



***mecA* Spesifik DNA Probu Kullanarak Nehir Suyunda MRSA İzlenmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 113Z198

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Araştırmacı:
Prof. Dr. Aysun ERGENE

EKİM 2015
ANKARA



ÖNSÖZ

Bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje kapsamında daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T045 nolu proje kapsamında Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın 12 farklı bölgesinden 2011-2012 yılları arasında üçer aylık periyotlar ile alınan su örneklerinden izole edilen metisilin dirençli bakterilerin tanımlanması, karakterize edilmesi, *mecA* genlerinin varlıklarının gösterilmesi ve *mecA* spesifik DNA problrı hazırlanarak metisilin dirençli bakterilerin daha önce fikse edilmiş su örnekleri üzerinden mevsimsel olarak takip edilerek populasyon yayılımlarının belirlenmesidir. Böylece *mecA* geninin *S. aureus* dışında başka bakterilerde de bulunup bulunmadığı ve *mecA* spesifik prob ile metisilin dirençli bakterilerin yüzey sularında takibinin yapılmasının uygunluğu belirlenmiştir. *mecA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid problr kullanılarak floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi ile metisilin dirençli bakterilerin yüzey sularında takip edilmesine yönelik literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan projenin benzer konudaki çalışmalara da önemli katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

***mecA* Spesifik DNA Probu Kullanarak Nehir Suyunda MRSA İzlenmesi**

ÖZET

Staphylococcus aureus insan vücudu üzerinde sıklıkla asemptomatik olarak taşınan fırsatçı bir patojendir. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) sonradan edindikleri gen sayesinde metisilin ve genel olarak diğer tüm β -laktam antibiyotiklere karşı dirençlidir. MRSA dünyadayaygın bir patojen olup, diğer *S. aureus* enfeksiyonları ile karşılaştırıldığında MRSA enfeksiyonlarının daha yüksek oranda morbidite ve mortalite gösterdiği görülmektedir. Antibiyotikler ve diğer ilaçların doğal sularda ve yüzey sularında bulunması, nehirler gibi klinik olmayan ortamlarda yüksek direnç gösteren bakterilerin oluşmasına neden olmaktadır. Bunların içinden insanlar ve hayvanlar tarafından taşınan metisiline dirençli stafilocoklar ve β -laktam antibiyotiklere direnç sağlayan *mecA* geni taşıyan bakteriler özellikle dikkat çekmektedir. Metisiline dirençli stafilocokların yayılımlarındaki sürekli artışa rağmen, *mecA* genini taşıyan stafilocok ve diğer potansiyel patojen bakterileri rezervuar olarak barındıran doğal çevre hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Metisilin dirençli *S. aureus* penisilin bağlayıcı protein PBP2a içermesi ile oluşan hedef bölgelerin değiştirilmesi nedeniyle β -laktamlara karşı olan afinitesi azalmaktadır. Bu proteini kodlayan *mecA* geni mobil SCC*mec* olarak adlandırılan kromozom kaseti üzerinde yer almaktadır. Literatürde daha önce tarif edilmiş olan tüm SCC*mec* kasetindeki *mec* kompleks genleri (*mecA*, *mecI*, ve *mecR1*) genelde aynıdır. Bu genler β -laktam antibiyotiklere direnci sağlamaktadır. Ancak, tüm *mecA* klonları metisiline dirençli değildir ve MRSA popülasyonundaki tüm direnç seviyeleri, çeşitli kromozomal faktörler tarafından module edilen PBP2a üretimindeki verimliliğe bağlıdır. Bu durum, MRSA direnç seviyelerinin fenotipik duyarlı ile yüksek dirençli arasında değişkenlik göstermesinin nedenini açıklamaktadır. Bu kaygılara dayanarak, bu projede şehirselle ve fekal kirlilikten etkilenen yüzey sularında *mecA* taşıyan bakterilerin izole edilmesi, tanımlanması, karakterizasyonu ve *mecA* spesifik DNA problemleri kullanarak mevsimsel olarak takip edilmesi planlanmıştır. Daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T045 nolu proje kapsamında Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın 12 farklı bölgesinden alınmış olan su örneklerinden metisilin dirençli bakteriler izole edilmiştir. Bu proje kapsamında ise, 111T045 nolu proje kapsamında izole edilen ve daha önceden stok kültürleri hazırlanmış olan bu bakterilerin tanımlanması, karakterize edilmesi, *mecA* genlerinin varlıklarının gösterilmesi planlanmış ve *mecA* spesifik DNA problemleri hazırlanarak 2011-2012 yılları süresince üçer aylık periyotlarla alınmış ve fikse edilmiş su örneklerinde *mecA* içeren bakterilerin mevsimsel olarak takip edilmesi planlanmıştır. Metisilin dirençli suşların tanımlanması 16S rRNA dizi



analizi ve yağ asidi analizi ile yapılmıştır. Fikse edilmiş su örneklerindeki *mecA* geni taşıyan suşların populasyonlarındaki mevsimsel değişiklikler ise *mecA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid prob lar kullanılarak floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi ve görüntü analizi mikroskopu ile takip edilmiştir. Böylece *mecA* geninin *S. aureus* dışında başka bakterilerde de bulunup bulunmadığı ve *mecA* spesifik prob ile metisilin dirençli bakterilerin yüzey sularında takibinin yapılmasının uygunluğu belirlenmiştir. *mecA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid prob lar kullanılarak floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi ile metisilin dirençli bakterilerin yüzey sularında takip edilmesine yönelik literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan projenin benzer konudaki çalışmalara da önemli katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, metisilin dirençli bakteri, MRSA, *mecA*, PBP2a, floresan *in situ* hybridization



Monitoring MRSA in the river water by using *mecA* specific DNA probe

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen often carried asymptotically on the human body. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) includes those strains that have acquired a gene giving them resistance to methicillin and essentially all other β -lactam antibiotics. MRSA is a major pathogen worldwide; MRSA infections are associated with increased morbidity and mortality, in comparison with other *S. aureus* infections. The presence of antibiotics and other pharmaceuticals in natural waters and over land runoff has selected for highly resistant bacteria in non-clinical settings like rivers. Of particular interest are methicillin-resistant staphylococci shed by humans and animals, as well as the gene conferring their resistance to β -lactam antibiotics, *mecA*. Despite continual increases in the community prevalence of methicillin-resistant staphylococci, there is little understanding of the role of the natural environment as a reservoir of staphylococci and other potentially pathogenic bacteria that harbour *mecA*. Methicillin resistance in *S. aureus* involves an altered target site due to an acquired penicillin-binding protein (PBP2a) with decreased affinity to β -lactams. The *mecA* gene encodes this protein and is located on a mobile SCC*mec* cassette chromosome. In all SCC*mec* elements that have been described previously in the literature, the *mec* complex genes (*mecA*, *mecI*, and *mecR1*) are almost identical. This genetic element confers resistance to most currently available β -lactam antibiotics. However, not all *mecA* clones are resistant to methicillin, and over all resistance levels in a population of MRSA depend on efficient production of PBP2a, which is modulated by a variety of chromosomal factors. This explains why MRSA resistance levels range from phenotypically susceptible to highly resistant. Despite continual increases in the community prevalence of methicillin-resistant staphylococci, there is little understanding of the role of the natural environment as a reservoir of staphylococci and other potentially pathogenic bacteria that harbor *mecA*. Based on these concerns, we will investigate the occurrence of *mecA* harboring bacteria in surface waters impacted by suburban runoff and fecal pollution by using *mecA* specific DNA probes. Methicillin-resistant bacteria have been already isolated through the project 111T045 in which samples collected periodically from 12 different stations along the river Kızılırmak in the city of Kırıkkale in between 2011 and 2012. In this study, we will identify the previously cultured bacteria and show the presence of *mecA* gene. Methicillin-resistant consortium were identified by using fatty acid methyl ester analysis and 16S rRNA sequencing. The population dynamics of the *mecA* harboring community during



the period of one year (in between 2011-2012) were studied by using *in situ* hybridization with *mecA* targeted fluorescently labelled oligonucleotide probes and image-analyzed microscopy. There is, to our knowledge, no study dealing with *mecA* specific probes to monitor methicillin-resistant consortium in surface waters in the published scientific literature. This study will open up the possibility of using *mecA* specific probes to monitor methicillin-resistant consortium in surface waters as well as determining *mecA* harboring bacteria other than *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant bacteria, MRSA, *mecA*, PBP2a, fluorescein *in situ* hybridization



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1 Stafilokoklar	5
2.2 Antibiyotik Direnci	6
2.3 Safilokoklarda Metisilin Direnci, Staphylococcal Cassette Chromosome	6
2.4 Metisilin Direnci	8
3. GEREÇ ve YÖNTEM	13
3.1 Metisilin Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal Testleri	13
3.2 Antibiyotik Duyarlık Testleri	13
3.3 Bakteriyel Kültürden Genomik DNA İzolasyonu	13
3.4 <i>mecA</i> Geninin Varlığının PZR ile Tesbiti	14
3.5 Bakterilerde PBP2a Proteini Analizi	14
3.5.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	15
3.5.2 Ayırma Jelinin Hazırlanması	15
3.5.3 Dengeleyici Jelin Hazırlanması	15
3.6 Western Blot Analizi ile PBP2a'nın Belirlenmesi	16
3.7 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyon	16
3.8 Yağ Asiti Metil Esteri Analizi (FAME) ile İdentifikasyon	17
3.9 Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH)	18
3.9.1 Floresan Görüntüleme	20
3.9.2 İstatistiksel Analizler	20
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	21
4.1 Metisilin Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal Testleri	21
4.2 Antibiyotik Duyarlık Testleri	22
4.3 Bakteriyel Kültürden Genomik DNA İzolasyonu	22
4.4 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyon	24
4.6 Bakterilerde PBP2a Proteini Analizi	34
4.7 Western Blot Analizi ile PBP2a'nın Belirlenmesi	36
4.8 Yağ Asiti Metil Esteri Analizi (FAME) ile İdentifikasyon	37
4.8.1 Al11 Kodlu Suşun FAME Analizi;	37
4.8.2 Ba01 Kodlu Suşun FAME Analizi	38
4.8.3 Li12 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	39
4.8.4 Co11 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	40
4.8.5 SDS3 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	41
4.8.6 SDS4 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	42
4.8.7 SDS6 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	43
4.8.8 SDS7 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	44
4.8.9 SDS8 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	45
4.8.10 SDS10 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	46
4.8.11 SDS10-2 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	47
4.8.12 SDS10-3 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	49
4.8.13 SDS11 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi	50
4.9 Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH)	51
4.9.1 <i>mecA</i> Proplarının Optimum Hibridizasyon Koşullarının Belirlenmesi	51
4.9.2 <i>mecA</i> Geni Taşıyan Bakterilerin Mevsimsel Populasyon Yayılımı	57
5. SONUÇ	60
6. REFERANSLAR	61



TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. FISH için kullanılan oligonükleotid problemler	19
Tablo 4.1. Metisilin dirençli suşların biyokimyasal ve morfolojik özellikleri	21
Tablo 4.2. Yüzey sularından izole edilen metisilin dirençli stafilokok ve stafilokok olmayan suşlar	25
Tablo 4.3. AI11 kodlu izolata ait yağ asidi profilleri	38
Tablo 4.4. Ba01 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	39
Tablo 4.5. Li12 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	40
Tablo 4.6. Co11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	41
Tablo 4.7. SDS3 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	42
Tablo 4.8. SDS4 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	43
Tablo 4.9. SDS6 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	44
Tablo 4.10. SDS7 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	45
Tablo 4.11. SDS8 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	46
Tablo 4.12. SDS10 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	47
Tablo 4.13. SDS10-2 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	48
Tablo 4.14. SDS10-3 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	49
Tablo 4.15. SDS11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	50
Tablo 4.16. <i>mecA</i> pozitif ve negatif kontrol suşları ile <i>mecA</i> problemlerinin hibridizasyon koşulları	51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Antibiyotik direnç mekanizması.....	7
Şekil 2.2. β -laktam antibiyotikler varlığında mecR1-mecI-mecR2 tarafından mecA geninin indüklenme mekanizması.....	10
Şekil 2.3. FISH prosedure	12
Şekil 4.1a. Metisilin dirençli suşların genomik DNA analizi	23
Şekil 4.1b. Metisilin dirençli suşların genomik DNA analizi	23
Şekil 4.2. Metisilin dirençli suşların 16S rRNA PZR ürünleri	24
Şekil 4.3. Al11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	26
Şekil 4.4. Ba01 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	26
Şekil 4.5. Co11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	27
Şekil 4.6. Li12 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	27
Şekil 4.7. SDS6 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	28
Şekil 4.8. SDS10-2 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	28
Şekil 4.9. SDS10-3 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram.....	29
Şekil 4.10. SDS8 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	29
Şekil 4.11. SDS4 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	30
Şekil 4.12. SDS7 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	30
Şekil 4.13. SDS10 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	31
Şekil 4.14. SDS11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram	31
Şekil 4.15a. <i>mecA</i> geni taşıyan stafilocok izolatları	33
Şekil 4.15b. <i>mecA</i> geni taşıyan stafilocok olmayan izolatlar	33
Şekil 4.16a. SDS-PAGE PBP2a protein analizi (a) stafilocok izolatları.	34
Şekil 4.16b. SDS-PAGE PBP2a protein analizi (b) stafilocok olmayan izolatlar.....	35
Şekil 4.16c. SDS-PAGE PBP2a protein analizi (c) stafilocok olmayan izolatlar.	35
Şekil 4.17a. Stafilocok izolatlarında Western Blot PBP2a protein analizi.	36
Şekil 4.17b. SDS-PAGE PBP2a protein analizi (b) stafilocok olmayan izolatlar.....	37
Şekil 4.18. Al11 kodlu suşa ait GC kromotogramı	38
Şekil 4.19. Ba01 kodlu suşa ait GC kromotogramı	39
Şekil 4.20. Li12 kodlu suşa ait GC kromotogramı.....	40
Şekil 4.21. Co11 suşuna ait GC kromotogramı.....	41
Şekil 4.22. SDS3 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	42
Şekil 4.23. SDS4 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	43
Şekil 4.24. SDS6 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri	44
Şekil 4.25. SDS7 kodlu suşa ait GC kromotogramı	45
Şekil 4.26. SDS8 kodlu suşa ait GC kromotogramı	46
Şekil 4.27. SDS10 kodlu suşa ait GC kromotogramı	47
Şekil 4.28. SDS10-2 kodlu suşa ait GC kromotogramı	48
Şekil 4.29. SDS10-3 kodlu suşa ait GC kromotogramı	49
Şekil 4.30. SDS11 kodlu suşa ait GC kromotogramı	50
Şekil 4.31. <i>mecA</i> pozitif <i>S. aureus</i> ATCC33591 suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a ₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b ₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c ₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu	52
Şekil 4.32. <i>mecA</i> pozitif <i>S. aureus</i> ATCC33591 suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a ₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b ₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c ₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu.	53
Şekil 4.33. <i>mecA</i> pozitif <i>S. aureus</i> ATCC33591 suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a ₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b ₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c ₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu	54
Şekil 4.34. <i>mecA</i> negatif <i>S. aureus</i> ATCC25922 suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a ₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b ₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c ₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu.	55

Şekil 4.35. <i>mecA</i> negatif <i>E. coli</i> DH5 α suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a ₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b ₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c ₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu	56
Şekil 4.36. Ocak (a-a ₁), Nisan (b-b ₁), Temmuz (c-c ₁), Ekim (d-d ₁) 2011 dönemlerinde alınan su örneklerinde % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c ₁) konsantrasyonlarında gerçekleşen hibridizasyon.	57
Şekil 4.37. Ocak (a-a ₁), Nisan (b-b ₁), Temmuz (c-c ₁), Ekim (d-d ₁) 2012 dönemlerinde alınan su örneklerinde % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c ₁) konsantrasyonlarında gerçekleşen hibridizasyon.	58
Şekil 4.38. 2011-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde <i>mecA</i> geni taşıyan bakterilerin mevsimsel populasyon yayılımı	59



1. GİRİŞ

Günümüzde enfeksiyon hastalıklarının en etkili tedavi yöntemi olan antibiyotik kullanımının, dikkatli bir şekilde uygulanması gerekmektedir. Bu işlem normal bakteri florası korunarak yapılmalıdır. Aksi durumlarda ise, bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazandıkları gözlenmiştir. Çünkü yanlış antibiyotik kullanımı normal bakteri florasını yok etmekte ve bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmalarını sağlamaktadır (Bayar vd., 2008). İnsanlar için en önemli fırsatçı patojenlerin başında stafilokoklar gelmektedir. İnsanlarda gıda zehirlenmelerinden sepsise kadar çok değişik hastalıklara yol açtıkları bilinmektedir (Yugueros vd., 2000). Stafilokoklar, doğada çok yaygın olarak bulunan Gram pozitif bakterilerdir. Başlıca kaynakları insandır. Fizyolojik olmayan çevre koşullarına uzun sürelerle dayanabilir, yüksek tuz ve lipid içeren ortamlarda üreyebilirler (Howard ve Hale,1976). Isıya direnç gösterirler ve 60°C'de 30 dakika ısıtılmakla inaktive olmazlar (Arda vd., 1992). Stafilokoklarda esas sorun, son yıllarda giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir. Bu bakterilerde metisilin direnci ilk kez antibiyotiğin klinik kullanıma girmesinden çok kısa bir süre sonra, 1961 yılında İngiltere'den *Staphylococcus aureus* suşunda bildirilmiştir. 1970'lerde Avrupa ülkelerinde 1980'lerde de Amerika Birleşik Devletlerinde yayılmıştır. Günümüzde metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, prevalansı ülkeler arasında oldukça farklılık göstermektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde MRSA prevalansı <%1 iken, Güney Avrupa ülkelerinde, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve bazı Asya ülkelerinde bu oran % 50'leri aşmış durumdadır (Appelbaum, 2007; Shorr, 2007). Günümüzde, sadece hastane kaynaklı MRSA infeksiyonlarının değil, aynı zamanda toplum kaynaklı MRSA infeksiyonlarının görülme sıklığında da önemli bir artış görülmektedir (Appelbaum, 2007). Bunların moleküler epidemiyolojisi hastane kaynaklı MRSA'lardan oldukça farklıdır. Hastane kaynaklı-MRSA'lar, genellikle tip 1, 2 veya 3 "stafilokokkal kaset kromozom (SCC*mec*)" genetik elemanını bulundururlar. Bu gen bölgesi bakterinin tüm β -laktam yapısındaki antibiyotiklere ve hatta klindamisin, gentamisin ve florokinolon gibi diğer ilaçlara karşı da direnç göstermesini sağlamaktadır. Toplum kaynaklı MRSA izolatlarında ise sıklıkla tip 4 SCC*mec* genetik elemanı ve bakterinin virülansında rol oynayan bir toksini kodlayan "Panton-Valentine leukocidin (PVL)" geni bulunmaktadır (Shorr, 2007; Appelbaum, 2006). Ülkemizde değişik hastanelerde yapılan çalışmalarda *S. aureus*'un metisiline direnci % 16-52 arasında tespit edilmiştir. Metisiline dirençli *S. aureus*'ların (MRSA) tüm β -laktam antibiyotiklere dirençli oldukları kabul edilmektedir (Köksa, 1992). β -laktamaz enzimiyle hidrolize olmayan β -laktam antibiyotiklere (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) karşı olan direnç metisilin direnci olarak adlandırılır (Chambers, 1988; 1997). Metisilin direnci, aynı zamanda intrinsek direnç olarak da tanımlanmaktadır. Böylece direncin, antibiyotiği inaktive eden β -

laktamaz enzimiyle değil, kromozomal yolla olduğu anlaşılır (Maranan vd., 1997; Mulligan, vd., 1993). *S. aureus* suşlarında tedaviden sonra aynı suşların hastalardan tekrar elde edildiği gözlenmiştir. MRSA suşları morbidite ve mortalitesi yüksek infeksiyonlara yol açmaları ve bu infeksiyonlarda tedavi seçeneklerinin de sınırlı olması nedenleri ile önemlidirler (Köksa, 1992).

S. aureus, klinik kullanımda olan antibiyotiklerin çoğuna direnç geliştirme yeteneğinde olup tüm dünyada çeşitli antibiyotiklere karşı değişik direnç oranları rapor edilmiştir (İbrahim vd., 2009). Direnç gelişiminde pek çok mekanizma rol oynamaktadır. Bir çok patojenik faktör; plazmidler, bakteriyofajlar, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genlerin üzerinde konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon gibi mekanizmalar ile aktarılmaktadır. Horizontal gen transferi ile kazanılan hareketli gen gruplarından biri olan *SCC_{mec}*, MRSA kromozomuna entegre DNA yapılarıdır (Lindsay ve Holden, 2004; Trindade vd., 2005). *SCC_{mec}*, MRSA'lar tarafından taşınmakta ve metisilin direncinden sorumlu *mecA* gen dizisini içermektedir. Ayrıca *mecA* geninden başka, diğer antibiyotiklere dirençten sorumlu genler, insersiyon gen dizileri ve fonksiyonları henüz tanımlanmamış genler yer almaktadır. *SCC_{mec}* bölgesi virulans genlerini, bakteriyofajlarla ilgili genleri ve konjugatif gen dizisini (*tra*) içermez. Metisiline duyarlı *S. aureus* suşları *SCC_{mec}* içermemektedirler. *mec* geni içermeyen *SCC*'ler de vardır ve stafilokok türlerinde gen aktarımı için oldukça uygundur. *mecA* içermeyen *SCC*'ler daha çok mikroorganizmanın stres durumlarında hayatta kalmasına yardımcı olan genleri taşımaktadırlar (Katayama vd., 2003a; 2003b).

Stafilokoklardaki metisilin direnci; kromozomal (intrinsik) direnç, aşırı miktarda β -laktamaz salgılanması, penisilin bağlayan proteinlerdeki (PBP) yapısal değişiklikler ile gerçekleşmektedir. Metisilin direncinde en çok kromozomal direnç mekanizmasıyla karşılaşmaktadır. Metisilin direncinden sorumlu *mecA* genini taşıyan plazmid ve transpozonların bulunduğu gen kaseti, bakteri kromozomuna entegre olmaktadır. *mecA* geni MRSA suşlarında 78 kDa ağırlığında olan penisilin bağlayan bir protein olan PBP2a'nın sentezlenmesinden sorumludur (Berger-Bachi ve Rohrer, 2002). PBP2a'nın β -laktam antibiyotiklere afinitesi düşüktür. Bu nedenle metisilin dirençli bir stafilokok β -laktam antibiyotiklerle karşılaştığında, PBP2a düşük afinite nedeni ile β -laktam antibiyotiği bağlayamaz, hücre duvar sentez fonksiyonunu sürdürür (Dowson vd., 1994). Stafilokoklarda PBP2a sentezinin düzenlenmesinde *mecR1* ve *mecI* adı verilen iki düzenleyici gen önemli rol oynar. Bu genler *mecA* gen transkripsiyonunu düzenlemektedirler. *mecR1* membrana bağlı bir sinyal taşıyıcı protein olan *mecR1*'i kodlarken *mecI* transkripsiyonel düzenleyici bir protein olan *mecI*'yi kodlamaktadır (Timothy ve Weller, 1999).

mecA genini taşıyan plazmid ve transpozonlar, β -laktam antibiyotiklerden başka, kinolonlar, makrolidler, kloramfenikol, klindamisin, tetrasiklinler, aminoglikozidler, sülfametoksazol/trimetoprim, rifampin direncinden sorumlu genleri de taşımaktadırlar. Direnç genlerinin, transpozonlar ve plazmidler aracılığı ile kolay ve etkin bir şekilde aktarımı ve SCC*mec* gibi iyi organize olmuş özel yapılar, MRSA suşlarının 1970'li yıllardan beri gittikçe artan antibiyotik direnci ile önemli patojenler haline gelmesine neden olmuştur. Buna bağlı olarak ciddi MRSA infeksiyonları ve hastane salgınları sık rapor edilir olmuştur (Chambers, 1997; Proctor vd., 1995). Bayar vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada boğaz kültürlerinden izole edilen 27 adet *S. aureus* suşunun identifikasyon testleri yapılmış ve tanımlanan bu suşların novobiyosin, amikasin, penisilin G, amoksisilin, siprofloksasin, oksasilin, metisilin, tetrasiklin, sefalotin, nitrofontotin, eritromisin, sefoksitin ve amfisilin antibiyotiklerine karşı duyarlılık testleri yapılmıştır. *S. aureus* olarak tanımlanan suşların siprofloksasine ve eritromisine %100 duyarlı, amikasine %95 ve metisiline %90 duyarlı, penisilin G, oksasilin, basitrasine ise %100 dirençli, klindamisine %95, nitrofontotine %80 ve amfisiline %70 dirençli olduğu belirlenmiştir. Bir başka çalışmada MRSA olarak tiplendirilen 30 suş çalışmaya alınmış ve disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıkları tespit edilmiştir. Suşların 1 tanesinde kinupristin-dalfopristin direnci, 15 suşta tetrasiklin direnci, 3 tanesinde amikasin direnci ile 10 tanesinde rifampin direnci saptanmıştır. Metisilin dirençli bulunan 30 suşta nitrosefin diskiyle 23 suşta β -laktamaz varlığı tespit edilmiş 30 MRSA izolatının 10 tanesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle *mecA* geni taşıdıkları belirlenmiştir (Özel, 2011). Wu vd. (1996) 150 bağımsız *S. sciuri* suşlarından izole edilen DNA'ların, *mecA* probu ile hibridize olduğunu göstermiştir. DNA analizleri, sekansın metisilin dirençli *S. aureus* ve *S. epidermidis*'deki *mecA* ile %88 benzerlik olduğunu göstermiştir.

Stafilokokların, kuşların fekal materyallerinde, insanlarda nazal boşluklarda ve vücut yüzeyinde ve ev hayvanlarında kolonize olduğu, ayrıca tatlı-tuzlu suları, sahil kumlarını ve atık suları da kontamine ettiği bilinmektedir (Vengust vd., 2006; Lévesque vd., 2000). Bu tip klinik olamayan ortamlarda, doğal sularda MRSA varlığını göstermesine rağmen, bazı epidemik MRSA suşları ırmak sularında ve tuzlu sularda 14 güne kadar hayatta kalabilmektedir. Bu da sucul ortamların bakımı ve bu patojenlerin yayılımı hakkında endişe yaratmaktadır (Tolba vd., 2008). *Enterococcus hirae*'de *mecA* homologuna rastlanması *mecA* geninin sadece stafilokok ile sınırlı olmadığını, stafilokok dışındaki türlerde de olabileceğini düşündürmektedir. *mecA*'nın çevrede stafilokoklar dışındaki türler arasındaki yayılımı hakkında yeterince bilgi bulunmamaktadır (Hanssen ve Ericson, 2006). Kassem vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada, Ohio yakınlarındaki doğal su habitatında antibiyotik dirençli bakterilerde *mecA* geni varlığını belirlemek için su örnekleri 13 farklı bölgeden izole alınıp oksasilin içeren besiyerine ekilerek toplamda 65 izole edilmiş ve bu izolatlarda PZR

kullanılarak *mecA* varlığına bakılmıştır. 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanmış olan bakterilerin antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir. *mecA* geni, izolatlar arasında üç patojenik tür olan *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* ve *Enterococcus faecalis* bakterilerinin de yer aldığı görülmüştür. Bu izolatların siprofloksasin ve trimethoprime dirençli değilken, oksasilin, amfisilin, amoksisilin, vankomisin, eritromisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli oldukları belirlenmiştir. İlk defa çoklu antibiyotik dirençli stafilokok türleri dışında üç patojende *mecA* geni tespit edilmiştir. Bu türlerdeki *mecA* varlığı sucul ortamlardan izole edilen bakteriler arasında potansiyel bir *mecA* gen alışverişinin olduğunu düşündürmektedir (Kassem vd., 2008). *mecA* taşıyan SCC'nin stafilokok türleri arasında yaygın bir şekilde lateral gen transferiyle aktarılabilmesi bilinmektedir. SCC*mec*'in türler arasındaki gen transferi, antibiyotik baskısı ve metisilin dirençli stafilokok yayılımının artması gibi nadir durumlarda gerçekleşebilir. Ayrıca farklı bakteri türleri arasında SCC*mec* transferi potansiyelinde ipuçlarını vermiştir. Türler arasındaki SCC*mec* transferi kısmen nadirdir, ancak PBP kodlayan segmentler *Haemophilus*, *Neisseria* ve *Streptococcus*'u içeren dirençli bakteriler ile sonradan kazanılabilir, β -laktam antibiyotiklere direnç artabilir ve artan dirençle beraber çevredeki patojen rezervuarının da önemi artar. Daha da önemlisi enfekte olmuş insanlar bunun yayılımını kolaylaştırmaktadır (Dowson vd., 1994).

Bu projede şehirselle ve fekal kirlilikten etkilenen yüzey sularında *mecA* geni taşıyan bakterilerin izole edilmesi, tanımlanması, karakterizasyonu ve *mecA* spesifik DNA problemleri kullanarak mevsimsel olarak takip edilmesi planlanmıştır. Daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T045 nolu proje kapsamında Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın 12 farklı bölgesinden 2011-2012 yılları arasında üçer aylık periyotlar ile alınan su örneklerinden metisilin dirençli bakteriler izole edilmiş ve kültüre alınmıştır. Bu proje kapsamında ise, izole edilen bu bakterilerin tanımlanması, karakterize edilmesi, *mecA* genlerinin varlıklarının gösterilmesi ve *mecA* spesifik DNA problemleri hazırlanarak daha önceden fikse edilmiş su örnekleri üzerinden mevsimsel olarak takip edilmesi planlanmıştır. *mecA* taşıyan suşlar 16S rRNA dizi analizi ve yağ asidi analizi kullanılarak tanımlanmıştır. *mecA* geni taşıyan suşların popülasyonlarındaki mevsimsel değişiklikler ise *mecA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid problemleri kullanılarak floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi ve görüntü analizi mikroskopu ile takip edilmiştir. Böylece yüzey sularında *mecA* geninin *S. aureus* dışında başka bakterilerde de bulunup bulunmadığı ve *mecA* spesifik prob ile metisilin dirençli bakterilerin yüzey sularında takibinin yapılmasının uygunluğu belirlenmiştir. Yaptığımız araştırma sonucu *mecA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid problemleri kullanılarak floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi ile metisilin dirençli bakterilerin yüzey sularında takip edilmesine yönelik literatürde herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bu bakımdan bu projenin söz konusu alanda bulunan bir boşluğun giderilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Stafilokoklar

Stafilokoklar 100 yılı aşkın bir süredir infeksiyon etkeni olarak tıp dünyasında söz konusu olan bir mikroorganizmadır. Stafilokokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış ve 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiştir. Ardından, 1884'te Rosenbach hasta örneklerinden bu mikroorganizmaları izole etmiş ve beyaz renkli kolonileri "*Staphylococcus albus*", sarı-portakal rengi kolonileri ise "*Staphylococcus aureus*" olarak isimlendirilmiştir. Bakterinin Kraus ve Clairmont tarafından 1900'da alfa toksini, Glenny ve Stevens tarafından 1935'te beta toksini bulunmuştur. Smith ve Price 1938'de gama toksin ve Williams ile Harper 1947'de delta toksin varlığını açıklamışlardır. Todd ve arkadaşları tarafından 1978'de yeni bir hastalık olarak "Toksik Şok Sendromu" tanımlanmıştır (Akçam vd., 2007). Fleming'in 1928 yılında penisilini bulmasına kadar stafilokoklar ağır seyirli ve hatta ölümlü sonuçlanabilen tedavisi sorunlu infeksiyonlara sebep oluyordu. Stafilokok tedavisinde ilk adım, 1940 yılında Oxford'da Florey, Chain ve arkadaşları tarafından penicillium kültürlerinden penisilin saflaştırılmasıyla atılmıştır. Fakat penisilin klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra penisiline dirençli stafilokoklar görülmeye başlanmıştır (Kayaalp, 2005). İlk kez 1944 yılında Kirby tarafından penisilinaz üreten stafilokoklar tespit edilmiştir. Penisilinaz üreterek penisiline direnç kazanmış *S. aureus* suşları 1950'li yılların sorunlu bakterileri olmuşlardır. Penisilinaza dirençli penisilinlerin 1960'da kullanıma girmesinden iki yıl sonra görülen metisilin direnci, antimikrobialleri tedavi seçeneklerini önemli ölçüde sınırlandırmıştır. *S. aureus* 1980'li yıllardan sonra tüm dünyada hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir artış göstererek adeta yeniden doğmuştur. Tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli MRSA suşları beta-laktam dışı antibiyotiklerin çoğuna da dirençli olduklarından, bu suşlarla oluşan ağır infeksiyonların tedavisinde glikopeptit 4 antibiyotikler tek seçenek haline gelmiştir (Dündar, 2000). İlk kez 1995 yılında Fransa'da vankomisine azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus* (VISA), 1996'da Japonya'da heteroVISA ve sonunda 2002 yılında A.B.D'de vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA) suşlarının saptanması ile stafilokoklarda çoğul antimikrobiyal direnç sorunu daha da ciddi hale gelmiştir (Derbentli, 2005; CDC, 2002). Stafilokoklar Tanım *Staphylococcus* cinsi "*Micrococcus*", "*Stomatococcus*" ve "*Planococcus*" cinsleriyle birlikte "*Micrococaceae*" ailesi içinde yer alır. Yunancada bir salkım üzüm anlamına gelen staphyle (üzüm salkımı) ve coccus (tane) sözcüklerinden türetilmiştir. Bu yüzden *Stapylococcus*, bu gram pozitif kokların üzüm tanelerinin kümelenmesine benzer şekildeki üremesini ifade etmek için kullanılır. Fakat klinik materyallerde bu mikroorganizma tek, çift veya kısa zincirler halinde de görülebilir (Akçam vd., 2007; Muray vd., 2005).

Stafilokoklar dış çevre koşullarına dayanıklı bakterilerdir. Kurumuş klinik materyallerden aylar sonra bile izole edilebilir (Akçam vd., 2007).

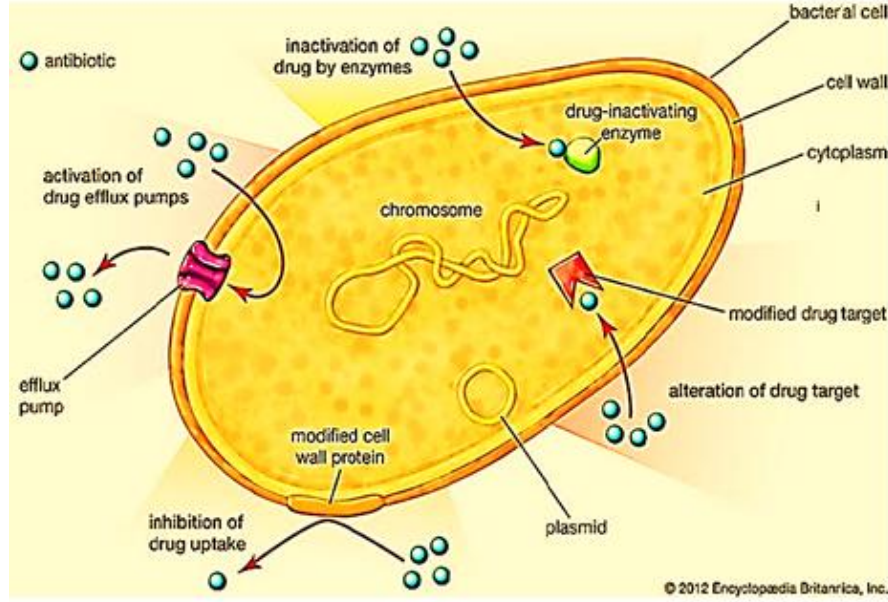
2.2 Antibiyotik Direnci

Stafilokoklara bağlı infeksiyon hastalıkları yüzyıllardır insanlığın önemli sağlık sorunlarından biri olmuştur. Penisilin kullanıma girmesi umut olmakla birlikte kısa süre sonra gelişen penisilin direnci bu umutları boşa çıkarmıştır. Daha sonra geliştirilen metisilin de kullanıma girmesinden sadece bir yıl sonra bu antibiyotiğe dirençli ilk suş tanımlanmıştır. Sonraki 10 yıl içinde klinik olarak çok dikkat çekmeyen sporadik vakalar halinde görülen MRSA suşları, 1970 yıllarından sonra tüm dünyada yaygın olarak görülmeye başlamış, birçok hastanede endemik hale gelerek ciddi bir sağlık sorunu olmuştur. Özellikle hastane kaynaklı infeksiyonların önde gelen sebeplerinden biri olan MRSA, hayatı tehdit eden ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır. Çoklu antibiyotik direncine sahip bu suşlar hastanede kalış süresinin uzamasına neden olmakta ve sağlık sistemine ciddi bir mali yük getirmektedir. Sağlık kuruluşlarından başka son zamanlarda toplumda da çeşitli infeksiyonlardan MRSA suşları izole edilmeye başlanmıştır. Toplum kaynaklı MRSA suşları nekrotizan pnömoni gibi ciddi infeksiyonlara neden olabilseler de, şimdilik sıklıkla deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilmektedirler (Köksal, 2007; Boyle-Vavra vd., 2005). *S. aureus*, klinik kullanımda olan antibiyotiklerin çoğuna direnç geliştirme yeteneğinde olup tüm dünyada çeşitli antibiyotiklere karşı değişik direnç oranları rapor edilmiştir. Direnç gelişiminde pek çok mekanizma rol oynamaktadır. Bunlardan en önemlileri patojenite adaları ve hareketli gen kaset gruplarıdır (Stafilokokkal kaset kromozom (SCC) *mec* Gen Grubu). Antibiyotik direnci ve virulans mekanizmalarının moleküler temellerinin anlaşılabilmesi için, bu genetik yapıların organizasyon ve fonksiyonlarının bilinmesi gerekmektedir (Ito vd., 2008).

2.3 Safilokoklarda Metisilin Direnci, Staphylococcal Cassette Chromosome

Stafilokokkal kaset kromozom (SCC) adı verilen genetik yapının üzerinde bulunan *mecA* (SSC*mec*) geni tarafından düşük afiniteli bir penisilin bağlayan protein (PBP) olan PBP2a'nın sentezlenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Ito vd., 2014). SCC*mec*, MRSA kromozomuna entegre olmuş bir grup hareketli DNA yapılarıdır (Lindsay ve Holden, 2004; Trindade vd., 2005). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda MRSA neslinin tüm karakteristiklerinin belirlenebilmesi için, bakterinin genetik yapısının yanında, *mecA*, SCC gibi genetik yapıların yapısının da aydınlatılması gerektiği ortaya koyulmuştur (Wannet vd., 2005; Oliveira vd., 2002).

Birçok patojenik faktör plazmidler, bakteriyofajlar, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genlerin üzerinde konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon gibi mekanizmalar ile aktarılmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Antibiyotik direnç mekanizması (Morier, 2013)

DNA dizi analizi çalışmaları ile bilinen bu hareketli gen gruplarına ek olarak "Patojenite Adaları (PA)" adı verilen ve bakteri kromozomu üzerinde belirli bölgelerde bir araya gelmiş gen gruplarının varlığı gösterilmiştir. Patojenite Adaları insan, hayvan ve bitki patojeni birçok bakteride gösterilmiş ve virulansa katkıları ispatlanmıştır. Bununla birlikte patojen olmayan bazı suşlarda da PA'nın varlığı gösterilmiş ve virulansa katkısı olmasa da bakteriyeye çoğalma, fiziksel koşullara adaptasyon ya da bağışıklık sisteminden kaçış gibi özellikler kazandırdığını düşündürmüştür. Bundan dolayı bu tür gen grupları "Ekolojik Adalar" olarak tanımlanmışlardır. Ekolojik adalar bazen PA ile yüksek oranda dizi benzerliği gösterebilirler de virulans özellikleri kazandırmamaktadırlar. Horizontal transfer ile kazanılan hareketli gen gruplarının hepsinin virulans ile ilgili olmadıklarının gösterilmesi ile birlikte, bu gen grupları genel olarak "Gen Adaları (GA)" olarak adlandırılmışlardır. GA bazı kaynaklarda; simbiyotik adalar, saprofitik adalar, ekolojik adalar, direnç adaları veya patojenite adaları gibi alt gruplara ayrılarak tanımlanmaktadır (Köksal, 2007). PA'ların bir analogu olan SCC_{mec}, MRSA'lar tarafından taşınmakta ve metisilin direncinden sorumlu *mecA* gen dizisini içermektedir. Ayrıca bu genomik adacıklarda, *mecA* geninden başka, diğer antibiyotiklere dirençten sorumlu genler, insersiyon gen dizileri ve fonksiyonları henüz tanımlanmamış

genler yer alır. SCC mec bölgesi virulans genlerini, bakteriyofajlarla ilgili genleri ve konjugatif gen dizisini (*tra*) içermez. Metisiline duyarlı *S. aureus* suşları SCC mec içermemektedirler. *mec* geni içermeyen SCC'ler de vardır ve stafilokok türlerinde gen aktarımı için oldukça uygundur. *mecA* içermeyen SCC'ler daha çok mikroorganizmanın stres durumlarında hayatta kalmasına yardımcı olan genleri taşımaktadırlar (Katayama vd., 2003a; 2003b). Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, infeksiyon hastalıklarının tedavisinde başarısızlıklara neden olmaktadır. Direnç gelişiminde en önemli faktörler, antibiyotiklerin endikasyonlar dışında yaygın bir şekilde, uygun olmayan doz ve sürelerde kullanımlarıdır. Bu ilaçların yetersiz doz ve sürede kullanılması, bakteri kolonizasyonunu arttırmakta ve dirençli suşların oluşumuna neden olmaktadır. Bir antibiyotiğe karşı direnç gelişmesi, aynı sınıftan diğer ilaçlarda da bu soruna yol açmakta ve çoklu direnç problemine yol açmaktadır.

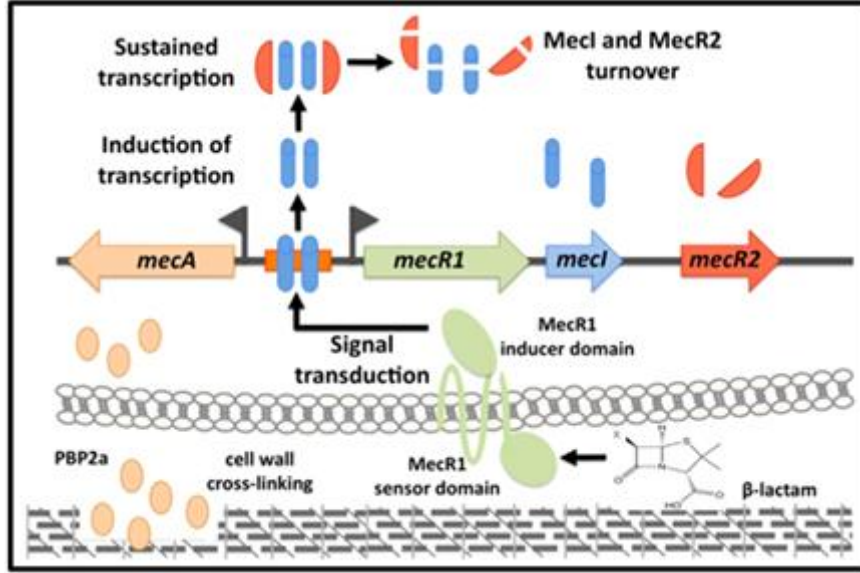
2.4 Metisilin Direnci

Penisilin ilk defa 1940 yılında stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve böylece stafilokok infeksiyonlarının morbidite ve mortalitelerinde dramatik bir şekilde azalma görülmüştür. İlk kez 1944 yılında İngiltere'de penisiline dirençli stafilokok suşları rapor edilmeye başlanmıştır. Daha sonra stafilokoklarda bir çok antibiyotik direnci tanımlanmıştır (Jolly vd., 1997; Deurenberg vd., 2007). Mikroorganizmalar ürettikleri β -laktamaz (penisilinaz) enzimi ile β -laktam halkası taşıyan antibiyotiklerin etkilerini inhibe ederler. Bu durum β -laktam halkasının amid bağının hidrolizi yoluyla gerçekleşmektedir. β -laktamazların β -laktam halkasındaki amid bağına ulaşmalarını engellemek için benzilpenisilin yapısındaki fenoksi grubunun yerine metoksi grubunun eklenmesi ile metisilin (2,6-dimetoksifenilpenisilin) sentez edilmiştir. Bir penisilin türevi olan metisilin, β -laktamaz enzimine dirençlidir ve β -laktamaz enzimine dirençli antibiyotikler (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) içerisinde 1959 yılında ilk üretilen ve klinikte ilk kullanılan antibiyotik olmasına rağmen ciddi interstisyel nefrit yapma yan etkisinden dolayı klinik kullanımdan kaldırılmıştır. Sadece laboratuvarlarda deneysel amaçlı kullanılmaktadır. Metisilin kullanıma girmesinden sadece iki yıl sonra İngiltere'de ilk metisilin dirençli stafilokok rapor edilmiştir. *In vitro* olarak metisiline dirençli bulunan stafilokok suşları, diğer β -laktam antibiyotiklere de dirençli kabul edilir (Kuwahara-Arai vd., 1996).

Stafilokoklardaki metisilin direnci üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir;

- 1) Kromozomal (intrinsik) metisilin direnci.
- 2) Aşırı miktarda β -laktamaz salgılanması.
- 3) PBP'lerdeki yapısal değişiklikler.

1) Kromozomal (intrinsik) Metisilin Direnci; en sık karşımıza çıkan mekanizmadır. Metisilin direncinden sorumlu *mecA* genini taşıyan plazmid ve transpozonların bulunduğu gen kaseti, bakteri kromozomuna integre olmaktadır. *mecA* geninin etkisi ile MRSA suşlarında PBP2' ya da PBP2a denilen yeni bir PBP sentezlenmektedir. PBP2a 78 kDa ağırlığındadır ve β -laktam antibiyotiklere karşı PBP'den daha düşük afinite göstermektedir. Buna bağlı olarak β -laktam antibiyotikler PBP2a'ya bağlanmamakta, böylece bakteri hücre duvarı için gerekli olan peptidoglikan sentezi devam etmektedir (Berger-Bachi ve Rohrer, 2002). Stafilokoklarda PBP2a sentezinin düzenlenmesinde *mecR1* ve *mecl* adı verilen iki düzenleyici gen önemli rol oynar. Bu genler *mecA* gen transkripsiyonunu düzenlemektedirler. *mecR1* membrana bağlı bir sinyal taşıyıcı protein olan *MecR1*'i kodlarken *mecl* transkripsiyonel düzenleyici bir protein olan *Mecl*'yi kodlar. *MecR1* ve *Mecl* proteinleri, β -laktamaz üretiminin düzenleyici proteinleri olan *BlaR1* ve *Blal* proteinleri ile büyük oranda benzerlik gösterirler. *BlaR1* ve *Blal* proteinleri plazmid ilişkili, β -laktamaz üretiminden sorumlu bir gen olan *blaZ* gen sisteminin düzenleyici proteinleri olup *blaR1* ve *blal* genleri tarafından kodlanmaktadır. *BlaR1* ve *Blal* proteinlerini kodlayan genlerin düzenlenmesi *mecA* sistemi ile yüksek oranda dizi benzerliği gösterir. Bu durum *mecA* sisteminin düzenleyici genlerinin *blaZ* gen sisteminden geliştiğini düşündürmektedir. Operatör bölgelerin benzerliği dolayısıyla *Blal* proteini, PBP2a üretimini etkileyebilmektedir (Arede vd., 2012; Zhang vd., 2001). Bu nedenle *blaZ* geni, *BlaR1* ve *Blal* proteinleri kontrolünde PBP2a üretimini indükleyebilmektedir. Bu durum bir çok klinik MRSA suşunda görülmektedir (Arede vd., 2012). β -laktamaz üretimi indüklenebilir özellikte olabilmekte iken PBP2a sentezi normal regülatör genlerin varlığında indüklenebilir değildir ancak bazı suşlarda yüksek metisilin konsantrasyonlarında PBP2a sentezi bir miktar indüklenebilmektedir (Berger-Bachi ve Rohrer, 2002). Bunun nedeni *Mecl* proteininin *mecA* geni üzerine olan baskılayıcı etkisinin, *Blal* proteinin *blaZ* geni üzerine olan baskılayıcı etkisinden daha güçlü olmasıdır. Bunun bir sonucu olarak; *mecA* geni taşıyor olsa da *mecl* ve *mecR1* regülatör bölgeleri sağlam olan suşlar, *mecl*'nin *mecA* üzerindeki baskılayıcı gen işlevini etkili olarak yapabilmesinden dolayı fenotipik olarak metisiline duyarlıdır (Şekil 2.2.). Bu MRSA izolatları pre-MRSA olarak adlandırılırlar (Berger-Bachi ve Rohrer, 2002; Arede vd., 2012).



Şekil 2.2. β -laktam antibiyotikler varlığında *mecR1-mecI-mecR2* tarafından *mecA* geninin indüklenme mekanizması (Zhang vd., 2001)

Sık veya uygunsuz antibiyotik kullanımı *S. aureus* suşlarında kromozomal mutasyonlara veya *mecA* gen sisteminde delesyonlara neden olarak baskılayıcı fonksiyonun ortadan kalkmasına ve PBP2a'nın devamlı üretilir hale gelmesine neden olabilir (Arede vd., 2012; Salmenlinna, 2002). Bir başka deyişle; metisilin direnci için regülatör genlerde değişiklikler olması ve β -laktamaz regülatör gen sistemindeki *mecA*'yı baskılayıcı genlerin olmaması gerekmektedir. Klinik MRSA izolatlarında *mecI* ve sıklıkla da *mecR1* bölgelerinde delesyonlar ya da *mecI* veya *mecA*'nın promotor bölgesinde mutasyonlar görülmektedir (Merlino vd., 2002).

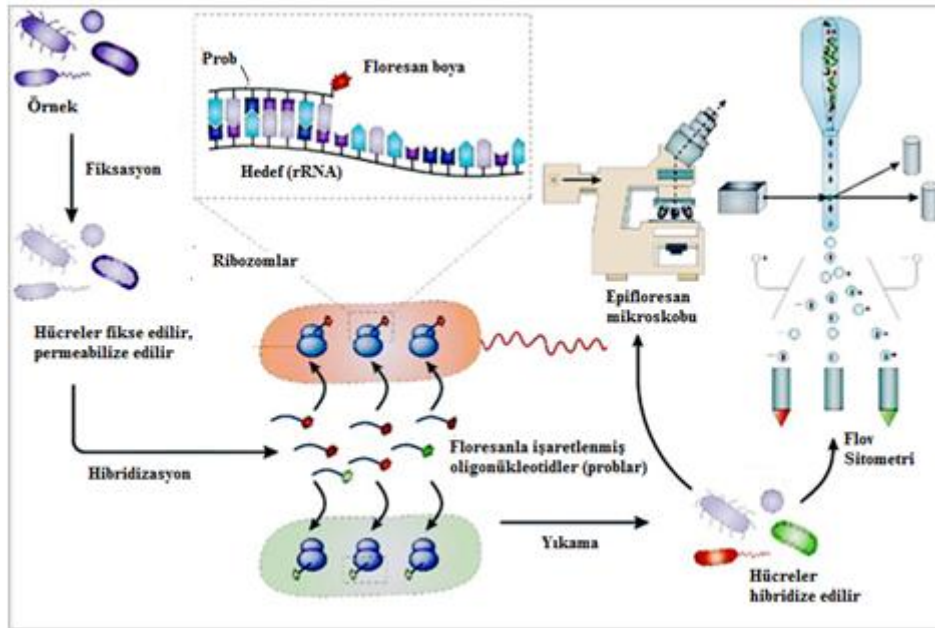
Metisilin direncinin düzenlenmesi; esas olarak *mecA* ve varsa *blaZ* genlerinin düzenleyici-sinyal üretici sistemleri ile olmaktadır. Bununla birlikte metisilin direncini etkileyen başka faktörler de vardır (Berger-Bachi ve Rohrer, 2002; Sancak, 2007). Bu faktörlerden bir tanesi bakteri hücre duvarının yapısı ile ilişkilidir. PBP2a'nın optimal etki gösterebilmesi için N-asetil muramik asit (NAM); N-asetil glikozamin (NAG) yapısındaki karbonhidrat yapılarının belirli uzunlukta olması gerekmektedir. PBP2a'nın transglikozidaz bölgesindeki değişiklikler peptidoglikan bileşimindeki karbonhidrat yapılarının gerekli uzunluğa erişememesine ve metisilin direncinde belirgin azalmaya neden olur (Sancak, 2007).

2.5 *mecA* Geninin Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi

MRSA, hastane kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenlerinden biridir. MRSA'larda tüm β -laktam yapısındaki antibiyotiklere ve aynı zamanda diğer grup antibiyotiklere karşı çoklu direnç göstermektedir. Bu nedenle, metisilin direncinin en kısa sürede doğru olarak saptanması, bu infeksiyonların kontrol altına alınmasında ve tedavisinde doğru antibiyotiğin seçilmesinde büyük önem taşımaktadır. Metisilin direncinin heterojen olarak ortaya çıkması, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bu suşların saptanmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon, oksasilin disk difüzyon yöntemi, sefoksitin disk difüzyon yöntemi, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, agar tarama, e-test yöntemi, lateks aglutinasyon ve kromojenik yöntemler gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Swenson ve Tenover, 2005).

Günümüzde erken tanıya yönelik özel testler ve moleküler yöntemler gibi modern ve hızlı tanı yöntemleri önem kazanmaktadır. Metisilin direncinin saptanmasında *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması oldukça zor ve pahalıdır. MRSA izolatlarında *mecA* geninin PZR temelli yöntemlerle araştırılması yaygın olarak kullanılsa da *mecA* geni bulunan, ancak bunu eksprese etmeyen duyarlı suşların bulunabileceği unutulmamalıdır (Velasco vd., 2005; Elsayed ve Elbestawy, 2008). Farklı çevrelerde, mikrobiyal çeşitliliğin identifikasyonunda moleküler tekniklerin hızlı ve güvenilirliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Organizmaların tanımlanmasında, DNA veya RNA'larının bazı benzersiz kısımları kesin bilgi sağlamaktadır (Malik vd., 2008). Diğer taraftan PZR ve 16S rRNA analizi gibi nükleik asit teknolojisindeki son gelişmeler, bakterilerin genotip analizleri için yeni metodların kullanılmasına yol açmıştır. 16S rRNA karşılaştırmalı analizleri, son derece korunmuş dizilerin değişken dizi bölgeleri ile iç içe olduğunu göstermektedir. Değişken bölgelerin analizleri, filogenetik ve evrimsel ilişkilerin belirlenmesine izin vermektedir (Rogers vd., 2007). Mikroorganizmaların tanımlanmasında korunmuş ya da değişken olan bölgeler, PZR ile DNA amplifikasyonuna yönelik primer için hedef olarak kullanılabilir. Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH), floresan boyalarla işaretlenen, tamamlayıcı DNA'ya, bu DNA dizilerinin yerleşimini görebilmek için hibridizasyona uğrayan veya bağlanan tek zincirli DNA (prob) kısa dizilerini gerektiren bir yöntemdir. Belirli bir kromozomal bölgenin veya DNA kesiminin FISH yöntemi ile görünür hale gelebilmesi için kullanılan problemlerin 5' ucu floresan ya da sulfoindosiyanın (Cy3, Cy5) gibi fluorokrom boyalar ile işaretlenmekte ve işaretlenen oligonükleotid problemler hücrelere girerek spesifik olarak komplementer hedef sekanslar ile hibridize olmaktadır. Yani eksojen olarak reaksiyona sokulan işaretli nükleotid, prob DNA'sındaki uygun nükleotid ile yer değiştirir. Prob işaretlendikten sonra lam/lamel üzerine

fikse edilen metafaz ve/veya interfazdaki proteinler uzaklaştırılır, çift sarmal halde bulunan gerek prob gerekse hedef DNA'lar denatürasyon ile tek zincir haline getirilir. Önceden işaretlenmiş prob ile spesifik eşleşmenin olacağı uygun koşullarda genomik DNA hibridize edilir. Floresan işaretli prop hibridize olduğu zaman kromozomlar floresan boyadan yayılan ışığın belirli bir dalga boyunda absorblanması ile görünür hale gelirler. Bu hibridizasyon sinyalinin ve bu prob ile hibridize olan DNA segmentinin lokalizasyonu daha sonra epifloresan mikroskobu ya da konfokal lazer taramalı mikroskobu (CLSM) ile belirlenir (Şekil 2.3) (Manz vd., 1992). Bu teknik ile bakteriler doğal habitatlarında kültüre edilmelerine gerek kalmaksızın floresan mikroskobu kullanılarak saptanabilmektedir. Böylece kültüre edilemeyen bakterilerin tanısına ve takibine de olanak sağlamaktadır. Nükleik asit amplifikasyon ve FISH yöntemleri hızlı ve güvenilir testler olup, duyarlılık ve özgüllükleri oldukça yüksektir. Tanı için az miktarda klinik materyal gerektirmeleri ve klinik materyallerde bulunan inhibitör maddelerden etkilenmemeleri nedeniyle izolasyonları, üretilmeleri veya identifikasyonları çok zor olan bakteriyel ve viral ajanların belirlenmesinde büyük yararlar sağlamaktadırlar. Ayrıca bu teknikler genellikle otomatize veya yarı otomatize sistemler halinde oldukları için personel hataları ve laboratuvar enfeksiyonlarını minimal düzeye indirgemektedir (İbrahim vd., 2009). FISH tekniği hücre ekstraksiyonu ve fiksasyon işlemleri ile gerçekleştirilmektedir. Hibridizasyon ve bir sonraki yıkama aşamasında optimizasyonu sağlamak için sıcaklık, NaCl ve formamid konsantrasyonları belirlenmelidir. Bu koşullar probtan proba değişmekte olup optimal koşullar probun hedef bölgeye bağlanmayı ve spesifik olmayan bağlanmaları minimuma indirmeyi sağlamaktadır (Amann ve Fuchs, 2008).



Şekil 2.3. FISH metodu (Amann ve Fuchs, 2008)



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Metisilin Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal Testleri

Daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T045 nolu proje kapsamında Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın 12 farklı bölgesinden 2011-2012 yılları arasında üçer aylık periyotlar ile alınan su örneklerinden izole edilmiş metisilin dirençli bakterilerin hazırlanmış olan stok kültürleri kullanılarak biyokimyasal testleri yapılmıştır. Öncelikle %7 koyun kanlı agar, mannitol salt agar ve MacConkey agar ortamlarına ekilen suşlar 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra üreyen mikroorganizmaların makroskopik olarak koloni morfolojileri, pigment ve hemoliz özellikleri, Gram boyama ve biyokimyasal özellikleri (API 20 NE) incelenmiştir.

3.2 Antibiyotik Duyarlık Testleri

Kullanılan antibiyotiklerin çoğunluğuna karşı dirençten sorumlu genlerin, sıklıkla dışardan alınan mobil genetik elementlerle ilişkili oldukları bilinmektedir. Aktarılabir ilaç direnci ilk olarak ellili yılların sonlarında saptanmıştır. O tarihten beri direnç genlerini taşıyan çok sayıda plazmid ve transpozon tanımlanmıştır. Plazmidlerin üzerinde çoğunlukla bir veya daha fazla antibiyotiğe direnç genleri bulunmaktadır. İzole edilen bakterilerin Oksasilin, sefoksitin antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile muller hinton agarda Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2006) kriterlerine göre yapılacak ve sonuçlar CLSI standartlarına göre değerlendirilmiştir. Antibiyogram sonucu mikroorganizmalar, standart antibiyotik disk tablosinde verilen inhibisyon zon çapına göre antibiyotik dirençli (R) veya duyarlı (S) olarak sınıflandırılmıştır.

3.3 Bakteriyel Kültürden Genomik DNA İzolasyonu

İzole edilen metisilin dirençli bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn (1990) protokolüne göre yapılmıştır. 15 mL luria bertani sıvı besiyerine tek koloniden ekim yapıp 150 rpm'de 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Bir gecelik bakteri kültürleri 1.5 mL'lik epondorf tüplere koyularak 10.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra pelletler 567 µL TE tamponu içerisinde mikropipet yardımıyla çözüldürülerek üzerlerine 30 µL SDS ve 3 µL proteinaz K çözeltileri eklenerek vortekslenmiştir. 37°C'de 1 saat bekletilen hücrelere 100 µL NaCl ekleyerek tekrar vortekslenmiştir. 80 µL CTAB/NaCl çözeltisi ekledikten sonra tüpler vortekslenip ve 65°C'de 10 dk tutulmuştur. Tüplerin üzerine eşit hacimde kloroform/izoamil alkol eklenerek tekrar

vortekslenmiştir. 10.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenen tüplerin üst fazları, temiz satrifüj tüplerine alıp ve eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol karışımından ekleyerek vortekslenmiştir. 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra üst fazlar dikkatlice temiz tüplere alınarak ve 0,6 hacim izopropanol eklenmiştir. Ardından DNA çökünceye kadar tüpler vortekslenip 15.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Tüplere 50 µL %70 etanol eklenerek DNA'lar yıkanıp tüpler hemen ters çevrilip alkol uzaklaştırılmıştır. Tüpler ağzı açık durumda oda sıcaklığında bir süre (10-15 dk) veya 60°C'de birkaç dk bekletilerek alkolün tamamen uçurulması sağlanmıştır. Pelletlerin üzerine 50-100 µL TE tamponu ekleyip tüplere parmakla yavaşça vurularak DNA'lar çözdürülüp, DNA saflığı Qubit Fluorometre cihazı (Invitrogen) ile ölçülmüştür. Her jelde moleküler marker olarak Lambda DNA / EcoRI + Hind III kullanılıp, DNA %0.7'lik agaroz jelde (w/v) 80 voltta 3 saat boyunca elektroforezde yürütülen jel, etidyum bromürle boyanarak UV altında görüntülenmiştir. Marker DNA boyutları ile örnekler kıyaslanarak, moleküler ağırlıklar hesaplanmıştır.

3.4 *mecA* Geninin Varlığının PZR ile Tesbiti

Fenotipik yöntemlerle metisilin dirençli olduğu anlaşılan suşlarda *mecA* geninin varlığı PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. *mecA* geninin amplifikasyonu için *mecA* P4F 5'-TCCAGATTACAACCTTCACCAGG-3' ve *mecA* P7R 5'-CCACTTCATATGTTGTAGG-3' primer çifti kullanılmıştır (Compernelle vd., 2007). 1.5 mM MgCl₂, 5X Taq buffer, 200 µM dNTP karışımı, 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol primer, (2.5U/µL) Taq DNA polimeraz (Fermantas), saf su ve 5 µL (100 ng) kalıp DNA (genomik DNA) eklenerek toplam 50 µL reaksiyon karışımı hazırlanıp PZR tüpleri thermal cycler cihazına (Bio-Rad T-100, USA) yerleştirilmiştir. Reaksiyon karışımına, başlangıçta 92°C'de 5 dakika ve her bir döngü için 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 45 saniye primer bağlanması, 72°C'de 30 saniye primer uzaması basamaklarını içeren 35 döngü ve 72°C'de 3 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır (Buntaran vd., 2013). Tüm PZR ürünleri, %1 agaroz jelle her örnekten Her bir örnek için 5 µL PCR ürünlerine 1 µL miktarında 6x loading dye ilave edilerek elektroforezde 80 V 1 saat boyunca yürütülmüştür.

3.5 Bakterilerde PBP2a Proteini Analizi

mecA gen varlığı tespit edilen metisilin dirençli bakterilerde metisilin dirençliliğinden sorumlu olan PBP2a protein varlığının gösterilmesine yönelik çalışmalar Kim vd. (2012) tanımladıkları metoda göre yapılmıştır. 100 mL'lik Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine *mecA* pozitif bakterilerin ekimleri yapılarak 30°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan

sonra kültürler 10 dk 8000 g'de santrifüjlenerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pellet kısmına 400 µL lizis buffer eklenerek pipetaj yapılmıştır. 3 mL lizis buffer için 30 µL PMSF, 30 µL sodyum orthovanadate, 45 µL proteaz inhibitör koktail oranları kullanılmıştır (Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Invitrogen, UK.) Lizis buffer PMSF kararsız olduğu için falkona eklenmeden hemen önce hazırlanır, ışığa duyarlıdır. Lizis buffer içinde falkonlar 30 dk, buz üstünde, karanlıkta bekletilmiştir. Her 7.5 dk'da bir kısa vorteks yapılmıştır. Süre bitiminde falkondaki çözelti 1.5 mL ependorf tüplere aktarılıp +4°C'de 10 dk 10000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant etiketlenmiş tüplere alınıp -20°C'de alikotlanarak saklanmıştır. Örnekler üzerine 50 µL örnek tamponu ekleyip elektroforezden önce 100°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

3.5.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

İzole edilen dış membran proteinlerinin konsantrasyonları Quick Start BSA Standart Kit (Bio-Rad, USA) ile belirlendikten sonra, analiz için %4'lük dengeleyici ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (Bio-rad, Mini Protean Tetra System) yapılmıştır (Achtman vd., 1983).

3.5.2 Ayırma Jelinin Hazırlanması

16.7 mL %30'luk akrilamid/bis akrilamid, 19.8 mL distile su, 12.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.6), 500 µL %10'luk APS (amonyum persülfat), 500 µL %10'luk SDS birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 µL TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamin) ilave edilerek, 1 mm aralığına sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı bütanol ile kaplanarak polimerize olması için bekletilmiştir.

3.5.3 Dengeleyici Jelin Hazırlanması

3.4 mL %30'luk akrilamid/bis akrilamid, 13.6 mL distile su, 2.5 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 200 µL %10'luk APS ve 200 mL %10'luk SDS birbiri ile iyice karıştırıldıktan sonra 20 µL TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım polimerize olan ayırma jelinin üzerindeki bütanol distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli üzerine dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir. Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, kuyucuklar elektroforez yürütme tamponu ile yıkandıktan sonra tanka sabitlenmiş ve elektroforez düzeneği yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Örneklerden 20 µL kuyucuklara yüklenmiş ve 80 mA'de yaklaşık 150 V'ta ortalama 30 dakika yürütülmüştür. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller tespitleme çözeltisi içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisinde ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk aralıklarla yıkanarak, fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

Marker olarak Color Plus Prestained Protein Marker (New England BioLabs, UK), PBP2a'nın belirlenmesinde metisilin dirençli *S. aureus* ATCC33591 ve metisilin duyarlı *S. aureus* ATCC25922 suşları pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.6 Western Blot Analizi ile PBP2a'nın Belirlenmesi

PBP2a proteininin Western Blot analizi için örnekler (30 µg) SDS-poliakrilamid jellere yüklenerek elektroforeze tabi tutulmuştur. Proteinler polivinilidinden diflorür (PVDF) membrana Trans Blot PVDF/Nitrocellulose Starter Kit (Bio-Rad, USA) kullanılarak Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad, USA) blotting cihazında üretici firmanın talimatlarına göre transfer edilmiştir. Transfer tamamlandıktan sonra membranla antikorlar arasındaki spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirmek için membran, % 5 bovin serum albumin içeren tris- buffer salin çözeltisinde (TBS) 4°C'de 1 gece bırakılarak blokaj uygulanmış ve membran % 0.05 tween 20 (TBS-T) içeren TBS çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından PVDF membran 2 saat oda sıcaklığında 1:1000 oranında TBS-T çözeltisiyle seyreltilmiş rabbit anti-PBP2a primer antikor (RayBiotech, USA) ile inkübe edilmiştir. inkübasyon sonrası membran TBS-T çözeltisi ile yıkanarak 1:10000 oranında TBS-T çözeltisinde seyreltilmiş goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG), (H+L) horseradish peroksidaz (HRP)-konjuge sekonder antikor (Milipore, USA) ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 3 kez yıkanan membran, HRP Conjugate Substrate Kit solusyonu (Bio-Rad, USA) ile üretici firmanın talimatlarına göre protein bantları görülene kadar bekletilmiştir. Western blot analizinde Marker olarak Precision Plus Protein WesternC Standards (Bio-Rad, USA) olarak kullanılmıştır. Sonuçlar metisilin dirençli *S. aureus* ATCC33591 ve metisilin duyarlı *S. aureus* ATCC25922 suşları pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.7 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyon

16S rRNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rRNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primer çifti, 27 F forward primer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; ve 1492 R reverse primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' kullanılmıştır (Lane vd., 1985). PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 100 µL PZR karışımı için 10 µL kromozomal DNA (100 ng), 5 µL 16S forward primer (20 pmol), 5 µL 16S reverse primer (20 pmol), 4 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 4 µL 50 mM MgCl₂, 10 µL 10x Taq Buffer (Taq DNA polymerase içeren), 61.5 µL steril distile su, 0.5 µL (2.5U) Taq DNA polimeraz karıştırılıp santrifüjlenmiştir. Tüplerin thermal cycler da 30 döngü için izlenen prosedür şu şekildedir. 5 dk 95°C de ön ısıtma, 95°C'de 30 sn 30 döngü denatürasyon, 30 sn 55°C'de primerlerin

bağlanması, 2 dk 72°C'de uzama ve 10 dk 72°C'de zincir sentezinin gerçekleştirilmesi şeklindedir. Suşların 16S rRNA bölgeleri PZR'da çoğatıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. 100 bp Plus DNA Ladder marker olarak kullanılmıştır. PZR ürünleri jelde görüntüledikten sonra sekans analizi yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır (Ramaiah ve Vardanyan, 2008). İzole edilen bakterilerin PZR ile 16S rRNA gen sekans analizi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. Elde edilen nükleotid sekansları, National Center of Biotechnology Information'ın internet sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Blast programı doğrultusunda NCBI GenBank, EMBL ve Ribosomal Database Project (RDP)'de yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. İzole edilen civa dirençli bakterilerin filogenetik ağaçları, 16S rRNA sekans dizileri kullanılarak Mega 5.2 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Oluşturulan soy ağaçları ile izolatların birbiriyle yakınlık dereceleri ortaya koyulmuştur.

3.8 Yağ Asiti Metil Esteri Analizi (FAME) ile İdentifikasyon

Bu analiz ile metisilin dirençli bakteriler yine moleküler düzeyde tanımlanması amaçlanmıştır. İzolatların yağ asiti analizleri için gerekli olan tüm kimyasallar ve uygulama prosedürleri Mikrobial Identification System (MIS) (Microbial ID Inc. Newark De) kullanma klavuzuna göre hazırlanmıştır. Prosedür uygun olarak hazırlanmış ve gerekli saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuş örnekler Mikrobial Identification System (MIS) (Microbial ID Inc. Newark De) cihazına yerleştirilerek Gaz kromatografi cihazında CLIN 50 kütüphanesi kullanılarak analiz edilmiştir (MIDI, 2001). Analize alınacak örnekler triptik soy agar ekilerek 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra gelişen hücreler steril cam tüplere öze ile 40 mg olacak şekilde tartılarak ilk aşamada saponifikasyonla hücresel lipitlerin parçalanıp, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır. Bunun için 40 mg örnek bulunan tüplerin üzerine 1. çözüldüden 1 mL ilave edip 5-10 saniye vortekslenmiştir. 100°C'lik su banyosunda 5 dakika tutulduktan sonra tekrar vortekslenip ve daha sonra tekrar 100°C'lik su banyosunda 25 dakika tutulmuştur. İkinci basamakta yağ asitlerin metilasyonu sağlanmış, serbest yağ asitlerine ester bağlarıyla metil eklenmiş ve yağ asidi metil esterler elde edilmiştir. Bunun için, 100°C'lik su banyosundan çıkarılan tüplere 2. çözüldüden 2 mL ilave edilip ve 5-10 saniye vortekslenerek 80°C'lik su banyosunda 10 dakika tutulmuştur. Üçüncü basamak olan saflaştırma basamağında soğutulan tüplerin üzerine 3. çözüldüden 1.25 mL ilave edilip ve 10 dakika karıştırılmıştır. Bu basamak sonunda tüplerde altta asidik, üstte organik sıvı faz olmak üzere iki faz gözlenmektedir. Tüplerdeki asidik faz pastör pipeti ile uzaklaştırılıp, yağ asidi metil esterleri, asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplanarak organik faz muhafaza edilmiştir. Son basamakta ise tüplerin üzerine 4. çözüldüden 3 mL ilave edilip ve 5 dakika karıştırılmıştır. Böylece serbest yağ asidi metil esterlerinin saf

olarak elde edilmesi sağlanmıştır. Tüplerde gözlenen üst faz pastör pipeti ile 2 mL'lik viallere alınmıştır.

3.9 Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH)

FISH, hücre ekstraksiyonu ve fiksasyon işlemleri ile gerçekleştirilmektedir. Hibridizasyon ve bir sonraki yıkama aşamasında optimizasyonu sağlamak için sıcaklık, NaCl ve formamid konsantrasyonları belirlenmelidir. Bu koşullar probtan proba değişmekte olup optimum koşullar probun hedef bölgeye bağlanmayı ve spesifik olmayan bağlanmaları minimuma indirmeyi sağlayan bir tekniktir. Bu projede *mecA* geni taşıyan suşların popülasyonlarındaki mevsimsel değişiklikler ise *mecA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid problemler kullanılarak FISH yöntemi ve görüntü analizi mikroskopu ile takip edilmiştir. Böylece yüzey sularında *mecA* geninin *S. aureus* dışında başka bakterilerde de bulunup bulunmadığı ve *mecA* spesifik prob ile metisilin dirençli bakterilerin yüzey sularında takibinin yapılmasının uygunluğu belirlenmiş olacaktır. Daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T045 nolu proje kapsamında Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın 12 farklı bölgesinden 2011-2012 yılları arasında üçer aylık periyotlar ile alınan su örnekleri toplanmış ve % 4 paraformaldehid ile 0.13 M NaCl, 7 mM Na₂HPO₄ ve 3 mM NaH₂PO₄ içeren PBS tamponunda (pH 7.2) + 4°C'de 24 saat süreyle fikse edilip, 1:1: oranında etanol (% 100) - PBS ile süspanse edilmiştir. Örnekler etiketlenerek FISH için -20°C'de saklanmıştır (Hoshino vd., 2008). Fiksasyon hücrelerin morfolojisini korumak, nükleik asit kaybını önlemek ve probun hücre içine girişini kolaylaştırmak için yapılmakta ve fikse edilen hücreler uzun süre bozulmadan saklanabilmektedir. Fikse edilen su örnekleri kullanılarak *mecA* gen bölgesi taşıyan metisilin dirençli bakteriler tespit edilmiştir. *In situ* uygulamada hedef olan hücreler ile hibridizasyonu gerçekleştirmek için, pozitif kontrol EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri, negatif kontrol olarak NONEUB (NON338) probu ve metisilin direncini kodlayan *mecA* gen bölgesine yönelik olarak Uhl vd. (2006) tarafından type-I SCC*mec* kromozom bölgesini içeren *S. aureus* NCTC10442 (Genbank accession number AB033763) suşundan dizayn edilen *mecA* I-II ve III problemleri kullanılmıştır (Tablo 3.1). Bazı mikroorganizmalar kendiliğinden otofloresans vermektedir. Ayrıca ortamda bulunan boya kalıntıları da gerçek pozitifliğin ayırımında sorun yaratabilir. FISH çalışmalarında hedef bölgeye yönelik probu kullanmadan önce pozitif ve negatif kontrol problemleri ile hibridizasyon çalışmalarının yapılması da otofloresans sorununu çözebilmektedir. Tüm problemler 5'ucundan fluorescein isothiocyanate (FITC) ile işaretlenmiştir (Alpha DNA, Montreal, Canada) ve Tris-Edta çözeltisi ile konsantrasyonları 50 ng/µL olacak şekilde sulandırılıp -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1. FISH için kullanılan oligonükleotid problemler

Prob	Hedef gen/ organizma	Sekans (5'→3')	Baz uzunluğu (bp)	GC (%)	T _m (C°)	Referans
<i>mecA</i> I	<i>mecA</i> gene	GTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATA	29	76.6	84.0	Uhl vd., 2006
<i>mecA</i> II	<i>mecA</i> gene	GAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTA	27	73.2	76.0	Uhl vd., 2006
<i>mecA</i> III	<i>mecA</i> gene	AGATCTTATGCAAACCTAATTGGCAAATCC	30	72.7	80.0	Uhl vd., 2006
EUB338	Most Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	18	66.7	55.0	Amann vd., 1990
EUB338 II	Planctomycetales	GCAGCCACCCGTAGGTGT	18	66.7	55.0	Daims vd., 1999
EUB338 III	Verrucomicrobials	GTCGCCACCCGTAGGTGT	18	66.7	55.0	Daims vd., 1999
NONEUB	Negative control	ACTCCTACGGGAGGCAGC	18	66.7	55.0	Wallner vd. 1993

T_m, erime sıcaklığı

27-30 bp uzunluğunda olan *mecA* I-II ve III problemleri, *mecA* geni taşıyan paraformaldehid ile fikse edilmiş kültürler ile hibridize edilerek *mecA* gen spesifitesi ve optimum hibridizasyon koşulları bakımından değerlendirilmiştir. Metisilin direnci belirlenmiş bir *S. aureus* ATCC33591 (*mecA* pozitif) pozitif kontrol olarak, laboratuvarımızda var olan ve metisilin direnci göstermeyen *S. aureus* ATCC25922 (*mecA* negatif) ve *E. coli* DH5α suşları da negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Bütün hibridizasyonlar Amann protokolü esas alınarak yapılmıştır (Amann, 1995). Fiske edilmiş bakteri süspansiyonlarından 1-3 µL lamların üzerine yayılarak 45°C'de 30 dk kurutulmuştur. Ardından lamlar sırayla % 50, 80 ve 96'lık etanol serisinden sırayla geçirilip (3'er dk süreyle) lamlar tekrar oda sıcaklığında kurutulmuştur. 0,9 M NaCl, 20 mM, Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM EDTA, % 0,001 SDS ve farklı konsantrasyonlarda formamid içeren 9 µL hibridizasyon tamponu ile 1 µL prob solüsyonu (50 ng/µL) ve 1 µL DAPI (200 ng/µL) lamların üzerine yayılmıştır. DAPI, DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır ve hem canlı hem de fikse örnekleri boyamada kullanılır. DAPI ile boyama sonucu örnekte bulunan toplam hücre sayısı belirlenebilmektedir (Amann vd., 1997). Lamlar 48°C'de 15 dk süreyle ısıtılmış 50 mL yıkama tamponuyla (0,9 M NaCl, 20 mM, Tris-HCl (pH 7.2), % 0,001 SDS içeren) yıkanıp bidistile su ile yıkama tamponu uzaklaştırılmıştır. Manz ve arkadaşlarına göre hibridizasyon sıklığı kademeli olarak hibridizasyon tamponuna % 5 (v/v) konsantrasyonda formamid eklenmesiyle arttırılmıştır. NaCl konsantrasyonu hibridizasyon tamponunda kullanılan formamid konsantrasyonuna göre ayarlanmıştır (Manz vd., 1992).

3.9.1 Floresan Görüntüleme

mecA geni taşıyan bakterileri görüntülemek için Leica DM 5000B model (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) dijital kameralı (DFC300FX, Leica Microsystems) floresan mikroskopu ile Leica QWin Plus bilgisayar programı kullanılmıştır. Görüntüler CCD dijital kamera ile 100× büyütme kullanılarak elde edilmiştir. FITC ve DAPI boya sinyallerini analiz etmek için sırasıyla uygun optik filtre setleri I3 ve A (Leica) kullanılmıştır. Yıkama işleminden sonra havada kurutulan preparatların üzerine özel bir solüsyon (citifluor veya antifade solüsyon) damlatılarak (genellikle 1-5 µL) lamel kapatılmıştır ve ardından floresan mikroskopunda incelenmiştir. Citifluor veya antifade solüsyon kullanılan floresan boyaaların solmasını önlemek için kullanılmaktadır (Amann, 1995). Üç replika gerçekleştirilen FISH uygulamalarında her preparattan çekilen 10 görüntünün DAPI ve FITC piksel alanları ve ortalamaları belirlenerek *mecA* geni taşıyan bakterilerin bakteri populasyon yoğunlukları,

$$mecA \text{ geni taşıyan bakterilerin biyokütlesi (\%)} = \frac{\text{FITC görüntü piksel alanı}}{\text{DAPI görüntü piksel alanı}}$$

eşitliğinden % biyokütle olarak hesaplanmıştır (Li vd., 2007). Bu hesaplamalardan önce FISH görüntülerinden, otofloresans ve artefaktlar ve boya kalıntılarını uzaklaştırmak için negatif kontrol probunun (NON338) piksel alanları çıkarılmıştır. *mecA* geni taşıyan bakterilerin biyokütle yüzdeleri (%) *mecA* probları ile alınan sinyal görüntülerine göre belirlenirken, DAPI ile boyama sonucu elde edilen görüntülerden de alanda bulunan toplam hücre sayısı belirlenmiştir. *mecA* probu için optimum koşullar belirlendikten sonra üçer aylık periyotlarla toplanmış ve fikse edilmiş olan su örnekleri kullanılarak *mecA* geni taşıyan bakterilerin mevsimsel populasyon yayılım profili çıkarılmıştır.

3.9.2 İstatistiksel Analizler

mecA geni taşıyan bakterilerin *mecA* probları ile optimum hibridizasyon koşullarını belirlemek için yapılan FISH uygulamaları sonucu elde edilen biyokütle yüzde oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri Origin Pro 8.5 programı (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) kullanılarak hesaplanmıştır. Bulgular, % 95 güvenilirlik aralığı ve (p<0.05 significance level) anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiş ve p<0.05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Metisilin Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal Testleri

Daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T045 nolu proje kapsamında Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın 12 farklı bölgesinden 2011-2012 yılları arasında üçer aylık periyotlar ile alınan su örneklerinden izole edilmiş bakterilerin metisilin direncinin belirlenmesinde antibiyogram duyarlılık testi yapılmış ve sonuçlar değerlendirilip metisilin direnci olan bakterilerin stok kültürleri hazırlanmıştır. Proje kapsamında metisilin dirençli olarak belirlenen 12 suş sırasıyla Al11, Ba01, Co11, Li12, SDS6, SDS10-2, SDS10-3, SDS8, SDS4, SDS7, SDS10 ve SDS11 olarak kodlandıktan mikrobiyolojik ve biyokimyasal testleri yapılmıştır. Öncelikle % 7 koyun kanlı agar, mannitol salt agar ve MacConkey agar ortamlarına ekilen suşlar 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra üreyen mikroorganizmaların makroskobik olarak koloni morfolojileri, pigment ve hemoliz özellikleri, gram boyama ve biyokimyasal özellikleri API 20NE (Biomerieux) kiti kullanılarak yapılmış ve sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Metisilin dirençli suşların biyokimyasal ve morfolojik özellikleri

Biyokimyasal özellikler	Al11	Ba01	Co11	Li12	SDS6	SDS10-2	SDS10-3	SDS8	SDS4	SDS7	SDS10	SDS11
Koloni rengi	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Beyaz	-	Beyaz	Beyaz
Gram boyama	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Hücre morfolojisi	Kok	Kok	Kok	Kok	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Kazein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatin	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Üreaz	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemoliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoz	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannoz	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroz	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnoz	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin dihidrolaz	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta-galaktosidaz	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
N-asetilglukozamin H ₂ S	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat redüksiyonu	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

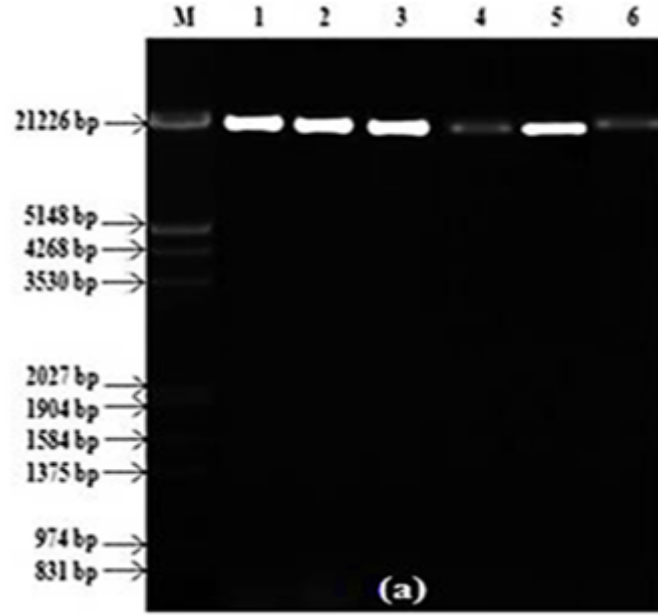
(+); pozitif, (-); negatif

4.2 Antibiyotik Duyarlık Testleri

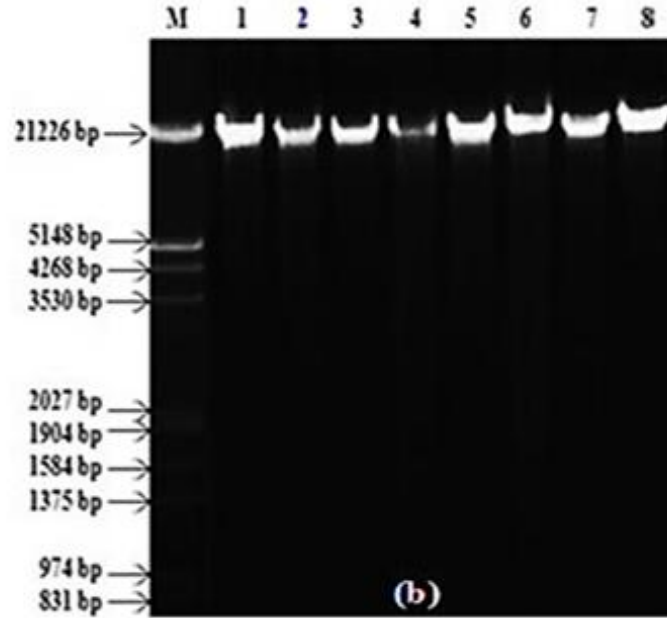
İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık testi olarak Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda disk difüzyon testi kullanılmıştır. Suşların metisilin dirençliliklerinin aranmasında her bir suşun taze kültürlerinden 0.5 McFarland standardına göre süspansiyon hazırlanarak steril eküvyon ile %4 NaCl içeren Mueller-Hinton agar besiyerine ekim yapılmıştır. Petriler oda ısısında 5-10 dakika bekletildikten sonra, besiyerinin yüzeyine 1 µg'lık oksasilin ve 30 µg'lık sefoksitin diskleri yerleştirilip 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sonuçlar, CLSI (2006) standartlarına göre değerlendirilmiştir (Tablo 4.2). Antibiyogram sonucu mikroorganizmalar, standart antibiyotik disk tablosinde verilen inhibisyon zon çapına göre antibiyotik dirençli (R) veya duyarlı (S) olarak sınıflandırılmıştır. Oksasilin inhibisyon zon çapı ≥ 13 mm olan suşlar duyarlı, ≤ 10 mm olan suşlar dirençli olarak değerlendirilmiştir. Sefoksitin inhibisyon zon çapı ≥ 22 mm olan suşlar duyarlı, ≤ 21 mm olan suşlar dirençli olarak değerlendirilmiştir. Metisilin direnci taşıyan suşların oksasilin ve sefoksitin antibiyotiklerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) agar dilüsyon metoduyla belirlenmiştir. Her iki antibiyotik için MİK değeri $\leq 2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ise suşlar duyarlı, $\geq 6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ise suşlar dirençli kabul edilmiştir (Brown vd., 2005). Bütün sonuçlar, metisilin dirençli *S. aureus* ATCC33591 ve metisilin duyarlı *S. aureus* ATCC25922 American Type Culture Collection (ATCC) kontrol suşları kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.2). İzolatların FOX antibiyotik MİK değerleri 128 ve $\geq 512 \mu\text{g mL}^{-1}$ iken OXA antibiyotiği için 32 ve $\geq 512 \mu\text{g mL}^{-1}$ değerleri arasında belirlenmiştir (Tablo 4.2). FOX/OXA antibiyotiklerine dirençlilik penisilin, sephem, imipenem, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörler kombinasyonları ampisilin/sulbaktam, amoksasilin/klavulanik asit, piperasilin/tazobaktam ve tikarsilin/klavulanik asit gibi antibiyotiklere de dirençlilik anlamına gelmektedir (Moreillon vd., 2005). Yüzey sularında antibiyotik dirençli bakterilerin tanımlanması ile ilgili birçok çalışma belirtilmiştir (Pruden vd., 2006).

4.3 Bakteriyel Kültürden Genomik DNA İzolasyonu

Metisilin dirençli suşların genomik DNA analizi yapılarak, bantlar kontrol edilmiş (Şekil 4.1a, 4.1b) ve PZR amplifikasyonu çalışmalarında bu suşlara ait DNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır.



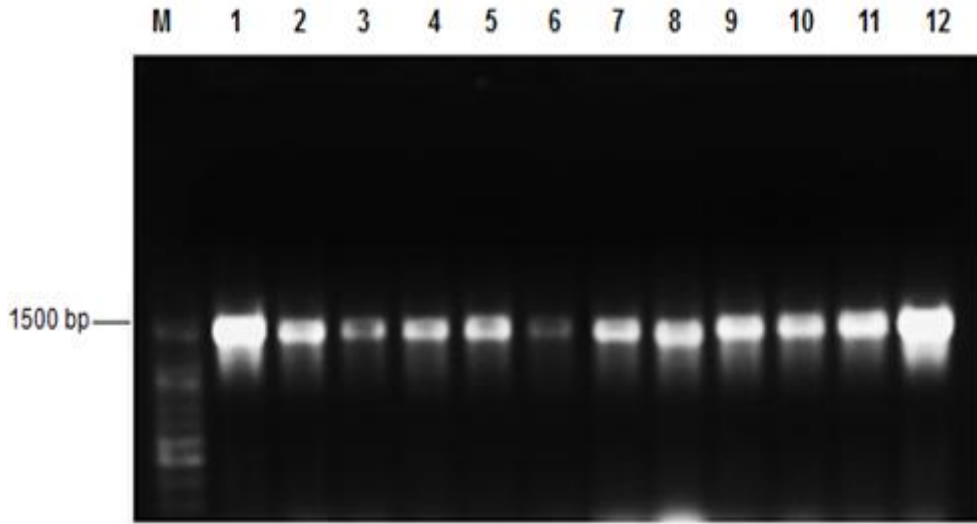
Şekil 4.1a. Metisilin dirençli suşların genomik DNA analizi; 1: AI11, 2: Ba01, 3: Co11, 4: Li12
M: Lambda DNA-HindIII Marker, chr; Kromozomal DNA



Şekil 4.1b. Metisilin dirençli suşların genomik DNA analizi; 1: SDS6, 2: SDS10-2, 3: SDS10-3, 4: SDS8, 5: SDS4, 6: SDS7, 7: SDS10, 8: SDS11, M: Lambda DNA-HindIII Marker, chr; Kromozomal DNA

4.4 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyon

Metisilin dirençli suşların 16S rRNA PZR ürünleri elde edilip jelde görüntüledikten sonra suşların tanımlaması için 16S rRNA sekans analizi yapılmıştır (Şekil 4.2). Elde edilen nükleotid sekansları, National Center of Biotechnology Information'ın internet sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Blast programı doğrultusunda NCBI GenBank'da yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Sekans analizi sonucu, metisilin dirençli Co11 suşu %99 oranında *Staphylococcus warneri* (KJ395373), Al11, Ba01 ve Li12 suşlarının %99 oranında *Staphylococcus aureus* (KJ395360, KJ395371 ve KJ395370) ile homoloji gösterdikleri belirlenmiştir. SDS6, 10-2, 10-3, 8, 4, 10, 11 olarak kodlanan 7 suş sırasıyla *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas baetica*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas. migulae* ve *Pseudomonas kilonensis*, SDS7 suşu ise *Aeromonas veronii* olarak tanımlanmıştır. Bu suşların % benzerlik oranları ve gen bankası kayıt numaraları Tablo 4.2'de verilmiştir.



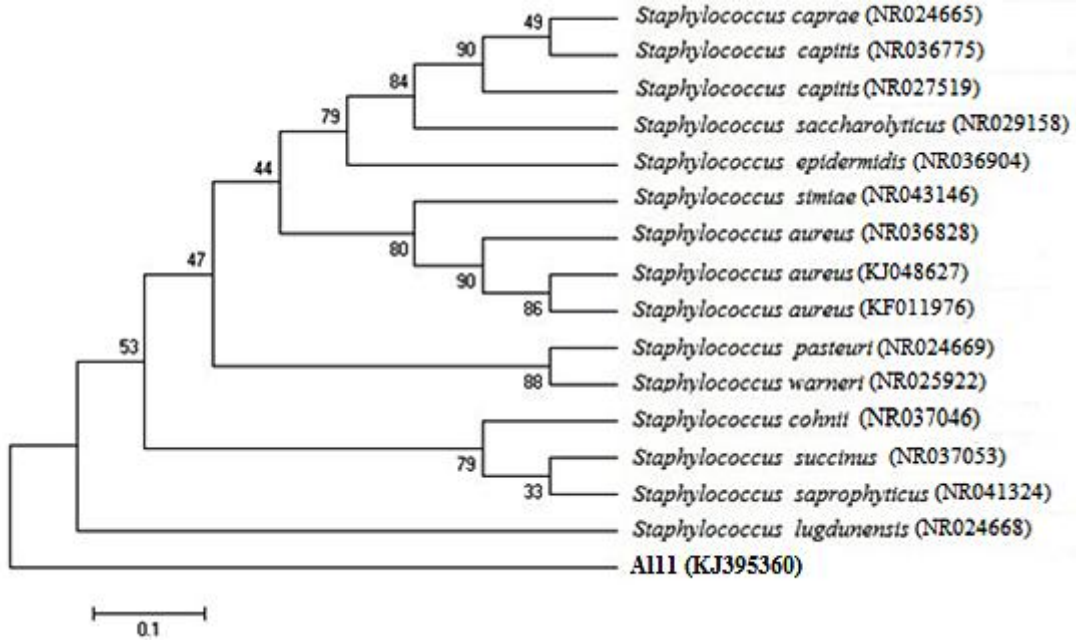
Şekil 4.2. Metisilin dirençli suşların 16S rRNA PZR ürünleri; 1: Al11, 2: Ba01, 3: Co11, 4: Li12, 5: SDS6, 6: SDS10-2, 7: SDS10-3, 8: SDS8, 9: SDS4, 10: SDS7, 11: SDS10, 12: SDS11, M: O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder

Tablo 4.2. Yüzey sularından izole edilen metisilin dirençli stafilokok ve stafilokok olmayan suşlar

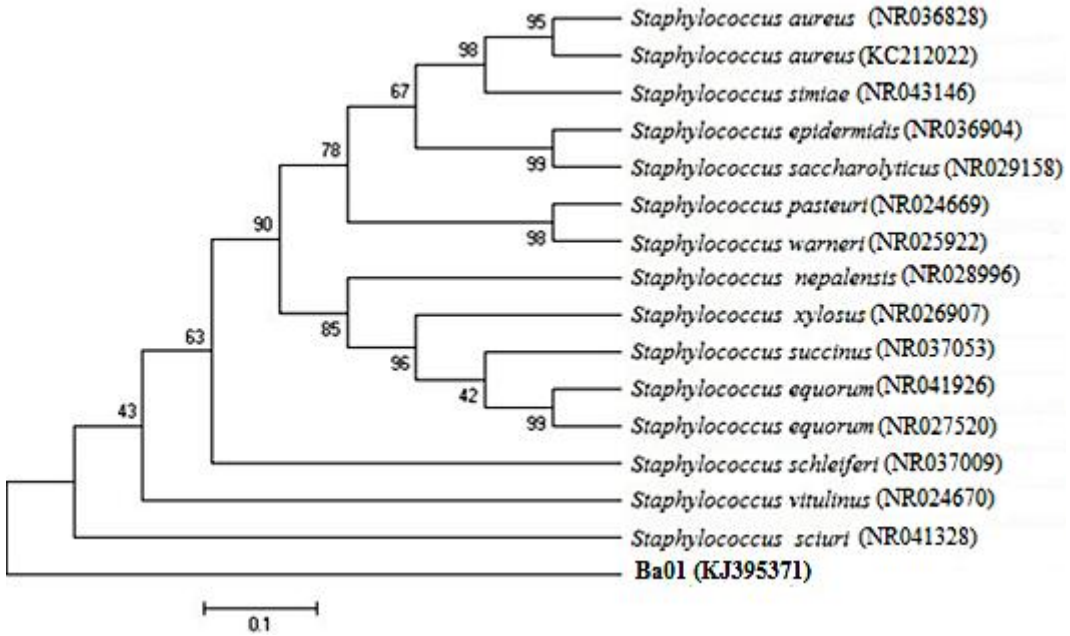
İzolatlar	Koordinatlar	Sefoksitin DD Test ^a (mm)	Oksasilin DD Test ^b (mm)	Sefoksitin MİK ^c (µg mL ⁻¹)	Oksasilin MİK ^c (µg mL ⁻¹)	16S rRNA Sekans Analizi (Homoloji%)	EMBL Access No
Al11	39°50'28.41"N, 33°28'02.13"E, 686 m	6	8	128	32	<i>Staphylococcus aureus</i> (%99)	KJ395360
Ba01	39°22'16.39"N, 33°26'49.26"E, 890 m	6	6	128	32	<i>Staphylococcus aureus</i> (%99)	KJ395371
Co11	39°50'28.41"N, 33°28'02.13"E, 686 m	10	8	≥512	≥512	<i>Staphylococcus warneri</i> (%99)	KJ395373
Li12	39°57'22.98"N, 33°25'04.35"E, 679 m	6	10	128	32	<i>Staphylococcus aureus</i> (%99)	KJ395370
SDS6	39°34'34.39"N, 33°26'11.61"E, 763 m	6	6	≥512	≥512	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (%99)	KJ937670
SDS10-2	39°48'38.97"N, 33°29'14.57"E, 684 m	6	6	≥512	≥512	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (%93)	KJ937675
SDS10-3	39°48'38.97"N, 33°29'14.57"E, 684 m	6	6	≥512	≥512	<i>Pseudomonas corrugata</i> (%93)	KJ937676
SDS8	39°39'53.04"N, 33°28'55.46"E, 852 m	6	6	≥512	≥512	<i>Pseudomonas baetica</i> (%99)	KJ937672
SDS4	39°28'39.46"N, 33°24'26.73"E, 740 m	6	6	≥512	≥512	<i>Pseudomonas koreensis</i> (%97)	KJ937669
SDS7	39°37'02.34"N, 33°26'38.26"E, 773 m	6	6	≥512	≥512	<i>Aeromonas veronii</i> (%97)	KJ937671
SDS10	39°48'38.97"N, 33°29'14.57"E, 684 m	6	6	≥512	≥512	<i>Pseudomonas migulae</i> (%96)	KJ937673
SDS11	39°50'28.41"N, 33°28'02.13"E, 686 m	6	6	≥512	≥512	<i>Pseudomonas kilonensis</i> (%99)	KJ937677

^aSefoksitin inhibisyon zon çapı ≥22 mm olan suşlar duyarlı, ≤ 21 mm olan suşlar dirençli olarak değerlendirilmiş 3 tekrarlı ölçümlerin ortalama değerleri; ^bOksasilin inhibisyon zon çapı ≥13 mm olan suşlar duyarlı, ≤ 10 mm olan suşlar dirençli olarak değerlendirilmiş 3 tekrarlı ölçümlerin ortalama değerleri; ^c MİK değeri ≤ 2 µg mL⁻¹ ise suşlar duyarlı, ≥ 6 µg mL⁻¹ ise suşlar dirençli kabul edilmiş 3 tekrarlı ölçümlerin ortalama değerleri; DD, disk difüzyon; MİK, minimal inhibitör konsantrasyonu; +, pozitif; -, negatif; 16S rRNA, 16S ribosomal RNA; EMBL, European Molecular Biology Laboratory.

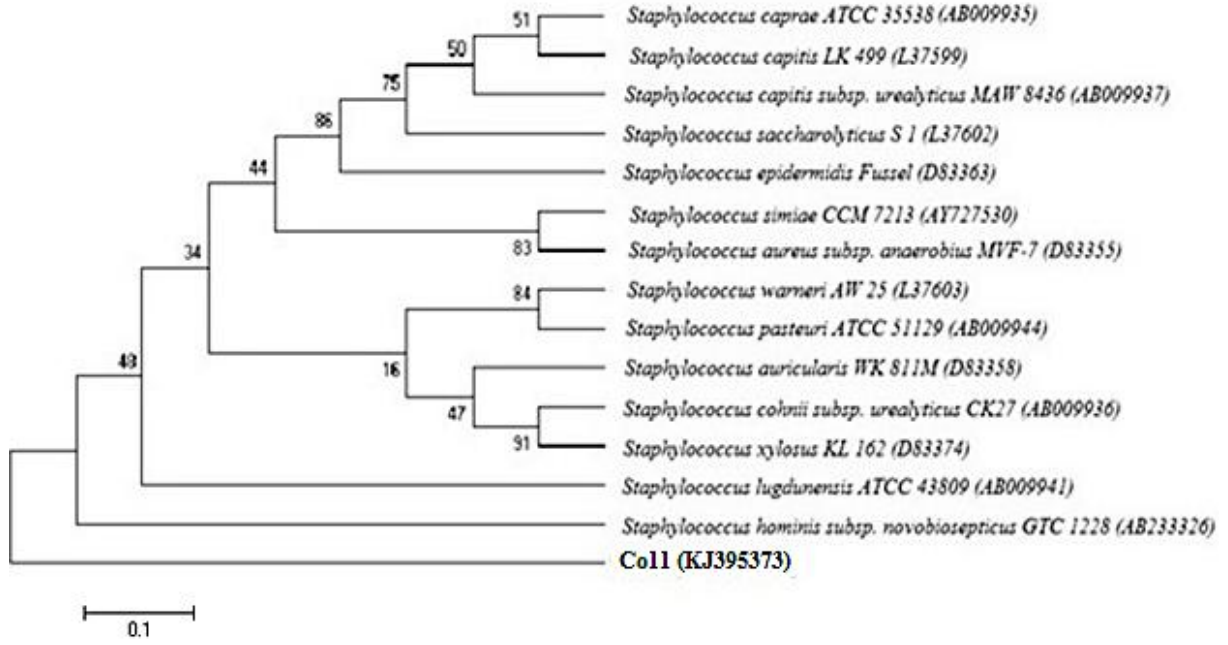
Metisilin dirençli suşların filogenetik ağaçları, 16S rRNA sekans dizileri kullanılarak komşu- bağlantı ağacı (neighbour-joining) metodu ile çizilmiştir (Şekil 4.3-4.14). Metisilin dirençli suşların 16S rRNA bölgelerine göre sıralanan dizilerin Mega 5.2 programında uzaklık matriksine dayalı olarak "neighbour-joining tree" oluşturulmuştur. Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu (ağacın güvenilirliği) istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı "bootstrap" (seç-bağla) analizi yapılmıştır. Soyağacın da birbirlerinden en fazla uzakta yer alan izolatlar soy ağacın da evrimsel olarak birbirlerine en uzak türler olarak belirlenmiştir.



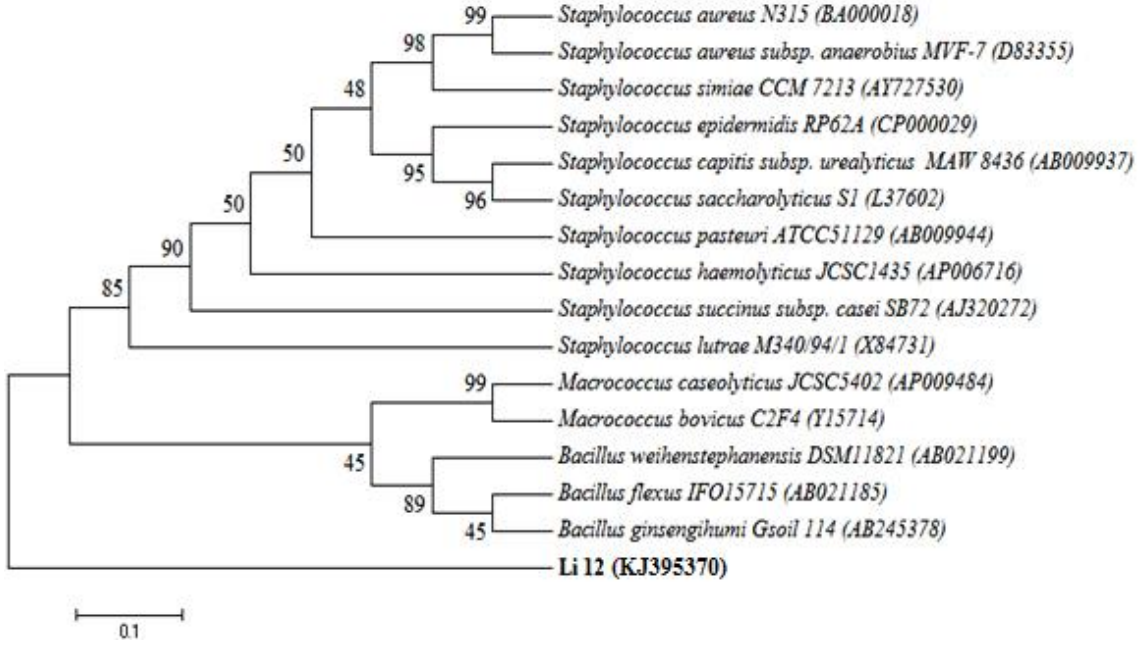
Şekil 4.3. A111 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



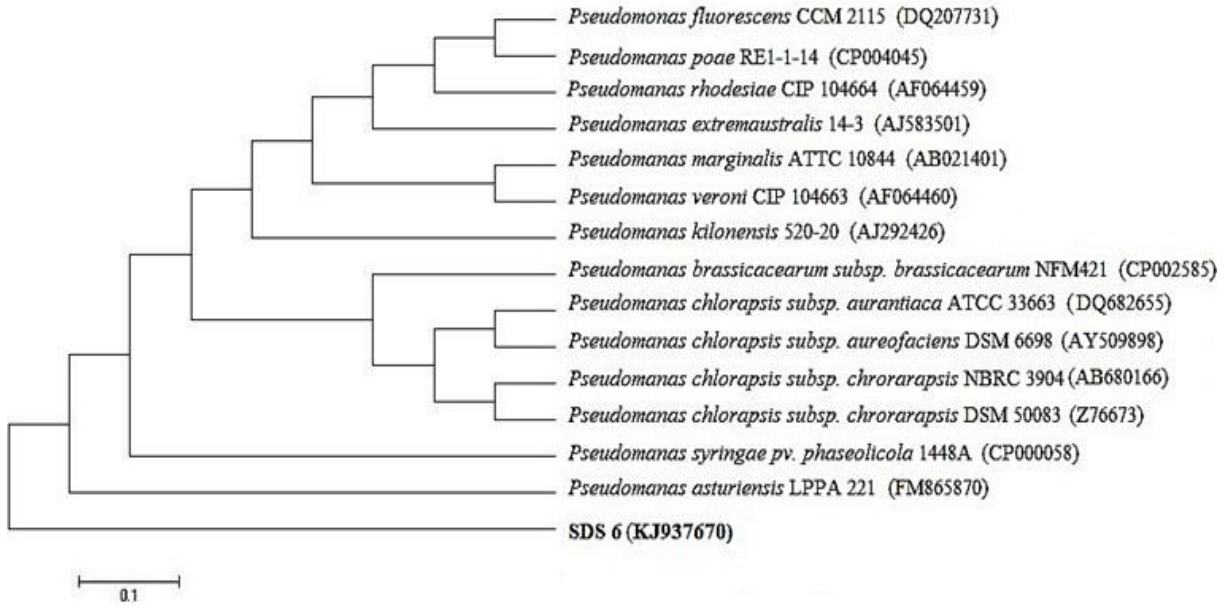
Şekil 4.4. Ba01 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



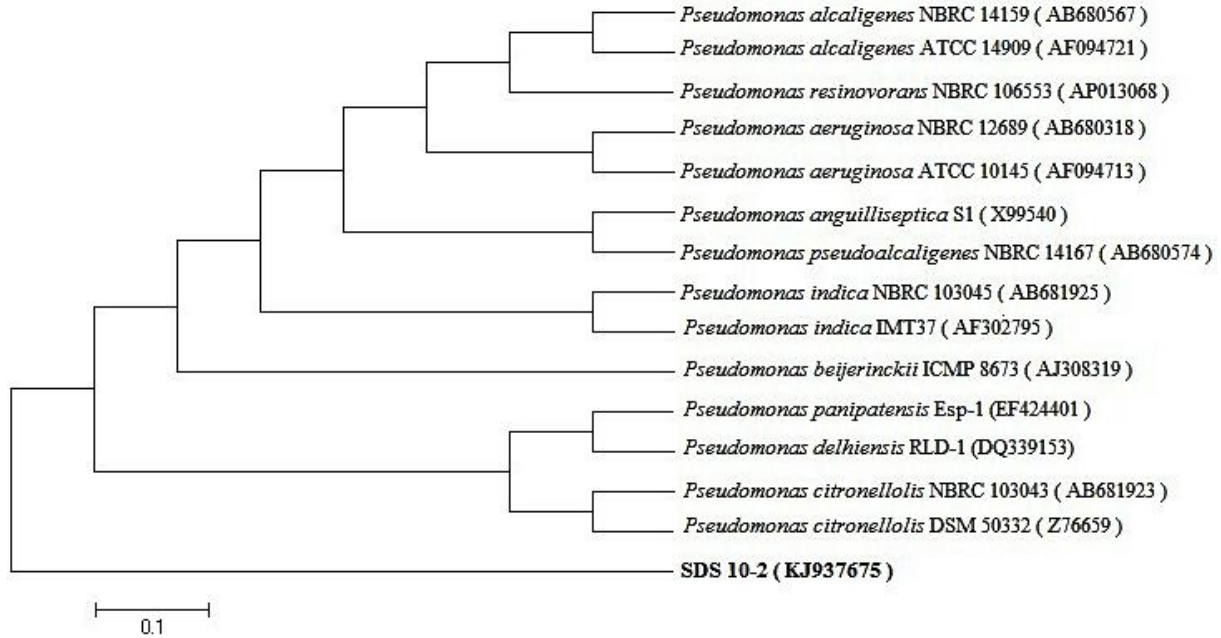
Şekil 4.5. Co11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.)



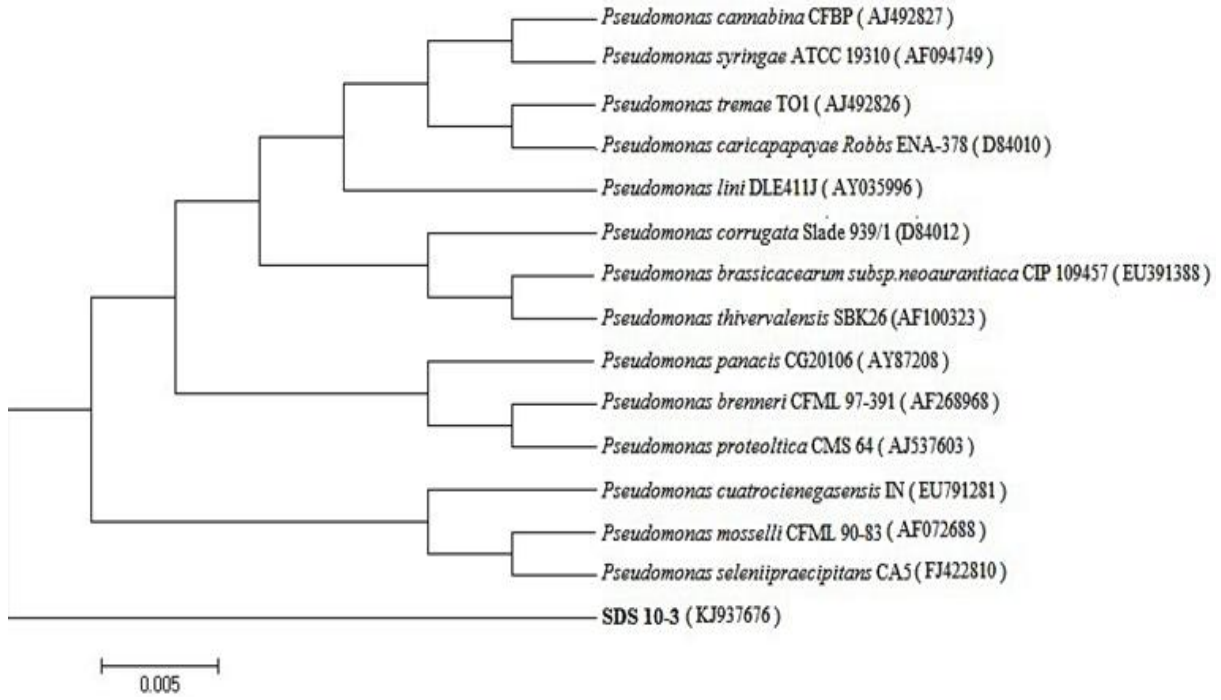
Şekil 4.6. Li12 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.)



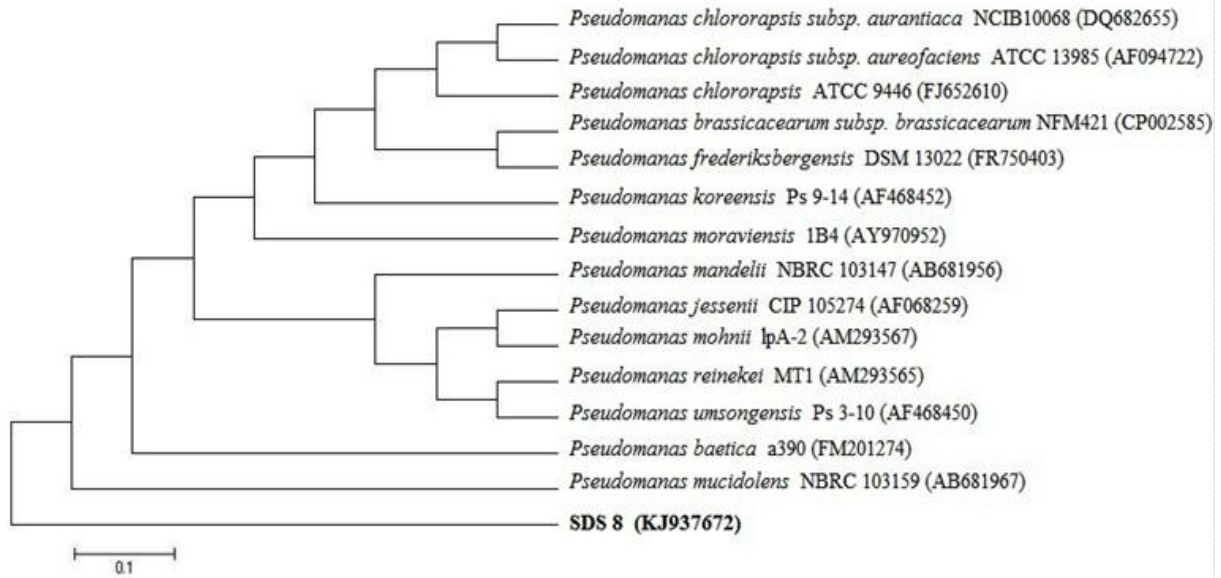
Şekil 4.7. SDS6 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



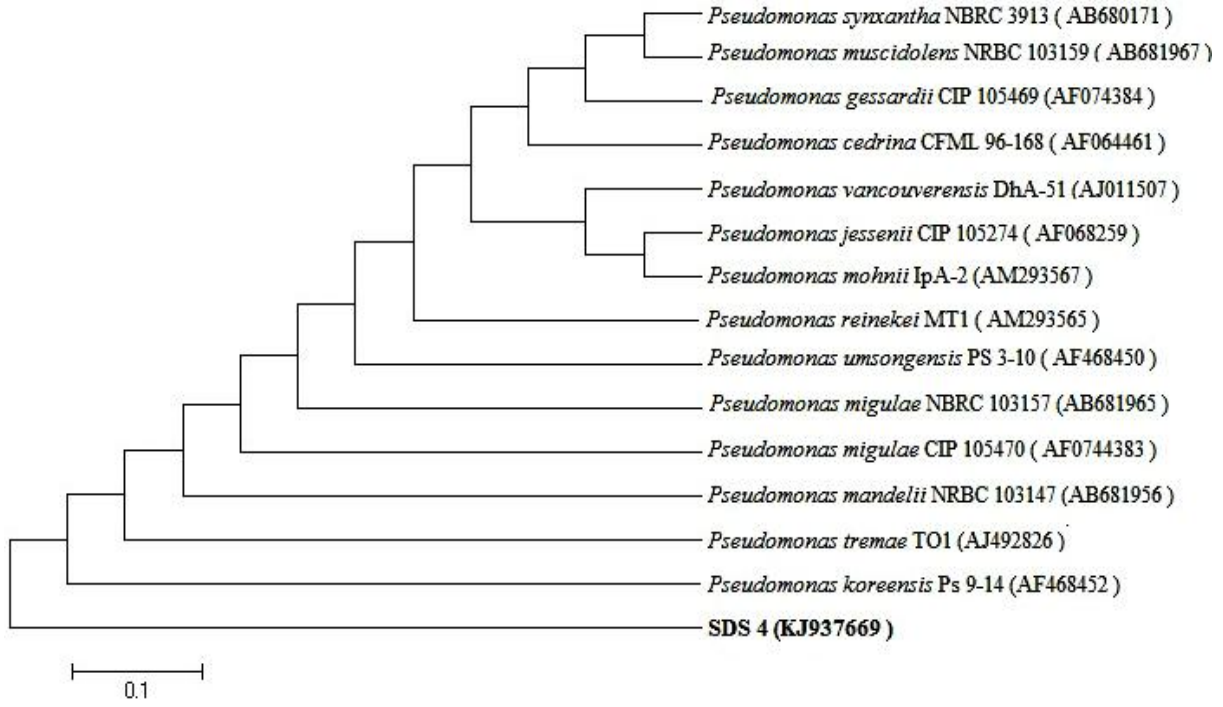
Şekil 4.8. SDS10-2 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



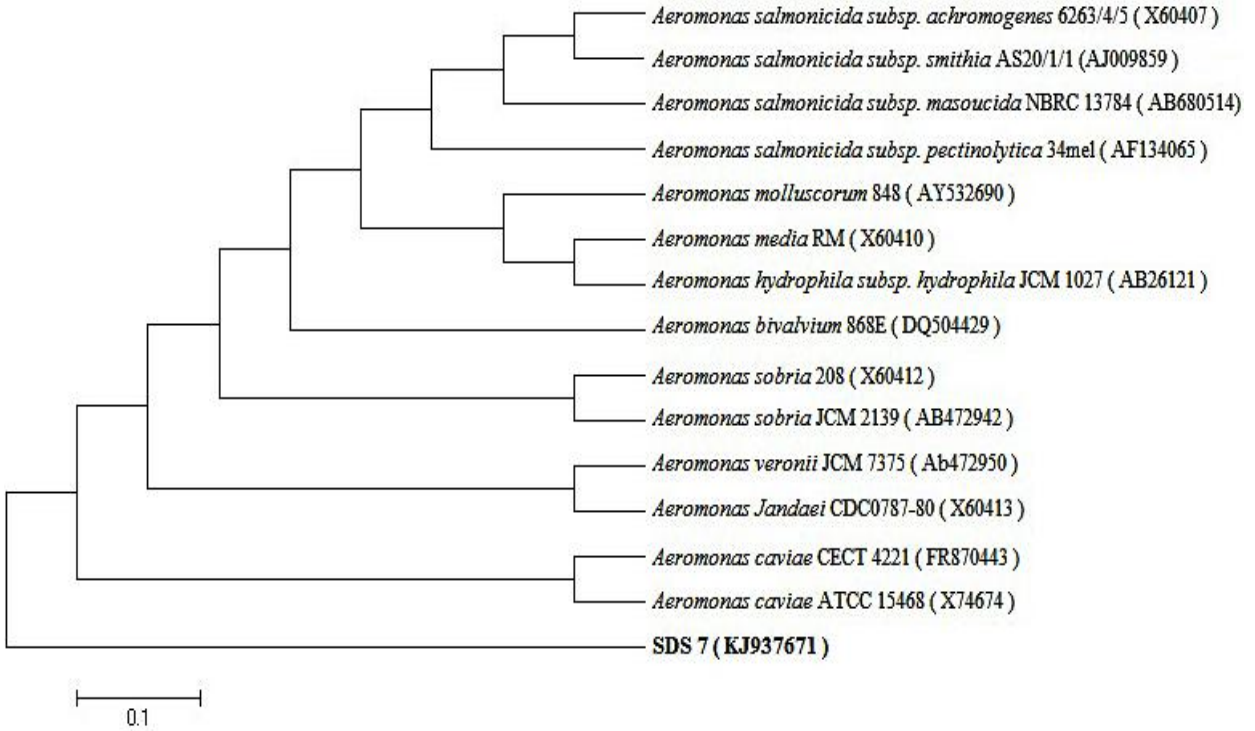
Şekil 4.9. SDS10-3 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



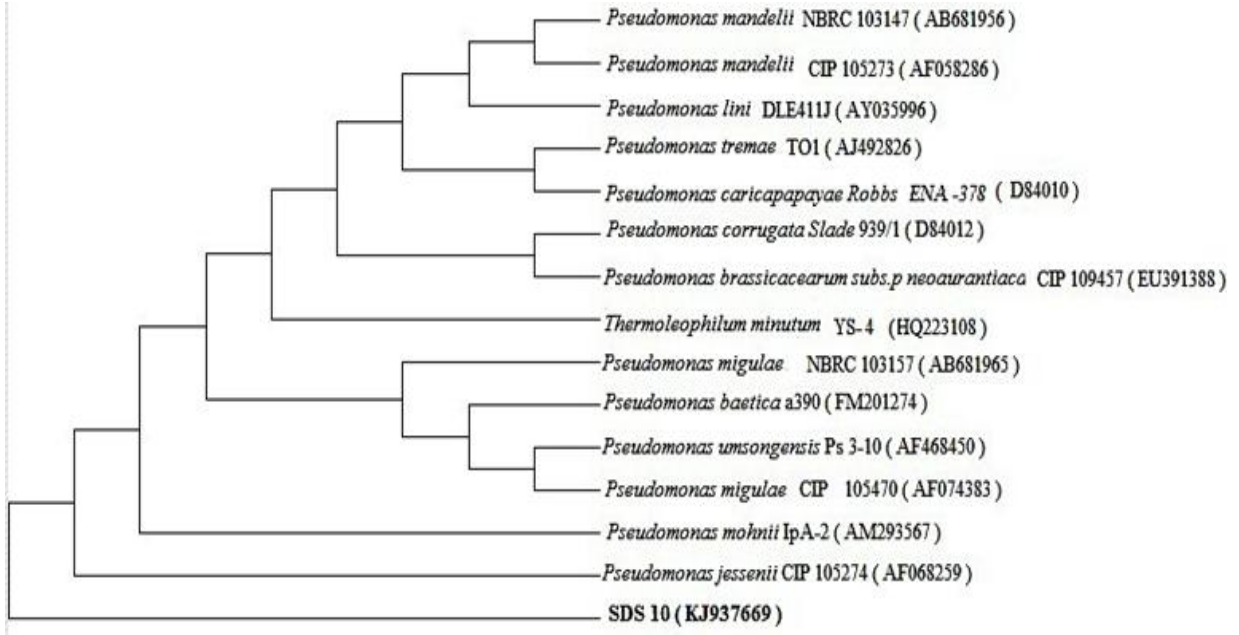
Şekil 4.10. SDS8 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



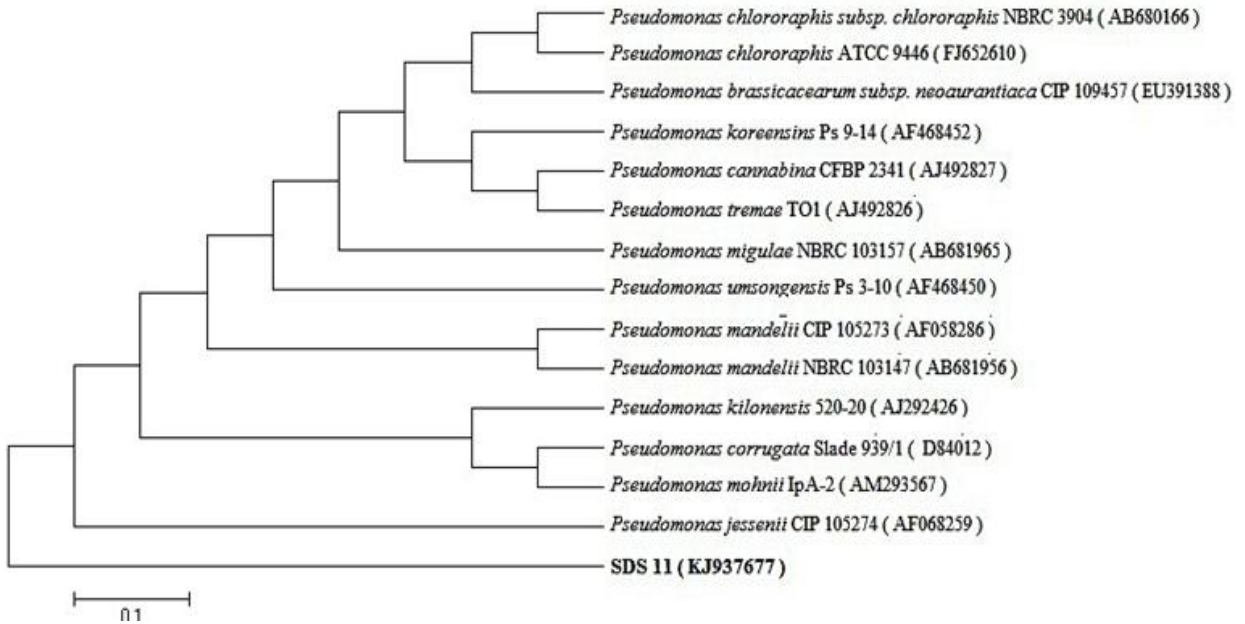
Şekil 4.11. SDS4 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



Şekil 4.12. SDS7 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



Şekil 4.13. SDS10 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)

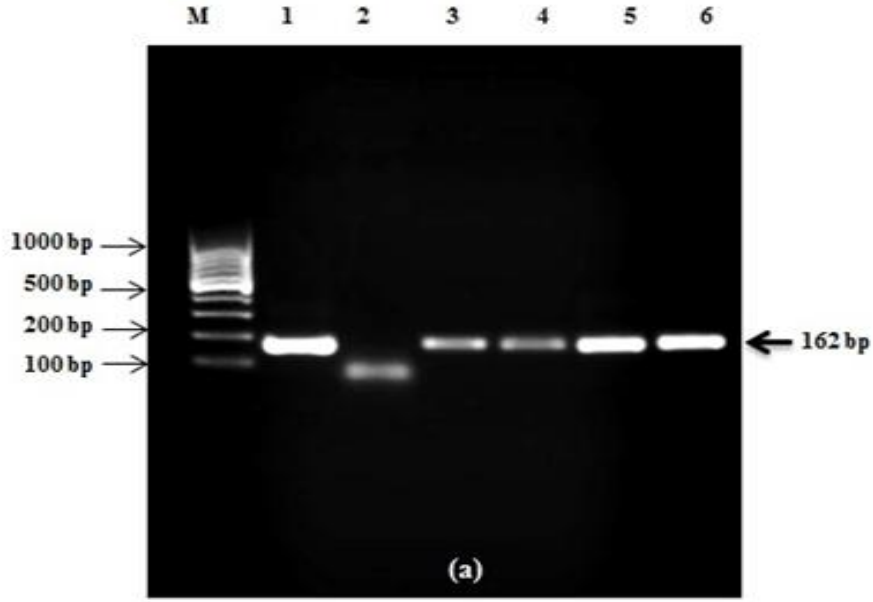


Şekil 4.14. SDS11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)

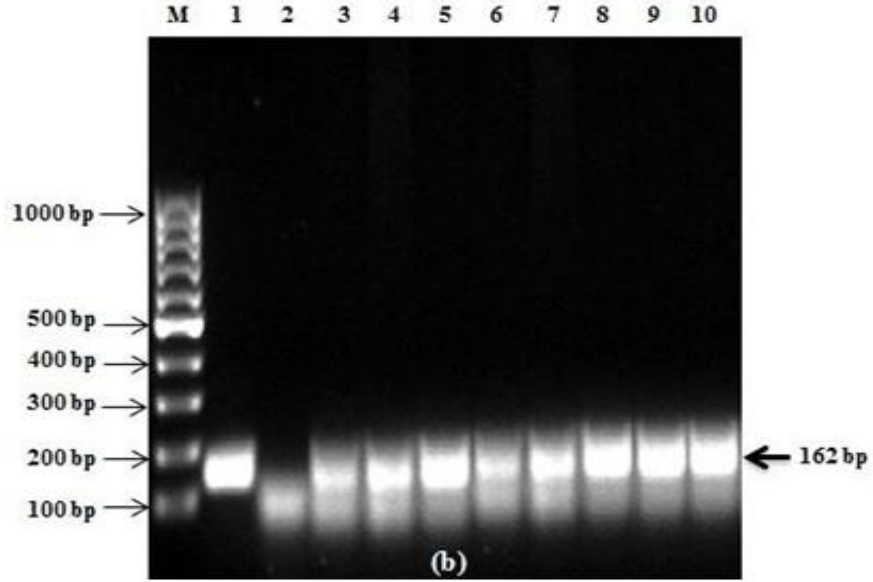
Bizim çalışmalarımız, *mecA* geninin sadece metisilin dirençli stafilokok suşlarında (MRS) değil stafilokok olmayan suşlarda da bulunduğunu göstermiş olup Kassem vd. (2008), Baba vd. (2009), Ito vd. (2012) tarafından bu konuyla ilgili yapılan önceki çalışmaları doğrulamıştır. Elde ettiğimiz veri sonucunda *mecA* geni, ilk kez *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türlerinde tespit edilmiştir. *Pseudomonas* türleri su ve toprak kaynaklıdır. *Aeromonas* türleri ise, taze ve tuzlu su, kanalizasyon ve atık su gibi doğal habitatlarda yaygındır (Araoju vd., 1991). Bu tür yüzey sularında stafilokok dışında diğer tür izolatlarında, *mecA* geninin, gen aktarım yoluyla ile metisilin dirençliliği gelişebilmektedir. Aslında metisiline duyarlı olan bakteriler, metisiline maruz kalmış *mecA* genini taşıyan bakterilerden bu geni alabilmektedirler. Yüzey sularında *mecA* geni plazmidler, bakteriyofajlar, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genlerin üzerinde konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon gibi mekanizmalar ile aktarılabilmektedir (Roy, 1999). Bu nedenle yüzey suyu izolatları arasında *mecA* geninin aktarımı mümkün olabilmektedir. *mecA* geninin aktarımı yüzey sularında metisilin dirençli bakterilerin yaygınlaşmasına neden olabilmektedir. Doğal çevrede *mecA*'nın yaygın olarak bulunduğunun tespit edilmesi, enfeksiyonların ve enfekte olan insanlarla olan yayılımın takip edilmesini kolaylaştıracaktır (Pertel vd., 2008).

4.5 *mecA* Geninin Varlığının PZR ile Tesbiti

Metisilin dirençliliği belirlenen suşlarda *mecA* geninin varlığı PZR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.15a ve 4.15b'de görüldüğü gibi PZR sonucunda elde edilen amplikonların boyutları 100 bp'lik marker ile 162 bp'lik *mecA* gen bölgesi karşılaştırılmıştır. Stafilokok olan ve stafilokok olmayan tüm metisilin dirençli suşlarda metisilin direncinden sorumlu 162 bp'lik *mecA* gen bölgesi tespit edilmiştir. Bütün sonuçlar, metisilin dirençli *S. aureus* ATCC33591 ve metisilin duyarlı *S. aureus* ATCC25922 American Type Culture Collection (ATCC) kontrol suşları ile karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir.



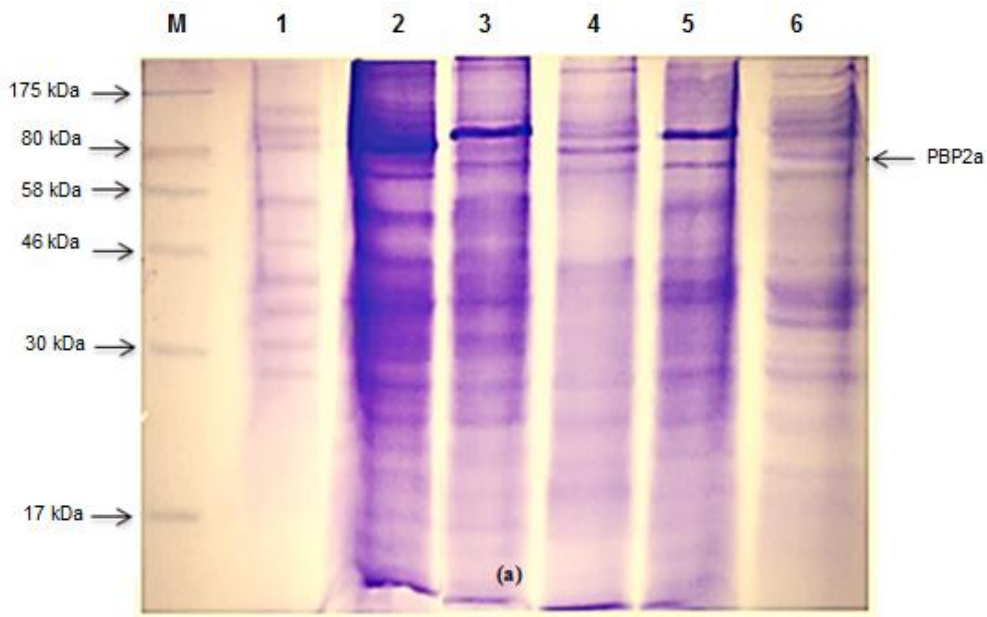
Şekil 4.15a. *mecA* geni taşıyan stafilokok izolatları: *S. aureus* ATCC33591 (pozitif kontrol) 1, *S. aureus* ATCC 25922 (negatif kontrol) 2, *S. aureus* Al11 3, *S. aureus* Ba01 4, *S. warneri* Co11 5, *S. aureus* Li2 6, Marker Gen Ruler (100-1000 bp).



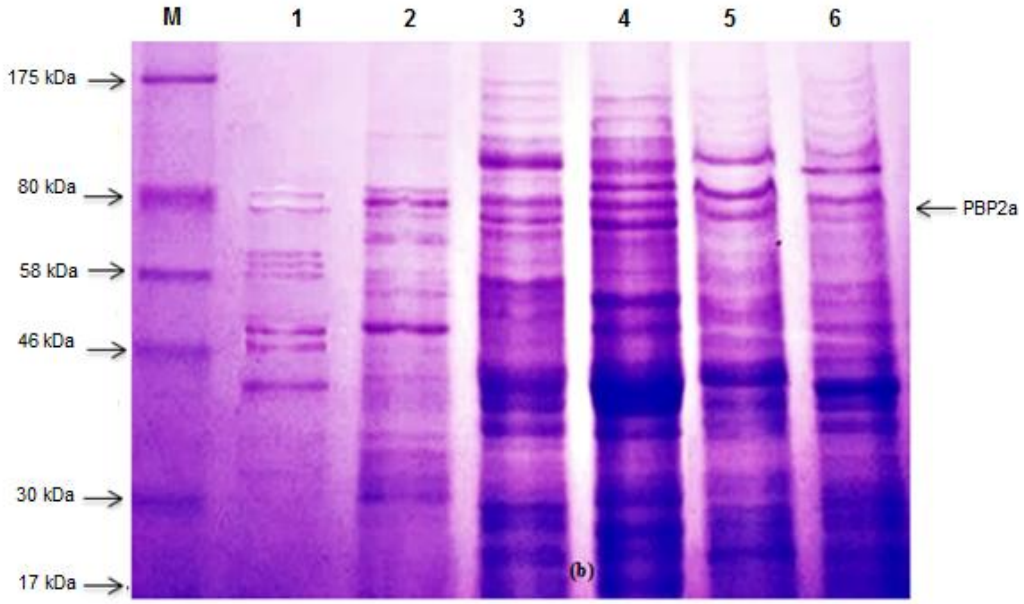
Şekil 4.15b. *mecA* geni taşıyan stafilokok olmayan izolatlar: *S. aureus* ATCC33591 (pozitif kontrol) 1, *S. aureus* ATCC 25922 (negatif kontrol) 2, *P. fluorescens* SDS6 3, *P. resinovorans* SDS10-2 4, *P. corrugate* SDS10-3 5, *P. baetica* SDS8 6, *P. koreensis* SDS4 7, *A. veronii* SDS7 8, *P. migulae* SDS10 9, *P. kilonensis* SDS11 10. M, Marker Gen Ruler (100-1000 bp).

4.6 Bakterilerde PBP2a Proteinini Analizi

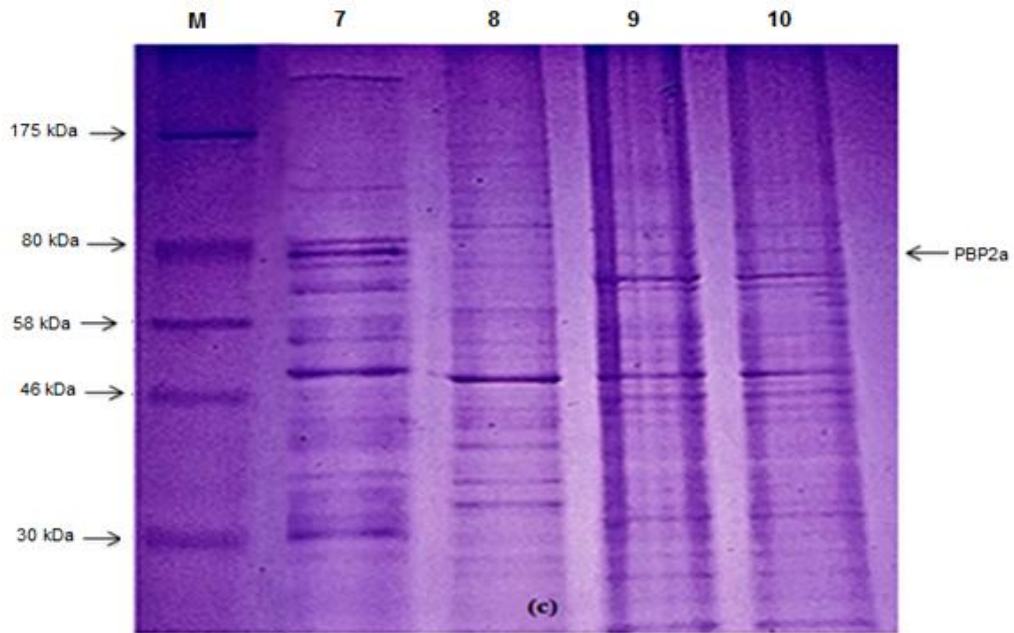
Metisilin dirençli stafilokoklarda, *mecA* geni penisilin bağlayan bir protein olan PBP2a'nın sentezlenmesinden sorumludur. PBP2a'nın beta laktam antibiyotikere affinitesi düşüktür. Bu nedenle metisilin dirençli bir stafilokok beta laktam antibiyotiklerle karşılaştığında PBP2a düşük affinite nedeni ile beta laktam antibiyotiği bağlayamaz, hücre duvar sentez fonksiyonunu sürdürür (10). Şekil 4.16a, 4.16b ve 4.16c'de görüldüğü gibi SDS-PAGE analizi sonucu stafilokok olan ve stafilokok olmayan suşlarda yaklaşık 75 kDa ağırlığında olan PBP2a proteini varlığı gösterilmiştir. *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *Neisseria meningitides*, *Streptococcus pneumonia*, *Aquifex aeolicus*, ve *Escherichia coli* gibi önemli suşlarda β -laktamlara direncin PBP2a'ların ekspresyonu ile olduğu belirlenmiştir (Zapun vd., 1993; Yuan vd., 2008; Sung vd., 2009).



Şekil 4.16a. SDS-PAGE PBP2a protein analizi (a) stafilokok izolatları: *S. aureus* ATCC 25922 (negatif kontrol) 1, *S. aureus* ATCC33591 (pozitif kontrol) 2, *S. aureus* Al11 3, *S. aureus* Ba01 4, *S. warneri* Co11 5, *S. aureus* Li12 6, M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa).



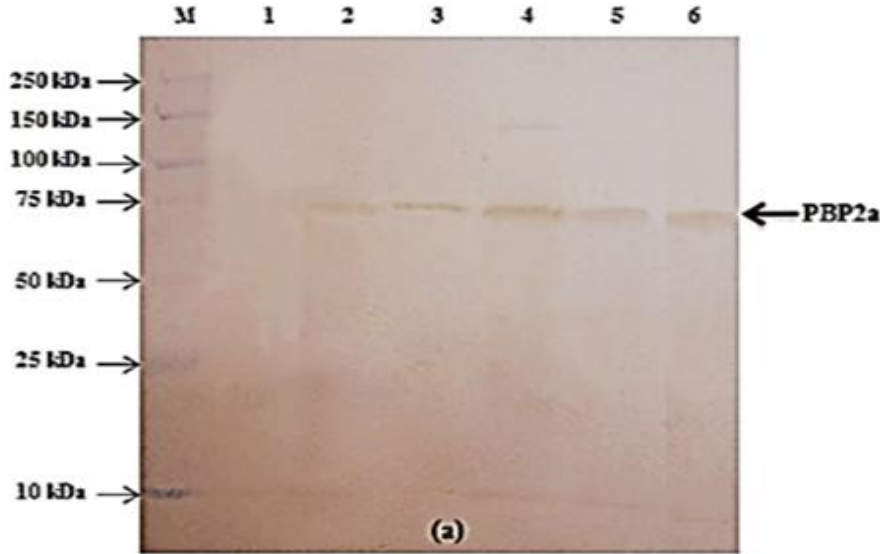
Şekil 4.16b. SDS-PAGE PBP2a protein analizi (b) stafilokok olmayan izolatlar: *S. aureus* ATCC 25922 (negatif kontrol) 1, *S. aureus* ATCC33591 (pozitif kontrol) 2, *P. fluorescens* SDS6 3, *P. resinovorans* SDS10-2 4, *P. corrugate* SDS10-3 5, *P. baetica* SDS8 6, M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa).



Şekil 4.16c. SDS-PAGE PBP2a protein analizi (c) stafilokok olmayan izolatlar: *P. koreensis* SDS4 7, *A. veronii* SDS7 8, *P. migulae* SDS10 9, *P. kilonensis* SDS11 10, M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa).

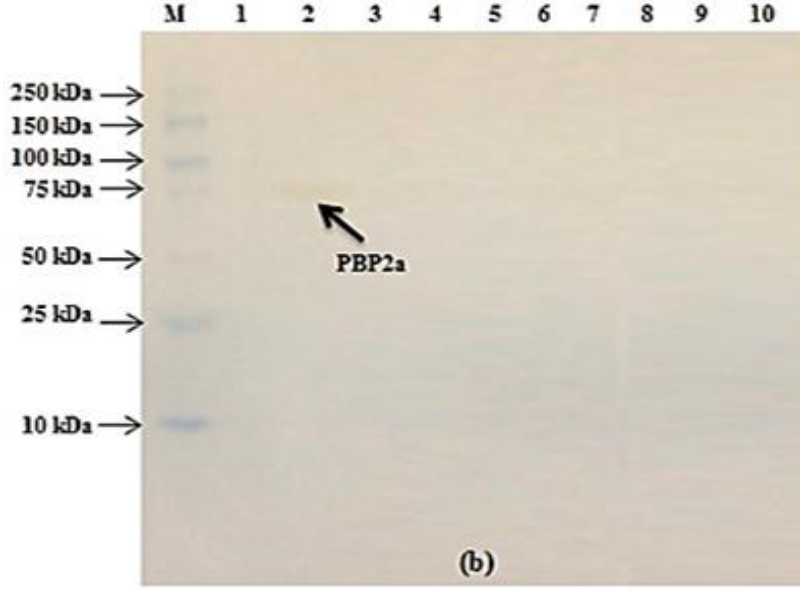
4.7 Western Blot Analizi ile PBP2a'nın Belirlenmesi

Metisilin dirençli stafilokoklarda, PBP2a'nın ekspresyonu Western Blot Analizi yapılarak kontrol edilmiştir. Şekil 4.17a'da Anti-PBP2a rabbit antitodü ve anti-rabbit HRP-conjugated IgG antitodü kullanılarak PBP2a proteinlerinin lokalizasyonu gösterilmiştir. Yaklaşık 75 kDa ağırlığında olan PBP2a proteini sadece 4 Metisilin dirençli stafilokok (MRS) suşunda tespit edilmiştir. *S. aureus* normalde kolayca antikorlar tarafından tanınabilen bakteri hücre duvarının dış yüzeyine bağlanabilen dört PBP's enzimi üretir (Roth vd., 2006). Ancak Stegger vd. (2012) homolog mec genleri arasındaki nükleotid farklılığının derecesinin önemli olduğunu, PBP2a'yı tespit etmek için geçerli tanı testleri kullanıldığında olumsuz sonuçlar verebileceğini ve bu yüzden potansiyel bir halk sağlığı sorunu teşkil edebileceğini belirtmişlerdir.



Şekil 4.17a. Stafilokok izolatlarında Western Blot PBP2a protein analizi: *S. aureus* ATCC 25922 (negatif kontrol) 1, *S. aureus* ATCC33591 (pozitif kontrol) 2, *S. aureus* AI11 3, *S. aureus* Ba01 4, *S. warneri* Co11 5, *S. aureus* Li12 6. M, Precision Plus Protein WesternC Standards Marker (10-250 kDa).

Metisilin dirençli pseudomonadlarda da PBP2a'nın ekspresyonu Western Blot Analizi yapılarak kontrol edilmiştir. Şekil 4.17b'de görüldüğü gibi pseudomonadlarda PBP2a spesifik antitodü olan anti-PBP2a rabbit antitodü ile PBP2a proteinleri belirlenmesi mümkün olmamıştır. Bu durum ticari olarak piyasada bulunan ve kullanılan antikorların stafilokok spesifik olarak üretilmiş olmalarından dolayı stafilokok olmayan PBP2a proteini taşıyıcılarının tespitinde yetersiz kaldığını ortaya çıkarmıştır.



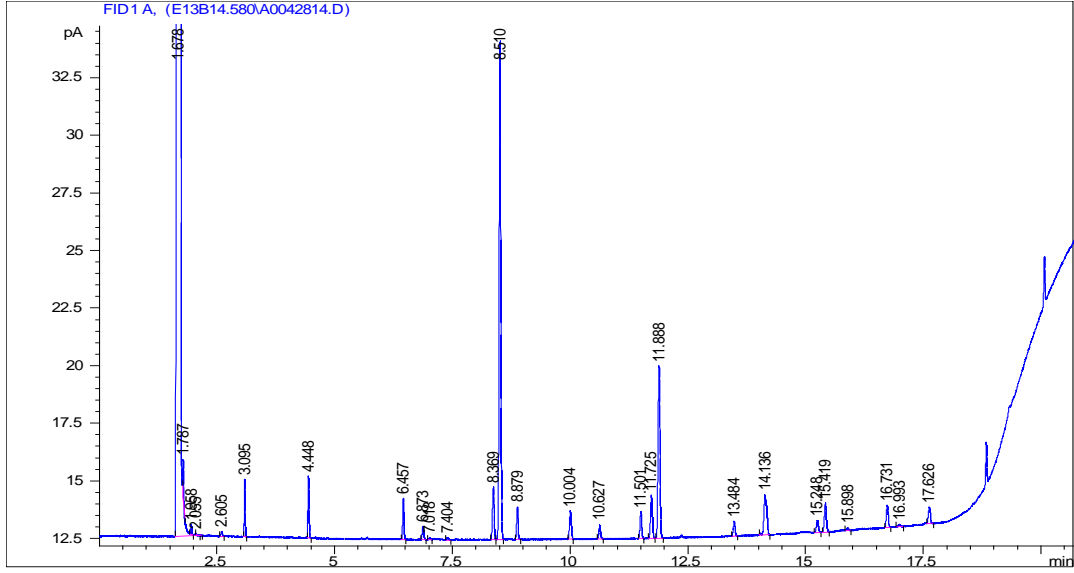
Şekil 4.17b. SDS-PAGE PBP2a protein analizi (b) stafilokok olmayan izolatlar: *S. aureus* 90123 (pozitif kontrol) 1, *S. aureus* ATCC 25922 (negatif kontrol) 2, *P. fluorescens* SDS6 3, *P. resinovorans* SDS10-2 4, *P. corrugate* SDS10-3 5, *P. baetica* SDS8 6, *P. koreensis* SDS4 7, *A. veronii* SDS7 8, *P. migulae* SDS10 9, *P. kilonensis* SDS11 10, M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa).

4.8 Yağ Asiti Metil Esteri Analizi (FAME) ile İdentifikasyon

Bu analiz metisilin dirençli bakterileri yine moleküler düzeyde tanımlama için kullanılmıştır.

4.8.1 AI11 Kodlu Suşun FAME Analizi;

AI11 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları Tablo 4.3'te ve GC kromatogramı Şekil 4.18'de verilmiştir. AI11 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 46.99 oranında C_{15:0} anteiso, % 18.32 oranında C_{17:0} anteiso içerdiği belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucu AI11 kodlu suş 0.271 similarity indeks (SI) değeri ile *Staphylococcus cohnii* olarak tanımlanmıştır.



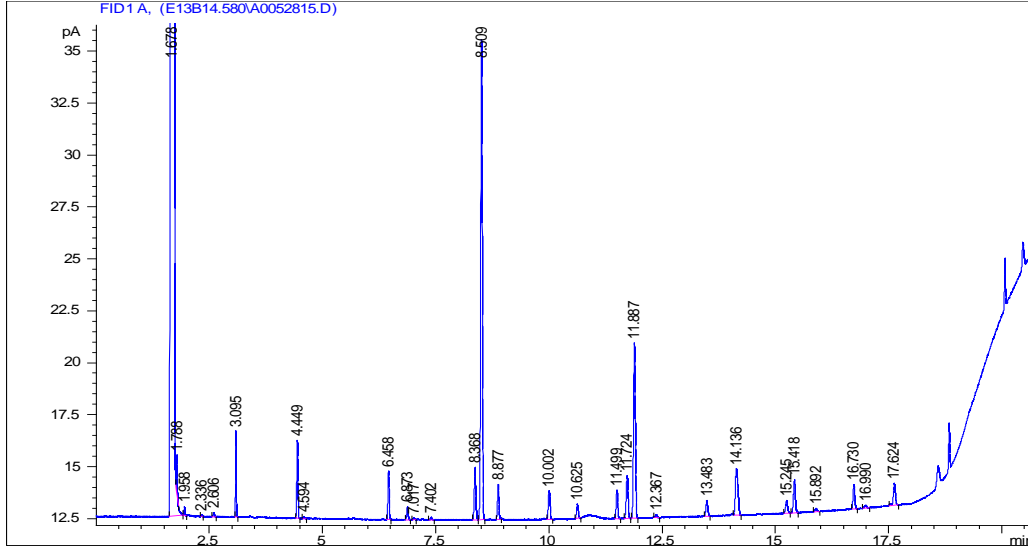
Şekil 4.18. Al11 kodlu suşa ait GC kromotogramı

Tablo 4.3. Al11 kodlu izolata ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Perce	Comment1	Comment2
1.678	3.796E+8	0.026	----	7.009	SOLVENT	----	< min rt	
1.787	5059	0.022	----	7.222		----	< min rt	
1.958	1302	0.025	----	7.554		----	< min rt	
2.055	138	0.022	----	7.744		----	< min rt	
2.605	748	0.029	----	8.814		----	< min rt	
3.095	6619	0.021	----	9.769		----		
4.448	8616	0.026	----	11.566		----		
6.457	7187	0.032	----	13.318		----		
6.873	2595	0.035	0.960	13.618	14:0 ISO	1.17	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
7.018	227	0.024	----	13.722		----		
7.404	445	0.032	0.947	14.001	14:0	0.20	ECL deviates 0.001	Reference 0.000
8.369	11457	0.040	0.931	14.623	15:0 ISO	5.00	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
8.510	107925	0.038	0.929	14.714	15:0 ANTEISO	46.99	ECL deviates 0.001	Reference 0.000
8.879	6174	0.035	0.924	14.952	unknown 14.959	2.67	ECL deviates -0.007	
10.00	6369	0.041	0.915	15.626	16:0 ISO	2.73	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
10.62	3211	0.042	0.912	15.998	16:0	1.37	ECL deviates -0.002	Reference -0.004
11.50	5780	0.039	0.909	16.501	15:0 3OH	2.46	ECL deviates -0.002	
11.72	10373	0.043	0.909	16.630	17:0 ISO	4.42	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
11.88	42987	0.048	0.909	16.724	17:0 ANTEISO	18.32	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
13.48	3384	0.044	0.910	17.631	18:0 ISO	1.44	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
14.13	14789	0.058	0.912	18.000	18:0	6.32	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
15.24	3029	0.044	0.915	18.634	19:0 ISO	1.30	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
15.41	7584	0.046	0.915	18.731	19:0 ANTEISO	3.25	ECL deviates 0.000	
15.89	536	0.039	0.917	19.005	19:0	0.23	ECL deviates 0.005	Reference 0.002
16.73	5269	0.044	----	19.484		----		
16.99	613	0.042	0.919	19.634	20:0 ISO	0.26	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
17.62	4298	0.049	0.920	19.998	20:0	1.85	ECL deviates -0.002	Reference -0.005

4.8.2 Ba01 Kodlu Suşun FAME Analizi

Ba01 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları Tablo 4.4'te ve GC kromotogramı Şekil 4.19'da verilmiştir. Ba01 kodlu suş % 44.84 oranında C_{15:0} anteiso, % 17.78 oranında C_{17:0} anteiso içermektedir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizinde Ba01 kodlu suşun 0.202 SI değeri ile *Staphylococcus cohnii* ile eşleştiği tespit edilmiştir.



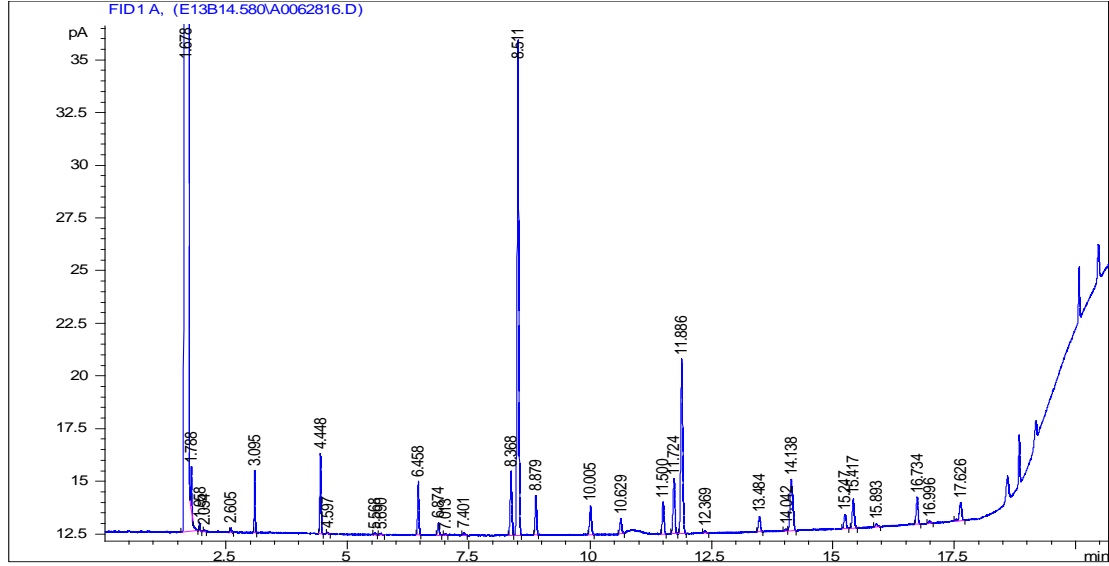
Şekil 4.19. Ba01 kodlu suşa ait GC kromotogramı

Tablo 4.4. Ba01 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Respons	Ar/H	RFac	ECL	Peak Name	Perce	Comment1	Comment2
1.678	3.793E+	0.02	----	7.00	SOLVENT	----	< min rt	
1.788	5152	0.02	----	7.22		----	< min rt	
1.958	1226	0.02	----	7.55		----	< min rt	
2.336	205	0.02	----	8.28		----	< min rt	
2.606	715	0.02	----	8.81		----	< min rt	
6.873	2949	0.03	0.96	13.6	14:0 ISO	1.17	ECL deviates	Reference -0.002
7.017	265	0.02	----	13.7		----		
7.402	569	0.03	0.94	14.0	14:0	0.22	ECL deviates	Reference -0.001
8.368	12392	0.04	0.93	14.6	15:0 ISO	4.78	ECL deviates	Reference -0.002
8.509	116359	0.03	0.92	14.7	15:0 ANTEISO	44.8	ECL deviates	Reference 0.000
8.877	7604	0.03	0.92	14.9	unknown	2.92	ECL deviates	
10.002	7380	0.04	0.91	15.6	16:0 ISO	2.80	ECL deviates	Reference -0.003
10.625	3555	0.04	0.91	15.9	16:0	1.34	ECL deviates	Reference -0.005
11.499	6954	0.04	0.90	16.5	15:0 3OH	2.62	ECL deviates	
11.724	11535	0.04	0.90	16.6	17:0 ISO	4.35	ECL deviates	Reference -0.002
11.887	47154	0.04	0.90	16.7	17:0 ANTEISO	17.7	ECL deviates	Reference -0.002
12.367	945	0.04	0.90	17.0	17:0	0.36	ECL deviates	Reference -0.002
13.483	4450	0.04	0.91	17.6	18:0 ISO	1.68	ECL deviates	Reference -0.004
14.136	18037	0.05	0.91	18.0	18:0	6.82	ECL deviates	Reference -0.003
15.245	3813	0.04	0.91	18.6	19:0 ISO	1.45	ECL deviates	Reference -0.004
15.418	9492	0.04	0.91	18.7	19:0 ANTEISO	3.60	ECL deviates	
15.892	1000	0.04	0.91	19.0	19:0	0.38	ECL deviates	Reference -0.001
16.730	6326	0.04	----	19.4		----		
16.990	791	0.03	0.91	19.6	20:0 ISO	0.30	ECL deviates	Reference -0.006
17.624	6723	0.04	0.92	19.9	20:0	2.57	ECL deviates	Reference -0.006

4.8.3 Li12 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

Li12 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Tablo 4.5'de ve GC kromotogramı Şekil 4.20'de verilmiştir. Li12 kodlu suş %43.59 oranında C_{15:0} anteiso, %17.87 oranında C_{17:0} anteiso içermektedir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizinde Li12 kodlu suşun 0.183 SI değeri ile *Staphylococcus cohnii* ile eşleştiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. Li12 kodlu suşu ait GC kromotogramı

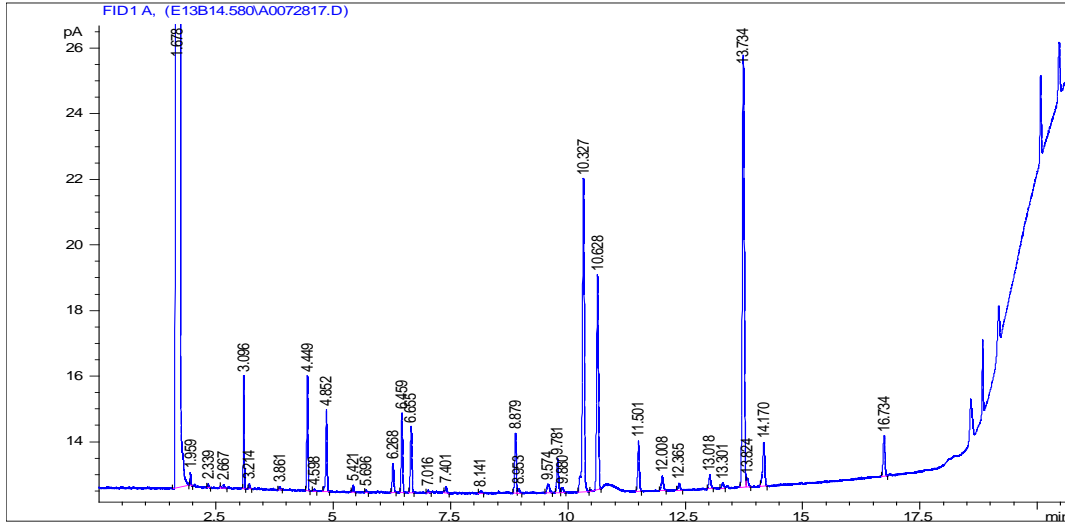
Tablo 4.5. Li12 kodlu suşu ait yağ asidi profilleri

RT	Respos	Ar/	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1.678	3.805E+	0.02	----	7.010	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.788	5613	0.02	----	7.224		----	< min rt	
1.958	1213	0.02	----	7.555		----	< min rt	
2.054	244	0.02	----	7.742		----	< min rt	
2.605	710	0.02	----	8.815		----	< min rt	
5.568	415	0.03	1.007	12.61	13:0 ISO	0.17	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
5.690	509	0.04	----	12.71		----		
6.458	9911	0.03	----	13.31		----		
6.874	2813	0.03	0.960	13.61	14:0 ISO	1.10	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
7.013	205	0.02	0.957	13.71	14:0 ANTEISO	0.08	ECL deviates 0.012	
7.401	497	0.03	0.947	13.99	14:0	0.19	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
8.368	14919	0.03	0.931	14.62	15:0 ISO	5.63	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
8.511	115704	0.03	0.929	14.71	15:0 ANTEISO	43.59	ECL deviates 0.002	Reference 0.000
8.879	8157	0.03	0.924	14.95	unknown 14.959	3.06	ECL deviates -0.007	
10.00	7113	0.04	0.915	15.62	16:0 ISO	2.64	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
10.62	3949	0.04	0.912	15.99	16:0	1.46	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
11.50	7363	0.03	0.909	16.50	15:0 3OH	2.72	ECL deviates -0.003	
11.72	13993	0.04	0.909	16.63	17:0 ISO	5.16	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
11.88	48472	0.04	0.909	16.72	17:0 ANTEISO	17.87	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
12.36	557	0.03	0.909	17.00	17:0	0.21	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
13.48	4093	0.04	0.910	17.63	18:0 ISO	1.51	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
14.04	508	0.03	----	17.94		----		
14.13	19489	0.05	0.912	18.00	18:0	7.21	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
15.24	4087	0.04	0.915	18.63	19:0 ISO	1.52	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
15.41	8540	0.04	0.915	18.73	19:0 ANTEISO	3.17	ECL deviates -0.001	
15.89	840	0.04	0.917	19.00	19:0	0.31	ECL deviates 0.002	Reference -0.001
16.73	6766	0.04	----	19.48		----		
16.99	510	0.04	0.919	19.63	20:0 ISO	0.19	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
17.62	5969	0.05	0.920	19.99	20:0	2.23	ECL deviates -0.002	Reference -0.005

4.8.4 Co11 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

Co11 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Tablo 4.6'da ve GC kromotogramı Şekil 4.21'de verilmiştir. Co11 kodlu suşun yağ asidi profilinin %34.69 oranında C_{18:1} w9c, %15.59 oranında C_{16:0} ve %5.18 oranında C_{12:0} içerdiği belirlenmiştir.

%23.95 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda Co11 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.



Şekil 4.21. Co11 suşuna ait GC kromotogramı

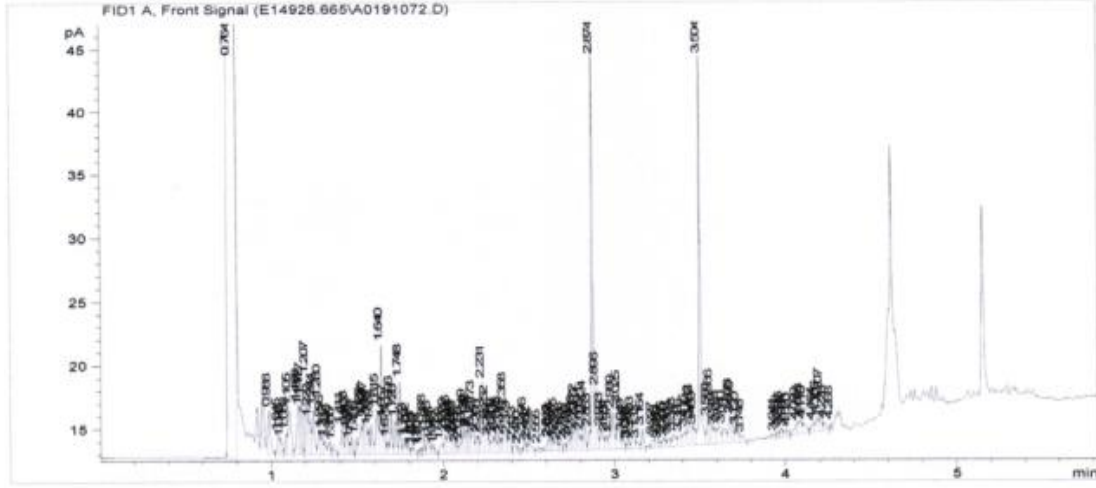
Tablo 4.6. Co11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Respons	Ar/	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1.678	3.788E+	0.02	----	7.009	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
3.214	546	0.02	1.232	10.00	10:0	0.33	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
3.861	436	0.03	1.134	10.91	Sum In Feature 2	0.24	ECL deviates 0.002	12:0 ALDE ?
4.852	10108	0.03	1.045	12.00	12:0	5.18	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
5.421	895	0.03	1.014	12.48	unknown 12.484	0.45	ECL deviates 0.005	
5.696	327	0.03	----	12.72		----		
6.268	3965	0.03	0.978	13.18	12:0 2OH	1.90	ECL deviates 0.005	
6.655	9128	0.03	0.966	13.46	12:0 3OH	4.33	ECL deviates 0.007	
7.401	946	0.04	0.947	14.00	14:0	0.44	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
8.141	397	0.03	0.934	14.47	Sum In Feature 1	0.18	ECL deviates -0.001	15:1 ISO I/13:0 3OH
8.879	8484	0.03	0.924	14.95	unknown 14.959	3.85	ECL deviates -0.005	
8.953	657	0.03	0.923	15.00	15:0	----	ECL deviates 0.001	
9.781	5466	0.04	0.916	15.49	Sum In Feature 2	2.46	ECL deviates 0.007	14:0 3OH/16:1 ISO I
9.880	775	0.03	0.915	15.55	16:0 N alcohol	0.35	ECL deviates 0.004	
10.32	53483	0.04	0.913	15.82	Sum In Feature 3	23.95	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.62	34870	0.04	0.912	16.00	16:0	15.59	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
11.50	7376	0.03	0.909	16.50	15:0 3OH	3.29	ECL deviates 0.000	
12.00	2670	0.04	0.909	16.79	17:1 w8c	1.19	ECL deviates 0.002	
12.36	1208	0.04	0.909	17.00	17:0	0.54	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
----	397	---	----	----	Summed Feature 1	0.18	15:1 ISO H/13:0 3OH	13:0 3OH/15:1 i I/H
----	----	---	----	----		----	15:1 ISO I/13:0 3OH	
----	5902	---	----	----	Summed Feature 2	2.70	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
--	53483	---	----	----	Summed Feature 3	23.95	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO

4.8.5 SDS3 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

SDS3 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Tablo 4.7'de ve GC kromotogramı Şekil 4.22'de verilmiştir. SDS3 kodlu suşunda en fazla bulunan yağ asitleri % 5.51 oranında 10:0 iso, % 3.39 oranında 8:0 3OH, % 2.82 oranında 11:0 iso 3OH ve % 2.57

12:0 olarak belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda SDS3 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.



Şekil 4.22. SDS3 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

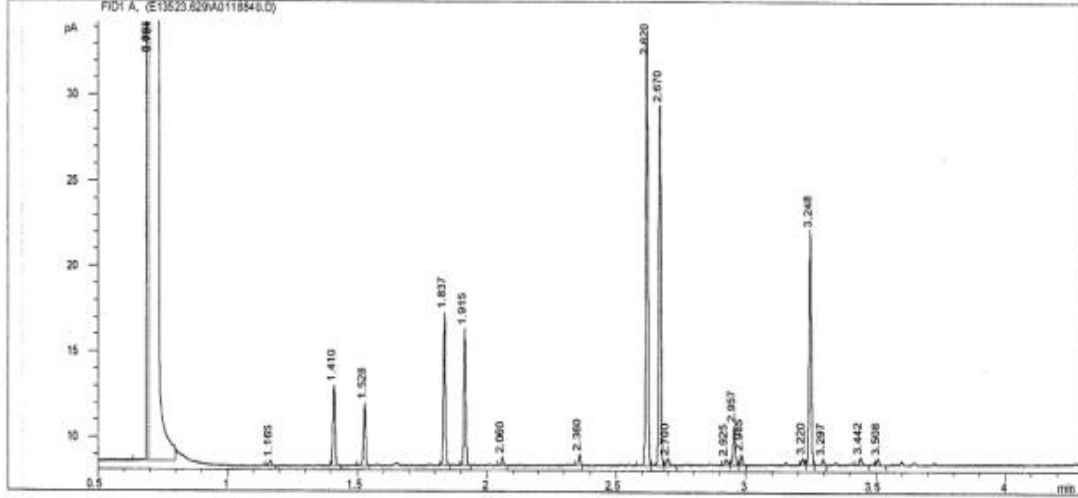
Tablo 4.7. SDS3 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.7639	6.656E+8	0.016	----	6.6804	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.9882	7029	0.015	----	8.1731		----	< min rt	
1.0453	3147	0.015	----	8.5477		----	< min rt	
1.0597	1542	0.010	----	8.6426		----	< min rt	
1.0882	2252	0.010	----	8.8298		----	< min rt	
1.1051	8590	0.018	----	8.9408		----	< min rt	
1.1577	7115	0.013	----	9.2865		----		
1.1662	3250	0.007	----	9.3426		----		
1.1767	5552	0.010	1.114	9.4114	8:0 3OH	3.39	ECL deviates -0.001	
1.2075	9097	0.011	1.105	9.6138	10:0 iso	5.51	ECL deviates -0.002	Reference -0.015
1.2221	4633	0.014	----	9.7101		----		
1.2441	6207	0.013	----	9.8547		----		
1.4428	1856	0.008	----	10.9183		----		
1.4566	947	0.007	1.053	10.9899	11:0	0.55	ECL deviates -0.010	Reference -0.018
1.4680	3647	0.009	----	11.0420		----		
1.5653	2129	0.008	1.039	11.4595	10:0 3OH	1.21	ECL deviates 0.012	
1.5809	3917	0.012	----	11.5264		----		
1.6146	7260	0.016	----	11.6710		----		
1.6399	12273	0.011	----	11.7798		----		
1.6574	3662	0.011	----	11.8548		----		
1.6745	1435	0.010	1.025	11.9285	12:1 at 11-12	0.81	ECL deviates 0.003	
1.6957	4585	0.011	1.023	12.0176	12:0	2.57	ECL deviates 0.018	Reference 0.013
1.7198	5041	0.015	1.021	12.1079	11:0 iso 3OH	2.82	ECL deviates 0.000	
1.7478	7230	0.010	----	12.2129		----		
1.7724	2166	0.014	----	12.3052		----		
1.7919	1857	0.012	----	12.3781		----		
1.8144	604	0.010	1.012	12.4625	11:0 3OH	0.33	ECL deviates -0.003	
1.8245	856	0.014	----	12.5005	unknown 12.502	----	ECL deviates -0.001	
1.8565	383	0.009	1.009	12.6205	13:0 iso	0.21	ECL deviates -0.002	Reference -0.006
1.8711	581	0.010	----	12.6751		----		
1.8881	2154	0.009	----	12.7391		----		
1.9160	3112	0.017	----	12.8436		----		
1.9350	1171	0.011	----	12.9147		----		
1.9488	599	0.010	1.001	12.9667	13:1 at 12-13	0.33	ECL deviates 0.009	
1.9884	1777	0.015	----	13.1054		----		
2.0657	1357	0.008	----	13.3695		----		
2.0771	661	0.008	----	13.4086		----		
2.0983	1426	0.012	0.992	13.4809	12:0 3OH	0.77	ECL deviates -0.002	
2.1186	3870	0.013	----	13.5502		----		
2.1324	2089	0.009	----	13.5976	unknown 13.591	----	ECL deviates 0.007	
2.1415	1887	0.008	0.989	13.6288	14:0 iso	1.02	ECL deviates 0.001	Reference -0.001

4.8.6 SDS4 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

SDS4 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Tablo 4.8'de ve GC kromatogramı Şekil 4.23'te verilmiştir. SDS4 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 22.9 oranında 16:0, % 9.93 12:0 2OH, % 8.80 oranında 12:0 3OH ve % 6.00 oranında 10:0 3OH içerdiği

belirlenmiştir. % 26.9 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda SDS4 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.



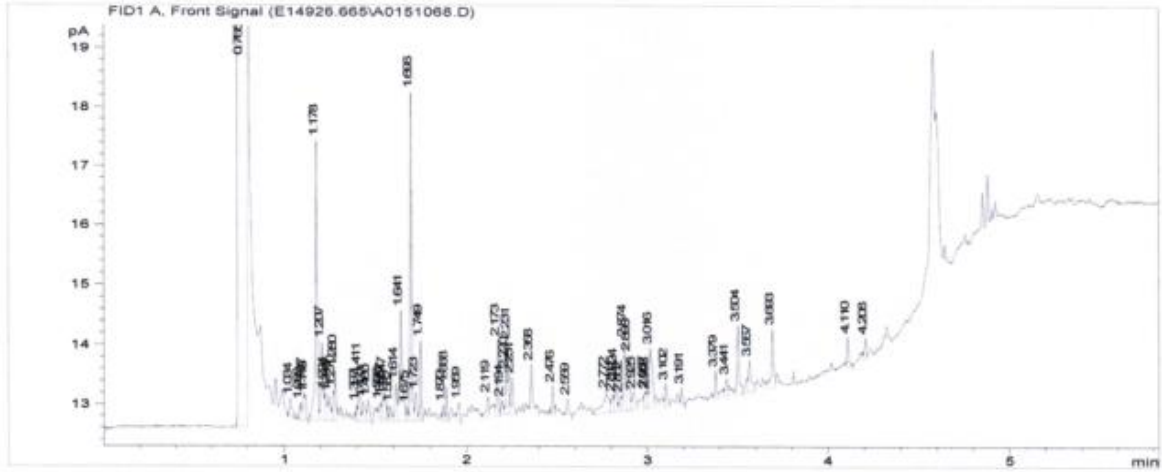
Şekil 4.23. SDS4 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

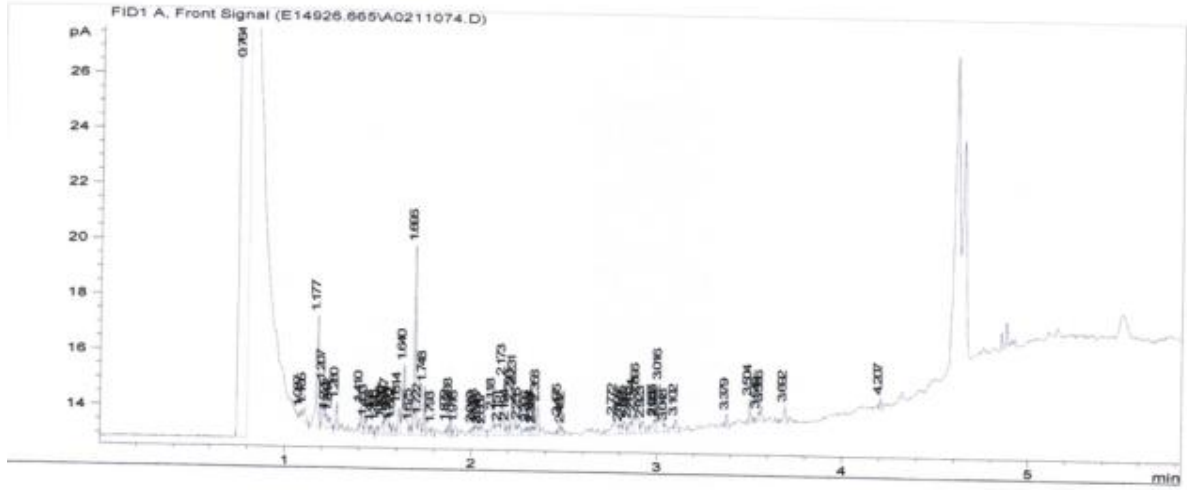
Tablo 4.8. SDS4 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6927	342818	0.004	----	6.6787		----	< min rt	
0.7010	9.583E+8	0.016	----	6.7407	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.1653	479	0.010	----	10.1476		----		
1.4099	5226	0.009	1.098	11.4482	10:0 3OH	6.00	ECL deviates 0.000	
1.5283	4246	0.009	1.064	12.0000	12:0	4.73	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
1.8365	9435	0.008	1.006	13.2036	12:0 2OH	9.93	ECL deviates 0.000	
1.9149	8457	0.008	0.994	13.4832	12:0 3OH	8.80	ECL deviates 0.000	
2.0599	582	0.008	0.976	14.0002	14:0	0.59	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
2.3598	697	0.008	0.948	15.0008	15:0	----	ECL deviates 0.001	
2.6196	27585	0.009	0.931	15.8360	Sum In Feature 3	26.87	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6703	23493	0.009	0.928	15.9990	16:0	22.82	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
2.7000	720	0.012	----	16.0939		----		
2.9251	578	0.011	0.917	16.8115	17:1 w8c	0.55	ECL deviates -0.004	
2.9566	2975	0.010	0.916	16.9121	17:0 cyclo	2.85	ECL deviates -0.003	
2.9846	785	0.010	0.915	17.0012	17:0	0.75	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
3.2195	472	0.008	0.909	17.7521	Sum In Feature 5	0.45	ECL deviates -0.004	18:2 w6,9c/18:0 ante
3.2476	15894	0.009	0.908	17.8418	Sum In Feature 8	15.10	ECL deviates -0.006	18:1 w7c
3.2970	586	0.010	0.907	17.9996	18:0	0.56	ECL deviates 0.000	Reference -0.007
3.4415	821	0.011	----	18.4715		----		
3.5075	571	0.010	----	18.6869		----		
----	27585	----	----	----	Summed Feature 3	26.87	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	472	----	----	----	Summed Feature 5	0.45	18:0 ante/18:2 w6,9c	18:2 w6,9c/18:0 ante
----	15894	----	----	----	Summed Feature 8	15.10	18:1 w7c	18:1 w6c

4.8.7 SDS6 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

SDS6 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Tablo 4.9'da ve GC kromatogramı Şekil 4.24'de verilmiştir. SDS6 kodlu suşunda en fazla bulunan yağ asitleri % 24.2 oranında 18:0 3OH, % 19.3 oranında 12:0, % 6.94 oranında 10:0 iso ve % 4.90 oranında 10:0 iso olarak belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda SDS6 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.





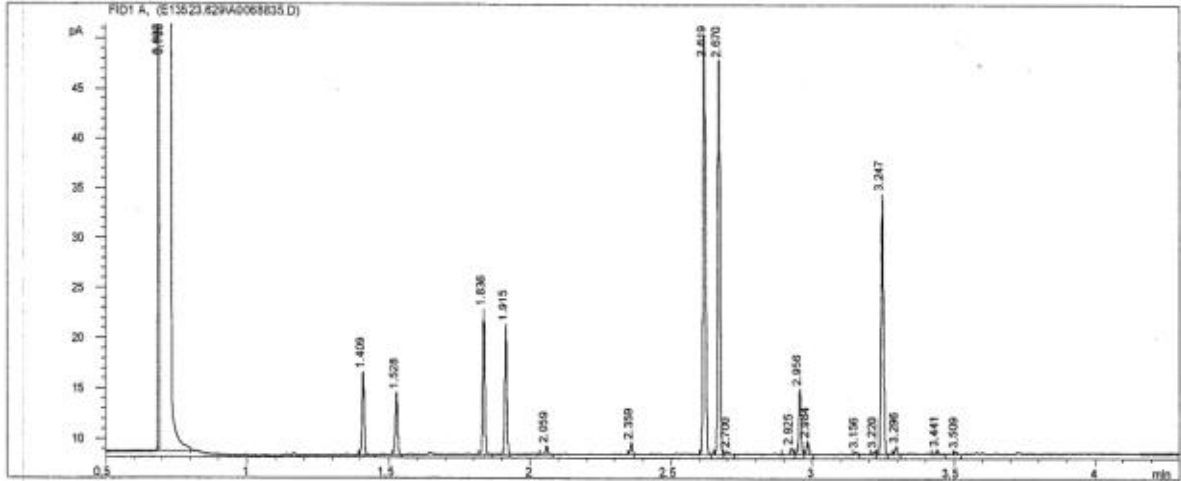
Şekil 4.25. SDS7 kodlu suşa ait GC kromotogramı

Tablo 4.10 SDS7 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.7644	6.642E+8	0.016	----	6.6334	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.2067	2452	0.012	----	9.5667	unknown 9.560	----	ECL deviates 0.007	
1.4103	1229	0.010	1.063	10.7176	11:0 anteiso	3.92	ECL deviates 0.013	
1.4332	945	0.015	----	10.8372		----		
1.4683	347	0.009	1.053	11.0133	11:0	1.10	ECL deviates 0.013	
1.5857	341	0.008	1.039	11.4343	10:0 3OH	1.06	ECL deviates -0.014	
1.6665	693	0.009	1.023	11.9966	12:0	24.21	ECL deviates -0.003	Reference 0.015
1.7221	1170	0.016	1.021	12.0940	11:0 iso 3OH	3.58	ECL deviates -0.014	
1.7483	2099	0.009	1.019	12.1926	11:0 2OH	6.41	ECL deviates 0.002	
1.7934	475	0.013	----	12.3629		----		
1.8715	422	0.009	----	12.6577		----		
1.8882	860	0.009	1.007	12.7206	13:0 anteiso	2.59	ECL deviates 0.007	
2.1508	1229	0.020	----	13.6472		----		
2.1729	2837	0.010	0.988	13.7230	14:0 anteiso	8.40	ECL deviates 0.005	
2.1943	584	0.011	----	13.7966		----		
2.2196	1236	0.009	----	13.8836		----		
2.2314	2181	0.010	0.985	13.9243	14:1 w5c	6.44	ECL deviates 0.008	
2.2564	1054	0.017	0.984	14.0094	14:0	3.11	ECL deviates 0.009	Reference 0.019
2.3055	470	0.011	----	14.1698		----		
2.3245	447	0.010	0.980	14.2316	13:0 2OH	1.31	ECL deviates 0.008	
2.3375	327	0.008	----	14.2741	unknown 14.263	----	ECL deviates 0.011	
2.3578	1759	0.012	----	14.3407		----		
2.4754	725	0.010	0.974	14.7246	15:0 anteiso	2.12	ECL deviates 0.000	Reference 0.006
2.4922	383	0.010	----	14.7796		----		
2.7718	2439	0.028	----	15.6736	unknown 15.669	----	> max ar/ht	
2.8047	592	0.012	0.965	15.7780	16:1 w11c	1.71	ECL deviates -0.004	
2.8251	928	0.014	0.964	15.8426	Sum In Feature 3	2.68	ECL deviates 0.003	16:1 w7c/16:1 w6c
2.8527	757	0.013	0.964	15.9305	16:1 w5c	2.19	ECL deviates 0.002	
2.8742	1167	0.012	0.963	15.9985	16:0	3.37	ECL deviates -0.001	Reference 0.000
2.8963	2298	0.013	----	16.0690		----		
2.9231	1069	0.018	0.963	16.1538	15:0 iso 3OH	3.08	ECL deviates -0.008	
2.9871	1128	0.017	----	16.3572		----		
2.9989	514	0.009	----	16.3946		----		
3.0158	3728	0.015	0.961	16.4481	Sum In Feature 9	10.74	ECL deviates 0.001	17:1 iso w9c
3.0475	525	0.014	0.961	16.5491	17:1 anteiso w9c	1.51	ECL deviates -0.003	
3.1023	789	0.014	0.960	16.7230	17:0 anteiso	2.27	ECL deviates -0.010	Reference -0.012
3.3787	653	0.011	0.958	17.6052	18:3 w6c (6,9,12)	1.87	ECL deviates 0.005	
3.5039	1078	0.010	0.957	18.0059	18:0	3.09	ECL deviates 0.006	Reference -0.002

4.8.9 SDS8 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

SDS8 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Tablo 4.11 ve GC kromotogramı Şekil 4.26.'de verilmiştir. SDS8 kodlu suşun yağ asidi profilinin %23.8 oranında 16:0, % 9.03 oranında 12:0 2OH, % 7.87 oranında 12:0 3OH içerdiği belirlenmiştir. % 26.2 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda SDS8 suşunun 0.320 SI değeri ile *Pseudomonas putida* olarak tespit edilmiştir.



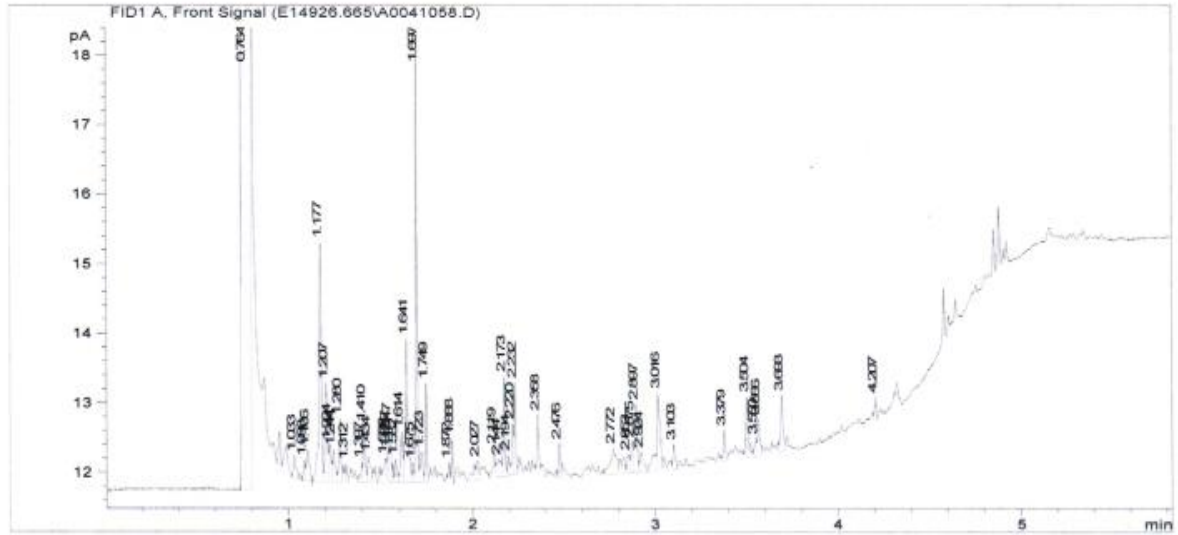
Şekil 4.26. SDS8 kodlu suşa ait GC kromotogramı

Tablo 4.11. SDS8 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6920	296252	0.004	----	6.6767		----	< min rt	
0.7000	9.515E+8	0.016	----	6.7358	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.4093	9082	0.009	1.098	11.4491	10:0 3OH	5.80	ECL deviates 0.001	
1.5277	6913	0.009	1.064	12.0000	12:0	4.28	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
1.8360	15432	0.008	1.006	13.2037	12:0 2OH	9.03	ECL deviates 0.000	
1.9147	13603	0.008	0.994	13.4842	12:0 3OH	7.87	ECL deviates 0.001	
2.0595	936	0.009	0.976	14.0000	14:0	0.53	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
2.3594	1317	0.009	0.948	15.0005	15:0	----	ECL deviates 0.000	
2.6192	48350	0.009	0.931	15.8362	Sum In Feature 3	26.18	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6700	44108	0.009	0.928	15.9996	16:0	23.82	ECL deviates 0.000	Reference -0.006
2.7004	592	0.012	----	16.0963		----		
2.9253	909	0.010	0.917	16.8138	17:1 w8c	0.49	ECL deviates -0.001	
2.9562	7791	0.009	0.916	16.9124	17:0 cyclo	4.15	ECL deviates -0.003	
2.9838	1536	0.009	0.915	17.0007	17:0	0.82	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
3.1556	346	0.009	0.910	17.5501	16:0 3OH	0.18	ECL deviates 0.002	
3.2197	460	0.009	0.909	17.7552	Sum In Feature 5	0.24	ECL deviates -0.001	18:2 w6,9c/18:0 ante
3.2474	30459	0.009	0.908	17.8437	Sum In Feature 8	16.09	ECL deviates -0.004	18:1 w7c
3.2962	1007	0.010	0.907	17.9997	18:0	0.53	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
3.4410	697	0.011	----	18.4731		----		
3.5087	414	0.009	----	18.6944		----		
----	48350	---	----	----	Summed Feature 3	26.18	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	460	---	----	----	Summed Feature 5	0.24	18:0 ante/18:2 w6,9c	18:2 w6,9c/18:0 ante
----	30459	---	----	----	Summed Feature 8	16.09	18:1 w7c	18:1 w6c

4.8.10 SDS10 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

SDS10 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Tablo 4.12 ve GC kromotogramı Şekil 4.27'de verilmiştir. SDS10 kodlu suşun yağ asidi profilinin %23.1 oranında 16:0, % 9.10 oranında 12:0 2OH, % 7.88 oranında 12:0 3OH ve % 5.90 oranında 10:0 3OH içerdiği belirlenmiştir. % 27.0 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda SDS10 suşunun 0.129 SI değeri ile *Pseudomonas syringae* olarak tespit edilmiştir.



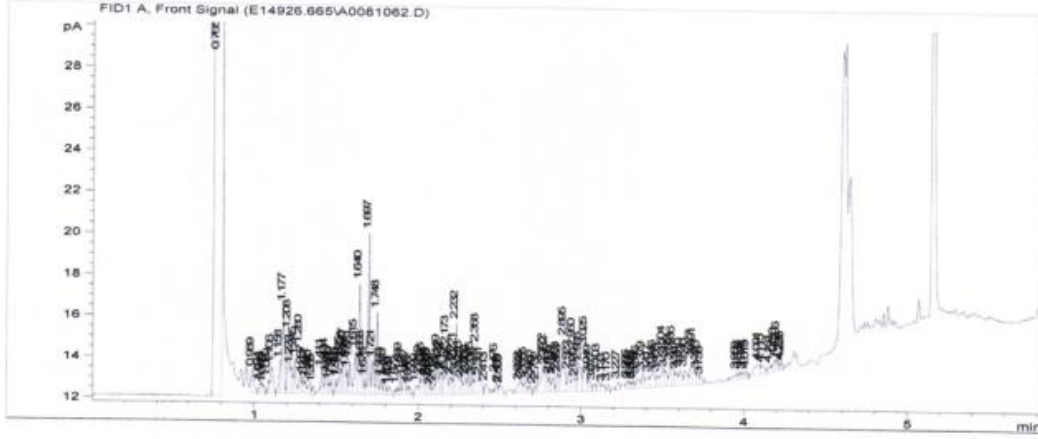
Şekil 4.28. SDS10-2 kodlu suşa ait GC kromotogramı

Tablo 4.13. SDS10-2 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.7645	6.511E+8	0.016	----	6.6439	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.0334	640	0.014	----	8.4243		----	< min rt	
1.0878	429	0.011	----	8.7843		----	< min rt	
1.1058	1013	0.016	----	8.9034		----	< min rt	
1.1774	6019	0.012	----	9.3772		----	< min rt	
1.2067	2386	0.013	----	9.5713		----		
1.2239	988	0.013	----	9.6850		----		
1.2443	860	0.013	----	9.8203		----		
1.2800	1325	0.011	----	10.0399		----		
1.3123	432	0.012	----	10.2083		----		
1.3972	438	0.010	----	10.6483		----		
1.4104	1097	0.010	1.066	10.7174	11:0 anteiso	4.49	ECL deviates 0.012	
1.4340	801	0.015	----	10.8408		----		
1.5263	757	0.015	----	11.2641		----		
1.5373	472	0.007	----	11.3117		----		
1.5471	1148	0.013	----	11.3542		----		
1.5815	493	0.011	----	11.5030		----		
1.6137	1277	0.013	----	11.6421		----		
1.6406	4271	0.014	----	11.7585		----		
1.6748	341	0.009	----	11.9065		----		
1.6966	7114	0.009	1.025	11.9985	12:0	28.00	ECL deviates -0.001	Reference 0.014
1.7234	904	0.016	1.022	12.0997	11:0 iso 3OH	3.55	ECL deviates -0.008	
1.7485	1736	0.009	1.020	12.1944	11:0 2OH	6.80	ECL deviates 0.003	
1.8720	317	0.009	----	12.6606		----		
1.8884	688	0.009	1.007	12.7225	13:0 anteiso	2.66	ECL deviates 0.009	
2.0272	532	0.013	----	13.2234		----		
2.1192	790	0.013	----	13.5396		----		
2.1436	773	0.019	0.989	13.6236	14:0 iso	2.94	ECL deviates -0.004	Reference 0.003
2.1732	1919	0.010	0.987	13.7252	14:0 anteiso	7.28	ECL deviates 0.007	Reference 0.015
2.1945	381	0.010	----	13.7984		----		
2.2196	929	0.009	----	13.8848		----		
2.2316	1655	0.010	0.984	13.9260	14:1 w5c	6.26	ECL deviates 0.010	
2.3584	1001	0.010	----	14.3433		----		
2.4757	644	0.010	0.973	14.7261	15:0 anteiso	2.41	ECL deviates 0.001	Reference 0.004
2.7721	1744	0.028	----	15.6750	unknown 15.669	----	> max ar/ht	
2.8529	501	0.013	0.963	15.9316	16:1 w5c	1.85	ECL deviates 0.004	
2.8750	776	0.012	0.962	16.0016	16:0	2.87	ECL deviates 0.002	Reference 0.000
2.8967	1733	0.012	----	16.0705		----		
2.9242	841	0.019	0.961	16.1577	15:0 iso 3OH	3.11	ECL deviates -0.004	
3.0160	2400	0.014	0.960	16.4489	Sum ln Feature 9	8.85	ECL deviates 0.002	17:1 iso w9c
3.1033	620	0.013	0.959	16.7256	17:0 anteiso	2.28	ECL deviates -0.007	Reference -0.011
3.3792	760	0.012	0.956	17.6047	18:3 w6c (6,9,12)	2.79	ECL deviates 0.005	
3.5040	1296	0.011	0.956	18.0034	18:0	4.76	ECL deviates 0.003	Reference -0.004
3.5500	458	0.013	----	18.1538		----		
3.5664	910	0.013	0.956	18.2078	17:0 iso 3OH	3.34	ECL deviates 0.015	
3.6935	1572	0.014	0.955	18.6240	19:0 iso	5.77	ECL deviates -0.014	
4.2068	423	0.011	----	20.3355		----	> max rt	
----	2400	----	----	----	Summed Feature 9	8.85	16:0 10-methyl	17:1 iso w9c

4.8.12 SDS10-3 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

SDS10-3 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Tablo 4.14 ve GC kromotogramı Şekil 4.29'da verilmiştir. SDS10-3 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 15.0 oranında 12:0, % 12.9 oranında 8:0 3OH, % 8.25 oranında 10:0 iso içerdiği belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda SDS10-3 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.



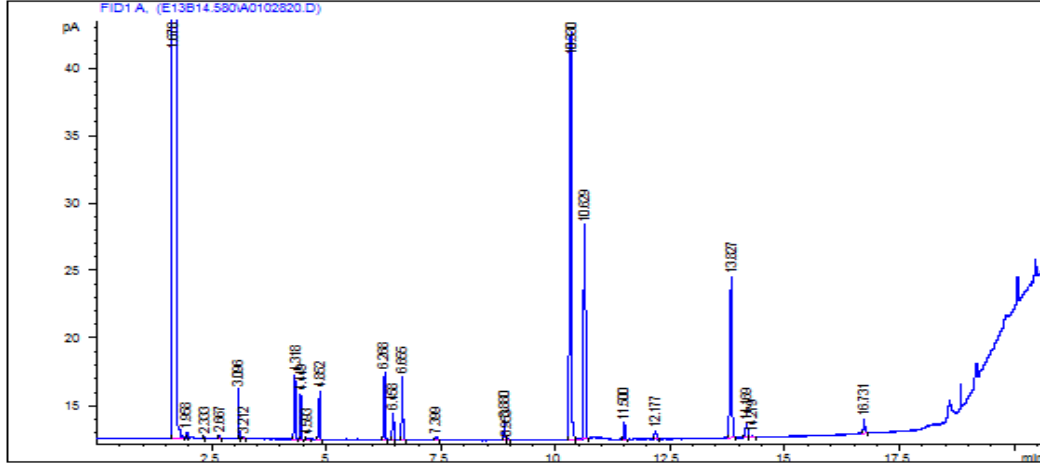
Şekil 4.29. SDS10-3 kodlu suşa ait GC kromotogramı

Tablo 4.14. SDS10-3 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.7645	6.551E+8	0.016	----	6.6885	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
0.9888	2334	0.015	----	8.1732		----	< min rt	
1.0345	628	0.010	----	8.4735		----	< min rt	
1.0457	704	0.010	----	8.5472		----	< min rt	
1.0597	427	0.010	----	8.6389		----	< min rt	
1.0885	809	0.009	----	8.8285		----	< min rt	
1.1062	2962	0.017	----	8.9443		----	< min rt	
1.1585	2362	0.011	----	9.2879		----		
1.1775	7339	0.012	1.120	9.4128	8:0 3OH	12.97	ECL deviates 0.001	
1.2078	4705	0.011	1.111	9.6123	10:0 iso	8.25	ECL deviates -0.004	Reference -0.014
1.2234	2307	0.013	----	9.7145		----		
1.2447	2904	0.012	----	9.8545		----		
1.2802	3052	0.010	----	10.0712		----		
1.2969	1038	0.009	----	10.1578		----		
1.3117	1032	0.013	----	10.2343		----		
1.3400	1050	0.013	----	10.3811		----		
1.3595	554	0.011	----	10.4820		----		
1.4112	1724	0.011	----	10.7502		----		
1.4338	1666	0.010	----	10.8674		----		
1.4436	910	0.008	----	10.9180		----		
1.4571	550	0.008	1.055	10.9883	11:0	0.92	ECL deviates -0.012	Reference -0.017
1.4687	865	0.009	----	11.0412		----		
1.4958	887	0.009	----	11.1573		----		
1.5104	793	0.009	----	11.2197		----		
1.5254	1980	0.011	----	11.2841		----		
1.5377	1707	0.008	----	11.3370		----		
1.5471	3218	0.013	----	11.3771		----		
1.5660	1216	0.008	1.041	11.4584	10:0 3OH	2.00	ECL deviates 0.010	
1.5813	2442	0.011	----	11.5240		----		
1.6147	4207	0.015	----	11.6675		----		
1.6405	8119	0.011	----	11.7780		----		
1.6579	2262	0.011	----	11.8526		----		
1.6752	962	0.010	1.027	11.9271	12:1 at 11-12	1.56	ECL deviates 0.002	
1.6967	9292	0.009	1.025	12.0174	12:0	15.03	ECL deviates 0.017	Reference 0.014
1.7206	3218	0.015	1.022	12.1067	11:0 iso 3OH	5.19	ECL deviates -0.001	
1.7485	4980	0.009	----	12.2113		----		
1.7729	1396	0.013	----	12.3028		----		
1.7934	1174	0.013	----	12.3795		----		
1.8152	453	0.010	1.013	12.4615	11:0 3OH	0.72	ECL deviates -0.003	
1.8257	662	0.013	----	12.5008	unknown 12.502	----	ECL deviates -0.001	
1.8715	436	0.009	----	12.6726		----		
1.8885	1175	0.009	----	12.7362		----		
1.9169	1914	0.017	----	12.8427		----		
1.9356	696	0.011	----	12.9128		----		
1.9496	475	0.010	1.002	12.9653	13:1 at 12-13	0.75	ECL deviates 0.007	
1.9893	1072	0.015	----	13.1041		----		
2.0097	1239	0.010	----	13.1736		----		
2.0259	1932	0.014	----	13.2291		----		
2.0447	1175	0.011	----	13.2932		----		
2.0580	879	0.009	----	13.3385		----		
2.0660	812	0.009	----	13.3658		----		
2.0781	376	0.008	----	13.4073		----		
2.0982	772	0.011	0.991	13.4761	12:0 3OH	1.21	ECL deviates -0.007	
2.1190	2438	0.013	----	13.5470		----		
2.1325	1277	0.008	----	13.5929	unknown 13.591	----	ECL deviates 0.002	
2.1419	1108	0.007	0.989	13.6253	14:0 iso	1.73	ECL deviates -0.003	Reference -0.002
2.1511	1318	0.009	----	13.6567		----		
2.1735	4043	0.013	----	13.7331		----		

4.8.13 SDS11 Kodlu Suşun Yağ Asidi Analizi

SDS11 kodlu suşun içerdiği yağ asitleri yüzde oranları ile Tablo 4.15 ve GC kromotogramı Şekil 4.30'da verilmiştir. SDS11 kodlu suşun yağ asidi profilinin % 19.9 oranında 16:0, % 17.0 oranında 18:1 w7c, % 5.63 oranında 12:0 2OH içerdiği belirlenmiştir. % 38.8 oranında yağ asidi ise tanımlanamamıştır. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda SDS11 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.



Şekil 4.30. SDS11 kodlu suşa ait GC kromotogramı

Tablo 4.15. SDS11 kodlu suşa ait yağ asidi profilleri

RT	Response	Ar/H	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.678	3.809E+8	0.026	---	7.015	SOLVENT PEAK	---	< min rt	
1.958	1157	0.024	---	7.561		---	< min rt	
2.333	260	0.023	---	8.290		---	< min rt	
2.667	580	0.027	---	8.940		---	< min rt	
3.096	9637	0.020	---	9.774		---		
3.212	386	0.027	1.232	9.999	10:0	0.12	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
4.318	17748	0.030	1.089	11.429	10:0 3OH	4.98	ECL deviates -0.007	
4.449	10703	0.026	---	11.570		---		
4.593	226	0.028	---	11.724		---		
4.852	14892	0.031	1.045	12.002	12:0	4.01	ECL deviates -0.002	Reference -0.001
6.268	22329	0.034	0.978	13.182	12:0 2OH	5.63	ECL deviates -0.005	
6.458	8101	0.032	---	13.320		---		
6.655	21753	0.036	0.966	13.461	12:0 3OH	5.42	ECL deviates -0.007	
7.399	1424	0.036	0.947	13.999	14:0	0.35	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
8.880	6635	0.036	0.924	14.953	unknown 14.959	1.58	ECL deviates -0.006	
8.953	420	0.036	0.923	15.000	15.0	---	ECL deviates -0.000	
10.330	164992	0.043	0.913	15.820	Sum In Feature 3	38.80	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.629	84533	0.042	0.912	15.999	16:0	19.85	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
11.500	5903	0.038	0.909	16.499	15:0 3OH	1.38	ECL deviates -0.004	
12.177	3039	0.044	0.909	16.889	17:0 CYCLO	0.71	ECL deviates -0.001	Reference -0.000
13.827	72555	0.049	0.911	17.823	18:1 w7c	17.02	ECL deviates -0.000	
14.169	6100	0.045	---	18.017		---		
14.279	647	0.036	0.912	18.079	11 methyl 18:1 w7c	0.15	ECL deviates -0.002	
16.731	5552	0.045	---	19.481		---		
---	164992	---	---	---	Summed Feature 3	38.80	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

Metisilin dirençli stafilkoklar ve pseudomonadların yağ asidi analizleri ile tanımlanmalarına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda Al11, Ba01 ve Li12 kodlu suşlar düşük SI değerleriyle *Staphylococcus cohnii* olarak tanımlanmıştır. SDS8 ve SDS10 kodlu

suşlar yine düşük SI değeriyle *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas syringae* olarak tanımlanmışlardır. Diğer suşlar ise FAME analizi ile cins düzeyinde dahi tanımlanamamıştır. FAME analiz sonuçlarına göre suşların tanımlanması açısından sağlıklı veriler elde edilemediğinden 16S rRNA sekans analizi dikkate alınarak metisilin dirençli stafilkoklar ve pseudomonadlar moleküler düzeyde tanımlanmıştır.

4.9 Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH)

4.9.1 *mecA* Problarının Optimum Hibridizasyon Koşullarının Belirlenmesi

In situ uygulamada hedef olan *mecA* geni taşıyan bakterilerin hibridizasyonu gerçekleştirmek için *mecA* I, II ve III problemleri ile *S. aureus* ATCC33591 pozitif kontrol suşu ve farklı formamid ve NaCl konsantrasyonları (% 45, 50 and 55 formamid ve 0.040, 0.028 ve 0.020 M NaCl) kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır (Tablo 4.16). Hibridizasyon sonrası Leica QWin Plus programı kullanılarak yapılan DAPI ve FITC görüntülerine ait piksel alanları (pp²) analizinde elde edilen hibridizasyon oranları Tablo 4.16'da ve FISH görüntüleri ise Şekil 4.31, 4.32 ve 4.33.'te sırasıyla verilmiştir.

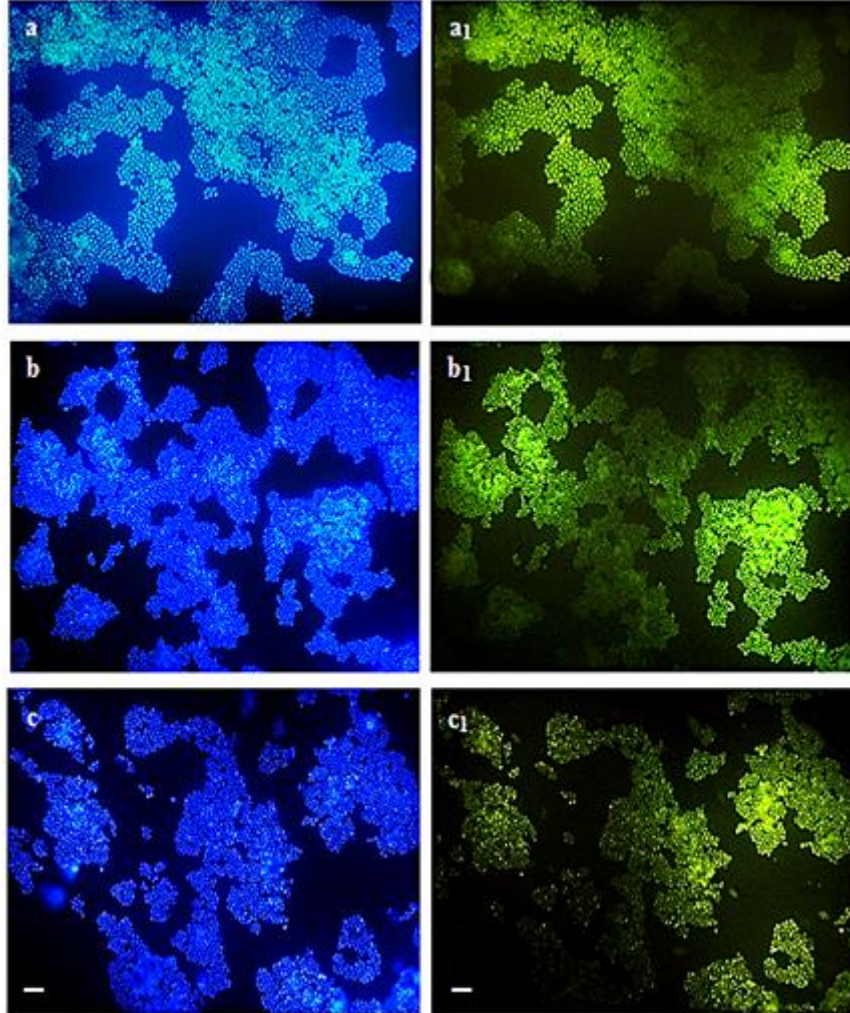
Tablo 4.16. *mecA* pozitif ve negatif kontrol suşları ile *mecA* problemlerinin hibridizasyon koşulları

	<i>mecA</i> Problemleri için % Sinyal İntensiyte								
	% 45 Formamid + 0.040 M NaCl			% 50 Formamid + 0.028 M NaCl			% 55 Formamid + 0.020 M NaCl		
	<i>mecA</i> I	<i>mecA</i> II	<i>mecA</i> III	<i>mecA</i> I	<i>mecA</i> II	<i>mecA</i> III	<i>mecA</i> I	<i>mecA</i> II	<i>mecA</i> III
<i>S. aureus</i> ATCC33591 <i>mecA</i> ⁺	77.1±0.98	65.9±1.63	76.4±0.79	85.7±1.05	79.3±1.51	80.9±2.18	88.9±0.15	81.6±1.71	92.1±1.57
<i>S. aureus</i> ATCC25922 <i>mecA</i> ⁻	1.86±0.94	2.52±1.01	2.96±1.52	2.84±0.85	3.66±1.09	3.81±0.57	2.14±0.35	2.66±0.63	3.98±0.67
<i>E. coli</i> DH5α <i>mecA</i> ⁻	2.04±0.57	2.50±0.26	3.08±0.46	3.24±1.84	2.5±0.36	3.80±1.54	1.40±0.75	1.93±0.81	2.89±0.68

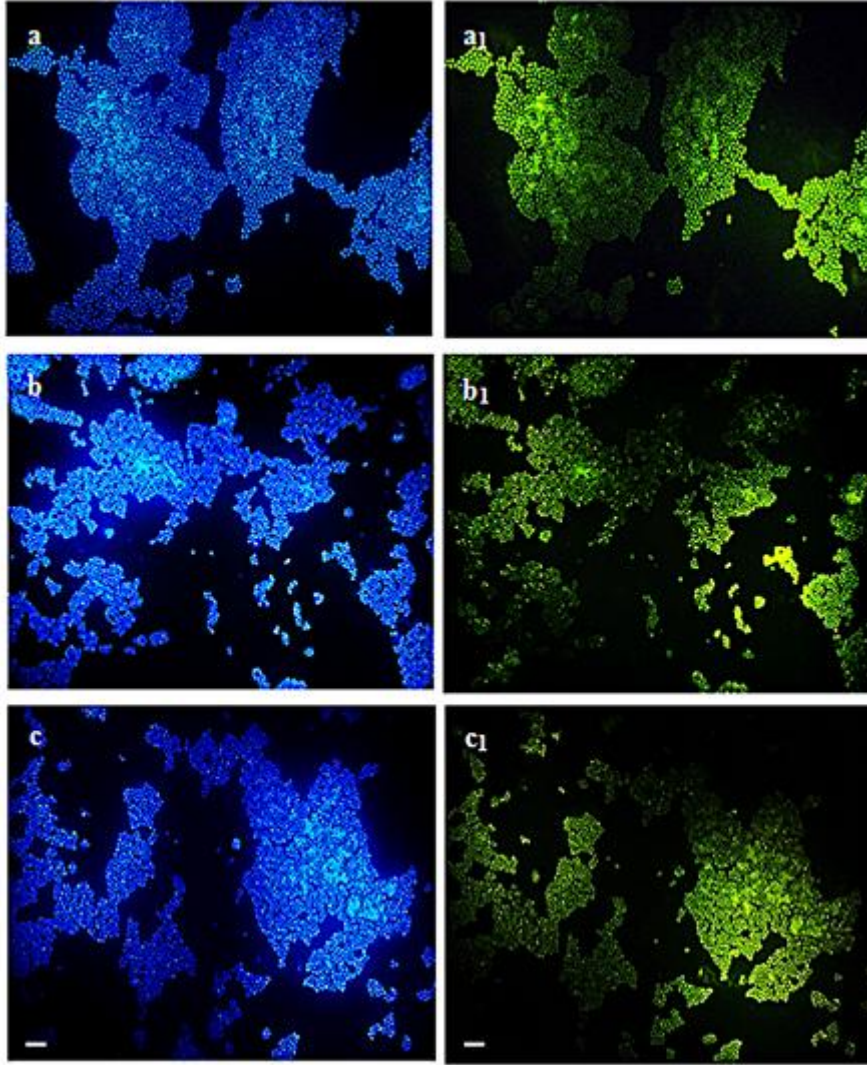
±, standart sapma
mecA⁺, *mecA*-pozitif kontrol
mecA⁻, *mecA*-negatif kontrol

% 55 formamid ve 0.020 M NaCl konsantrasyonunda *mecA* III probu % 92.1±1.57 (p<0.05) oranında en fazla *mecA* genine spesifitesi yüksek hibridizasyon gösteren prob olarak belirlenmiştir. Bu hibridizasyon koşullarının ve *mecA* III probunun daha sonraki çalışmalarda

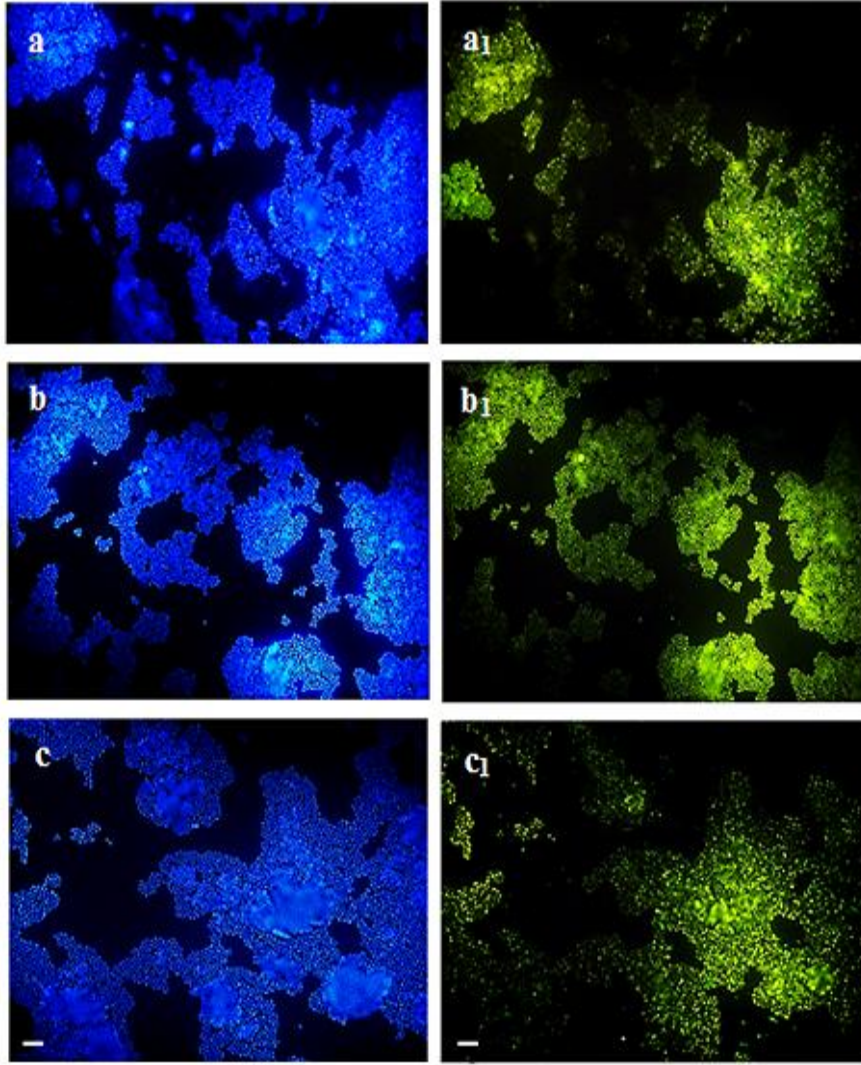
mecA geni taşıyan bakterilerin takip edilmesine yönelik spesifitesinin doğrulanması için *mecA* geni taşımayan negatif kontrol suşları *S. aureus* ATCC25922 ve *E. coli* DH5 α ile hibridizasyon yapılmıştır. *S. aureus* ATCC25922 (Şekil 4.34) ve *E. coli* DH5 α (Şekil 4.35) suşları sırasıyla % 3.98 ± 0.67 ($p < 0.05$) ve % 2.89 ± 0.68 ($p < 0.05$) oranlarıyla düşük intensity göstermiştir. *mecA* III probunun sinyal yoğunluğu ile hedef *mecA* geni arasında doğrusal ilişki $R^2 = 0.91$ olarak belirlenmiştir.



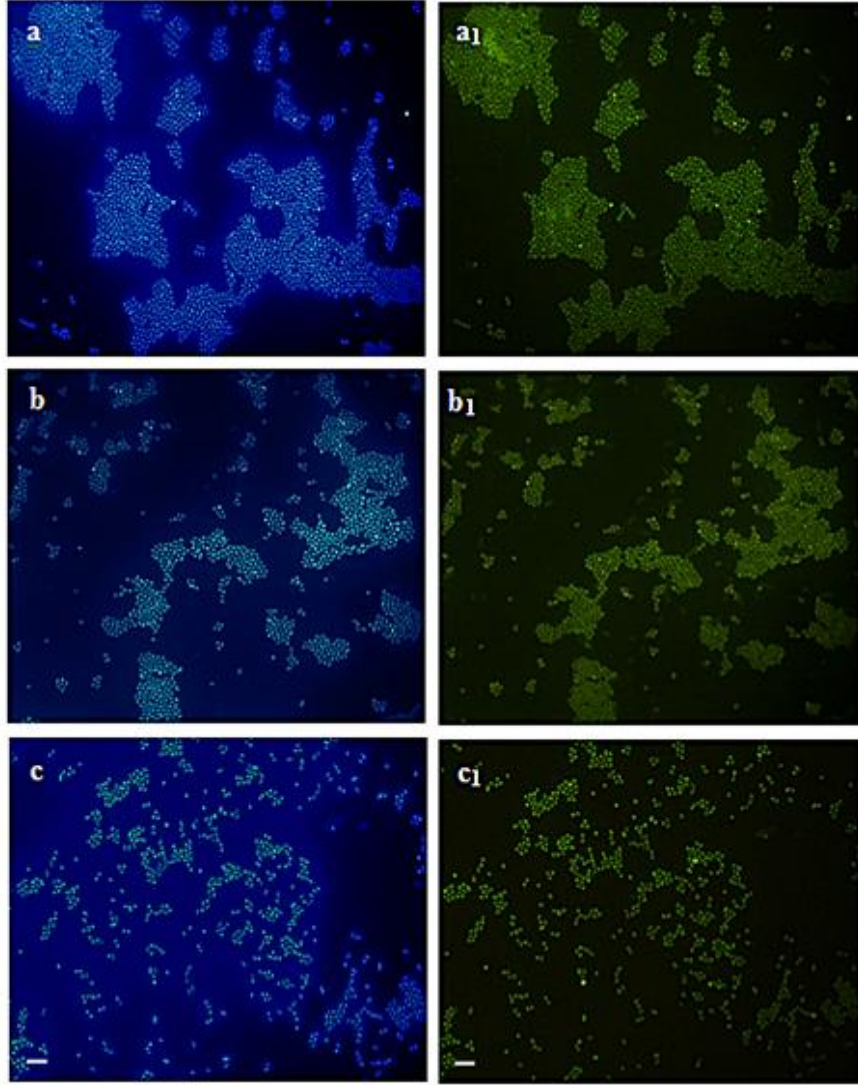
Şekil 4.31. *mecA* pozitif *S. aureus* ATCC33591 suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu. DAPI ile boyanmış toplam hücre populasyonları (a, b, c) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *mecA* I probu (a₁, b₁, c₁). (Bar, 10 μ m)



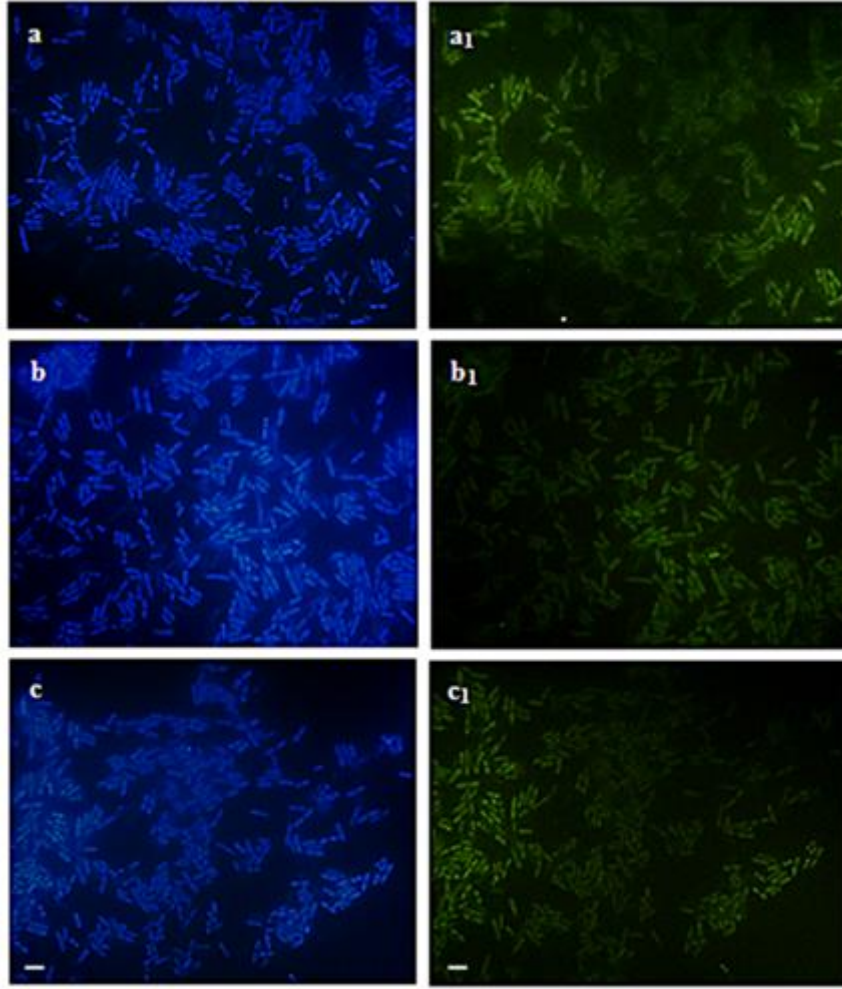
Şekil 4.32. *mecA* pozitif *S. aureus* ATCC33591 suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu. DAPI ile boyanmış toplam hücre populasyonları (a, b, c) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *mecA* II probu (a₁, b₁, c₁). (Bar, 10µm)



Şekil 4.33. *mecA* pozitif *S. aureus* ATCC33591 suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu. DAPI ile boyanmış toplam hücre populasyonları (a, b, c) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *mecA* III probu (a₁, b₁, c₁). (Bar, 10µm)



Şekil 4.34. *mecA* negatif *S. aureus* ATCC25922 suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu. DAPI ile boyanmış toplam hücre populasyonları (a, b, c) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *mecA* III probu (a₁, b₁, c₁). (Bar, 10µm)

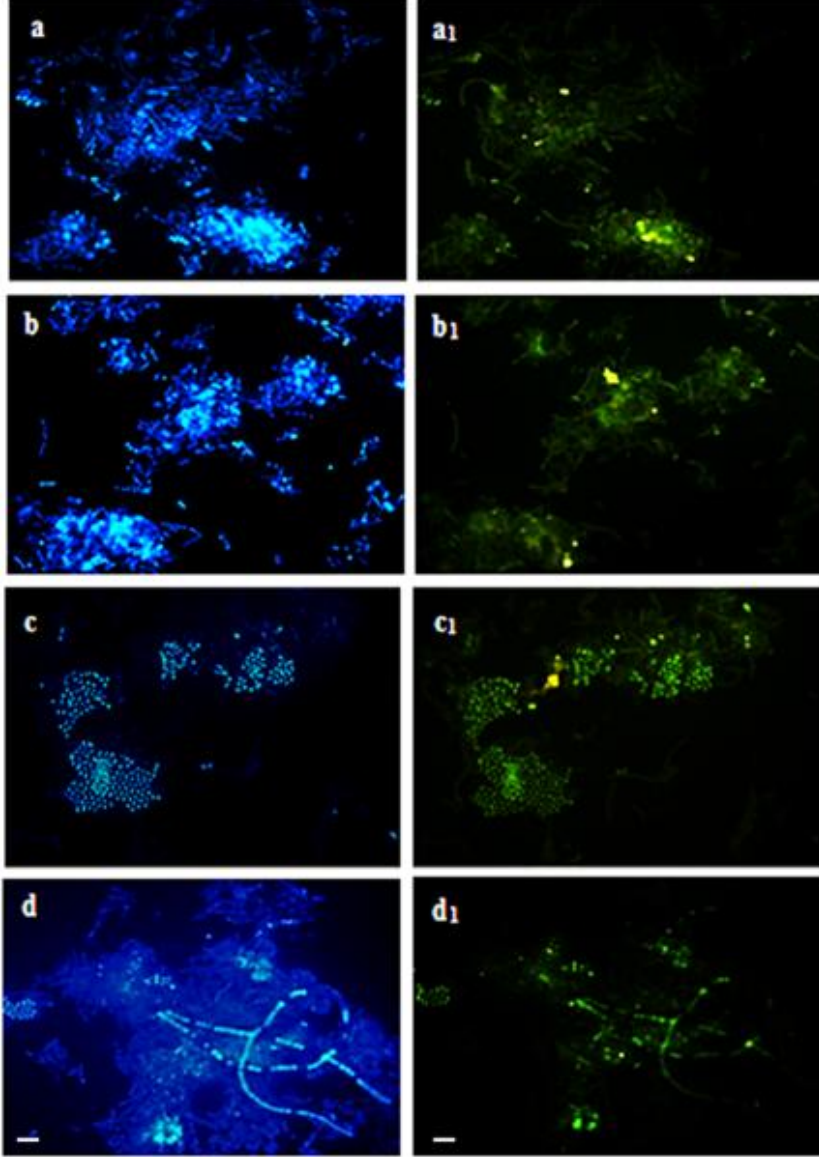


Şekil 4.35. *mecA* negatif *E. coli* DH5 α suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu. DAPI ile boyanmış toplam hücre popülasyonları (a, b, c) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *mecA* III probu (a₁, b₁, c₁). (Bar, 10 μ m)

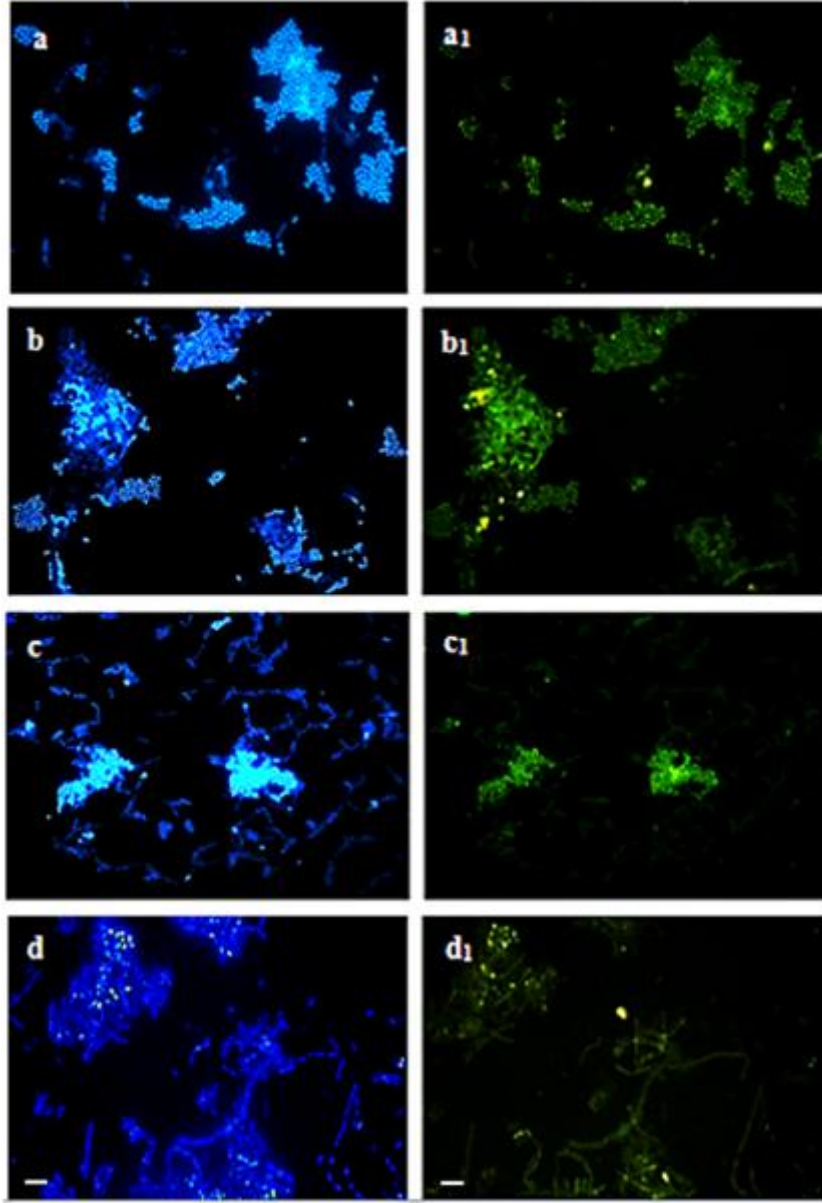
Optimizasyon çalışmaları sonucunda % 55 formamid ve 0.020 M NaCl konsantrasyonunda *mecA* III probunun *mecA* geni taşıyan bakterilerin takip edilmesi için spesifitesi en yüksek prob olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın bundan sonrasındaki aşamada ise, Kızılırmaktan 2011-2012 dönemlerinde üçer aylık periyotlarla toplanmış ve fikse edilmiş olan su örnekleri ile belirlenen bu koşullarda hibridizasyon çalışmaları yapılarak *mecA* geni taşıyan bakterilerin mevsimsel popülasyon yayılım profilleri çıkarılmıştır.

4.9.2 *mecA* Geni Taşıyan Bakterilerin Mevsimsel Populasyon Yayılımı

Şekil 4.36 ve 4.37'de görüldüğü gibi *mecA* III probu için belirlenen optimum koşullar kullanılarak (% 55 formamid ve 0.020 M NaCl) 2011 Ocak-2012 Ekim arasında toplanmış olan su örneklerinde *mecA* geni taşıyan suşlar takip edilmiştir.

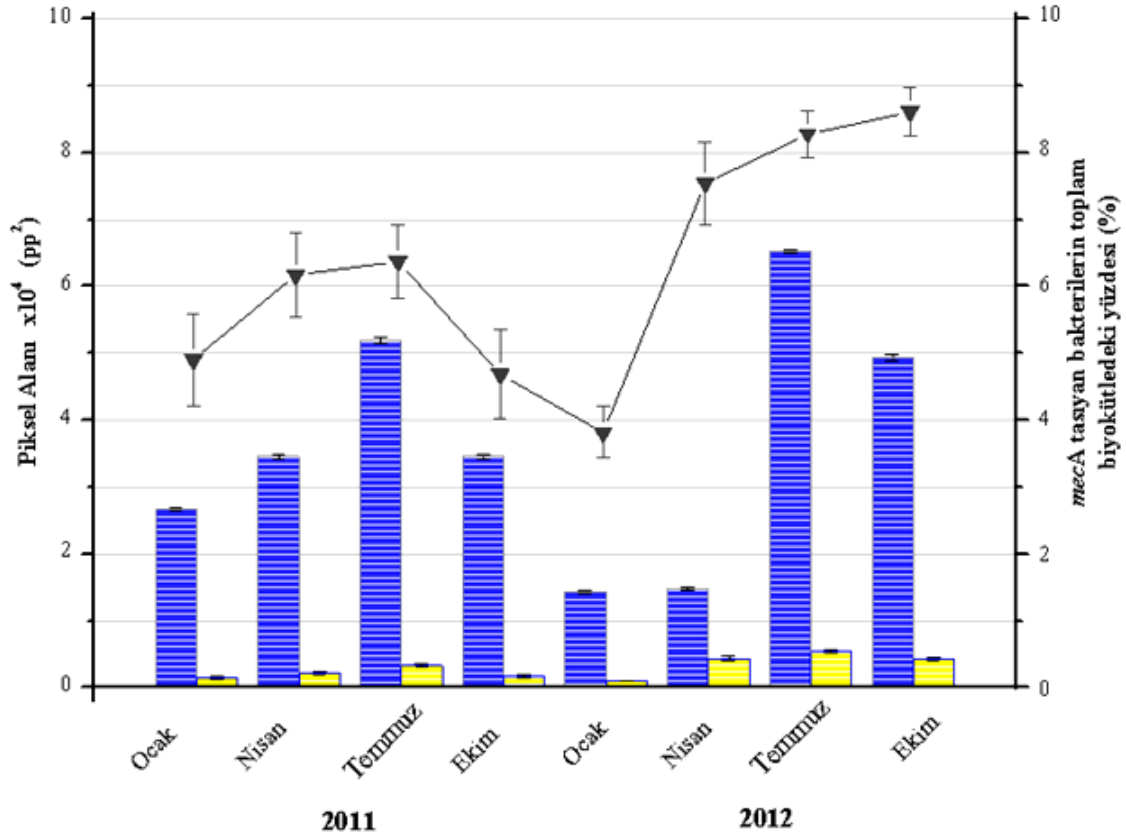


Şekil 4.36. Ocak (a-a₁), Nisan (b-b₁), Temmuz (c-c₁), Ekim (d-d₁) 2011 dönemlerinde alınan su örneklerinde % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c₁) konsantrasyonlarında gerçekleşen hibridizasyon. DAPI ile boyanmış toplam hücre populasyonları (a, b, c, d) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *mecA* III probu (a₁, b₁, c₁, d₁). (Bar, 10µm)



Şekil 4.37. Ocak (a-a₁), Nisan (b-b₁), Temmuz (c-c₁), Ekim (d-d₁) 2012 dönemlerinde alınan su örneklerinde % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c₁) konsantrasyonlarında gerçekleşen hibridizasyon. DAPI ile boyanmış toplam hücre populasyonları (a, b, c,d) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *mecA* III probu (a₁, b₁, c₁, d₁). (Bar, 10µm)

mecA geni taşıyan suşların populasyon yoğunluğu (%) DAPI ve *mecA* III probu ile hibridize olan bu suşların FITC görüntülerinin piksel alanları (pp²) verilmiştir. Piksel alanlarına dayanarak elde edilen iki yıllık yayılım grafiğinde FITC ile hibridize olan *mecA* geni taşıyan suşların biyokütle yüzdeleri (%) standart sapma değerleri hesaplanarak belirtilmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. 2011-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde *mecA* geni taşıyan bakterilerin mevsimsel popülasyon yayılımı (▼). DAPI ile boyanmış toplam biyokütlenin piksel alanı (■) ve FITC işaretli *mecA* III probu ile hibridize olan toplam *mecA* geni taşıyan bakteriler (■). (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

2011 Ocak ayında toplam bakteri popülasyonu ($2.67 \times 10^4 \pm 0.02 \times 10^4$ pp²) ve *mecA* geni taşıyan bakterilerin popülasyon yoğunluğunun ($0.49 \times 10^5 \pm 0.05 \times 10^5$ pp²) en düşük değerlerde olduğu belirlenmiştir. Ancak 2011 Temmuz ayında toplam bakteri popülasyonu ($5.19 \times 10^4 \pm 0.05 \times 10^4$ pp²) ve *mecA* geni taşıyan bakterilerin popülasyon yoğunluklarının ($0.33 \times 10^4 \pm 0.03 \times 10^4$ pp²) en yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir.

2012 yılı bakteri popülasyon yayılımları bakımından 2011 yılı popülasyon dağılımı ile benzerlik göstermektedir. 2012 Ocak ayında toplam bakteri popülasyonu ($1.43 \times 10^4 \pm 0.02 \times 10^4$ pp²) ve *mecA* geni taşıyan bakterilerin popülasyon yoğunluğunun ($0.01 \times 10^4 \pm 0.01 \times 10^4$ pp²) diğer aylara göre en düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. 2012 Temmuz ayında toplam bakteri popülasyonu ($6.52 \times 10^4 \pm 0.02 \times 10^4$ pp²) ve *mecA* geni

taşıyan bakterilerin populasyon yoğunluklarının ($0.54 \times 10^4 \pm 0.02 \times 10^4$ pp²) en yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir.

2011 yılı *mecA* geni taşıyan bakterilerin ortalama yoğunluğu Ocak ayında % 4.90 ± 0.68 , Nisan ayında % 6.16 ± 0.63 , Temmuz ayında % 6.36 ± 0.55 ve Ekim ayında % 4.69 ± 0.66 olarak belirlenmiştir. Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında toplam bakteri populasyon dağılımı göz önüne alındığında *mecA* geni taşıyan bakterilerin populasyon yayılım oranları arasında gözlenen farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$) belirlenmiştir.

2012 yılı biyokütlerdeki *mecA* geni taşıyan bakterilerin ortalama yoğunluğu Ocak ayında % 3.82 ± 0.38 , Nisan ayında % 7.52 ± 0.61 , Temmuz ayında % 8.24 ± 0.34 ve Ekim ayında % 8.58 ± 0.36 olarak belirlenmiştir. Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında gözlenen ortalama *mecA* geni taşıyan bakterilerin populasyon yoğunlukları arasındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$) belirlenmiştir.

Yapılan ANOVA testi neticesinde 2011 ve 2012 yılları içerisinde Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında ortalama *mecA* geni taşıyan bakterileri yoğunluklarının mevsimsel değişiklik gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0.001$). Ayrıca bu üç yıl için uygulanan Shapiro-Wilk istatistiksel analiz testine göre *mecA* geni taşıyan bakterileri için elde edilen verilerin normal dağılım gösterdiği ($p < 0.05$) tespit edilmiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada yüzey sularında, şehir atık sularında metisilin dirençli stafilokok ve diğer *mecA* taşıyan bakterilerin varlığı araştırılmıştır. *mecA* sıklıkla stafilokok ile ilişkili olarak rapor edilsede stafilokok dışında *Pseudomonas* ve *Aeromonas* gibi başka patojen bakteri türlerinde de *mecA* tespit edilmesi, bu genin yayılımına ve varlığına yeni bir ışık tutabilir. Bugüne kadar sulardan metisilin dirençli stafilokok izole edilemese de farklı kökenden *mecA*'nın gen transferi ile başka patojenlerde bu genin bulunması, doğal çevrede klinik olarak öneme sahip olan *mecA* içeren patojenlerin artmasına neden olmaktadır. Daha önceleri sadece stafilokok oldukları sanılan β -laktam antibiyotiklerine direnç sağlayan *mecA* genini taşıyan bu patojenler çoklu antibiyotik dirençliliği göstermektedirler. Doğal çevrede *mecA*'nın yaygın olarak bulunduğu tespit edilmesi, enfeksiyonların ve enfekte olan insanlarla olan yayılımın takip edilmesini kolaylaştıracaktır. Sonuç olarak bu patojenlerin *mecA* sekansı, antibiyotik dirençliliği, genetik çeşitliliği ve su örneklerindeki varlığı, farklı

biyokimyasal ve moleküler metodlarla incelenmektedir. Ancak yüzey sularında *mecA* geninin *S. aureus* dışında başka bakterilerde de bulunup bulunmadığını gösteren ve *mecA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid prob lar kullanılarak floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi ile yüzey sularında *mecA* genini taşıyan bakterilerin takip edilmesine yönelik literatürde herhangi bir çalışma, yaptığımız araştırma sonucu bulunamamıştır. Bu projenin özgün yönü *mecA* spesifik prob kullanılarak metisilin dirençli bakterilerin kültüre alınmasına gerek kalmadan yüzey sularında takiplerinin yapılması için floresan *in situ* hibridizasyon yönteminin kullanılmış olmasıdır. Gerek klasik kültür izolasyon ve identifikasyon bazlı sistemler gerekse otomatize sistemler genellikle mikroorganizmanın uzun sürede sonuç verip yoğun laboratuvar çalışmalarına ihtiyaç duyan, yetersiz sayıda ve yorumlanması güç ancak gen ekspresyonuna bağlı olarak değişebilecek stabil olmayan fenotipik özelliklerini baz olarak alırlar. İşte bu anlamda moleküler biyolojik yöntemler sadece izolasyonunda zorluk çekilen patojenlerin tanısı amacı ile değil aynı zamanda hastane infeksiyonları ile epidemiyolojik anlamda ilişkisi düşünülen hastane içi klinik ve çevresel örneklerle hastaneler arası salgınlardan izole edilen suşların tür ve tip bazında identifikasyonuna olanak sağlar. Yüzey sularında *mecA* geninin *S. aureus* dışında başka bakterilerde de bulunup bulunmadığı ve *mecA* spesifik prob ile metisilin dirençli bakterilerin kültüre alınmadan yüzey sularında takibinin yapılmasının uygunluğu belirlenmiş olmasıyla MRSA gibi en ölümcül süpermikropların takip edilmesi kolaylaşacaktır. Sonuç olarak MRSA tespitinde *mecA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid prob lar kullanılarak floresan *in situ* hibridizasyon yönteminin alternatif bir yöntem olarak kullanılabilceğini ve bunda önerilen bu projede olduğu gibi konuyla ilgili daha geniş çalışmaların yapılmasıyla mümkün olabileceğini düşünmekteyiz. Proje sonucunda elde edilen bilgiler ışığında söz konusu yöntemin tanı ve teşhis amacıyla klinik laboratuvarlarda, enfeksiyonların epidemiyolojisi ve toplum sağlığı çalışmalarında kullanılabilirliği belirlenmiştir.

6. REFERANSLAR

Achtman, N., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A., Silver, .RP. 1983. "Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K isolates", *Infection and Immunity*, 39, 315–335.

Akçam, F.S., Tinaz, B.G., Kaya, O., Tigli, A., Türe, E., Hoşoğlu, S. 2007. "Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* and comparison of *mecA* with *femA*, *femB*, *femX* positivities", *Microbiol Res.* In Press.

Amann, R., Glöckner, F.O., Neef, A. 1997. “Modern methods in subsurface microbiology: *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes”, FEMS Microbiol. Rev., 59, 191–200.

Amann, R.I. 1995. *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Akkerman ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds) Molecular Microbial Ecology Manual, Kluwer Academic, Dordrecht, pp 1–15.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. 1990. “Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations”, Appl. Environ. Microbiol., 56, 1919–1925.

Amann, R.I., Fuchs, B.M. 2008. “Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques”, Nat. Rev. Microbiol., 6, 339–348.

Appelbaum, P.C. 2006. “MRSA-the tip of the iceberg”, Clin Microbiol. Infect, 12 (2), 3–10.

Appelbaum, P.C. 2007. “Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*”, Clin. Infect. Dis., 45 (3), 165–170.

Araoju, R.M., Arribas, R.M. and Pares, R. 1991. “Distribution of *Aeromonas* species in waters with different level of pollution”, J. Appl. Bacteriol., 71, 182–186.

Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın N., Akay, Ö. 1992. Özel Mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Yayınları, 741, 659.

Arede, P., Milheirico, C., de Lencastre, H., Oliveira, D.C. 2012. “The anti-repressor *mecR2* promotes the proteolysis of the *mecA* repressor and enables optimal expression of β -lactam resistance in MRSA”, PLOS Pathogens, 8 (7), e1002816.

Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T., Hiramatsu, K. 2009. “Complete genome sequence of *Macrococcus caseolyticus* strain JCSC5402, reflecting the ancestral genome of the humanpathogenic staphylococci”, J. Bacteriol. 191, 1180–1190.

Bayar, S., Hocaoğlu, Z., Diğrak M. 2008. “Boğaz kültürlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının bazı fizyolojik, biyokimyasal özellikleri ve antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi”, KSÜ Fen ve Mühendislik Derg., 11 (1).

Berger-Bachi, B., Rohrer, S. 2002. "Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci*", Arch. Microbiol., 178, 165–171.

Boyle-Vavra, S., Ereshefsky, B., Wang, C.C., Daum, R.S. 2005. "Successful multiresistant community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette *mecA* (SCC*mecA*) type VT or SCC*mecA* type IV", J Clin Microbiol., 43, 4719–4730.

Brown, D.F., Edward, D.I., Hawkey, P.M., Morrison, D., Ridgway, D.L., Towner, K.J. 2005. "Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*", J. Antimicrob. Chemother., 56, 1000–1018.

Buntaran, L., Hatta, M., Sultan, A.R., Dwiyanti, R., Sabir, M. 2013. "Scc*mec* type II gene is common among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Jakarta, Indonesia", BMC Res. Notes 23, 106–110.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002. MMWR. 51 (26), 565-567.

Chambers, H.F. 1988. "Methicillin-resistant staphylococci", Clin Microbiol Rev., 1, 173-186.

Chambers, H.F. 1997. "Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications", Clin Microbiol Rev., 10, 781–91.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS Performance standards for Antimicrobial disc diffusion tests. 2006. Approved standards. 9th ed. CLSI Document M2-M9. Wayne Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Compernelle, V., Verschraegen, G., Claeys, G., 2007. "Combined use of Pastorex Staph-Plus and either of two new chromogenic agars, MRSA ID and CHROMagar MRSA, for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*", J. Clin. Microbiol., 45, 154–158.

Cutting, S.M., Horn, PB. 1990. "Genetic analysis in Molecular Biological Methods for *Bacillus*", Edited by: Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, UK; p: 27–74.

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M. 1999. "The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set", *Syst. Appl. Microbiol.*, 22, 434–444.

Derbentli, Ş. 2005. "Stafilokoklarda antibiyotik direnci", *ANKEM Derg.* 19, 54- 60.

Deurenberg, R.H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A.W., Bruggeman, .CA., Stobberingh, E.E. 2007. "The molecular evolution of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*", *Clin. Microbiol. Infect.*, 13, 222–235.

Dowson, G., Coffey, T.J., Spratt, B.G. 1994. "Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to β -lactam antibiotics", *Trends Microbiol.*, 2, 361–365.

Dündar, V. 2000. "Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonları", *Klimik Derg.* 13, 26- 27.

Elsayed, E.H., Elbestawy, E. 2008. "Molecular characterization of soil microorganisms: Effect of industrial pollution on distribution and biodiversity", *World J. Microbiol. Biot.*, 2, 215–224.

Gregory, P.D., Lewis, R.A., Curnock, S.P., Dyke, K.G. 1997. "Studies of the repressor (Blal) of β -lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*", *Mol. Microbiol.*, 24, 1025–1037.

Hanssen, A.M., Ericson Sollid, J.U. 2006. "SCCmec in staphylococci: genes on the move", *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 46, 8–20.

Hoshino, T., Yilmaz, L.S. Noguera, D.R., Daims, H., Wagner, M., 2008. "Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH", *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5068–5077.

Howard, J. G., Hale, C. 1976. "Lack of neonatal susceptibility to induction of tolerance by polysaccharide antigens", *Eur. J. Immunol.*, 6, 486–492.

Ibrahim, S., Salmenlinna, S., Virolainen, A., Kerttula, A., Iytkäinen, O., Jägerroos, H., Broas, M., Vuopio-varkila, J. 2009. "Carriage of methicillin- resistant staphylococci and their SCCmec types in a long term care facility", *J Clin Microbiol.*, 47, 32–37.

Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., de Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M.T., Coleman, D.C., Goering, R., Giffard, P.M., Skov, R.L., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Tenover, F.C., Oliveira, D.C., Boyle-Vavra, S., Laurent, F., Kearns, A.M., Kreiswirth, B., Ko, K.S., Grundmann, H., Sollid, J.E., John, J.F. Jr., Daum, R., Soderquist, B. and Buist, G. 2012. "Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56 (10) 4997–4999.

Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. (2001). "Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 45 (5), 1323–1336.

Ito, T., Kuwahara-Arai, K., Katayama, Y., Uehara, Y., Han, X., Kondo, Y., Hiramatsu, K. 2014. "Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) analysis of MRSA", *Methods Mol. Biol.*, 1085, 131–148.

Jolly, L., Wu, S., van Heijenoort, J., de Lencastre, H., Mengin- Lecreux, D., Tomasz, A. 1997. "The *femR315* gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase", *J. Bacteriol.*, 179, 5321-5325.

Kassem, I.I., Esseili, M.A., Sigler, V. 2008. "Occurrence of *mecA* in nonstaphylococcal pathogens in surface waters", *J. Clin. Microbiol.*, 46 (11), 3868–3869.

Katayama, Y., Takeuchi, F., Ito, T., Ma, X., Ui-mizutani, Y., Kobayashi, I., Hiramatsu, K. 2003a. "Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", *J. Bacteriol.*, 185, 2711–2722 .

Katayama, Y., Zhang, H. Z., Hong, D., Chambers, H. F. 2003b. "Jumping the barrier to beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*", *J Bacteriol.*, 185, 5465–547.

Kayaalp S.O. 2005. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. (11. Baskı). Ankara Hacettepe Taş Yayın Evi.

Kim, C., Mwangi, M., Chung, M., Milheirço, C., de Lencastre H., Thomasz, A. 2013. “The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA:Key role of the stringent stress response”, PLoS ONE, 8, e82814.

Köksa, I. 1992. “Metisiline dirençli stafilkokların epidemiyolojisi ve diğler antibiyotiklere duyarlılığı”, Ankem Dergisi, 6 (2), 292–295.

Köksal, F. 2007. Bakteriyel Patojenite Adaları/Genomik Adalar. İçinde: IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu. Durmaz R. (ed). İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Malatya.

Kuwahara-Arai, K., Kondo, N.S., Hori, Tateda-Suzuki, E., Hiramatsu, K. 1996. “Suppression of methicillin resistance in a *mecA* containing pre-methicillinresistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*mediated repression of PBP 2' production“, Antimicrob. Agents Chemother., 40, 2680–2685.

Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. 1985. “Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses”, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 82, 6955–6959.

Lévesque, B., Brousseau, P., Bernier, F., Dewailly, É. 2000. “Study of the bacterial content of ring-billed gull droppings in relation to recreational water quality“, Water Res., 34, 1089–1096.

Li, B., Irvin, S., Baker, B. 2007. “The variation of nitrifying bacterial population sizes in a sequencing batch reactor (SBR) treating low/mid/high concentrated wastewater”, J. Environ. Engin. Science, 6: 651–663.

Lindsay, J.A., Holden, M.T. 2004. “*Staphylococcus aureus*: superbug, super genome“, Trends Microbiol., 12 (8), 378–385.

Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. 2008. “The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water“, Environ. Int., 34, 265–276.



Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H. 1992. "Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions", *Syst. Appl. Microbiol.*, 15, 593–600.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H. 1992. "Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions", *Syst. Appl. Microbiol.*, 15, 593–600.

Maranan, M.C., Moreira, B., Boyle-vavra, S., Daum, R.S. 1997. "Antimicrobial resistance in staphylococci", *Infect Dis Clin North Am.*, 11, 813–849.

Merlino, J., Watson, J., Rose, B., Beard-Pegler, M., Gottlieb, T., Bradbury, R., Harbour, C. 2002. "Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia", *J Antimicrob. Chemother.*, 49 (5), 793–801.

MIDI, Inc. Sherlock Microbial Identification System References, 2001. Microbial identification by Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters (GC-FAME).

Moreillon, P., Que, Y.A., Glauser, M.P. 2005. *Staphylococcus aureus* (including Staphylococcal toxic shock) in Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and practice of Infectious disease, 6th edition, Churchill Livingstone, p. 2321–2351.

Morier, D. 2013. Antibiotic resistance. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1027479/antibiotic-resistance>, 17 Kasım 2014.

Mulligan, M.E., Murray-leisure, K.A., Standiford, H.C. 1993. "MRSA: a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management", *Am J Med.*, 94:313-328.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Tenover, P.C. 2005. Medical Microbiology; 4th ed. Philadelphia: Elsevier. 203 (12), 221–236.

Oliveira, D.C., de Lencastre, H. 2002. "Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", *Antimicrob Agents Chemother.*, 46 (7), 2155–2161.

Özel, E. 2011. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında *mecA* geninin tespitinde evigene testi, lateks aglütinasyon testi ve PZR yönteminin karşılaştırılması, (Uzmanlık Tezi), Süleyman Demirel Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.

Pertel, P.E., Bernardo, P., Fogarty, C., Matthews, P., Northland, R., Benvenuto, M., Thorne, G.M., Luperchio, S.A., Arbeit, R.D., Alder, J. 2008. "Effects of prior effective therapy on the efficacy of daptomycin and ceftriaxone for the treatment of community-acquired pneumonia", Clin. Infect. Dis., 46, 1142–1151.

Proctor, R.A., Van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J.N., Arbeit, R. D. 1995. "Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*", Clin. Infect. Dis., 20, 95–102.

Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H. and Carlson, K.H. 2006. "Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado", Environ. Sci. Technol., 40, 7445–7450.

Ramaiah, D.J., Vardanyan, N.L. 2008. "Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury", Marine Biotechnol., 10, 471–477.

Rogers, S.W., Moorman, T.B., Ong, S.K. 2007. "Fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil", Soil Sci. Soc. Am. J., 71, 2.

Roth, D.M., Senna, J.P., Machado, D.C. 2006. "Evaluation of the humoral immune response in BALB/c mice immunized with a naked DNA vaccine anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", Genet. Mol. Res., 5, 503–512.

Roy, P.H. 1999. "Horizontal transfer of genes in bacteria." Microbiol. Today, 26, 168–170.
Salmenlinna S. 2002. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. Academic dissertation. Faculty of Medicine, University of Helsinki, Haartman Institute. Helsinki.

Sancak, B. 2007. "*Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci", Hacettepe Tıp Derg., 38, 127–134.

Shorr, A.F. 2007. "Epidemiology of staphylococcal resistance", Clin. Infect. Dis., 45 (3), 171–176.

Stegger, M., Andersen, P.S., Kearns, A., Pichon, B., Holmes, M.A., Edwards, G., Laurent, F., Teale, C., Skov, R. and Larsen, A.R. 2012. "Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA* (LGA251)", Clin. Microbiol. Infect., 18, 395–400.

Sung, M.T., Lai, Y.T., Huang, C.Y., Chou, L.Y., Shih, H.W., Cheng, W.C., Wong, C.H., Ma, C. 2009. "Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 8824–8829.

Swenson, J.M., Tenover, F.C. 2005. "Cefoxitin disk study group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp", J. Clin. Microbiol., 43, 3818–3823.

Timothy, M., Weller, A. 1999. "The distribution of *mecA*, *mecR1* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin", J. Antimicrob. Chemother., 43 (1), 15–22.

Tolba, O., Loughrey, A., Goldsmith, C.E., Millar, B.C., Rooney, P.J., Moore, J.E. 2008. "Survival of epidemic strains of healthcare (HA-MRSA) and community-associated (CA-MRSA) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in river, sea and swimming pool water", Int. J Hyg. Environ. Health., 211, 398–402.

Trindade, P., Pacheco, R.L., Costa, S.F., Rossi F., Barone, A.A., Mamizuka, E.M., Levin, A.S. 2005. "Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin resistant *S. aureus*", J. Clin. Microbiol., 43 (7), 3435–3437.

Uhl, J.R., Rochester, M.N., Franklin, R., Cockerill, III., and Rochester, M.N. 2006. Detection of *mecA*-containing *Staphylococcus* spp. Patent No: US 7074599B2.

Velasco, D., Del mar Tomas, M., Cartelle, M. 2005. "Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*", J. Antimicrob. Chemother., 55, 379–382.

Vengust, M., Anderson, M.E., Rousseau, J., Weese, J.S. 2006. "Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community", *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 602–606.

Wallner, G., Amann, R., Beisker, W. 1993. "Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms", *Cytometry*, 14, 136–143.

Wannet, W.J., Spalburg, E., Heck, M.E., Pluister, G.N., Tiemersma, E., Willems, R.J., Huijsdens, X.W., de Neeling, A.J., Etienne, J. 2005. "Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leucocidin genes in The Netherlands", *J Clin Microbiol.*, 43 (7), 3341–3345.

Wu, S., Piscitelli, C., De Lencastre, H., Tomasz, A., 1996. "Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*", *Microb Drug Resist.*, 2, 435–441.

Yuan, Y., Fuse, S., Ostash, B., Sliz, P., Kahne, D., Walker, S. 2008. "Structural analysis of the contacts anchoring moenomycin to peptidoglycan glycosyltransferases and implications for antibiotic design", *ACS Chem. Biol.*, 3, 429–436.

Yugueros, J., Temprano, A., Berzal, B., Sanchez, M., Hernanz, C., Luengo, J.M., Naharro, G. 2000. "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp.", *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4351–4355.

Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T. 2008. "Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance", *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 361–385.

Zhang, H.Z., Hackbarth, C.J., Chansky, K.M., Chambers, H.F. 2001. "A proteolytic transmembrane signalling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci", *Science* 291, 1962–1965.



Proje Kapsamında Yapılan Toplantılarda Sunulan Bildiriler

- 1- Seyedmonir E, Yilmaz F, and Içgen B, "Prevalence of *mecA* in surface water contaminated with *Staphylococcus*". EurAsia Waste Management Symposium, 28–30 April 2014, Istanbul, Turkey.
- 2- Seyedmonir E, Yilmaz F, and Içgen B, "*mecA* gene dissemination among staphylococcal and non-staphylococcal isolates shed in surface waters". International Conference on Chemistry, Biomedical and Environment Engineering, 7–8 October 2014, Antalya, Turkey.
- 3- Seyedmonir E, Yilmaz F, and Içgen B, "Methicillin-resistant surface water isolates monitored by *mecA*-specific DNA probes". The International Conference on Civil and Environmental Engineering, 20–23 May 2015, Nevsehir, Turkey.

Proje Kapsamında Yapılan veya Hazırlanan Yayınlar

- 1- Seyedmonir E, Yilmaz F, and Içgen B (2015) *mecA* gene dissemination among staphylococcal and non-staphylococcal isolates shed in surface waters. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 95 (1), 131–138.
- 2- Methicillin-Resistant Bacteria Inhabiting Surface Waters Monitored by *mecA*-Targeted Oligonucleotide Probes. Environmental Microbiology (Submitted to CLEAN- Soil, Air, Water)

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. BÜLENT İÇGEN
Proje No:	113Z198
Proje Başlığı:	Meca Spesifik DNA Probu Kullanarak Nehir Suyunda MRSA İzlenmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	AYSUN ERGENE
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2013 - 01/10/2015
Onaylanan Bütçe:	231720.0
Harcanan Bütçe:	211134.53
Öz:	<p>Staphylococcus aureus insan vücudu üzerinde sıklıkla asemptomatik olarak taşınan fırsatçı bir patojendir. Metisiline dirençli S. aureus (MRSA) sonradan edindikleri gen sayesinde metisilin ve genel olarak diğer tüm β-laktam antibiyotiklere karşı dirençlidir. MRSA dünyadaygın bir patojen olup, diğer S. aureus enfeksiyonları ile karşılaştırıldığında MRSA enfeksiyonlarının daha yüksek oranda morbidite ve mortalite gösterdiği görülmektedir. Antibiyotikler ve diğer ilaçların doğal sulara ve yüzey sularında bulunması, nehirler gibi klinik olmayan ortamlarda yüksek direnç gösteren bakterilerin oluşmasına neden olmaktadır. Bunların içinden insanlar ve hayvanlar tarafından taşınan metisiline dirençli stafilocoklar ve β-laktam antibiyotiklere direnç sağlayan mecA geni taşıyan bakteriler özellikle dikkat çekmektedir. Metisiline dirençli stafilocokların yayılımlarındaki sürekli artışa rağmen, mecA genini taşıyan stafilocok ve diğer potansiyel patojen bakterileri rezervuar olarak barındıran doğal çevre hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Metisilin dirençli S. aureus penisilin bağlayıcı protein PBP2a içermesi ile oluşan hedef bölgelerin değiştirilmesi nedeniyle β-laktamlara karşı olan afinitesi azalmaktadır. Bu proteini kodlayan mecA geni mobil SCCmec olarak adlandırılan kromozom kaseti üzerinde yer almaktadır. Literatürde daha önce tarif edilmiş olan tüm SCCmec kasetindeki mec kompleks genleri (mecA, mecl, ve mecR1) genelde aynıdır. Bu genler β-laktam antibiyotiklere direnci sağlamaktadır. Ancak, tüm mecA klonları metisiline dirençli değildir ve MRSA popülasyonundaki tüm direnç seviyeleri, çeşitli kromozomal faktörler tarafından module edilen PBP2a üretimindeki verimliliğe bağlıdır. Bu durum, MRSA direnç seviyelerinin fenotipik duyarlı ile yüksek dirençli arasında değişiklik göstermesinin nedenini açıklamaktadır. Bu kayıtlara dayanarak, bu projede şehirselle ve fekal kirlilikten etkilenen yüzey sularında mecA taşıyan bakterilerin izole edilmesi, tanımlanması, karakterizasyonu ve mecA spesifik DNA problemleri kullanarak mevsimsel olarak takip edilmesi planlanmıştır. Daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T045 nolu proje kapsamında Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın 12 farklı bölgesinden alınmış olan su örneklerinden metisilin dirençli bakteriler izole edilmiştir. Bu proje kapsamında ise, 111T045 nolu proje kapsamında izole edilen ve daha önceden stok kültürleri hazırlanmış olan bu bakterilerin tanımlanması, karakterize edilmesi, mecA genlerinin varlıklarının gösterilmesi planlanmış ve mecA spesifik DNA problemleri hazırlanarak 2011-2012 yılları süresince üçer aylık periyotlarla alınmış ve fikse edilmiş su örneklerinde mecA içeren bakterilerin mevsimsel olarak takip edilmesi planlanmıştır. Metisilin dirençli suşların tanımlanması 16S rRNA dizi analizi ve yağ asidi analizi ile yapılmıştır. Fikse edilmiş su örneklerindeki mecA geni taşıyan suşların popülasyonlarındaki mevsimsel değişiklikler ise mecA hedefli floresan işaretli oligonükleotid problemleri kullanılarak floresan in situ hibridizasyon yöntemi ve görüntü analizi mikroskopu ile takip edilmiştir. Böylece mecA geninin S. aureus dışında başka bakterilerde de bulunup bulunmadığı ve mecA spesifik prob ile metisilin dirençli bakterilerin yüzey sularında takibinin yapılmasının uygunluğu belirlenmiştir. mecA hedefli floresan işaretli oligonükleotid problemleri kullanılarak floresan in situ hibridizasyon yöntemi ile metisilin dirençli bakterilerin yüzey sularında takip edilmesine yönelik literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan projenin benzer konudaki çalışmalara da önemli katkıda bulunacağı düşünülmektedir.</p>

Anahtar Kelimeler:	Staphylococcus aureus, metisilin dirençli bakteri, MRSA, mecA, PBP2a, floresan in situ hybridization
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK