



+

Hastane Atık Sularındaki Antibiyotik Direnç Genlerinin Yayımlarının Analizi

Program Kodu: 1002

Proje No: 117Y245

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Bülent İÇGEN

Bursiyer(ler):

Osman KAYALI

MART 2019

ANKARA



ÖNSÖZ

Hastane atık suları içerdikleri antibiyotiklerin yanı sıra antibiyotik direncine sahip bakterileri ve antibiyotik direnç genlerini barındırmaları bakımından önemlidir. Bu atık suların herhangi bir ön arıtmaya maruz kalmadan kanalizasyon sistemlerine, nehirlere, göllere ve denizlere deşarj edilmesi alıcı ortamlar açısından önemli kirlilik kaynağı oluşturmaktadır. Bu projede hastane atık sularının alıcı ortamlarda ki antibiyotik direnç genlerinin yayılımına olan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, 160 ile 1000 yatak kapasiteli altı ayrı hastaneden bir yıl süreyle mevsimsel periyotlarla atık su örnekleri toplanmıştır. Yaygın olarak kullanılan ve klinik önem arz eden antibiyotiklere yönelik direnç genleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon metoduyla analiz edilerek ve yayılım profilleri çıkarılmıştır. Hastane atık sularında antibiyotik direnç genlerinin yayılımlarının analizi başlıklı bu çalışma 117Y245 proje kodu ile TÜBİTAK tarafından 1002 hızlı destek programı kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	1
2.1 Beta laktam grubu antibiyotikler ve direnç mekanizmaları	2
2.2 Kinolonlar ve direnç mekanizmaları	3
2.3 Tetrasiklinler ve direnç mekanizmaları	4
2.4 Amphenikoller ve direnç mekanizmaları	4
2.5 Makrolid/Linkozamid/Streptogramin (MLS grubu) antibiyotikler ve direnç mekanizmaları	5
2.6 Sulfonamidler ve direnç mekanizmaları	5
2.7 Aminoglikozidler ve direnç mekanizmaları	6
3. YÖNTEM.....	6
3.1 Hastane atık su örneklerinin toplanması	6
3.2 Total DNA izolasyonu.....	6
3.3 DNA örneklerinin kalitatif analizi	7
3.4 Kantitatif analiz.....	9
3.4.1 Standart eğri örneklerinin hazırlanması	9
3.4.2 Kantitatif PZR deneylerinin yapılması	9
3.5 İstatistiksel analizler	13
4. BULGULAR.....	13
4.1 1 numaralı hastane (H1) sonuçları	13
4.2 2 numaralı hastane (H2) sonuçları	15
4.3 3 numaralı hastane (H3) sonuçları	16
4.4 4 numaralı hastane (H4) sonuçları	18
4.5 5 numaralı hastane (H5) sonuçları	19
4.6 6 numaralı hastane (H6) sonuçları	21
5. TARTIŞMA/SONUÇ	22
6. KAYNAKÇA.....	24

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 16s rRNA geni için standart eğri grafiği ve değerleri -----	10
Şekil 2. <i>aadA</i> geni için standart eğri grafiği ve değerleri -----	10
Şekil 3. <i>tetA</i> geni için standart eğri grafiği ve değerleri -----	11
Şekil 4. <i>cmlA</i> geni için standart eğri grafiği ve değerleri -----	11
Şekil 5. <i>sul1</i> geni için standart eğri grafiği ve değerleri -----	11
Şekil 6. <i>qnrS</i> geni için standart eğri grafiği ve değerleri -----	12
Şekil 7. <i>ermB</i> geni için standart eğri grafiği ve değerleri -----	12
Şekil 8. <i>bla_{CTX-M}</i> geni için standart eğri grafiği ve değerleri -----	12
Şekil 9. 1 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda) -----	13
Şekil 10. 1 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri -----	14
Şekil 11. 1 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları -----	14
Şekil 12. 2 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda) -----	15
Şekil 13. 2 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri -----	15
Şekil 14. 2 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları -----	16
Şekil 15. 3 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda) -----	16
Şekil 16. 3 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri -----	17
Şekil 17. 3 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları -----	17
Şekil 18. 4 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda) -----	18
Şekil 19. 4 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri -----	18
Şekil 20. 4 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları -----	19
Şekil 21. 5 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda) -----	19
Şekil 22. 5 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri -----	20
Şekil 23. 5 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları -----	20
Şekil 24. 6 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda) -----	21
Şekil 25. 6 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri -----	21
Şekil 26. 6 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları -----	22

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Belirlenen genlere özgül primer setleri	8
--	---



ÖZET

Antibiyotik direncinin ortaya çıkması ve yayılması dünya çapında önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu konuda dünya sağlık örgütü başta olmak üzere pek çok kuruluş tarafından acil eylem planları oluşturulmakta ve pek çok ülkede bu doğrultuda gerekli tedbirler alınmaktadır. Bu yüzden antibiyotik direncinin ortaya çıkışı ve yayılımının anlaşılması ve takip edilmesi büyük önem taşımaktadır. Antibiyotiklerin sıklıkla kullanıldığı yerler olan hastaneler antibiyotik direncinin ortaya çıkışı ve çevreye yayılımında rol oynamaktadır. Hastane atık sularında yüksek miktarda bulunan antibiyotik kalıntıları sebebiyle ortamdaki antibiyotik direnç genlerine sahip bakteriler kolaylıkla çoğalıp seçilmektedir. Ayrıca yatay gen transferi sayesinde bakteriler dirençlilik sağlayan genlerini ortamda bulunan farklı bakteri türleri ile paylaşabilmektedir. Herhangi bir ön arıtıma maruz kalmadan hastanelerden deşarj olan atık sular antibiyotik direncinin çevresel yayılımındaki bir numaralı etken olarak gösterilmektedir. Bu nedenle bu projede farklı yatak kapasitesine sahip altı büyük kapasiteli hastane seçilerek bu hastanelerden bir yıl boyunca her mevsim atık su örneği alınmıştır. Yaygın olarak kullanılan ve klinik öneme sahip antibiyotik grupları olan β -laktamlar, sulfonamidler, tetrasiklinler, amfenikoller, aminoglikozidler, makrolid/linkozamid/streptogramin (MLS grubu) ve kinolonlara yönelik olan sırasıyla *blaCTX-M*, *sul1*, *tetA*, *cmlA*, *aadA*, *ermB* ve *qnrS* genlerinin atık sulardaki miktarları kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle belirlenmiştir. Seçilen her bir antibiyotik direnç geninin atık sulardaki varlığı tespit edilmiştir ve tespit edilen direnç geni miktarları *aadA>tetA>cmlA>sul1>qnrS>ermB>blaCTX-M* şeklinde sıralandığı belirlenmiştir. Elde edilen gen miktarları tek yönlü varyans analizi yöntemi ile analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucu *ermB* geni dışındaki bütün genlerin mevsimsel dağılımlarındaki farklılıkların anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik dirençliliği, hastane atık suları, antibiyotik direnç genleri



ABSTRACT

Emergence and dissemination of antibiotic resistance has become an important problem worldwide. Urgent action plans are prepared by many organizations, especially the world health organization and necessary measures are taken in many countries. Therefore, understanding the emergence and dissemination of antibiotic resistance is of great importance. Hospitals, where antibiotics are frequently used, play a role in the emergence and dissemination of antibiotic resistance. Hospital wastewaters have the high amount of antibiotic residues which facilitates the proliferation and dissemination of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. Horizontal gene transfer mechanisms enables bacteria to share their resistance genes with different bacterial species. Effluents discharged from hospitals without any pre-treatment is shown as the number one factor in the environmental dissemination of antibiotic resistance. For this reason, in this project, six large capacity hospitals with different bed capacity were selected and seasonal wastewater samples were taken from these hospitals for one year. Quantitative polymerase chain reaction method were used to quantify antibiotic resistance genes *blaCTX-M*, *sul1*, *tetA*, *cmlA*, *aadA*, *ermB* and *qnrS* which belong commonly used and clinically important antibiotic groups, β -lactams, sulfonamides, tetracyclines, amphenicols, aminoglycosides, macrolide/linkosamide/streptogramin (MLS) and quinolones, respectively. The presence of each selected antibiotic resistance gene in wastewater has been determined. The highest amount of the determined resistance gene is *aadA* while *blaCTX-M* is the lowest amount of detected gene. The determined resistance gene amounts are listed as *aadA*>*tetA*>*cmlA*>*sul1*>*qnrS*>*ermB*>*blaCTX-M*. One-way analysis of variance was carried out. In seasonal statistics, all genes except *ermB* gene were found to be statistically significant ($p<0.05$).

Keywords: Antibiotic resistance, hospital wastewaters, antibiotic resistance genes



ANA METİN

1. GİRİŞ

Antibiyotik dirençli bakterilerin ve antibiyotik direnç genlerinin çevrede yayılımı, biyolojik kirlilik olarak kabul edilmekte ve halk sağlığına karşı giderek büyüyen bir tehdit oluşturmaktadır. Hastane atık suları, antibiyotik dirençli bakterilerin ve direnç genlerinin yayılmasında etkili önemli bir potansiyel kaynaktır. Genellikle atık sularda bulunan antibiyotikler minimum inhibitör konsantrasyonunun altında olmasına rağmen mikrobiyal komünite üzerinde seçici bir baskı oluşturarak dirençli bakteri ve direnç genlerinin çoğalmasına yönelik etki etmektedir Antibiyotik direncinin hastane atık sularında taranması bu problemin takibi ve tanımlanmasında önemli ve gerekli bir çalışmadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Antibiyotikler, enfeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir yer almaktadır. Aynı zamanda antibiyotikler hayvancılık ve tarımda da yaygın olarak kullanılmaktadır (Rodriguez-Mozaz vd. 2014). Antibiyotikler; beta-laktamlar, kinolonlar, tetrasiklinler, amfenikoller, makrolidler, sulfonamidler, aminoglikozitler, gibi farklı sınıflara ayrılırlar (Bouki vd. 2013). Günümüzde kimyasal sentez ile üretilen antibiyotiklerin aksine ilk antibiyotikler doğal yollardan elde edilmiştir. Bu doğal antibiyotikler milyarlarca yıldır belirli bakteriler tarafından üretilerek diğer bakterilere karşı besin kaynaklarının kullanımı açısından fayda sağlamıştır (Wintersdorff vd. 2016). Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılır:

- I. Bakteriyostatikler: Bunlar bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önlerler.
- II. Bakterisitler: Bunlar bakteri hücrelerini doğrudan yok ederler.

Antibiyotikler, etki mekanizmalarına göre beş sınıfta toplanırlar:

- I. Bakterilerin hücre duvarının sentezini inhibe edenler: Bu ilaçlar genellikle bakterisit etkilidir. Sadece gelişmekte olan bakterilere etkilidir, çünkü gelişmesini tamamlamış olanlarda hücre duvarı sentezi de tamamlanmıştır.
- II. Protein sentezini inhibe edenler: Bakterilerin ribozomları 70 S ribozomudur ve insanlardaki 80 S ribozomuna göre antibiyotiklere duyarlılığı daha fazladır. 70S ribozomunda 23 S, 16 S ve 5 S proteinleri bulunur ve 70 S protein sentezi sırasında 30 S ve 50 S alt birimlerine ayrılır.
- III. Sitoplazma membranının geçirgenliğini artırarak etki gösterenler: Bu ilaçlar sitoplazmada bulunan amino asit ve nükleotidler gibi önemli bileşiklerin hücre dışına çıkmalarına neden olur ve bakterisit etki gösterir.

- IV. DNA veya mRNA sentezini bozanlar.
- V. Bakterinin metabolizması için gerekli maddelerin sentezini önleyenler.

Antibiyotik direnci, bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir (Yüce, 2001). Antibiyotikler eski oldukları kadar, antibiyotiklere karşı geliştirilen çeşitli direnç genleri de o kadar eskiye dayanmaktadır. Buna donmuş fosil örneklerinden veya izole mağara mikrobiyom örneklerinden elde edilen DNA dizilerinde rastlanılan antibiyotik direnç genleri kanıt oluşturmaktadır (Wintersdorff vd. 2016). Direnç gelişimi ve yayılımı genellikle gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlanmakla birlikte, antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımı sonucu değil, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğu da bilinmektedir. Ancak antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanıma girilmesi ile birlikte yıllar içinde çoğul dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmış ve bunlarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar yaşanmaya başlamıştır (Tenover ve Hugles, 1996; Cohen, 1992). Bakterilerde antibiyotik dirençliliğine doğal direnç ve kazanılmış direnç şeklinde rastlanmaktadır. Antibiyotik direnci bakterilerde doğal olarak bulunabilir ve bu tür direncin antibiyotik kullanımı ile ilişkisi yoktur. Doğal direnç, mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşımamalarının veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşamamasının bir sonucudur. Bu tür direnç bakterinin temel özelliğidir ve ilaç kullanımı ile ilişkisi yoktur, kalıtsal değildir. Örneğin ilacın dış membrandan geçememesi nedeniyle gram negatif bakteriler vankomisine doğal olarak dirençlidir. Kazanılmış direnç ise bakteri genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak eskiden duyarlı olduğu bir anti-bakteriyel ajandan etkilenmemesidir. Genetik kaynaklı bu direnç kromozomal veya kromozom dışı elemanlara bağlı olabilir. Kromozomal direnç bakteri kromozomunda kendiliğinden oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Ekstrakromozomal direnç, çeşitli yollarla aktarılan plasmid, transpozon ve integron adı verilen genetik elemanlara bağlıdır. Kromozom veya plasmid üzerindeki direnç genleri, bakterinin bölünmesi ile dirençli suşun ve direnç genlerinin yayılımı gerçekleşir (dikey gen transferi). Direnç genleri transformasyon, konjugasyon gibi yatay gen transferi mekanizmaları ile aktarılırlar (Yüce, 2001).

2.1 Beta laktam grubu antibiyotikler ve direnç mekanizmaları

Beta laktamlar, hücre duvarının sentezinden sorumlu olan penisilin bağlayan proteinlerin aktivitesini engelleyerek etki eden antibiyotiklerdir. Günümüzde birçok çeşidi bulunan beta-laktam grubu antibiyotikler kimyasal yapılarına göre; penisilin grubu, sefalosporin grubu, monobaktamlar ve karbapenemler olarak 4 grupta toplandığı görülmektedir.

Beta-laktam antibiyotiklerine karşı direncin temel mekanizması ya kromozom ya da plazmid tarafından kodlanan beta-laktamaz enzimi üretiminin sonucudur. Bu tip direnç hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler tarafından ortaya çıkarılır. Gram pozitif bakteriler içinde beta-laktamaz salgılayan en önemli patojen *Staphylococcus aureus*' tur. Sefalosporinler bu beta-laktamazlara oldukça dayanıklı olmakla birlikte, gram pozitif mikroorganizmaların beta-laktamazları plazmid kontrolünde olup, diğer bakterilere de geçebilmektedir. Gram negatif bakterilerde beta laktamazlar, dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik boşlukta bulunurlar ve kromozom ya da plazmid kontrolünde sentezlenirler. Gram negatif bakterilerin kromozomal beta-laktamazları, bakterinin türüne ve suşa göre indüklenebilen, yüksek düzeyde yapısal veya düşük düzeyde yapısal olabilir. Gram negatif bakterilerde gözlenen beta-laktam direncinin büyük bölümü plazmid kontrolündedir. Özellikle *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. başta olmak üzere, birçok gram negatif bakteride 'geniş spektrumlu beta-laktamaz' (GSBL) yaygın olarak bulunmakta ve plazmid yolu ile diğer bakterilere geçebilmektedir. Beta-laktamazlara ilave olarak porin değişimi ve penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP) modifikasyonu sonucu da direnç oluşabilir. Metisilin dirençli *S.aureus*' da değişik yapıda PBP sentezlenmesi sonucu tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişebilir (Abraham 1987; Çiftci ve Aşık., 2011).

2.2 Kinolonlar ve direnç mekanizmaları

Kinolonlar, bakteri DNA giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV enzimini inhibe eden antibiyotiklerdir. Her iki enzim de bakteri hücrelerinde başarılı bir DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için esastır. Topoizomeraz II, *gyrA* ve *gyrB* genlerinin ürünü olup, iki alfa, iki beta monomeri olmak üzere toplam dört alt ünitelerden oluşmaktadır. Genel olarak kinolonların gram-negatif etkinliği DNA giraz, gram-pozitif etkinliği ise topoizomeraz IV inhibisyonuna bağlıdır. Kinolonlar, DNA giraz enziminin direkt alfa alt birimini etkiler ve DNA girazın, DNA ile oluşturduğu kompleksi stabilize ederek enzimi çalışmaz hale getirir. Kinolonların, "DNA-DNA giraz" enzim kompleksine bağlanarak bakteri DNA'sının replikasyonunu durdurduğu da öne sürülmektedir. Topoizomeraz IV'ün inhibe edilmesiyle de bakterinin bölünmesi sırasında yeni oluşan DNA'nın genç bakterilere bölünmesi işlemi engellenmiş olur. Dolayısıyla kinolonlar bakterisit özelliğinde antibiyotiklerdir.

Florokinolonlara karşı oluşan direnç kromozomal kaynaklı olduğu bilinmektedir (Mayer vd., 1995). Tüm bakteri türlerinde florokinolonlara karşı esas direnç mekanizması DNA giraz enzimidaki mutasyonlardır (*GyrA*, *GyrB*). *gyrA* geni mutasyonları tüm bakterilerde tüm kinolonlara karşı yüksek direnç oluşumundan sorumludur. *gyrB* geni mutasyonları ile de özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *E.coli*' de kinolon direnci gösterilmiştir, ancak bu direnç

tüm kinolonlara karşı olmayabilir. Permeabilite mutantları yalnızca gram negatif bakterilerde gözlenmiş olup, dış membran porinlerinde oluşan değişiklikler sonucu florokinolonlara karşı artmış minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptanır. Bu tip direnç florokinolonların yanı sıra beta-laktamlar, tetrasiklinler gibi diğer ilaçlar içinde geçerlidir. Aktif efluks sistem, ilacın hücre dışına atılımı ile ilgili olan sistem, kinolon direnci yanı sıra tetrasiklin, beta-laktamlar ve benzalkonyum klorür gibi deterjanlara dirence yol açtığı bilinmektedir (Spratt, 1994; Acar, 1997).

2.3 Tetrasiklinler ve direnç mekanizmaları

Tetrasiklinler, bakteri ribozomlarının 30S alt ünitesine bağlanarak aminoasit t-RNA'nın bağlanmasını bloke ederek protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerdir. En az selektif ve en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Tetrasiklin dirençli bakteriler genellikle efluks pompası veya ribozomal koruma sistemi olarak adlandırılan iki farklı direnç mekanizmasından birini eksprese eder. Gram negatif bakterilerde tetrasiklin direnci için tetA' dan tetE' ye kadar farklı genler tanımlanmıştır. Bu genlerin genellikle plazmid veya transpozonla ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Huys vd., 2005).

2.4 Amfenikoller ve direnç mekanizmaları

Amfenikoller ciddi bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan hem gram negatif hem gram pozitif bakterilere karşı etkili geniş spektrumlu sentetik antibiyotik grubudur (Thompson vd., 2017). Bakteriyostatik antibiyotik olan kloramfenikoller, prokaryotlarda protein sentezinde rol oynayan spesifik ve yüksek etkili inhibitörlerdir. Kloramfenikoller protein zincir uzamasını ribozomun 50s alt ünitesinin peptidiltransferaz merkezine geri dönüşümlü bağlanarak inhibe etmektedir (Schwarz vd., 2004). Kloramfenikol direncinden sorumlu üç ana mekanizma mevcuttur. Kloramfenikol asetiltransferazlar (*cat* genleri), spesifik veya çoklu efluks pompaları (*cmIA*, *floR*, *fexA*, *pexA*, ve *fexB* genleri) ve rRNA metilazlar (*cfp* genleri). Bu genler plasmidler, transpozonlar veya integronlar gibi hareketli genetik elementlerde bulunmaktadır ve bu sayede tür ve cins düzeyinde yayılma imkânı bulmaktadırlar (Li vd., 2013).

2.5 Makrolid/Linkozamid/Streptogramin (MLS grubu) antibiyotikler ve direnç mekanizmaları

Makrolidler (eritromisin, klaritromisin, azitromisin) ribozomların 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Bakteriyostatik etkilidir. Gram negatif bakterilerin dış zarı hidrofobik bileşikler geçirmediği için bu bakteriler, makrolid grubu antibiyotiklere doğal olarak dirençlidir. Ribozomal hedefin değişmesi, enzimatik inaktivasyon ve aktif pompa sistemlerinin aşırı ekspresyonu bu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde önemli rol oynar. Ribozomal hedefin değişmesi, aerobik ve anaerobik gram pozitif bakteriler arasında en sık görülen direnç mekanizmasıdır. İlacın bağlandığı 50S ribozomal altbirimdeki 23S rRNA'da spesifik bir adenin molekülünün metilasyonu ile ribozomda yapısal bir değişiklik olur ve ilacın ribosomal RNA'ya bağlanması azalır. Metilasyondan sorumlu enzimler erm (eritromisin ribozom metilasyon) gen bölgesince kodlanır ve çeşitli gram pozitif bakterilerde 8 farklı erm gen sınıfı saptanmıştır. Bu genler kromozom, plazmid veya transpozonlar üzerinde bulunur. Yapısal veya indüklenebilir karakterdedir (Mayer vd., 1995; Davies, 1994). Enzimatik inaktivasyon, eritromisin ve diğer makrolidleri inaktive ederek dirençte rol oynayan çeşitli enzimler vardır. Bu enzimlerin plazmid kaynaklı olduğu saptanmıştır (Mayer vd., 1995).

2.6 Sülfonamidler ve direnç mekanizmaları

Sülfonamidlerin mikroorganizmaya olan etkileri antimetabolit etkidir. Bakteri hücre duvarını yapabilmek için folik aside ihtiyaç duyar. Folik asit sentetaz enzimi yukarıdaki parçaları birbirine bağlayarak folik asit sentezini gerçekleştirir. Folik asidin yapısında PABA bulunur. Eğer bakteri, organizmaya verilen sülfonamid ile karşılaşırsa bunu, kimyasal bakımdan birbirine benzeyen PABA yerine koymaya çalışır. Ancak molekül uzunlukları, genişliği, şekli ve elektronik nedenlerle bu olay gerçekleşemez. Sentez bu safhada son bulur. Hücre duvarı için folik asit oluşmazsa pürin bazlarının sentezi de engellenmiş olur. Pürin bazlarının sentezlenememesi bakteri hücrelerinde RNA ve DNA sentezini de bozar.

Sülfonamidlere direnç, kromozom ve plazmidlerce kodlanabilir. Kromozomal dirençte, mutasyonlar sonucu PABA'nın aşırı sentezi ile folat metabolizmasında sülfonamidlerin inhibisyonu önlenemezse de bu mekanizma klinik olarak pek önemli değildir. Streptococcus pneumoniae ve Neisseria meningitidis' te gözlenir. En sık gözlenen sülfonamid direnci, bakterinin sülfonamidlere düşük afinite gösteren dihidropteroat sentaz enzimi (DHPS) sentezlenmesi olup bu olay plazmid kontrolündedir (Huovinen, 1997).

2.7 Aminoglikozidler ve direnç mekanizmaları

Aminoglikozidler, bakterilerde ribozomlara bağlanarak protein sentezi evresinde mRNA' nın yanlış okunmasına ve bunun sonucunda bakteri ölümüne yol açan antibiyotiklerdir. Aminoglikozid direnci, enzimatik inaktivasyon, ilacın sitoplazmaya geçişinin engellenmesi ve ribozomal hedef değişiklikleri olmak üzere üç mekanizmayla ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmaların en önemlisi enzimatik inaktivasyondur. Bunun önemi, aminoglikozid modifiye eden enzim genlerinin plazmid ya da transpozonlarla yayılabilmesinde (Yüce, 2001).

3. YÖNTEM

Projede kullanılan yöntemler iş akış sırasına göre şu şekilde özetlenebilir. İlk olarak belirlenen hastanelerden atık su örneklerinin mevsimsel olarak toplanması ve toplanan örneklerin uygun koşullarda saklanabilmesi için fikse edilmesi. Fiksasyon işleminin ardından total DNA izolasyonu ile ortamdaki bütün genetik materyalin elde edilmesi. Elde edilen DNA örneklerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması. Analizler sonucu sahip olunan verinin işlenerek istatistiksel analizlerin yapılması.

3.1 Hastane atık su örneklerinin toplanması

Toplanacak örnekler için yoğun kullanıma sahip yatak kapasitesi 160 ile 1140 arasında değişiklik gösteren altı farklı hastane belirlenmiştir. Bu hastanelerden; 1 numaralı hastane 160 yatak kapasitesine, 2 numaralı hastane 730 yatak kapasitesine, 3 numaralı hastane 270 yatak kapasitesine, 4 numaralı hastane 468 yatak kapasitesine, 5 numaralı hastane 1140 yatak kapasitesine ve 6 numaralı hastane 484 yatak kapasitesine sahiptir. Yaz örneği 2017 temmuz ayında, sonbahar örneği 2017 ekim ayında, kış örneği 2018 ocak ayında ve ilkbahar örneği ise 2018 nisan ayında 50 ml miktarlarında üçerli örnekler alınmıştır. Toplanan örnekler iki saat içinde laboratuvara buz kutusu ile taşınmıştır. Örnekler 20 dakika boyunca 4000 rpm ile santrifüj yapılmıştır ve ardından elde edilen peletin üzerine %50 etanol-su karışımı eklenerek fiksasyonu sağlanmıştır. Fikse edilen örnekler DNA izolasyonu öncesi -20°C sıcaklıkta saklanmıştır.

3.2 Total DNA izolasyonu

Saklanan örneklerden DNA izolasyonu Macharey-Nagel firmasının Nucleospin® Soil kiti kullanılarak üreticinin talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır. DNA örneklerinin 260nm ve

280nm dalga boyundaki absorpsanlarına bakılarak kalitelerine ve miktarlarına bakılmıştır. DNA örnekleri %1'lik (m/V) agaroz jelde 80 mV potansiyelde yürütülerek DNA bantları görüntülenmiştir. Bütün örneklerin konsantrasyonları PZR uygulamasına uygun olması açısından 3-5 ng/µl aralığında olacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltme işleminde konsantrasyon değerleri Colibri mikrovolumetrik ışık spektroskopisiyle kontrol edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

3.3 DNA örneklerinin kalitatif analizi

Bakterilere antibiyotik dirençliliğini sağlayan genler (*blaCTX-M*, *sull*, *tetA*, *aadA*, *cmIA*, *ermB* ve *qnrS*) hastane atık sularından alınan örneklerden elde edilen total DNA içinde PZR ile taranmıştır. Antibiyotik dirençliliği sağlayan gen ve gen bölgelerine spesifik primer setleri Tablo.1'de belirtildiği gibidir. Her primer çifti için farklı primer bağlanma sıcaklığı primer çiftinin özelliklerine göre optimize edilmiştir. PZR koşulları şu şekildedir: 2.5 µL 10X PZR tamponu, 1.25 Unit Taq DNA polimeraz, 3 µL 25 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP karışımı, her bir primerden 0,4 mM, 3-5 ng/µL kalıp DNA son hacim 25 µL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlanmıştır. (Korzeniawska vd. 2013). Ardından oluşan PZR ürünleri %1,5'luk (m/V) agaroz jele yüklenip elektroforezde 80 mV sabit potansiyelde yürütüldü ve bantların görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Belirlenen genlere özgül primer setleri

Antibiyotik/gen sınıfı	Hedef gen	Primer sekansı	Amplikon boyutu (bp)	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Referans
16s rRNA	16s	F-CGGTGAATACGTTTCYCGG R-GGWTACCTTGTTACGACTT	143	55	Suzuki vd. 2000
β -laktamlar	<i>bla_{CTX-M}</i>	F-AGTGAAAGCGAACCGAATC R-CTGTCACCAATGCTTTACC	365	54	Shilei vd. 2017
Sülfonamidler	<i>sulI</i>	F-CGCACCGGAAACATCGCTGCAC R- TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG	163	55.9	Pei vd. 2006
Tetrasiklinler	<i>tetA</i>	F-GCTACATCCTGCTTGCC TC R-CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	56	Ng vd. 2001
Aminoglikozidler	<i>aadA</i>	F-AAATTCTTCCAACCTGATCTGCG R-CCTGAACAGGATCTATTTGAGGC	276	58	Tian vd. 2016
Makrolid/linkozamid/st reptogramin	<i>ermB</i>	F-GATACCGTTTACGAAATTGG R-GAATCGAGACTTGAGTGTGC	364	58	Chen vd. 2007
Kinolonlar	<i>qnrS</i>	F-GTATAGAGTTCCGTGCGTGTGA R-GGTTTCGTTCCCTATCCAGCGATT	189	54.6	Mao vd. 2015
Amfenikoller	<i>cmlA</i>	F-GTTGGCGGTACTCCCTTGCC R-GGCCACCTCCCAGTAGAACG	158	55	Li vd. 2013

3.4 Kantitatif analiz

Antibiyotik direnç genlerinin hastane atık sularındaki miktar tayininin yapılabilmesi için her reaksiyonda standart eğri hazırlanması gerekmektedir. Miktarı bilinen kalıp DNA içeren bu örnekler reaksiyonda kullanılarak her bir örneğin Ct değeri hesaplanır. Ct değeri her bir örnek için cihazın ölçümleri sonucu elde ettiği floresan eşik değerine ulaşılan PZR döngüsü sayısıdır. Miktarı bilinen Kalıp DNA'lardan elde edilen bu Ct değerleri standart eğri grafiği oluşturmada kullanılır. Oluşturulan grafik sayesinde miktarı bilinmeyen örneklerin kantitatif PZR sonucu elde edilen Ct değerleri kullanılarak miktar tayini yapılmaktadır. Günümüzde kullanılan kantitatif PZR cihazları ve beraberinde sağlanan uyumlu analiz programları Ct değerleri ve floresans eşik değerlerini otomatik olarak hesaplamakta ve kullanıcıya doğrudan gen miktarı verisini sağlamaktadır.

3.4.1 Standart eğri örneklerinin hazırlanması

Miktar tayini için gerekli olan standart eğrileri için saflaştırılmış PZR ürünleri kullanılmıştır (Makowska vd.,2015). Bu PZR ürünleri Tablo.1 de belirtilen primer çiftleri kullanılarak her bir gen için ayrı konvansiyonel PZR yöntemi ile elde edilmiştir. PZR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kiti ile üreticinin talimatına göre saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış PCR ürünlerinin konsantrasyonları mikrovolumetrik ışık spektrofotometrisi ile ölçülerek kopya sayıları Pei ve arkadaşlarının (2006) daha önce belirttiği;

$$gen\ kopyası\ sayısı = \frac{DNA\ miktarı \times Avogadro\ sayısı}{amplikon\ uzunluğu \times 1.10^{12} \times 0,66}$$

eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen miktarı bilinen ampliconlardan 1/10 seyreltme katsayısı ile dilüsyon serisi hazırlanmıştır. Her bir gen için ayrı hesaplanan ve gen kopya sayıları bilinen dilüsyon serileri kalıp DNA olarak kullanılarak kantitatif PZR yönteminde miktar tayini yapılması için standart eğrilerin oluşturulmasında kullanılmıştır.

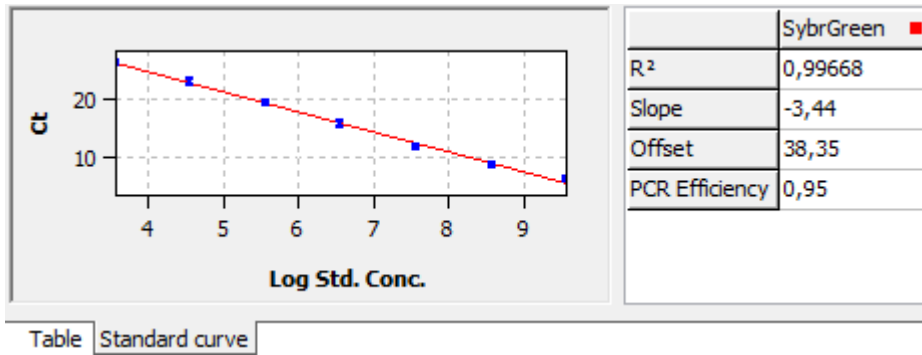
3.4.2 Kantitatif PZR deneylerinin yapılması

Kantitatif PZR yöntemiyle tablo.1'de gösterilen primerler kullanılarak ilgili genlerin kopya sayısı belirlenmiştir. Reaksiyon karışımın hazırlanmasında GoTaq® qPCR Master Mix kullanılmıştır ve üreticinin talimatına göre 20 µl son hacimde hazırlanıp Biometra TOptical Thermocycler termal döngü cihazı kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları, 95°C'de ilk denaturasyonun ardından her döngü 95°C'de 15 saniye denaturasyon aşaması, 20 saniye boyunca tablo.1'de verilen sıcaklıklar ile bağlanma aşaması ve üreticinin talimatına göre

60°C'de uzama aşaması olacak şekilde ayarlanmıştır. Döngülerin bitiminde, 65°C'den 95°C'ye kadar aşamalı olarak yapılan ölçümler ile elde edilen ayrılma eğrisi amplikonların spesifik olup olmadığı kontrol edilmiştir (Rodriguez-Mozaz vd., 2014). Kantitatif PZR deneylerinin amplifikasyon veriminin 0.80-1.20 aralığında ve standart eğrilerinin R^2 değerinin en az 0.990 olmasına dikkat edilmiştir. Yapılan deneylerde elde edilen standart eğri grafikleri ve grafiklere ait değerler her bir gen için aşağıdaki şekilde verilmiştir:

16S rRNA geni için:

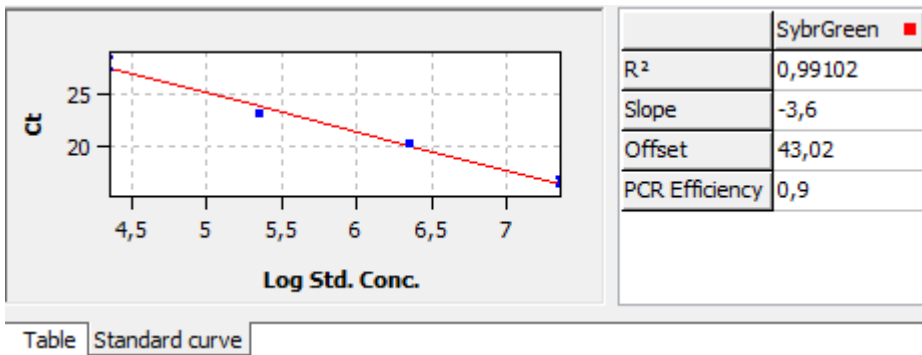
LOQ değeri 3500 kopya/ μ l belirlenmiş olup standart eğri grafiği, R^2 , eğim (slope) ve Y-int (Offset) değerleri şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. 16s rRNA geni için standart eğri grafiği ve değerleri

aadA geni için:

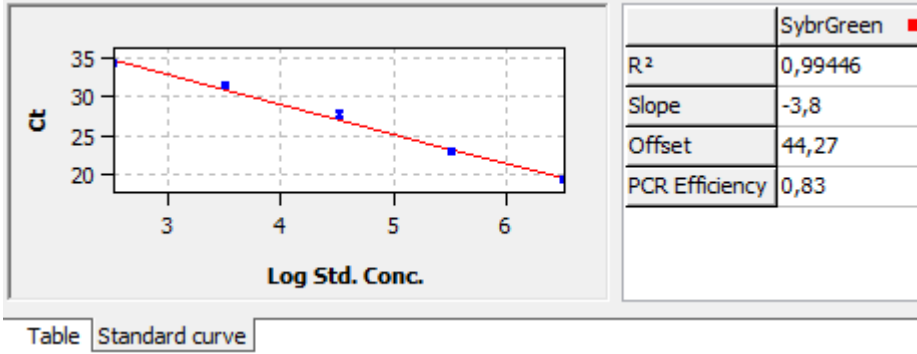
LOQ değeri 10300 kopya/ μ l belirlenmiş olup standart eğri grafiği, R^2 , eğim (slope) ve Y-int (Offset) değerleri şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. *aadA* geni için standart eğri grafiği ve değerleri

tetA geni için:

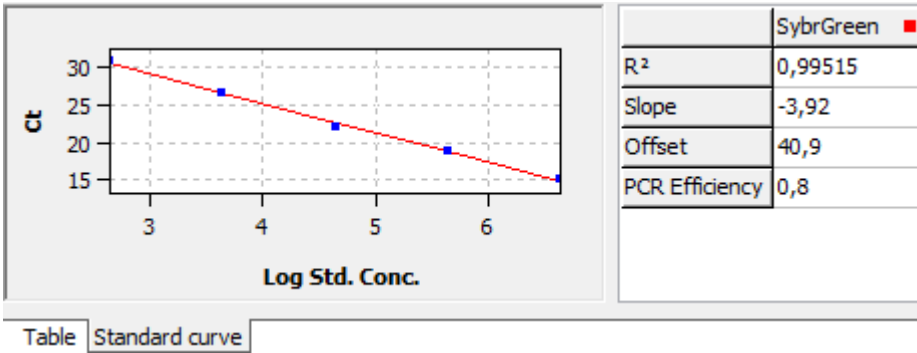
LOQ değeri 330 kopya/ μ l belirlenmiş olup standart eğri grafiği, R^2 , eğim (slope) ve Y-int (Offset) değerleri şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. *tetA* geni için standart eğri grafiği ve değerleri

***cmIA* geni için:**

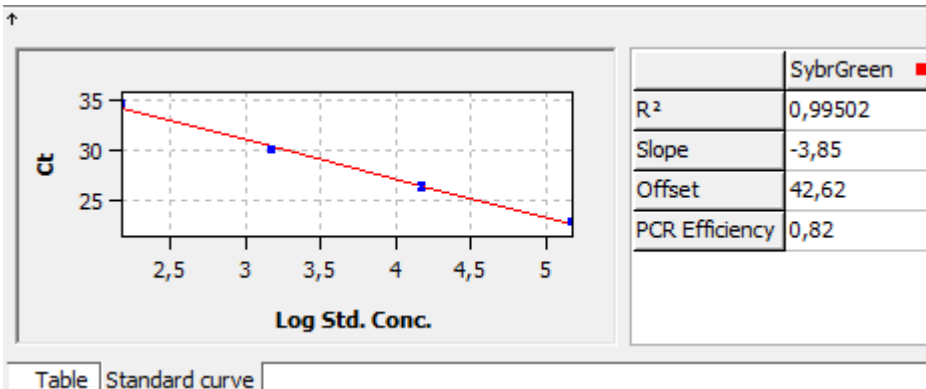
LOQ değeri 44 kopya/μl belirlenmiş olup standart eğri grafiği, R², eğim (slope) ve Y-int (Offset) değerleri şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4. *cmIA* geni için standart eğri grafiği ve değerleri

***sul1* geni için:**

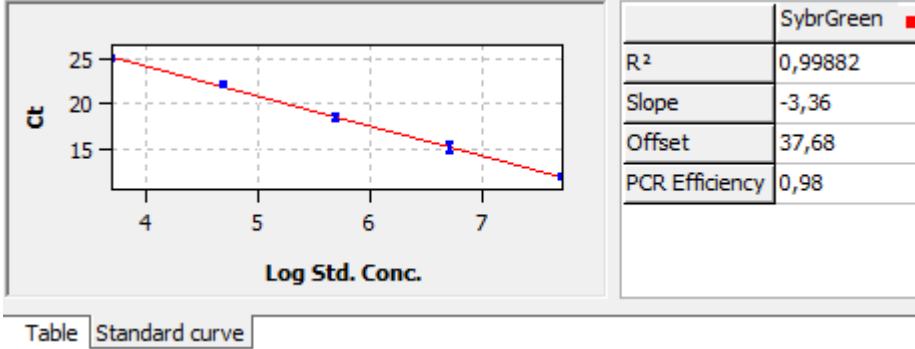
LOQ değeri 15 kopya/μl belirlenmiş olup standart eğri grafiği, R², eğim (slope) ve Y-int (Offset) değerleri şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. *sul1* geni için standart eğri grafiği ve değerleri

***qnrS* geni için:**

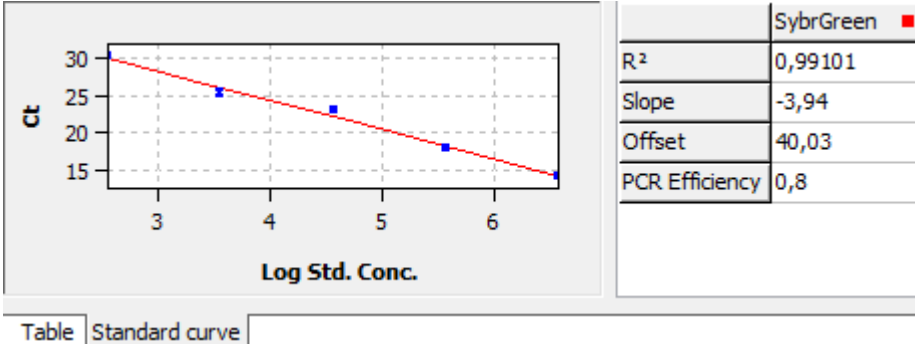
LOQ değeri 50 kopya/μl belirlenmiş olup standart eğri grafiği, R^2 , eğim (slope) ve Y-int (Offset) değerleri şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. *qnrS* geni için standart eğri grafiği ve değerleri

***ermB* geni için:**

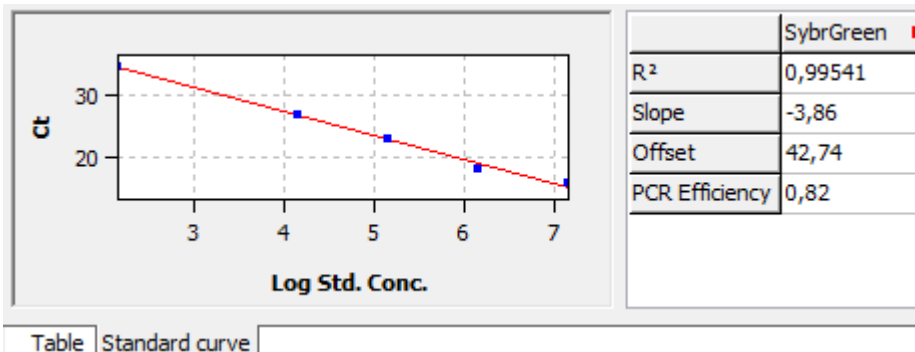
LOQ değeri 37 kopya/μl belirlenmiş olup standart eğri grafiği, R^2 , eğim (slope) ve Y-int (Offset) değerleri şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. *ermB* geni için standart eğri grafiği ve değerleri

***bla_{CTX-M}* geni için:**

LOQ değeri 5 kopya/μl belirlenmiş olup standart eğri grafiği, R^2 , eğim (slope) ve Y-int (Offset) değerleri şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. *bla_{CTX-M}* geni için standart eğri grafiği ve değerleri

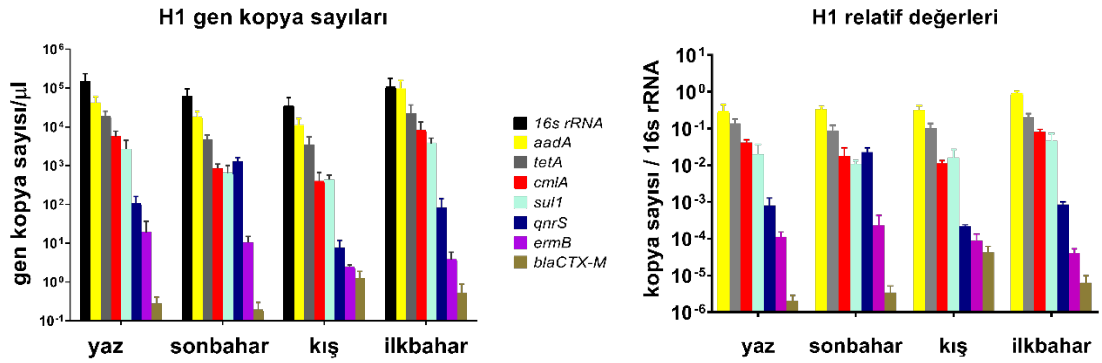
3.5 İstatistiksel analizler

Tek Yönlü ANOVA testleri ikiden fazla grupta anlamlı farklılığın belirlenmesi için kullanılan bir analiz olması ile antibiyotik direnç genleri arasındaki mevsimsel farklılığın belirlenmesinde ideal yöntemdir. Tek Yönlü ANOVA analizi, bize grupların birbirinden farklı olup olmadığı bilgisini verir yalnız farklı olanı grubu belirtmez, bu yüzden Tukey post hoc testi yapılarak mevsimler arasındaki ikili karşılaştırmalara da bakılmıştır. Bu sayede anlamlı farklılık gösteren mevsimler belirlenebilmiştir (Macconnell vd., 2018). Tek Yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testleri SPSS 24.0 (IBM SPSS Statistics, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

Elde edilen sonuçlar hastane bazında; mL atık su örneğindeki kopya sayıları (3-5 ng/ μ L konsantrasyonunda kalıp DNA'dan kantitatif PZR reaksiyonunda 1 μ L miktarındaki kopya sayısı), *16s rRNA* genine göre relatif değerler, mevsimsel dağılım ve gen dağılımı grafikleri şeklinde aşağıda gösterilmektedir:

4.1 1 numaralı hastane (H1) sonuçları

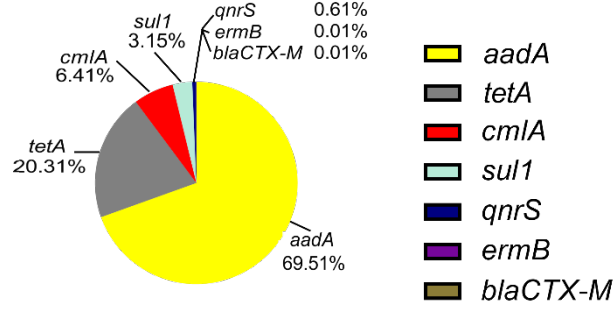


Şekil 9. 1 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda)

H1 hastanesinin atık su örneklerinin antibiyotik direnç genleri miktarları ve bu genlerin *16s rRNA* genine göre relatif değerleri Şekil 9'da verilmiştir. H1 örneklerinde her mevsimde antibiyotik direnç genleri tespit edilmiştir. Miktar tayini sonucu en çok yayılan genin *aadA* olduğu belirlenmiştir ve antibiyotik direnç geni miktarları

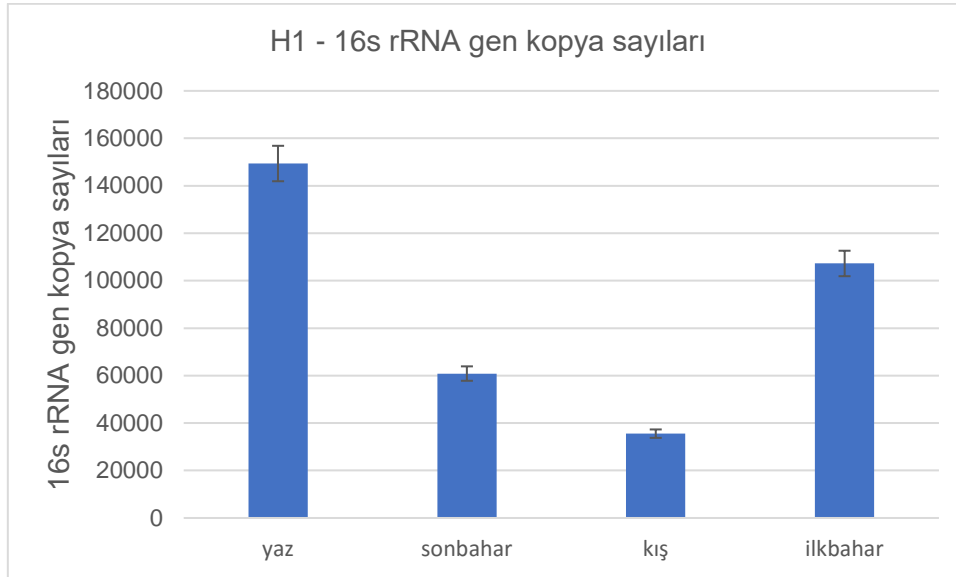
aadA>tetA>cmlA>sul1>qnrS>ermB>blaCTX-M şeklinde sıralanmaktadır. Şekil 10'da bu antibiyotik direnç genlerinin birbirleri arasındaki dağılım yüzdeleri verilmiştir.

H1 toplam gen dağılımları



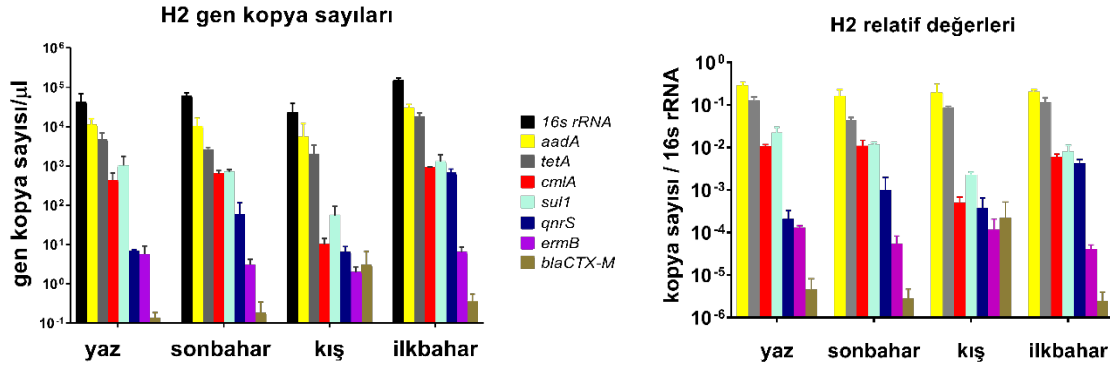
Şekil 10. 1 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri

H1 örnekleri *ermB* ve *tetA* genleri dışındaki bütün genlerde mevsimsel olarak anlamlı ($p<0.05$) istatistiksel fark tespit edilmiştir. Şekil 11'de gösterilen kopya sayıları *16s rRNA* genine ait olup atık sularda bulunan tüm bakteriyel popülasyonu temsil etmektedir. Burada yaz ve ilkbahar mevsimlerinde bakteriyel etkinin arttığı gözlenmektedir. H1 örnekleri içinde *blaCTX-M* geni hariç bütün genler ilkbahar ve yaz mevsimlerinde yoğun yayılım göstermektedir.



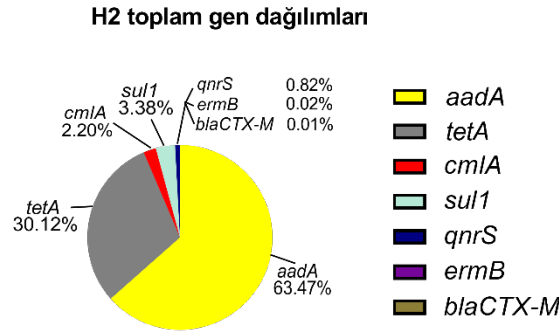
Şekil 11. 1 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları

4.2 2 numaralı hastane (H2) sonuçları



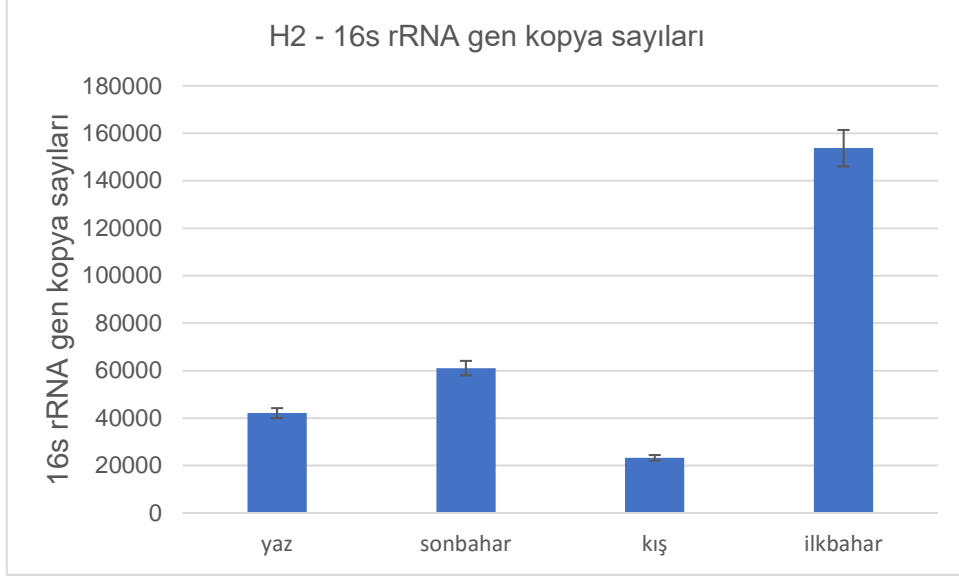
Şekil 12. 2 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda)

H2 hastanesinin atık su örneklerinin antibiyotik direnç genleri miktarları ve bu genlerin 16s rRNA genine göre relatif değerleri Şekil 12'de verilmiştir. H2 hastanesinin atık su örneklerinde her mevsimde antibiyotik direnç genleri tespit edilmiştir. Miktar tayini sonucu en çok yayılan genin *aadA* olduğu belirlenmiştir ve antibiyotik direnç geni miktarları *aadA*>*tetA*>*sul1*>*cmlA*>*qnrS*>*ermB*>*bla*_{CTX-M} şeklinde sıralanmaktadır. Şekil 13'te bu antibiyotik direnç genlerinin birbirleri arasındaki dağılım yüzdeleri verilmiştir.



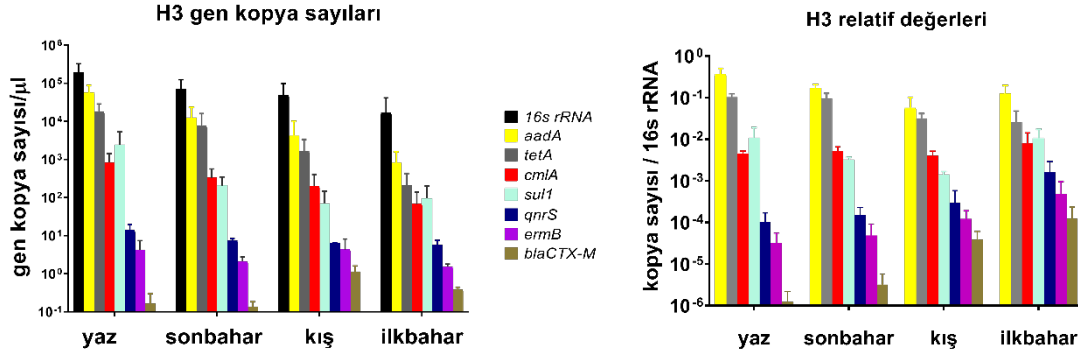
Şekil 13. 2 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri

H2 örneklerinde *tetA*, *aadA*, *qnrS* ve *cmlA* genlerinde mevsimsel olarak anlamlı ($p < 0.05$) istatistiksel fark tespit edilmiştir. Şekil 14'te gösterilen kopya sayıları *16s rRNA* genine ait olup atık sularında bulunan tüm bakteriyel popülasyonu temsil etmektedir. Burada özellikle ilkbahar mevsiminde bakteriyel etkinin arttığı gözlenmektedir. H2 örnekleri içinde *bla*_{CTX-M} geni hariç bütün genler ilkbahar mevsiminde yoğun yayılım göstermektedir.



Şekil 14. 2 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları

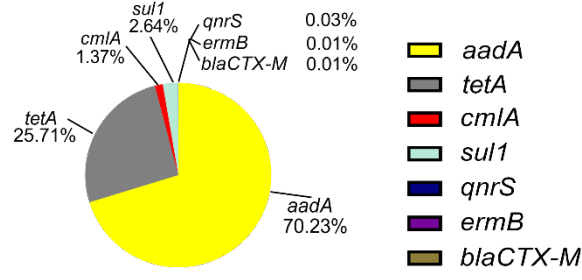
4.3 3 numaralı hastane (H3) sonuçları



Şekil 15. 3 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda)

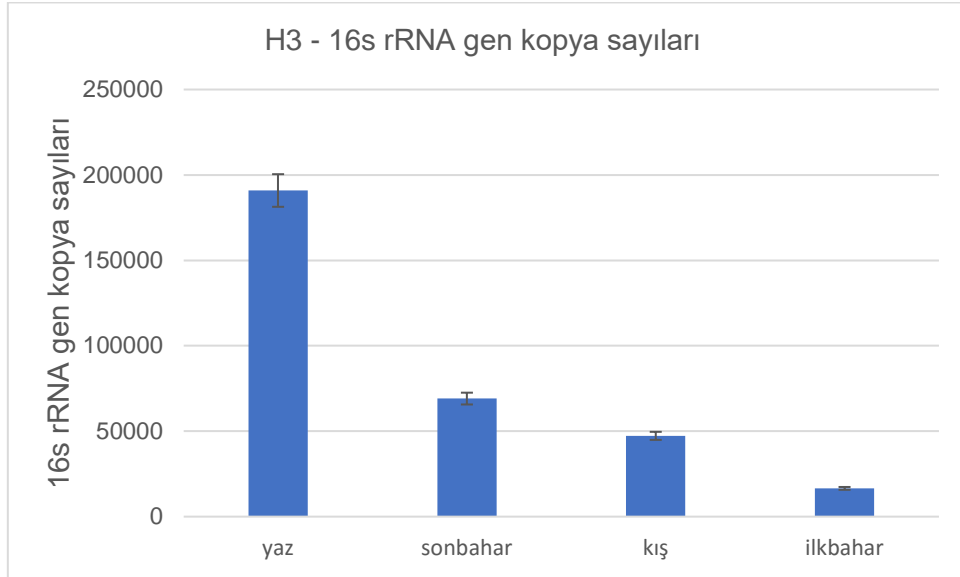
H3 hastanesinin atık su örneklerinin antibiyotik direnç genleri miktarları ve bu genlerin 16s rRNA genine göre relatif değerleri Şekil 15'te verilmiştir. H3 hastanesinin atık su örneklerinde her mevsimde antibiyotik direnç genleri tespit edilmiştir. Miktar tayini sonucu en çok yayılan genin *aadA* olduğu belirlenmiştir ve antibiyotik direnç geni miktarları *aadA*>*tetA*>*sul1*>*cmlA*>*qnrS*>*ermB*>*bla_{CTX-M}* şeklinde sıralanmaktadır. Şekil 16'da bu antibiyotik direnç genlerinin birbirleri arasındaki dağılım yüzdeleri verilmiştir.

H3 toplam gen dağılımları



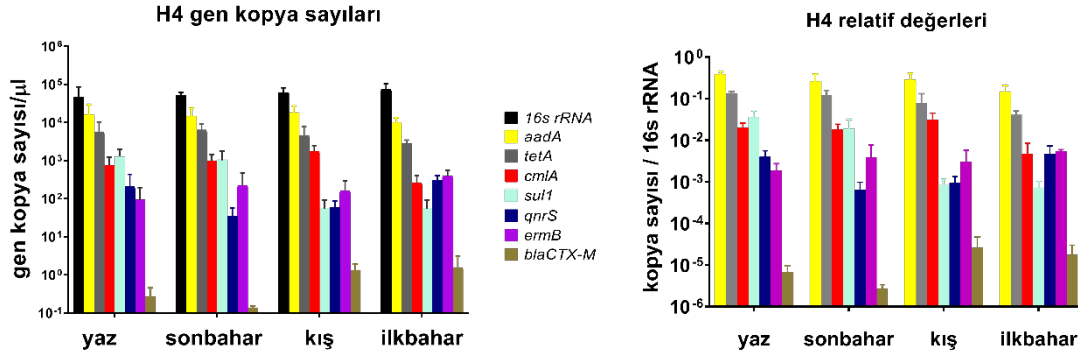
Şekil 16. 3 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri

H3 örneklerinde yalnızca *bla_{CTX-M}*, *aadA* ve *qnrS* genlerinde mevsimsel olarak anlamlı ($p < 0.05$) istatistiksel fark tespit edilmiştir. Şekil 17’de gösterilen kopya sayıları *16s rRNA* genine ait olup atık sularda bulunan tüm bakteriyel popülasyonu temsil etmektedir. Burada yaz mevsiminde bakteriyel etkinin arttığı gözlenmektedir. H3 örnekleri içinde *bla_{CTX-M}* geni hariç bütün genler yaz mevsiminde artan yayılım göstermektedir.



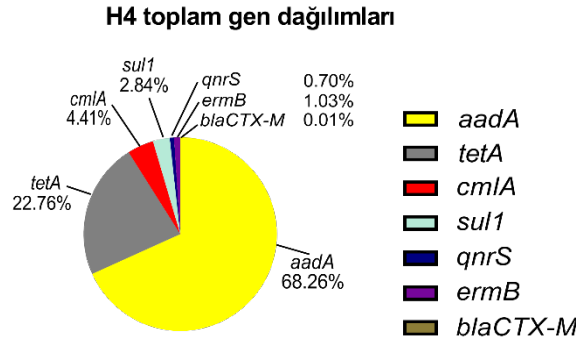
Şekil 17. 3 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları

4.4 4 numaralı hastane (H4) sonuçları



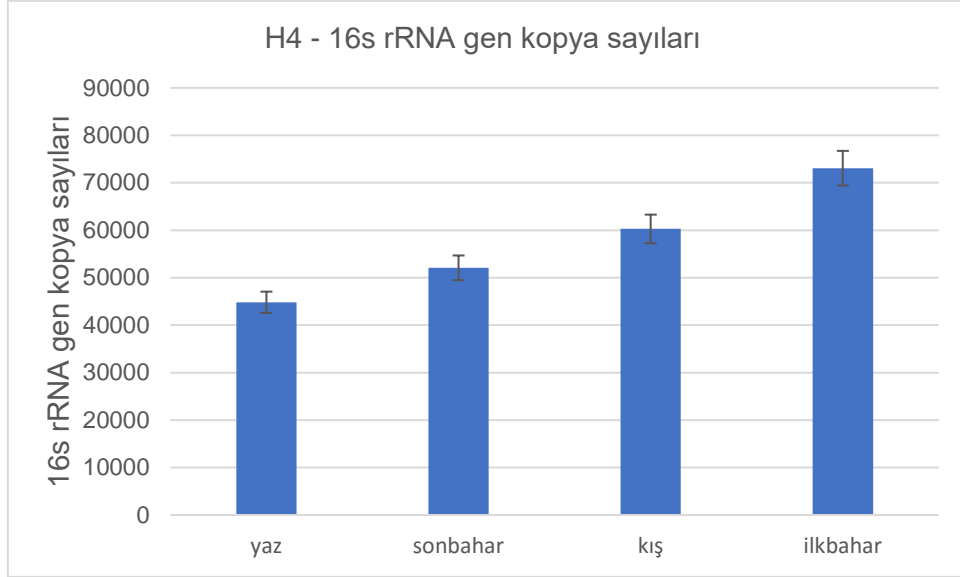
Şekil 18. 4 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda)

H4 hastanesinin atık su örneklerinin antibiyotik direnç genleri miktarları ve bu genlerin 16s rRNA genine göre relatif değerleri Şekil 18’de verilmiştir. H4 hastanesinin atık su örneklerinde her mevsimde antibiyotik direnç genleri tespit edilmiştir. Miktar tayini sonucu en çok yayılan genin *aadA* olduğu belirlenmiştir ve antibiyotik direnç geni miktarları *aadA*>*tetA*>*cmlA*>*sul1*>*ermB*>*qnrS*>*bla*_{CTX-M} şeklinde sıralanmaktadır. Şekil 19’da bu antibiyotik direnç genlerinin birbirleri arasındaki dağılım yüzdeleri verilmiştir.



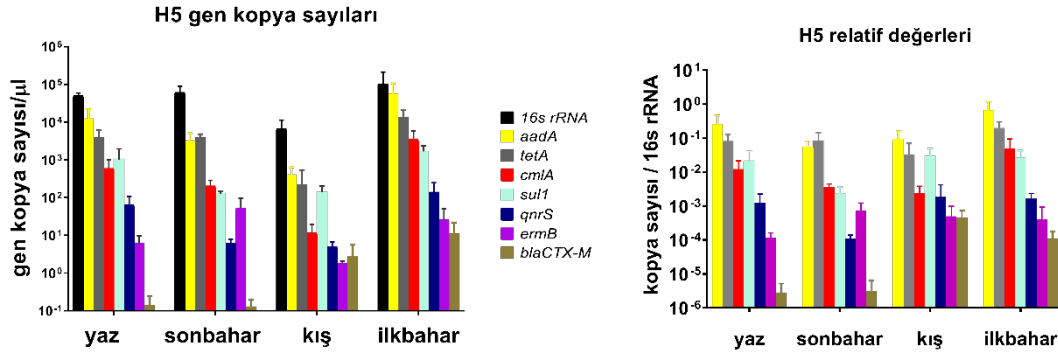
Şekil 19. 4 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri

H4 örneklerinde sadece *sul1* ve *cmlA* genlerinde mevsimsel olarak anlamlı ($p < 0.05$) istatistiksel fark tespit edilmiştir. Şekil 12’de gösterilen kopya sayıları *16s rRNA* genine ait olup atık sularda bulunan tüm bakteriyel popülasyonu temsil etmektedir. Şekil 20’de dengeli bir mevsimsel dağılım gözlenmektedir. H4 örneklerinin yayılımında genel olarak mevsimlerin doğrudan etkisi olmadığı görülmektedir.



Şekil 20. 4 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları

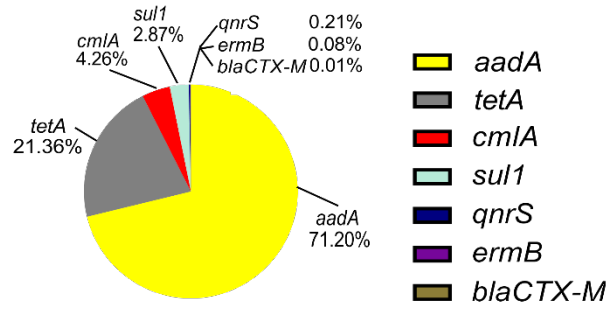
4.5 5 numaralı hastane (H5) sonuçları



Şekil 21. 5 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda)

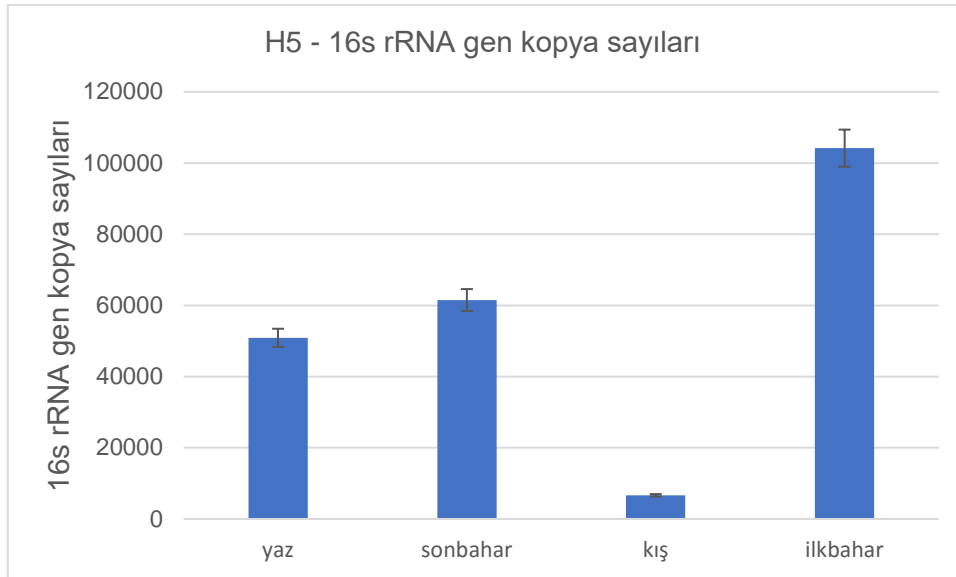
H5 hastanesinin atık su örneklerinin antibiyotik direnç genleri miktarları ve bu genlerin 16s rRNA genine göre relatif değerleri Şekil 21'de verilmiştir. H5 hastanesinin atık su örneklerinde her mevsimde antibiyotik direnç genleri tespit edilmiştir. Miktar tayini sonucu en çok yayılan genin *aadA* olduğu belirlenmiştir ve antibiyotik direnç geni miktarları *aadA*>*tetA*>*cmlA*>*sul1*>*ermB*>*qnrS*>*bla_{CTX-M}* şeklinde sıralanmaktadır. Şekil 22'de bu antibiyotik direnç genlerinin birbirleri arasındaki dağılım yüzdeleri verilmiştir.

H5 toplam gen dağılımları



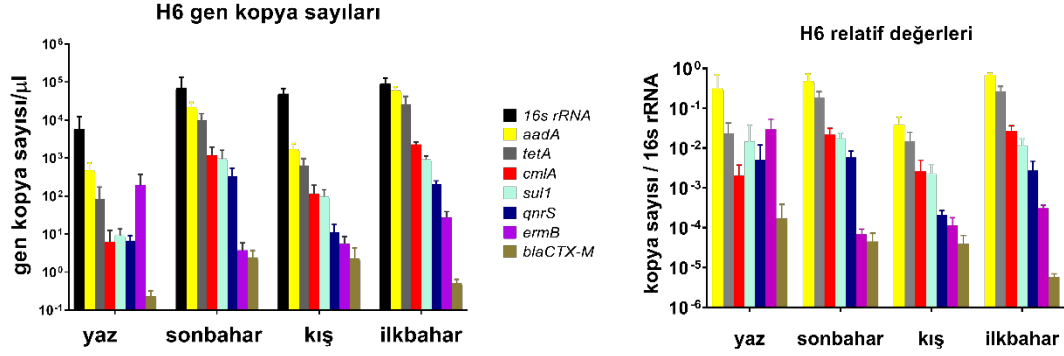
Şekil 22. 5 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri

H5 örneklerinde *tetA*, *sul1* ve *cmlA* genlerinde mevsimsel olarak anlamlı($p<0.05$) istatistiksel fark tespit edilmiştir. Şekil 15’de gösterilen kopya sayıları *16s rRNA* genine ait olup atık sularda bulunan tüm bakteriyel popülasyonu temsil etmektedir. Şekil 23’te özellikle ilkbahar mevsiminde bakteriyel etkinin arttığı gözlenmektedir. H5 örnekleri içinde bütün genler ilkbahar mevsiminde yoğun yayılım göstermektedir.



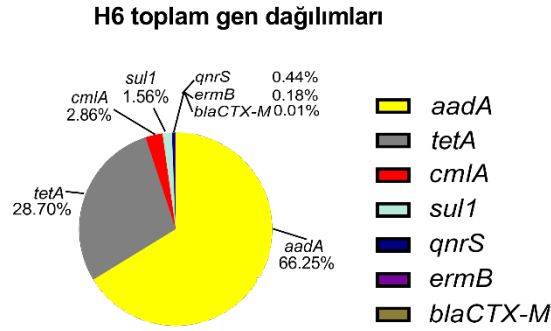
Şekil 23. 5 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları

4.6 6 numaralı hastane (H6) sonuçları



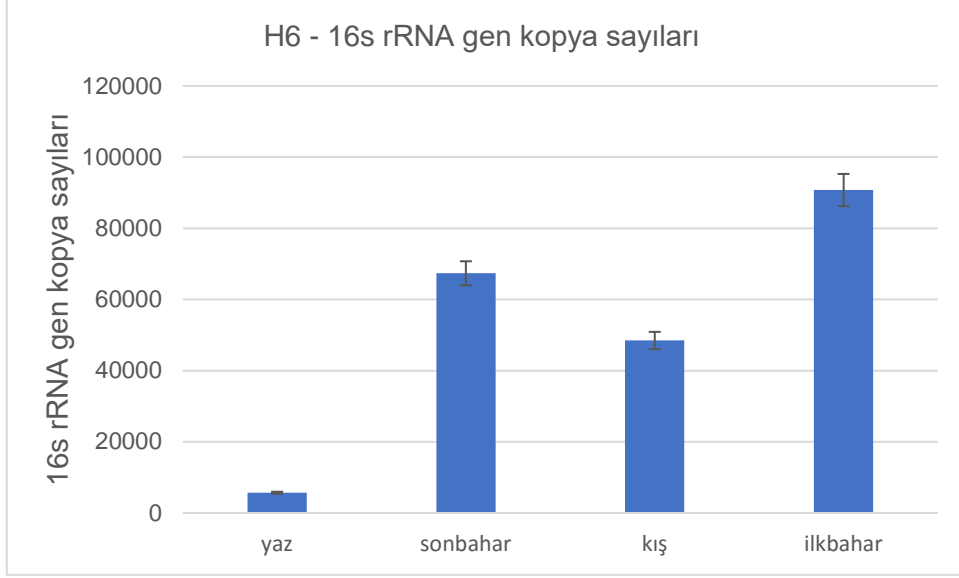
Şekil 24. 6 numaralı hastane örneklerinin ortalama antibiyotik direnç gen miktarları (solda) ve relatif değerleri (sağda)

H6 hastanesinin atık su örneklerinin antibiyotik direnç genleri miktarları ve bu genlerin 16s rRNA genine göre relatif değerleri Şekil 24’de verilmiştir. H6 hastanesinin atık su örneklerinde her mevsimde antibiyotik direnç genleri tespit edilmiştir. Miktar tayini sonucu en çok yayılan genin *aadA* olduğu belirlenmiştir ve antibiyotik direnç geni miktarları *aadA*>*tetA*>*cmlA*>*sul1*>*ermB*>*qnrS*>*bla_{CTX-M}* şeklinde sıralanmaktadır. Şekil 25’te bu antibiyotik direnç genlerinin birbirleri arasındaki dağılım yüzdeleri verilmiştir.



Şekil 25. 6 numaralı hastanedeki gen dağılımı yüzdeleri

H6 örneklerinde *tetA*, *sul1*, *qnrS*, *aadA* ve *cmlA* genlerinde mevsimsel olarak anlamlı ($p < 0.05$) istatistiksel fark tespit edilmiştir. Şekil 18’de gösterilen kopya sayıları *16s rRNA* genine ait olup atık sularda bulunan tüm bakteriyel popülasyonu temsil etmektedir. Şekil 26’da özellikle ilkbahar mevsiminde bakteriyel etkinin arttığı gözlenmektedir. H6 örnekleri içinde bütün genler ilkbahar mevsiminde yoğun yayılım göstermektedir.



Şekil 26. 6 numaralı hastane için 16s rRNA gen kopya sayıları

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Beta laktam grubu antibiyotiklerin çevrede yayılımında etkili olduğu gösterilen *Kluyvera* türlerinin dışında CTX grubu beta laktamlara olan direncin *E.coli*'de ve *Enterobacter* türlerinde arttığı tespit edilmiştir. Beta laktamlara olan enzimatik dirençten sorumlu olan CTX grubu antibiyotik direnç genleri en çok çeşitlilik gösteren direnç geni olduğu pek çok ülkede farklı enzim varyasyonlarının ortaya çıkması ile gösterilmiştir (Canton vd., 2012). Elde ettiğimiz sonuçlarda diğer antibiyotik direnç genlerine nispeten düşük miktarda olsa da her mevsim varlığını sürdürdüğü ve hastane atık sularından yayıldığı anlaşılmaktadır. Makrolid ve kinolon grubu antibiyotiklere direnç sağlayan sırasıyla *ermB* ve *qnrS* genleri de klinik ortamda ve hastane atık sularında tespit edilmiştir (Schimitz vd.,2000; Rodriguez-Mozaz vd.,2015; Auguet vd.,2017). Sulfonamidlere direnç sağlayan *sul1* geni atık sularında ve klinik ortamlarda sıklıkla gösterilmektedir. Yatay gen transferine aracılık eden mobil genetik elementler ile sıklıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ploy vd.,2000; Rodriguez-Mozaz vd.,2015). Mobil genetik elementlerle ilişkisi yüksek olarak gösterilen diğer iki antibiyotik direnç geni *aadA* ve *cmlA*, sırasıyla aminoglikozid ve kloramfenikol antibiyotiklerine direnç sağlamaktadır. Bu genlerin integronların gen kasetlerinde sıklıkla yer aldığı gösterilmiştir (Ploy vd.,2000; Collis vd.,1995; Chang vd.,2011). Aminoglikozid direnç geni (*aadA*) miktarlarının tüm örneklerde büyük miktarda çıkması integron gibi mobil genetik elementlerin de hastane atık sularında yüksek miktarda bulunduğu işaret etmektedir. Bu durum yatay gen transferi potansiyelinin de yüksek olduğunu ve herhangi bir antibiyotik direnç geninin antibiyotik kullanımının artmasıyla seçilime uğrayıp kolayca çoğalabileceğini göstermektedir. Hastane atıksularında sıklıkla görülen bir

diğer direnç genleri, tetrasiklin antibiyotikleri grubuna ait olan efluks pompası kodlayan *tet* genleridir (Wang vd.,2018; Proia vd.,2018). Bu proje de bakılan *bla_{CTX-M}*, *sul1*, *tetA*, *cmlA*, *aadA*, *ermB* ve *qnrS* genleri tüm mevsimlerde tespit edilmiştir. Bu genlerin sıklıkla ilkbahar ve yaz aylarında miktarlarının, dolayısıyla hastane atık sularından yayılımının, arttığı gösterilmiştir. Antibiyotik direnç genlerinin belirli mevsimlerde yayılımının yüksek olması diğer mevsimlerdeki yayılımının önemsiz olduğu anlamına gelmemelidir. Elde edilen sonuçlar antibiyotik direnç genlerinin her mevsim belirli seviyelerde hastanelerden yayıldığını göstermektedir.

1140 yatak kapasiteli 5 numaralı hastanede β -laktam antibiyotiklerine direnç sağlayan *bla_{CTX-M}* geni en yüksek miktarda ilkbahar sezonunda tespit edilmiştir. 468 yatak kapasiteli 4 numaralı hastanede ise makrolid grubu antibiyotiklere direnç sağlayan *ermB* geni tüm mevsimlerde en yüksek kopya sayısı göstermiştir. Tetrasiklin direnç geni olan *tetA* geni ise ilkbahar sezonunda 160 yataklı 1 numaralı ve 484 yataklı 6 numaralı hastanelerde yüksek kopya sayılarında tespit edilmiştir. Aminoglikozid direnç geni *aadA*, amfenikol direnç geni *cmlA*, sulfonamid direnç geni *sul1* ilkbahar sezonunda ve kinolon direnç geni *qnrS* sonbahar sezonunda en yüksek kopya sayıları 160 yataklı 1 numaralı hastanede tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, en düşük yatak kapasitesine sahip olan 1 numaralı hastanenin antibiyotik direnç genlerinin yayılımında daha etkin bir role sahip olduğuna işaret etmektedir. Bu durum antibiyotik direnç genlerinin yayılımının hastane büyüklüğü ile doğrudan bir ilişkisi olmadığını ancak yoğun antibiyotik kullanımıyla ilişkili olduğu sonucuna yönlendirmektedir. Literatürde hastane atık sularının farklı alıcı su ortamlarından daha yüksek antibiyotik direnç geni içeriğine sahip olduğu sıklıkla bildirilmiştir. Vietnam, Brezilya ve Polonya'da yapılan çalışmalarda atık sulardan izole edilen bakterilerin dirençli olduğu ve yüksek miktarlarda antibiyotik direnç geni içerdikleri gösterilmiştir (Lien ve ark., 2017, Picao ve ark., 2013, Korzeniewska ve ark., 2013). Portekiz'de ve Fransa'da yapılan çalışmalarda antibiyotik direnç genlerinin belirteci olarak kullanılan integron ve antibiyotik direnç genlerinin hastane atık sularında yüksek miktarda bulunduğu gösterilmiştir (Laquaz ve ark., 2018, Narciso-da-rocha ve ark., 2014). Amerika Birleşik Devletleri, İspanya, Belçika, Singapur ve Suudi Arabistanda yapılan çalışmalarda ise çeşitli antibiyotik direnç genlerinin hastane atık sularında yüksek olduğu ve varlıklarını alıcı ortamlarda devam ettirdikleri gösterilmiştir (Walia ve ark., 2016, Rodriguez-Mozaz ve ark., 2015, Proia ve ark., 2018, Le ve ark., 2016, Timraz ve ark., 2017). Yapılan metagenomik çalışmalar, hastane atık sularında belirlenen antibiyotik direnç geni tanımlayıcı sekans miktarlarının hastane atık sularında diğer ortamlardan fazla olduğunu bildirmektedir (Rowe ve ark., 2017, Karkman ve ark., 2019). Çin'de 3 farklı hastaneden ve Tunus'ta 7 farklı hastaneden alınan örneklerle yapılan çalışmalarda antibiyotik direnç genlerinin hastaneler arasında farklı

miktarlarda bulunmalarının sebebi olarak dirençli bakteri salgınlarına yönelik artan antibiyotik kullanımı olduğu belirtilmektedir (Nasri ve ark., 2017, Wang ve ark., 2018).

Bütün bu veriler ışığında antibiyotik direnç genlerinin yoğun antibiyotik kullanımına sahip hastanelerde, hastane büyüklüğü önem arz etmeksizin, yayılabildiği görülmektedir. Hastane atık sularından yayılan antibiyotik dirençli bakteriler ve antibiyotik direnç genleri, ulaştıkları alıcı su ortamlarından tarım ve hayvancılık gibi yollarla insan hayatına dahil olabilmektedir. Bunun sonucunda tedavi maksatlı kullanılan ve kritik öneme sahip olan antibiyotikler işlevsiz kalmaktadır. Bu yüzden hastane atık sularının herhangi bir ön arıtım olmaksızın çevresel ortamlara yayılması halk sağlığı ve ülke ekonomisi açısından büyük tehdit oluşturmaktadır. Ülkemizde, “Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği” kapsamında hastane atık suları evsel atık su tanımında yer almıştır. Bu durum hastane atık sularının belirli kriterlerin sağlanması karşılığında doğrudan alıcı ortamlara deşarj edilmesinin önünü açmaktadır. Hastane atık suları herhangi bir arıtım olmadan alıcı ortamlara deşarj edilmemelidir. Yapılan bu çalışma da, hastane atık sularının antibiyotik direnç genlerinin çevreye yayılması açısından önemli bir noktasal kaynak olduğu ve kaynağında arıtılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKÇA

- Abraham E.P. 1987. Cephalosporins. “The Cephalosporin Antibiotics”. Williams J.D. Auckland: Adis Press.
- Acar, J.F., Goldstein, F.W. 1997. “Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones”, *Clin Infect Dis*, 24(Suppl 1), 567-73.
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews*, 29 Suppl 1(Suppl 1), S49–S52.
- Auguet, O., Pijuana, M., Borrego, C.M., Rodriguez-Mozaz, S., Triadó-Margarit, X., Giustina, S.V.D., Gutierrez, O., 2017 “Sewers as potential reservoirs of antibiotic resistance” *Science of the Total Environment* 605-606, 1047-1054.
- Bäumlisberger M, Youssar L, Schilhabel MB, Jonas D. 2015. Influence of a Non-Hospital Medical Care Facility on Antimicrobial Resistance in Wastewater. *PLoS ONE* 10(3): e0122635. doi:10.1371/journal.pone.0122635
- Bouki, C., Venieri, D., & Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.016>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- Chang, C. Y., Lu, P. L., Lin, C. C., Lee, T. M., Tsai, M. Y., & Chang, L. L. (2011). Integron types, gene cassettes, antimicrobial resistance genes and plasmids of *Shigella sonnei* isolates from outbreaks and sporadic cases in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology*, 60(2), 197–204. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.022517-0>
- Chen, H., & Zhang, M. (2013). Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China. *Environment International*, 55, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.01.019>

- Cohen M.L., 1992. "Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era". *Science*, 257, 1050-1055.
- Collis, C. M., & Hall, R. M. (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), 155–162. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.1.155>
- Çiftci, İ.H., Aşık, G., 2011, "Acinetobacter baumannii" nin antibiyotik direnç mekanizmaları", *Ankem Derg.* 25(3): 196-207.
- Davies, J. 1994. "Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes". *Science*, 264, 375-82.
- Huovinen, P. 1997. "Increases in rates of resistance to trimethoprim". *Clin Infect Dis*, 24(Suppl 1), 63-6.
- Huys G., Cnockaert M., Vaneechoutte M. 2005. "Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals", *Res Microbiol*, 156(3), 348-55.
- Karkman, Antti Pärnänen, Katariina Larsson, D. G. Joakim 2019 Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments *Nature Communications* 10.1038/s41467-018-07992-3
- Korzeniawska, E., Korzeniawska, A., Harnisz, M. 2013. "Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 96-102.
- Laquaz, M., Dagot, C., Bazin, C. 2018 Ecotoxicity and antibiotic resistance of a mixture of hospital and urban sewage in a wastewater treatment plant *Environ Sci Pollut Res* 25: 9243. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9957>
- Le, T. H., Ng, C., Chen, H., Yi, X. Z., Koh, T. H., Barkham, T. M., ... Gin, K. Y. (2016). Occurrences and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria and Genetic Determinants of Hospital Wastewater in a Tropical Country. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(12), 7449–7456. doi:10.1128/AAC.01556-16
- Li, J., Shao, B., Shen, J., Wang, S., & Wu, Y. (2013). Occurrence of chloramphenicol-resistance genes as environmental pollutants from swine feedlots. *Environmental Science and Technology*, 47(6), 2892–2897. <https://doi.org/10.1021/es304616c>
- Lien, L.T.Q.; Lan, P.T.; Chuc, N.T.K.; Hoa, N.Q.; Nhung, P.H.; Thoa, N.T.M.; Diwan, V.; Tamhankar, A.J.; Stålsby Lundborg, C. Antibiotic Resistance and Antibiotic Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Hospital Wastewater in Vietnam. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14, 699.
- Makowska, N., Koczura, R., Mokracka, J., 2015. "Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water", *Chemosphere*, 144, 1665-1673.
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., ... Alvarez, P. J. J. (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 85, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>
- Mayer, K.H., Opal S.M., Medeiros A.A. 1995. Mechanisms of antibiotic resistance, Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fourth ed. New York: Churchill Livingstone, 212-25.
- McConnell, M. M., Truelstrup Hansen, L., Jamieson, R. C., Neudorf, K. D., Yost, C. K., & Tong, A. (2018). Removal of antibiotic resistance genes in two tertiary level municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 643, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.212>
- C. Narciso-da-Rocha, A.R. Varela, T. Schwartz, O.C. Nunes, C.M. Manaia 2014 blaTEM and vanA as indicator genes of antibiotic resistance contamination in a hospital-urban wastewater treatment plant system *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 2 (2014), pp. 309-315
- Nasri, J. Subirats, A. Sánchez-Melsió, H. Ben Mansour, C.M. Borrego, J.L. Balcázar 2017 Abundance of carbapenemase genes (blaKPC, blaNDM and blaOXA-48) in wastewater effluents from Tunisian hospitals *Environ. Pollut.*, 229 pp. 371-374, 10.1016/j.envpol.2017.05.095
- Ng, C., Tay, M., Tan, B., Le, T. H., Haller, L., Chen, H., ... Gin, K. Y. H. (2017). Characterization of metagenomes in urban aquatic compartments reveals high prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in wastewaters. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02200>



- Pei, R.T., Kim, S.C., Carlson, K.H., Pruden, A. 2006. "Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG)", *Water Res*, 40, 2427–2435.
- R.C. Picão, J.P. Cardoso, E.H. Campana, A.G. Nicoletti, F.V.B. Petrolini 2013 The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 76 (2013), pp. 80-85
- Ploy, M. C., Lambert, T., Couty, J. P., & Denis, F. (2000). Integrons: An antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(6), 483–487. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2000.070>
- Proia, L., Adriana, A., Jessica, S., Carles, B., Marinella, F., Marta, L., ... Servais, P. (2018). Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. *Chemosphere*, 206, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.163>
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sanchez-Melsio, A., Borrego, M.C., Barcelo, D., Balcazar, L.J., 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewater and their impact on the receiving river. *Water Research* 69, 234-242.
- Rowe, W., Baker-Austin, C., Verner-Jeffreys, D. W., Ryan, J. J., Micallef, C., Maskell, D. J., & Pearce, G. P. (2017). Overexpression of antibiotic resistance genes in hospital effluents over time. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(6), 1617–1623. doi:10.1093/jac/dkx017
- Schmitz, F. J., Sadurski, R., Kray, A., Boos, M., Geisel, R., Köhrer, K., ... Fluit, A. C. (2000). Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6), 891–894.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
- Shilei, Z., Yun, B., Ze, J., Chunguang, W., & Tie, Z. (2017). Detection of resistance phenotype and gene of avian *Escherichia coli* to β -lactam antibiotics. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(3), 535–538. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0331>
- Spratt, B.G. 1994. "Resistance to antibiotics mediated by target alterations". *Science*, 264, 388-93.
- Suzuki, M. T., & Taylor, L. T. (2000). Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5 J -Nuclease Assays Downloaded from <http://aem.asm.org/> on November 26 , 2014 Lane Medical Library, 66(11), 4605–4614. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4605-4614.2000>.Updated
- Tenover, F.C., Hugles, J.M. 1996. "The challenges of emerging infectious diseases development and spread of multiply resistant bacterial pathogens", *JAMA*, 275, 300-4.
- Thompson, C. S., Traynor, I. M., Fodey, T. L., Faulkner, D. V., & Crooks, S. R. H. (2017). Screening method for the detection of residues of amphenicol antibiotics in bovine, ovine and porcine kidney by optical biosensor. *Talanta*, 172(April), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.047>
- Tian, Z., Zhang, Y., Yu, B., & Yang, M. (2016). Changes of resistome, mobilome and potential hosts of antibiotic resistance genes during the transformation of anaerobic digestion from mesophilic to thermophilic. *Water Research*, 98, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.031>
- Timraz K, Xiong Y, Al Qarni H, Hong PY (2017) Removal of bacterial cells, antibiotic resistance genes and integrase genes by on-site hospital wastewater treatment plants: surveillance of treated hospital effluent quality. *Environ Sci Water Res Technol* 3:293–303. <https://doi.org/10.1039/c6ew00322b>
- Von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., ... Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Walia S., Murleedharan C., Band J., Kanwar M., Kumar A., 2016 Quantitation of antibiotic resistance genes pollution in hospital waste water effluent and Urban Clinton River Water, Michigan, USA *Current Medicine Research and Practice* 6 (2016) 149–151 Contents



Wang, Q., Wang, P., & Yang, Q. (2018). Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. *Science of the Total Environment*, 621, 990–999. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.128>

Young S, Nayak B, Sun S, Badgley BD, Rohr JR, Harwood VJ. 2016. Vancomycin-resistant enterococci and bacterial community structure following a sewage spill into an aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* 82:5653–5660. doi:10.1128/AEM.01927-16.

Yüce, A., 2001, Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları, *Klimik Dergisi*. 14(2): 41-46.

Zhang, T., Zhang, M., Zhang, X., and Fang, H. H. 2009. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting enterobacteriaceae in activated sludge of sewage treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3455–3460. doi: 10.1021/es803309m

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. BÜLENT İÇGEN
Proje No:	117Y245
Proje Başlığı:	Hastane Atık Sularındaki Antibiyotik Direnç Genlerinin Yayılımlarının Analizi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/03/2018 - 01/03/2019
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	26750.0
Öz:	<p>Antibiyotik direncinin ortaya çıkması ve yayılması dünya çapında önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu konuda dünya sağlık örgütü başta olmak üzere pek çok kuruluş tarafından acil eylem planları oluşturulmakta ve pek çok ülkede bu doğrultuda gerekli tedbirler alınmaktadır. Bu yüzden antibiyotik direncinin ortaya çıkışı ve yayılımının anlaşılması ve takip edilmesi büyük önem taşımaktadır. Antibiyotiklerin sıklıkla kullanıldığı yerler olan hastaneler antibiyotik direncinin ortaya çıkışı ve çevreye yayılımında rol oynamaktadır. Hastane atık sularında yüksek miktarda bulunan antibiyotik kalıntıları sebebiyle ortamdaki antibiyotik direnç genlerine sahip bakteriler kolaylıkla çoğalıp seçilmektedir. Ayrıca yatay gen transferi sayesinde bakteriler dirençlilik sağlayan genlerini ortamda bulunan farklı bakteri türleri ile paylaşabilmektedir. Herhangi bir ön arıtıma maruz kalmadan hastanelerden deşarj olan atık sular antibiyotik direncinin çevresel yayılımındaki bir numaralı etken olarak gösterilmektedir. Bu nedenle bu projede farklı yatak kapasitesine sahip altı büyük kapasiteli hastane seçilerek bu hastanelerden bir yıl boyunca her mevsim atık su örneği alınmıştır. Yaygın olarak kullanılan ve klinik öneme sahip antibiyotik grupları olan β-laktamlar, sulfonamidler, tetrasiklinler, amfenikoller, aminoglikozidler, makrolid/linkozamid/streptogramin (MLS grubu) ve kinolonlara yönelik olan sırasıyla blaCTX-M, sul1, tetA, cmlA, aadA, ermB ve qnrS genlerinin atık sulardaki miktarları kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle belirlenmiştir. Seçilen her bir antibiyotik direnç geninin atık sulardaki varlığı tespit edilmiştir ve tespit edilen direnç geni miktarları aadA, tetA, cmlA, sul1, qnrS, ermB, blaCTX-M şeklinde sıralandığı belirlenmiştir. Elde edilen gen miktarları tek yönlü varyans analizi yöntemi ile analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucu ermB geni dışındaki bütün genlerin mevsimsel dağılımlarındaki farklılıkların anlamlı (p küçüktür 0.05) olduğu belirlenmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Antibiyotik dirençliliği, hastane atık suları, antibiyotik direnç genleri
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır