

## İnsan Patojeni *Escherichia coli* İzolatlarının Fenotipik Özellikleri, Plazmit ve Protein Profillerine Göre Karakterizasyonu

İsmet BERBER<sup>1</sup>

Akın ÖTER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 65080 Van  
<sup>2</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 65080 Van

**Özet:** Bu çalışmada, 13 adet *E. coli* suşu fenotipik özellikleri, plazmit ve protein profillerine göre karakterize edildi. Agaroz jel elektroforez analiz sonuçlarına göre bütün suşların en az bir adet plazmit bulundurduğu belirlendi. Toplam hücre protein profil sonuçları esas alınarak yapılan nümerik analiz, benzerlik düzeyi % 71'in üzerinde 2 ayrı büyük grup ortaya koydu. Ayrıca, hücre dışı protein profil sonuçları esas alınarak yapılan nümerik analiz ise benzerlik düzeyi % 60'ın üzerinde 3 ayrı büyük grup ortaya koydu. Bu araştırma, SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profillerinin test edilen *E. coli* suşlarının taksonomik ilişkilerinin incelenmesinde etkili bir yaklaşım sağlamadığını gösterdi. Bununla birlikte, hücre dışı protein profillerinin toplam hücre protein profillerine göre daha iyi ayırım sağladığı da belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** *E. coli*, Karakterizasyon, Plazmit, Protein profilleri, SDS-PAGE.

### Characterization of Human Pathogenic *Escherichia coli* Isolates According to Phenotypic Properties, Plasmid and Protein Profiles

**Abstract:** In the present study, 13 *E. coli* strains were characterized using phenotypic properties, plasmid and protein profiles. According to agarose gel electrophoresis analysis it was confirmed that all strains consisted of at least one plasmid. A numerical analysis based on whole-cell protein patterns revealed 2 distinct major groups with a similarity level of above 71 %. Afterwards, a numerical analysis based on extracellular protein patterns revealed 3 difference major groups with a similarity level of above 60 %. The research indicated that whole-cell and extracellular protein profiles obtained by SDS-PAGE did not provide an effective approach to the investigation of taxonomic relationship among the tested *E. coli* strains. However, it determined that extracellular protein patterns were more difference than whole-cell protein profiles.

**Key words:** *E. coli*, Characterization, Plasmid, Protein profiles, SDS-PAGE.

#### Giriş

Son yıllarda çoklu antibiyotik direncine sahip birçok Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizma dünyada ve ülkemizde giderek tehlikeli boyutlara ulaşan hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Harbart ve ark. 2001; Mitscher 1999; Berber ve ark. 2003). ABD ve Avrupa'daki birçok klinik raporlarında özellikle metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) ve diğer antibiyotik dirençli insan patojeni mikroorganizmaların yüksek oranda ölümle sonuçlanan enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmektedir (Viksveen 2003). Gerçekten, çoğu patojenik *E. coli* suşu hastane ortamında insanlara bulaşarak ağır seyreden enfeksiyonlara neden olmakta ve bu hastalıkların tedavisi oldukça yüksek bir maddi kaybı da beraberinde getirmektedir (Allison ve ark. 1998).

*E. coli* türüne ait suşların çoğu kapsül veya mikrokapsül oluşturabilme yeteneğine sahip, peritrik flagellalı, hareketli veya hareketsiz, Gram (-), sporsuz ve fakültatif anaerobiktir (Farmer ve ark. 1985). Bu türe giren suşların tanımlanmasında öncelikli olarak biyokimyasal testlere dayalı metotlar kullanılmaktadır (Bettalheim 1992). Biyokimyasal testleri esas alan yöntemler tür düzeyinde *E. coli* tanısı için yeterli bilgi sağlamasına karşın, tür altı seviyede ayırım için yeterli değildir. Ayrıca, *E. coli* türüne ait suşların karakterizasyonunda; serolojik (Bettalheim ve Thompson 1987), bakteriyofaj tiplendirimi (Khakhria ve ark. 1990; Bachmann 1990), antibiyogram analizleri gibi diğer klasik yöntemlere ilave olarak plazmit tiplendirimi (Coutrier ve ark. 1988; Singer ve ark. 1989), ribozomal RNA tiplendirimi (Fournier ve Ozeki 1985), DNA/DNA hibridizasyonu (Ikemura 1981) ve farklı PCR teknikleri (Ko ve Lee 2006) gibi yöntemler de kullanılmıştır.

Günümüzde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) tekniği kullanılarak birçok cinsde ait mikroorganizmaların toplam ve hücre dışı protein profilleri belirlenerek gerek tür gerekse tür altı seviyede ayırım yoluna gidilmiştir. Kullanılan bu yöntemin bazı cinslere ait türlerin ayırımında oldukça yararlı olduğu belirlenmiştir (Clink ve Pennington 1987; Elliott ve Facklam 1993; Berber ve Berber 2006). Ancak, bazı bakteri türlerinin tür altı düzeyde ayırımında hücre dışı protein profillerinin daha faydalı olduğu bildirilmektedir (Berber ve ark. 2003).

Bu çalışmada Van ilinde bulunan bazı hastane ve kliniklere gelen hastalardan alınan idrar ve gaita kültürlerinden izole edilmiş izolatların biyotiplendirilmesi, antibiyotik dirençlilikleri ve plazmit içeriklerinin belirlenmesi, toplam hücre proteinleri ve hücre dışı protein profillerinin belirlenmesi esas alınarak karakterizasyonu amaçlandı.

#### Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada, Van ilindeki Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Bakterioloji laboratuvarı, Van Kızılay Tıp Merkezi, Van Doğu Tıp Merkezi ve Van Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarlarından temin edilen idrar ve dışkı örneklerinden izole edilen 10 adet izolat ve *E. coli* ATCC 11239, *E. coli* ATCC 4230 ve *E. coli* ATCC 25922 numaralı referans suşlar kullanıldı. Bütün suşların fenotipik özelliklerini belirlemek için Gram boyama, hareket, oksidaz, şekerlerin fermantasyonu (laktoz, maltoz, glukoz, sükroz, arabinoz, ksiloz, mannitol ve rafinoz), H<sub>2</sub>S oluşumu, laktozdan gaz oluşumu, lizin dekarboksilasyonu,

sitrat kullanımı, indol oluşumu, üreaz, Voges-Proskauer, metil kırmızısı, DNaz, fenilalanin deaminasyonu gibi biyokimyasal testler yapıldı. Ayrıca, antibiyotik duyarlılıkları NCCLS önerileri doğrultusunda disk difüzyon tekniği kullanılarak belirlendi. Bu test için seftazidim, amoksisilin-klavulonik asit, ampisilin, sefazolin, amikazin, siprofloksasin ve gentamisin olmak üzere 7 farklı standart antibiyotik diski (Difco) kullanıldı.

*E. coli* suşlarından plazmit DNA izolasyonu için alkali lizis plazmit DNA izolasyon metodu kullanıldı (Zhou ve ark. 1990). İzole edilen plazmitler hazırlanan %0.6'lık agaroz jelde (Midicell® Primo Submarine Gel System, USA) 100 voltluk sabit akımda yaklaşık 1.5-2 saat süre ile yürütüldü. Yürütme işleminin bitiminde jelin fotoğrafı UV transillüminatör (Cedex, France) altında çekildi. Her bakteri suşu 100 ml BHI broth (Difco) besiyeri 250 mililitrelik erlenmayer içerisinde 150 rpm ve 37°C'lik çalkalamalı etüvde 24 saat süreyle geliştirildi. Hücre dışı proteinlerin ekstraksiyonunda Wessel ve Flugge (1984)'nin yöntemi, toplam hücre proteinlerin ekstraksiyonunda Berber ve ark. (2003)'nin modifiye yöntemi kullanıldı. Bakteri kültürlerinden ekstrakte edilen toplam hücre ve hücre dışı proteinler dikey elektroforez tankı (UVP Vertical Electrophoresis Unit, Cambridge, UK) ve 1 mm kalınlığında (%4'lük stacking ve %10'lük resolving) jelde yürütülerek Comassie Brilliant Blue (R-250) ile boyandı (Laemmli 1970). Daha sonra boyası giderilerek protein bantları görünür hale getirilen jellerin fotoğrafları (FinePix S9500, Fuji, Japan) çekildi.

Her bakteri suşuna ait toplam ve hücre dışı protein profillerini içeren jellerin fotoğrafları çıplak gözle incelendi ve protein bantları (1 ya da 0) ikili veriler biçiminde bilgisayara kaydedildi. Bilgisayar ortamına aktarılan veriler MINITAB versiyon 13.3 programında değerlendirildi ve protein profilleri esas alınarak bakteri suşları arasındaki benzerlik, unweighted pair group method with an arithmetic averages algorithm (UPGMA) yöntemi kullanılarak dendrogramlar oluşturuldu.

### **Bulgular ve Tartışma**

İzolatlarının biyokimyasal test sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre izolatların tümünün Gram (-), hareketli, sporsuz, çomak şeklinde ve fakültatif aerobik oldukları belirlendi. Yapılan karbonhidrat fermentasyon testleri bütün suşların laktoz, maltoz, glukoz, sükröz, arabinoz, ksiloz ve mannitolü kullanabildiği halde 4 suşun (DT5, DT4, DH8 ve ATCC 25922) rafinozu kullanamadıkları bulundu. Diğer taraftan, izolatların tümünün H<sub>2</sub>S negatif ve laktozdan gaz oluşturdukları da tespit edildi.

Diğer yandan, test edilen suşların tümünün lizin dekarboksilaz, fenilalanin deaminaz negatif, sitrat ve üreaz negatif olmalarına karşın indol ve metil kırmızısı pozitif oldukları saptandı. Bununla birlikte, tüm suşların glukozdan aseton oluşturamadıkları ve K<sub>2</sub>, DH5 ve DH3 numaralı suşlar hariç diğer suşların DNaz negatif oldukları bulundu. Antibiyogram test sonuçlarına göre, bir sefalosporin türevi olan seftazidim antibiyotiğine karşı DH1 ve ATCC 11239 numaralı iki suş orta derecede duyarlı

iken, diğer suşların tamamının bu antibiyotiğe karşı dirençli olduğu saptandı. Diğer bir sefalosporin türevi olan sefazolin antibiyotiğine karşı ise DH3, DH4, DH7, DT5 ve DT6 suşları hariç diğer bütün suşların duyarlı oldukları tespit edildi. Bir penisilin türevi olan ampisilin antibiyotiğine karşı bütün bakteri suşları dirençli iken, diğer penisilin türevi olan amoksisilin-klavulanik asite karşı DH1, DH3, DH4, DH7, DH8, DT5 ve DT6 olmak üzere toplam 7 adet suşun dirençli oldukları ve diğer 6 suşun bu antibiyotiğe duyarlı olduğu bulundu. Diğer taraftan, aminoglukozit türevi olan amikasin antibiyotiğine karşı test edilen suşların tamamının duyarlı olduğu halde, diğer aminoglukozit türevi gentamisin antibiyotiğine karşı DH3 ve DH4 numaralı suşların dirençli diğer suşların duyarlı oldukları belirlendi. Ayrıca, kinolon türevi olan siprofloksasin antibiyotiğine karşı DH3 ve DH4 numaralı izolatların dirençli, diğer izolatların ise duyarlı olduğu tespit edildi.

Yapılan DNA plazmit analiz sonuçlarına göre, test edilen suşların hepsinde en az bir adet plazmit içerdiği görüldü (Şekil 1). a ile işaretlenmiş plazmitin bütün suşlarda ortak olduğu, buna karşın b ile işaretlenmiş olan plazmitin ise yalnızca DH5 ve DT6 suşlarında bulunduğu belirlendi. Bakteri suşlarından en çok plazmiti 6 ve 11 numaralı hatlarda yürütülen DH8 (4 tane) ve ATCC 25922 (5 tane) suşlarının içerdiği tespit edildi. Diğer taraftan, c ile işaretlenen plazmitin yalnızca DH8 ve d ile işaretlenen plazmitin de yine sadece DH1 suşunda bulunduğu görüldü. Ayrıca, en çok plazmit içeren iki suşun (DH8 ve ATCC 25922) e ile işaretlenmiş üçlü plazmit bantlarını içerdiği de bulundu. Çalışmada, bakteri suşlarının plazmit içerip içermediği hedeflendiği için molekül ağırlıklarının belirlenmesi için molekül standart kullanılmadı.

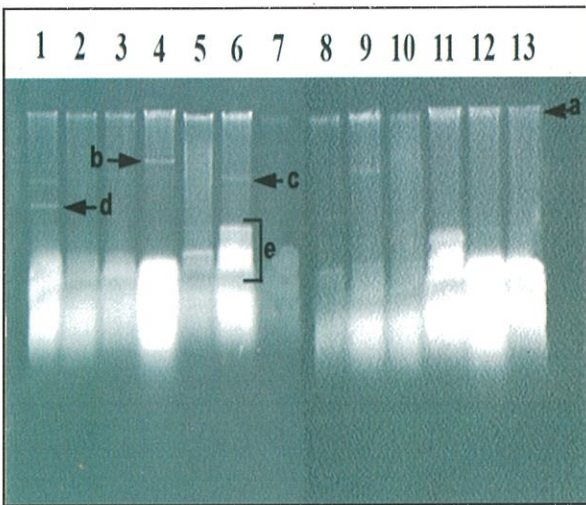
Araştırmamızda incelenen bakterilerin toplam hücre protein profilleri Şekil 2'de verilmektedir. Toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE analiz sonuçlarına göre, suşların hepsinin yüksek düzeyde benzer bant profillerine sahip oldukları belirlendi. Bütün suşların yüksek (60-150 kDa) ve düşük (30-50 kDa) molekül ağırlığına sahip bant desenleri arasında benzerlik seviyesinin yüksek olduğu bulundu. Özellikle; yüksek molekül ağırlıklı (2, 3 ve 4 numaralı bantlar) ve düşük molekül ağırlıklı (6, 7, 8, 9 ve 10 numaralı bantlar) dominant protein bantlarının bütün suşlarda ortak olduğu tespit edildi. Bununla birlikte, incelenen suşlar arasında az da olsa bazı farklılıkların olduğu da görüldü. DT5 ve ATCC 25922 numaralı suşların 5 olarak işaretlenen üçlü protein bandını içermeleriyle diğer suşlardan farklılık gösterdikleri tespit edildi. Ayrıca, 200 kDa'dan daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan ve 1 ile işaretlenen protein bandının DH1, DH3 ve DH4 numaralı suşlar hariç diğer bütün suşlarda bulunduğu da belirlendi.

Diğer taraftan, incelenen suşlara ait toplam hücre dışı protein profilleri Şekil 3'de görülmektedir.

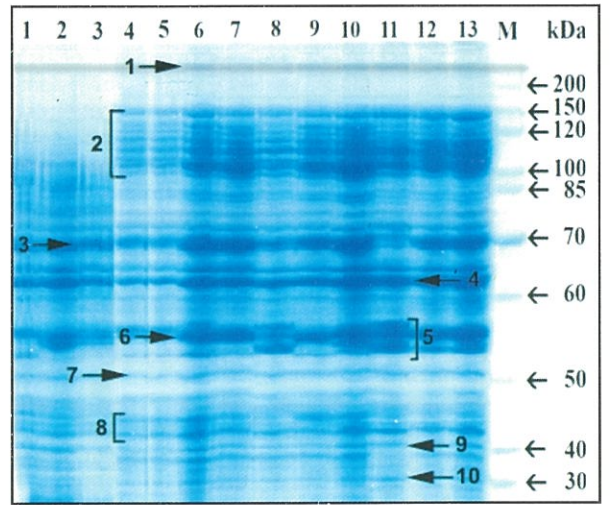
Çizelge 1. *E. coli* izolatlarının biyokimyasal özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları.

Test	DT6	DT5	DT4	K2	DH1	DH8	DH5	DH4	DH7	DH3	<i>E. coli</i> ATCC 4320	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 11239
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Şekerlerin Fermantasyonu													
Laktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sükroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ksiloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinoz	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
H <sub>2</sub> S Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktozdan Gaz Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lizin Dekarboksilasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat Kullanımı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Üreaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Kırmızısı	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNaz	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Fenilalanin Deaminasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antibiyotikler													
Seftazidim	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I
Amoksisilin-klavulanik asit	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S
Ampisilin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sefazolin	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S
Amikasin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Siprofloksasin	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
Gentamisin	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S

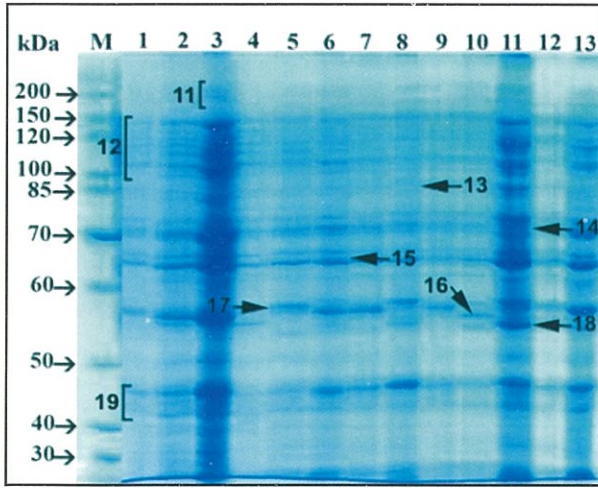
(+): olumlu, (-): olumsuz, R: dirençli, I: orta derecede dirençli, S: duyarlı.



Şekil 1. 13 adet *E. coli* suşunun plazmit profilleri. Hatlar: 1: DH1, 2: DH3, 3: DH4, 4: DH5, 5: DH7, 6: DH8, 7: DT4, 8: DT5, 9: DT6, 10: K2, 11: *E. coli* ATCC 25922, 12: *E. coli* ATCC 4230, 13: *E. coli* ATCC 11239.



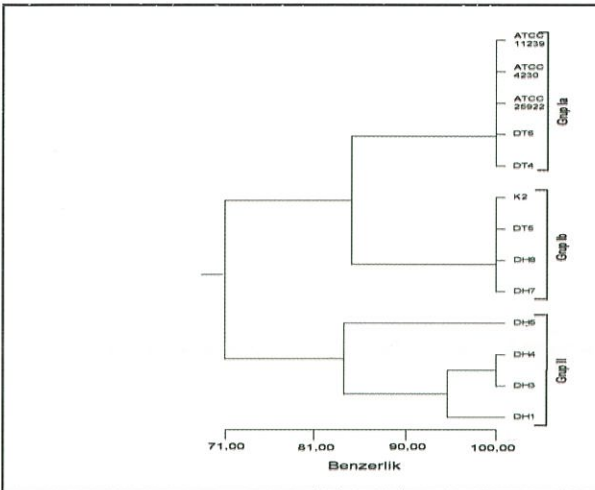
Şekil 2. 13 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen hücre içi protein profilleri. Hatlar, Şekil 1'de verdiği gibidir.



Şekil 3. 13 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen hücre dışı protein profilleri. Hatlar, Şekil 1'de verildiği gibidir.

Toplam hücre dışı proteinlerinin SDS-PAGE analiz sonuçları incelendiğinde, toplam hücre protein profillerinde olduğu gibi bütün suşların oldukça benzer bant profillerine sahip oldukları görüldü. Şekil 3'de de görüleceği gibi; 12, 13, 14 ve 15 numaralı protein bantlarının tüm suşunda ortak dominant bantlar olduğu görülmektedir. Ancak, 11 ile işaretlenen ikili protein bantının yalnızca DT4 ve ATCC 25922 numaralı suşlarda bulunduğu belirlendi. Diğer taraftan, DH7, DT5 ve ATCC 25922 suşları için 17 ile işaretlenen farklı bir protein bantının var olduğu da tespit edildi. Ayrıca; DH3, DH4 ve K2 suşlarının 16 ile işaretlenmiş farklı bir protein bantını içerdiği ve 18 numara ile gösterilen protein bantının ise yalnızca DH3, DH5, DT5, *E. coli* ATCC 25922 numaralı suşlarda bulunduğu görüldü.

Toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz sonuçlarına göre, suşların benzerlik oranı % 71 ve üzerinde 2 farklı ana gruba ayrıldığı belirlendi (Şekil 4). Birinci grup toplam 9 suş içermekte olup kendi içerisinde benzerlik düzeyi % 83 ve üzerinde iki alt gruba ayrıldı. Bu alt gruplardan Grup Ia, benzerlik seviyesi % 100 olan ATCC 11239, ATCC 25922, ATCC 4230, DT6 ve DT4 numaralı 5 suşu içermektedir. Diğer bir alt grup olan Grup Ib ise yine %100 benzerlik seviyesinde toplam 4 suşu (K2, DT5, DH7 ve DH8) bulundurduğu tespit edildi. Grup II benzerlik oranı % 83 ile % 100 arasında değişiklik gösteren toplam 4 suşu (DH1, DH3, DH4 ve DH5) içermektedir.

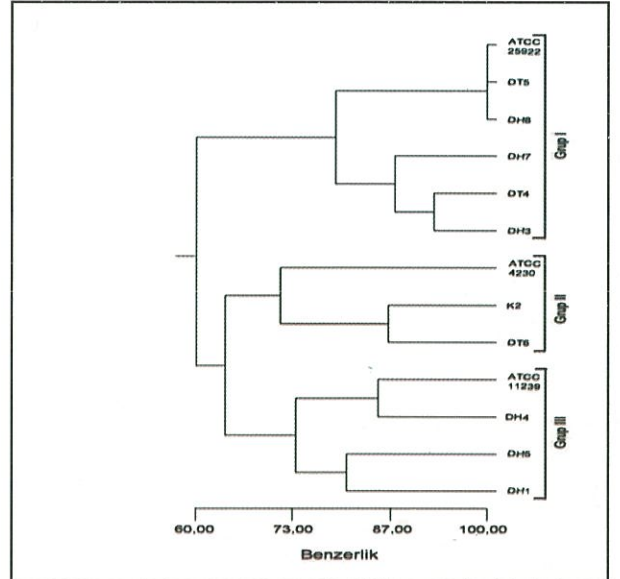


Şekil 4. 13 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri esas alınarak (UPGMA) oluşturulan dendrogram.

Hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz sonuçlarına göre suşların benzerlik oranı % 60 ve üzerinde 3 farklı grubu içerdiği belirlendi (Şekil 5). Birinci grup, 1'i referans (ATCC 25922) ve 5'i yeni izole edilen (DH3, DH7, DH8, DT4 ve DT5) toplam 6 adet test suşunu içermekte ve bu suşların benzerlik düzeyi % 81 ve üzerinde değişmektedir. İkinci grubun benzerlik seviyesi % 70 ve üzerinde toplam 3 suşu (K2, DT6 ve ATCC 4230) içerdiği belirlendi. Diğer taraftan, Grup III ise % 73 ve üzerinde benzerlik oranına sahip toplam 4 (DH1, DH4, DH5 ve ATCC 11239) suşu içermektedir.

Bu çalışmada, incelenen toplam 13 adet izolatın biyokimyasal testler sonuçlarına göre *E. coli* türüne ait oldukları belirlendi. Ancak, test sonuçları izolatların kendi aralarında ayrımı için yeterli olmadığı da görüldü. Diğer taraftan, antibiyogram sonuçları, bütün suşların penisilin türevi antibiyotiklere karşı direnç kazandıklarını ortaya koydu. Elde edilen sonuçlar ülkemiz ve dünya literatüründe bildirilen diğer sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Köksal ve Samastı 2002; Weinstein ve Hayden 1998; Eisestein ve Zaleznik 2000).

Bütün *E. coli* suşların en az bir plazmit içerdiği belirlendi (Şekil 1). Bazı araştırmacılar, mastitis tanısı konmuş hayvanlardan izole edilen *E. coli* izolatlarının ve hayvan kesimhanelerinden izole edilen *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus* ve *Campylobacter* suşlarının ayrımında plazmit profillerine göre yapılan ayrımı faydalı olmadığı, ancak diğer moleküler ve epidemiyolojik tekniklerle beraber uygulandığında faydalı olabileceğini rapor etmektedirler (Uçan ve ark. 2003; Açık ve ark. 2005). Her iki çalışmadan elde edilen bulgular bu araştırmadan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.



Şekil 5. 13 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam ekstraselüler protein profilleri esas alınarak (UPGMA) oluşturulan dendrogram.

Bu araştırmada incelenen 13 adet *E. coli* suşunun toplam hücre ve toplam hücre dışı proteinlerinin elektroforetik desenlerine göre karşılaştırılması yapıldı. Toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE analiz sonuçlarına göre, suşların hepsinin yüksek düzeyde benzer bant profillerine sahip oldukları görüldü. Bu sonuçlara göre toplam hücre protein profillerine göre suşlar arasında bir ayrım yapmanın oldukça güç olduğu belirlendi. Bizim bu

çalışmadan elde ettiğimiz sonuçların daha önce yapılmış bazı çalışmalarla uyumlu olduğu tespit edildi (Berber ve ark. 2003; Uçan ve ark. 2003; Açık ve ark. 2005). Diğer taraftan, toplam hücre dışı proteinlerinin SDS-PAGE sonuçları incelendiğinde, toplam hücre protein profillerinde olduğu gibi bütün suşların oldukça benzer bant profillerine sahip oldukları belirlenmiştir. Bazı bakteri türlerinin tür altı düzeyde ayırımında toplam hücre dışı protein profillerinin daha faydalı olduğu bildirilmektedir (Berber ve ark. 2003). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bu durumu desteklemektedir.

Toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz, benzerlik oranı % 71 ve üzerinde 2 farklı grubun varlığını ortaya koydu. Bütün suşlar arasındaki benzerlik yüzdesinin % 71 ve üzerinde olması incelenen suşların identik olduğunu gösterdi. Gerçekten, toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz sonuçlarının suşlar arasında çok önemli farklılıklar ortaya koyamadığını ve tür altı düzeyde suşlar arasında bir ayırım yapmanın güç olduğunu ortaya koydu. Ayrıca, toplam hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz, benzerlik oranı % 60 ve üzerinde 3 farklı grup ortaya koydu. Bununla birlikte, toplam hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analizin toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analize kıyasla daha ayırıcı olduğunu gösterdi.

## Sonuç

Birçok araştırmacı poliakrilamid jel elektroforeziyle (PAGE) elde edilen yüksek ayırım gücüne sahip protein profillerinin bilgisayar kullanılarak yapılan nümerik analiz değerlendirmelerinin çoğu bakteri cinsine giren tür ve tür altı taksonların ayırımında ve taksonomik ilişkilerinin belirlenmesinde oldukça başarılı sonuçlar verdiğini bildirmektedirler (Berber ve Berber 2006; Costas ve ark. 1993; Zarnowski ve ark. 2001). Bu çalışmada, SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen toplam hücre ve toplam hücre dışı protein profillerinin nümerik analiz sonuçlarının biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlara oranla tür altı seviyede daha faydalı olduğunu, bununla birlikte hücre dışı proteinlerini esas alarak yapılan nümerik analizin toplam hücre proteinlerini esas alan nümerik analize göre daha etkili ve kullanışlı olduğunu da gösterdi. Gerçekten, hastanelerde enfeksiyona neden olan patojenik *E. coli* suşlarının hızlı ve doğru tanısı enfeksiyon ve buna bağlı olarak ortaya çıkacak olan salgınların kontrol altına alınması için çok önemlidir. Sonuç olarak bu çalışma, insan patojeni *E. coli* izolatlarının ayırımında rutin biyokimyasal testlerin yetersiz kaldığı durumlarda bir veya birden fazla moleküler tekniğin birlikte kullanılmasının faydalı olacağını ortaya koydu. Diğer yandan, bu çalışmada yalnızca Van ilinden toplanan az sayıdaki *E. coli* izolatı incelendiği için genel bir değerlendirme yapmak zordur. Bu yüzden bölgedeki farklı illerden toplanarak yapılacak olan daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## Kaynaklar

Açık, L., A. Temiz, A. Çelebi, S. Arslan, R. Yılmaz, 2005. Protein Patterns and Plasmid Profiles of the Bacterial Strains Isolated from a Poultry Slaughterhouse in Ankara, Turkey. Food Technology and Biotechnology. 43: 255–262.

Allison, L., A. Stirrat, F.M. Thomson-Carter, 1998. Genetic Heterogeneity of *Escherichia coli* O157:H7 in Scotland and

its Utility in strain Subtyping. Eur J Microbiol Infect Dis. 17: 844-848.

Bachmann, B.J., 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K–12, edition 8. Microbiol Rev. 54: 130-197.

Berber, I., C. Cokmus, E. Atalan, 2003. Characterization of *Staphylococcus* species by SDS-PAGE of whole-cell and extracellular proteins. Microbiol. 72: 42-47.

Berber, I., S. Berber, 2006. Numerical Analysis of SDS-PAGE Protein Patterns of Facultative Alkaliphilic *Bacillus* Species Isolated from Lake Van, Turkey. Fresenius Environmental Bulletin. 15: 409-416.

Bettalheim, K.A., 1992. The Genus *Escherichia*. In: Balows A, Trüper HG, Drowkin M, Tno, WH, Schleifer KH, eds. The Prokaryotes. Springer-Verlag. 2697–2711s., London.

Bettalheim, K.A., Thompson, C.J. 1987. New Method of Serotyping *Escherichia coli*: implementation and verification. J Clin Microbiol. 25: 781-786.

Clink, J., T.H. Pennington, 1987. Staphylococcal Whole Cell Polypeptide Analysis: Evaluation as a Taxonomic and Typing Tool. J Med Microbiol. 23: 41-44.

Costas, M., B. Holmes, K.A. Frith, C. Riddle, P.M. Hawkey, 1993. Identification and typing of *Proteus penneri* and *Proteus vulgaris* biogroups 2 and 3, from clinical sources, by computerized analysis of electrophoretic protein patterns. J Appl Bacteriol. 75: 489-498.

Coutrier, M., F. Bex, P.L. Berguist, W.K. Maas, 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. Microbiol Rev. 52: 375–395.

Eisestein, B.I., D.F. Zaleznik, 2000. *Enterobacteriaceae*. In: Mandell, GL, Bennet JE, Dolin R, eds. Mandell Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infections Diseases. Churchill Livingstone. 2294s., Philadelphia.

Elliott, J.A., R.R. Facklam, 1993. Identification of *Leuconostoc* spp. by Analysis of Soluble Whole-Cell Protein Patterns. J Clin Microbiol. 31: 1030–1033.

Farmer, J.J., Davis, B.R., Hickman-Brenner, F.W., McWorter, A., Huntley-Carter, G.P., Asbur, M.A., Riddle, C., Wathe-Grady, H.G., Elias, C., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G., O'Hara, C.M., Morris, G.K., Smith, P.B., Brenner, D.J., 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 21: 46-76.

Fournier, M.J., H. Ozeki, 1985. Structure and organization of the transfer ribonucleic acid genes of *Escherichia coli*. Bacteriol Rev. 49: 379-397.

Harbart, S., W. Albrich, D.A. Goldmann, J. Huebner, 2001. Control of multiply resistant cocci: do international comparisons help? The Lancet Infectious Diseases. 1: 251-261.

Ikemura, T., 1981. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. J Mol Biol. 146: 1-21.

Khakhria, R., D. Duck, H. Lior, 1990. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. Epidemiol Infect. 105: 511-520.

Ko, J., Y. Lee, 2006. RNA-conjugated template-switching RT-PCR method for generating an *Escherichia coli* cDNA library for small RNAs. J Microbiol Met. 64: 297-304.

Köksal, F., M., Samastı, 2002. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Enterik Bakterilerin Antibiyotiklere Direnç Durumu. Klinik Derg. 15: 25-28.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227: 680-685.
- Mitscher, L.A., 1999. Multiple Drug Resistance. *Med Res Rev*. 19: 477-496.
- Singer, M., Baker, T.A., Schnitzler, G., Deischel, S.M., Goel, M., Dove, W., Jaaks, K.J., Grossman, A.D., Erickson, J.W., Grossman, C.A., 1989. A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance element for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 53: 1-24.
- Uçan, S.U., L. Açık, A. Çelebi, O. Erganiş, E. Arslan, 2003. Plasmids and Protein Patterns of *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitis in Konya, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*. 29: 475-480.
- Viksvveen, P., 2003. Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can homeopathy be an alternative? *Homeopathy*. 92: 99-107.
- Weinstein, R.A., M.K. Hayden, 1998. Multiply drug-resistant pathogens: epidemiology and control. In: Bennet, J.V., Brachman, P.S., eds. *Hospital Infections*. Lippincott-Raven. 215s., Philadelphia.
- Wessel, D., U.I. Flugge, 1984. A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids. *Analytical Biochemistry*. 138: 141-143.
- Zarnowski, R., J. Eichel, T. Lewicka, H. Rozycki, S.J. Pietr, 2001. Protein fingerprinting as a complementary tool for the classification of *Pseudomonas* bacteria. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 6: 913-923.
- Zhou, C., Y. Yang, A.Y. Jong, 1990. Miniprep in ten minutes. *Biotechnology*. 8: 172-173.