



VANKOMİSİN DİRENÇ GENLERİNİN DNA PROBLARI İLE YÜZEY SULARINDA *in situ* OLARAK TAKİP EDİLMESİ

Program Kodu: 1002

Proje No: 114Z973

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Bülent İÇGEN

ŞUBAT 2016
ANKARA



ÖNSÖZ

Bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmanın amacı daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T045 nolu proje kapsamında Kırıkkale-Kızılırmak'tan alınan su örneklerinden izole edilmiş ve kültüre alınmış olan vankomisin dirençli bakterilerin tanımlanması, karakterize edilmesi ve *van* genlerini içeren bakterilerin PZR ile araştırılmasıdır. Ayrıca, örnekleme esnasında fiksasyonu yapılmış olan sularda bulunan vankomisin dirençli bakterilerin tespit ve takip edilmesi için *van* genlerine yönelik DNA problemlerinin kullanılması ve böylece *van* genlerinin yüzey sularındaki bakteriler arasında yayılımı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Literatürde DNA problemleri ile *van* genlerinin yüzey sularında tespit ve takibine yönelik bizim bilgimiz dahilinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Söz konusu çalışmanın bakterilerde vankomisin direnci gelişiminde yüzey sularının etkisi konusunda toplum sağlığını da yakından ilgilendiren önemli verilerin oluşmasına katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.



Vankomisin direnç genlerinin DNA problemleri ile yüzey sularında *in situ* olarak takip edilmesi

ÖZET

Antibiyotikler tıp ve veterinerlikte mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesinde veya tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Metabolize edilmeleri sonucu evsel ve hastane atık suları aracılığı ile yüzey ve yeraltı sularına karışabilmektedirler. Atık suların içme su akiferlerine bulaşması, içme suyu standartları açısından ciddi problemler oluşturmakta ve sağlıklı içme suyu sağlanmasını zora sokmaktadır. Bu nedenle, atık suların geri dönüşüm sürecinde antibiyotik dirençli bakterilerin ve antibiyotik direnç genlerinin arıtma sularında bulunması olasılığı kaygı vericidir. Özellikle toplum sağlığı açısından öne çıkan antibiyotiklere yönelik gelişen direnç genlerinin ve bu genleri taşıyan mikroorganizmaların yüzey sularına bulaşması ve buna bağlı olarak bu sularda yer alan olası diğer patojen mikroorganizmalara aktarılma olasılığı ciddi riskler taşımaktadır. Bu nedenle yüzey sularındaki bu antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi ve takip edilmesi sözkonusu risklere karşı olası tedbirlerin alınması açısından önemli veriler sağlayacaktır. Günümüzde, toplum sağlığı açısından öne çıkan antibiyotiklerden biri olan vankomisin, gram-pozitif bakterilere karşı diğer antibiyotiklerin yetersiz kaldığı veya alerji oluşturduğu durumlarda kullanılan glikopeptid yapılı bir bileşiktir. Özellikle enterokok cinsi bakterilerde vankomisin direncinin ortaya çıkmaya başlaması dünya çapında ciddi bir antimikrobiyal direnç tehlikesi olarak ele alınmaktadır. Geçtiğimiz on yıl boyunca vankomisin dirençli enterokokun (VRE) ciddi bir hastane patojeni olarak kendini göstermiş olması bunun en önemli göstergesidir. Bu nedenle önerilen bu proje ile vankomisin direnç genlerinin (*van* genleri), bu genlere yönelik olarak hazırlanacak olan DNA problemleri ile yüzey sularında *in situ* olarak izlenmesi, bu genleri içeren enterokok ve/veya enterokok olmayan bakterilerin belirlenmesi ve söz konusu genlerin diğer bakterilere aktarılmasında yüzey sularının rolüne yönelik bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Böylece *van* genlerini taşıyan bakterileri yüzey sularında *in situ* olarak tespit ve takip edilmesinin yanı sıra, VRE dışında *van* geni içeren patojen ve/veya patojen olmayan bakterilerin de belirlenmesi ile yüzey sularının *van* genlerinin yayılımındaki etkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Vankomisin, *van* genleri, vankomisin direnci, VRE, yüzey suları



***In situ* monitoring of vancomycin resistance genes in surface waters by using DNA probes**

ABSTRACT

Antibiotics are extensively used to prevent or treat microbial infections in human and veterinary medicine. When metabolized they are discharged to domestic wastewater system. Due to surface runoffs and leaching, antibiotics and their metabolites can contaminate surface and ground waters. The increased reuse of treated wastewater has been mirrored by increased concern that antibiotics, resistant bacteria, and antibiotic resistant genes are being introduced into the drinking water systems. The potential spread of resistance genes in the water environment and their transfer to other human pathogens are major risk factors for human health. A better understanding of the fate of resistance genes in the water environment provides information for the potential threats to the environment and human. Vancomycin is one of the glycopeptide antibiotics which are used in the treatment of infections caused by gram-positive bacteria in case of resistance or allergies to other antibiotics. The emergence of vancomycin resistance among enterococci is considered as one of the major antimicrobial resistance threats worldwide. Over the past decade vancomycin-resistant enterococci (VRE) have emerged as major nosocomial pathogens. Therefore, this study aimed at using DNA probes for *in situ* detection and monitoring of vancomycin resistance gene (*van* genes)-harboring isolates in surface waters where transfer of *van* genes among isolates might take place.

Keywords: Vancomycin, vancomycin resistance, *van* genes, VRE, surface waters



İÇİNDEKİLER DIZINI

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Enterokoklar	3
2.2 Antibiyotik Direnci	5
2.3 Vankomisin Direnci	6
3. GEREÇ ve YÖNTEM	12
3.1 Vankomisin Dirençli Bakterilerin ve Direnç Düzeylerinin Belirlenmesi	12
3.2 Vankomisin Dirençli Bakterilerin Genomik DNA İzolasyonu	12
3.3 Vankomisin Dirençli Bakterilerin Plazmid DNA İzolasyonu	13
3.4 Vankomisin Dirençli Bakterilerin 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyon	14
3.5 <i>van</i> Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Tespiti	15
3.6 <i>vanA</i> gen Sekans Analizi	15
3.7 D-alanin-D-laktat Ligaz Proteininin SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri	16
3.7.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	16
3.7.2 Ayırma Jelinin Hazırlanması	16
3.7.3 Dengeleyici Jelini Hazırlanması	16
3.8 Western Blot Analizi ile D-alanin-D-laktat Ligaz Proteininin Belirlenmesi	17
3.9 Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH)	17
3.9.1 <i>vanA</i> Probesinin Tasarımı	18
3.9.2 Fikse Edilmiş Örnekler ile Hibridizasyon	18
3.10 Floresan Görüntüleme	20
3.11 İstatistiksel Analizler	20
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	21
4.1 Vankomisin Metisilin Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal Testleri	21
4.2 Antibiyotik Duyarlılık Testleri	21
4.3 Bakteriyel Kültürden Genomik DNA ve Plazmid İzolasyonu	23
4.4 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyon	24
4.6 <i>vanA</i> Amplikonlarının Sekans Analizi	38
4.7 Bakterilerde D-alanin-D-laktat Ligaz Analizi	39
4.7.1 D-alanin-D-laktat Ligazın SDS-PAGE Analizi	39
4.8 Western Blot Analizi ile D-alanin-D-laktat Ligaz'ın Belirlenmesi	41
4.9 Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH)	44



4.9.1 <i>vanA</i> Problarının Optimum Hibridizasyon Koşullarının Belirlenmesi	47
4.9.2 <i>vanA</i> Geni Taşıyan Bakterilerin Mevsimsel Populasyon Yayılımı.....	51
5. SONUÇ	Error! Bookmark not defined.
6. REFERANSLAR.....	Error! Bookmark not defined.



TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. FISH için kullanılan oligonükleotid proplar	19
Tablo 4.1. Vankomisin dirençli suşların biyokimyasal ve morfolojik özellikleri.....	22
Tablo 4.2. Yüzey sularından izole edilen vankomisin dirençli <i>vanA</i> geni taşıyan enterokok ve enterokok olmayan suşlar	25
Tablo 4.3. Vector NTI Express Software 1.2 programı kullanılarak seçilen <i>vanA</i> DNA prob sekansları.....	47
Tablo 4.4. <i>vanA</i> pozitif ve negatif kontrol suşlarının <i>vanA</i> probu ile hibridizasyon koşulları ..	48

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Vankomisin direnç mekanizması.....	7
Şekil 2.2. <i>vanA</i> operonunun yapısı	8
Şekil 2.3. <i>vanB</i> operonunun yapısı	8
Şekil 2.4. <i>vanC</i> operonunun yapısı	9
Şekil 2.5. <i>vanD</i> operonunun yapısı	9
Şekil 2.6. <i>vanE</i> operonunun yapısı	9
Şekil 2.7. <i>vanG</i> operonunun yapısı.....	10
Şekil 2.8. FISH metodu	11
Şekil 4.1. İzolatlara ait DNA ve Plazmid (total DNA ekstraksiyonu) agaroz jel elektroforezi; .23	
Şekil 4.2. İzolatlara ait DNA ve Plazmid (total DNA ekstraksiyonu) agaroz jel elektroforezi; <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (215, 140, 60 kb), (1), <i>E. faecalis</i> E07 (2), <i>P. plecoglossicida</i> Ag10 (3), <i>R. planticola</i> Ag11 (4), <i>P. veronii</i> SDS7 (5), <i>P. baetica</i> SDS8 (6), <i>P. resinovorans</i> SDS10-2 (7), <i>P. kilonensis</i> SDS11 (8). M, Marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII (125-21226 bp).....	23
Şekil 4.3. Ag10 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.).....	27
Şekil 4.4. Ag11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.).....	27
Şekil 4.5. Al11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.).....	28
Şekil 4.6. Ba01 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.).....	28
Şekil 4.7. Cr07 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.).....	29
Şekil 4.8. Co11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.).....	29
Şekil 4.9. Cu12 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.002; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.).....	30
Şekil 4.10. E07 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.).....	30
Şekil 4.11. E330 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.).....	31

Şekil 4.12. Hg 10 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.005; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	31
Şekil 4.13. Hg 11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	32
Şekil 4.14. Ni11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	32
Şekil 4.15. Pb06 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.005; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	33
Şekil 4.16. SDS3 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	33
Şekil 4.17. SDS7 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	34
Şekil 4.18. SDS8 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	34
Şekil 4.19. SDS10-2 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	35
Şekil 4.20. SDS11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	35
Şekil 4.21a. <i>vanA</i> geni taşıyan enterokok olan izolatlar: <i>E. faecium</i> 330 (pozitif kontrol) (1), <i>E. coli</i> DH5 α (negatif kontrol) (2), <i>E. faecalis</i> E07 (3), <i>E. faecalis</i> Cr07 (4), <i>E. faecalis</i> Pb06 (5). Enterokok olmayan izolatlar: <i>P. plecoglossicida</i> Ag10 (6), <i>R. planticola</i> Ag11 (7), <i>P. koreensis</i> Cu12 (8), <i>P. koreensis</i> Hg10 (9), <i>P. koreensis</i> Hg11 (10), <i>C. testosteroni</i> Ni11 (11), <i>P. fluorescens</i> SDS3 (12), M, Quick-Load 100 bp DNA Ladder (100–1517 bp)	37
Şekil 4.21b. <i>vanA</i> geni taşıyan izolatlar; <i>E. faecium</i> 330 (pozitif kontrol) (1), <i>A. veronii</i> SDS7 (2), <i>P. baetica</i> SDS8 (3), <i>P. resinovorans</i> SDS10-2 (4), <i>P. kilonensis</i> SDS11 (5). Stafilokok olan izolatlar: <i>S. warneri</i> Co11 (6), <i>S. aureus</i> Ba01 (7), <i>S. aureus</i> Al11 (8). M, Quick-Load 100 bp DNA Ladder (100–1517 bp).....	37
Şekil 4.22. <i>vanA</i> geni taşıyan bakterilerin filogenetik ağacı. (0.05; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.).....	38
Şekil 4.23a D-alanin-D-laktat ligazın SDS-PAGE analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): <i>E. faecium</i> E330 (pozitif kontrol) (1), <i>E. coli</i> DH5 α (negatif kontrol) (2), <i>P. plecoglossicida</i> Ag10 (3), <i>R. planticola</i> Ag11 (4), <i>E. faecalis</i> Cr07 (5), <i>P. koreensis</i> Cu12 (6), <i>P. koreensis</i> Hg10 (7), <i>P. koreensis</i> Hg11 (8), <i>E. faecalis</i> Pb06 (9). M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa).....	39
Şekil 4.23b D-alanin-D-laktat ligazın SDS-PAGE analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): <i>E. faecium</i> E330 (pozitif kontrol) (1), <i>E. coli</i> DH5 α (negatif kontrol) (2), <i>C.</i>	

<i>testosteroni</i> Ni11 (3), <i>P. fluorescens</i> SDS3 (4), <i>A. veronii</i> SDS7 (5), <i>P. baetica</i> SDS8 (6). M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa)	40
Şekil 4.23c. D-alanin-D-laktat ligazın SDS-PAGE analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): <i>E. faecium</i> E330 (pozitif kontrol) (1), <i>E. coli</i> DH5α (negatif kontrol) (2), <i>P. kilonensis</i> SDS11 (3), <i>P. baetica</i> SDS12 (4). M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa).....	40
Şekil 4.23d. D-alanin-D-laktat ligazın SDS-PAGE analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): <i>E. faecium</i> E330 (pozitif kontrol) (1), <i>E.coli</i> DH5α (negatif kontrol) (2), <i>S. warneri</i> Co11 (3), <i>S. aureus</i> Ba01 (4), <i>S. aureus</i> Al11 (5). M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa)	41
Şekil 4.24a. D-alanin-D-laktat ligazın Western blot analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): <i>E. faecium</i> E330 (pozitif kontrol) (1), <i>E.coli</i> DH5α (negatif kontrol) (2), <i>C. testosteroni</i> Ni11 (3), <i>E. faecalis</i> Pb06 (4), <i>P. fluorescens</i> SDS3 (5), <i>A. veronii</i> SDS7 (6), <i>P. baetica</i> SDS8 (7). M, Precision Plus Protein WesternC Standards Marker (BioRad, USA) .	42
Şekil 4.24b. D-alanin-D-laktat ligazın Western blot analizi (39 kDa ağırlığında siyah ok ile gösterilmiştir): <i>E. faecium</i> E330 (pozitif kontrol) (1), <i>E.coli</i> DH5α (negatif kontrol) (2), <i>P. resinovorans</i> SDS10-2 (3), <i>P. kilonensis</i> SDS11 (4), <i>P. plecoglossicida</i> Ag10 (5), <i>R. planticola</i> Ag11 (6). M, Precision Plus Protein WesternC Standards Marker (BioRad, USA).....	42
Şekil 4.24c. D-alanin-D-laktat ligazın Western blot analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): <i>E. faecium</i> E330 (pozitif kontrol) (1), <i>E.coli</i> DH5α (negatif kontrol) (2), <i>E. faecalis</i> Cr07 (3), <i>P. korensis</i> Cu12 (4), <i>P. korensis</i> Hg10 (5), <i>P. korensis</i> Hg11 (6), <i>E. faecalis</i> E07 (7). M, Precision Plus Protein WesternC Standards Marker (BioRad, USA).....	43
Şekil 4.24d. D-alanin-D-laktat ligazın Western blot analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): <i>E. faecium</i> E330 (pozitif kontrol) (1), <i>E.coli</i> DH5α (negatif kontrol) (2), <i>S. aureus</i> Al11 (3), <i>S. aureus</i> Ba01 (4), <i>S. warnerii</i> Co11 (5). M, Precision Plus Protein WesternC Standards Marker (BioRad, USA).....	43
Şekil 4.25. <i>E. faecium</i> pVEF1 (a) ve pVEF2 (b) plazmidlerinde bulunan <i>vanA</i> operonu	45
Şekil 4.26. <i>E. faecium</i> pVEF1 (a) ve pVEF2 (b) plazmidleri <i>vanA</i> operonunda 909 bp <i>Bam</i> HI (12201) - <i>Cl</i> al (13110) fragmentleri. Koyu bölge <i>vanA</i> operonundan prob seçimi için kullanılan bölgeyi göstermektedir.	46
Şekil 4.27. <i>vanA</i> pozitif <i>E. faecalis</i> E07 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. DAPI ile boyanmış toplam hücre popülasyonları (a, b, c) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan <i>vanA</i> probu (a ₁ , b ₁ , c ₁). (Bar, 10µm).....	49

- Şekil 4.28. *vanA* 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 *vanA* probu (a₁, b₁, c₁). (Bar, 10 μ m).....50
- Şekil 4.29. 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 popülasyonları (a, b, c,d) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *vanA* probu (a₁, b₁, c₁, d₁). (Bar, 10 μ m)51
- Şekil 4.30. 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 popülasyonları (a, b, c,d) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *vanA* probu (a₁, b₁, c₁, d₁). (Bar, 10 μ m)52
- Şekil 4.31. 2011-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde *vanA* geni taşıyan bakterilerin mevsimsel popülasyon yayılımı (▼). DAPI ile boyanmış toplam biyokütlenin piksel alanı (■) ve FITC işaretli *vanA* probu ile hibridize olan toplam *vanA* geni taşıyan bakteriler (■). (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.).....53



1. GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin sucul ortamlara evsel ve endüstriyel kökenli atıklarla karışması ekosistem ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır (Bugg vd., 1991). Doğaya sürekli salınan bu antibiyotikler, mikroflorayı yok edecek yoğunlukta olmayacak şekilde yüzey sularına karışmaktadırlar. Antibiyotiklerin yüzey sularında bu şekilde bulunması, antibiyotik dirençliliğinin artmasına, sürekli yeni antibiyotik türevlerinin tüketime sunulmasına ve enfeksiyon tedavilerinin tehlikeye girmesine yol açmaktadır ki bu da ilgili antibiyotiklerin insanlar üzerindeki terapötik etkilerini olumsuz etkilemektedir (Batt vd., 2006). Şehirsal atıksu arıtım tesislerinden çıkan süzüntülerle de bu antibiyotiklerin, antibiyotik direnç genlerinin ve dirençli bakterilerin yayıldığı düşünülmektedir (Kemper, 2008). Özellikle biyolojik arıtım tesisleri bu direncin oluşması ve yayılmasını sağlayacak koşulları oluşturmaktadır. Çünkü bakteriler sürekli olarak inhibisyon-altı seviyede antibiyotiklere maruz kalmaktadırlar (Ferreira vd., 2006). Özellikle fekal kontaminasyonda indikatör mikroorganizmalar olan koliformlar ve enterokoklar olmak üzere antibiyotik dirençli bakteriler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Auerbach vd., 2007). İnsanlardaki tedavisi zor enfeksiyonlar ile ilişkin vankomisin dirençli enterokoklar olmak üzere birçok farklı mikrobiyal ajan araştırılmıştır. Genel yüzdesi düşük olsa da klinik verilerle kıyaslandığında antibiyotik dirençliliğinin atıksularda ve rekreasyonel sularda bulunduğu gözlenmektedir ki bu durum kamu sağlığını tehdit eder bir nitelik taşımaktadır (Boczek vd., 2007; Araújo vd., 2010). Enterokoklarda glikopeptid direncinin en korkulan yanı laboratuvar veya klinik koşullarda bu dirençten sorumlu genlerin diğer gram pozitif bakterilere aktarılabilme olasılığıdır (Başustaoğlu, 2004; Şardan, 2004). Bu nedenle, risk faktörleri, direncin belirlenmesi, tarama prosedürleri ve kontrol önlemleri iyi bilinmelidir (Çiçekler, 2006).

Son yıllarda özellikle antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdikleri çoklu antibiyotik direnci sebebiyle enterokokların neden olduğu idrar yolu, safra kesesi, endokardit, bakteriyemi ve menenjit gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonlarda büyük bir artış görülmüştür. Enterokoklar birçok antibiyotiğe karşı kromozomal direnç göstermeleri, diğer antibiyotiklere de kolaylıkla direnç geliştirebilmeleri ve çevreye adaptasyonlarının iyi olması nedeni ile diğer patojenlerden daha tehlikeli hale gelmektedirler (Çöleri ve Çökmüş, 2008).

Enterokokların epidemiyolojik araştırmasında kullanılan bakteriyosin tiplendirme, faj tiplendirme, biyokimyasal reaksiyon profilleri, antimikrobiyal duyarlılıkları ve serolojik testler gibi klasik fenotiplendirme yöntemleri yetersizdir ve yararları sınırlıdır. Günümüzde erken tanıya yönelik özel testler ve moleküler yöntemler gibi modern ve hızlı tanı yöntemleri önem kazanmaktadır. Moleküler tiplendirme; dirençli enterokokların incelenmesi, önlenmesi ve

yayımlarının kontrol edilmesinde çok daha yardımcı bir yöntemdir (Teixeira vd., 2007). 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 (Muyzer ve Smalla, 1998). Diğer taraftan polimeraz zincir reaksiyonu (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 (Demirel, 2012). 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 prob 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 mikroskopu ya da konfokal lazer taramalı mikroskopu (CLSM) ile belirlenir (Bhatt, 2014; Zolgharnein vd, 2010). Bu teknik ile bakteriler doğal habitatlarında kültüre edilmelerine gerek kalmaksızın floresan mikroskopu 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 indirmektedir (Uttley vd., 1998).

Farklı habitatlardan vankomisin dirençli bakterilerin izole edilip tanımlanmasıyla ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak, yüzey sularında vankomisin direnç genlerinin belirlenmesi, *van* direnç genlerini taşıyan bakterilerin yüzey sularında *in situ* olarak takip edilmesi ve yayılımlarının belirlenmesine yönelik mevcut bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle önerilen bu proje kapsamında daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T045 nolu proje kapsamında Kırıkkale-Kızılırmak'tan alınan su örneklerinden izole edilmiş ve kültüre alınmış olan vankomisin dirençli bakterilerin tanımlanması, karakterize edilmesi ve *van* genlerini içeren bakterilerin PZR ile araştırılmasıdır. Ayrıca, örnekleme esnasında fiksasyonu yapılmış olan sularda bulunan vankomisin dirençli bakterilerin tespit ve takip edilmesi için *van* genlerine yönelik FISH yöntemi ile DNA problemlerinin kullanılması ve böylece *van* genlerinin yüzey sularındaki bakteriler arasında yayılımı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Literatürde DNA problemleri ile *van* genlerinin yüzey sularında tespit ve takibine yönelik bizim bilgimiz dahilinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Söz konusu çalışmanın bakterilerde vankomisin direnci gelişiminde yüzey sularının etkisi konusunda toplum sağlığını da yakından ilgilendiren önemli verilerin oluşmasına katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Enterokoklar

Enterokoklar gerek doğal olarak taşıdıkları düşük düzeyde beta-laktam ve aminoglikozit direnci yanında klindamisin, linkomisin, trimetoprim/sulfametoksazol dirençleri, gerekse genetik madde aktarımı ya da mutasyon sonucu kazandıkları tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, florokinolon, yüksek düzeyde beta-laktam ve aminoglikozit ile vankomisin dirençleri nedeniyle günümüzün sorun yaratan bakterilerindedir (Berzeg, 2005). Ayrıca enterokoklardaki, penisilinler ve vankomisin gibi hücre duvarına etki eden antibiyotiklere tolerans nedeniyle, bu antibiyotikler öldürücü değil ama üremeyi durdurucu etki gösterirler (Donskey ve Rice, 2000). İlk vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşunun 1988 yılında bildirilmesinden sonra (Uttley vd., 1998), Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde dirençli suşlar ortaya çıkmaya başlamış ve birçok hastanede sıklıkla diyaliz, transplantasyon, hematoloji ve yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere, zaman zaman epidemilere de neden olan VRE'ler hastane infeksiyonlarının önemli etkenleri arasındaki yerini almıştır. Özellikle altta yatan ciddi hastalığı olanlarda VRE infeksiyonlarının görülme sıklığı artmaktadır. Enterokokların infeksiyon etkeni olarak sıkça izole edilmelerinin yanı sıra, çoğul antibiyotik direncine sahip suşların son yıllarda artması, tedaviyi güçleştirmektedir (Gültekin ve Günseren, 2000). Enterokokların laboratuvar koşullarında bile olsa vankomisin

direncini *Staphylococcus aureus* suşlarına aktarabilmesi tehlikenin bir başka boyutunu oluşturmaktadır (Noble vd., 1992). Bütün bu nedenlerle, VRE kontrolünde sürveyans, hızlı ve doğru tanı büyük önem taşımaktadır. Enterokoklar gram pozitif, sporsuz, katalaz ve oksidaz negatif, fakültatif anaerobik, tek, çift veya zincir şeklinde koklardır. 45°C'de, % 5-10 NaCl içeren ortamda ve pH 4.0-9.6 gibi geniş aralıklarda üreyebilme özellikleri ile diğer koklardan kolayca ayrılırlar (Çetinkaya ve Elal, 2010). Enterokoklar, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin üyeleridir. Enterokoklar çevre koşullarına dayanıklı olduklarından her çeşit ortamda canlılıklarını sürdürebilirler. Doğada; toprak, su, bitki, kuşlar böcekler ve memelilerde yaygın olarak bulunurlar. İnsanlarda, esas olarak gastrointestinal florada bulunmaları nedeni ile gerek hastane gerekse hastane dışı ortamda endojen kaynaklı infeksiyonlara yol açmaktadırlar (Koneman vd., 1992). Hastane yüzeylerinde birkaç gün canlı kalabilirler (Boyce vd., 1995; Murray, 1990). İnsandan insana bulaşma (çapraz infeksiyon) moleküler epidemiyolojik analiz ile gösterilmiştir. Yoğun bakım ünitelerindeki hastaların ve sağlık personelinin barsağında kolonize olabilirler. Kolonizasyon sağlıklı bireylerde infeksiyon oluşumu için bir risk oluşturmayabilir. Ancak özellikle yoğun bakımda yatan hastalarda ya da altta yatan hastalığı olanlarda bu bakterilerle kolonizasyon, infeksiyon için bir risk faktörüdür. Vankomisine dirençli enterokokların yayılımında bağırsak kolonizasyonu en önemli kaynaktır. Asemptomatik bağırsak kolonizasyonu aylarca sürebilir. Bu kişiler VRE infeksiyonu riski taşırlar ve bu suşların sağlık çalışanlarının ellerine, derisine ve böylece diğer hastalara yayılmasında potansiyel bir kaynaktırlar. Enterokokların hastane ortamındaki yoğun antibiyotik baskısının varlığında üreyebilme yeteneği, onların nozokomiyal patojenler olarak ortaya çıkmasına yol açar. Sıklıkla endokardit, bakteremi, üriner sistem infeksiyonu, yara infeksiyonu ve karın içi ve pelvik infeksiyonlara, daha ender olarak da meninjit, deri ve yumuşak doku infeksiyonlarına yol açarlar (Donskey ve Rice, 2000; Murray, 1990). En az 12 *Enterococcus* türü tanımlanmasına rağmen, enterokok infeksiyonlarının % 80-90'ında *E. faecalis*, % 5-10'unda ise *E. faecium* etken olmuştur (Teixeira ve Facklam, 2003). Ancak son yıllara kadar *E. faecalis* klinik izolatlardan en çok izole edilen tür iken, günümüzde *E. faecium* da sık izole edilmektedir. Diğer enterokok türleri (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. cecorum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. dispar*, *E. mundii*) nadiren infeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir (Winn vd., 2006; Brooks vd., 2007). Vankomisin direnci enterokok türlerinin birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmaları ve plazmit ve transpozon aracılığı ile kazanılmış direncin diğer suşlara da aktarılması, vankomisin de dahil olmak üzere çoğul antibiyotik direnci gösteren suşların hızla yayılmasına yol açmıştır (Noble vd., 1992).

1980'li yıllarda enterokoklarda beta-laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı direncin ortaya çıkması üzerine vankomisin uzun yıllar tek uygun antibiyotik olarak

kullanılmıştır. Vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) ilk kez 1988 yılında Uttley ve arkadaşları tarafından İngiltere'den, Leclerg ve arkadaşları tarafından da Fransa'dan bildirilmiştir. Bunu diğer Avrupa ülkeleri ve ABD'den bildirilen olgular ve VRE epidemileri izlemiştir. Enterokoklar, düşük virülanslı bakterilerdir. Buna rağmen enterokoklar özellikle hastane infeksiyonlarına neden olan etkenler arasında ön sıralarda yer almaktadır. Bu mikroorganizmaların etken olduğu infeksiyonların tedavisi oldukça güçleşmiştir. Bu güçlüğün en önemli nedenleri enterokoklarda gelişen ve vankomisini de içine alan çoklu antibiyotik direncinin ve beta laktamaz üretiminin ortaya çıkmasıdır vd., 1997; Roghmann vd., 1997).

Vankomisin aerob ve anaerob gram pozitif bakterilere etkilidir. Lipid membranı aşamadığından gram negatif bakterilere etkisizdir. Ancak bu konuda birkaç istisna bulunmaktadır. *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* vankomisine duyarlı olabilir ve bu bakteriyle oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. Ayrıca bazı *Neisseria gonorrhoeae* kökenleri de vankomisine duyarlı olabilir. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), koagülaz negatif stafilokoklar, viridans streptokoklar, *Corynebacterium* türleri (*C. jeikeium* dahil), *Bacillus* türleri, beta hemolitik streptokoklar, pnömokoklar (penisiline dirençli suşlar dahil), anaerob streptokoklar ve *Clostridium* türlerine karşı bakterisidal etki gösterir. Enterokoklara karşı ise bakteriostatik etki gösterirler, aminoglikozidler ile sinerjik etki sağlanır. *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Erysipelothrix* türleri doğal olarak glikopeptidlere dirençlidir. Laktobasillerin direnç durumu değişkendir. Enterokoklarda, *Staphylococcus haemolyticus* ve *Listeria monocytogenes* kökenlerinde vankomisine direnç saptanmıştır (Zeckel, 1997; Wood, 1996).

2.2 Antibiyotik Direnci

Enterokoklar diğer Gram pozitif mikroorganizmaların duyarlı olduğu pek çok antimikrobiyal ajana kısmen veya tamamen dirençlidir. Hiçbir antibiyotik tek başına enterokoklara karşı bakterisid etkiye sahip değildir. Düşük düzeyli aminoglikozit, beta laktam, düşük düzeyli linkozamid, TMP-SMX'e karşı intrinsik dirençli iken; yüksek düzeyde aminoglikozid, beta laktam, hücre duvarına etkili ajanlar, kinolonlar, yüksek düzeyli linkozamid, makrolid, penisilin ve ampisilin, rifampisin, tetrasiklin ve vankomisine kazanılmış olarak direnç geliştirebilir. Ayrıca çoğu enterokok suşu ampisilin ve vankomisin dahil hücre duvarına etkili antimikrobiallerin öldürücü etkilerine karşı tolerans gösterir. Bu intrinsik değil genellikle antibiyotik kullanımı sonrası kazanılmış bir özelliktir (Berzeg, 2005). Dünyanın çeşitli yerlerinde yüksek oranlarda, özellikle *E. faecium*'da ampisilin, penisilin ve vankomisin direnci mevcuttur. Enterokok popülasyonları dahil çoğu enterokok, beta laktam ajanlara karşı özellikle PBP5'e karşı azalmış affinite sonucu kısmen rezistans gösterir. Genellikle

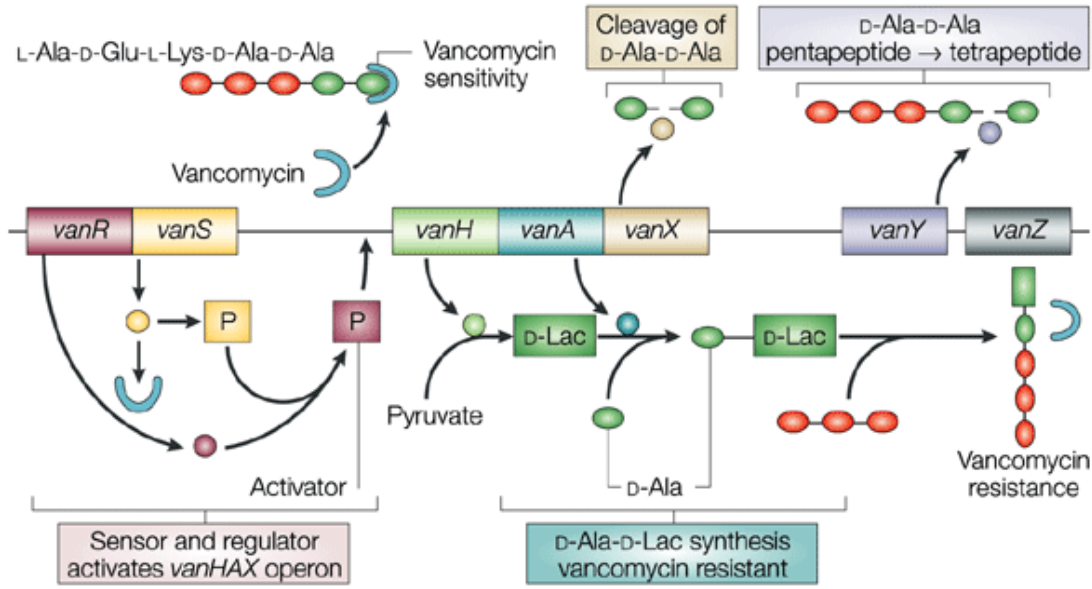
sefalosporinler enterokoklara penisilinlerden daha az etkilidir. Özellikle *E. faecium*'da *E. faecalis*'e göre intrinsik penisilin direncinde bariz artış gözlenmektedir. *E. faecalis* için penisilin MİK değeri diğer streptokoklardan 10-100 kat daha yüksektir. İntrinsik aminoglikozid direnci ise bu ajanların enterokokal dış hücre zarından penetrasyonlarındaki azalmaya bağlıdır. Bu, hücre duvarına etkili uygun bir ajanın verilmesiyle sinerjistik olarak enterokokun öldürülmesiyle önlenir. TMP-SMX invitro duyarlı iken invivo dirençlidir. Enterokoklar arasında kazanılmış direnç genellikle genetik olarak plazmid veya transpozonlar aracılığıyla aktarılır. Bunlar arasında en önemlisi yüksek düzeyde aminoglikozid direnci (HLAR), glikopeptid direnci, beta laktamaz yapımı veya diğer mekanizmalarla gelişen yüksek penisilin direncidir. Günümüzde enterokokların çoğu kazanılmış direnç yoluyla eritromisin, klindamisin ve tetrasiklinlere dirençlidir. Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci (HLAR) plazmid aracılı aminoglikozid modifiye eden enzim üretimiyle veya ribozomal mutasyonla (sadece streptomisin için) olur. HLAR, 2000 µg mL⁻¹'nin üzerinde MİK değerleri olarak tanımlanır ve hücre duvarına etkili ajanlarla kombinasyonda ortaya çıkan sinerjistik etkinin kaybolmasına yol açar (Berzeg, 2005).

Glikopeptid antibiyotikler günümüzde giderek artan Gram pozitif bakteri enfeksiyonları nedeniyle daha çok kullanım alanı bulan antibiyotiklerdir. Bu antibiyotiklere karşı gelişen direnç önemli bir sorun olmaya başlamıştır. Bu grup içinde ilk olarak vankomisin 1956 yılında *Streptomyces orientalis*'ten ve sonra 1978 yılında teikoplanin *Actinoplanes teichomycetis*'ten izole edilmiştir. Daptomisin, eremomisin yeni geliştirilen glikopeptidlere örnektir. Vankomisin molekül ağırlığı 1450 Dalton olan trisiklik bir polipeptiddir ve Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezinde yer alan D-alanin D-alanin içeren peptidlerle kompleksler oluşturarak peptidoglikan sentezini inhibe eder. Vankomisin ayrıca protoplast hasarı oluşturarak RNA sentezi üzerine de etkili olurlar (Berzeg, 2005).

2.3 Vankomisin Direnci

Enterokoklarda antibiyotik direnci kromozomal ya da sonradan kazanılmış olabilir. Plazmidler, transpozonlar ve kromozomlar üzerindeki direnç genlerine bağlı olan kazanılmış direnç ve mevcut direnç genlerinin farklı tür ve cinsteki bakterilere aktarılabilmesi söz konusudur. Bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir (Başustaoğlu, 2004; Şardan, 2004). Kazanılmış direnç, genellikle bir DNA mutasyonu ya da yeni bir DNA segmentinin transferi sonucunda gelişir (Şardan, 2004). Şu ana kadar enterokoklarda *vanA*'dan *vanG*'ye kadar vankomisin direncinden sorumlu olduğu bilinen yedi farklı gen kümesi tanımlanmıştır. Ancak direnç mekanizması tüm fenotiplerde benzerlik gösterip vankomisin hedefine daha düşük bir afiniteyle bağlanır (Çöleri

ve Çökmüş, 2008). Enterokoklarda hücre duvarı sentezlenirken, ligaz enzimi ile iki D-alanin molekülü birbirine bağlanır ve D-alanin-D-alanin oluşur. Ardından, transglikolizasyon, transpeptidasyon ve peptidoglikan tabaka sentezi gerçekleşir (Boyce, 1997). Vankomisin, pentapeptidin D-ala-D-ala terminal dizisine bağlanır ve hücre duvarı sentezini inhibe eder. VRE ise, ligaz enzimi ile D-ala-D-ala ucunun yapısını değiştirir ve D-ala-D-laktat meydana gelir ki bu farklı uca vankomisinin bağlanma yeteneği çok azdır; böylece hücre duvarı sentezi, dolayısı ile enterokokların üremeleri devam eder (Kaye vd., 2000). (Şekil 2.1)

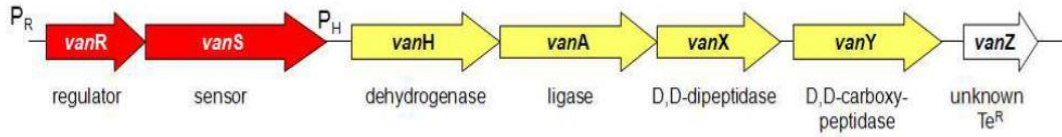


Şekil 2.1. Vankomisin direnç mekanizması (Hughes, 2003)

Van direnç genlerinin enterokoklar arasında ve özellikle diğer gram pozitif bakterilere plazmid ve transpozonlar aracılığıyla aktarımı, direncin hızla yayılmasına neden olarak tehlikeli boyutlara ulaşmıştır. Bu gen kümelerinden en iyi tanımlananı *vanA* ve *vanB* kümeleri olup klinik enterokoklarda en çok karşılaşılan direnç tiplerini oluştururlar (Çöleri ve Çökmüş, 2008).

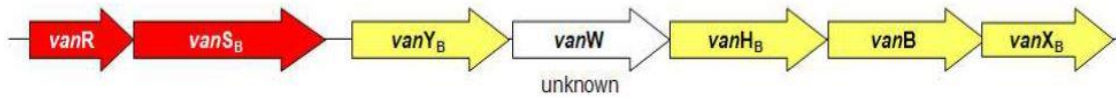
vanA tipi direnç: Vankomisin ve teikoplanine yüksek düzeyde direncin (vankomisin için $\geq 64 \mu\text{g mL}^{-1}$, teikoplanin için $\geq 16 \mu\text{g mL}^{-1}$) olduğu direnç tipidir. *VanA* tipi direncin oluşması için gerekli genler Tn 1546 transpozonu üzerinde, ilgili elemanlar ise Tn 5482 transpozonu üzerinde yer alır. *VanA* geni ilk olarak *E. faecium*'da tespit edilmiştir. Ancak *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinorum*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türlerinde de saptanmıştır. *vanA* tipi direnç en sık karşılaşılan dirençtir. Vankomisin tarafından yüksek, teikoplanin tarafından ise zayıf indüklenebilir özellikte, yüksek

düzeyde bir dirençtir. Vankomisin direncinin regülasyonu ve oluşumunda rol alan diğer genler (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*) ve *vanA* geni Tn 1546 transpozonu üzerinde yer almaktadır (Şekil 2.2). Bu genlerin ekspresyonu sonucu, “D-ala-D-laktat”la sonlanan peptidoglikan öncül molekülleri oluşur. Bu enzim sentezinde söz konusu proteinler birbirleri ile uyum içerisinde çalışırlar. *vanH* proteini, *vanA* geninin D-ala-D-laktat oluşturabilmesi için gerekli D-laktatı oluşturan D-hidroksi asit dehidrogenazdır. Dolayısı ile D-laktat sentezinden sorumludur (Çöleri ve Çökmüş, 2008; Kaye, 2000). *VanX* ise dipeptidaz aktivitesi ile, D-ala-D-ala havuzunu azaltır (Kaye, 2000). *vanS*, ortamda vankomisin varlığını algılayan bir alıcıdır, vankomisin varlığında *vanR*'yi uyarır, *vanH*, *vanX*, *vanA* sentezi aktive olur. *E. faecium*'da ise bu gen plazmid üzerindedir. Vankomisine ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençten, 39-40 kDa ağırlığında, *vanA* sitoplazmik proteinleri sorumludur (Çöleri ve Çökmüş, 2008; Murray, 2000; Guardabassi ve Dalsgaard, 2004).



Şekil 2.2. *vanA* operonunun yapısı (Werner, 2012)

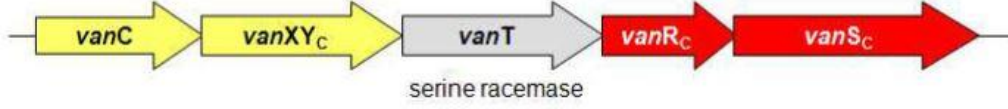
vanB glikopeptid direnci de, *vanA* ligaz enzimi ile % 76 oranında aminoasit benzerliği olan *vanB* ligaz enzimi ile sağlanır. *VanB* direnci de *vanA* gibi çok sayıda gen topluluğunun ürünü olan proteinlerce kodlanır (Şekil 2.3). Önceleri *vanB* direnç genlerinin kromozomal yerleşiminden dolayı aktarılamadığı düşünülüyordu; ancak *vanB* direnç genleri aynı zamanda kromozomda büyük, hareketli genetik elemanlar olarak yer alırlar ve bakteriler arasında aktarılabirler (Kaye, 2000; Hayden vd., 2003). Bu tip direnç vankomisine değişik düzeyde direnç gösterir (MİK 4 - >1024 µg mL⁻¹), teikoplanine duyarlıdır (MİK 0.5-2 µg mL⁻¹). Vankomisin tarafından indüklenebilen bir dirençtir. Teikoplanin indükleyemez. Ancak vankomisin ile indüklenen kökenler teikoplanine de direnç gösterebilirler. *vanB* sadece *E. faecium* ve *E. faecalis*'te saptanmıştır (Başustaoğlu, 2004; Şardan, 2004).



Şekil 2.3. *vanB* operonunun yapısı (Werner, 2012)

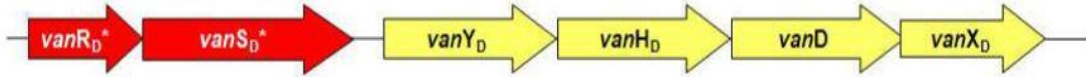
vanC tipi direnç: Bu grupta vankomisine düşük düzeyde direnç söz konusudur. Bu tip direncin *E. gallinorum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* suşlarında varlığı bildirilmiştir. Bu suşlarda hemen her zaman *vanC* geni bulunmasına rağmen vankomisin için MİK değeri

genellikle $2-32 \mu\text{g mL}^{-1}$ arasındadır. *VanC* tipi dirence sahip olan suşlar teikoplanine duyarlıdır. Yapısal olarak indüklenemez ve transfer edilemezler. *vanC* ligaz enzimi ise, D-ala-D-serin ile sonlanan pentapeptid oluşumuna neden olarak *E. gallinarum* suşlarında vankomisin direncine neden olur (Arthur vd., 1991; Murray, 2000). (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *vanC* operonunun yapısı (Werner, 2012)

vanD tipi direnç: Sadece *E. faecium*'da bildirilmiştir. *vanD* geni izolatları yapısal olarak hem vankomisine (MİK $64-128 \mu\text{g mL}^{-1}$) hem de teikoplanine (MİK $4-64 \mu\text{g mL}^{-1}$) dirençlidir. *vanD* geni kromozomaldır ve konjugasyon ile transfer edilemez (Başustaoğlu, 2004).



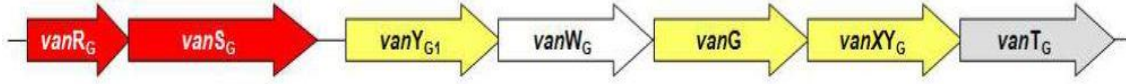
Şekil 2.5. *vanD* operonunun yapısı (Werner, 2012)

vanE tipi direnç: *E. faecalis* BM4405 izolatında tanımlanmıştır. Düşük düzeyde vankomisin direnci (MİK $16 \mu\text{g mL}^{-1}$) vardır. Teikoplanine duyarlıdır (MİK $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). *vanE* geni kromozom üzerine lokalizedir ve transfer edilemediği bilinmektedir. Bu yeni direnç fenotipi *vanC* tipi dirence ile benzerlik gösterir. Ancak *vanE* tipi direncin genetik belirleyicisi farklıdır (Başustaoğlu, 2004).



Şekil 2.6. *vanE* operonunun yapısı (Werner, 2012)

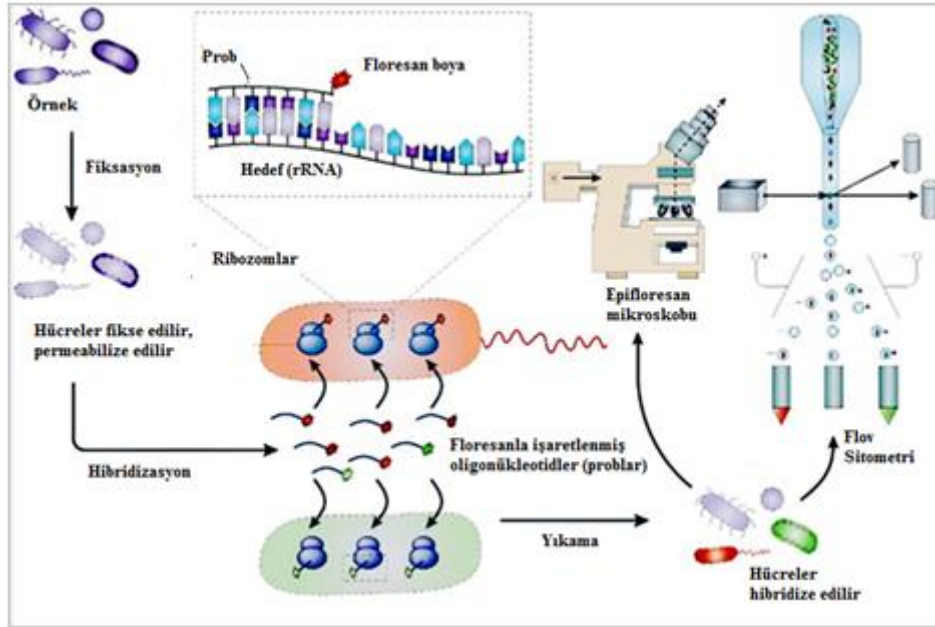
vanG tipi direnç: Bu direnç tipi ilk olarak *E. faecalis* WCH9 suşunda tanımlanmıştır. Tipik olarak vankomisine düşük düzeyde dirençli (MİK $12-16 \mu\text{g mL}^{-1}$), teikoplanine ise duyarlıdır (MİK $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dirençten *vanG* geni sorumludur ve ayrıntılı genetik analizi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Enterokoklarda glikopeptid direncinin en korkulan yanı laboratuvar veya klinik koşullarda bu dirençten sorumlu genlerin diğer gram-pozitif bakterilere aktarılabilme olasılığıdır (Başustaoğlu, 2004; Şardan, 2004).



Şekil 2.7. *vanG* operonunun yapısı (Werner, 2012)

Günümüzde erken tanıya yönelik özel testler ve moleküler yöntemler gibi modern ve hızlı tanı yöntemleri önem kazanmaktadır. Vankomisin direncinin saptanmasında *vanA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması oldukça zor ve pahalıdır. VRE izolatlarında *vanA* geninin PZR temelli yöntemlerle araştırılması yaygın olarak kullanılsa da *vanA* geni bulunan, ancak bunu ifade 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 prob 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 mikroskopu ya da konfokal lazer taramalı mikroskopu (CLSM) ile belirlenir

(Şekil 2.8) (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 indirmektedir (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 2.8. FISH metodu (Amann ve Fuchs, 2008)



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Vankomisin Dirençli Bakterilerin ve Direnç Düzeylerinin Belirlenmesi

Daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen 111T145 nolu proje kapsamında Kırıkkale-Kızılırmak'tan alınan su örneklerinden vankomisin dirençli bakterilerin izolasyonu için vankomisin içeren selektif besiyerleri kullanılmıştır. 24 saat, 30 ve 37°C'lik etüvde inkübe edilip üreyen bakterilerin vankomisin dirençlilikleri çalışılmak üzere stok kültürleri kullanılarak biyokimyasal testleri yapılmıştır. Öncelikle üreyen mikroorganizmaların makroskopik olarak koloni morfolojileri, gram boyama özellikleri, vankomisin duyarlılık testleri ve üreyebildikleri minimum vankomisin konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile muller hinton agarda Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI) kriterlerine göre yapılacak ve sonuçlar CLSI standartlarına göre değerlendirilmiştir (CLSI, 2012). Vankomisin dirençli *E. faecium* E330 pozitif kontrol, vankomisin dirençli olmayan *Escherichia coli* DH5α negatif kontrol suşu olarak kullanılmıştır. Antibiyogram sonucu mikroorganizmalar, standart antibiyotik disk çizelgesinde verilen inhibisyon zon çapına göre antibiyotik dirençli (R) veya duyarlı (S) olarak sınıflandırmıştır. Daha sonra yine CLSI standartlarına göre ilgili suşların minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) testleri sonucunda direnç düzeyleri değerlendirilmiştir. Suşların direnç düzeyleri proje kapsamında kullanılacak olan *van* genleri açısından yönlendirici olmuştur.

3.2 Vankomisin Dirençli Bakterilerin Genomik DNA İzolasyonu

İzole edilen vankomisin 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 çözündürülerek 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 santrifüj 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.

3.3 Vankomisin Dirençli Bakterilerin Plazmid DNA İzolasyonu

Kullanılan antibiyotiklerin çoğunluğuna karşı dirençten sorumlu genlerin, sıklıkla dışardan alınan mobil genetik elementlerle ilişkili oldukları bilinmektedir. Aktarılabılır 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. Plazmidler üzerinde farklı direnç genlerinin kümeleşmiş olması, bakteriler arasında çoğul direncin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Direnç plazmidleri; konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyonla duyarlı olan alıcı bakterilere horizontal olarak aktarıldığında, onlarda da bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı direncin oluşumuna yol açmaktadırlar. İzole edilen vankomisin dirençli bakterilerde bu dirençliliğin intrinsik van kaynaklı mı yoksa plazmid tarafından kodlanan bir dirençlilik olup olmadığını belirlemek için plazmid profilleri çıkarılmıştır. Saflaştırılmış izolatlardaki plazmidlerin varlığı alkali lizis metodu kullanılarak saptanmıştır (Kumar vd., 2010). Plazmid izolasyonu yapılacak bakteriler, 5 mL'lik nutrient broth besiyerine ekilerek 30°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültürlerden 1.5 mL alınarak ependorf tüplere aktarılıp 4°C'de 10.000 devir/dakika'da 30 saniye santrifüj edilerek hücreler çöktürülüp üstteki sıvı kısım atılmıştır. Ependorf tüplerindeki hücrelerin üzerine 100 µL alkali lizis I solüsyonundan eklenerek ve tüplerdeki karışımlar homojen oluncaya kadar vorteks edilmiştir. Daha sonra tüplerdeki karışımlara 200 µL alkali lizis II solüsyonu ekleyip tüpler birkaç kez alt-üst edilmiştir. Bu işlemde sonra tüpler buz içinde birkaç dakika bekletilmiştir. Tüpler buz içinden çıkarılıp üzerlerine 150 µL alkali lizis III solüsyonu eklenip, birkaç kez alt-üst edilmiştir. Bu işlemde sonra tüpler buz içinde 5 dakika bekletilip tüpler 4°C'de 10.000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilip, üstteki sıvı kısım toplanarak yeni ependorf tüplere aktarılmıştır. Bu işlemde sonra ependorf tüplere 2 hacim (1:2) oda sıcaklığına sahip etanol ekleyip, vorteksledikten sonra, iki dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Presipite olan nükleik asit molekülleri, 4°C'de 10.000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülüp, üst kısım dikkatli bir şekilde atılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında bırakılarak etanol

uçurulmuştur. Tüplere 1 mL % 70'lik etanol eklenip, birkaç kez alt-üst edildikten sonra, 4°C'de 10.000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst kısım dikkatli bir şekilde atılarak ve tüpler oda sıcaklığında bekletilip kalan etanol uçurulmuştur. Tüplerdeki nükleik asit moleküllerinin üzerine 50 µL TE tamponu (Tris-EDTA) eklenmiştir. Dirençliliğin genetik kökenini araştırmak amacı ile izole edilen bütün suşlar içerisinde 30 ve 100 µg mL⁻¹ akridine orange ve antibiyogram analizinde kullanılan konsantrasyonda antibiyotikler içeren muller hinton agar besiyerlerine ekilerek 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Antibiyogram testinde dirençli olan suşlar akridin orange ve antibiyotik içeren besiyerinde ürememişse, suşun taşıdığı dirençlilik plazmid kökenli, üremişse kromozomal kökenli şekilde değerlendirilmiştir.

3.4 Vankomisin Dirençli Bakterilerin 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 santrifüjlenecektir. 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 vankomisin 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.

3.5 *van* Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Tespiti

Suşların direnç düzeyleri proje kapsamında kullanılacak olan *van* genleri açısından yönlendirici olacaktır. Çalışma daha çok yüksek düzeyde vankomisin direnç genleri olan *vanA* genleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Fenotipik yöntemlerle vankomisin dirençli olduğu anlaşılan suşlarda *van* genlerinin varlığı PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. *vanA* geninin çoğaltılabilmesi için 1F 5'-ATGAATAGAATAAAAGTTGCAATAC-3' ve 1029R 5'-CCCCTTTAACGCTAATACGAT-3' (Miele vd., 1995) primer çifti kullanılmıştır. 2.5 µL 10X taq buffer, 3 µL 25 mM MgCl₂, 2.5 µL 2 mM dNTP karışımı, 2 pmol primer stoklarından, 3 µL *vanA*-1 ve *vanA*-2 primer, 0.2 µL (5U/µL) Taq DNA polimeraz, 2.05 µL saf su ve 5 mL (50 ng) kalıp DNA (genomik ve plazmid DNA) eklenerek toplam 25 µL reaksiyon karışımı hazırlanıp PZR tüpleri thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir. Reaksiyon karışımına, başlangıçta 94°C'de 3 dakika ve her bir döngü için 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 1 dakika primer bağlanması, 72°C'de 2 dakika primer uzaması basamaklarını içeren 35 döngü, 72°C'de 6 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır (Jayaratne ve Rutherford, 1999; Biavasco vd., 2007). Vankomisin-dirençli *E. faecium* E330 pozitif kontrol, vankomisin dirençli olmayan *E. coli* DH5α negatif kontrol suşları olarak kullanılmıştır. Ayrıca enterokokları belirlemede kullanılan evrimsel açıdan son derecede iyi korunmuş EF-Tu elongasyon faktörünü kodlayan tuf gen bölgesi, 618F 5'-TACTGACAAACCATTTCATGATG-3' ve 729R 5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3' primer çifti ile amplifiye edilmiştir (Ke vd., 1999). PZR koşulları başlangıçta 94°C'de 5 dakika ve her bir döngü için 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika primer bağlanması, 72°C'de 2 dakika primer uzaması basamaklarını içeren 35 döngü, 72°C'de 6 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır. Tüm PZR ürünleri, % 1 agaroz jele her örnekten 10 µL yüklenerek elektroforezde yürütülüp jel görüntüleme sisteminde bant görüntüleri elde edilmiştir. PZR sonucunda elde edilen DNA'ların boyutları Quick-Load 100 bp DNA ladder (New England Biolabs) marker ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.6 *vanA* gen Sekans Analizi

Elde edilen *vanA* amplikonları QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Toronto, Canada) ile saflaştırılmış ve sekans analizi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. *vanA* sekansları, Blast programı doğrultusunda NCBI GenBank'ta yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Filogenetik ağacın oluşturulmasında öncelikle *vanA* sekansları, Mega 5.2 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) istatistik analiz programında Clustal W seçeneği kullanılarak türlere ait baz dizileri hizalanmıştır (Tamura vd., 2013). Komşu-bağlantı (neighbour-joining)

metodu ile filogenetik ağaç çizilmiştir ve oluşturulan soy ağacı ile izolatların *vanA* sekansları açısından birbirleriyle yakınlık/benzerlik dereceleri ortaya koyulmuştur.

3.7 D-alanin-D-laktat Ligaz Proteininin SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri

İzole edilen vankomisin dirençli bakterilerin D-alanin-D-laktat ligaz proteininin izolasyonu Achtman ve arkadaşlarının tanımladıkları metoda göre yapılmıştır (Achtman vd., 1983). 100 mL'lik nutrient broth besiyerlerine ekim yapılmıştır. İnkübasyondan sonra besiyerini uzaklaştırmak için santrifüj yapıp üst sıvı kısım atılmıştır. 10 mL, 10 mM Tris-HCl pelletler üzerine eklenerek sonikasyon (80 sn, % 50 devir) işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 4°C'de 3000 rpm, 20 dakika santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Üst kısım yeni tüplere alınarak 4°C'de, 20.000 rpm, 60 dakika santrifüj yapılmıştır. Pelletler üzerine 150 µL steril su eklenerek 20°C'de 1 gece bekletilmiştir. 20°C'den alınan örnekler 200 µL Triton-X içeren solüsyon eklenecek ve 20 dakika bekletilmiştir. Örnekler 20°C'de 2000 rpm, 90 dakika santrifüj yapılarak sıvı kısım atılmıştır. Pelletler üzerine 50 µL örnek tamponu eklenerek elektroforezden önce 100°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

3.7.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

İzole edilen total hücre 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 elektrofrez (Bio-rad, Mini Protean Tetra System) yapılmıştır (Achtman vd., 1983).

3.7.2 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.

3.7.3 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), D-alanin-D-laktat ligaz proteininin belirlenmesinde vankomisin-dirençli *E. faecium* E330 pozitif kontrol, vankomisin dirençli olmayan *Escherichia coli* DH5α negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.8 Western Blot Analizi ile D-alanin-D-laktat Ligaz Proteininin Belirlenmesi

D-alanin-D-laktat Ligaz 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 mouse anti-human *vanA* primer antikor (USBiological Life Sciences, USA) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası membran TBS-T çözeltisi ile yıkanarak 1:10000 oranında TBS-T çözeltisinde seyreltilmiş goat anti-mouse immunoglobulin (G/M) 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 vankomisin dirençli *E. faecium* E330 pozitif kontrol, vankomisin dirençli olmayan *E. coli* DH5α negatif kontrol suşları olarak kullanılmıştır.

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 *vanA* geni taşıyan suşların popülasyonlarındaki mevsimsel değişiklikler ise *vanA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid prob kullanılarak FISH yöntemi ve görüntü analizi mikroskopu ile takip edilmiştir. Böylece yüzey sularında vankomisin dirençli bakteriler tespit edilmiştir. *vanA* geninin enterokoklar dışında başka bakterilerde de bulunup bulunmadığı ve *vanA* spesifik prob ile vankomisin dirençli bakterilerin yüzey sularında takibinin yapılmasının uygunluğu belirlenmiş olacaktır.

3.9.1 *vanA* Prob Tasarımı

vanA geni taşıyan suşların yüzey sularında tespitine yönelik çalışmalar için kullanılan prob Vector NTI® Express 1.2 programı (IBI, USA) programında tasarlanmıştır. National Center of Biotechnology Information (NCBI)'da yer alan *E. faecium* pVEF1 ve pVEF2 plazmidlerinde *vanA* operonu tarafından kodlanan *vanA* geninin *Bam*HI ve *Cla*I restriksiyon enzim kesim noktaları kullanılmıştır. Elde edilen prob dizilerine ait annealing sıcaklık aralığı, sekans uzunluğu ve GC oranları parametreleri belirlenmiştir. Tasarlanan prob dizilerinin *vanA* gen açısından spesifiteleri BLAST kullanılarak kontrol edilmiştir (Benson ve Karsch-Mizrachi, 2000). Seçilen 25 bp DNA fragmenti 5' ucu fluoresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmiştir (Alpha DNA, Montreal, Canada). Seçilen FITC işaretli *vanA* probu, paraformaldehit ile fikse edilmiş *vanA* geni taşıyan *E. faecalis* E07 saf kültürü ve 2011-2012 yıllarında toplanan su örnekleri ile FISH çalışmalarında kullanılmıştır.

3.9.2 Fikse Edilmiş Örnekler ile Hibridizasyon

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 *vanA* 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) problemler ve vankomisin direncini kodlayan *vanA* gen bölgesine yönelik olarak tasarlanan 5'-CTGTTTGGGGGTTGCTCAGAGGAGC-3' prob 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 fluoresein izothiosiyanat (FITC) ile işaretlenmiştir (Alpha DNA, Montreal, Canada) ve Tris-Edta çözeltisi ile konsantrasyonları 50 ng μL^{-1} 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>vanA</i>	<i>vanA</i> geni	CTGTTTGGGGGTTGCTCAGAGGAGC	25	60.0	32.4	This study
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	Negatif kontrol	ACTCCTACGGGAGGCAGC	18	66.7	55.0	Wallner vd.1993

T_m, erime sıcaklığı

25 bp uzunluğunda olan *vanA* probu ile *vanA* geni taşıyan paraformaldehid ile fikse edilmiş kültürler ile hibridize edilerek *vanA* gen spesifitesi ve optimum hibridizasyon koşulları bakımından değerlendirilmiştir. Vankomisin dirençli *E. faecalis* E07 ve vankomisin dirençli göstermeyen *E. coli* DH5 α suşu 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^{-1}) ve 1 μL DAPI (200 ng μL^{-1}) 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).

3.10 Floresan Görüntüleme

vanA 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 *vanA* geni taşıyan bakterilerin bakteri popülasyon yoğunlukları,

$$vanA \text{ harboring bacteria } (\%) = \frac{\text{Pixel area of FITC image}}{\text{Pixel area of DAPI image}}$$

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. *vanA* geni taşıyan bakterilerin biyokütle yüzdeleri (%) *vanA* probu ile alınan sinyal görüntülerine göre belirlenirken, DAPI ile boyama sonucu elde edilen görüntülerden de alanda bulunan toplam hücre sayısı belirlenmiştir. *vanA* probu için optimum koşullar belirlendikten sonra üçer aylık periyotlarla toplanmış ve fikse edilmiş olan su örnekleri kullanılarak *vanA* geni taşıyan bakterilerin mevsimsel popülasyon yayılım profili çıkarılmıştır.

3.11 İstatistiksel Analizler

vanA geni taşıyan bakterilerin *vanA* probu 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 güvenlik 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 Vankomisin 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 vankomisin direncinin belirlenmesinde antibiyogram duyarlılık testi yapılmış ve sonuçlar değerlendirilip vankomisin direnci olan bakterilerin stok kültürleri hazırlanmıştır. Proje kapsamında metisilin dirençli olarak belirlenen 18 suş sırasıyla Ag10, Ag11, Al11, Ba01, Cr07, Co11, Cu12, E07, E330, Hg10, Hg11, Ni11, Pb06, SDS3, SDS7, SDS8, SDS10-2 ve SDS11 olarak kodlandıktan mikrobiyolojik ve biyokimyasal testleri yapılmıştır. Vankomisin içeren selektif besiyerinde üreyen mikroorganizmaların makroskobik olarak koloni morfolojileri, pigment ve hemoliz özellikleri, gram boyama ve biyokimyasal özellikleri API 20NE (Biomérieux) kiti kullanılarak yapılmış ve sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

4.2 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık testi olarak Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda disk difüzyon (DD) testi kullanılmıştır. Suşların vankomisin dirençliliklerinin aranmasında her bir suşun taze kültürlerinden 0.5 McFarland standardına göre süspansiyon hazırlanarak steril eküvyon ile Mueller-Hinton agar besiyerine ekim yapılmıştır. Petri ler oda ısısında 5-10 dakika bekletildikten sonra, besiyerinin yüzeyine 30 µg'lık vankomisin diskleri yerleştirilip 30 ile 37°C'delerde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sonuçlar, CLSI (2012) standartlarına göre değerlendirilmiştir (Tablo 4.2). Antibiyogram sonucu mikroorganizmalar, standart antibiyotik disk tablosunda verilen inhibisyon zon çapına göre antibiyotik dirençli (R) veya duyarlı (S) olarak sınıflandırılmıştır. Vankomisin inhibisyon zon çapı ≥ 17 mm olan suşlar duyarlı, ≤ 14 mm olan suşlar dirençli olarak değerlendirilmiştir. Vankomisin direnci taşıyan suşların vankomisin antibiyotiğine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) agar dilüsyon metoduyla belirlenmiştir. Vankomisin için MİK değeri ≤ 4 µg mL⁻¹ ise suşlar duyarlı, ≥ 32 µg mL⁻¹ ise suşlar dirençli kabul edilmiştir (CLSI, 2012). Bütün sonuçlar, vankomisin dirençli *E. faecium* E330 ve vankomisin duyarlı *E. coli* DH5α. kontrol suşları kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.2). İzolatların vankomisin DD testine göre zon çapları 6-9 mm aralığında, MİK değerleri ise 30 ve ≥ 512 µg mL⁻¹ arasında belirlenmiştir (Tablo 4.2). Yüzey sularında antibiyotik dirençli bakterilerin tanımlanması ile ilgili birçok çalışma belirtilmiştir (Pruden vd., 2006).

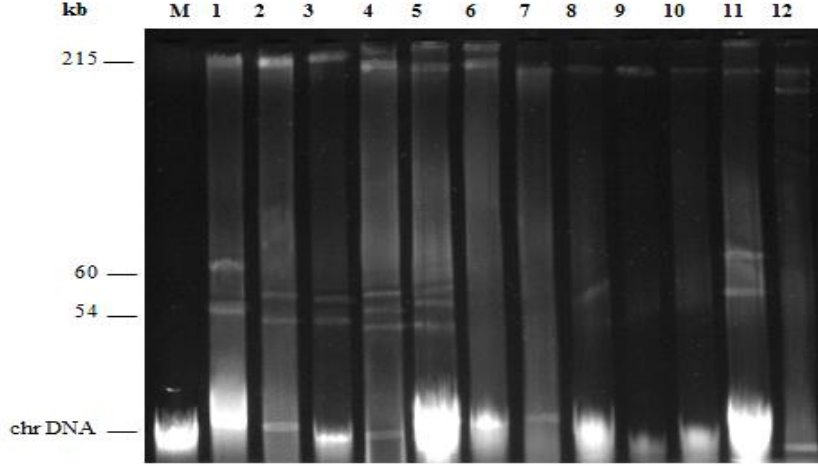
Tablo 4.1. Vankomisin dirençli suşların biyokimyasal ve morfolojik özellikleri

Biyokimyasal Özellikler	Ag 10	Ag11	Al11	Ba01	Co11	Cr07	Cu12	E07	E330	Hg10	Hg11	Ni11	Pb06	SDS3	SDS7	SDS8	SDS10-2	SDS11
Koloni rengi	Şeffaf	Beyaz	Sarı	Sarı	Sarı	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Sarı	Sarı	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Sarı	Beyaz	Beyaz	Beyaz
Gram boyama	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Hücre morfolojisi	Basil	Basil	Kok	Kok	Kok	Kok	Basil	Kok	Kok	Basil	Basil	Basil	Kok	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	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

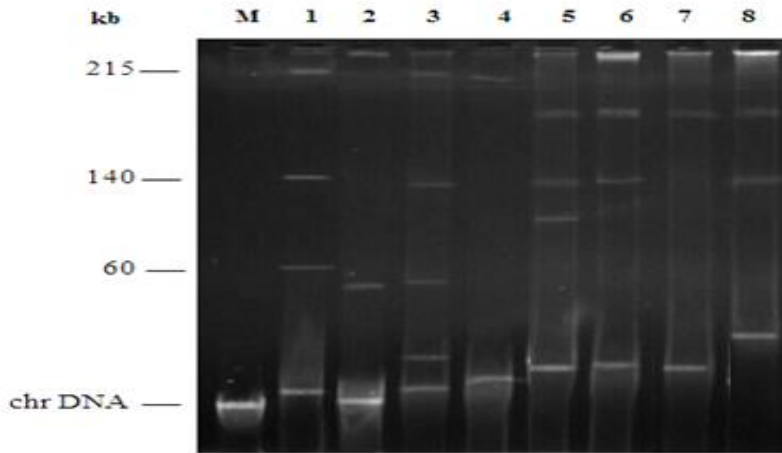
(+); pozitif, (-); negatif

4.3 Bakteriyel Kültürden Genomik DNA ve Plazmid İzolasyonu

Vankomisin dirençli suşların genomik DNA ve plazmid analizi yapılarak, bantlar kontrol edilmiş (Şekil 4.1 ve 4.2) ve PZR amplifikasyonu çalışmalarında bu suşlara ait DNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.1. İzolatlara ait DNA ve Plazmid (total DNA ekstraksiyonu) agaroz jel elektroforezi; *Agrobacterium tumefaciens* (215, 140, 60 kb) (1), *E. faecium* E330 (pozitif kontrol) (2), *E. faecalis* E07 (3), *P. plecoglossicida* Ag10 (4), *R. planticola* Ag11 (5), *E. faecalis* Cr07 (6), *P. korensis* Cu12 (7), *P. korensis* Hg10 (8), *P. korensis* Hg11 (9), *C. testosteroni* Ni11 (10), *E. faecalis* Pb06 (11), *P. fluorescens* SDS 3 (12). M, Marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII (125-21226 bp)



Şekil 4.2. İzolatlara ait DNA ve Plazmid (total DNA ekstraksiyonu) agaroz jel elektroforezi; *Agrobacterium tumefaciens* (215, 140, 60 kb), (1), *E. faecalis* E07 (2), *P. plecoglossicida* Ag10 (3), *R. planticola* Ag11 (4), *P. veronii* SDS7 (5), *P. baetica* SDS8 (6), *P. resinovorans* SDS10-2 (7), *P. kilonensis* SDS11 (8). M, Marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII (125-21226 bp)

Vankomisin dirençliliğın genetik kökenini araştırmak amacı ile vankomisin direci belirlenmiş suşlar içerisinde 30 ve 100 µg mL⁻¹ akridine orange ve antibiyogram analizinde kullanılan konsantrasyonda antibiyotikler içeren muller hinton agar besiyerlerine ekilerek 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Bunun sonucunda vankomisin direnci belirlenmiş suşların akridin orange ve antibiyotik içeren besiyerinde üremedikleri ve taşıdıkları dirençliliğın plazmid kökenli olduğu düşünölmüştür.

4.4 16S rRNA Sekans Analizi ile İdentifikasyon

Vankomisin dirençli suşların 16S rRNA PZR ürünleri elde edilip jelde görüntöüendikten sonra suşların tanımlaması için 16S rRNA sekans analizi yapılmıştır. 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, vankomisin dirençli 18 suşun, 4 enterokok (3 *E. faecalis*, 1 *E. faecium*), 14 enterokok olmayan (8 *Pseudomonas*, 3 *Staphylococcus*, 1 *Comomonas*, 1 *Raoultella* ve 1 *Aeromonas*) türler olduğu belirlenmiştir. Bu suşların % benzerlik oranları ve gen bankası kayıt numaraları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Vankomisin dirençli suşların filogenetik ağaçları, 16S rRNA sekans dizileri kullanılarak komşu- bağlantı ağacı (neighbour-joining) metodu ile çizilmiştir (şekil 4.3-4.20). Vankomisin 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.

Tablo 4.2. Yüzey sularından izole edilen vankomisin dirençli *vanA* geni taşıyan enterokok ve enterokok olmayan suşlar

İzolatlar	Koordinatlar	Vankomisin DD test ^a	Vankomisin MIK test ^b (µg mL ⁻¹)	<i>vanA</i> PCR analizi	D-alanin-D-laktat ligaz SDS-PAGE analizi	D-alanin-D-laktat ligaz Western blot analizi	16S rRNA sekans analizi (Homology %)	EMBL access No
Ag10	39°48'38.97"N,33°29'14.57"E, 684m	R	64	+	+	+	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (99%)	KJ395363
Ag11	39°50'28.41"N, 33°28'02.13"E, 686m	R	512	+	+	+	<i>Raoultella planticola</i> (99%)	KJ395359
Al11	39°50'28.41"N,33°28'02.13"E,686m	R	128	+	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i> (99%)	KJ395360
Ba01	39°22'16.39"N,33° 26'49.26"E, 890m	R	128	+	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i> (99%)	KJ395371
Cr07	39°37'02.34"N, 33°26'38.26"E, 773m	R	64	+	+	+	<i>Enterococcus faecalis</i> (96%)	KJ395365
Cu12	39°57'22.98"N, 33°25'04,35"E, 679m	R	512	+	+	+	<i>Pseudomonas koreensis</i> (98%)	KJ395364
Co11	39°50'28.41"N,33°28'02.13"E, 686 m	R	128	+	+	+	<i>Staphylococcus warneri</i> (99%)	KJ395373
E07	39°37'02.34"N, 33°26'38.26"E, 773m	R	512	+	+	+	<i>Enterococcus faecalis</i> (99%)	KU195302
E330	39°37'02.34"N, 33°26'38.26"E, 773m	R	≥512	+	+	+	<i>Enterococcus faecium</i> (99%)	KU296972
Hg10	39°48'38.97"N, 33°29'14.57"E, 684m	R	512	+	+	+	<i>Pseudomonas koreensis</i> (96%)	KJ395377
Hg11	39°50'28.41"N, 33°28'02.13"E, 686m	R	512	+	+	+	<i>Pseudomonas koreensis</i> (98%)	KJ395378

^a inhibisyon zon çapı ≥ 17 mm olan suşlar duyarlı (S), inhibisyon zon çapı ≤ 14 mm olan suşlar duyarlı (R) (CLSI 2012);

^b ≤ 4 µg mL⁻¹ ise suşlar duyarlı ve ≥ 32 µg mL⁻¹ ise suşlar dirençli (CLSI 2012);

DD, disk difüzyon;

MIC, minimal inhibitor konsantrasyon;

+, pozitif; -, negatif;

PCR, Polimeraz Zincir Reaksiyonu;

SDS-PAGE, Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

16S rRNA, 16S ribozomal RNA;

EMBL, European Molecular Biology Laboratory.

Tablo 4.2. Yüzey sularından izole edilen vankomisin dirençli *vanA* geni taşıyan enterokok ve enterokok olmayan suşlar (devam ediyor)

İzolatlar	Koordinatlar	Vankomisin DD test ^a	Vankomisin MİK test ^b (µg mL ⁻¹)	<i>vanA</i> PCR analizi	D-alanin-D-laktat ligaz SDS-PAGE analizi	D-alanin-D-laktat ligaz Western blot analizi	16S rRNA sekans analizi (Homology %)	EMBL access No
Ni11	39°50'28.41"N, 33°28'02.13"E, 686m	R	64	+	+	+	<i>Comamonas testosteroni</i> (99%)	KJ395372
Pb06	39°34'34.39"N, 33°26'11.61"E, 763m	R	64	+	+	+	<i>Enterococcus faecalis</i> (98%)	KJ395380
SDS3	39°26'03.30"N, 33°24'08.43"E, 781m	R	32	+	+	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99%)	KJ937668
SDS7	39°37'02.34"N, 33°26'38.26"E 773m	R	≥512	+	+	+	<i>Aeromonas veronii</i> (96%)	KJ937671
SDS8	39°39'53.04"N, 33°28'55.46"E, 852m	R	≥512	+	+	+	<i>Pseudomonas baetica</i> (99%)	KJ937672
SDS10-2	39°48'38.97"N, 33°29'14.57"E, 684m	R	512	+	+	+	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (93%)	KJ937675
SDS11	39°50'28.41"N, 33°28'02.13"E, 686m	R	128	+	+	+	<i>Pseudomonas kilonensis</i> (99%)	KJ937677

^a inhibisyon zon çapı ≥ 17 mm olan suşlar duyarlı (S), inhibisyon zon çapı ≤ 14 mm olan suşlar duyarlı (R) (CLSI 2012);

^b ≤ 4 µg mL⁻¹ ise suşlar duyarlı ve ≥ 32 µg mL⁻¹ ise suşlar dirençli (CLSI 2012);

DD, disk difüzyon;

MİK, minimal inhibitör konsantrasyon;

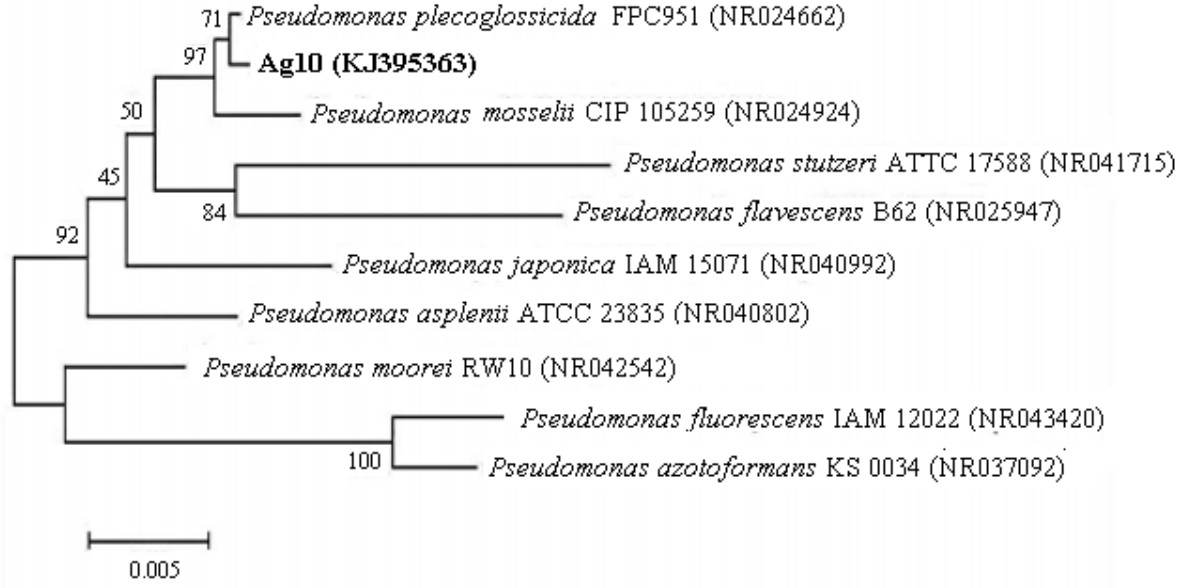
+, pozitif; -, negatif;

PCR, Polimeraz Zincir Reaksiyonu;

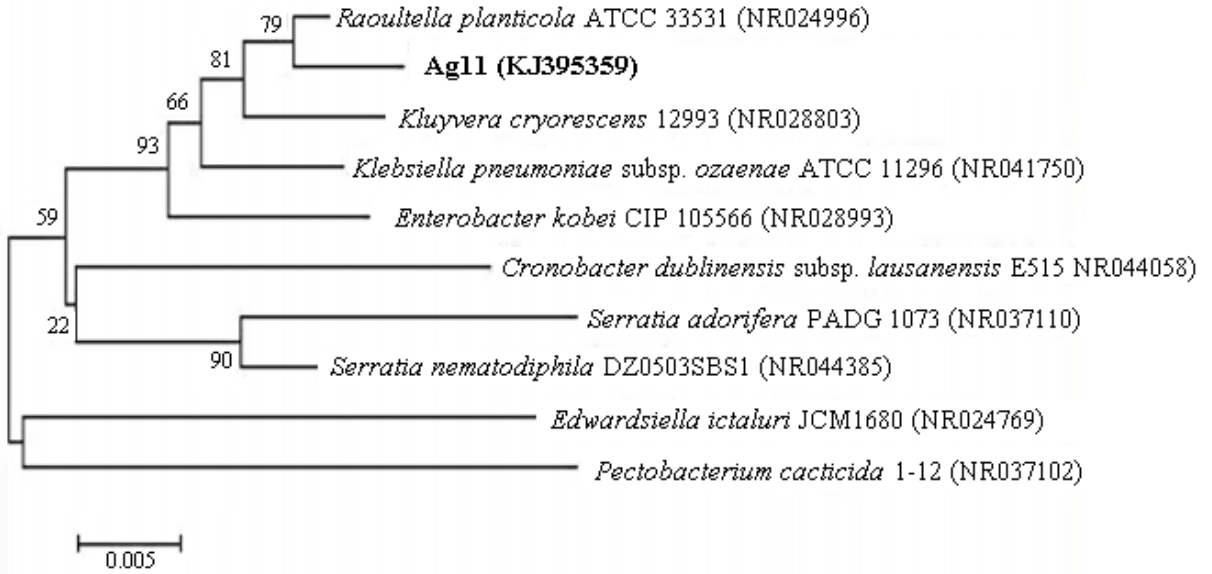
SDS-PAGE, Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

16S rRNA, 16S ribozomal RNA;

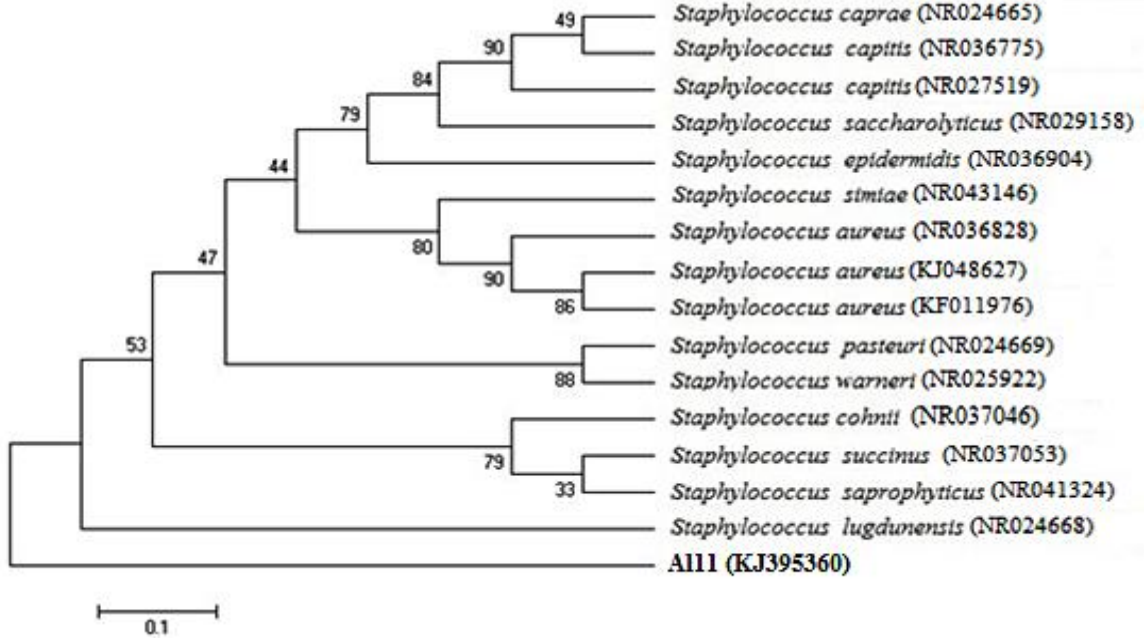
EMBL, European Molecular Biology Laboratory.



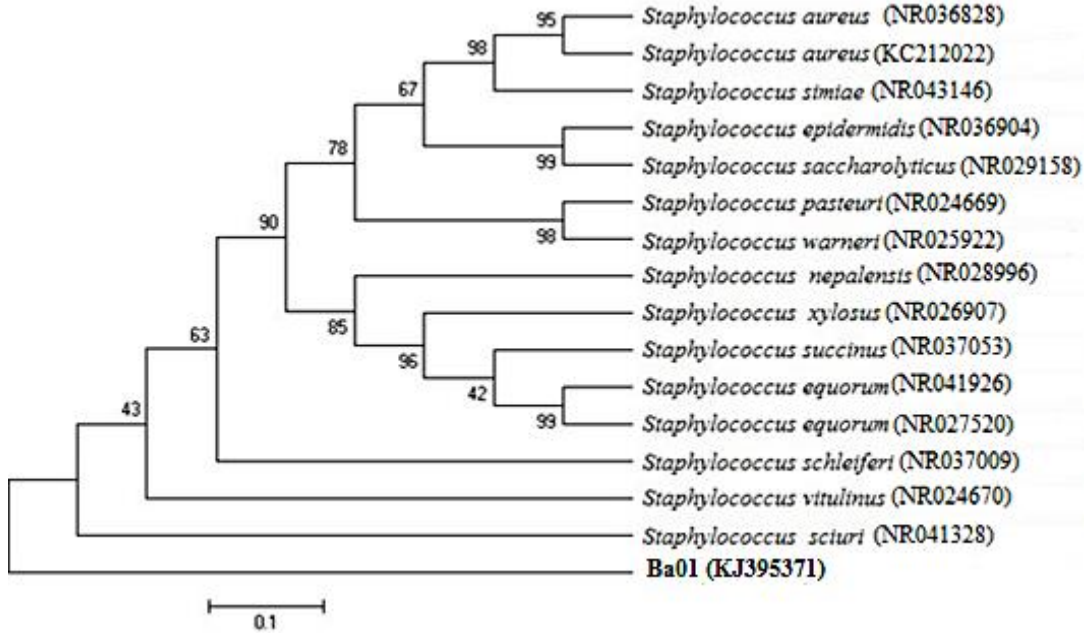
Şekil 4.3. Ag10 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



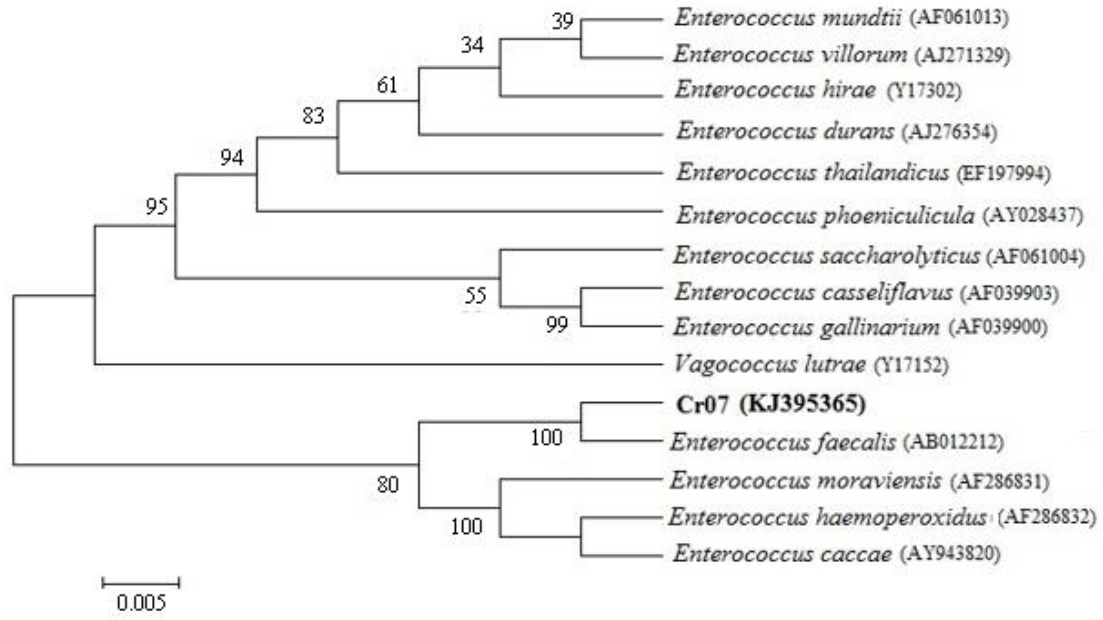
Şekil 4.4. Ag11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



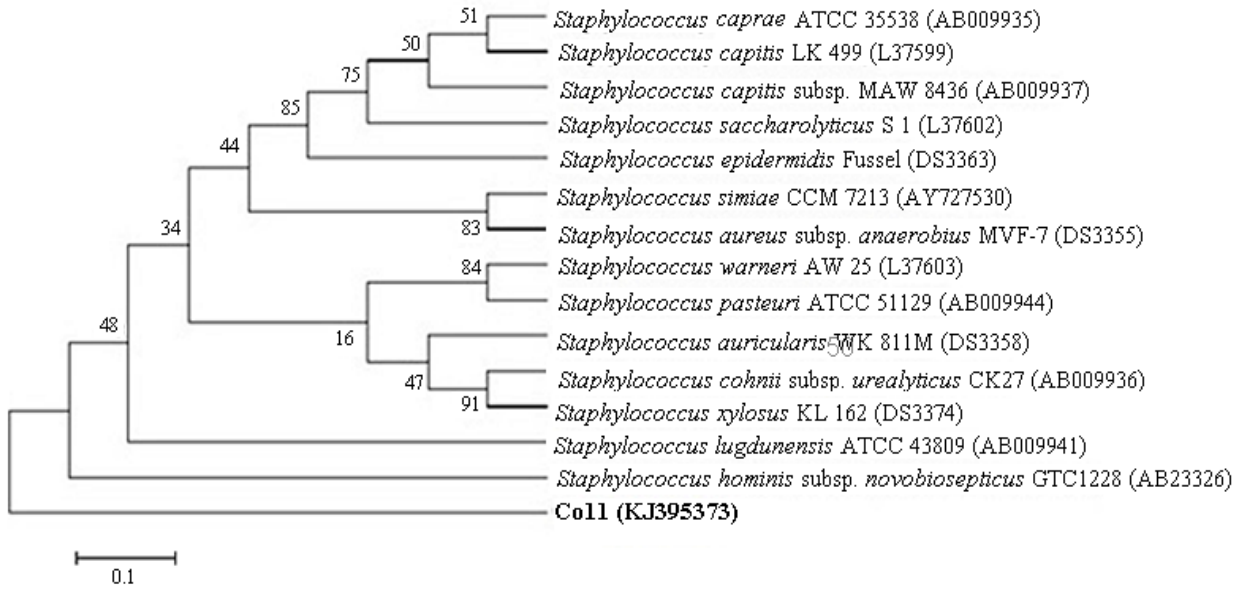
Şekil 4.5. A111 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



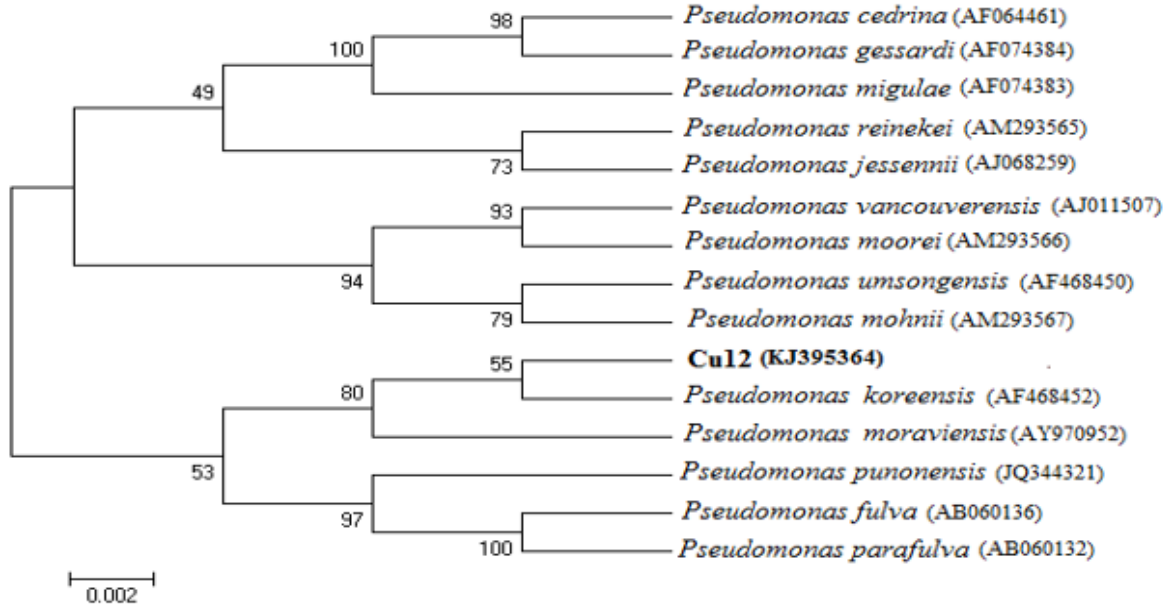
Şekil 4.6. Ba01 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



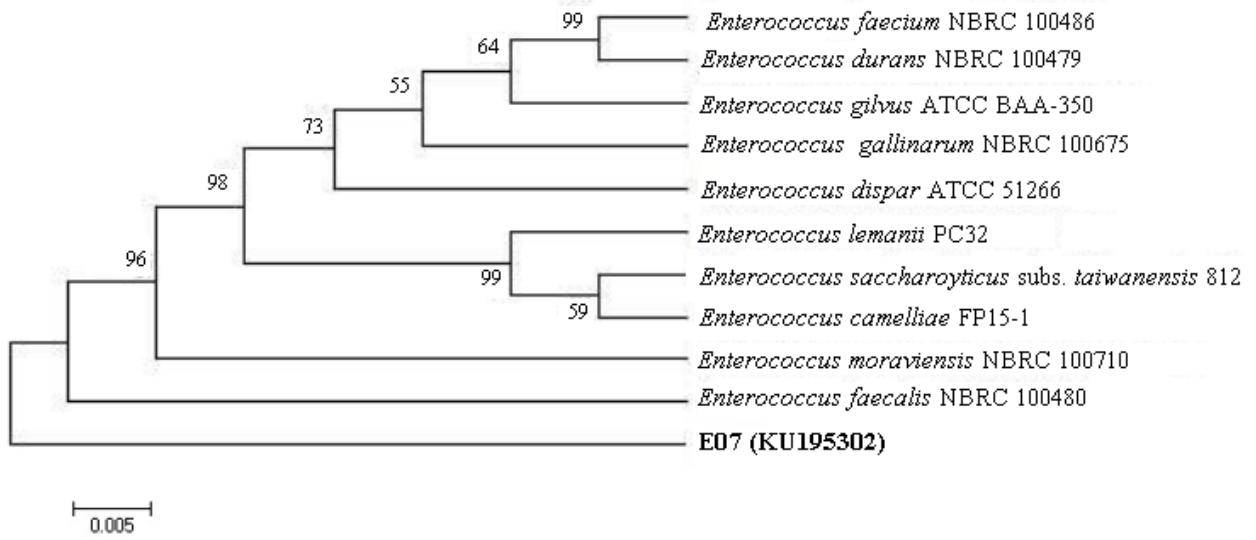
Şekil 4.7. Cr07 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



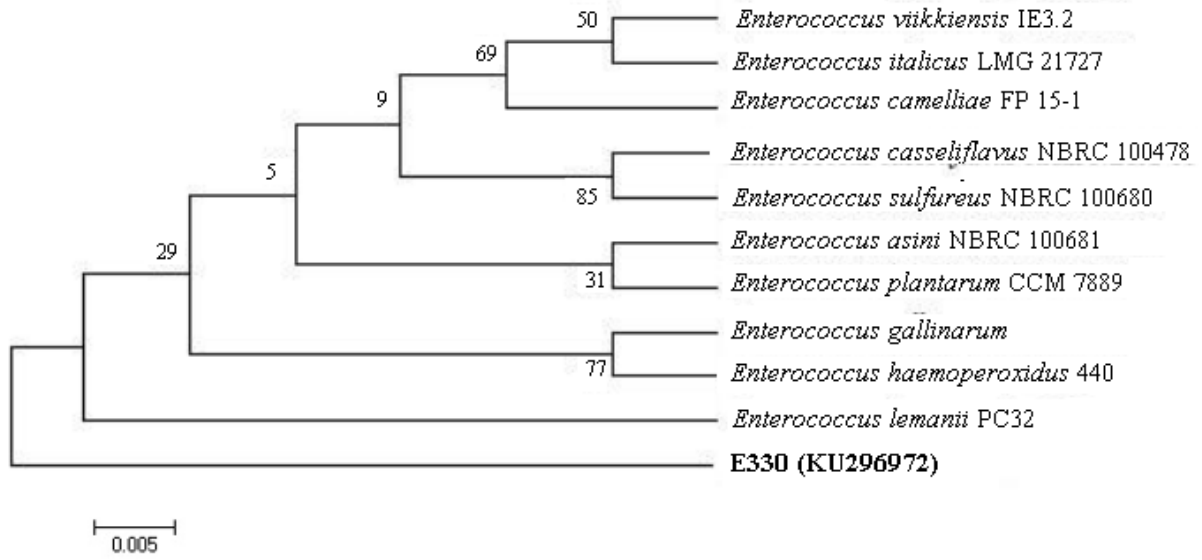
Şekil 4.8. Co11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



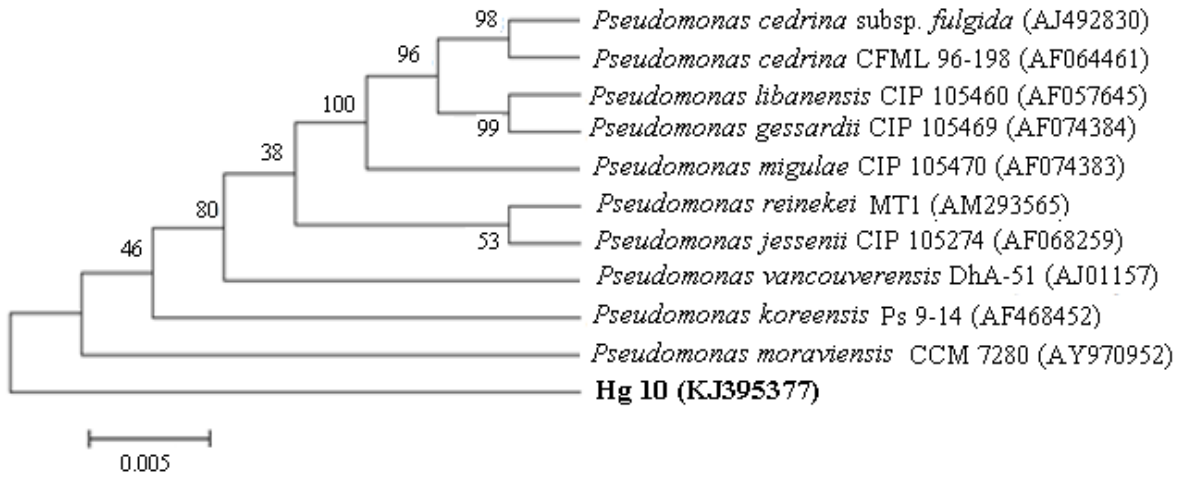
Şekil 4.9. Cu12 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.002; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.)



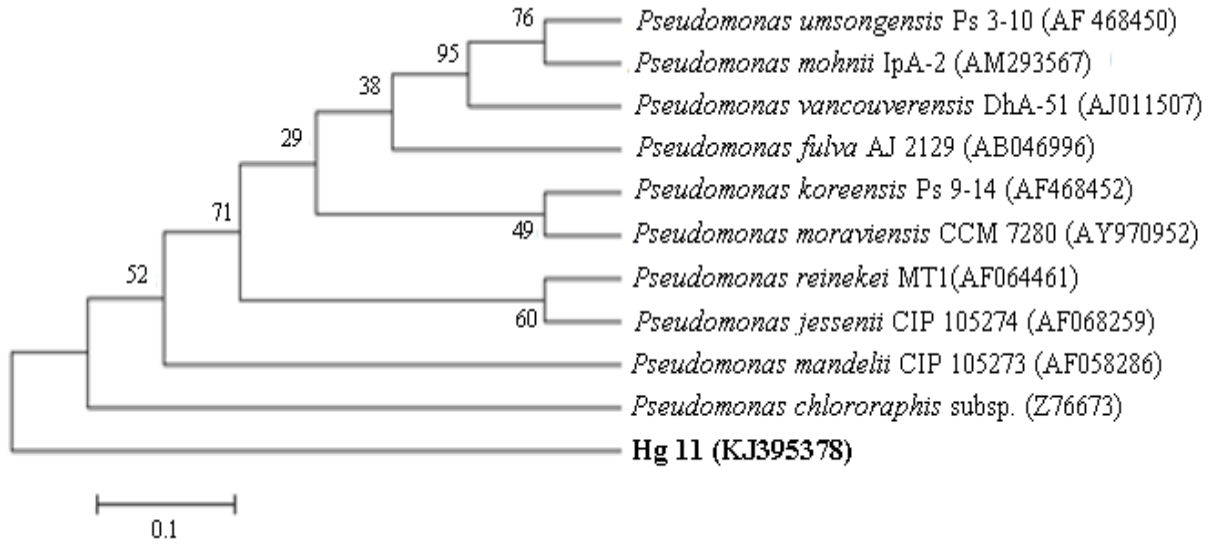
Şekil 4.10. E07 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.)



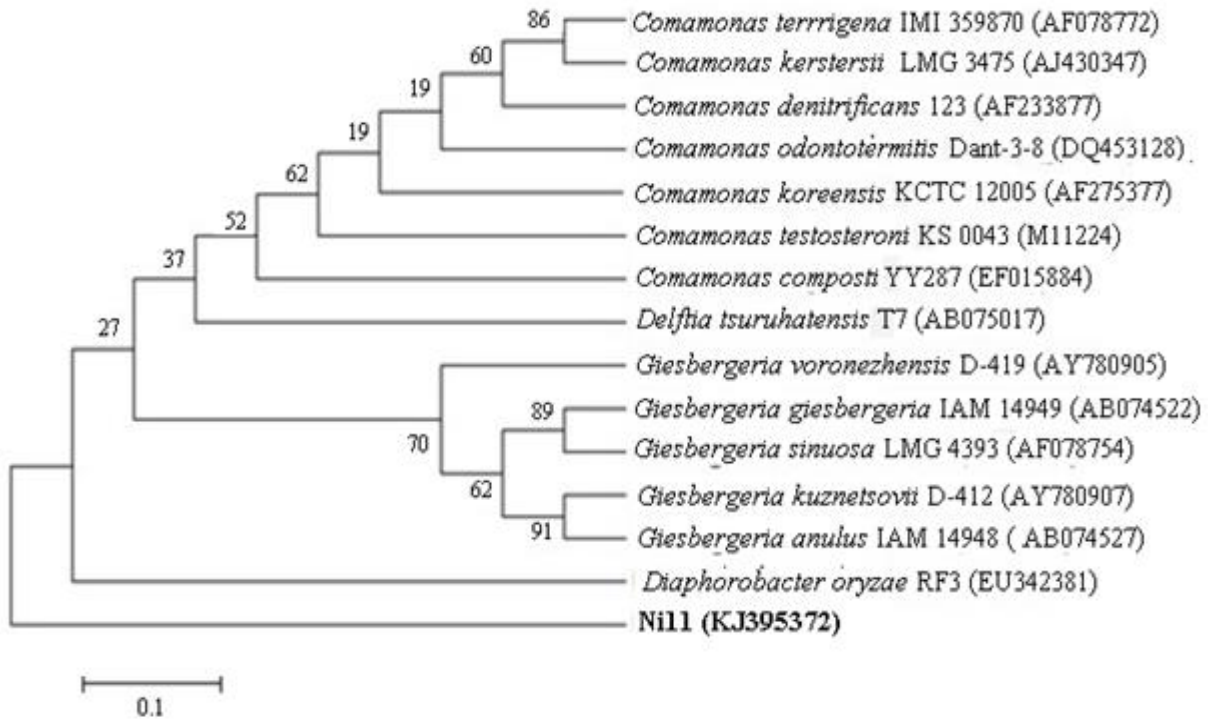
Şekil 4.11. E330 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.)



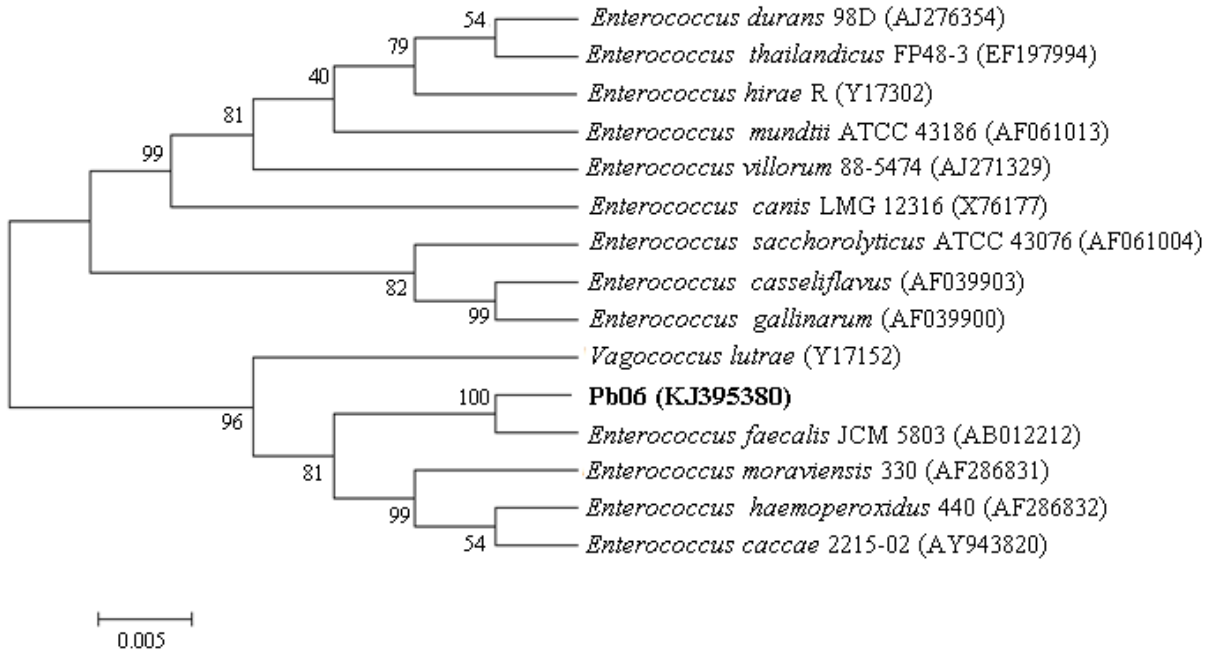
Şekil 4.12. Hg 10 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.)



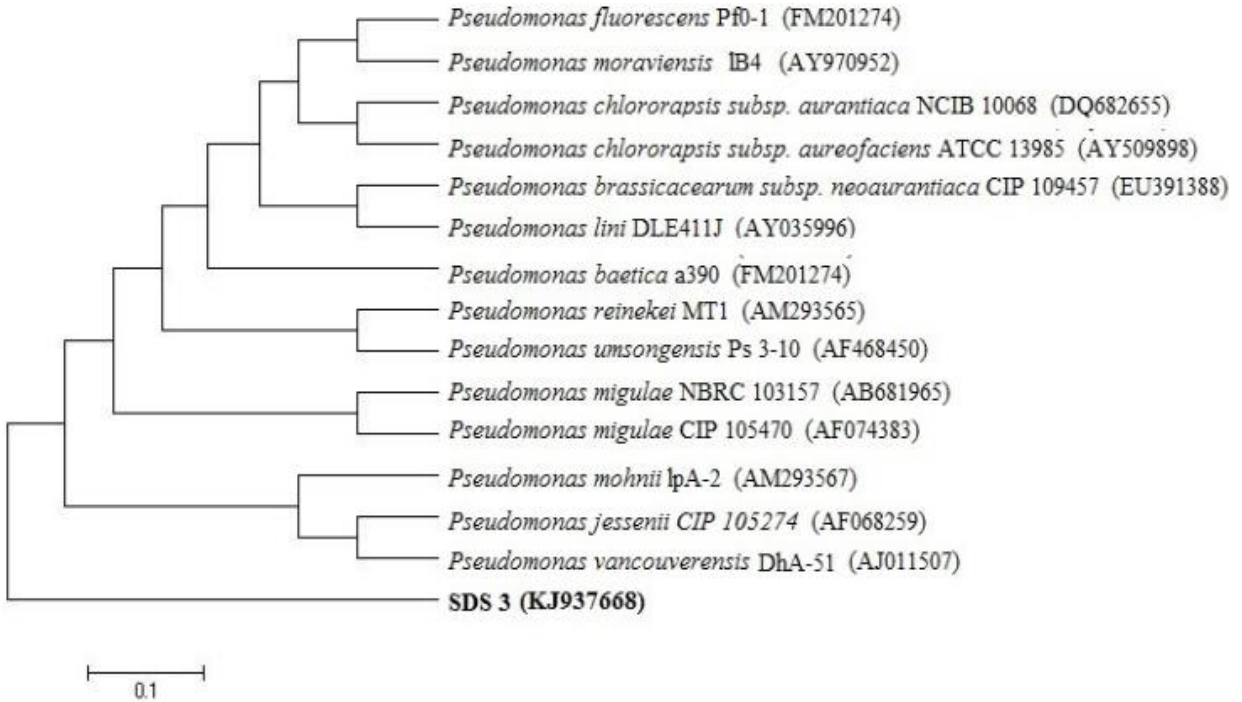
Şekil 4.13. Hg 11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.)



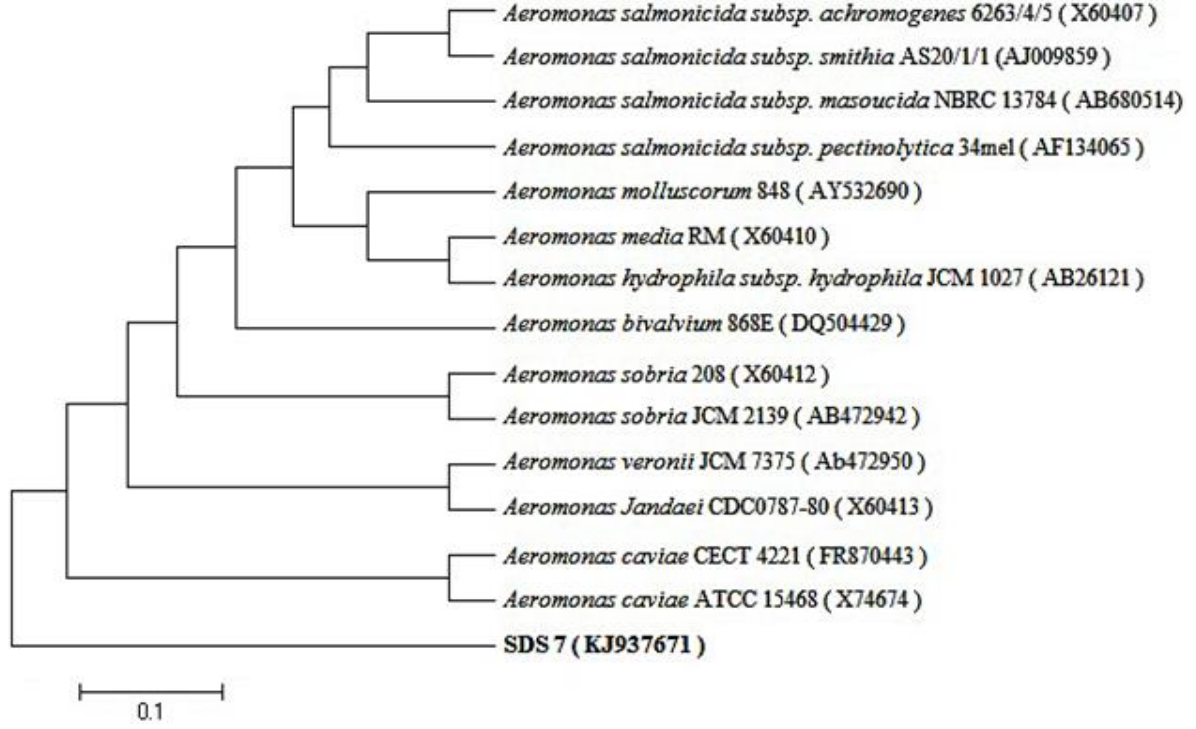
Şekil 4.14. Ni11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotitler arasındaki farkı göstermektedir.)



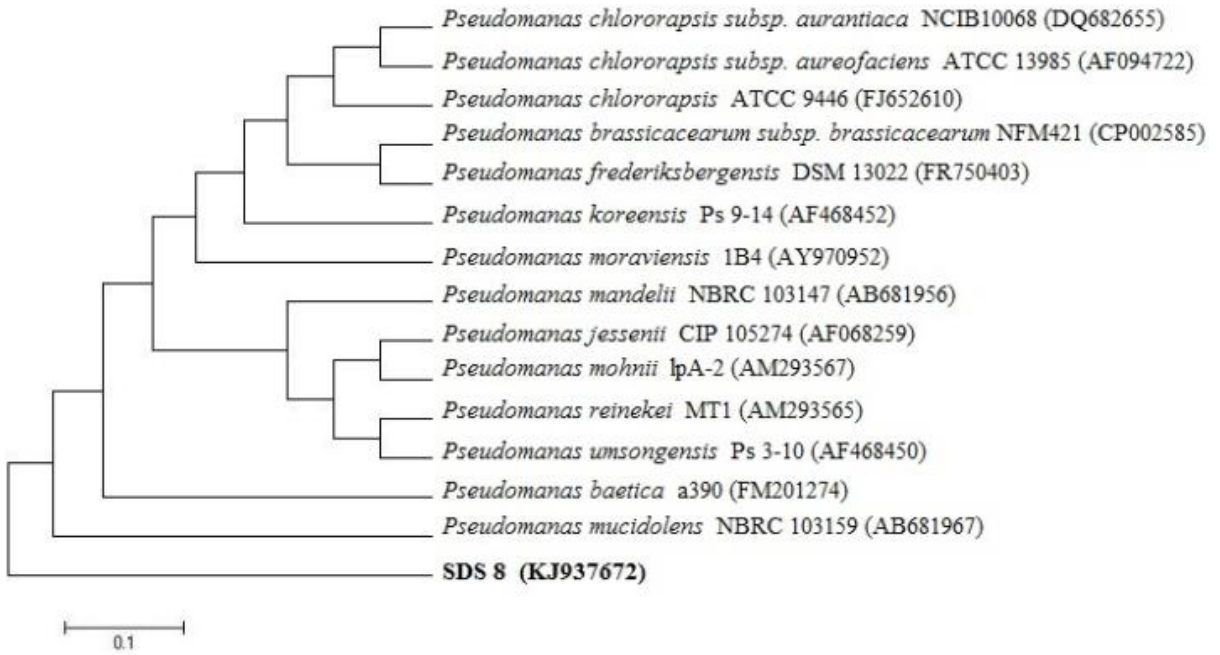
Şekil 4.15. Pb06 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



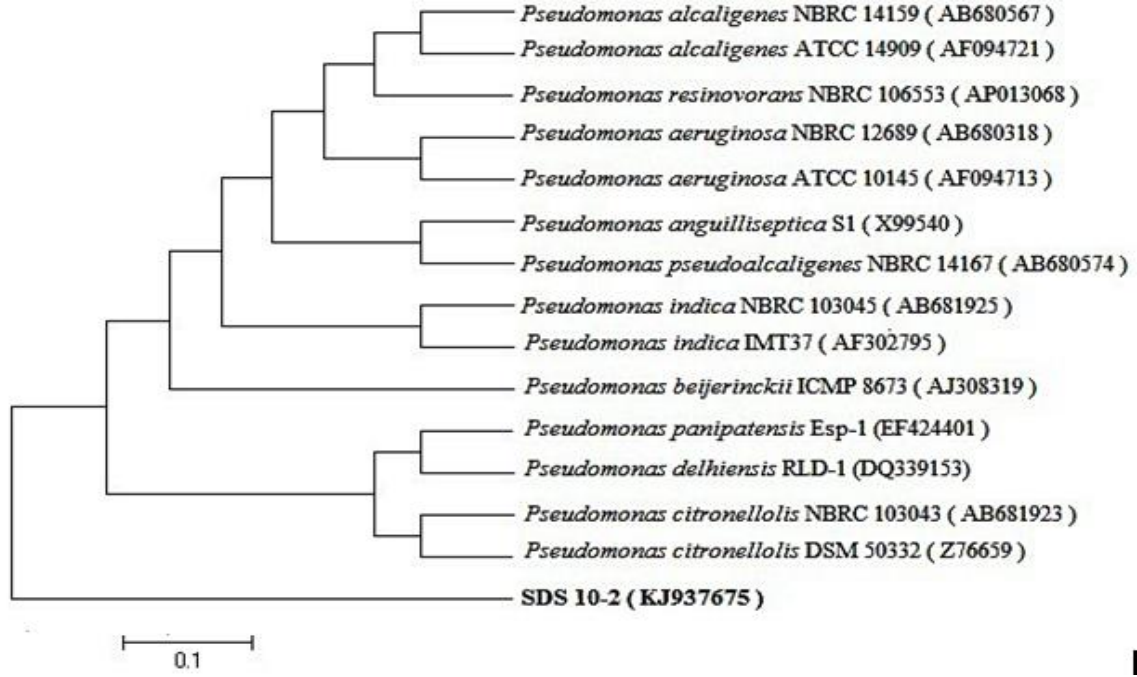
Şekil 4.16. SDS3 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



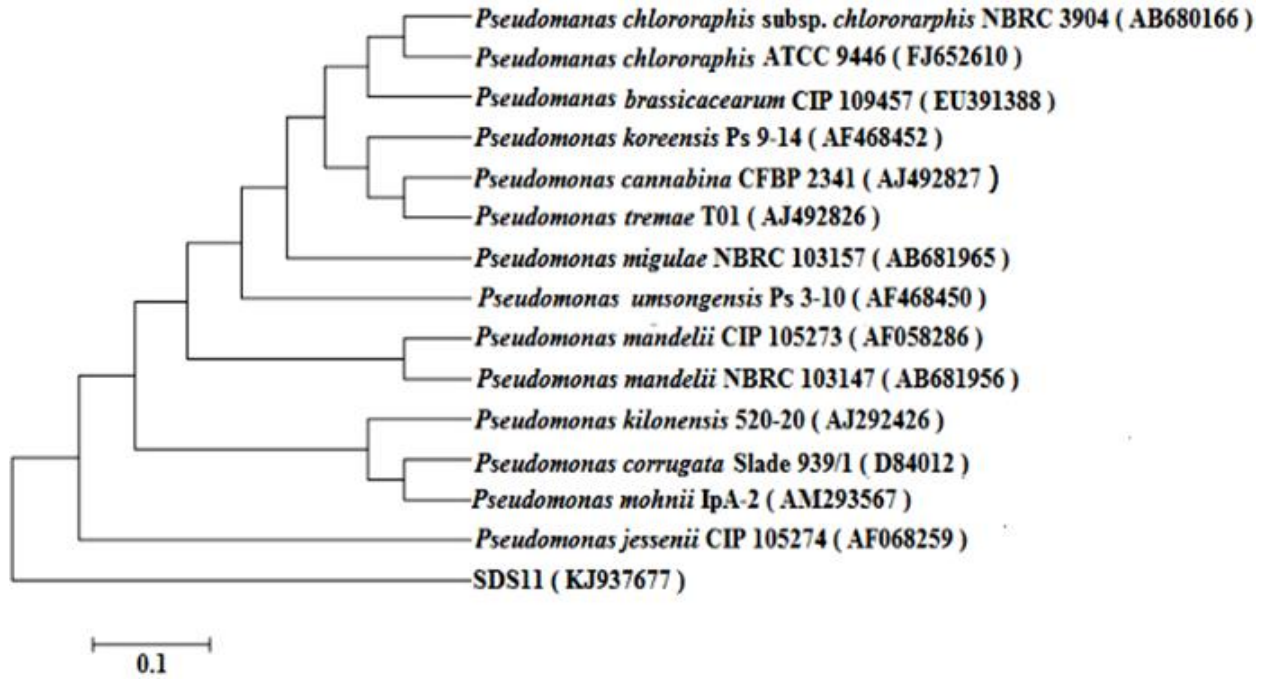
Şekil 4.17. SDS7 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



Şekil 4.18. SDS8 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)



Şekil 4.19. SDS10-2 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)

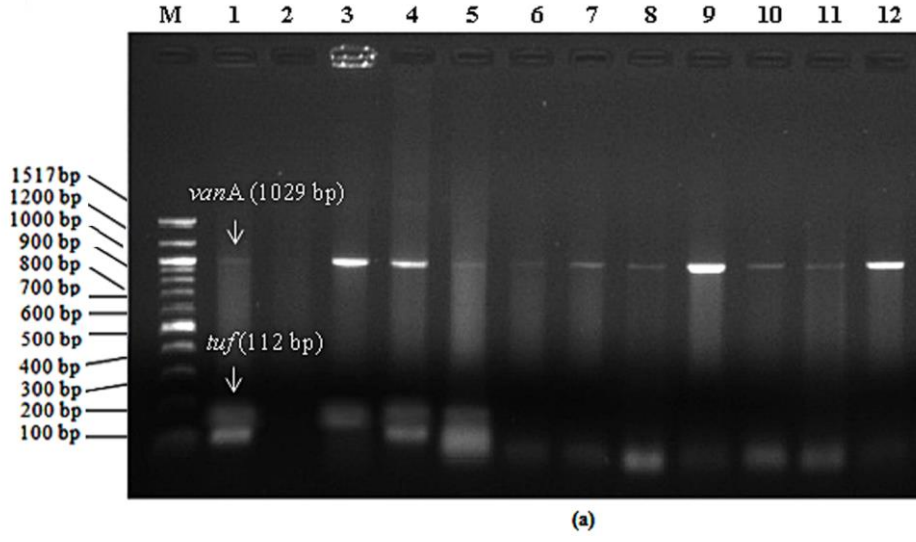


Şekil 4.20. SDS11 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)

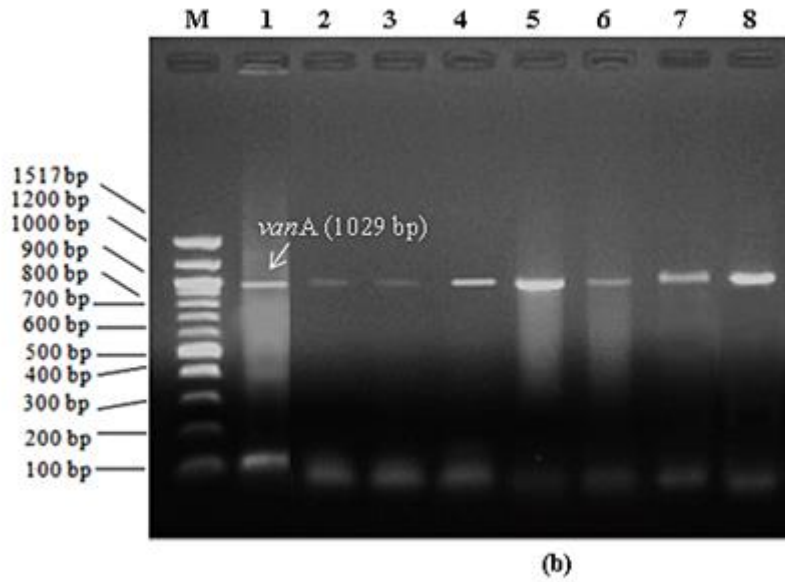
4.5 *vanA* Geninin Varlığının PZR ile Tesbiti

Vankomisin dirençliliği belirlenen suşlarda *vanA* geninin varlığı PZR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.21a ve 4.21b'de görüldüğü gibi PZR sonucunda elde edilen ampikonların boyutları 100 bp'lik marker ile 1029 bp'lik *vanA* gen bölgesi karşılaştırılmıştır. Enterokok olan ve enterokok olmayan tüm vankomisin dirençli suşlarda vankomisin direncinden sorumlu 1029 bp'lik *vanA* geni tespit edilmiştir. Bütün sonuçlar, vankomisin dirençli *E. faecium* 330 pozitif ve vankomisin duyarlı *E. coli* DH5α negatif kontrol suşları ile karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir.

Elongasyon faktorünü (EF-Tu) kodlayan *tuf* gen bölgesi ile enterokok olduğu doğrulanmış 4 suşun *vanA* geni taşıdıkları görülürken, *vanA* aracılı vankomisin direnci stafilokoklarda yaygın olmasa da (Perichon ve Courvalin 2009) bu çalışmada *Staphylococcus* cinsine ait 3 türde görülmüştür. Ancak şimdiye kadar *vanA* geni ilk kez bu çalışmada *Pseudomonas*, *Comomonas*, *Raoultella* ve *Aeromonas* türlerinde tespit edilmiştir. Yüzey sularında enterokok dışındaki türlerde, *vanA* geninin, gen aktarım yoluyla ile vankomisin dirençliliği gelişebilmektedir. Aslında vankomisine duyarlı olan bakteriler, vankomisine maruz kalmış *vanA* genini taşıyan bakterilerden bu geni alabilmektedirler. Yüzey sularında *vanA* geni plazmidler, bakteriyofajlar, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genlerin üzerinde konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon gibi mekanizmalar ile aktarılabilir (Roy, 1999). Bu nedenle yüzey suyu izolatları arasında *vanA* geninin aktarımı mümkün olabilmektedir. *vanA* geninin aktarımı yüzey sularında vankomisin dirençli bakterilerin yaygınlaşmasına neden olabilmektedir.



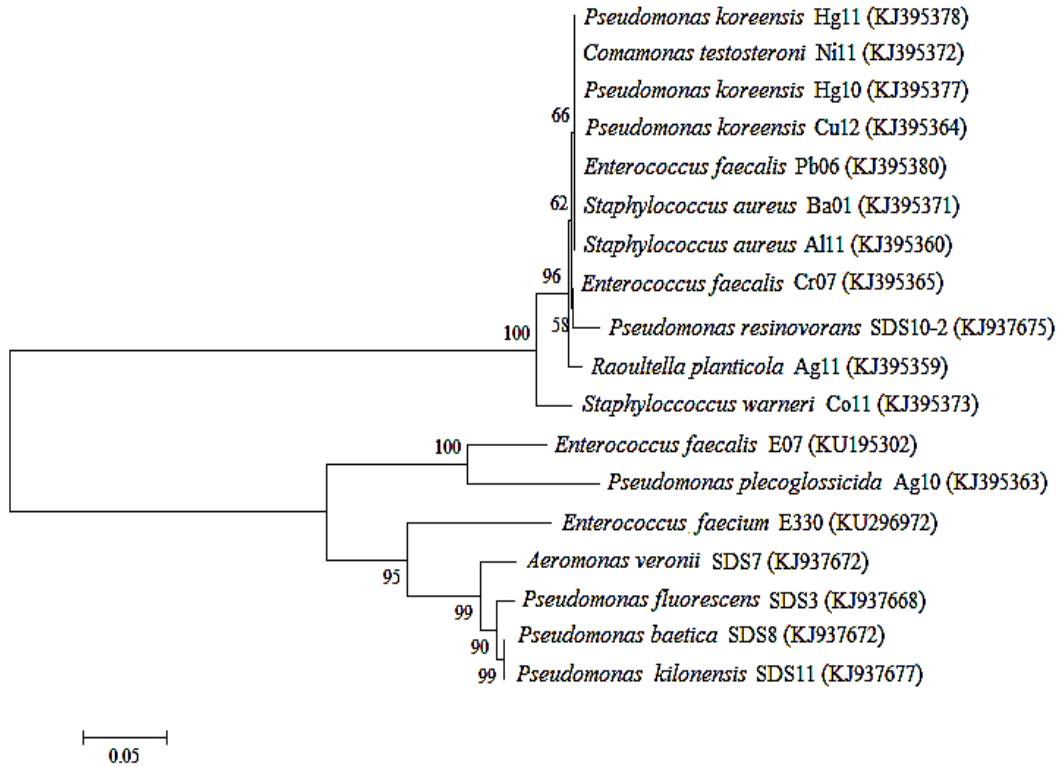
Şekil 4.21a. *vanA* geni taşıyan enterokok olan izolatlar: *E. faecium* 330 (pozitif kontrol) (1), *E. coli* DH5 α (negatif kontrol) (2), *E. faecalis* E07 (3), *E. faecalis* Cr07 (4), *E. faecalis* Pb06 (5). Enterokok olmayan izolatlar: *P. plecoglossicida* Ag10 (6), *R. planticola* Ag11 (7), *P. koreensis* Cu12 (8), *P. koreensis* Hg10 (9), *P. koreensis* Hg11 (10), *C. testosteroni* Ni11 (11), *P. fluorescens* SDS3 (12), M, Quick-Load 100 bp DNA Ladder (100–1517 bp)



Şekil 4.21b. *vanA* geni taşıyan izolatlar; *E. faecium* 330 (pozitif kontrol) (1), *A. veronii* SDS7 (2), *P. baetica* SDS8 (3), *P. resinovorans* SDS10-2 (4), *P. kilonensis* SDS11 (5). Stafilokok olan izolatlar: *S. warneri* Co11 (6), *S. aureus* Ba01 (7), *S. aureus* Al11 (8). M, Quick-Load 100 bp DNA Ladder (100–1517 bp)

4.6 *vanA* Amplikonlarının Sekans Analizi

vanA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Enterokok ve enterokok olmayan izolatların *vanA* sekans dizileri kullanılarak *vanA* genleri açısından benzerlikleri, Mega 5.2 programında neighbour-joining metodu ile çizilen filogenetik ağaçta gösterilmiştir. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi enterokok ve enterokok olmayan 18 izolatın *vanA* sekans benzerlik değerleri % 58-100 aralığında belirlenmiştir. *E. faecalis*'ten *S. aureus*'a yüksek düzeyde vankomisin ve glikopeptid-makrolid direnç genlerinin konjugatif transferi literatürde belirtilmiştir (Noble vd.,1992). Klinik ortamda *E. faecium*'dan *S. aureus*'un *vanA* genini aldığı Weigel ve arkadaşları (2007) tarafından bildirilmiştir. Patojenik olan ve olmayan bakterilerin, direnç genlerini horizontal gen transferi ile çevre izolatlarından alabilmektedirler (Davies, 1997). Enterokok olan ve olmayan bu izolatlardan elde edilen *vanA* sekansları, *vanA* geninin transfer olurken aynı zamanda farklı oijnli bu izolatlarda bu genin korunduğu da görülmüştür Bu çalışmada *vanA* geninin enterokok olan ve olmayan türlerde bulunması da bunu desteklemektedir.



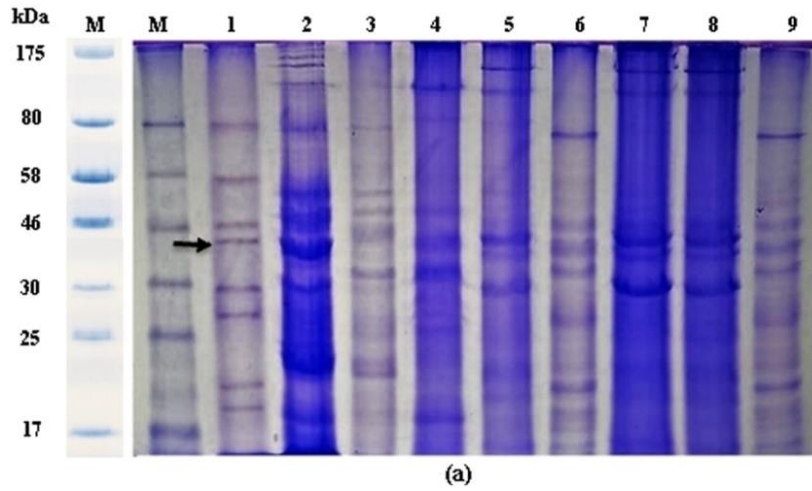
Şekil 4.22. *vanA* geni taşıyan bakterilerin filogenetik ağacı. (0.05; nükleotiler arasındaki farkı göstermektedir.)

4.7 Bakterilerde D-alanin-D-laktat Ligaz Analizi

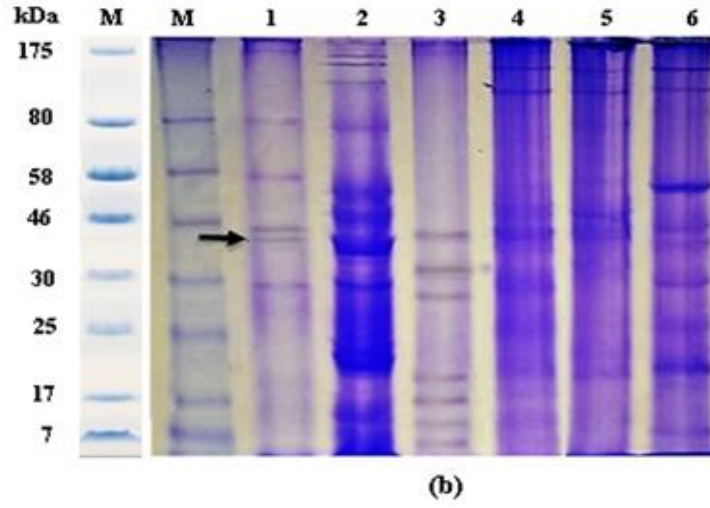
Vankomisin duyarlı bakterilerde hücre duvarını geçen vankomisin pentapeptidin D-ala-D-ala terminal ucuna bağlanır ve hücre duvarı sentezini inhibe eder. D-alanin-D-laktat ligaz enzimi ile D-ala-D-ala ucunun yapısını değiştirir ve D-ala-D-ala-laktat veya serin meydana gelir ve bu uca vankomisinin bağlanma yeteneği çok azdır. Böylece hücre duvarı sentezi ve üreme devam eder (Depardieu vd., 2007).

4.7.1 D-alanin-D-laktat Ligazın SDS-PAGE Analizi

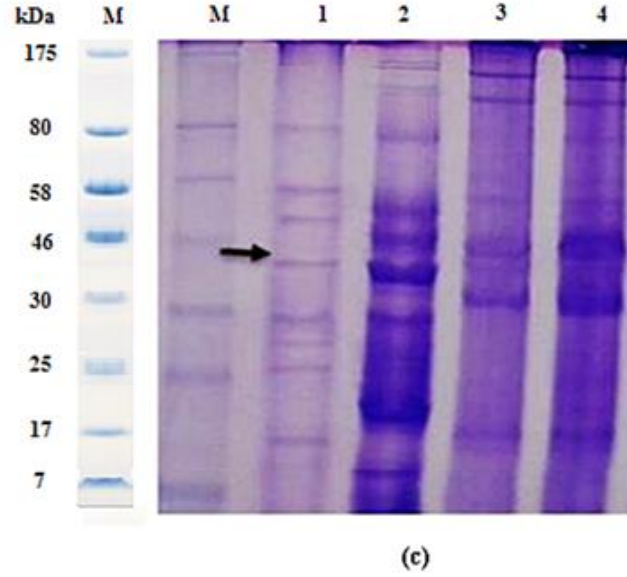
Vankomisin dirençli izolatlarda, *vanA* geni D-alanin-D-laktat ligazın sentezlenmesinden sorumludur. Şekil 4.23a, 4.23b, 4.23c ve 4.23d'de görüldüğü gibi SDS-PAGE analizi sonucu enterokok olan ve enterokok olmayan suşlarda yaklaşık 39 kDa ağırlığında olan D-alanin-D-laktat ligaz protein varlığı gösterilmiştir.



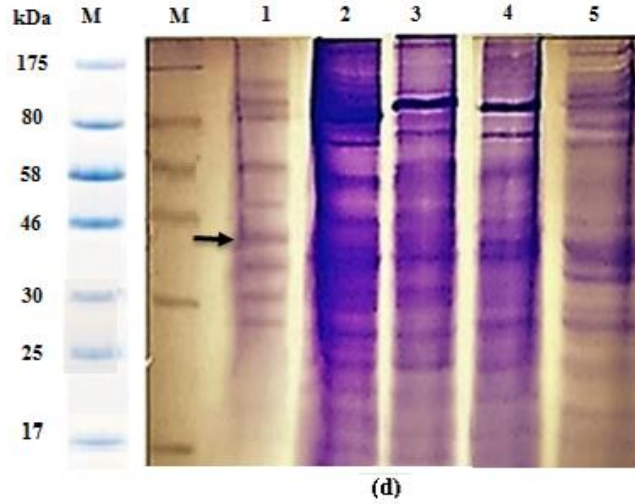
Şekil 4.23a D-alanin-D-laktat ligazın SDS-PAGE analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): *E. faecium* E330 (pozitif kontrol) (1), *E. coli* DH5 α (negatif kontrol) (2), *P. plecoglossicida* Ag10 (3), *R. planticola* Ag11 (4), *E. faecalis* Cr07 (5), *P. koreensis* Cu12 (6), *P. koreensis* Hg10 (7), *P. koreensis* Hg11 (8), *E. faecalis* Pb06 (9). M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa)



Şekil 4.23b D-alanin-D-laktat ligazın SDS-PAGE analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): *E. faecium* E330 (pozitif kontrol) (1), *E. coli* DH5 α (negatif kontrol) (2), *C. testosteroni* Ni11 (3), *P. fluorescens* SDS3 (4), *A. veronii* SDS7 (5), *P. baetica* SDS8 (6). M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa)



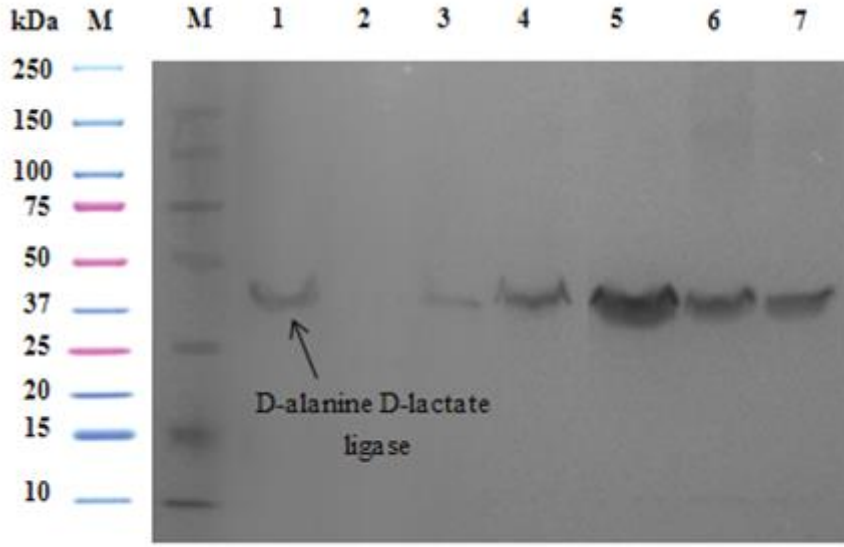
Şekil 4.23c. D-alanin-D-laktat ligazın SDS-PAGE analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): *E. faecium* E330 (pozitif kontrol) (1), *E. coli* DH5 α (negatif kontrol) (2), *P. kilonensis* SDS11 (3), *P. baetica* SDS12 (4). M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa)



Şekil 4.23d. D-alanin-D-laktat ligazın SDS-PAGE analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): *E. faecium* E330 (pozitif kontrol) (1), *E.coli* DH5α (negatif kontrol) (2), *S. warneri* Co11 (3), *S. aureus* Ba01 (4), *S. aureus* AI11 (5). M, Colorplus Prestained Protein Marker (7-175 kDa)

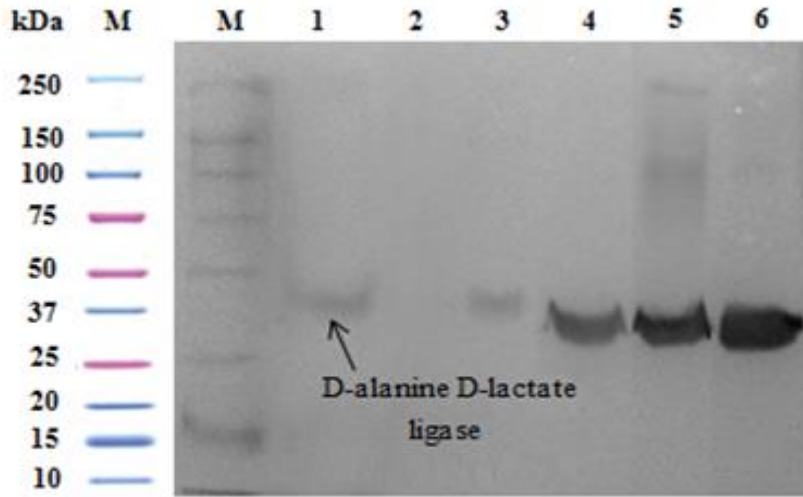
4.8 Western Blot Analizi ile D-alanin-D-laktat ligaz'ın Belirlenmesi

Vankomisin dirençli *vanA* geni taşıyan yüzey sularından izole edilmiş 18 izolatta, D-alanin-D-laktat ligaz ekspresyonu Western Blot Analizi yapılarak kontrol edilmiştir. Şekil 4.24a, 4.24b, 4.24c ve 4.24d'de mouse anti-human *vanA* primer antibodi ve goat anti-mouse immunoglobulin G/M horseradish peroksidaz (HRP)-conjugated sekonder antibodi kullanılarak D-alanin-D-Laktat ligaz proteinlerinin lokalizasyonu gösterilmiştir. Yaklaşık 39 kDa ağırlığında olan D-alanin-D-laktat ligaz proteinleri enterokok olan ve olmayan tüm suşlarda aynı pozisyonda tespit edilmiştir (4.24a, 4.24b, 4.24c ve 4.24d). D-alanin-D-laktat ligaz proteini 4 vankomisin dirençli enterokok suşu dışında enterokok olmayan suşlarda da tespit edilmiştir. *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Leuconostoc mesenteroides*'in D-alanin-D-laktat terminal kısımlarının, vankomisin dirençli enterokoklardaki D-alanin-D-laktat terminal kısmı ile aynı yapıda oldukları ve doğal olarak glikopeptidlere dirençli oldukları belirtilmiştir (Billot-Klein vd., 1994; Handwerger vd., 1994).



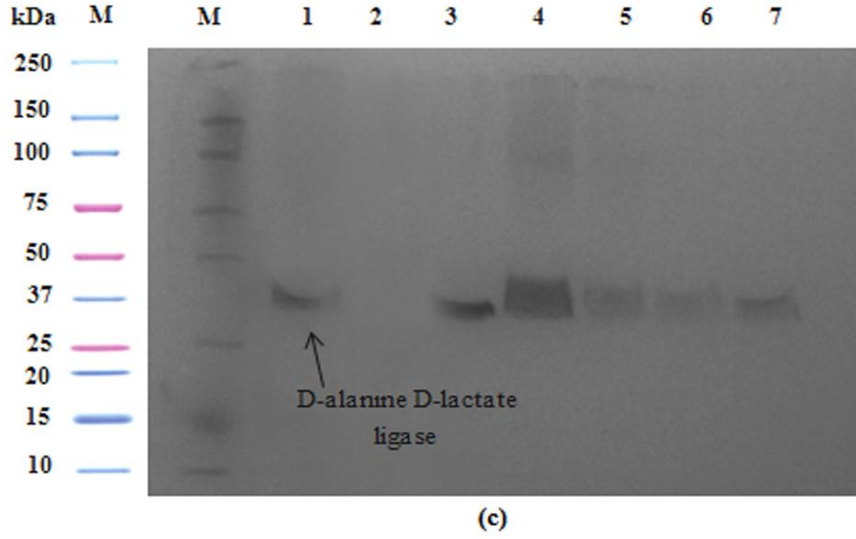
(a)

Şekil 4.24a. D-alanin-D-laktat ligazın Western blot analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): *E. faecium* E330 (pozitif kontrol) (1), *E.coli* DH5α (negatif kontrol) (2), *C. testosteroni* Ni11 (3), *E. faecalis* Pb06 (4), *P. fluorescens* SDS3 (5), *A. veronii* SDS7 (6), *P. baetica* SDS8 (7). M, Precision Plus Protein WesternC Standards Marker (BioRad, USA).

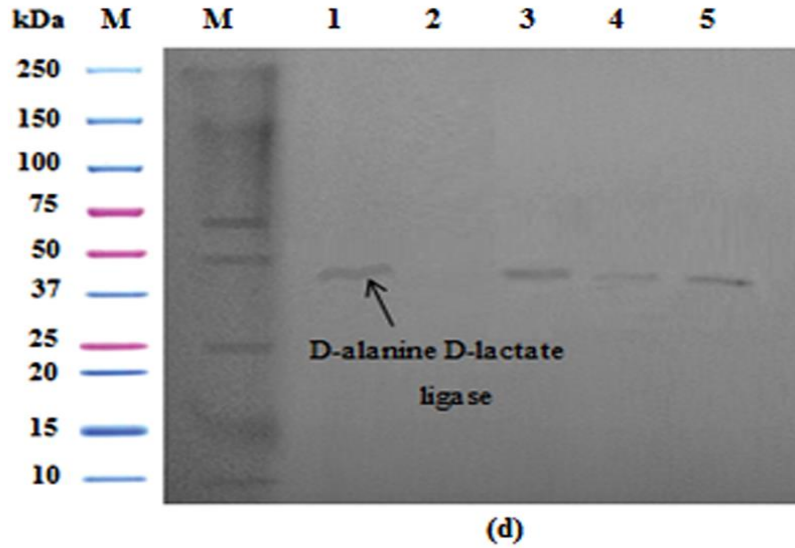


(b)

Şekil 4.24b. D-alanin-D-laktat ligazın Western blot analizi (39 kDa ağırlığında siyah ok ile gösterilmiştir): *E. faecium* E330 (pozitif kontrol) (1), *E.coli* DH5α (negatif kontrol) (2), *P. resinovorans* SDS10-2 (3), *P. kilonensis* SDS11 (4), *P. plecoglossicida* Ag10 (5), *R. planticola* Ag11 (6). M, Precision Plus Protein WesternC Standards Marker (BioRad, USA).



Şekil 4.24c. D-alanin-D-laktat ligazın Western blot analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): *E. faecium* E330 (pozitif kontrol) (1), *E. coli* DH5 α (negatif kontrol) (2), *E. faecalis* Cr07 (3), *P. korensis* Cu12 (4), *P. korensis* Hg10 (5), *P. korensis* Hg11 (6), *E. faecalis* E07 (7). M, Precision Plus Protein WesternC Standards Marker (BioRad, USA).

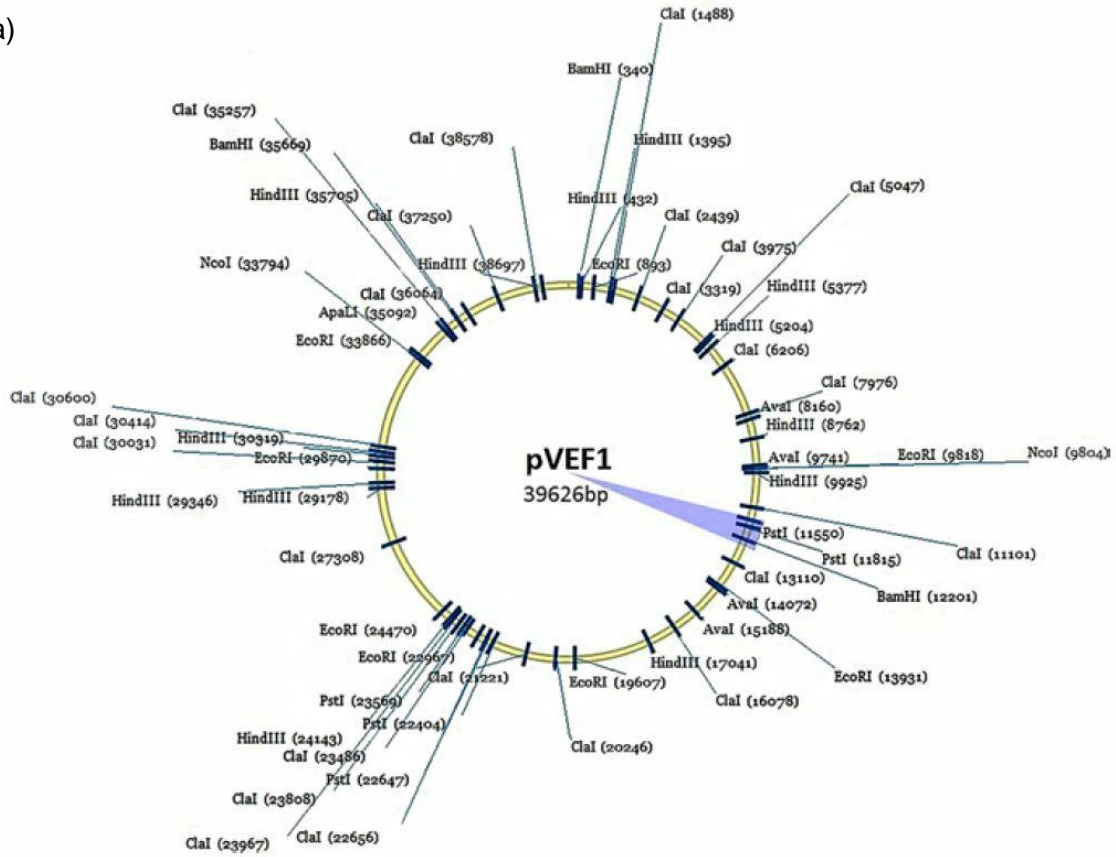


Şekil 4.24d. D-alanin-D-laktat ligazın Western blot analizi (39 kDa ağırlığında ok ile gösterilmiştir): *E. faecium* E330 (pozitif kontrol) (1), *E. coli* DH5 α (negatif kontrol) (2), *S. aureus* Al11 (3), *S. aureus* Ba01 (4), *S. warnerii* Co11 (5). M, Precision Plus Protein WesternC Standards Marker (BioRad, USA).

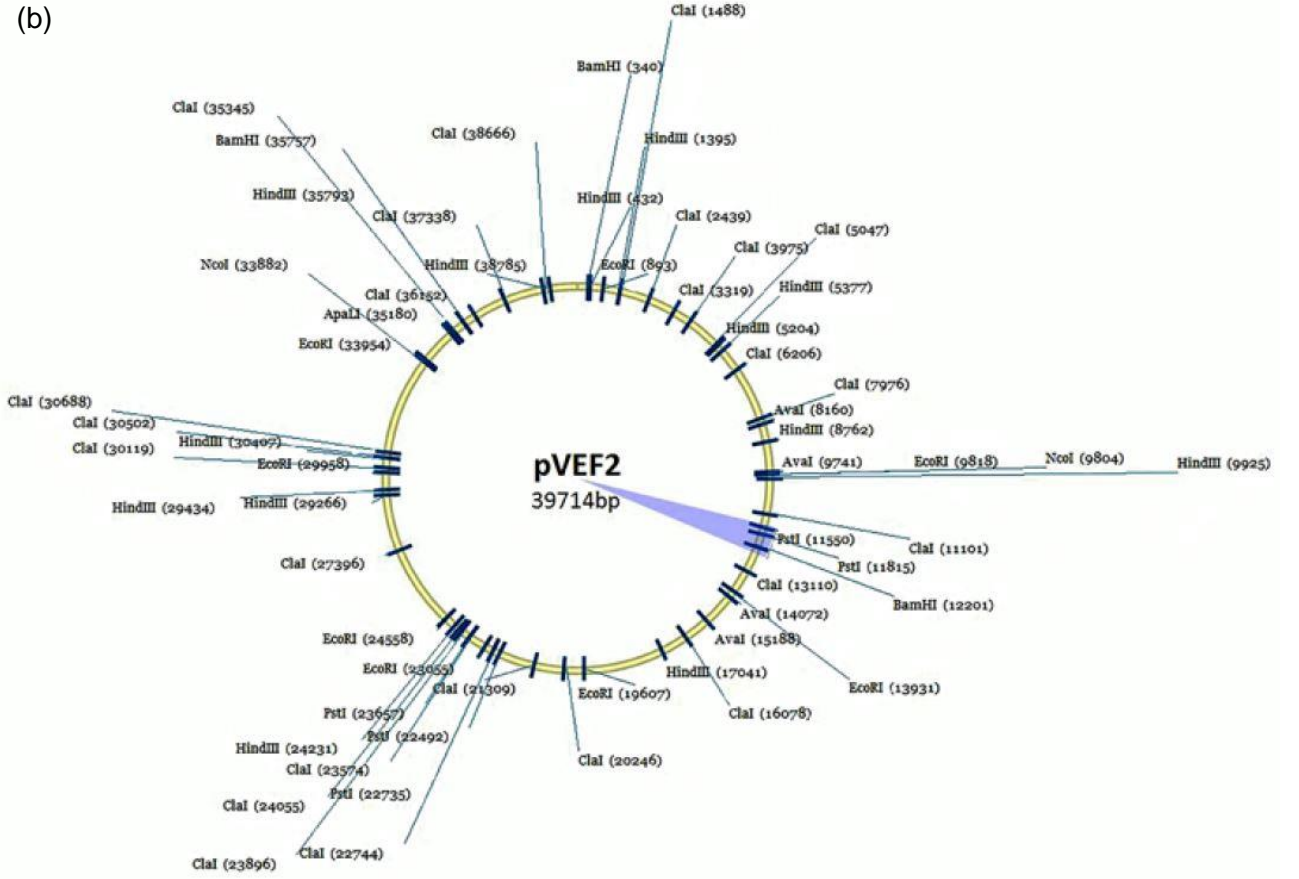
4.9 Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH)

25 bp uzunluğundaki *vanA* oligonukleotid DNA prob, *E. faecium* pVEF1 ve pVEF2. Plazmidlerine ait *vanA* operonu 909 bp BamHI-ClaI fragmenti kullanılarak tasarlanmıştır. pVEF1 (39626 bp) ve pVEF2 (39714 bp) plazmidlerinin tüm restriksiyon enzim kesim bölgeleri GenBank'tan (accession numaraları AM296544 ve AM410096) elde edilmiştir (Şekil 4.25a ve 4.25b).

(a)



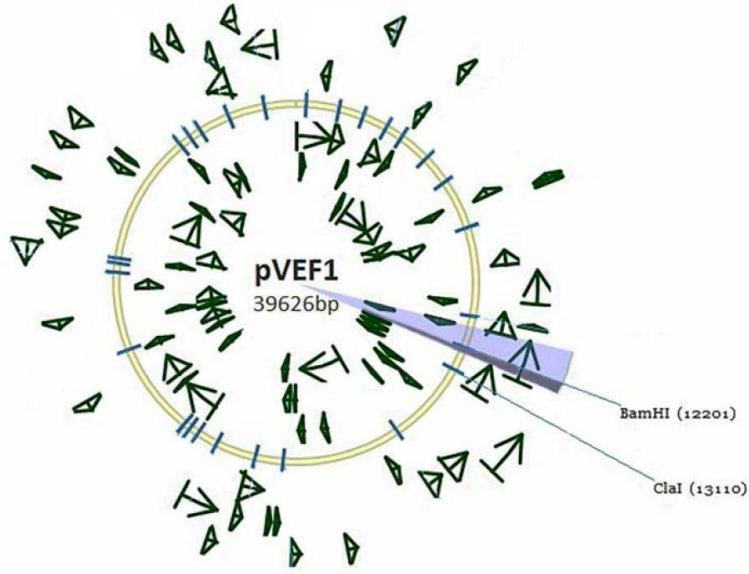
(b)



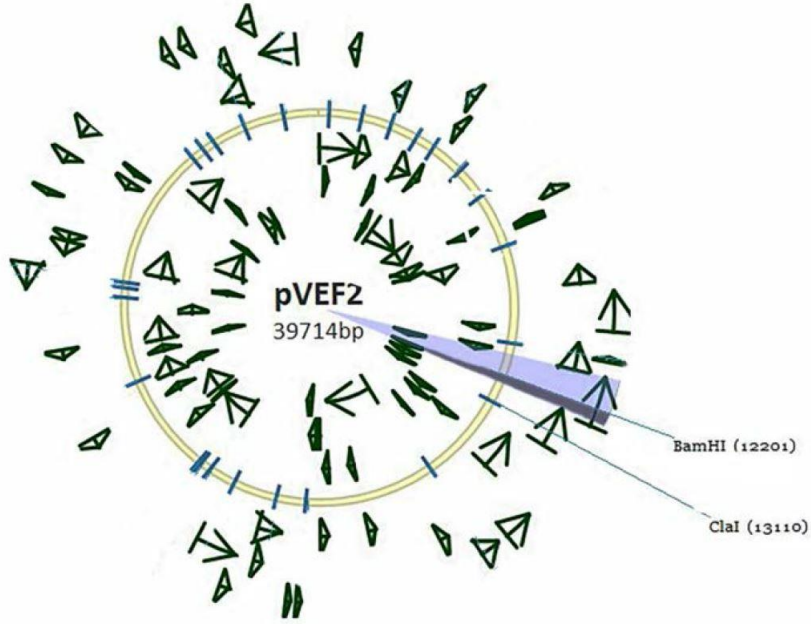
Şekil 4.25. *E. faecium* pVEF1 (a) ve pVEF2 (b) plazmidlerinde bulunan *vanA* operonu

Her iki plazmid için open reading frame (ORF) bölgeleri ve restriksiyon kesim noktalarının analizi Vector NTI Express 1.2 programında yapılmıştır (IBI, USA) (Şekil 4.26a ve 4.26b).

(a)



(b)



Şekil 4.26. *E. faecium* pVEF1 (a) ve pVEF2 (b) plazmidleri *vanA* operonunda 909 bp *Bam*HI (12201) - *Cla*I (13110) fragmentleri. Koyu bölge *vanA* operonundan prob seçimi için kullanılan bölgeyi göstermektedir.

vanA hibridizasyon probu için her iki plazmidde *vanA* operonunda 11489 ve 12520 bp'lik bölge seçilmiştir. *vanA* operonundan 20 sekans seçilmiş ve seçilen bu sekansların % 100 spesifiteleri BLAST (Tablo 4.3) kullanılarak kontrol edilmiştir. Bu sekanslar arasında % GC oranı, GC bazlarının lokasyonu, baz uzunluğu ve T_m sıcaklığı parametrelerine bakılarak 4. sıradaki 25 bp uzunluğunda olan prob 5'-CTGTTTGGGGTTGCTCAGAGGAGC-3' dizisi seçilmiştir. Seçilen bu probun 5' ucu FITC ile işaretlenmiştir (Alpha DNA, Montreal, Canada).

Tablo 4.3. Vector NTI Express Software 1.2 programı kullanılarak seçilen *vanA* DNA prob sekansları

Sekans No	Sekanslar	Baz uzunluğu	GC (%)	Site ^a	T _m (C°)
1	ATACTGTTTGGGGTTGCTCAGAGG	25	52	12475	28.1
2	TACTGTTTGGGGTTGCTCAGAGGA	25	52	12474	29.4
3	ACTGTTTGGGGTTGCTCAGAGGAG	25	56	12473	30.1
4	CTGTTTGGGGTTGCTCAGAGGAGC	25	60	12472	32.4
5	TTGCTCAGAGGAGCATGACGTATCG	25	52	12461	29.0
6	TGCTCAGAGGAGCATGACGTATCGG	25	56	12460	30.9
7	GCTCAGAGGAGCATGACGTATCGGT	25	56	12459	29.2
8	CTCAGAGGAGCATGACGTATCGGTA	25	52	12458	26.1
9	ATGTGCGAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAA	30	50	12341	41.7
10	TGTGCGAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAA	29	51.7	12341	42.0
11	GTGCGAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAA	28	53.6	12341	40.4
12	TGCGAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAA	27	51.9	12341	40.2
13	GCGAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAA	26	53.8	12341	38.5
14	CGAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAA	25	52	12341	36.2
15	GAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAAAACG	28	50	12337	37.7
16	AAAACCTTGCGCGGAATGGGAAAACG	26	50	12337	36.1
17	AAACCTTGCGCGGAATGGGAAAACG	25	52	12337	35.4
18	AACCTTGCGCGGAATGGGAAAACGA	25	52	12336	35.9
19	ACCTTGCGCGGAATGGGAAAACGAC	25	56	12335	35.7
20	CCTTGCGCGGAATGGGAAAACGACA	25	56	12334	37.2

^a *E. faecium* pVEF1 ve pVEF2 plazmidlerinin *Bam*HI (12201) - *Cl*al (13110) kesim bölgelerinden elde edilen fragmentler T_m, erime sıcaklığı

4.9.1 *vanA* Problarının Optimum Hibridizasyon Koşullarının Belirlenmesi

In situ uygulamada hedef olan *vanA* geni taşıyan bakterilerin hibridizasyonu gerçekleştirmek için tasarlanan *vanA* probu ile *vanA* pozitif *E. faecalis* 07 ve *vanA*-negatif *E. coli* DH5α kontrol suşları olarak 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 4.4). Hibridizasyon sonrası Leica QWin Plus programı kullanılarak yapılan DAPI ve FITC görüntülerine ait piksel alanları (pp²) analizinde elde edilen hibridizasyon oranları Tablo 4.4'te ve FISH görüntüleri ise Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de sırasıyla verilmiştir.

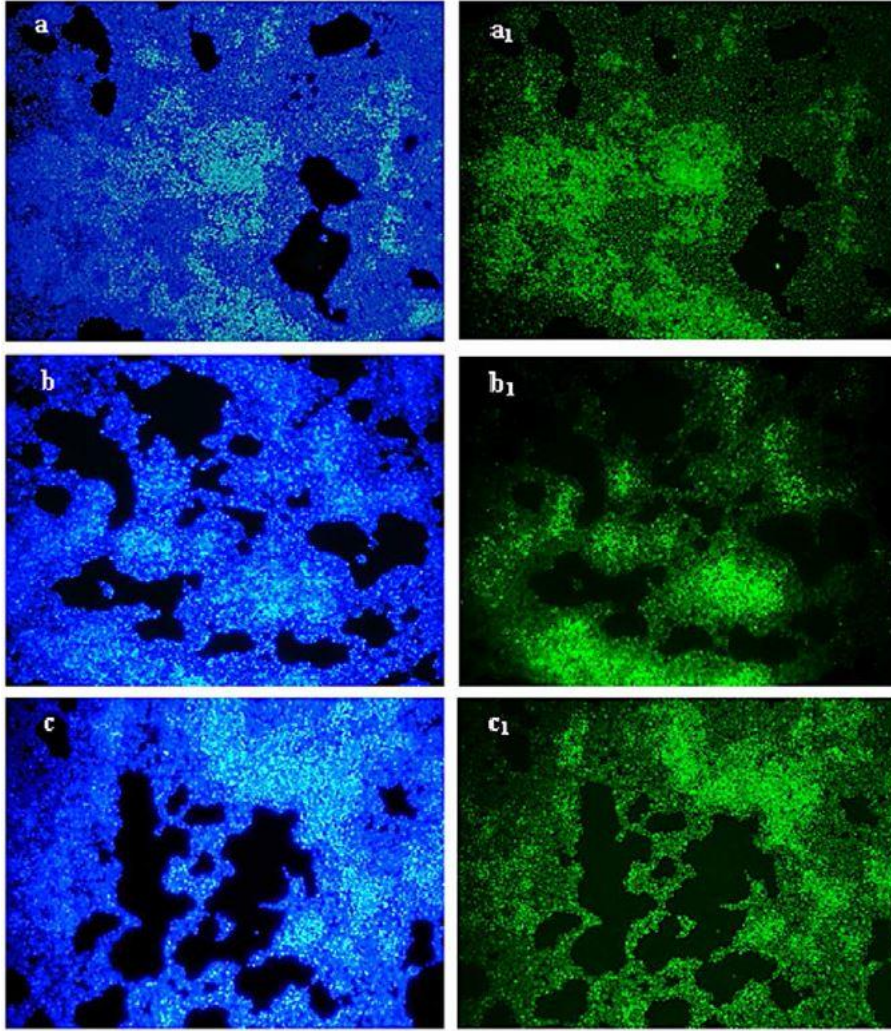
E. faecalis E07 *vanA* pozitif kontrol suşu kullanılarak % 55 formamid ve 0.020 M NaCl konsantrasyonunda gerçekleşen hibridizasyonda *vanA* probu % 88.6±1.97 (p<0.05) oranında en fazla *vanA* genine spesifite ile hibridize olmuştur (Şekil 4.27). Bu hibridizasyon koşullarının ve *vanA* probunun daha sonraki çalışmalarda *vanA* geni taşıyan bakterilerin takip edilmesine

yönelik spesifitesinin doğrulanması için *vanA* geni taşımayan negatif kontrol suşu *E. coli* DH5 α ile hibridizasyon yapılmıştır). *E. coli* DH5 α suşu % 2.89 \pm 0.68 ($p < 0.05$) oranlarıyla düşük intensity göstermiştir (Şekil 4.28). *vanA* probunun sinyal yoğunluğu ile hedef *vanA* geni arasında doğrusal ilişki $R^2 = 0.91$ olarak belirlenmiştir.

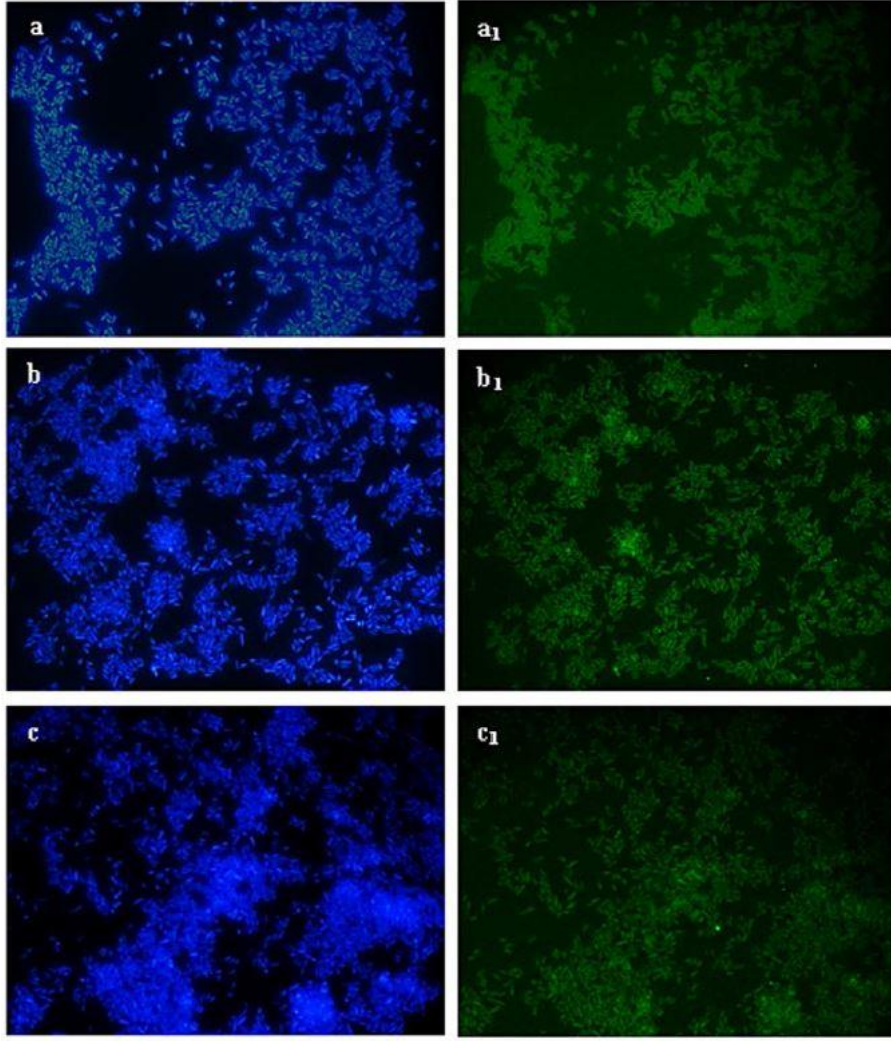
Tablo 4.4. *vanA* pozitif ve negatif kontrol suşlarının *vanA* probu ile hibridizasyon koşulları

<i>vanA</i> probe için hibridizasyon koşulları		<i>vanA</i> probu için % sinyal intensity		
		<i>vanA</i> ⁺ kontrol	<i>vanA</i> ⁻ kontrol	
Sıcaklık (C°)	[Formamid] (%)	[NaCl] (M)	<i>E. faecalis</i> E07	<i>E. coli</i> DH5 α
46	45	0.040	73.8 \pm 0.75	1.40 \pm 0.75
46	50	0.028	78.9 \pm 1.82	1.93 \pm 0.81
46	55	0.020	88.6 \pm 1.97	2.89 \pm 0.68

\pm , standart sapma
vanA⁺, vA-pozitif kontrol
vanA⁻, *vanA*-negatif kontrol



Şekil 4.27. *vanA* pozitif *E. faecalis* E07 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 *vanA* probu (a₁, b₁, c₁). (Bar, 10µm)

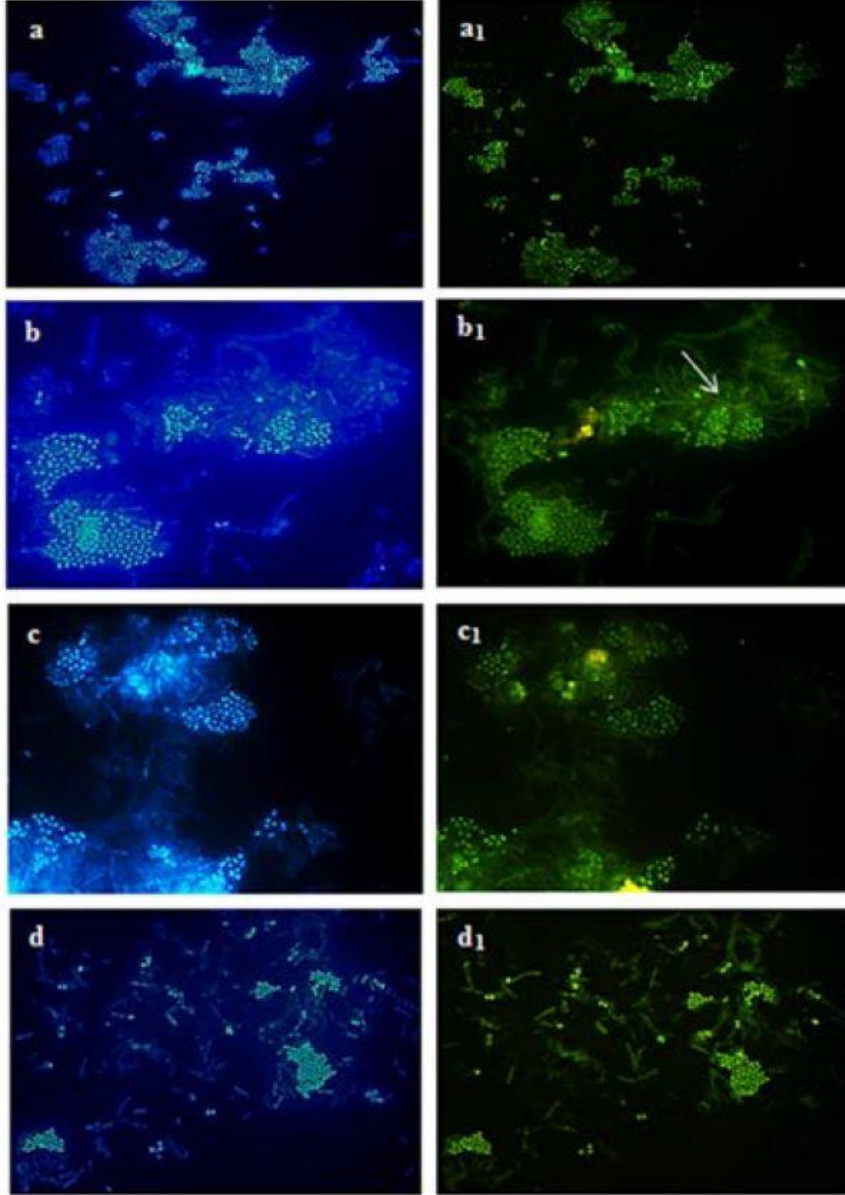


Şekil 4.28. *vanA* negatif *E. coli* DH5 α suşunun % 45 formamid ve 0.040 M NaCl (a-a₁), % 50 formamid ve 0.028 M NaCl (b-b₁), ve % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c₁) konsantrasyonlarında hibridizasyon optimizasyonu. DAPI ile boyanmış toplam hücre popülasyonları (a, b, c) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *vanA* probu (a₁, b₁, c₁). (Bar, 10 μ m)

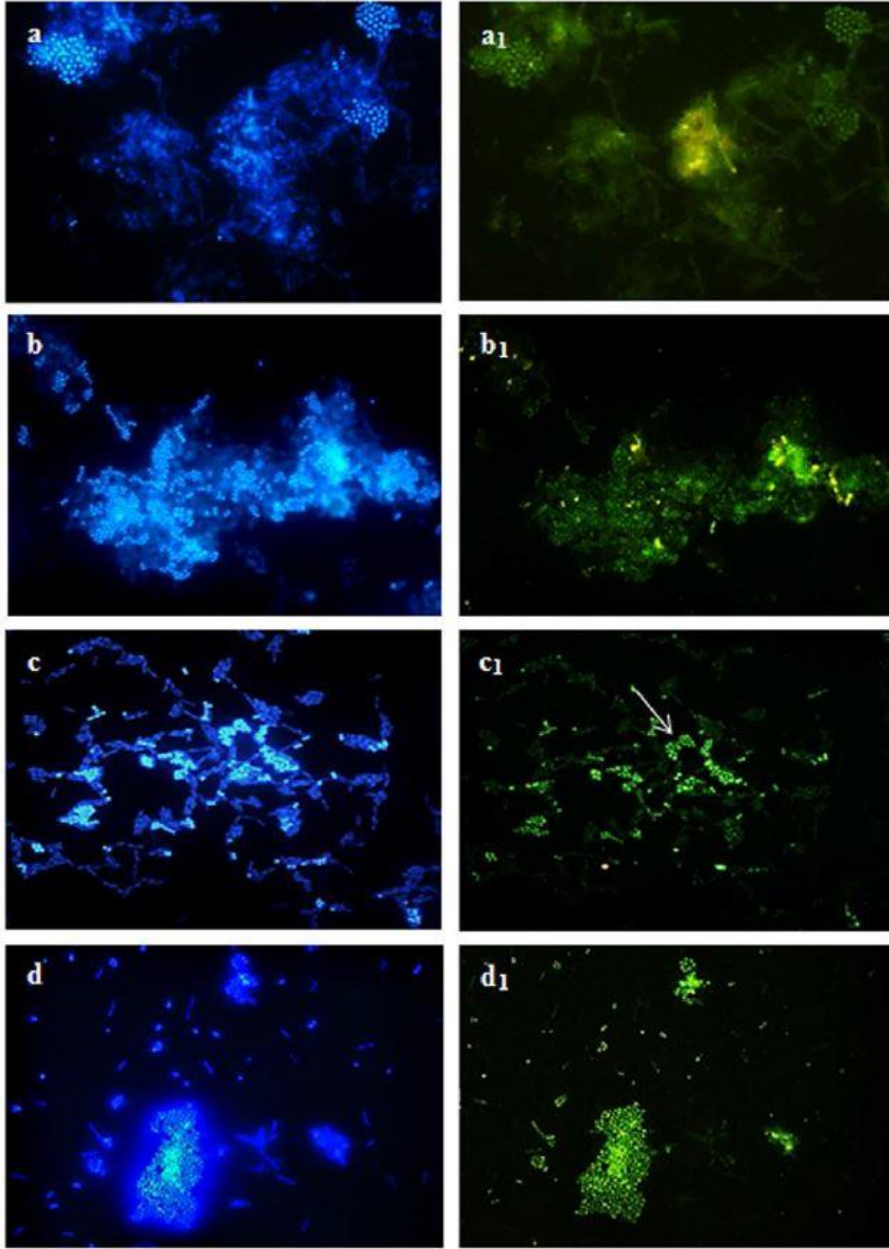
Optimizasyon çalışmaları sonucunda *vanA* probunun *vanA* geni taşıyan bakterilerin takip edilmesi için en yüksek spesifitede % 55 formamid ve 0.020 M NaCl konsantrasyonunda çalıştığı tespit edilmiştir. Çalışmanın bundan sonrasındaki aşamalarında ise, Kızılırmaktan 2011-2012 dönemlerinde üçer aylık periyotlarla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

4.9.2 *vanA* Geni Taşıyan Bakterilerin Mevsimsel Populasyon Yayılımı

Şekil 4.29 ve 4.30'da görüldüğü gibi *vanA* probu için belirlenen optimum koşullar kullanılarak (% 55 formamid ve 0.020 M NaCl) 2011 Ocak-2012 Ekim arasında toplanmış olan su örneklerinde *vanA* geni taşıyan suşlar takip edilmiştir.



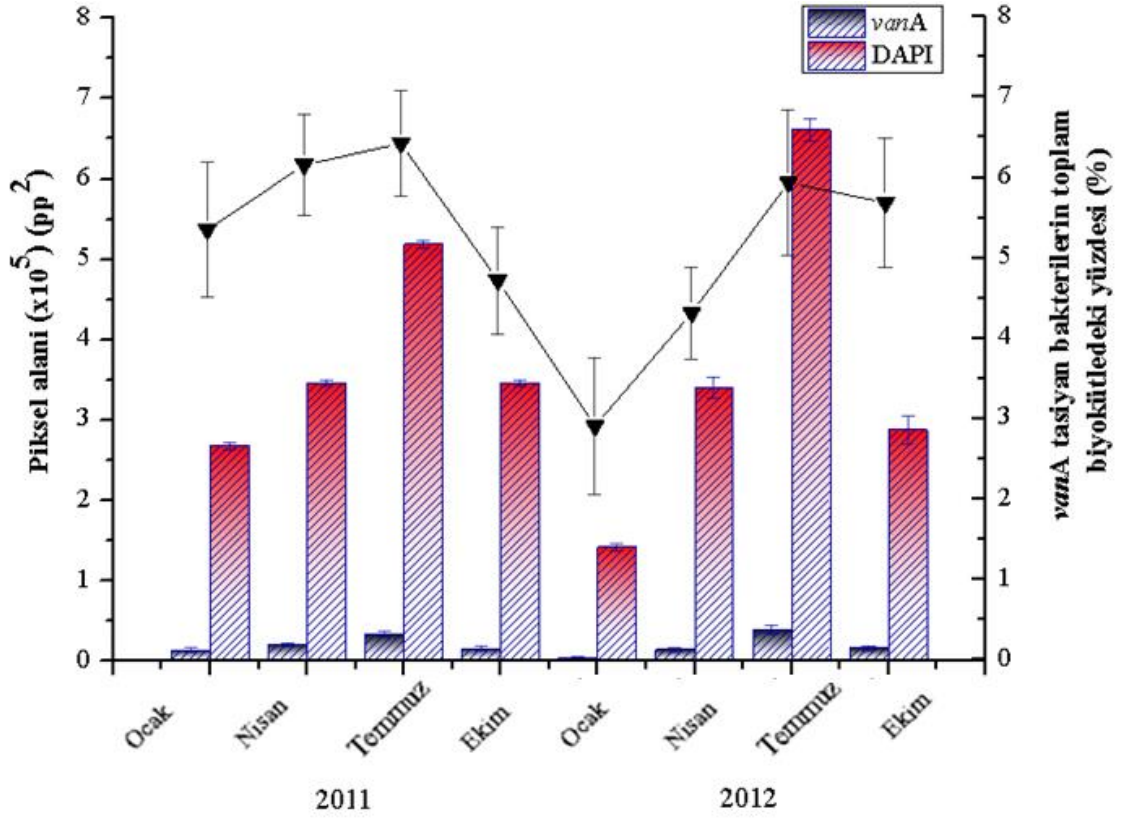
Şekil 4.29. Ocak (a-a₁), Nisan (b-b₁), Temmuz (c-c₁), Ekim (d-d₁) 2011 dönemlerinde alınan su örneklerinde % 55 formamid ve 0.020 M NaCl (c-c₁) konsantrasyonlarında gerçekleşen hibridizasyon. DAPI ile boyanmış toplam hücre populasyonları (a, b, c,d) ve bunlara karşılık gelen saf kültürlerle uygulanan *vanA* probu (a₁, b₁, c₁, d₁). (Bar, 10µm)



Şekil 4.30. 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 *vanA* probu (a₁, b₁, c₁, d₁). (Bar, 10µm)

vanA geni taşıyan suşların populasyon yoğunluğu (%) DAPI ve *vanA* 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 *vanA* geni taşıyan

suşların biyokütle yüzdeleri (%) standart sapma değerleri hesaplanarak belirtilmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. 2011-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde *vanA* geni taşıyan bakterilerin mevsimsel populasyon yayılımı (▼). DAPI ile boyanmış toplam biyokütlenin piksel alanı (■) ve FITC işaretli *vanA* probu ile hibridize olan toplam *vanA* geni taşıyan bakteriler (■). (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

2011 Ekim ayında toplam bakteri populasyonu ($3.46 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^5$ pp²) ve *vanA* geni taşıyan bakterilerin populasyon yoğunluğunun ($0.16 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^5$ pp²) en düşük değerlerde olduğu belirlenmiştir. Ancak 2011 Temmuz ayında toplam bakteri populasyonu ($5.19 \times 10^5 \pm 0.05 \times 10^4$ pp²) ve *vanA* geni taşıyan bakterilerin populasyon yoğunluklarının ($0.33 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5$ pp²) en yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir.

2012 yılı bakteri populasyon yayılımları bakımından 2011 yılı populasyon dağılımı ile benzerlik göstermektedir. 2012 Ocak ayında toplam bakteri populasyonu ($1.42 \times 10^5 \pm 0.04 \times 10^5$ pp²) ve *vanA* geni taşıyan bakterilerin populasyon yoğunluğunun ($0.04 \times 10^5 \pm 0.01 \times 10^5$ pp²) diğer aylara göre en düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. 2012

Temmuz ayında toplam bakteri popülasyonu ($6.61 \times 10^5 \pm 0.14 \times 10^5$ pp²) ve *vanA* geni taşıyan bakterilerin popülasyon yoğunluklarının ($0.39 \times 10^5 \pm 0.06 \times 10^5$ pp²) en yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir.

2011 yılı *vanA* geni taşıyan bakterilerin ortalama yoğunluğu Ocak ayında % 5.35 ± 0.84 , Nisan ayında % 6.16 ± 0.63 , Temmuz ayında % 6.42 ± 0.66 ve Ekim ayında % 4.72 ± 0.67 olarak belirlenmiştir. Ocak, Nisan ve Temmuz aylarında toplam bakteri popülasyon dağılımı göz önüne alındığında *vanA* geni taşıyan bakterilerin popülasyon yayılım oranları arasında gözlenen farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$) belirlenmiştir.

2012 yılı biyokütlerdeki *vanA* geni taşıyan bakterilerin ortalama yoğunluğu Ocak ayında % 2.91 ± 0.85 , Nisan ayında % 4.32 ± 0.57 , Temmuz ayında % 5.94 ± 0.91 ve Ekim ayında % 5.68 ± 0.81 olarak belirlenmiştir. Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında gözlenen ortalama *vanA* geni taşıyan bakterilerin popülasyon 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 *vanA* geni taşıyan bakterilerin yoğunluklarının mevsimsel değişiklik gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0.001$). Ayrıca bu iki yıl için uygulanan Shapiro-Wilk istatistiksel analiz testine göre *vanA* geni taşıyan bakterileri için elde edilen verilerin normal dağılım gösterdiği ($p < 0.05$) tespit edilmiştir.

Yüzey suları, denizler, anaerobik reaktörler, sediment gibi farklı kominitelerdeki bakteri grupları cins ya da tür düzeyinde bile spesifik hedef DNA problemleri dizayn edilerek hedef organizma, bulunduğu ortamdan izole edilmeden belirlenebilmektedir (Amann vd., 2001; Daims vd., 2005; Içgen ve Harrison, 2006a, 2006b; Morozova vd., 2011; Bryukhanov vd., 2011; Yılmaz ve Içgen, 2015). Bazı araştırmacılar FISH yöntemini kullanarak mikroorganizmaların mevsimsel yayılımında başarı sağlamışlardır (Pernthaler vd., 1998; Pinhassi ve Hagström 2000; Klammer vd., 2002). Ancak antibiyotik dirençli bakterilerin *in situ* olarak yüzey sularında takip edilmesine yönelik çalışmaların olmadığı görülmüştür. Sularda antibiyotik dirençli bakterilerin yayılımı hakkında bilgi edinilmesi açısından bu tarz çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu projede FISH tekniği ile spesifik DNA probu kullanılarak yüzey sularında *vanA* antibiyotik direnç geni taşıyan bakterilerin takip edilmesinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir.



5. SONUÇ

Atık sular doğaya bırakılmalarından önce arıtım tesislerinde tüm proseslerinden geçmiş olsalar bile antibiyotik direnç genlerini ve antibiyotiklere dirençli bakterileri barındırabilmektedirler. Bu bağlamda *vanA* geni taşıyan vankomisin gibi glikopeptit antibiyotiklere yüksek seviyede dirençli enterokoklar (VDE) oldukça önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada ırmak suyundan elde edilen örneklerden *vanA* geni taşıyan vankomisin dirençli bakteriler araştırılmıştır. Yapılan ön çalışmalar sonucu 18 izolatın her iki glikopeptit antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. 16s rRNA sekans analizi ile tanımlanan bu glikopeptit dirençli enterokok ve enterokok olmayan izolatların taşıdığı *vanA* gen sekansları arasında % 58-100 homoloji olduğu görülmüştür. *vanA* sıklıkla enterokok ile ilişkili olarak rapor edilsede 4 enterokok (3 *E. faecalis*, 1 *E. faecium*) dışında 14 enterokok olmayan (3 *Staphylococcus*, 8 *Pseudomonas*, 1 *Comomonas*, 1 *Raoultella* ve 1 *Aeromonas*) gibi başka patojen bakteri türlerinde de *vanA* geninin tespit edilmesi, bu genin yayılımına ve varlığına yeni bir ışık tutabilir. Bugüne kadar sulardan vankomisin dirençli *Pseudomonas*, *Comomonas*, *Raoultella* ve *Aeromonas* izole edilemese de farklı kökenden *vanA*'nın gen transferi ile başka patojenlerde bu genin bulunması, doğal çevrede klinik olarak öneme sahip olan *vanA* içeren patojenlerin artmasına neden olmaktadır. Doğal çevrede *vanA*'nın yaygın olarak bulunduğunun tespit edilmesi, enfeksiyonların ve enfekte olan insanlarla olan yayılımın takip edilmesini kolaylaştıracaktır. Ayrıca tüm dirençli izolatlarda *vanA* geni tarafından kodlanan D-alanin-D-laktat ligaz enziminin varlığı western blot yöntemi ile gösterilmiştir. *vanA* geninin yüzey sularındaki yayılımı ve bunun izlenmesi, dirençli bakterilerin çevreye ve insana olan potansiyel zararı hakkında bilgiler sunabilmektedir. Bu amaçla Vector NTI Express yazılımı kullanılarak *Enterococcus faecium* pVEF1 ve pVEF2 plasmidlerinin 909 bp'lik BamHI-ClaI kısmından 25-mer'lik bir oligonükleotit DNA probu tasarlanmıştır. Dizayn edilen probun 46°C, % 55 formamid ve 0.020 M NaCl hibridizasyon koşullarında *vanA*-pozitif *Enterococcus faecalis* için yüksek seviyede ayırt edici olduğu tespit edilmiştir. Aynı hibridizasyon koşulları kullanılarak ırmak suyundan alınan örnekler FISH yöntemi kullanılarak floresan mikroskop ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, yeni dizayn edilen *vanA* spesifik oligonükleotit DNA probunun yüzey sularındaki vankomisin dirençli bakterilerin izlenmesinde yüksek oranda ayırt edici ve kantitatif bir araç olduğunu göstermiştir. Arıtılmış atık suların tekrar kullanımından dolayı antibiyotik direnç genleri ve antibiyotik dirençli bakteriler yüzey sularına karışmakta ve insan sağlığı için risk oluşturmaktadır. Bu nedenle yüzey suları, direnç genlerinin yayılımı nedeniyle sadece *vanA* taşıyan enterokoklar için değil, aynı zamanda enterokok olmayan bakteriler için de sıcak bölgeler oluşturmakta ve özel bilimsel yaklaşımlar gerektirmektedir.

Sonuç olarak bu patojenlerin *vanA* sekansı, antibiyotik dirençliliği, genetik çeşitliliği ve su örneklerindeki varlığı, farklı biyokimyasal ve moleküler metodlarla incelenmektedir. Ancak yüzey sularında *vanA* geninin enterokoklar dışında başka bakterilerde de bulunup bulunmadığını gösteren ve *vanA* hedefli floresan işaretli oligonükleotid prob lar kullanılarak floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi ile yüzey *vanA* genini taşıyan bakterilerin takip edilmesine yönelik literatürde herhangi bir çalışma, yaptığımız araştırma sonucu bulunamamıştır. Bu projenin özgün yönü *vanA* spesifik prob kullanılarak vankomisin dirençli bakterilerin kültüre alınmasına gerek kalmadan yüzey sularında takiplerinin yapılması için floresan *in situ* hibridizasyon yönteminin kullanılmış olmasıdır.

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.

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.

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.

Amann, R., Fuchs, B.M., Behrens, S. 2001. “The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation”, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 231–236.

Araújo, C., Torres, C., Silva, N., Carneiro, C., Gonçalves, A., Radhouani, H., et al. 2010. “Vankomisin resistant enterococci from Portuguese waste water treatment plants”, J. Basic Microbiol., 50, 605–609.

Arthur, M., Molinas, C., Dutka-Malen, S., Courvalin, P. 1991. “Structural relationship between vancomycin resistance protein *vanH* and 2-hidroxykarboxylic acid dehydrogenase”, Gene, 103, 133-134.

Auerbach, E.A., Seyfried, E.E., McMahon, K.D. 2007. “Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants” Water Res., 41, 1143–1151.

Başustaoğlu, A. 2004. Enterokoklarda Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları ve Direnç Sorunu, Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara, pp. 141-158.

Batt, A.L, Snow, D.D., Aga, D.S. 2006. “Occurrence of sulphonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA”, Chemosphere, 64, 1963–1971.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I. 2000.”GenBank”, Nucleic Acids Res. 28, 15–18.

Berzeg, D., 2005. Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnci, Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci Ve E Test İle Vankomisin Mik Değerlerinin Değerlendirilmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi.

Bhatt, P. 2014. “Detection of glycopeptide resistance genes in enterococci by multiplex PCR”, Medical Journal Armed Forces India, XXX, 1-5

Biavasco, F., Foglia, G., Paoletti, C., Zandri, G., Magi, G., Guaglianone, E., Sundsfjord, A., Pruzzo, C., Donelli, G., Facinelli, B. 2007. “*vanA*-type enterococci from humans, animals, and food: Species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants”, Appl. Environ. Microbiol., 73, 10, 3307-3319.

Billot-Klein, D. et al., 1994. “Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant *vanB*-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. “, J. Bacteriol., 176, 2398–2405.

Boczek, L.A., Rice, E.W., Johnston, B., Johnson, J.R. 2007. "Occurrence of antibiotic-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clonal group a in waste water effluents", Appl. Environ. Microbiol, 73, 4180–4184.

Boyce, J.M., Mermel, L.A., Zervos, M.J., et al. 1995. "Controlling vancomycin-resistant enterococci", Infect. Control Hosp. Epidemiol., 16, 634-637.

Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. 2007. "Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology", 24th ed. NY, Lange Medical Books Mc Hraw Hill Inc., 233-248.

Bugg, T.D., Wright, G.D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., Walsh, C.T. 1991. "Molecular basis for vankomisin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins *vanH* and *vanA*", Biochemistry, 30, 10408–10415.

Bryukhanov, A.L., Korneeva, V.A., Kanapatskii, T.A., Zakharova, E.E., Men'ko, E.V., Rusanov, I.I., Pimenov N.V. 2011. "Investigation of the sulphate reducing bacterial community in the aerobic water and chemocline zone of the Black Sea by the FISH technique", Microbiol. 80, 112–120.

Çetinkaya, F., Elal, Muş T., 2010. "Yararları ve riskleriyle gıda kaynaklı enterokoklar", Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med., 29, 1, 77-83.

Çiçekler, Tok, N., 2006. "Enterokoklarda Vankomisin Direnci (Uzmanlık Tezi)" Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği İstanbul.

CLSI, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement.

Çöleri, A., Çökmüş C, 2008. "Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları", Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Derg., 65 (2), 87-96.

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.

Daims, H., Stoecker, K., Wagner, M. 2005. Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of prokaryotes, p 213–239. In: Advanced methods in molecular microbial ecology, Osborn AM, Smith CJ, (ed.). Bios-Garland, Abingdon, UK.

Davies, J., 2006. “Where have all the antibiotics gone? “, Can J. Infect. Dis. Med. Microbiol., 17, 287–290.

Demirel, S., 2012. “Molecular techniques for determining microbial diversity in treatment systems”, Sigma, 30, 179-192.

Depardieu, F. et al., 2007. “Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression“, Clin. Microbiol. Rev., 20, 79–114.

Donskey, C.J., Rice, L.B. 2000. “Vancomycin resistance in enterococci” , In: Moellering RC Jr, ed. Emerging Pathogens: Implications for the Future. Chicago: PharmaLibri Publ Inc., 5-32.

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.

Ferreira, Da Silva, M., Tiago, I., Verissimo, A., Boaventura, R.A.R., Nunes, O.C., Manaia, C.M. 2006. “Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban waste water treatment plant” FEMS Microbiol. Ecol, 55, 322–329.

Guardabassi, L., Dalsgaard, A. 2004. “Occurrence, structure and mobility of Tn 1546-Like elements in environment isolates of vancomycin-resistant enterococci”, Appl. Environ. Microbiol., 70, 984-990.

Gültekin, M., Günseren, F. 2000. “Vankomisin dirençli enterokoklar”, Hastane İnfek Derg., 4, 195-204.

Handwerger, S. et al., 1994. “Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate“, J. Bacteriol., 176, 260–264.

Hayden, M.K., Trenholme, G.M., Schultz, J.E., et al. 1993. “*In vivo* development of teicoplanin resistance in a *vanB Enterococcus faecium* isolate”, J. Infect Dis., 167, 1224-1227.



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.

Hughes, D. 2003. "Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance", *Nat. Rev. Genet.*, 4, 432-441.

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.

Icgen, B., Harrison, S.T.L. 2006a. "Exposure to sulfide causes populations shifts in sulfate-reducing consortia", *Res. Microbiol.* 157, 784–791.

Icgen, B., Harrison, S.T.L. 2006b. "Identification of population dynamics in sulfate-reducing consortia on exposure to sulfate", *Res. Microbiol.* 157, 922–927.

Icgen, B., Yilmaz, F. 2015. "Design a *cadA*-targeted DNA probe for screening of potential bacterial cadmium biosorbents", *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-015-5810-y.

Jayaratne, P., Rutherford, C. 1999. "Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR", *J. Clin. Microbiol.* 37, 2090-2092.

Kaye, K.S., Fraimow, H.S., Abrutyn, E. 2000. "Antibacterial Therapy. Pathogens resistant to antimicrobial agents" *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 14, 293-314.

Ke, D. et al. 1999. "Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci", *J. Clin. Microbiol.* 37, 3497–3503.

Kemper, N. 2008. "Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment", *Ecol Indic.* 8, 1-13.

Klammer, S., Posh, T., Sonntag, B., Griebler, C., Mindl, B., Psenner, R. 2002. "Dynamics of bacterial abundance, biomass, activity, and community composition in the oligotrophic Traunsee and the Traun River Austria", *Water, Air Soil Poll.* 2, 137–163.

- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda W.M., Srechenberger, P.C., Winn, W.C. 1992. "The gram positive cocci part 2: Streptococci and *Streptococcus*-Like Bacteria", *Diag. Microbiol.*, 4, 431-466.
- Kumar, G., Singla, R., Kumar, R., 2010. "Plasmid associated anthracene degradation by *Pseudomonas* sp. isolated from filling station site", *Nature and Science*, 8(4), 89-94
- 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.
- 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. Sci.*, 6, 651–663.
- Mainous, M.R., Lipsett, P.A., O'Brien, M. 1997. "Enterococcal bacteremia in the surgical intensive care unit. Does vancomycin resistance affect mortality? ", *The Johns Hopkins SICU Study Group. Arch Surg.*, 132, 76-81.
- 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", *Sjst. Appl. Microbiol.*, 15, 593–600.
- Miele, A., Bandera, M. & Goldstein, B.P. 1995. "Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in enterococci and to study gene organization in *vanA* isolates", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39,1772–1778.
- Murray, B.E. 1990. "The life and times of the *Enterococcus*", *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, 46-65.
- Murray, B.E. 2000. "Vancomycin-resistant enterococcal infections", *The New England J. Medic.*, 342, 710-721.
- Muyzer, G. and Smalla, K., 1998. "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology", *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127-141.

Noble, W.C., Virani, Z., Cree, R.G. 1992. "Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*", FEMS Microbiol. Lett., 72, 195-198.

Perichon, B., Courvalin, P. 2009. "*vanA*-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*", Antimicrob. Agents Chemother., 53 , 4580–4587.

Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R., Amann, R. 1998. "Seasonal community and population dynamics of pelagic Bacteria and Archaea in a high mountain lake", Appl. Environ. Microbiol. 64, 4299–4306.

Pinhassi, J., Hagström, A. 2000. "Seasonal succession in marine bacterioplankton", Aquat. Microb. Ecol. 21, 245–256.

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.

Roghmann, M.C., McCarter, R.J., Jr, Brewrink, J., Cross, A.S., Morris, J.G. Jr. 1997. "*Clostridium difficile* infection is a risk factor for bacteremia due to vancomycin resistant enterococci (VRE) in VRE-colonized patients with acute leukemia", Clin. Infect. Dis., 25, 1056-1059.

Roy, P.H. 1999. "Horizontal transfer of genes in bacteria." Microbiol. Today, 26, 168–170.

Şardan, Y.Ç. 2004. "Enterokoklarda Direnç Sorunu; Yeni Ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar", Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara, 10-16.

Tamura, K. et al., 2013. "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", Mol. Biol. Evol., 30, 2725–2729.

Teixeira, L.M., Facklam, R.R. 2003. “*Enterococcus*“, in: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, DC: ASM Press, pp. 422-433.

Teixeira, L.M., Siqueira-Carvalho, M.G., Facklam, R.R. 2007. “*Enterococcus*, In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (Eds)”, *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC, pp. 430-442.

Uttley, A.H., Collins, C.H., Naidoo, J., George, R.C. 1988. “Vancomisin-resistant enterococci” *Lancet*, 1, 57–58.

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.

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.

Weigel, L.M., Donlan, R.M., Shin, D.H. et al. 2007. “High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 231–238.

Werner, G., 2012. Current trends of emergence and spread of vancomycin-resistant enterococci, *Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium*, pp.1–53.

Winn, W. Jr, Allen, S., Janda, W., et al. 2006. *Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 672-764.

Wood, M.J. 1996. “The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 37, 209-222.

Zeckel, M.L. 1997. “A closer look at vancomycin, teicoplanin and antimicrobial resistance”, *J. Chemother.*, 9, 311-335.

Zolgharnein, H., Karami, K., Assadi, M.M. and Sohrab, A.D. 2010. “Molecular characterization and phylogenetic analyses of heavy metal removal bacteria from the Persian Gulf”, *Biotechnol.*, 9, 1-8.



Proje Kapsamında Yapılan Toplantılarda Sunulan Bildiriler

- 1- Nakipoglu M, Yilmaz F, and Içgen B, “Vancomycin resistance genes reservoired and disseminated in surface waters”. 1st International Caparica Conference in Antibiotic Resistance, 26–28 January 2015, Lisbon, Portugal.
- 2- Nakipoglu M, Yilmaz F, and Içgen B, “Western blot analysis used to detect van-encoded d-alanine-d-lactate ligase in surface water isolates”. The International Conference on Civil and Environmental Engineering, 20–23 May 2015, Nevsehir, Turkey.
- 3- Nakipoglu M, Yilmaz F, and Içgen B, “*In situ* monitoring of vancomycin resistance genes in surface waters by oligonucleotide probes”. ICOEST 2015 International Conference on Environmental Science and Technology, 09-13 September 2015, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

Proje Kapsamında Yapılan veya Hazırlanan Yayınlar

- 1- Nakipoglu M, Yilmaz F, and Içgen B (2015), *vanA*-targeted oligonucleotide DNA probe designed to monitor vancomycin- and teicoplanin-resistant bacteria in surface waters. (Submitted to Environmental Monitoring and Assessment)
- 2- Nakipoglu M, Yilmaz F, and Içgen B (2015), *vanA* gene harboring enterococcal and non-enterococcal isolates expressing high level vancomycin and teicoplanin resistance reservoired in surface waters. (Submitted to Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. BÜLENT İÇGEN
Proje No:	114Z973
Proje Başlığı:	Vankomisin Direnç Genlerinin Dna Problemleri İle Yüzeysel Sularında İn Situ Olarak Takip Edilmesi
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:	01/02/2015 - 01/02/2016
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	25898.03
Öz:	<p>Antibiyotikler tıp ve veterinerlikte mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesinde veya tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Metabolize edilmeleri sonucu evsel ve hastane atık suları aracılığı ile yüzeysel ve yeraltı sularına karışabilmektedirler. Atık suların içme su akiferlerine bulaşması, içme suyu standartları açısından ciddi problemler oluşturmakta ve sağlıklı içme suyu sağlanmasını zora sokmaktadır. Bu nedenle, atık suların geri dönüşüm sürecinde antibiyotik dirençli bakterilerin ve antibiyotik direnç genlerinin arıtma sularında bulunması olasılığı kaygı vericidir. Özellikle toplum sağlığı açısından öne çıkan antibiyotiklere yönelik gelişen direnç genlerinin ve bu genleri taşıyan mikroorganizmaların yüzeysel sularına bulaşması ve buna bağlı olarak bu sulara yer alan olası diğer patojen mikroorganizmalara aktarılma olasılığı ciddi riskler taşımaktadır. Bu nedenle yüzeysel sularındaki bu antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi ve takip edilmesi sözkonusu risklere karşı olası tedbirlerin alınması açısından önemli veriler sağlayacaktır. Günümüzde, toplum sağlığı açısından öne çıkan antibiyotiklerden biri olan vankomisin, gram-pozitif bakterilere karşı diğer antibiyotiklerin yetersiz kaldığı veya alerji oluşturduğu durumlarda kullanılan glikopeptid yapılı bir bileşiktir. Özellikle enterokok cinsi bakterilerde vankomisin direncinin ortaya çıkmaya başlaması dünya çapında ciddi bir antimikrobiyal direnç tehlikesi olarak ele alınmaktadır. Geçtiğimiz on yıl boyunca vankomisin dirençli enterokokun (VRE) ciddi bir hastane patojeni olarak kendini göstermiş olması bunun en önemli göstergesidir. Bu nedenle önerilen bu proje ile vankomisin direnç genlerinin (van genleri), bu genlere yönelik olarak hazırlanacak olan DNA problemleri ile yüzeysel sularında in situ olarak izlenmesi, bu genleri içeren enterokok ve/veya enterokok olmayan bakterilerin belirlenmesi ve söz konusu genlerin diğer bakterilere aktarılmasında yüzeysel sularının rolüne yönelik bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Böylece van genlerini taşıyan bakterileri yüzeysel sularında in situ olarak tespit ve takip edilmesinin yanı sıra, VRE dışında van geni içeren patojen ve/veya patojen olmayan bakterilerin de belirlenmesi ile yüzeysel sularının van genlerinin yayılımındaki etkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Vankomisin, van genleri, vankomisin direnci, VRE, yüzeysel suları
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır