz edilebilen DNA moleküllerinin büyüklüğü iki misli artmıştır. Bu artış, daha önce yapılmış zahmetli araştırmaları basitleştirmesi ve mümkün olan en fazla sayıda yeniliği ortaya koyduğu için moleküler biyolojide büyük önem taşımaktadır. Tüm organizmaları bakteri ve virüslerden memelilere kadar birçok kullanımı alanını kapsamaktadır (Gardiner, 1991). PFGE yöntemi DNA'nın hazırlanmasını, DNA'nın ender kesici bir kesim enzimi kullanarak ayrılmasını, fragmanların PFGE tarafından ayrılmasını ve bantlama modellerinin görselleştirilmesi ve yorumlanmasını gerektirir (Kaufmann, 1998).

Bu çalışmada, Trabzon ve Rize illerindeki tatlı sularda bulunan 7 farklı gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) tesisinin giriş-çıkışındaki su ve sedimentlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarının genotipik analizinin *XbaI* ve *ApaI* enzimleri kullanılarak PFGE yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.2. Enterobacteriaceae Familyası

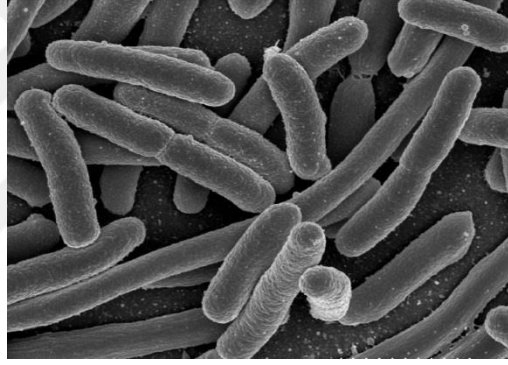
Enterobacteriaceae, *Salmonella* ve *Escherichia coli* gibi ünlü hastalık etkenlerini de içeren büyük bir bakteri ailesidir. İnsan ve hayvanların bağırsaklarında çok sayıda aerobik, gram negatif ve spor oluşturmeyen bakteriler bulunmaktadır. Morfoloji, boyama, üreme ve diğer özellikleriyle benzerlik gösteren bu mikroorganizmalar Enterobacteriaceae familyasında toplanmaktadır. Bu familyanın içinde enfeksiyon hastalıklarına yol açan zararlı türleri olabileceği gibi gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanılan yararlı türleri de vardır. Bazı türler organik maddelerin doğada çürümesine yardım ederken, birçoğu da insan ve diğer hayvanların normal bağırsak florasında bulunmaktadır (Anonim, 2016b; Arda vd., 1992).

Entereobacteriaceae familyası içerisinde insan ve hayvan bağırsak florasında sürekli olarak bulunanlar bazen bağırsak florasında yer alan ve bir kısım da bitkilerde bulunan heterojen bir grup bakteri bulunur. Entereobacteriaceae familyası bakteriler yaklaşık 0,3-1,0 µm eninde ve 1,0-6,0 µm boyunda olup çoğunluğu hareketli bazıları ise hareketsiz düz gram negatif çomak biçiminde olmalarıdır. Endospor oluşturmazken genel besiyerlerinde kolayca çoğalabilirler. Fermantatif metabolizmaları var olup glikozu parçalayarak asit ve birçoğu gaz da oluşturabilirler. Katalaz pozitif, tümünde oksidaz negatiftir (Bilgehan, 2000). Familya da yer alan mikroorganizmaların bir kısmı örneğin *E. coli* hem bağırsak kanalının normal florasını oluştururken hem de bazı enfeksiyonlara neden olabilmektedir

(Arda vd., 1992). Bağırsaklardaki Enterik bakterilerin arasında *E. coli* türü başta gelir. Aerobik bakterilerin %80'nini oluştururken dışkıdaki miktarı 10^8 *E. coli*/gram'dır (Anonim, 2016b).

1.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli, pediatrist ve bakteriyolog olan Theodor Escherich tarafından bebek dışkısında ince kısa çubuklar şeklinde izole edilip 1885 yılında *Bacterium coli commune* adıyla yayınlanmıştır. 1954 yılına kadar *Escherichia coli* olarak tanımlanamamıştır (Croxen vd., 2013). İnsanların bir günde dışkı yoluyla vücudundan atılan *E. coli* (Şekil 1) bakteri sayısı 100 milyar ile 10 trilyon arasındadır (Anonim, 2016c).



Şekil 1. *E. coli*'nin mikroskop görüntüsü (URL-1, 2017).

Escherichia coli memelilerin ve kuşların bağırsak florasında bulunup ve burada diğer flora bakterileri ve organizma ile bir denge altında kaldığı sürece hastalık yapmaz. Belirli koşullar altında *E. coli* insan ve hayvanlar için patojen olup gerek yangı gerekse sürgün şeklinde ortaya çıkan bağırsak hastalıklarına etken olabilir. Bağırsak kanallarından çıkıp diğer dokulara yerleşmeleri ve çeşitli klinik tablolara yol açmaları sık görülen durumlardandır. Özellikle idrar yolları safra kesesi ve safra yolları akciğer periton ve menenjlere ulaşan *E. coli* bakterileri önemli hastalıklara yol açabilir. Bunların en ünlüsü sayılan O157:H7 adlı serotip kanlı ishale ve ölüme yol açabilmektedir (Bilgehan, 2000).

Escherichia coli türü içinde büyük bir çeşitlilik vardır. *E. coli* türü içinde farklı özelliklere sahip olan, "suş" olarak adlandırılan çeşitli tipler vardır. Bunları birbirinden farklı kılan küçük mutasyonlar olabileceği gibi bütün bir genin, hatta pek çok genin, varlığı

veya yokluğu olabilir. Bu genler bakteriofaj, transpozon veya plazmitlerde bulunur ve bunlar başka bakteri türlerinden *E. coli*'ye iletilmiş olur (Anonim, 2016c).

1.3.1. Mikrobiyolojik Özellikler

Escherichia coli, Enterobacteriaceae familyasına bağlı *Escherichia* cinsi içinde yer alan gram negatif çomaklardır (Anonim, 2016d). *E. coli* yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda ve 1,0-1,5 µm eninde düz uçları yuvarlak çomakçık (çubuk) şeklinde, oksidaz negatif, hareketli ve sporsuz bakterilerdir. Hareketsiz şuşları da mevcuttur. Fakültatif anaerop nutrient agar, kanlı agar ve enterobakterilerin diferensiyel ve selektif besi yerlerinde (MacConkey, EMB agar, vs) 37°C'de 24 saate gözle görülebilir S tipi koloniler oluştururlar. MacConkey agarda pembe, EMB agarda metalik rengi veren koloniler oluştururlar. Gram negatif ve bakteriyolojik boyalarla kolayca boyanabilirler. Etraflarında kapsül maddeleri bulunmakla beraber organizmada bağırsak dışındaki yerlerde soyutlanan kökenlerin çoğunda kapsül ya da mikrokapsül bulunur. *E. coli* buyyon ve jeloz gibi besi yerlerinde kolayca üreyebilirler (Bilgehan, 2000).

Escherichia coli 60°C'de yaklaşık 30 dk, oda ısısında uygun ortamlarda uzun süre canlı kalabilme özelliğiyle oldukça dirençli bir bakteridir. Ayrıca soğuğa karşı dirençli iken dezenfektanlara karşı dirençliliği yoktur. Malaşit yeşili, brillant yeşili ve füksin gibi boyalar, safra, safra tuzları, sodyum sülfat gibi maddelere çoğalmalarını inhibe eder (Bilgehan, 2000).

1.3.2. Antijen Yapıları ve Tiplendirilmesi

Escherichia coli bakterilerinde O (somatik), H (kirpik) ve K (kapsül) antijenleri bulunur. O antijeni alkol ve kaynatmaya karşı dirençli formole karşı dirençsiz olmasıyla birlikte somatik, ısıya dayanıklı lipopolisakkarit yapısında bir antijendir. H antijeni, protein yapısında olup hareketli kökenlerde bulunurlar. Bu antijen formole karşı dirençli olurken kaynatma ve alkole karşı dayanıksızdır. K antijeni kapsül niteliğindedir ve polisakkarit yapısındadır. Isıya karşı dayanıklı olup 100°C'de iki saat kaynatılması sonucunda ortadan kaldırılabılırler. *E. coli* bakterilerinde özel fimbria antijenleri de bulunabilir (Bilgehan, 2000).

1.3.3. Patogenez

Escherichia coli ishal, septisemis menenjit ve idrar yolu enfeksiyonu gibi kliniksel semptomlar oluşturlar. İshale neden olan *E. coli*, farklı hastalığın türüne bağlı olarak farklı pulstotip olarak bölünebilmektedir (Stenutz vd., 2006).

Enterotoksik *E. coli* (ETEC) adı altında bağırsakta enterotoksinler oluşturan ve bu toksinlerin etkisi ile hafiften ağır koleriform sürgünlere kadar sürgünler oluşturan bağırsak patojeni *E. coli*'ler toplanırlar. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), daha çok çocuklarda, fakat aynı zamanda yetişkinlerde de dizanteriform sürgünlerine yol açan *E. coli* bakterileri bu grupta toplanır. Bunlar enterotoksin yapmazlar. Enterohemorajik *E. coli* suşları (EHEC), çocuklarda akut ishali takip eden, akut böbrek yetmezliği, trombositopeni ve hemolitik anemiyle seyreden "hemolitik üremi sendromu"nın etkenidirler. Enteropatojen *E. coli* (EPEC) daha çok süt çocuklarında görülür ve bu grup içindekilerin çoğu antibiyotiklere karşı çoklu dirençlere sahip serovarlar yer alır (Bilgehan, 2000).

1.4. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılan Antibiyotikler

Antibiyotikler insanlar başta olmak üzere bütün canlılarda ve 50 yılı aşkın bir süredir su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanılmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı bakteriyel hastalılara paralel bir şekilde artmıştır. Birçok veteriner antibakteriyellerin su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılma potansiyeli vardır ve antibiyotik kullanımı ülke ve coğrafyalara bağlı olarak farklılık göstermektedir (İnglis, 2000; Altınok, 2016).

Yoğun olarak bakteriyel hastalıklar kültür sistemlerinde sık sık görülür ve bu hastalıkları tedavi etmek için çeşitli antibiyotikler kullanılmaktadır. Dolayısıyla, antibiyotiklerin su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanımı, suda bulunan bakterilerin direncin artmasına katkıda bulunabilmektedir (Anonim, 1997). Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan bazı antibiyotikler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan bazı antibiyotikler

Antimikrobiyel sınıflar	Antimikrobiyellerin açıklamaları
Makrolidler	Balık yetiştiriciliğinde kullanılan tek makrolid eritromisindir. Gram-pozitif bakterilere karşı aktiftir ve bakteriyel böbrek hastalığı (<i>Renibacterium salmoninarum</i>) ve streptokok enfeksiyonlarında kullanılır. Yeme karıştırılarak verilmektedir (Anonim, 1997).
Fenikoller	Bunlar kloramfenikol, tiamfenikol ve florfenikol gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Kloramfenikol tifo tedavisi gibi önemli ilaç kullanım alanları vardır. Birçok ülkede su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanımı yasaklansa da diğer ülkelerde kullanımı devam etmektedir. Klonamfenikolün başlıca çevresel tehlikesi, ilaç direncini artırma potansiyelidir. Tiamfenikol ve florfenikol Japonya ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanım için geliştirilmiştir. Bunlar kloramfenikol ile aynı grupta olmasına karşın kloramfenikolün yan etkilerine sahip değildir (Anonim, 1997).
Tetrasiklinler	Bu grubun en yaygın kullanılanı oksitetrasiklin olup bazı bölgelerde chlortetracycline ve doksisisiklin de kullanılmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde en yaygın kullanılan antibiyotik Oksitetrasiklin'dir. Oral veya banyo yoluyla uygulanmaktadır. Nispeten ucuzdur. Balıklar ve kabuklu hayvanlarda <i>Aeromonas</i> ve <i>Vibrio</i> spp gibi çok çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı etkilidir. Çok yaygın olarak kullanılması veya uygun olmayan şartlarda kullanılmasından dolayı birçok bakteriyel izolatlar, oksitetrasikline karşı direnç kazanmıştır (Capone vd., 1996; Smith, 1996; Altınok, 2016).
Sülfonamidler	Bu ilaçlar tek başına kullanılabilir, ancak trimetoprim veya ormetoprim ile beraber daha sık kullanılırlar. Furunkulosis, enterik kızılğaz hastalığı ve vibriosis gibi hastalıkları kontrol etmek için kullanılırlar ve genellikle yeme karıştırılarak kullanılırlar (Samuelsen vd., 1994; Capone vd., 1996).

Su ortamında hastalıklara karşı bilinçsizce kullanılan antibiyotikler çevrede bulunan bakterilerin direnç kazanmasına neden olmaktadır. Patojenlere karşı kullanılan antibiyotiklerin ya düşük dozlarda uzun süre kullanılması ya da tavsiye edilen zamandan daha uzun süre kullanılması gibi etkenlerden dolayı bakterilerde direnç oluşmaktadır (Altınok, 2016).

Antibiyotiklere karşı direnç iki şekilde oluşmaktadır. Doğal dirençlilik, bazı bakterilerin doğal yapıları nedeniyle antibiyotiklere direnç göstermesidir ve genellikle yapısal ve biyokimyasal özellikler sayesinde bakterinin doğasına bağlı olarak oluşmaktadır. Kazanılmış direnç ise aşırı ve bilinçsiz antibiyotik kullanımına bağlı olarak duyarlı olan bakterilerde sonradan oluşmasıdır. Kazanılmış direnç, antibiyotik inaktivasyonu sonucu gelişen direnç, hedef molekülün değişmesi sonucu gelişen direnç,

aktif pompa sistemleri ve hücre duvarı değişimi sonucu gelişen direnç, diğer mekanizmalar sonucu gelişen direnç olmak üzere 4 grup altında toplanabilmektedir (Çiftci ve Aksoy, 2015). Yatay gen aktarımı genellikle konjüгатif plazmidler, fajlar ve transpozonlar gibi mobil genetik elementler tarafından gerçekleşmektedir (Çapkın vd., 2015).

1.5. Moleküler Yöntemler

Escherichia coli'nin çeşitli ortamlarda hayatta kalma kabiliyeti geniş genetik çeşitliliğe atfedilebilir, çünkü yüksek genetik çeşitlilik genellikle türlerin değişik ortamlara uyumunu ve çevresel değişikliklere karşı direncini geliştirir. Bugüne kadar tamamlanmış 22 *E. coli* genom dizisine dayanarak, *E. coli* türleri içerisinde en az 42.500 gen ailesi bulunduğu tahmin edilmektedir. Alttürlerde veya suş seviyesinde, *E. coli*'nin muazzam genetik çeşitliliği, çok sayıda farklı *E. coli* genotipinin varlığı ile kendini göstermektedir (Goto and Yan, 2011).

Akuakültür ortamında problemleri çözmek amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Pulsed-Field Jel Elektrofrez (PFGE), Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus Element (ERIC-PZR), Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Multipleks (Çoklu) PZR ve In Situ Hibridizasyon gibi birçok yöntem geliştirilmiştir (Goto and Yan, 2011; Türe ve Altınok, 2013; Tenover vd., 1995).

1.5.1. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Pulsed-field jel elektrofrez (PFGE), moleküler tipleme yöntemlerinin "altın metodu" olarak düşünülmektedir (Olive ve Bean, 1999). PFGE, farklı bakteri soyları ile ilgili yüksek ayırıcı güçleri ile diğer birçok biyokimyasal ve moleküler tipleme yöntemlerinden üstün olduğu kanıtlanmış genotiplendirme yöntemidir (Nameghi, 2007).

Schwartz vd. (1982), 50 kb'den büyük DNA moleküllerinin iki alternatif elektrik alanı kullanarak ayrılacağı kavramını ortaya attı. PFGE yöntemi; agaroz içine gömülü haldeki bakteriden, yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen kromozomun, restriksiyon enzimi (RE) ile kesim profilinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Durmaz vd., 2007). Geleneksel jel elektrofrez statik bir alan kullanıp, 50 kb'a kadar olan DNA

fragmentlerini ayrıştırabilirken, PFGE fragmentleri 10 megabaz büyüklüğündeki fragmentleri ayrıştırabilmektedir (Kaufmann, 1998).

Pulse field jel elektroforezi (PFGE) periyodik olarak bir jel matrisi yönünü değiştiren bir elektrik alanı uygulayarak büyük DNA moleküllerinin ayrılması için kullanılan önemli bir tekniktir. PFGE, çok sayıda bakteri karakterize etmek için yaygın olarak uygulanmıştır (Félix vd., 2012).

Bir PFGE sisteminde, bazı sıcaklık düzenleme araçları bulunan bir jel kutusu, elektrik alanlarını kontrol etmek için bir anahtarlama birimi, bir soğutucu ve bir güç kaynağı temel bileşenlerinden oluşmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Pulse Field Gel Electrophoresis sistemi görüntüsü

PFGE için, bakteri izolatları sıvı veya katı ortamda çoğaltılır, erimiş agaroz ile birleştirilir ve küçük kalıplara dökülür. Gömülü bakteriler yerinde deterjan-enzim lizisine tabi tutulur ve seyrek olarak kesen bir restriksiyon endonükleaz enzimi (RE) ile kesilebilir. İçerisinde bakteri DNA'sı bulunduran agaroz jelle yerleştirilir ve önceden belirlenmiş aralıklarla akım polaritesinin değiştirildiği bir cihazda elektroforez işlemine tabi tutulur. Darbeli alan, 10 ila 800 kb arasında değişen çok büyük moleküler uzunlukta DNA fragmanlarının net bir şekilde ayrılmasını sağlar. Elektroforetik modeller, jellerin etüdüyüm bromür (EtBr) gibi bir floresan boya ile boyandıktan sonra görüntülenir. Veri analizi, Applied Math, Bio-Rad, BioSystematics, Media Cybernetics veya Scanalytics'den temin edilebilen bir dizi ticari yazılım paketinin herhangi birini kullanarak yapılabilir (Olive ve Bean, 1999).

PFGE ayrımları, çeşitli moleküler ve çevresel değişkenlere duyarlıdır. Temel değişkenler DNA'nın moleküler özellikleri DNA konsantrasyonu, enzim miktarı, inkübasyon süresi, hücre konsantrasyonu, yıkama, kesici enzimin özelliği enzim veya tamponun kalitesi, voltaj ve pulse zamanı, sıcaklık gibi birçok faktör PFGE görüntüsünü etkilemektedir (Basım ve Basım, 2000).

Bu yöntem birçok alanda kullanımını mevcuttur. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibidir.

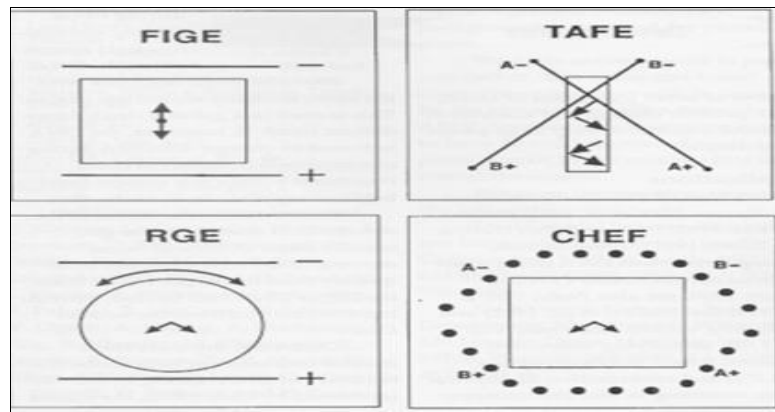
- PFGE tekniği, aynı türdeki farklı suşlar arasındaki ilişkinin derecesini belirlemede oldukça yararlı bir metottur.
- Büyük DNA moleküllerinin çözümü için PFGE tekniklerinin ortaya çıkması bakteriyel genomlar için yeni bir analiz yaklaşımı sağlamaktadır. Farklı enzimleri kullanarak elde edilen DNA parçalarının PFGE'si, bakteriyel genomun az sayıdaki büyük parçaya hızlı bir şekilde çözülmesi için güçlü bir tekniktir.
- PFGE, genom boyutu tahmininde ve kromozomal haritaların oluşturulmasında etkili bir yöntem olduğu ve ayrıca bakteri türlerinin karakterizasyonu için yararlı olduğu kanıtlanmıştır. PFGE teknolojisi, genom boyutunun doğru bir şekilde tahmin edilmesi ve çeşitli prokaryotik organizmaların fiziksel haritalarının oluşturulması için paha biçilemez bir metottur.
- PFGE genom karakterizasyonu için güçlü bir araçtır ve 180'den fazla bakteri kromozomunun fiziksel haritasının oluşturulmasında güçlü bir metottur.
- PFGE, radyasyona bağlı DNA hasarı ve onarımı tespitinde kullanılır.
- PFGE, restriksiyon haritalama, bireysel restriksiyon fragmentlerinin tespiti, gen ekleme ve fonksiyonel gen haritalama gibi konularda kullanışlıdır (Basım ve Basım, 2000).

Bu tekniğin önemli bir avantajı, genom boyutunun ölçülebilme kolaylığı, daha önce başka tekniklerle ölçüldüğünde hataya neden olan bir parametredir. PFGE ve restriksiyon endonükleaz kesimin kullanımının önemli bir sonucu, fiziksel bir haritanın oluşturulmasıdır. PFGE'nin genel uygulamaları, tüm kromozomların ayrılması, kromozom bölgelerinin geniş ölçekli kısıtlama haritalaması ve klonlamada bir yardımcı olarak DNA parçasının saflaştırılmasında kullanılabilir. PFGE, klonlama için çok büyük fragmanların hassas seçimini kolaylaştıracaktır ve büyük bir kromozomal bölgenin hızlı analizini sağlar. PFGE, özellikle bakterilerin, memelilerin, parazit protozoonlarının ve fungusların bozulmamış kromozomal DNA'larının parçalanmış genomları dahil olmak üzere çeşitli

kaynaklardan gelen geniş DNA moleküllerinin analizinde son derece güçlü olduğunu kanıtlanmıştır (Basım ve Basım, 2000).

PFGE, hem büyük hem de küçük DNA moleküllerinin boyut çözünürlüğünü arttırmak için OFAGE (ortogonal alan alternasyonlu jel elektroforezi), FIGE (alan ters çevirme jel elektroforezi), TAFE (çapraz alternatif alan elektroforezi), RGE (Rotasyonlu jel elektroforezi) ve CHEF (kontur-kenetlenmiş homojen elektrik alan jel elektroforezi) gibi çeşitli araçlar kullanılmıştır (Basım ve Basım, 2000).

Carle vd. 1986'de, iki alanın 180° aralıklarla ayrıldığı daha basit bir sistem olan Alan ters çevirme jel elektroforezi (FIGE) geliştirdiler. FIGE, tek boyutlu bir elektrik alanının periyodik olarak tersine çevrilmesine dayanan özel darbeleri alan jel elektroforezi tekniğidir (Heller, 1994). Çapraz alternatif alan elektroforezi (TAFE) formu, daha büyük darbeleri alan tekniklerinin dezavantajları olmaksızın, büyük DNA fragmanlarının basit, kullanışlı bir biçimde ayrılmasını sağlar. TAFE'de jel dikey olarak yönlendirilir ve basit bir dört elektrot dizisi jel düzleminde değil ön ve arka tarafına yerleştirilir. TAFE, 1,600 kilobaz parçasına kadar parçaların ayrılması için kullanılır (Basım ve Basım, 2000). Rotasyonlu jel elektroforezi (RGE), Southern 1987'de, İngiltere'de elektrotlar kapalıyken jelini iki ayar açısı arasında döndüren yeni bir PFGE sistemi tarif etmektedir. RGE'de elektrik alanı tekdüzedir ve bantlar düzdür, çünkü sadece bir takım elektrot kullanılır. RGE, zaman ve voltaj artışını gerçekleştirmeyi kolaylaştırır. RGE, tek bir homojen alan kullanır ve elektrik alanının yönünü, jel ile kesintili ve periyodik olarak jel döndürerek değiştirir. CHEF, büyük kromozomal DNA'yı ayırmada en etkili yöntemlerden biridir (Doi vd., 1992). CHEF, altıgen kontur etrafında eşit aralıklarla yirmi dört nokta elektrotu vardır. CHEF ile 7.000 kb'ye kadar moleküller ayrılabilir (Şekil 3).



Şekil 3. PFGE'nin yaygın olarak kullanılan türleri (URL-2).

Tenover vd. (1995), PFGE tarafından üretilen DNA parçacık modellerini yorumlamak ve bunları epidemiyolojik olarak yararlı bilgilere dönüştürmek için mikrobiyologların PFGE kalıplarını nasıl karşılaştıracağını ve rasgele genetik olayların kalıpları nasıl değiştirebileceğini bilinmesi gerekmektedir. PFGE kalıplarının yorumlanması için kriterler geliştirilmiştir (Tablo 2). Aynı türe ait suşlardaki PFGE profillerindeki farklılıklar, kullanılan kesim enzimlerinin tanımlama bölgelerindeki nokta mutasyonlarına bağlı olabileceği, kromozom üzerinde delesyon, insersion veya inversiyon gibi yeniden düzenlenmeler de bu farklılıkların nedeni olabilmektedir. Bu yeniden düzenlemeler, IS elementler, entegre plazmidler ve profajlar tarafından desteklenebilmektedir (Aleksandra vd., 2005).

Tablo 2. PFGE kalıplarını yorumlama kriterleri (Tenover vd., 1995).

Kategori	Salgın Suş ile Arasındaki Genetik Fark Sayısı	Salgın Suş ile Fark Gösteren Bant Sayısı	Epidemiyolojik Yorum
Aynı	0	0	İzolat, salgının bir parçasıdır.
Yakın İlişkili	1	1-3/2-3	İzolat salgınla yakın ilişkilidir.
Olası İlişkili	2	4-6	İzolat salgınla olası ilişkilidir.
Fark	≥ 3	≥ 7	İzolat salgınla ilişkili değildir.

Tenover vd. (1995), genetik olayların PFGE profilleri üzerindeki etkilerini aşağıdaki şekilde açıklamışlardır.

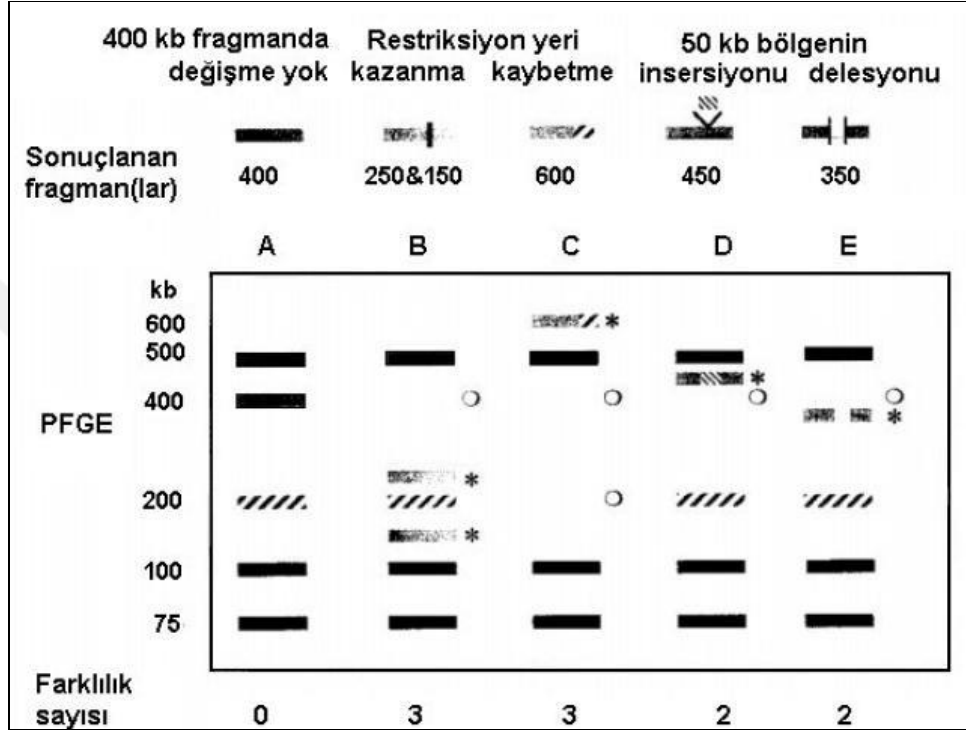
Restriksiyon bölgesi oluşturulmasına neden olan nokta mutasyonu: Yeni profilde, salgın profildeki mevcut bir bant olmayacak yerini salgın profildeki bulunmayan iki yeni daha küçük fragmana bırakacaktır. İki küçük parçanın boyutlarının toplamı, daha büyük parçanın boyutu kadar olmalıdır. Bu değişim, üç bant profilinin farklı olmasına neden olmaktadır (Şekil 4 B)

Restriksiyon bölgesi kaybına neden olan nokta mutasyonu: Yeni profilde, salgın profilde bulunmayan iki küçük parçanın birleşmesiyle daha büyük fragmana sahip yeni bir bant oluşacaktır. Bu değişim, üç bant profilinin farklı olmasına neden olmaktadır (Şekil 4 C).

Varolan bir restriksiyon bölgesine DNA eklenmesi: Yeni profilde, salgın profiliyle aynı sayıda banda sahip olacak, ancak küçük bir banda sahip olmayacak ve daha büyük

boyutta yeni bir bant olacaktır. Bu değişim, genellikle iki farklı bant bir bant olmaktadır (Şekil 4 D).

Bir parçadan DNA'nın delesyonu: Yeni profilde salgın suşla aynı sayıda bant gözükürken bir bant daha küçük görülmektedir (Şekil 4 E).



Şekil 4. Genetik olayların PFGE bant profillerine yansımaları: A) kontrol, B) salgın suş profili, C) yeni bir restriksiyon bölgesinin oluşması, D) bir restriksiyon bölgesinin kaybolması, E) DNA parçasının insersiyonu. DNA parçasının delesyonunu "O" kaybedilen bantı, "*" kazanılan bantı ifade etmektedir (Tenover vd., 1995).

1.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu belirli bir gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan bir tekniktir (Altınok ve Kurt, 2003). Çoğaltılan bölgeler genellikle 150-3,000 baz çifti (bp) uzunluğundadır (McPhearson vd., 1991). PZR üç basamaktan oluşmaktadır. İlk döngüde DNA 95°C'ye kadar ısıtılarak çift zincirin denatüre olması sağlanır; daha sonra sıcaklık 55-65°C'ye düşürülerek primerlerin komplementer oldukları hedef DNA dizisine kaynaşması sağlanır; *Taq* polimeraz kalıp zinciri kullanarak her primeri 5'→3'yönüne uzatır ve böylece her iki yönde kalıp dizinin sonuna kadar iki zincir sentezlenmiş olur. Bu

basamaklar 28-35 kez tekrarlanır ve her döngüde primerler arasında bölge defalarca çoğaltılır (Allison, 2014).

1.5.3. Restriksiyon Enzimleri

Restriksiyon enzimleri (veya restriksiyon endonükleazları) restriksiyon bölgesi olarak adlandırılan, çift zincirli DNA molekülü üzerindeki oldukça kısa ve özgül olan bazı dizileri tanırlar ve enzimin tipine bağlı olarak DNA'yı bu tanıma bölgelerinden veya başka yerlerden kırarlar. Restriksiyon endonükleazlar üç büyük sınıfta toplanmaktadır. Tip II Restriksiyon enzimleri DNA'yı çok spesifik bir şekilde parçalamaktadır. Genellikle DNA analizi ve genetik mühendisliği için kullanılan Tip II kısıtlama enzimleri, bir DNA molekülünü kestiği benzersiz bir nükleotid dizisine sahiptir. Restriksiyon endonükleazların isimlendirilmesi, harf ve rakamlardan oluşan bir sistemle keşfedildikleri organizmaların adına uygun olarak yapılmaktadır. Örneğin *EcoRI*, *Escherichia coli* (R suşu)'dan elde edilmiştir. Bu isimlendirmede *Eco*, organizmanın cins isminin ilk harfi ile tür isminin ilk iki harfinden; R ise suş tipinden gelmektedir, I ise bu enzimin bu organizmada keşfedilen 1. enzim olduğunun göstermektedir. Bugüne kadar 3.000'in üzerinde Tip II restriksiyon endonükleaz izole edilerek karakterize edilmiştir. Moleküler biyologların kullanımı amacıyla, 250'den fazla Tip II restriksiyon endonükleaz ise ticari olarak bulunmaktadır (Allison, 2014; Altınok ve Kurt, 2003).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Plaj suyu numunelerinden izole edilen *Escherichia coli* izolatları PFGE ile analiz edildiğinde çevresel replikasyonu işaret eden, 9 örnekleminin 4'ünde çok sayıda izolat için aynı PFGE profilleri bulundu. 16S rRNA gen dizilimi, API 20E biyokimyasal testi ve β -glukuronidaz aktivitesine göre su örneklerinden alınan klon dışı izolatların %82'si *E. coli*, %16'sı da dışkı koliformları olarak tanımlandı. Bu klonal olmayan izolatlar, doğrudan arıtılmamış kanalizasyon ve martı pisliklerinden elde edilen izolatlara benzer şekilde çeşitli PFGE profilleri oluşturduğu belirlendi (McLellan vd., 2001).

Teksas-Meksika sınırındaki Rio Grande Nehri ile ilişkili sulama kanalları ve çökeltilerdeki belirli bölgelerden 4 aylık örnekleme sonucu *E. coli* elde edildi. Elli *E. coli* izolatı PFGE kullanılarak genotiplendirildi. On bir farklı lokasyonda toplanan örnekler arasında farklı *E. coli* genotipleri tespit edildi. Ardışık aylarda elde edilen bazı izolatlarda benzer genotipik profillerin oluştuğu belirlendi (Lua vd., 2004).

Teksas'ta bulunan Waco Gölü ve Belton Gölü'nden on bir numune alma istasyonundan dokuz aylık örneklemede toplam 650 su numunesi toplandı. Toplanan su numunelerinden elde edilen ve stoklanan 631 *E. coli* izolatının 412'si *E. coli* için pozitif olmuştur. Sudan izole edilen *E. coli*'lerin PFGE genotip çeşitliliğine dayanarak, *E. coli*'nin incelenen su gövdelerinde dominant popülasyonları temsil ettiğine dair çok az kanıt bulunmuştur (Casareza vd., 2007).

12 aylık bir çalışmanın ardından güney California, ABD'nin orta Santa Ana Nehri (MSAR) havzasındaki boyunca dere ve kanallardan yüzey suları ve sedimentten elde edilen 600 *E. coli* izolatın prevalans, genetik çeşitlilik ve antimikrobiyal dirençliliği belirlendi. Dere ve kanallar boyunca, *E. coli*'nin yüzey suları ile karşılaştırıldığında sedimentte daha yaygın olarak bulunduğu tespit edildi. Kentsel çıkış kaynaklı *E. coli* ile tarımsal kaynaklı *E. coli* arasında herhangi bir ilişki bulunamazken, PFGE ile saptanan *E. coli* genotipleri, kentsel akış kaynaklarına göre tarımsal kaynaklarda daha az çeşitlilik gösterdiği belirlendi. PFGE ayrıca, yüzey sularındaki *E. coli* popülasyonlarının genetik çeşitliliğinin sedimentte olduğundan daha fazla olduğunu gösterdi. Bu, sediment içindeki izolatların klonal popülasyonlarla egemen olabileceğini düşündürmektedir (Ibekwe vd., 2011).

Kıyma, sucuk, hindi ve kuyu suyu numunelerinden alınan *E. coli* izolatlarının genetik çeşitliliği, *XbaI* ile kesilmiş kromozomal DNA, PFGE ile incelendi. *E. coli* izolatları, polimeraz zincir reaksiyonu-kısıtlama fragmanı uzunluk polimorfizmi (PZR-RFLP) ile elde edilen ve çeşitli *fliC* geni ve toksik virülans belirteçleri eksprese ederek farklı serotiplere sınıflandırıldı. Kesim profilleri, farklı serotiplerin izolatları arasında yüksek derecede polimorfizm ve aynı serolojik gruba ait suşlar arasında yakın ilişki gösterdi. Buna ek olarak, aynı virülans belirleyicilerine sahip bazı bakteri türleri farklı PFGE tipleri sergiledi. Elde edilen sonuçlar, PFGE analizinin potansiyel olarak patojen *E. coli* suşları arasındaki klonal doğayı ve genetik farklılıkları ortaya koyan güçlü bir araç olduğunu göstermektedir (Badri vd., 2009).

İdrar yolu enfeksiyonlu çocukların idrar örneklerinden toplamda 90 *E. coli* suşu izole edildi ve disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılığı test edildi. Bu suşların moleküler epidemiyolojisini incelemek amacıyla genomik kalıpları için PFGE kullanıldı. PFGE'de *E. coli* soylarından genetik olarak altmış beş profil görüldü. Çizilen dendrograma dayanarak örnek modeller iki gruba ayrıldı. Birinci grupta otuz yedi profile sahip altmış örnek bulunurken, bu grupta elli örneğin en az benzerliğe sahip olduğu belirlendi. İkinci grupta yirmi sekiz profile sahip otuz izolat içermektedir ve iki örnek dışındaki bütün izolatlar farklılık göstermektedir. PFGE yönteminin yüksek ayırım gücü, antibiyotik ile karşılaştırıldığında ve elde edilen profillere göre ve bu profillerin yüksek çeşitliliğine göre, araştırılan popülasyonda hiçbir epidemik UPEC saptanmadı (Farshad vd., 2011)

Hastalardan (6 örnek), gıdalardan (kıymadan 18 izolat ve çiğ süttten altı izolat) ve dana dışkılarından (31 izolat) izole edilen *E. coli* (0157:H7)'nin genomik DNA PFGE ve plazmid DNA analizi karakterize edildi. Kromozomal DNA'nın *XbaI* ile kesiminden sonra, 14 ila 19 arasında ayırt edilebilir banttın (30 ile 1000 kb arasında değişen) oluşmuştur. Bazı bantların incelenen bütün *E. coli* (0157:H7) izolatlarıyla ortak olduğu bulundu. Endonükleaz *XbaI* ile kesimi yapıldıktan sonra 61 izolattan PFGE tarafından 21 farklı genomik profil oluşturuldu. Kıyma izolatları arasında beş farklı profil tespit edildi, bunlardan bir tanesi 1993 yılında ABD'nin Kuzeybatı Pasifik'te bir salgından izole edilen 13 kıyma izolatıyla ilişkilendirildi. Washington ve Wisconsin'den beş buzağı izolatının PFGE profili, bu salgınla aynı olduğu düşünülen salgının kıyma profilleriyle aynı olduğu belirlendi (Meng vd., 1995).

Şubat 2004'ten Mart 2005'e kadar, 140 gıda işleyicilerinin elleri ve burun delikleri (92), çiğ süt (24) ve minas freskal peyniri (24) *E. coli* varlığı açısından analiz edildi. Kırk

yedi *E. coli* suşu elde edildi ve peynir kontaminasyonlarının olası kaynaklarını araştırmak için *XbaI* kesimini takiben PFGE'den elde edilen DNA macrorestriksiyon kalıpları ile karşılaştırıldı. PFGE genotiplendirmesine dayanarak, bir işleyici elinden alınan gıdalardan ve çiğ süttten izole edilen beş soydan izole edilen bir suş, peynirden altı suşla özdeş veya yakından ilişkiliydi, bu durumlarda, peynirlerde *E. coli* kontaminasyonunun olası kaynağı olduğunu düşündürmektedir. Burun deliklerinden izole edilen hiçbir suş, peynirlerde veya süt suşlarında bulunan suşlarla ilişkili değildi. Sonuçlar, suşlar arasında yüksek çeşitlilik gösterdi (Compos vd., 2009).

2.1. Materyal

2.1.1. Örnek Temini

Bu çalışmada, 2010.117.001.3 nolu proje kapsamında 2013 yılında Su Ürünleri Yük. Müh. Ertuğrul TERZİ'nin doktora çalışması için Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Rize ve Trabzon illerinde tatlı suda yetiştiriciliği yapılan 7 farklı gökkuşuğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) işletmesinden Mayıs 2010-Nisan 2011 tarihleri arasında işletmelerin giriş ve çıkışındaki su ve sedimentten iki ayda bir yapılan örneklemelemlerden izole edilen 75 *E. coli* izolatu kullanılmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. Çalışmada Kullanılan Solusyonlar

Çalışmada kullanılan kimyasal solüsyonlar aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Lizis Tampon (50 mM Tris: 50 mM EDTA, %1 Sarkosil): 500 ml için pH'sı 8 olarak ayarlanan 50 ml 1 M Tris, 100 ml 0.5 M EDTA ve 100 ml %10 Sarkosil behere koyularak ultrapure su ile 500 ml'ye tamamlandı.

EDTA: 0.5 M 1 L için 36,53 gr tartılıp saf su ile tamamlanarak pH 8 olarak ayarlandı.

TRIS: 1 M 250 ml için 30,25 gr tartılıp saf su ile tamamlanarak pH 8 olarak ayarlandı.

Hücre Süspansiyon Tampon (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0): 500 ml için pH 8 olarak ayarlanan 50 ml Tris ve 100 ml EDTA behere koyularak ultrapure su ile tamamlandı

%10'lük Sarkosil (N-Lauroylsarcosine, Sodium salt)

TE Tampon (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8.0): pH 8 olarak ayarlanan 10 ml 1 M Tris ve 1 ml 0.5 M EDTA beher içerisine koyularak 500 ml'ye ultrapure su ile tamamlandı.

10X TBE Hazırlama: 250 ml için; beher içine 27 gr Trizma, 13,75 gr Borik Asit tartıldı ve 10 ml 0.5 M EDTA (pH 9) eklenip 250 ml ye saf su ile tamamlanıp +4°C'ye koyuldu.

2.2.2. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Escherichia coli suşlar arasındaki antibiyotik direnç farklılıklarını tespit etmek amacıyla kaynatma yöntemiyle DNA izalasyonu yapıldı. Bu amaçla izolatlar -80°C'de stok kültür ortamından çıkartılıp oda sıcaklığında bekletildikten sonra steril öze yardımıyla TSA agara ekilerek 37°C'de 12 saat inkübasyona bırakıldı. Saf olarak üreyen koloniler öze yardımıyla 0.5'lik mikrosantrifüj tüplerine 200 µl ultrapure su içerisine koyuldu, örnekler voltekslendi (BioCote Stuart). Daha sonra 100°C'de 10 dk kaynatıldı. Bu işlem bittikten sonra örnekler 1500 X g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra -20°C'de saklandı.

E. coli izolatlarının *florR*, *ereA* ve *ereB* direnç genlerinin varlığı PZR ile belirlendi. PZR işleminde kaynatma yöntemiyle elde edilen DNA'lar kullanıldı. PZR karışımı için buz içerisinde 25 µl için 5 µl tampon, 3 µl magnezyum klorür (MgCl), 1 µl dNTP, 2 µl Primer (Tablo 3), 2 µl DNA, 11,8 µl ultrapure su, 0,2 µl *Taq* polimeraz hazırlanarak Tablo 4'de verilen protokölüne göre PZR basamakları uygulandı. PZR işleminden sonra örnekler 0.5X TAE (Tris-Acetate EDTA) tampon sisteminde %1'lik agaroz jel üzerinde 110 W şiddetinde 1 saat yürütüldü. Sonrasında jel görüntüleme analiz cihazında (Kodak Gel Logic 200 Imaging System) görüntüleme işlemi yapıldı.

Tablo 3. PZR reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Fragment uzunluğu (bp)	Referens	Annealing sıcaklığı (C°)
ereA-f ereA-r	AACACCCTGAACCCAAGGGACG CTTCACATCCGGATTCGCTCGA	420	Ounissi ve Courvalin (1985)	58
ereB-f ereB-r	AGAAATGGAGGTTTCATACTTACC A CATATAATCATCACCAATGGCA	546	Arthur vd. (1986)	52
Flor-f Flor-r	TATCTCCCTGTCGTTCCAG AGAACTCGCCGATCAATG	399	Van vd. (2008)	50

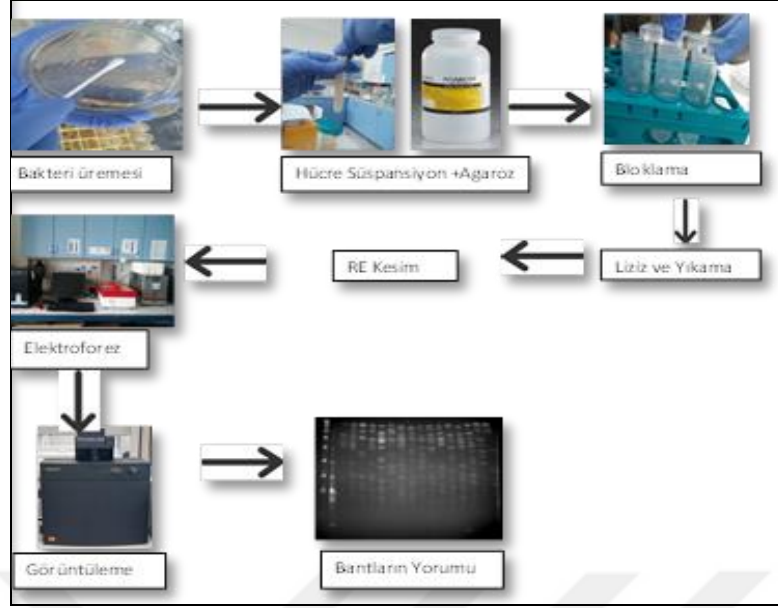
Tablo 4. Antibiyotik direnç genleri belirlenirken kullanılan PZR protokol

PCR Basamakları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Birinci Denaturasyon	94	45sn	1
Denaturasyon	94	25sn	30
Tutunma (Annealing)	*	50sn	
Uzama (extension)	72	50sn	
Son Uzama	72	5 dk	1

**florR* (53°C), *ereA* (57°C), *ereB* (53°C)

2.2.3. Pulsed-Field Gel Electroforez (PFGE) Aşamaları

Aşağıdaki Şekil 5'te PFGE'in aşamaları sıralanmıştır. Bakterilerin saf koloniler şeklinde çoğaltılması, süspansiyonu, bloklanması, yıkama, liziz, RE kesim, elektroforez, görüntüleme ve analiz kısımlarından oluşmaktadır.



Şekil 5. PFGE'nin pratik aşamaları

2.2.3.1. Plug Hazırlama

Pluglar hazırlanmadan bir gün önce -80°C 'de stoklanmış olan bakteriler Tryptic Soy Agar (TSA)'ya ekilerek 37°C 'de 12 saat inkübasyona bırakıldı. TSA'da çoğalan bakterilerin koloni, renk ve şekillerine incelenerek saflıkları belirlendi. Saf olarak üreyen koloniler öze yardımıyla alınarak 300 ml hücre süspansiyon tamponu (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8.0) içerisinde homojenize edildi. Bakterilerin yoğunlukları spektrofotometrede (Shimadzu, Uv-2550 UV-Visible Spectrophotometer) 610 nm dalga boyunda 0.8-1.0 olarak ayarlandı. 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü içine yoğunlukları ayarlanan bakteri süspansiyonundan 400 μl koyulup içerisine 20 μl Proteinaz K (20 mg/ml stok) eklendi. Ayrıca önceden hazırlanan ve 55°C 'de stabil halde tutulan %1.2'lik düşük erime ısılı agarozdan 400 μl mikrosantrifüj tüpüne eklendi ve bakteri solüsyonu pipet yardımıyla eşit miktarda karıştırıldıktan sonra agaroz kalıplarına dökülerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ortalama 5 dk bekletilerek soğutuldu. Daha sonra her bir falkon tüp içerisine yaklaşık 10 ml proteolizis [10 ml lizis tampon, 25 μl Proteaz K (20 mg/ml stok) her bir tüp için] koyularak hazırlanan kalıp jeller aktarıldı. Proteolizis içerisindeki jeller 55°C , 110 rpm'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. DNA bloklarını enzim ve deterjan atıklarından arındırmak amacıyla 55°C , 110 rpm'de her 15 dakikada bir 2 kez ultrapure su ve 2 kez TE ile yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra örnekler TE tampon içerisinde kullanılana kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

2.2.3.2. Enzimle Kesim

DNA blokları PFGE kuyucuklarının boyutuna göre kesildikten sonra içerisinde ultrapure su olan 1.5 ml mikrosantrifüj tüplere aktarıldı ve +4°C'de 1 saat bekletildi. Sonrasında tüp içindeki su boşaltılarak tekrar içerisine ultrapure su koyularak +4°C'de bir saat bekletildikten sonra tüp içerisindeki su boşaltılıp kesim işlemi için Tablo 5'e göre hazırlanan 50 U *XbaI* veya *ApaI* (enzim çözeltisinden 200 µl koyularak) 37°C, 80 rpm'de bir gece bırakıldı.

Tablo 5. *XbaI* veya *ApaI* enzimleri için prosedür

Enzim	5 µl
Tampon	20 µl
BSA*	2 µl
dH ₂ O	173µl

* Her iki enzim için farklı BSA kullanıldı. *XbaI* için D, *ApaI* için A

2.2.3.3. Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE) İşlemi

Önceden hazırlanan ve +4°C'de bekletilen Tris Borate EDTA (TBE) çözeltisinden 120 ml alınıp tüpe aktarıldı ve üzerine 2280 ml saf su eklenerek hem jel hem de elektroforez için TBE buferi hazırlandı.

PFGE (Biometra) (%0,9) için 2,7 gr Pulsed Field Certified Agarozdan tartılıp içine 300 ml TBE tampon konularak eritildi. Jel donduktan sonra enzimle kesilen örneklerin yüklemesi yapılarak PFGE cihazına yerleştirildi. Yaklaşık 30 dk beklettikten sonra 19 saat, 13°C'de, 180 Volta, 120° açıda ve 5 saniye aralıklarla 0.5X TBE tampon içerisinde koşturuldu. Hemen arkasından bantları daha iyi görüntülenebilmesi için 21 saat, 10°C'de, 130 Volta, 120° açıda sürekli olarak tekrar koşturuldu.

2.2.3.4. Görüntüleme

Elektroforez işlemi bittikten sonra jel 60 µl/ml Etüdyüm bromür (10 mg/ml) içerisinde 30 dk 100 rpm'de boyandıktan sonra suyu boşaltıldı ve içine saf su eklenerek 10

dk daha yıkandı. Sonrasında jel görüntüleme cihazında (Kodak Gel Logic 200 Imaging System) görüntülendi

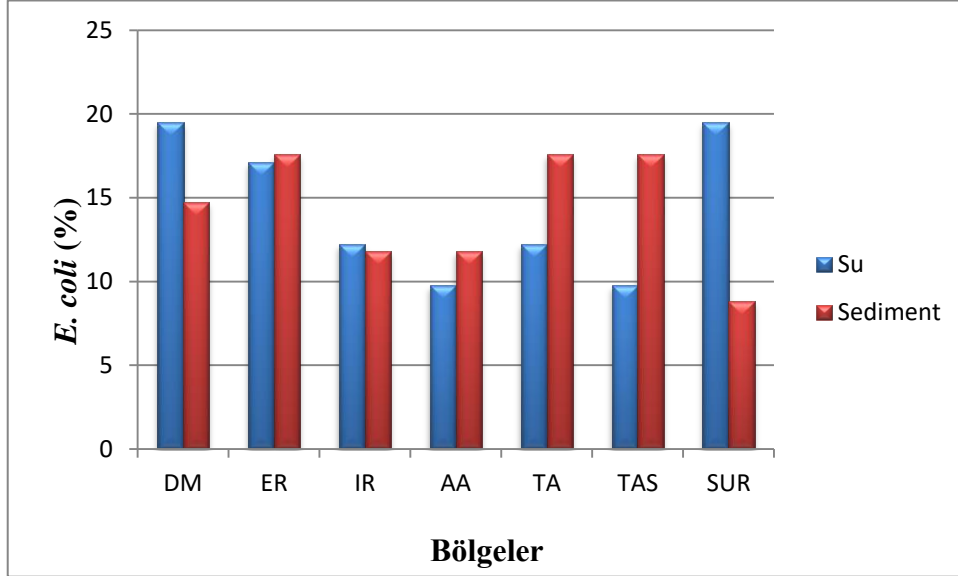
2.2.3.5. Analiz

Bant profilleri Bionumerics Gel Compar II (Uygulamalı Matematik, Sint-Martens-Latem, Belçika) ile analiz edildi. Farklı izolatların bant desenleri arasındaki benzerlikler, %2.5 tolerans ve %1 optimizasyon ile Zar benzerlik katsayısı kullanılarak hesaplandı. Dendrogram, küme analizi [aritmetik ortalama (UPGMA) ile ağırlıksız çiftler grubu yöntemi] kullanılarak oluşturuldu. Yazım yöntemlerinin ayrımcı indisleri (DI), Hunter ve Gaston (1988) tarafından geliştirilen formüle dayanılarak hesaplandı

3. BULGULAR

3.1. Antibiyotik Direnç Genlerin Sonuçları

Yedi farklı çiftlikten 2010 yılının mayıs ayında başlayıp 2011 yılının nisan ayına kadar iki ayda bir yapılan örneklemelemlerden elde edilen 75 *E. coli* izolatının su ve sedimentteki prevalansları; suda en fazla *E. coli* DM ve SUR çiftliklerinde %19,5 iken en az AA ve TAS çiftliklerinde %9,75, sedimentte en fazla *E. coli* ER, TAS ve TA çiftliklerinde %17,6 en az ise SUR çiftliğinde %8,8 olarak tespit edildi (Şekil 6).



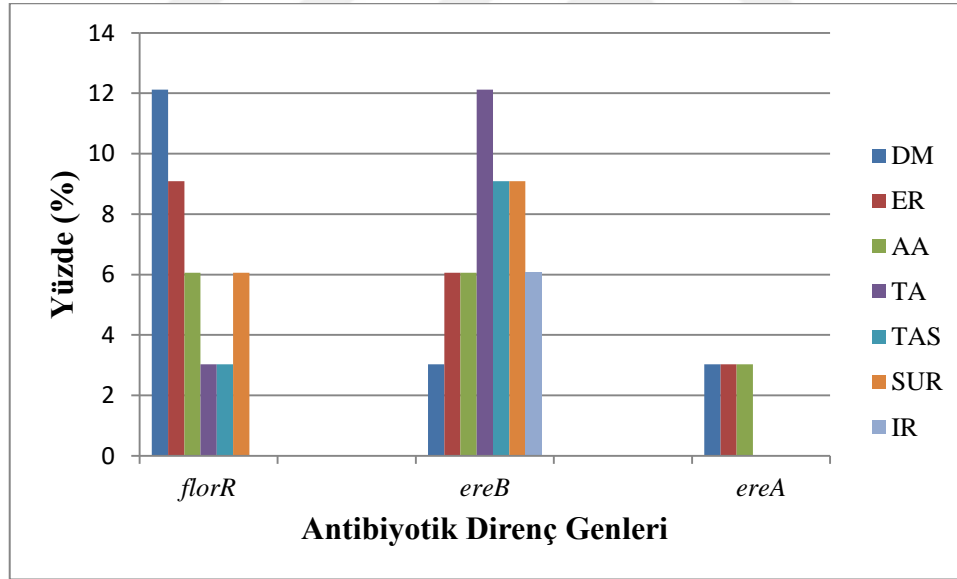
Şekil 6. Su ve sedimentten izole edilen *E. coli* prevalansı

Örnekleme sonucu elde edilen *E. coli*'lerin eritromisin (*ereA* ve *ereB* geni) ve florfenikol (*florR* geni) direnç genlerine bakıldı. Buna göre giriş-çıkış suyundan izole edilen *E. coli*'lerde oluşan direnç genleri sediment giriş-çıkışından daha fazla olduğu ve en fazla direnç geni ise *ereB* olarak tespit edildi (Tablo 6).

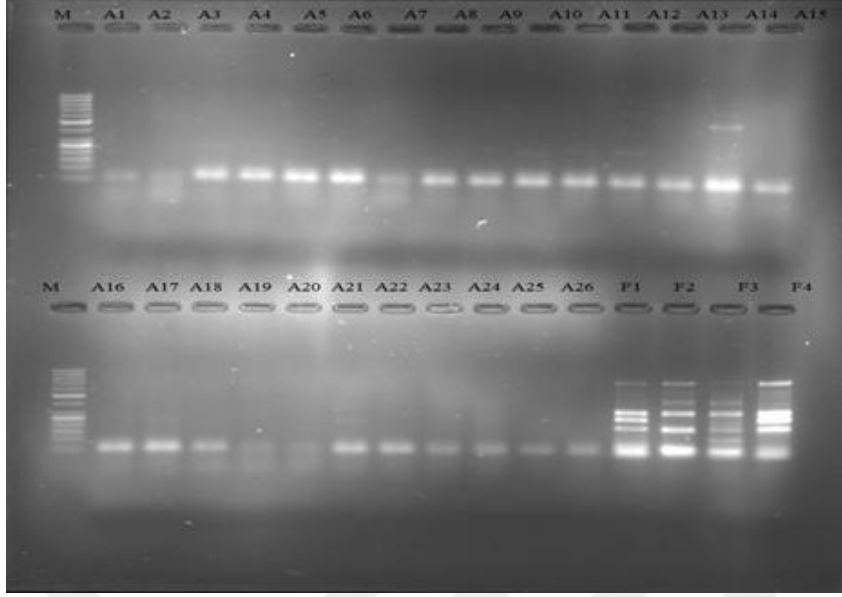
Tablo 6. Su girişi (WG), su çıkışı (WÇ), sediment giriş (SG), sediment çıkış (SÇ) noktasında izole edilen *E. coli*'lerin antibiyotik direnç genleri

Örnek Noktası	Antibiyotik Direnç Genleri			
	İzolat Sayısı	<i>FlorR</i>	<i>EreA</i>	<i>EreB</i>
WG/WÇ	20/21	3/5	-/2	5/4
SG/SÇ	16/18	4/1	-/1	1/7

Çalışmada toplam 75 *E. coli* izolatından 33 (%44) *E. coli* izolatı en az bir antibiyotik direnç geni bulundururken, 42 (%56) *E. coli* izolatında herhangi bir direnç geni bulunamamıştır. 33 *E. coli* izolatınının 13 (%39,39) izolat *florR*'a, 3 (%9,1) izolat *ereA* ve 17 (%51,51) izolatın *ereB* direnç genine sahip olduğu belirlendi. *florR* direnç geni en fazla DM işletmesinde, *ereB* direnç geni TA işletmesinde, *ereA* direnç geni ise sadece üç işletmede tespit edildi (Şekil 7). Yapılan PZR işlemi neticesinde *florR*, *ereA* ve *ereB* direnç genlerinden en fazla direnç geni *ereB* olarak tespit edildi (Şekil 8).



Şekil 7. *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç genleri

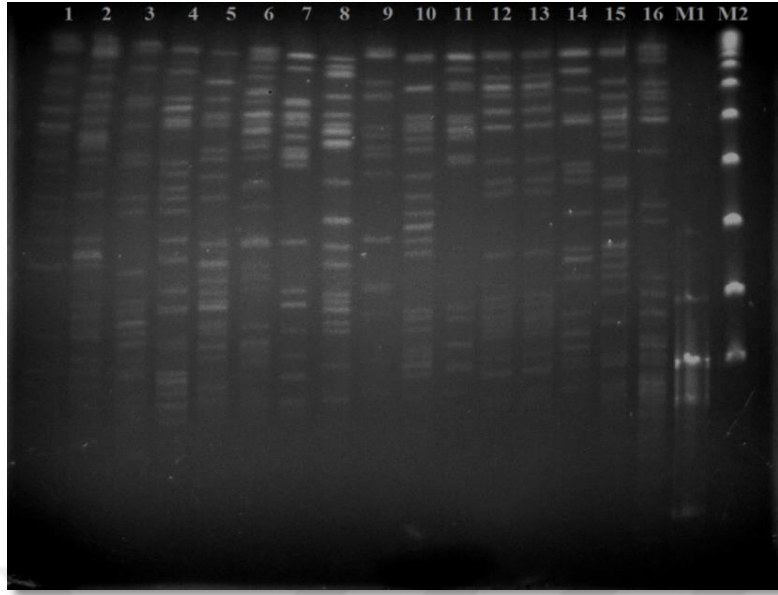


Şekil 8. PZR görüntüsü, M: Marker, A: *ereA*, F: *florR*

3.2. PFGE Sonuçları

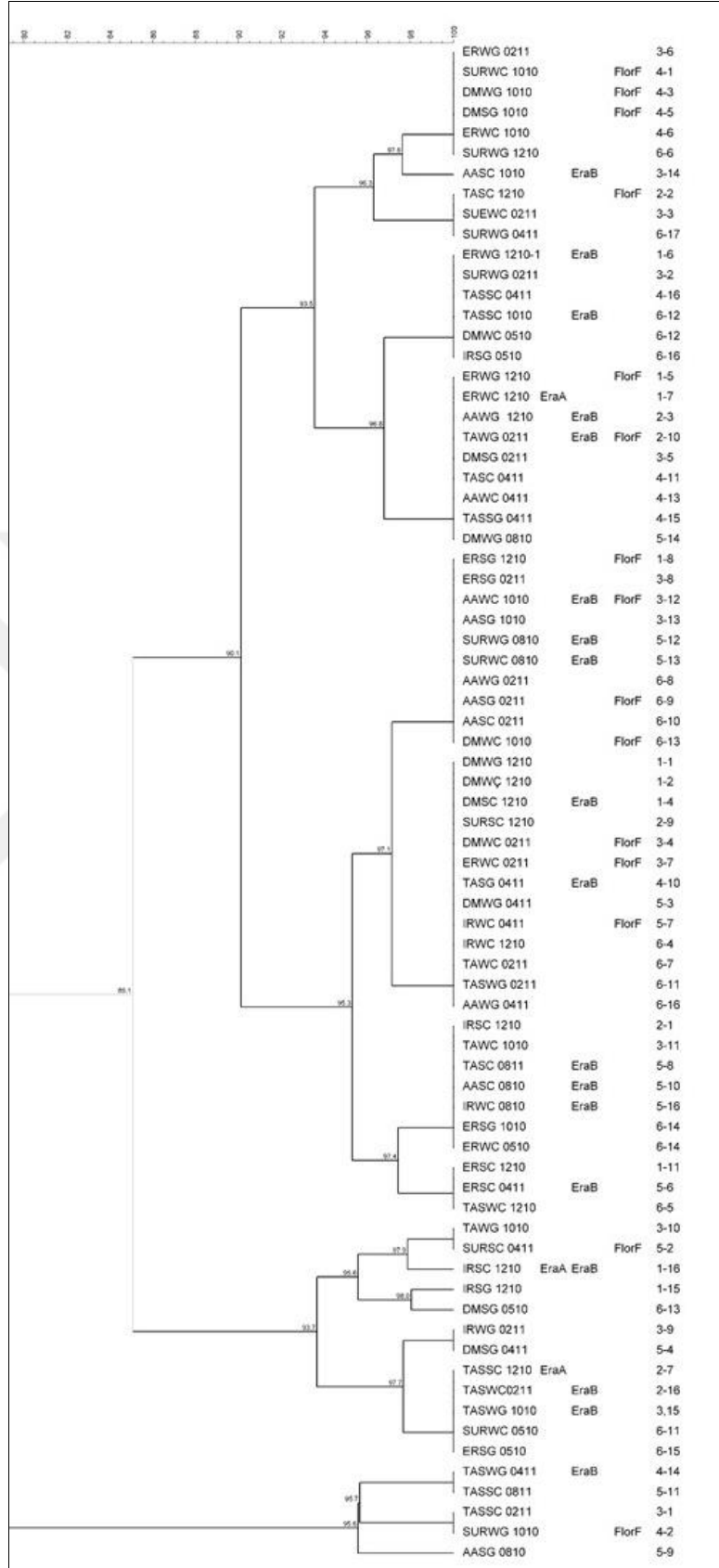
Toplamda 75 *E. coli* suşu çalışılmıştır. Bu suşlardan 13'ü DM, 13'ü ER, 7'si IR, 15'i TAS, 5'i TA, 11'i AA ve 11'i de SUR çiftliklerinden izole edilmiştir.

Yedi farklı balık çiftliğinden farklı zamanlarda su ve sedimentten izole edilen 75 farklı *E. coli* suşunun *XbaI* enzimi ile kesildikten sonra yapılan PFGE analizi sonucunda genomik DNA'larının benzerlik oranları %93 baz alındığında 4 temel kümede (X1-X4) gruplandırılmıştır ve Şekil 9'da bant profillerinin karşılaştırılması için jel üzerinde koşturulan *E. coli* suşlarının görüntüleri verilmiştir.



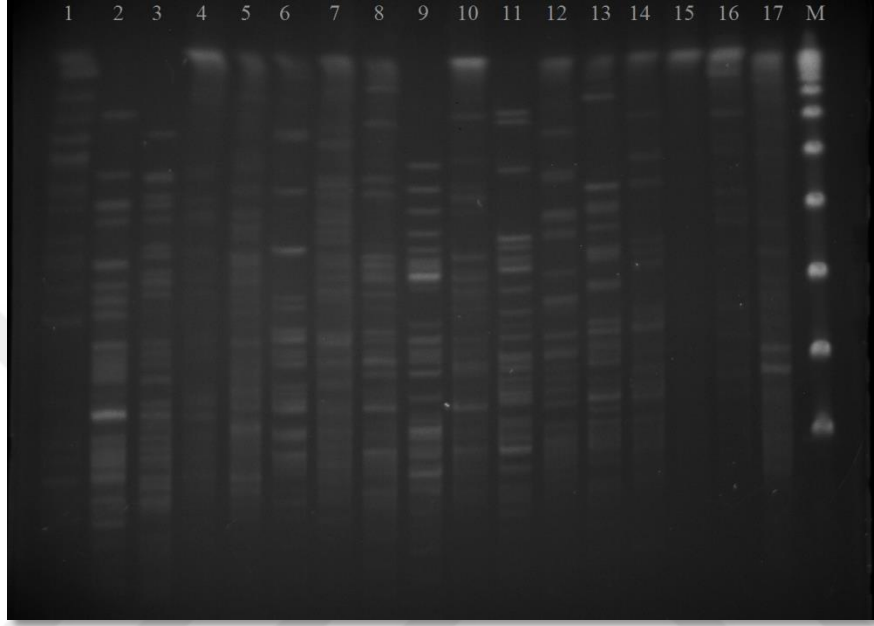
Şekil 9. *E. coli* suşlarının *Xba*I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucu oluşan bant profilleri

Bu sonuçlara göre tüm izolatlar arası benzerlik oranları %79,1 olup, TASWG 0411, TASSC 0811, TASSC 0211, SURWG 1010 ve AASG 0810 suşları diğer gruplardan ayrıldığında geri kalan suşların benzerlik oranları %85,1 olmaktadır. İlk X1 kümesinde toplamda 25 suş bulunmakta olup toplam suşların %33'ünü barındırmaktadır. Bu kümede DM çiftliğinden 5, ER çiftliğinden 5, IR çiftliğinden 1, TAS çiftliğinden 5, TA çiftliğinden 1, AA çiftliğinden 3, SUR çiftliğinden de 5 suş bulunmaktadır. X2 kümesinde suşların %44 bulunmaktadır. Bu suşlardan 6'sı DM çiftliğinden, 7'si ER çiftliğinden, 3'ü IR çiftliğinden, 4'ü TAS çiftliğinden, 3'i TA çiftliğinden, 7'si AA çiftliğinden ve 3'ü de SUR çiftliğinden izole edilmiştir. Üçüncü kümede suşların %16'sı vardır ve bu suşlardan 2'si DM çiftliğinden, 1'i ER çiftliğinden, 3'ü IR çiftliğinden, 3'ü TAS çiftliğinden, 1'i TA çiftliğinden ve 2'si de SUR çiftliğinden izole edilmiştir. Bu kümede AA suşu yoktur. En sonuncu küme (X4) ise en küçük küme olup, bünyesinde suşların %7'sini barındırmaktadır. Bu suşların üçü TAS, biri SUR ve diğeri de AA çiftliğinden *E. coli*'lerden oluşmaktadır (Şekil 10).



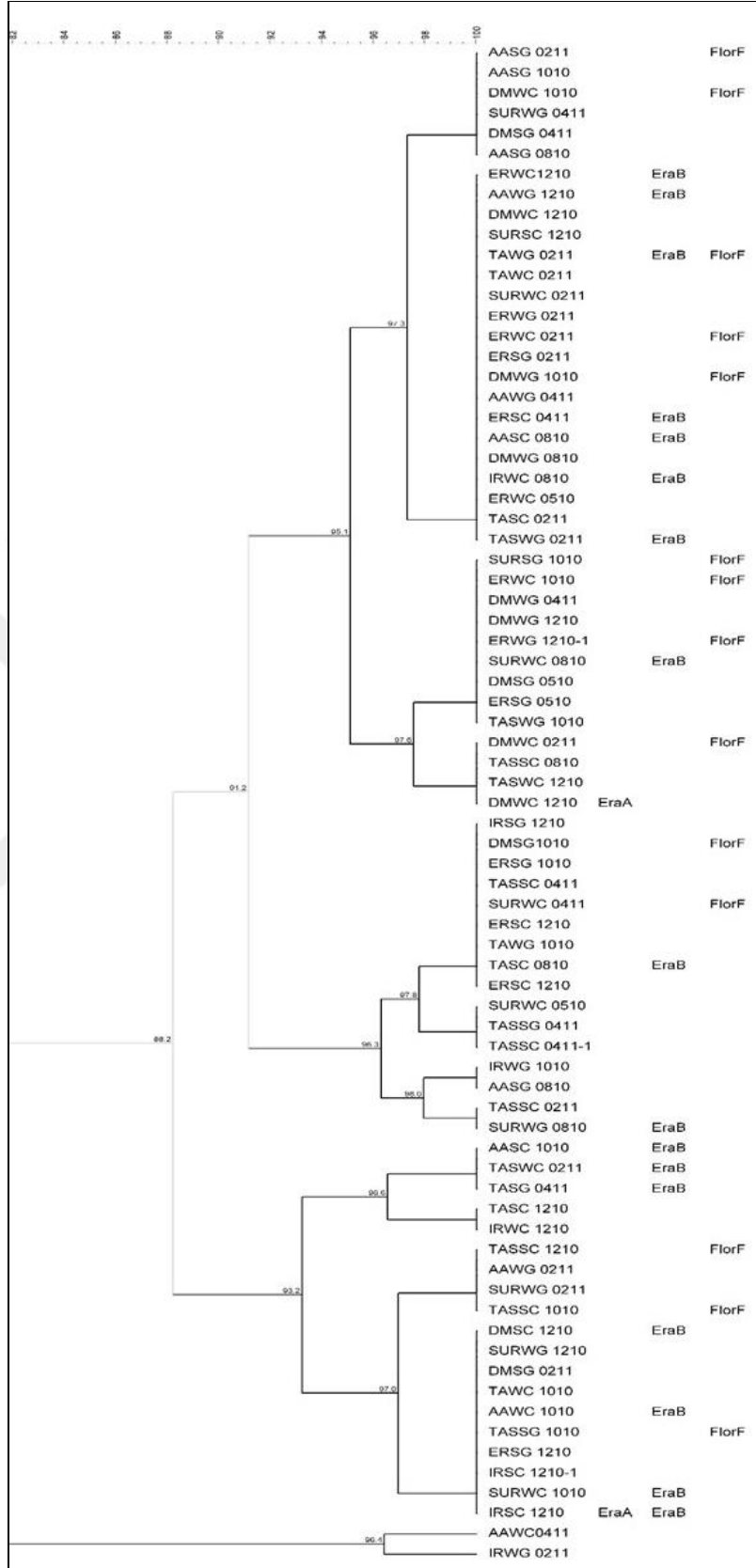
Şekil 10. *E. coli* şuşlarının *Xba*I enzimi ile kesimi sonrası elde edilen dendrogram

E. coli suşlarının kromozomal DNA'sının *ApaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucunda oluşan örnekleri PFGE ile analiz edilmiştir ve Şekil 11'de bant profillerinin karşılaştırılması için jel üzerinde koşturulan *E. coli* suşlarının görüntüleri verilmiştir.



Şekil 11. *E. coli* suşlarının *ApaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim sonucu oluşan bant profilleri

75 farklı *E. coli* suşunun *ApaI* enzimi ile kesildikten sonra yapılan PFGE analizi sonucunda genomik DNA'larının benzerlik oranları %93,4 baz alındığında 4 temel kümede (A1-A4) gruplandırılmıştır. A1 kümesinde en büyük küme olup bünyesinde toplam suşların %51'ini barındırmaktadır. Bu suşlardan 10'u DM çiftliğinden, 9'u ER çiftliğinden, 1'i IR çiftliğinden, 5'i TAS çiftliğinden, 2'si TA çiftliğinden, 6'sı AA çiftliğinden ve 5'i de SUR çiftliğinden izole edilmiştir. A2 kümesinde suşların %21'i vardır. Bu suşlar arasında 1 DM, 3 ER, 3 IR, 5 TAS, 1 TA ve 3 SUR çiftliklerinden izole edilen *E. coli* suşları bulunurken, bu kümede AA çiftliğinden suş bulunmamaktadır. A3 kümesi suşların %25'ini barındırarak ikinci en büyük kümeyi oluşturmaktadır. Bu kümede 2 DM, 1 ER, 4 IR, 5 TAS, 1 TA, 3 AA ve 3 SUR çiftliklerinden izole edilen suşlar bulunmaktadır. En son kümede (A4) ise sadece birer tane AA ve IR suşları bulunmaktadır (Şekil 12).



Şekil 12. *E. coli* suşlarının *ApaI* enzimi ile kesimi sonrası elde edilen dendrogram

4. TARTIŞMA

Farklı bölgelerdeki birçok sularda, bitkilerde veya hastanelerde *E. coli*'nin genetik çeşitliliğine bakılmasına rağmen tatlı sularda ki alabalık işletmelerinin giriş ve çıkış suları ile sedimentlerinden izole edilen *E. coli*'nin PFGE ile analizi ilk defa bu çalışmada yapılmıştır. Bu nedenle çalışma Karadeniz Bölgesinde bulunan gökkuşağı alabalığı tesislerinin giriş-çıkış su ve sedimentlerinde biriken *E. coli* şuşlarının genetik çeşitlilikleri ve tesislerde kullanılan antibiyotiklere karşı yatkınlıklarını tespit etmeye yardımcı olmaktadır. Ayrıca alınan örneklerin mevsimsel olması dönem dönem kullanılan antibiyotiklere karşı etkilerini de belirlemeyi sağlamaktadır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde, bakteriyel balık hastalıklarının tıbbi tedavisi sırasında antimikrobiyal maddeler çevresindeki suya salınmaktadır. Balık çiftliklerinde ve çevredeki su ortamlarında, su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan antimikrobiyallere karşı dirençli bakteri sıklığı görülmektedir (Çapkın vd., 2015). *E. coli* ve *Salmonella* gibi enterik bakteriler su ortamında, özellikle de subtropikal ortamlarda hayatta kalabilir ve çoğalabilmektedir (Desmarais vd., 2002; Baudart vd., 2000; Maule, 2000).

Escherichia coli'lerin hastalıklara karşı kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençlilik gösterdiği belirlenmiştir. Bu bağlamda, içme suyundan izole edilen birçok antibiyotiğe dirençli *Escherichia coli* soylarının, aminoglikozit, tetrasiklin ve trimetoprim sülfametoksazole direnç gösteren ARG'leri taşıdıkları bulunmuştur (Cernat vd., 2007). Koliform bakterilerde en yaygın direnç geni *tetA*, *sul2*, *bla_{CTX-M1}* ve *bla_{TEM}* izlenirken (Terzi, 2010), Güney California, ABD'nin orta Santa Ana Nehri (MSAR) havzası boyunca dere ve kanallardan yüzey suları ve sedimentten elde edilen 600 izolatın %24'ü (144 izolat) birden fazla antimikrobiyal ajana direnç göstermiştir. Çoklu dirençlerin çoğunun, kentsel akıştan gelen girdilerle ilişkili olduğu ve antifibrikler, rifampisin, tetrasiklin ve eritromisin içerdiği tespit edilmiştir (Ibekwe vd., 2011)

Tanzanya ve Pakistan'da bulunana balık çiftliklerindeki su, sediment ve balıklardan izole edilen bakterilerdeki antibiyotik direnç genlerini araştırılmış ve izolatlar, su ürünleri yetiştiriciliğinde ve hayvancılıkta kullanılan çeşitli antimikrobik maddelere karşı direnç genlerinin mevcudiyeti açısından incelendi. Bunun neticesinde tetrasikline ait *tetA* ve *tetG* genleri, amoksisiline ait *bla_{TEM}* geni, streptomisine ait *strA* ve *strB* genleri, kloramfenikole ait *cat1* geni ve eritromisine ait *mefA* geni belirlenmiştir (Shah vd., 2012)

Florfenikol, kloramfenikol ile ilişkili insan sağlığı riskine sahip olmayan kloramfenikolün sentetik, florinlenmiş bir analogudur. 1980'lerden beri Asya'da su ürünleri yetiştiriciliği için kullanılmaktadır (Keyes vd., 2000). Florfenikol ve kloramfenikole direnç kazandıran *flo* geni daha önce *Photobacterium piscicida* ve *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104'te tanımlanmıştır. Florfenikol bakteriyostatiktir. Son zamanlarda da *E. coli*'lerde ortaya çıkmıştır. Florfenikol mekanizması, bakteriyel ribozomun 50S alt-birimine bağlanarak bakteri protein sentezinin bozulmasına neden olur (White vd., 2000).

1997-1998 yıllarında isalli buzağularından elde edilen 48 *E. coli* üzerinde çalışma yapıldı. Hem kloramfenikol hem de florfenikol dirençli 41'i kapsayan ishalli buzağulardan alınan 48 adet *E. coli* izolatu, hem *flo* hem de *cmlA* genlerinin varlığı açısından test edildi. Florfenikol MIC'lerin ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ olduğu 44 izolattan 42'si, *flo* geni için PZR yoluyla *flo* geni pozitif olarak bulundu. Florfenikol MIC'lerin ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ olduğu tüm *E. coli* izolatları *flo* gen için negatif bulundu. On iki *E. coli* izolatu *cmlA* için pozitif ve 12'nin tamamında kloramfenikol MIC'ler ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi. Buna ek olarak sekiz izolat hem *flo* hem de *cmlA* için pozitif olarak bulunurken bu izolatlar için hem florfenikol hem de kloramfenikol MIC'ler ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi (White vd., 2000). Bu çalışmada 33 *E. coli* izolatının 13 (%39,39)'ünde *florR*'a karşı direnç geni tespit edildi.

Makrolid grubu antibiyotiklerinden olan eritromisin 1952'de *Staphylococcus aureus* bakterisinden elde edilen bir antibiyotiktir ve Avrupa'da da geniş bir yelpazede enfeksiyonlara karşı kullanılmaktadır. Özellikle *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türlerine bağlı olan enfeksiyonların tedavisinde kullanılan önemli antibiyotiklerdendir. Son yıllarda, eritromisine karşı oldukça dirençli *Escherichia coli* suşları bildirildi ve makrolid antibiyotiklerini inaktive eden enzimler de tarif edildi. Makrolidlerin ana yapısında makrosiklik lakton halkası ile buna eklenmiş şekerlerden oluşmaktadır. İçerdikleri lakton halka sayısına göre makrolidler sınıflandırıldığında eritromisin 14 üyeli bir makrolid halkasına sahiptir. Bakteriyel ribozomlarda 50S alt birimine bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe ederler, translasyon ve ribozom akümülyasyonunu önlerler. Makrolidlerden farklı olarak 30S alt birim oluşumunu da inhibe etmektedirler. Esteraz veya fosfotransferaz gibi inaktivasyon enzimleri de dirençte rol oynamaktadır (Aydın, 2007; O'hara and Yamamoto, 1996).

Escherichia coli'de inaktivasyon ile eritromisine yüksek seviyede direnç sağlayan pIP1527 plasmidinin *ereB* geninin nükleotid dizisi belirlendi. Modifiye eritromisin yapısı, kütle spektrometresi, kızılötesi spektrofotometri ve ^{13}C nükleer manyetik rezonansı içeren

fiziko-kimyasal teknikler ile belirlendi. Elde edilen veriler *ereA* (Ounissi and Courvalin, 1985), *ereB* gibi bir eritromisin esteraz'ı kodladığını gösterdi. İki izozimin amino asit dizilerinin karşılaştırılması, istatistiksel olarak anlamlı bir homoloji ortaya koymadı (Arthur vd., 1986).

ereA, *ereB* ve *ermAM* ile ilgili nükleotid dizilerinin dağılımı, Enterobacteriaceae ailesinin 112 suşu eritromisine dirençli koloni hibridizasyonu ile incelendi. Eritromisin esterazları tip I ve II'yi kodlayan *ereA* ve *ereB* genleri, 14 üyeli makrolidler eritromisin ve oleandomisin inaktive eden suşlarda tespit edildi. Bu antibiyotiklere inaktivasyona direnmekte olan 52 suşun hepsi *ereA* (n = 23), *ereB* (n = 23) veya her iki prob (n = 6) ile tespit edildiğinden, sadece bu direnç fenotipini oluşturan iki gen sınıfı sorumludur. Bir streptokokkal rRNA metilaz kodlayan *ermAM* geni, *Escherichia coli*'nin 21 suşu ve *Klebsiella* suşlarının iki suşunda saptandı. Çok sayıda suşun (n = 18) hem bir eritromisin esteraz tip II hem de bir rRNA metilaz ürettiği bulundu. *ereB* ve *ermAM* arasındaki fiziksel bağ, genlerin kod sentezlenmesinden sorumlu olduğu belirtildi (Arthur vd., 1987). Yapılan başka bir çalışmada plazmid üzerinde bulunan genetik bilgi, *Escherichia coil* BM694'e aktarıldı ve bu suş kullanılarak modifiye edilmiş antibiyotik izole edildi ve yapısı belirlendi. Direnç, antibiyotiğin lakton halkasını hidroliz eden bir eritromisin esterazın üretimini içermektedir. *E. coli* BM2195 antibiyotiklerin inaktivasyonu ile eritromisine oldukça dirençlidir. Modifiye antibiyotiğin yapısını fiziko-kimyasal tekniklerle belirledi ve edilen sonuçlara göre *E. coli* BM2195'in antibiyotik lakton halkasını hidroliz eden bir eritromisin esteraz üretmesiyle eritromisine dirençli olduğu tespit edildi (Barthelemy vd., 1984). Makrolidleri amino asidin 2'-hidroksil grubu üzerine fosfat sokarak makrolidleri inaktive eden makrosiklik çekirdeğin lakton halkasını ve fosfotransferazları (tip I ve tip II) hidrolize eden enzimler (*ereA* ve *ereB*) Enterobacteriaceae familyasının üyelerinde olduğu bildirildi (Sutcliffe vd., 1996).

10 Şubat 1997 ile 10 Şubat 1999 yılları arasında Helenik Antibiyotiklere Dirençli Solunum Yolu Patojeni Araştırmasına kayıtlı 2,448 Yunanlı bebek ve yeni yürümeye başlamış bebeklerden *S. pneumoniae* için nazofaringeal kültürler yapıldı. Örnekler 2 ile 23 aylık çocuklardan ayakta tedaviyle ve Orta - Güney Yunanistan'ın çeşitli bölgelerindeki 14 çocuk hekimi özel bürolarından elde edildi *S. pneumoniae* suşlarının izolasyonu, belirlenmesi, duyarlılık testi ve serotiplendirmesi yapıldı. İncelenen 2,448 çocuğun toplam 781 *S. pneumoniae* izolatının 137'si (%18) eritromisine dirençli idi. Bunların %67.9'u *ermB* geni ve %29.2'sinde ise *mefA* gen ürünleriydi. 137 eritromisine dirençli *S.*

pneumoniae izolatının 4'ünde (%2.9) ne *ermB* geni ne de *mefA* geni bulunamadı (Syrogiannopoulos vd., 2001). *Staphylococcus spp*namely, *ermA* ve *ermC* genlerinde en baskın olan erythromycin direnci belirleyici genlerin karşılaştırmalı bir analizi gerçekleştirildi. Altmış eritromisine dirençli *Staphylococcus spp.* izolatının 24'ü kuş, 36'sı klinik izolat olarak test edildi. Elde ettikleri sonuçlara göre, *ermC* geninin, en baskın direnç belirleyici geni olduğu, *ermC* geninin görüşüne karşın *ermA* geni üzerindeki prevalansını göstermektedir (Khan vd., 1999).

Bu çalışma elde edilen verilere göre çiftliklerin su ve sedimentlerinden izole edilen *E. coli*'lerin, *ereA* ve *ereB* direnç genlerine sahip olduğu, en az *ereA* direnç geni bulunurken en fazla *ereB* direnç geni olduğu tespit edildi.

PFGE metodu geçmiş yıllarda *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* ve *Lactococcus garvieae* gibi bakteriyel patojenlerin tiplendirilmeleri için kullanılmıştır. PFGE, moleküler metotlar ile karşılaştırıldığında nispeten daha güvenilir ve yüksek ayırt edebilme gücüne sahip güçlü bir metottur (Türe, 2012).

Farklı çalışmalarda PFGE için kullanılan koşullar farklılık göstermektedir. Elektroforetik koşullardaki farklılıklar, aynı DNA preparatı için elde edilen profillerde belirgin farklılıklara neden olabilmektedir. Kromozomal DNA'yı kesmek için kullanılan kesim enzimleri farklı çalışmalarda da farklıdır. Birden fazla enzim kullanmak, tekniğin ayırmacı gücünü önemli ölçüde arttırmaktadır. Restriksiyon enzimlerinin ve kullanılan elektroforetik koşulların önemli farklılıkları nedeniyle, bugüne kadar farklı laboratuvarlarda çalışanlar tarafından elde edilen PFGE profillerinin karşılaştırılmasının zor olduğu kanıtlanmıştır (Wassenaar vd., 2000).

PFGE'de DNA fragmanları üretmek için en önemli efektör olan restriksiyon enzimi spesifik bir nükleotit dizisi tanıyabilir ve her bakteri için spesifiktir. Bu çalışmada *Xanthomonas badrii* bakterisinden izole edilmiş ve *E. coli* izolatlarının 5'...T▼CTAGA...3', 3'...AGATC▲T...5' DNA'sındaki nükleotid dizisini tanıyan *XbaI* enzimi ile *Acetobacter pasteurianus* bakterisinden izole edilmiş ve *E. coli* izolatlarının 5'...GGGCC▼C...3', 3'...C▲CCGGG...5' DNA'sındaki nükleotid dizisini tanıyan *ApaI* enzimi kullanılmıştır (New England BioLabs; Nameghi, 2007).

PFGE yönteminin yüksek ayırım gücü antibiyotik dirençlilikleriyle karşılaştırıldığında profillerin yüksek çeşitliliğini göstermektedir. PFGE, aynı türün farklı bireyleri arasında ilişkilerin derecelendirilmesinde fayda sağlamaktadır. Motifiye edilen

protokol farklı yerlerden alınan örneklerin PFGE sonuçlarının karşılaştırılmasına da olanak sağlamaktadır.

Genotiplendirme yöntemleri, duyarlılık, kullanılabilirlik, çoğaltılabilirlik, hızlılık, kullanım kolaylığı ve maliyet gibi bir dizi ölçüt temelinde karşılaştırılabilir. En önemli özelliklerden biri, tekniğin ayırt edici gücüdür (Wassenaar and Newell, 2000). PFGE, farklı bakteri suşları ile ilgili yüksek ayrımcılık gücüyle, diğer çoğu biyokimyasal ve moleküler tipleme yöntemlerinden üstün olduğu kanıtlanmış genotiplendirme yöntemidir. Bununla birlikte, yöntem çok zaman alıcı ve tüm prosedür dört gün sürebilir. Bu, çok sayıda izolatu analiz etme kabiliyetini azaltabilir. Ayrıca, gelişmiş ekipman gerektiren pahalı bir yöntemdir (Olive ve Bean,1999). PFGE'nin ve DNA fragmanlarını jel üzerinde karşılaştıran diğer yöntemlerin en büyük dezavantajı ise reaktifler ve koşullar standartlaştırılmış olsa bile farklı laboratuvarlarda elde edilen sonuçların karşılaştırılmasının zor olmasıdır (Enright vd., 2000).

Kuyu suları (43), klinik örnekler (47) ve çeşitli gıdalardan (40) izole edilen 130 *E. coli* örnekleriyle genetik çeşitlilik, bazı antibiyotiklere duyarlılık ve plazmit profilleri yönünden yaptığı çalışma neticesinde PFGE sonuçları %80 benzerlik oranına göre değerlendirildiğinde; *E. coli* suşları, 16 alt tipe temsil edilen 101 farklı pulsotipe ayrıldı. Analiz edilen 43 su izolatu arasında 30 farklı pulsotip ve altı alt tip görülürken; 40 gıda suşu 32 farklı pulsotipe ve altı alt tipe, 47 klinik izolat ise 39 farklı pulsotip ve dört alt tipe ayrıldı. Restriksiyon profilleri değerlendirildiğinde tüm suşlar arasında yüksek oranda genetik çeşitlilik görüldü (Uysal, 2012).

2013 ve 2014 yıllarında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Bakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen ve üreptisin ön tanıları olan ve fenotipik olarak otomatize edilmiş olarak tanımlanan hastaların kan kültürlerinden ve idrarından 70 *E. coli* suşu izole edildi. PFGE analizinde, *E. coli* izolatlarının DNA'sı *XbaI* enzimi ile kesiminden sonra 13 ile 25 arasında değişen farklı sayıda fragmana sahip profiller tespit edilmiştir. PFGE sonuçlarında 70 *E. coli* suşunun %80'den fazla benzer olması nedeniyle 65 farklı pulsotip elde edilmiştir (Giray vd., 2016).

Onbir farklı lokasyonda toplanan örnekler arasında farklı *E. coli* genotipleri tespit edildi ve birbirini takip eden aylarda elde edilen izolatların benzer genotip model gösterdikleri belirlenmiştir (Lu vd., 2004). Sudan izole edilen *E. coli*'lerin PFGE genotip çeşitliliğine dayanarak, *E. coli*'nin incelenen su gövdelerinde dominant popülasyonları temsil ettiğine dair çok az kanıt bulunmuştur (Casareza vd., 2007). Dere ve kanallar

boyunca, *E. coli*'nin yüzey suları ile karşılaştırıldığında sedimentte daha yaygın olarak bulunduğu tespit edildi. Kentsel çıkış kaynaklı *E. coli* ile tarımsal kaynaklı *E. coli* arasında herhangi bir ilişki bulunamazken, PFGE ile saptanan *E. coli* genotipleri, kentsel akış kaynaklarına göre tarımsal kaynaklarda daha az çeşitlilik gösterdiği belirlendi (Ibekwe vd., 2011).

Bu çalışmada 2010 - 2011 yılları arasında izole edilen 75 farklı *E. coli* izolatlarının PFGE sonuçları incelenmiştir. Genotiplendirme yapılırken Tenover kriterleri kullanımı oldukça faydalı olmuştur. Her iki enzim kesimi sonucunda bakteri izolatları 4 grup altında toplanmıştır. *XbaI* enzimiyle kesim yapıldıktan sonra PFGE analizi sonucunda genomik DNA'larının benzerlik oranları %93 baz alındığında bakterileri izolatlarının arasındaki benzerlikler %79 olmuştur. *ApaI* enzimiyle kesim yapıldıktan sonraki PFGE analizi sonucunda genomik DNA'larının benzerlik oranları %93,4 baz alındığında 4 temel kümede guruplandırılmıştır. Yapılan çalışma neticesinde *E. coli*'lerde benzerlik olmasına rağmen hiçbiri aynı değildir. Bu farklı sonuçlar, farklı bölgedeki *E. coli* suşlarının yüksek çeşitliliğini göstermektedir. Nokta mutasyonları, DNA'nın eklenmesi ve silinmesi gibi rastgele genetik olaylar PFGE profillerini değiştirebilir. Bu olaylar belirlenen bantların varlığı veya yokluğu ile gösterilmektedir. Bununla birlikte, laboratuvar yöntemlerinin teknik zorlukları, gözlemlenen bu çeşitlerin bir diğer nedeni olarak kabul edilebilir. Ayrıca laboratuvar kurulumu ve ekipmanları, bilinmeyen sebepler, çalışma esnasında meydana gelen kesintiler, dikkat dağınıklığı, kişisel sorunlar gibi nedenlerde bağlı olabilmektedir (Farshad vd., 2011).

5. SONUÇ

Bu çalışmada 2010 ve 2011 yılları arasında farklı çiftliklerden elde edilen *E. coli* izolatlarının genotiplendirilmesi amacıyla PFGE metodu motifiye edilerek kullanılmıştır. Birçok çalışmada *XbaI* restriksiyon enzimi kullanılırken çalışmamızda *XbaI* ve *ApaI* olmak üzere iki ayrı restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır

XbaI restriksiyon enzim kesimi sonucunda suşların oluşturdukları bant profilleri UPGMA kümeleme analizi incelendiğinde, genomik DNA'larının benzerlik oranları %93 baz alınarak 4 temel kümede (X1-X4) guruplandırılmıştır. Bu sonuçlara göre tüm izolatlar arası benzerlik oranları %79,1 olup, TASWG 0411, TASSC 0811, TASSC 0211, SURWG 1010 ve AASG 0810 suşları diğer gruplardan ayrıldığında geri kalan suşların benzerlik oranları %85,1 olmaktadır. X1 kümesinde toplamda 25 suş bulunmakta olup toplam suşların %33'ünü barındırmaktadır. X2 kümesi ise suşların %44'ünü barındırmaktadır. Üçüncü kümede suşların %16'sı vardır ve bu grupta AA grubuna ait suş bulunmamaktadır. X4 kümesi ise en küçük küme olup, bünyesinde suşların %7'sini barındırmaktadır

ApaI restriksiyon enzim kesimi sonucunda suşların oluşturdukları bant profilleri UPGMA kümeleme analizi incelendiğinde; DNA'larının benzerlik oranları %93,4 baz alındığında 4 temel kümede (A1-A4) guruplandırılmıştır. En büyük küme A1 olup bünyesinde toplam suşların %51'ini barındırmaktadır. A2 kümesinde suşların %21'i vardır ve bu kümede AA çiftliğinden şus bulunmamaktadır. A3 kümesi suşların %25'ini barındırarak ikinci en büyük kümeyi oluştururken A4 kümesinde sadece AA ve IR suşları bulunmaktadır.

75 *E. coli* şusunun hepsine *florR*, *ereA* ve *ereB* karşı antibiyotik dirençlerine bakılmış suşların genel olarak 42 (%56)'si direnç geni oluşturmazken 33 (%44)'ü direnç geni barındırmaktadır. Bütün işletmelere bakıldığında ise en fazla *ereB* direnç geni olarak tespit edilmiştir.

Farklı örnek yerden elde edilen çok sayıda izolat, aynı örnekleme türü ve örnekleme zaman çerçevesi genetik çeşitlilik gösterdi. Bu geniş çeşitlilik çeşitliliğinin ardında olası açıklamalar izolatlar tamamen farklı kaynaklardan kaynaklanmış olabilir. Ancak *E. coli*'nin bir alt kümesinde bile önemli genotip çeşitliliği bulunmaktadır.

6. ÖNERİLER

Tatlı sulardaki işletmelerde ilk defa yapılmış olması ve literatüre sağlayacağı katkı nedeniyle bir temel oluşturma niteliğindedir.

Çevresel kirleticilere maruz kalma ve besin kompozisyonundaki değişiklikler, işletmelerde hastalıklara karşı kullanılan antibiyotikler bazı organizmalarda antibiyotik direncine neden olabilmektedir. Bu nedenle özellikle işletmelerde hastalık oluşmadan kullanılan antibiyotikler veya tedavi aşamasında uzun süre antibiyotik kullanımından kaçınılmalıdır. Antibiyotik kullanımı yerine probiyotikli besinlerle beslenilerek bağışıklık sistemi güçlendirilebilir.

PFGE sırasında numunelerin zayıf hazırlanması, hatalı elektroforez kurulumu, uygunsuz geçiş zamanı veya bunların herhangi bir kombinasyonu nedeniyle sorunlar ortaya çıkabilmektedir. PFGE işlemi yapılırken bantlarda kötü görüntülerin engellenebilmesi için dikkat edilmelidir. PFGE aşamasında dikkatli olunması daha net görüntü elde edilmesini sağlamaktadır.

DNA ekstraksiyonu için önemli olan lizis aşamasının dikkatli yapılması gerekir. Yetersiz lizis enzimle kesim jelde kötü görüntülere neden olabilmektedir. Agaroz PFGE kalıbına dökülürken uygun sıcaklıkta olmalı ve döküldüğünde oluşan hava kabarcıkları dikkatli bir şekilde alınmalıdır. Ayrıca cihaz çalışırken programlar arası geçişte cihazın durdurulup oluşan hava kabarcıklarının alınması görüntülerin parlak ve net gözükmesini sağlamaktadır. Çalışma esnasında elektrik kesintilerine karşın mutlaka güç kaynakları kullanılmalıdır.

PFGE metodu yapılan çalışmalarda her çalışmacı için farklı bir protokol geliştirildiği için karşılaştırılmaların yapılması zor olmaktadır. Bununla birlikte, yöntem çok zaman alıcı ve tüm prosedür dört gün gibi bir süre sürmektedir. Bu, çok sayıda izolatu analiz etme kabiliyetini azaltabilir. Ayrıca, gelişmiş ekipman gerektiren pahalı bir yöntemdir. restriksiyon enzimlerinin maliyeti de bu yöntemin bir dezavantajı sayılmaktadır.

PFGE yönteminin yüksek ayırım gücüyle de antibiyotiklere karşı dirençle karşılaştırıldığında profillerin yüksek çeşitliliğinde göstermektedir. PFGE ile aynı türün farklı bireyleri arasında ilişkilerin derecelendirilmesinde fayda sağlamaktadır. Motifiye edilen protokol farklı yerlerden alınan örneklerin PFGE sonuçlarının karşılaştırılmasına da olanak sağlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Allison, L., 2014. Temel Moleküler Biyoloji (I.Bölüm), Palme Yayıncılık.
- Aleksandra, M., Zorica, R., Anette, W., Janzen, T. and Obradovic, D., 2005. Isolation and characterization of bacterial flora from farmhouse fermented milk products of Serbia and Montenegro, Acta Veterinaria, 4 (55), 307-318.
- Altınok, İ., 2014. Genetik ders notları, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon
- Altınok, İ. ve Kurt, İ. 2003. Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3, 131-138
- Altınok, İ. 2016. Bakteriyel Balık Hastalıkları Tedavisi Ders Notu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon
- Anonim, Experiment: Testing Water for Fecal Coliform Bacteria, waksman foundation for microbiology information resources: <http://www.waksman-foundation.org/labs/rochester/coliform.htm>, 04.04.2017a
- Anonim, <https://tr.wikipedia.org/wiki/Enterobacteriaceae>, 12.19.2016b
- Anonim, https://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli, 12.01.2016c
- Anonim, *E.coli* serotipleri: <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/944105010.pdf#search=%22E.coli%20serotipleri%22>, 12.1.2016
- Anonim, 1997. GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rome, FAO: Reports and Studies, GESAMP, 65, 40.
- Anvarinejad, M., Farshad, Sh., Ranjbar, R., Giammanco, G M., Alborzi, A. and Japoni, A., 2012. Genotypic Analysis of *E. coli* Strains Isolated from Patients with Cystitis and Pyelonephritis, Iran Red Crescent Med J., 14, 7, 408–416.
- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N. ve Akay, Ö., 1992. Çomak Biçimli Mikroorganizma Enfeksiyonları, Özel Mikrobiyoloji: Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik Enfeksiyonları (Bölüm 3), Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum.
- Arthur, M., Autissier, D. and Courvalin, P., 1986. Analysis of the nucleotide sequence of the *ereB* gene encoding the erythromycin esterase type II, Nucleic Acids Res. 14, 12, 4987–4999.

- Arthur, M., Andremont, A. and Courvalin, P., 1987. Distribution of Erythromycin Esterase and rRNA Methylase Genes in Members of The Family Enterobacteriaceae Highly Resistant to Erythromycin, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 31, 3, 404-409.
- Aydın, K., 2007. Makrolidler ve Linkozamidler, Ankem Dergisi, 21, Ek2, 57-61.
- Badri, S., Fassouane, A., Filliol, I., Hassar, M. and Cohen, N., 2009. Food Safety Information Publishing Clonal analysis of *Escherichia coli* strains isolated from food by pulsed-field gel electrophoresis, Internet Journal of Food Safety, 44-49.
- Basım, E. ve Basım, H., 2000. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology, Turk J Biol, 25, 405-418.
- Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A. and Lebaron, P., 2000. Diversity of Salmonella strains isolated from the aquatic environments determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions, Appl. Environ. Microbiol., 66, 1544–1552.
- Barthelemy, P., Autissier, D., Gerbaudi, G. and Courvalin, P., 1984. Enzymic Hydrolysis of Erythromycin by A Strain of *Escherichia coli* A New Mechanism of Resistance, The Journal Of Antibiotics, 1692.
- Bilgehan, H., 2000. Klinik Mikrobiyoloji, özel bakteriyoloji ve Bakteri enfeksiyonları, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir, 1-16
- Campos, M. R. H., André, M. C. D. P. B., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C. and Serafini, A. B., 2009. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw milk, Minas Frescal cheese, and food handlers, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 61, 5, 1203-1209.
- Capkın, E., Terzi, E. ve Altınok, İ., 2015. Occurrence of antibiotic resistance genes in culturable bacteria isolated from Turkish trout farms and their local aquatic environment, Research, 114, 127–137.
- Capone, D. G., D. P. Weston, Miller, V. and Shoemaker, C., 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture, Aquacult., 145, 55-75.
- Carle, G. F., Frank, F. and Olson, M. V., 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecule by periodic inversion of electric field, Science, 232, 65-68.
- Carle, G. F. and Olson, M. V., 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis, Nucl. Acids Res., 14, 5647-5663.

- Casareza, E. A., Pillaib, S. D. and Di Giovanni, G. D., 2007. Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR, Water Research, 41, 3643-3648, doi:10.1016/j.watres.2007.03.020.
- Cernat, R., Balotescu, C., Ivanescu, D., Nedelcu, D., Lazar, V., Bucur, M., Valeanu, D., Tudorache, R., Mitache, M. and Dragoescu, M. (Bucharest, RO), 2007. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from drinking and recreational, salmaster waters, Int J Antimicrob Agents, 29, 274.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. and Finlay, B. B., 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*, Clin Microbiol Rev., 26, 4, 822–880, doi: 10.1128/CMR.00022-13.
- Çiftci, A. ve Aksoy, A., 2015. Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics, 1, 2, 1-10.
- Demirbağ, Z., 2011. Genel Mikrobiyoloji, Bölüm 6:Büyüme ve büyümenin Kontrolü, 116-117, Karadeniz Teknik Üniversitesi,Fen Bilimleri Fakültesi,Biyoloji Bölümü, Trabzon
- Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M. and Palmer, C. J., 2002. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment., Appl. Environ. Microbiol., 68, 3, 1165–1172.
- Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A. and Tanaka, K., 1992. Printed in Great Britain 2243 Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species, Journal of General Microbiology, 138, 2243-2251.
- Durmaz., R., Otlu, B., Çalifkan, A. ve Gürsoy, N., 2007. *Acinetobacter Baumanni*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Türlerinin Moleküler Tiplendirilmesinde Kullanılabilecek Kısa Süreli“Pulsed-Field Gel” Elektroferez (Pfge) Protokolü, Ankem Derg. 21, 2, 113-117.
- Egemen, Ö. ve Sunlu, U., 1996. Su kalitesi, Bornova-İzmir: Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, 14.
- Enright, M. C., Day, N. P. J., Davies, C. E., Peacock, S. J. and Spratt, B. G., 2000. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*, Journal Of Clinical Microbiology, 38, 3, 1008–1015.
- Ertürk, Y. E., 2010. Hayvan Kökenli *Salmonella* ve *Shigella* Suşlarında Çoklu Antibiyotik Direnci ve İntegron Sıklığı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara
- Farshad, S., Anvarinejad, M., Tavana, A. M., Ranjbar, R., Japoni, A., Zadegan, R. M. and Alborzi, A., 2011. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* strains isolated

from children with community acquired urinary tract infections, *African Journal of Microbiology Research*, 5, 26, 4476-4483, Doi: 10.5897/AJMR11.285.

Félix, B., Dao, T. T., Lombard, B., Brisabois, A. A. A. and Roussel, S., 2012. The Use of Pulsed Field Gel Electrophoresis in *Listeria monocytogenes* Sub-Typing Harmonization at the European Union Level, *Gel Electrophoresis –Principles and Basics* (Edited by Magdeldin, S.), 241-243.

Gardiner, K., 1991. Perspective:Analytical Biotechnology, Pulsed field gel electrophoresis, *Anal. Chem.*, 63, 7, 658–665, Doi: 10.1021/ac00007a003.

Giray, B., Uçar, F. B. ve Aydemir, S. Ş., 2016. Genotypic analysis of *Escherichia coli* strains that cause urosepsis in the Aegean region, *Turk J Med Sci*, 1518-1527, doi:10.3906/sag-1507-114.

Goto, D. K. and Yan, T., 2011. Genotypic Diversity of *Escherichia coli* in the Water and Soil of Tropical Watersheds in Hawaii, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 12, 3988-3997, doi:10.1128/AEM.02140-10.

Heller, C., 1994. Field Inversion Gel Electrophoresis, *Protocols for Gene Analysis*, Bölüm 31, *Methods in Molecular Biology* (Edited by Adrian. J. Harwood), Totowa,NJ: Humana Press Inc., 135-146.

Herschleb, J., Ananiev, G. and Schwartz, D. C., 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*, 2, 677-684, doi:10.1038/nprot.2007.94.

Heperkan, D., 2007. Koliform ve *Escherichia coli*: Özellikleri, Tipleri, Son gelişmeler ve Test yöntemleri, *Dünya Gıda*.

Hunter, P. R. and Gaston, M. A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems — an application of Simpsons index of diversity, *J. Clin. Microbiol.*, 26, 2465–2466.

Ibekwe, A. M, Murinda, S. E. and Graves, A. K., 2011. Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* from Human and Animal Sources Uncovers Multiple Resistances from Human Sources, *Research Article* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020819>.

Inghs, V., 2000. Antibacterial chemotherapy in aquaculture: review of practice, associated risks and need for action. In Report and proceedings of the SEAFDEC/FAO/CIDA meeting 63 on the use of chemicals in aquaculture in Asia, 20-22 May 1996, Iloilo, Philippines, *Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.*, 7-22.

Kaufmann, M., 1998. *Molecular bacteriology Protocoly and Clinical Applications*, Woodford, N. and Johnson, A. (Ed), Humana press Inc.,Totowa, N. J., *Methods in Molecular Medicine*, 15, 88-91.

- Kaufmann, M. E., 1998. Pulse Field Gel Electrophoresis, *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications* (Editor by: Woodford, N. and Johnson, A.), 33-50.
- Keyes, K., Hudson, C., Maurer, J. J., Thayer, S., White, D. G. and Lee, M. D., 2000. Detection of Florfenicol Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Sick Chickens, *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 2, 421–424.
- Khan, S. A., Nawazf, M. S., Khan, A. A. and Cerniglia, C. E., 1999. Simultaneous detection of erythromycin-resistant methylase genes *ermA* and *ermC* from *Staphylococcus* spp. by multiplex-PCR, *Molecular and Cellular Probes*, 13, 5, 381-387.
- Lua, L., Humea, M. E., Sternesc, K. L. and Pillaia, S. D., 2004. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates in irrigation water and associated sediments: implications for source tracking, *Water Research*, 38, 18, 3899–3908, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.020>.
- Lugal Göksu, M. Z., 2003. Su Kirliliği Ders Kitabı, *Adana: Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*, 7, 95-96-165
- Maule, A., 2000. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water, and on surfaces. Symposium series, *Soc.Appl. Microbiol.*, 29, 71S–78S.
- McLellan, S. L., Daniels, A. D. and Salmore, A. K., 2001. Clonal Populations of Thermotolerant Enterobacteriaceae in Recreational Water and Their Potential Interference with Fecal *Escherichia coli* Counts., *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 10, 4934-4938, doi: 10.1128/AEM.67.10.4934-4938.2001
- McPhearson, R. M., DePaola, A., Zywno, S. R., Motes, M. L. and Guarino, A. M., 1991. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds, *Aquaculture*, 99, 203-211.
- Meng, J., Zhao, S., Zhao, T. and Doyle, M. P., 1995. Molecular Characterisation of *Escherichia coli* O157H7 Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Plasmid DNA Analysis, *J. Med. Microbiol*, 42, 258-263.
- Munsuz, N. ve Ünver, İ., 1995. Su Kalitesi, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 1389, 335, Ankara
- Nameghi., S. A., 2007. Genotyping *Escherichia coli* isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Södertörn Högskola Stockholm, Yüksek lisans tezi.
- New England BioLabs., <https://www.neb.com/products/r0114-apai>, 11.04.2017
- O'hara, K. and Yamamoto, K., 1996. American Society For Microbiology Reaction Of Roxithromycin and Clarithromycin With Macrolide-Inactivating Enzymes From

- Highly Erythromycin-Resistant *Escherichia coli*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40, 4, 1036–1038.
- Olive, D. M. and Bean, P., 1999. Minireview, Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms, Journal Of Clinical Microbiology 37, 6, 1661–1669.
- Ounissi, H. and Courvalin, P., 1985. Nucleotide sequence of the gene *ereA* encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*, Gene, 35, 3, 271–278.
- Samuelsen, O. B., Lunestad, B. T., Ervik, A. and Fjelde, S., 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions, Aquacult., 126, 283-90.
- Schwartz, D. C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M. and Cantor, C. R., 1982. New techniques for purifying large DNAs and studying their priorities and packaging, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, s. XLVII, 189-195.
- Schwartz, D. C. and Cantor, C. R., 1984. Separation of YEast Chromosome-sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Elektrophoresis Cell.
- Shah, S. Q. A., Colquhoun, D. J., Nikuli, H. L. and Sørum, H., 2012. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in the Bacterial Flora of Integrated Fish Farming Environments of Pakistan and Tanzania, Environmental Science & Technology, 46, 16, 8672-8679.
- Smith, P., 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence, Aquacult., 146, 157-69.
- Southern, E. M., Anand, R., Brown, W. R. and Fletcher, D. S., 1987. A model for the separation of large DNA molecules by crossed-field gel electrophoresis, Nucl. Acids Res., 15, 5925-5943.
- Stenutz, R., Weintraub, A. and Widmalm, G., 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens, FEMS Microbiol Rev., 30, 3, 382-403.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A. and Wondrack, L., 1996. American Society for Microbiology Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40, 11, 2562–2566.
- Syrogianopoulos, G. A., Grivea, I. N., Tait-Kamradt, A., Katopodis, G. D., Beratis, N. G., Sutcliffe, J., Appelbaum, P. C. and Davies, T. A., 2001. Identification of an *erm(A)* Erythromycin Resistance Methylase Gene in *Streptococcus pneumoniae* Isolated in Greece. Antimicrob Agents Chemother, 45, 1, 342–344.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B., 1995. Guest Commentary: Interpreting Chromosomal

DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing, Journal Of Clinical Microbiology, 33, 9, 2233–2239, doi: 0095-1137/95/\$04.0010.

Terzi, E., 2013. Alabalık İşletmelerinden İzole Edilen Bakterilerde Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Topal, M., U. Şenel, G., Arslan, E. I. ve Öbek, E., 2015. Antibiyotikler ve Kullanım Alanları, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31, 3.

Türe, M. ve Altınok, İ., 2013. Pulsed-Field Jel Elektrofrez (PFGE) Metodu ve Akuatik Organizmalarda Kullanımı, SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 9, 1, 44-54.

Türe, M., 2012. Pfgc Metodu Kullanılarak *Lactococcus Garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi, TAGEM/HS/10/09/02/179, Trabzon

URL-1, https://www.google.com.tr/search?q=e.coli&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi7sqv0zdvtAhXPJFAKHYY0JBMYQ_AUICigB&biw=1137&bih=548#imgrc=qzjstTITg1P8jM, 11.05.2017

URL-2, <http://docplayer.cz/docs-images/60/45167318/images/48-0.png>, 11.06.2017

Van, T. T. H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L. T. and Coloe, P. J. 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes, International Journal of Food Microbiology, 124, 217-223.

Wassenaar, T. M. and Newell, D. G., 2000. Minireview, Genotyping of *Campylobacter* spp., Ap. and Env. Microbiol., 66, 1, 1-9.

White, D. G., Hudson, C., Maurer, J. J., Ayers, S., Zhao, S., Lee, M. D., Bolton, L., Foley, T. and Sherwood, J., 2000. Characterization of Chloramphenicol and Florfenicol Resistance in *Escherichia coli* Associated with Bovine Diarrhea, J. Clin. Microbiol., 38, 12, 4593-4598.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'un Maça ilçesinde doğdu. Lise öğrenimini 2003 yılında Maça'da tamamladıktan sonra 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Maça Meslek Yüksekokulu, Su Ürünleri Bölümü'ne başladı. 2010 yılında mezun olup aynı yıl yapılan Dikey Geçiş Sınavı ile KTÜ, Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümüne geçiş yaptı ve 2014 yılında öğrenimini tamamladı. 2014 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir.

