

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



Myroides Cinsi İzolatların Tanımlanması ve Moleküler Tiplendirmesi

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuba Eltimur Karatoprak

TEZ DANIŞMANI

Prof.Dr. Alper Akçalı

Çanakkale, 2023

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

Myroides Cinsi İzolatların Tanımlanması ve Moleküler
Tiplendirmesi

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuba Eltimur Karatoprak

TEZ DANIŞMANI

Prof.Dr. Alper Akçalı

Çanakkale, 2023

Bu çalışma ÇOMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TTU-2022 4032 nolu proje ile desteklenmiştir.

2. TEŞEKKÜR

Çanakkale’de asistanlığıma başladığım ilk günden beri beni güler yüz ve iyi niyetle karşılayan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı üyelerimiz; başta Prof. Dr. Müşerref Otkun, Dr. Öğr. Üyesi Aslı Özdemir ve Prof. Dr. Ahmet Ünver; tüm öğretim üyelerine emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tezimin konu seçiminden, uygulanması ve yazılmasına kadar her kademesinde bana yalnız olmadığımı gösteren ve yapabileceğime inanmamı sağlayan; sorduğum her soruya kısıtlı ve kıymetli vaktini ayırıp, bıkmadan uzun uzun cevap veren; tecrübelerinden yararlanmakla gurur ve onur duyduğum sayın Prof. Dr. Alper Akçalı’ya teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimin süresince tek asistan olarak çalıştığım dönemin sonrasındaki süreçte tanıştığım, baştan beri hep olsaydılar dediğim, birlikte çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarım; Arş. Gör. Dr. Çisil Şeyma Özel Davulcu, Arş. Gör. Dr. Sinem Durmaz, Arş. Gör. Dr. Ayça Kulalıgil, Arş. Gör. Dr. Hülya Parimli’ye anlayışları, yardımseverlikleri ve samimiyetlerinden ötürü teşekkür ederim.

Laboratuvarımızda birlikte çalışmaktan büyük mutluluk ve gurur duyduğum; başta Uzm. Bio. Mümin Sargın, Bio. Betül Koçer, Serpil Kaya olmak üzere; değerli tüm personelimize teşekkürlerimi borç bilirim.

Tam genom analizi verilerinde PathoFact veri işleme hattı ile veri analizimin yapılmasında yardımcı olan ÇOMÜ Tıp Fakültesi öğrencisi Yusuf Tarık Balta’ ya teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, bana maddi ve manevi karşılıksız, sınırsız yardımları olan anneciğim Nimet Eltimur’a; babam Saim Eltimur’a; bizim ailemizin en değerli parçası olan anneannem Emine Kandemir’e teşekkürlerimi, minnet duygularımı sunmaktan onur duyarım.

Kıymetli eşim, çalışmalarımnda beni yüreklendiren; yardımcı olmaya çalışan, tecrübelerini benimle paylaşan, sıkıntılı dönemlerde benim iyi olmama gayret eden Dr. Kadircan Karatoprak’ a da teşekkürlerimi sunarım.

Hayatta bana öyle güzel ve tarifsiz birşeyi; anneliği öğreten, birlikte büyüdüğüm bebeğim, dünyamıza hoş gelmiş Melek; arkadaşım... Sevgili bebeğim Tarık Eren Karatoprak, bana gösterdiğin anlayış ve özveriden dolayı sana da çok teşekkür ederim. Daha dünyamıza doğmamış güzel yavrum, sen de çalışmamızın tüm laboratuvar sürecinde ve sonrasında benimleydin, ömrün bereketli, esenlikli, aydınlık olsun.

Tüm ismini saydığım ve sayamadığım, hayatımdan geçmiş iyi kalpli insanlar; hepinizi iyi ki tanıdım, iyi ki varsınız. Güzel günlerde hep birlikte olmak temennisi ile...

Dr.Tuba Eltimur Karatoprak

3. ÖZET

***Myroides* Cinsi İzolatların Tanımlanması ve Moleküler Tiplendirmesi**

Myroides cinsi, çoğunlukla fırsatçı patojendir. Nadir rastlanan *Myroides* cinsi bakteriler ile literatürde oldukça sınırlı sayıda yayın mevcuttur.

Amaç: Nadir rastlanan *Myroides* türlerinin 16S rDNA yöntemi ile tanımlanması, örneklerin klonal ilişkilerinin RAPD PCR yöntemi ile belirlenmesi, olası bir salgının araştırılması, ilk ve son elde edilmiş izolatta tam genom analizi yapılarak genetik karakterizasyon ve zamanla değişimin belirlenmesi, özellikle ülkemiz tam genom analizi verisinin artırılmasıdır.

Gereç- Yöntem: Mart 2018'den Kasım 2021'e kadar Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hastanesi kliniklerinden laboratuvarımıza gelen rutin idrar kültürü örneklerinden 31 adet *Myroides* sp. izolatı elde edilmiş olup, bunlara 16S rDNA PCR ile moleküler tanımlama yaptık. RAPD PCR ve tam genom analizi ile izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi araştırdık. İlk ve son izolata tam genom analizi yapıp direnç genlerini, virulans faktörlerini tespit ettik.

Bulgular: Çalışmamızdaki üç adet izolat hariç diğerleri yoğun bakım ünitelerinden elde edilmiş 31 adet izolatın 26 tanesini *M.odoratimimus*, 5 tanesini *M.odoratus* olarak tanımladık. Üç adet izolat hariç tüm izolatlar test edilen tüm antibiyotiklere dirençliydi. RAPD ile tiplendirme için yeterli sayıda bant elde edemedik. Tam genom analizi ile ilk ve son izolatın çok yakın klondan kaynaklandığını tespit ettik. Tam genom analizi verileriyle her iki izolatımızda GlmU, capL, clpP, sodB, ureA, ureB, ureG, eno; multidrug rezistan protein MdtL, MdtE, Stp, MdtB, MdtC, NorM ve MdtA; kolistin rezistan protein EmrA ve EmrB; putatif multidrug rezistan ABC transporter ATP-binding/permeaz protein Yhel; linearmisin rezistan permeaz protein LnrN; fosmidomisin rezistan protein;

tetrasiklin rezistan protein sınıf C ve tetrasiklin rezistan protein sınıf C tetA_2; antiseptik rezistan protein qacA; metisilin rezistan regulator protein Mecl proteinlerini; korunmuş virulans faktör B (cvfB); ayrıca toksin ParE1, antitoksin ParD1, serin/treonin-protein kinaz toksin HipA bölgelerini kodlayan genleri saptadık. Ayrıca *ermF*, *sul2*, *floR*, *ereD*, *tetX*, *OXA-347*, *aadS*, *MUS-1*, *smeC*, *mcr-1.4*, *poxtA*, *aac(6')-IY*, sülfometazin antibiyotik direnç genlerini tespit ettik.

Sonuç: *Myroides* türleri çoğul ilaca dirençli bakterilerdir. Salgın tespitinde, elde MALDI-TOF yoksa öncelikle tür ayırımında moleküler yöntemler kullanılmalıdır. Tür ayırımı yaparak, bakterileri İki farklı türde tanımladık, bu sebeple hastanede dolaşımda olan iki farklı *Myroides* kökeni olduğunu tespit ettik. RAPD PCR izolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılmasında ucuz ve kolay bir yöntem olarak önerilse de çalışmamızda standardizasyonunun oldukça zor olduğunu ve ayırım gücünün düşük olduğunu gördük. İlk ve son izolatımızın tam genom analizi ile iki izolatın çok benzer olduğunu saptadık. Tespit ettiğimiz klonun, hastanede aralıklı olarak dolaştığını ve yoğun bakım ünitelerinde, komorbiditesi mevcut hastalarda idrar yollarında enfeksiyon ve kolonizasyona sebep olduğunu düşünmekteyiz. *Myroides* türleri ile olası salgınların incelenmesinde yeni nesil dizilemenin kullanıldığı ileri araştırmalara gerek vardır.

Anahtar Kelimeler: *Myroides* spp., tam genom analizi, RAPD PCR, moleküler tiplendirme.

4. ABSTRACT

Identification and Molecular Typing of *Myroides* Isolates Isolated in Our Laboratory

The genus *Myroides* is mostly opportunistic pathogen. There are a very limited publications in the literature on rare bacteria of the genus *Myroides*.

Aim: Identification of rare *Myroides* species by 16S rDNA method, determination of clonal relationships of samples by RAPD PCR method, investigation of a possible epidemic, genetic characterization and determination of change over time by performing whole genome analysis on the first and last isolate, especially increasing the data of whole genome analysis in our country.

Material-Method: From March 2018 to November 2021, 31 *Myroides* sp. we performed molecular identification of the isolate with 16S rDNA PCR. We investigated the clonal association between isolates by RAPD PCR and whole genome analysis. We conducted a whole genome analysis of the first and last isolate and detected for resistance genes and virulence factors.

Findings: We identified 26 of the 31 isolates in our study as *M.odoratimimus* and 5 as *M.odoratus*. We detected antibiotic resistance profiles as resistant to all tested antibiotics except three isolates. Except for three isolates, we obtained all samples from intensive care units. We could not obtain enough bands for typing with RAPD. By whole genome analysis, we determined that the first and last isolate originated from a very close clone. With whole genome analysis data we detected the genes encoding regions in both our isolates; GImU, capL, clpP, sodB, ureA, ureB, ureG, eno; multidrug resistance proteins MdtL, MdtE, Stp, MdtB, MdtC, NorM and MdtA; colistin resistance proteins EmrA and EmrB; putative multidrug resistance ABC transporter ATP-binding/permease protein Yhel; linearmicin resistance permease protein LnrN; fosmidomicin resistance protein; tetracycline resistance protein class C and tetracycline resistance protein class C tetA_2; antiseptic resistance protein qacA; methicillin resistance

regulatory protein Mecl proteins; conserved virulence factor B (cvfB); also the gene encoding regions toxin ParE1, antitoxin ParD1, serine/threonine-protein kinase toxin HipA. We determined at the same time *ermF*, *sul2*, *floR*, *ereD*, *tetX*, *OXA-347*, *aadS*, *MUS-1*, *smeC*, *mcr-1.4*, *poxA*, *aac(6')-IY*, sulfomethazine antibiotic resistance genes.

Conclusion: *Myroides* species are multidrug resistant bacteria. If MALDI-TOF is not available, molecular methods should be used primarily for species differentiation. By distinguishing the species, we identified the bacteria in two different species, so we determined that there were two different strains of *Myroides* circulating in the hospital. RAPD PCR is a very inexpensive and easy method to investigate the clonal relationship between isolates in possible epidemic situations; however, in our study, we found that its standardization was quite difficult and the discrimination power was low. By whole genome analysis of our first and last isolates, we determined that the two isolates were very similar. We think that the clone we detected circulates intermittently in the hospital and causes infection and colonization in the urinary tract in patients with comorbidities in intensive care units. Further research using next-generation sequencing is needed to examine possible outbreaks with *Myroides* species.

Keywords: *Myroides* spp., whole genome analysis, RAPD PCR, molecular typing.

5. İÇİNDEKİLER

| | | |
|-------|--|-----------|
| 1. | İÇ KAPAK..... | i |
| 2. | TEŞEKKÜR..... | ii |
| 3. | ÖZET..... | iv |
| 4. | ABSTRACT..... | vi |
| 5. | İÇİNDEKİLER..... | viii |
| 6. | KISALTMALAR..... | x |
| 7. | TABLolar..... | xii |
| 8. | RESİMLER..... | xiv |
| 1. | GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. | GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1 | <i>Myroides</i> spp. | 2 |
| 2.1.1 | Tarihçe | 2 |
| 2.1.2 | Mikrobiyolojik Özellikler | 2 |
| 2.1.3 | Oluşan Enfeksiyonlar..... | 3 |
| 2.1.4 | Antibiyotik Direnci | 4 |
| 2.1.5 | Patogenez ve Virulans..... | 9 |
| 2.1.6 | Mikrobiyolojik Tanı..... | 11 |
| 2.2 | Hastane Enfeksiyonları..... | 11 |
| 2.3 | Hastane Enfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji Yöntemlerinin Yeri ve Önemi:..... | 12 |
| 2.4 | 16SrDNA PCR Yöntemi..... | 14 |
| 2.5 | RAPD PCR..... | 16 |
| 2.6 | Yeni Nesil Dizileme..... | 18 |
| 3. | GEREÇ VE YÖNTEM..... | 23 |
| 3.1 | İzolatların Seçimi ve Örneklerin İşlenmesi..... | 23 |
| 3.2. | Bakterilerden DNA Ekstraksiyonu | 23 |
| 3.3 | 16S rDNA PCR Yöntemi ile İzolatların Moleküler Tiplendirilmesi ve İsimlendirilmesi..... | 25 |
| 3.4 | Agaroz Jel Elektroforezi | 25 |
| 3.5 | Sanger Sekanslama | 26 |
| 3.6 | RAPD PCR ile Örneklerin Filogenetik İlişkinin Araştırılması | 27 |
| 3.7 | İlk ve Son İzolatın Tam Genom Analizi | 29 |
| 3.7.1 | Kütüphane Hazırlama | 29 |
| 3.7.2 | Kütüphane Oluşturma ve Kalite Kontrol | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7.3 Sıralama..... | 30 |
| 3.7.4 Yeniden Sıralama Adımları | 30 |
| 3.7.5 İzolatların Tam Genom Dizilerinde Yapılan analizler..... | 30 |
| 3.7.5.1 İzolatların Kalite Kontrol (QC) Raporu | 30 |
| 3.7.5.2 Consensus Dizilimi Oluşturduktan Sonraki İşlemler | 30 |
| Gen-Protein Sentezi İlişkisinin Gösterilmesi (Annotation Oluşturma) .. | 30 |
| Online Veritabanları Sonuçlarının Karşılaştırılması | 30 |
| Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Saptanması | 31 |
| İzolatların ANI Raporunun Oluşturulması | 31 |
| SNP Analizi | 31 |
| 3.7.6 İzolatların GenBank Kaydının Yapılması ve Erişim Numaralarının Alınması | 31 |
| 4. BULGULAR | 32 |
| 4.1 16S rDNA PCR Yöntemi ve Sanger Sekans Analizi ile İzolatların İsimlendirilmesi..... | 32 |
| 4.2 RAPD PCR ile İzolatlar Arasındaki İlişkinin İncelenmesi | 37 |
| 4.3. İlk ve Son İzolatın Tam Genom Analizi | 43 |
| 4.3.1. İzolatların Kalite Kontrol (QC) Raporu | 43 |
| 4.3.2. Consensus Dizilimi Oluşturduktan Sonraki İşlemler | 44 |
| Gen-Protein Sentezi İlişkisinin Gösterilmesi (Annotation Oluşturma) | 44 |
| Online Veritabanları Sonuçlarının Karşılaştırılması | 47 |
| Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Saptanması | 48 |
| İzolatların ANI Raporunun Oluşturulması | 53 |
| SNP Analizi | 54 |
| 4.3.3 İzolatların GenBank Kaydının Yapılması ve Erişim Numaralarının Alınması | 58 |
| 5. TARTIŞMA..... | 59 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 66 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 69 |

6. KISALTMALAR

| | |
|--------------------|--|
| ADG | : Antibiyotik direnç geni |
| AFLP-PCR | : Amplified Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction |
| AP-PCR | : Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction |
| ATCC | : The American Type Culture Collection |
| bp. | : Baz çifti, base pair |
| BSA | : Bovine Serum Albumin |
| CDC | : Centers for Disease Control |
| ÇİD | : Çok ilaca dirençli |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| EMB | : Eosin Methylene Blue Agar |
| GI | : Genomik ada |
| HE | : Hastane enfeksiyonu |
| HGT | : Horizontal gen transferi |
| MALDITOF MS | : Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry |
| MLST | : Multi locus sequence typing |
| MLVA-PCR | : Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis |
| NÜSE | : Nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonu |
| PCR | : Polimeraz chain reaction |
| PFGE | : Pulsed-Field Gel Electroforesis |
| PI | : Patojenite adası |
| RAPD | : Randomly Amplified Polimorphic DNA |

| | |
|-----------------|--|
| RAPD-PCR | : Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction |
| REP-PCR | : Repetitive Element Sequence-based PCR |
| RFLP | : Restriction Fragment Length Polymorphism |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| rRNA | : Ribozomal ribonükleik asit |
| SLST | : Single Locus Sequence Typing |
| Spp. | : Türler |
| THSK | : Türkiye Halk Sağlığı Kurumu |
| ÜSE | : Üriner sistem enfeksiyonu |
| VİH | : Veri işleme hattı (pipeline) |
| YND | : Yeni nesil dizileme |

7. TABLOLAR

| | |
|---|----|
| Tablo 2.1. <i>Myroides</i> spp. izolatlarının karakteristik mikrobiyolojik özellikleri | 3 |
| Tablo 2.2. Gunzer ve arkadaşlarının 43 adet <i>M. odoratimimus</i> izolatında % duyarlılık oranları..... | 8 |
| Tablo 2.3. Gunzer ve arkadaşlarının 16 adet <i>M. odoratus</i> izolatında % duyarlılık oranları | 8 |
| Tablo 2.4. Hastane enfeksiyonları etkenlerini tiplendirme amacıyla kullanılan yöntemler | 14 |
| Tablo 2.5. 16S rRNA ve 16S rDNA özellikleri | 15 |
| Tablo 4.1. İzolatlarımızın GenBank erişim numaraları..... | 33 |
| Tablo 4.2. <i>Myroides odoratimimus</i> izolatları ve hastaların demografik özellikleri dağılımı..... | 34 |
| Tablo 4.3. <i>Myroides odoratus</i> izolatları ve hastaların demografik özellikleri dağılımı..... | 36 |
| Tablo 4.4. Hastalardan elde ettiğimiz <i>Myroides odoratimimus</i> izolatları ve özellikleri..... | 41 |
| Tablo 4.5. Hastalardan elde ettiğimiz <i>Myroides odoratus</i> izolatları ve özellikleri..... | 42 |
| Tablo 4.6. CGE ResFinder-4.1 aracı ile 1 ve 31 nolu izolatın dirençli olduğu ilaç sınıfları, antibiyotik direnç genleri ve genlerin GenBank erişim numaraları..... | 48 |
| Tablo 4.7. 1 nolu izolatın KmerResistance-2.2 sunucusu raporu sonuçları..... | 49 |
| Tablo 4.8. 31 nolu izolatın KmerResistance-2.2 sunucusu raporu sonuçları.... | 49 |
| Tablo 4.9. CARD online aracı ile 1 ve 31 nolu izolatın dirençli olduğu ilaç sınıfları, antibiyotik direnç mekanizması ve direnç genleri..... | 50 |
| Tablo 4.10. Pathofact VİH ile 1 ve 31 nolu izolatın dirençli olduğu ilaç sınıfları, direnç mekanizması ve direnç genleri..... | 53 |
| Tablo 4.11. İzolatlarımızın ANI Calculator raporu..... | 54 |

Tablo 4.12. *Myroides odoratimimus* 1 ve 31 numaralı izolatların GenBank Bioproject erişim numaraları.....58



8. RESİMLER

| | |
|---|----|
| Resim 2.1. <i>Myroides</i> cinsi bakterilerin %5 koyun kanlı agar besiyerinde görünümü..... | 2 |
| Resim 3.1. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi | 26 |
| Resim 4.1. 16S rDNA PCR ürünlerinin elektroforez sonrası görüntülerinin alınması..... | 32 |
| Resim 4.2. <i>M.odoratus</i> ile OPA-10 ve OPB-15 primerleriyle gradient PCR..... | 37 |
| Resim 4.3. OPA-10 primeri ile <i>M.odoratimimus</i> türüyle RAPD-PCR | 38 |
| Resim 4.4. OPB-15 primeri ile <i>M.odoratus</i> türüyle RAPD-PCR..... | 40 |
| Resim 4.5. 1 nolu izolatin soldan sağa; forward ve reverse dosyalarının kalite skoru..... | 44 |
| Resim 4.6. 31 nolu izolatin soldan sağa; forward ve reverse dosyalarının kalite skoru..... | 44 |
| Resim 4.7. 1 nolu izolatin Prokka ile Proksee arayüzündeki annotation haritası..... | 45 |
| Resim 4.8. 31 nolu izolatin Prokka ile Proksee arayüzündeki annotation haritası..... | 46 |
| Resim 4.9. 1 nolu izolatin gen ve genin kodladığı proteinlerin Prokka ile Proksee arayüzündeki annotation haritasının yakından görünümü..... | 47 |
| Resim 4.10. 1 nolu izolatin Proksee arayüzü – CARD ile saptadığımız direnç genleri..... | 51 |
| Resim 4.11. 31 nolu izolatin Proksee arayüzü – CARD ile saptadığımız direnç genleri..... | 52 |
| Resim 4.12. CGE CSIPhylogeny ile <i>Myroides odoratimimus</i> izolat 1 ve 31 genomunun, GenBank'taki diğer <i>M.odoratimimus</i> kromozomları ve referans genom (G13) ile filogenetik ilişkinin incelenmesi..... | 55 |

Resim 4.13. MEGA programı versiyon 11.0.13 ile oluşturulan filogenetik sirküler ağaçta *Myroides odoratimimus* izolat 1 ve 31 genomunun, GenBank'taki diğer *M.odoratimimus* kromozomları ve referans genom (G13) ile filogenetik ilişkisinin karşılaştırmalı görünümü.....56

Resim 4.14. *Myroides odoratimimus* izolat 1 ve 31 genomunun, G13 ve PR63039 izolatları kromozomları ile karşılaştırmalı görünümü (Proksee web arayüzü kullanılarak çizilmiştir.).....57



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Myroides cinsi, çoğunlukla fırsatçı patojen olarak bilinir ve immunsuprese hastalarda, bazen de immunkompetan insanlarda bu cinse ait türler hastalık yapabilirler. Ayrıca günümüzde bu bakterinin salgınlara ve ölüme neden olabilen enfeksiyonlara da sebep olabileceği bilinmektedir. Bu cins içinde en çok *M.odoratus* ve *M.odoratimimus* türlerine rastlanmaktadır. Nadir rastlanan bir bakteri olan *Myroides* cinsi bakteriler ile literatürde oldukça sınırlı sayıda yayın mevcuttur. Ancak son yıllarda ülkemiz dahil hastane kaynaklı muhtemel izolasyonların arttığı literatürden görülmektedir.

Amaçlarımız; nadir rastlanan *Myroides* türlerinin 16S rDNA yöntemi ile tanımlanması, örneklerin klonal ilişkilerinin RAPD PCR yöntemi ile belirlenmesi, olası bir salgının araştırılması, ilk ve son elde edilmiş izolatta tam genom analizi yapılarak genetik karakterizasyon ve zamanla değişimin belirlenmesi, ülkemizde şimdiye kadar oluşturulmamış olan tam genom analizi verisinin literatüre kazandırılmasıdır.

Günümüzde oldukça popüler olan yeni nesil dizileme yöntemleri, literatürde bu bakterilere oldukça kısıtlı sayıda uygulanmıştır (1-4). Biz de çalışmamız ile özellikle ülkemiz verisini artırmak istemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

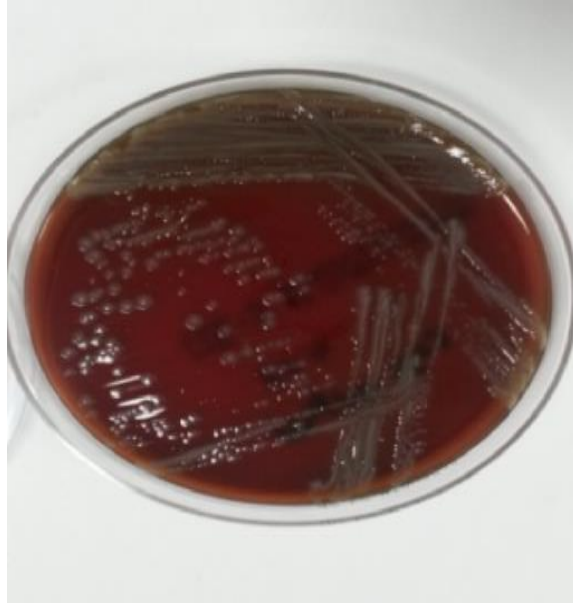
2.1 *Myroides* spp.

2.1.1 Tarihçe

Myroides cinsi bakteriler ilk olarak Stutzer tarafından *Bacterium faecale aromaticum* olarak adlandırılarak sonrasında *Flavobacterium odoratum* olarak yeniden isim almıştır (5, 6). Son olarak 1996 yılında Vancanneyt ve arkadaşları, DNA-rRNA hibridizasyon, DNA-DNA hibridizasyon, hücre protein paterninin araştırılması ve fenotipik özelliklerine göre bakteriyi *Myroides* olarak yeniden sınıflandırmıştır (7).

2.1.2 Mikrobiyolojik Özellikler

Myroides cinsi bakteriler aerobik, sporsuz, 0,5 µm genişliğinde / 1-2 µm uzunluğunda çoğunlukla sarı pigmentli (Resim 2.1), meyvemsi kokulu, hareketsiz, nonfermentatif gram negatif basillerdir. Oksidaz/katalaz/üreaz/jelatinaz (+), indol (-) ve çok ilaca dirençli metallo β-laktamazları mevcuttur (Tablo 2.1) (8).



Resim 2.1. *Myroides* cinsi bakterilerin %5 koyun kanlı agar besiyerinde görünümü (Laboratuvarımızda üretilmiş bakterinin fotoğrafıdır.)

Tablo 2.1. *Myroides* spp. izolatlarının karakteristik mikrobiyolojik özellikleri

| Test | <i>Myroides</i> (<i>M.odoratus</i> , <i>M.odoratimimus</i>) |
|---|--|
| Oksidaz | + |
| Hareket | - |
| MacConkey agarda üreme | Değişken(%91) |
| Glukozu kullanma | - |
| Mannitolü kullanma | - |
| İndol kullanma | - |
| Nitrati (NO ₃), azot dioksite (NO ₂) çevirme | - |
| Azot dioksiti (NO ₂), nitrojene (N ₂) çevirme | Değişken (%46) |
| Jelatini parçalama | + |
| Niştayı parçalama | - |
| Eskülin hidrolizi | - |
| DNAaz | + |
| Üreaz aktivitesi | + |
| Penisilin duyarlılığı | %19 duyarlı, sıklıkla dirençli |
| Polimiksin duyarlılığı | Dirençli |
| Pigment oluşumu | Sarı, yeşil renkli pigment |

2.1.3 Oluşan Enfeksiyonlar

Myroides cinsi bakterilerin doğal yaşam alanı toprak ve sular olup bu bakteriler normal mikrobiyotada bulunmaz (9-11). *Myroides* cinsi, çoğunlukla fırsatçı patojendir. İmmunsuprese hastalarda, bazen de immunkompetan insanlarda hastalık yapabilir (12, 13). Günümüzde bu bakterinin salgınlara ve

ölümlere neden olabilen enfeksiyonlara sebep olduğu bilinmektedir (14-16). Bu enfeksiyonlar; deri enfeksiyonları-cerrahi alan enfeksiyonu (17, 18), üriner sistem enfeksiyonu (14, 15, 17, 19), pnömoni, endokardit (20), ventrikülit (21), bakteremi, sepsis (22) gibi farklı klinik tablolar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu cins içinde en çok *M.odoratus* ve *M.odoratimimus* türlerine rastlanır (23).

2.1.4 Antibiyotik Direnci

Myroides cinsi bakteriler pek çok antibiyotiğe karşı dirençlidirler (12, 14, 24-27) ve bunlardan beta laktam antibiyotiklere intrinsik dirençli olabilirler (28). Direnç mekanizmaları günümüzde tam olarak aydınlatılamamış olsa da, beta laktamlara karşı dirençte *Myroides odoratus* için *TUS-1* ve *Myroides odoratimimus* için *MUS-1* isimli iki tane kromozomal metallo-beta laktamaz rol oynamaktadır. *Myroides odoratimimus*'ta kanamisin, amikasin, gentamisine karşı direncin plazmid aracılı olduğu; fakat ampisilin, sefodroksil, sefoperozon, seftazidim ve seftriaksona olan direncin kromozomal olduğu ortaya konulmuştur (29). Bununla birlikte *Myroides* türleri KPC2 Karbepenemaz enzimi içermektedir. Birçok tür, aztreonam ve karbapenem dahil beta-laktamlara dirençli olduğundan ve aminoglikozidlere, kinolonlara ve sülfametoksazole değişken duyarlılık gösterdiğinden tedavisi zor patojen olarak bildirilmektedir (22, 30).

Literatürde çoğu suş β -laktamlara, monobaktamlara, karbapenemlere ve aminoglikozidlere dirençli olduğu için bu bakterilerde antibiyotik tedavisi şu anda sorun olarak görülmektedir (17). β -laktamlara direncin kromozomal metallo- β -laktamazların (*TUS-1* ve *MUS-1*) üretilmesinden kaynaklandığı gösterilmiştir (28). Klinik izolatlar genellikle kinolonlara duyarlıdır ve sınırlı vakada trimetoprim sülfametoksazol ile siprofloksasin kombinasyonu veya monoterapi olarak trimetoprim sülfametoksazol uygulandığında klinik iyileşme gözlenmiştir (20, 21, 31, 32). Ktari S. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada üroloji kliniğinde meydana gelen *M.odoratimimus* üriner sistem enfeksiyonu salgınında hastalardan elde edilen yedi adet izolatın tümü, test edilen tüm antibiyotiklere dirençli olarak bulunmuş ve hastalardan üç tanesi siprofloksasin ve rifampisin ile başarılı olarak tedavi edilmiştir (14).

Bir diğerk çalışmada ise, Yunanistan'da 13 yaşında immunkompetan bir erkek hastanın tibiasının bir domuz tarafından ısırılması sonucu hastanın yarısından izole edilen *M.odoratimimus*'un yapılan antibiyotik direnç testinde amoksisilin/klavulanik asit, siprofloksasin, levofloksasin, kloramfenikol ve kotrimoksazole duyarlı; imipeneme orta düzeyde duyarlı olduğu saptanmışken test edilen diğerk antibiyotiklerde yüksek MİC değeri tespit edilmiş ve izolat bu antibiyotiklere dirençli kabul edilmiştir (12). Bu hastadan izole edilen suş da oldukça dirençli olup, antibiyotik duyarlılık testine göre hastaya siprofloksasin tedavisi uygulanmış ve yanıt alındığı gözlenmiştir. Bu sebeple antimikrobiyal duyarlılık testleri uygun antimikrobiyal ajanın seçiminde klinik rehberlik sağlamak için tüm izolatlarda önerilmektedir. *Myroides* türleri, özellikle hastaların rutin antimikrobiyal tedavisine yanıt vermediği durumlarda hem bağışıklığı baskılanmış hem de bağışıklığı yeterli konakçılarda deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının ayırıcı tanısında yer almalıdır.

Slovakya'da dört kanser hastasında gelişen nozokomiyal kateter ilişkili bakteremide ofloksasine duyarlı *Myroides* sp. tespit edilmiş. Bu hastaların kateterleri çıkarılıp, nötropeni gelişmesi halinde profilaksi amaçlı ofloksasin ile takip edilmiş ve başarılı yanıt alınmıştır (24).

Hindistan'da çiğ tavuk eti, çiğ keçi eti ve kümes hayvanı toprağından elde edilen izolatlardan *M. odoratimimus* SKS05-GRD'nin; amikasin, ampisilin, sefadroksil, sefoperazon, seftazidim, seftriakson, metilin ve gentamisin gibi antibiyotiklere direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu izolatta plazmid ve antibiyotik direnci arasındaki ilişkiyi araştırmak için plazmid izolasyonuna ve plazmid etkisizleştirmeye başvurulmuş. Plazmid etkisizleştirme, etidyum bromür kullanılarak yapılmış; etidyum bromürün 300 ve 500 µg/ml'de etkili olduğu bulunmuş. *M.odoratimimus* SKS05-GRD izolatının antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesiyle; amikasin, gentamisin ve kanamisine direncin plazmid aracılı ve diğerk antibiyotik direncinin kromozomal aracılı olduğunu doğrulayan duyarlılık testi saptanmıştır (25). *Myroides* türlerinin ayırt edici özelliklerinden biri de β-laktam antibiyotikler, aminoglikozidler, tetrasiklinler ve kinolonlar gibi birçok

antibiyotiğe direnç göstermeleridir (15, 17, 33). Bakterilerde antibiyotik direnci özelliği, belirli bir antibiyotiği inaktive eden enzimleri kodlayan genetik materyale sahip olma yoluyla ortaya çıkabilir (34). *M.odoratimimus* SKS05-GRD'de gösterildiği gibi antibiyotik direnci, plazmid aracılı veya kromozomal aracılı veya her ikisiyle beraber olabilir. Ampisilin, karbenisilin ve eritromisine direnç sağlayan bir R plazmid, bir *M. odoratus* suşunda tarif edilmiştir (35). *M. odoratimimus* SKS05-GRD ve diğer *Myroides* suşlarının ≥ 21 kb boyutunda plazmidlere sahip olduğu ve bu nedenle, *M. odoratimimus* SKS05-GRD'de plazmid oluşumunun bu bakteride antibiyotik direnci özelliğini indükleyebileceği şeklinde yorumlanmıştır (25).

C. Al-Bayssari ve arkadaşları Lübnan'da iki inek ve güvercin çiftliğinden rektal sürüntü ile elde edilen imipenem dirençli üç *Myroides odoratimimus* izolatının karbapenem direncinin moleküler mekanizmasını araştırmış ve *M. odoratimimus*'ta karbapenem direnci ile ilişkili kromozomal *bla MUS-1*'in yeni bir varyantını rapor etmişlerdir. Ayrıca hayvanların, direnç genlerinin çeşitli varyantlarını barındıran bir bakteri rezervuarını temsil edebileceği yorumunda bulunmuşlardır (27). *Myroides* cinsindeki β -laktamazlar, metallo- β -laktamazların B1 alt sınıfının üyeleridir ve diğer metalloenzimlerle uzaktan ilişkilidir. En yakından *Chryseobacterium indologenes*'ten IND-1 ile ilişkilidir (% 42 amino asit özdeşliği görülmektedir). Bununla birlikte filogenik analiz, *TUS-1* ve *MUS-1*'in, *Flavobacterium* türlerinin alt sınıfı B1 β -laktamazlarını gruplandıran alt sınıf B1 enzimlerinin aynı filogenik soya ait olduğunu göstermiştir. Saflaştırılmış β -laktamaz *TUS-1* ve *MUS-1*'in kinetik parametreleri, aztreonam hariç çoğu β -laktamları kapsayan hidroliz spektrumlarını detaylandırmıştır (28).

M. odoratimimus'ta *blaSFB-1*, *blaSLB-1*, *blaOXA-209*, *blaOXA-347* ve *tetX* direnç genlerinin varlığına ilişkin literatürde ilk sayılan raporda *M. odoratimimus* PR63039'un genomunda tetrasikline (*tetX*), makrolidlere (*ereB*, *cfrA*, *lasE*), sülfonamidlere (*suI2*, *suI3*) direnç ile ilişkili gen tanımlanmıştır. β -laktamlara (*blaMUS-1*, *blaTUS-1*, *blaSFB-1*, *blaSLB-1*, *blaOXA-209*, *blaOXA-347* genleri yoluyla) ve kloramfenikole (*cat* geni yoluyla) dirençli olabilmektedir. Ayrıca *acrB*,

acrD, *acrF*, *adeB*, *adeG*, *adeJ*, *amrB*, *ceoB*, *cmeB*, *mdsB*, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mtrD*, *smeE*, *mdtF* ve *macB* dahil olmak üzere 18 antibiyotik dışa akış pompası kodlayan direnç geni ile de direnç mekanizmaları saptanmıştır (36). Sadece trimethoprim /sulfametoksazole (37), minosikline duyarlılık saptayan yayınlar da mevcuttur (38).

Florian Gunzer ve arkadaşlarının 43 adet *M. odoratimimus* ve 16 adet *M. odoratus* ile yapmış olduğu çalışma yüksek sayıda klinik izolatta antimikrobiyal duyarlılığı raporlamıştır. Test edilen tüm kinolonlar arasında moksifloksasin, bu antibiyotik sınıfında en düşük MİK değerlerini göstermiştir. Ayrıca sadece 1 adet *M. odoratimimus* suşu ve 1 adet *M. odoratus* tigesikline duyarlı bulunmuşken; trimetoprim/sülfametoksazol, fosfomisin, kolistin, gentamisin, amikasin, eritromisin, azitromisin, daptomisin ve rifampisin için sınır değer bulunmadığından antibiyotik duyarlılık sonucu verilememiştir. Florian Gunzer ve arkadaşları fosfomisin, kolistin, gentamisin, amikasin ve daptomisin için belirlenen MİK sonuçları yüksek aralıkta olduğundan; bu antibiyotiklere karşı antimikrobiyal direnç olduğunu varsaymıştır. Yapılan çalışmada trimetoprim/sülfametoksazol, eritromisin, azitromisin ve rifampisin ile ilgili olarak, MİK sonuçları düşükten yükseğe doğru değişmektedir (1), (Tablo 2.2, Tablo 2.3). Bu çalışmada *M. odoratimimus* suşlarının %74,4'ünün (n = 32) ve *M. odoratus* suşlarının %50,0'sinin (n = 8) meropeneme duyarlı olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 2.2 ve 2.3), meropeneme duyarlı suşlar başkaları tarafından da bildirilmiştir (13, 16). Buna göre, meropenem, *Myroides* enfeksiyonlarının tedavisinde imipenemden daha yararlı olabilir. Kinolonlar arasında moksifloksasinin kullanılacak en iyi kinolon olabileceği belirtilmiştir (Tablo 2.2 ve 2.3). Ali ve ark. da, kanaliküli olan bir hastada moksifloksasinin başarılı bir şekilde kullanıldığını bildirmiştir (39).

Tablo 2.2. Gunzer ve arkadaşlarının 43 adet *M. odoratimimus* izolatında % duyarlılık oranları (1)

| Antibiyotik | S % | I % | R % |
|------------------------|------|------|------|
| Ampisilin | 2,3 | 44,2 | 53,5 |
| Piperasilin/Tazobaktam | 4,7 | 20,9 | 74,4 |
| Seftazidim | 0,0 | 2,3 | 97,7 |
| Sefepim | 0,0 | 11,6 | 88,4 |
| Aztreonam | 0,0 | 16,3 | 83,7 |
| İmipenem | 9,4 | 6,9 | 83,7 |
| Meropenem | 74,4 | 23,3 | 2,3 |
| Siprofloksasin | 2,3 | 14,0 | 83,7 |
| Levofloksasin | 11,6 | 51,2 | 37,2 |
| Moksifloksasin | 90,7 | 7,0 | 2,3 |
| Tigesiklin | 2,3 | 9,3 | 88,4 |

Tablo 2.3. Gunzer ve arkadaşlarının 16 adet *M. odoratus* izolatında % duyarlılık oranları (1)

| Antibiyotik | S % | I % | R % |
|------------------------|------|------|-------|
| Ampisilin | 31,3 | 12,5 | 56,2 |
| Piperasilin/Tazobaktam | 0,0 | 0,0 | 100,0 |
| Seftazidim | 0,0 | 0,0 | 100,0 |
| Sefepim | 0,0 | 0,0 | 100,0 |
| Aztreonam | 0,0 | 0,0 | 100,0 |
| İmipenem | 0,0 | 18,8 | 81,2 |
| Meropenem | 50,0 | 18,8 | 31,2 |
| Siprofloksasin | 6,3 | 26,0 | 68,7 |
| Levofloksasin | 43,8 | 43,8 | 12,4 |
| Moksifloksasin | 93,8 | 0,0 | 6,2 |
| Tigesiklin | 6,3 | 31,3 | 62,4 |

2.1.5 Patogenez ve Virulans

Myroides cinsi bakteriler çoğul antibiyotik direncine sahip olmalarıyla bilinirler ve literatürde patojeniteyi araştıran sınırlı sayıda yayın mevcuttur.

Bilindiği kadarıyla *M. profundus* bir proteaz olarak myroliysin üretmektedir ve bu proteaz elastinolitik aktivite sergileyen bir metalloproteaz olmakla birlikte kollajenaz üretiminde de rol oynamaktadır. Kollajen hidrolizi bakteriler için önemli bir virulans faktörü olup bu cinste de kollejenaz üretimi virulansta önemli bir role sahiptir (40).

Myroides cinsi bakterilerde biofilm oluşumu (41) da klinik patogeneze sorumludur ve klor ile bu bakterilerin yüzeylerden eradikasyonu sağlanabilmektedir (42).

M. pelagicus, *M. profundus*, *M. marinus*, *M. phaeus*, *M. guanonis*, *M. xuanwuensis*, *M. injenensis* ve *M. indicus* türlerinin şimdiye kadar insanlarda patojenitesi belirsizliğini korumaktadır (9, 43). Literatürde daha çok *M. odoratus* ve *M. odoratimimus* türleri ile enfeksiyonlara rastlanmaktadır.

Kandan izole edilen ilk *M. phaeus* vakası, immunsuprese bir hastada bakteremiye sebep olmuştur (44) ve tanısı 16S rDNA analizi ile konmuştur. Burada mikroorganizmanın patojenitesi için halen tartışmalı diye söz edilmiştir.

Shaohua Hu ve arkadaşları (2), üç farklı çevresel (H1bi, L41, CCUG.12700) ve üç farklı klinik patojen (CCUG.12901, CCUG.10230, CIP.101113) *M. odoratimimus* ile yaptıkları tam genom analizinde, tüm *M. odoratimimus* izolatlarının genel olarak çok az farkla aynı virulans faktörlerini içerdiklerini tespit etmiştir. Bunlar kapsül ve kapsül polisakkaritler (GalE, GImU, wbjD/wecB, ugd, uppS, RmlA, RmlB, capL, wecC); hücre içi yaşama ve invazyon faktörleri (katA, clpP, EF-Tu, sodB); moleküler şaperonlar (hsp60, DnaK); üreaz (ureA, ureB, ureG); acinetobactin (bauE); streptokokkal enolaz (eno); hem biyosentezi (hemB, hemL) ve T4SS efektörleri (Trans-2-enoylCoAredüktaz) olarak bulunmuştur (2).

Panrezistan klinik patojen *M. odoratimimus* PR63039 suşunun tam genom analizinin yapıldığı başka bir çalışmada, pek çok virulans ve direnç geni tespit edilmiş olup, antibiyotik direncine katkıda bulunan birden fazla direnci indükleyen gen mutasyonları bulunmuştur (36).

Başka bir çalışmada Çin, Tibet merasından izole edilen *M.odoratimimus* G13 suşundaki virülans faktör kodlayan genler ve antibiyotik direnç genlerinin (ADG) insan sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturmakta olduğu, tam genom sekanslama ve biyoinformatik analiz sonucu bu suşta *blaMUS-1* geninin bulunduğu tespit edilmiştir (45). Bu, metalo- β -laktamaz kodlayan, β -laktamazlara içsel direnç kazandıran bir gendir (1). Hu ve arkadaşları; fenikollere direnç sağlayan *cat* ve tetrasikline direnç sağlayan *tetX* genlerini farklı suşlarda tespit etmişlerdir (29). Genomdaki *abeS* ve *msrB* dahil olmak üzere ilaç akış pompası genleri *M. odoratimimus* çoklu ilaç direncine katkıda bulunmaktadır (1, 2, 29, 36). Horizontal gen transferi (HGT) de bir diğer genetik alışveriş yolunu oluşturmaktadır. Genomik adalarda bulunan patojenite adaları (PI) bölgeleri HGT ile bakteriden bakteriye geçmektedir. Bazı durumlarda bu adaların kesilip, diğer bakterilere aktarıldığı gözlenmiştir (46). PR63039 suşundaki MY-63039-RR bölgesi kusurlu antibiyotik direnç adası olarak kabul edilmiş olup bu, *M. odoratimimus*' ta raporlanan ilk genomik adayı (GI) oluşturmaktadır (29).

Çok ilaca dirençli (ÇİD) *M. odoratimimus* izole edildiği bir başka çalışmada, klinik örneklerdeki suşlarla oldukça benzerlik tespit edilmiş ve bu suş; tetrasiklinlere diğer suşlardan daha toleranslı bulunmuştur. G13'teki MGI1313 antibiyotik direnç GI tespit edilmiş olup, bunun başka bakterilere transfer kapasitesi de saptanmıştır. MGI1313 bölgesini kazanan bakteri çeşitli antibiyotiklere de dirençli hale gelmiş olmaktadır. GI'nın potansiyel transfer özelliği klinik açıdan önem oluşturmaktadır ve G13 çevresel suşunun patojenitesi olmasına rağmen; virulans faktörleri, direnç gen aktarımı ve ÇİD halen belirsizliğini korumaktadır (45).

2.1.6 Mikrobiyolojik Tanı

Tanı amacıyla yaygın olarak kullanılan VITEK 2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Fransa) ve Matrix-Assisted Laser Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) karşılaştırıldığı ve sonuçların 16S rDNA PCR verileriyle ilişkilendirildiği Percy Schröttner ve arkadaşlarının çalışmasında toplamda, rutin tanı sırasında toplanan 22 suş analiz edilmiş olup, VITEK 2'nin *Myroides* cinsini güvenilir bir şekilde tanımladığı; ancak *M. odoratimimus* ve *M. odoratus* arasında ayırım yapamadığı gösterilmiştir. Bunun aksine, hem MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) hem de 16S rDNA dizilimi, iki tür arasında verimli bir şekilde ayırım yapmıştır (47). Tür düzeyinde tanı, ancak MALDITOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ve moleküler yöntemler ile mümkündür. Mikrobiyolojik özellikler, otomatize sistemler ve diğer yöntemler ancak cins düzeyinde tanımlama yapabilmektedir.

2.2 Hastane Enfeksiyonları

Hastane enfeksiyonu (HE), hastanın hastaneye başvurduğu esnada inkübasyon döneminde bulunmayan, hastaneye yatışından 48 saat sonra başlayan veya hastaneden taburculuğundan sonraki 10 gün içinde gelişen, mikroorganizmalar veya onların toksinleri ile oluşan bölgesel ya da sistemik enfeksiyonlardır (48).

2008 yılında, ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), HE tanımını genişletmiş ve sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon tanımı kullanılmaya başlanmıştır (49). 2009 yılında ise Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) tarafından bu metin Türkçe'ye çevrilerek yayımlanmıştır (50). Bu tanım içerisinde hastane dışında sağlık hizmeti veren kurumlarda (hemodiyaliz, ayaktan kemoterapi üniteleri vb.) veya bakım evlerinde uzun süre kalanlarda gelişen enfeksiyonlar, evde yara bakımı veya hemşirelik hizmeti alanlar da bu tanıma dahil edilmiştir.

Sık görülen HE; primer kan dolaşımı enfeksiyonları, pnömoniler, üriner sistem enfeksiyonları ve diğer (cerrahi alan enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonu, kardiyovasküler sistem enfeksiyonu, santral sinir sistemi enfeksiyonu, göz, kulak, boğaz ve ağız enfeksiyonları, gastrointestinal sistem enfeksiyonu, genital sistem enfeksiyonu) olarak sıralanabilir (49).

Şimdiye kadar kayıtlara *Myroides* cinsi mikroorganizmalarla oluşan salgınlar raporlanmıştır. İlk ana salgın, 1994-1997 yılları arasında yaşanan; 13 adet hastanın yer aldığı, Türkiye'deki bir hastanenin üroloji servisinde meydana gelen üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE) salgını (15); Mayıs-Kasım 2010 tarihleri arasında Tunus'ta bir hastanede, yine üroloji bölümünde görülen ÜSE salgını (14); Çin'deki Shanghai Jiaotong Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki Renji Hastanesinde Temmuz 2015-Ağustos 2016 tarihleri arasında; safra ve pankreas cerrahisi (6/22) ve üroloji bölümünden (16/22), yatan hastalardan toplam 22 adet *M.odoratimimus* izolatu ile oluşan ÜSE salgını (51); Haziran-Ağustos 2017 arasında Batı Romanya'da meydana gelen 44-80 yaş aralığında bulunan 7 adet hastanın yer aldığı; 6 adet hastanın üriner taş, 1 adet hastanın da mesane kanseri olduğu hastalarla gelişen ÜSE salgını (38); ülkemizde Uşak'taki bir hastanede; Mart-Mayıs 2019 tarihleri arasında idrar örneklerinden elde edilen 6 adet *M.odoratimimus* suşu ile oluşan ÜSE salgını (52); Ankara'da Temmuz-Aralık 2019 tarihleri arasında 7 adet hastada, toplam 9 adet *Myroides* sp. ile oluşan ÜSE salgını (53)dır.

2.3 Hastane Enfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji Yöntemlerinin Yeri ve Önemi:

Hastaneye yatan kişiler, normal bireylere göre altta yatan kronik ve akut hastalıkları dolayısıyla enfeksiyonlara daha fazla yatkınlık gösterir. Hastane ortamı da dirençli mikroorganizmalarla enfeksiyonlar için bu hastalara zemin hazırlar. Yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan hastane enfeksiyonları

hastane masraflarını bir hayli artırmaktadır. Bu sebeplerden ötürü hastane kaynaklı enfeksiyonlardan korunma ve bunların kontrolü oldukça önemlidir (50).

Hastane enfeksiyonları sporadik, endemik, epidemik olarak görülebilmektedir. En fazla endemik enfeksiyonlara rastlanmaktadır ve kontrol önlemleri bu gruba uygulanmaktadır. Endemik enfeksiyonların üçte birlik kısmı çapraz bulaşma ile oluşmaktadır. Hastane enfeksiyonlarında epidemiyolojik araştırmalar, belirli bir patojen ile enfeksiyon sıklığı arttığında, bir hasta grubunda aynı tür bakteri izole edildiğinde ya da benzer antibiyotik duyarlılık paterni gösteren suşlar belirlendiği durumlarda başlatılmaktadır. Moleküler mikrobiyolojik yöntemler, etkenlerin bulaşma yollarını, bulaşma mekanizmalarını ortaya çıkarmada önemli katkı sağlamaktadır. Ortak biyotip, yüzey reseptörleri, genotip, virülans faktörleri gibi özellikleri göz önünde bulundurarak klonalitenin varlığını veya yokluğunu tespit eden moleküler yöntemler; enfeksiyonların yayılımını izlemede oldukça etkindir. Moleküler yöntemler; enfeksiyonların hızlı tanısında, kökenlerin identifikasyonu ve klonal benzerliklerinin saptanmasında, antibiyotik direnci saptanmasında, enfeksiyonların izleminde, hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi konusunda faydalar sağlamıştır (54). Mikroorganizmaların fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri hastane enfeksiyonlarının izlenmesinde yararlanılan yöntemler olarak kullanılmaktadırlar (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Hastane enfeksiyonları etkenlerini tiplendirme amacıyla kullanılan yöntemler

| Fenotipik tiplendirme | Genotipik tiplendirme |
|--|--|
| Biyotiplendirme | Plazmid analizi |
| Serotiplendirme | Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizi (RFLP, PFGE) |
| Bakteriyosin tiplendirmesi | Ribotipleme |
| Faj tiplendirmesi | Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemler (RAPD, REP- PCR, AP-PCR) |
| Antibiyotik duyarlılık testlerine göre | Sekans analizi (MLST, SLST) |
| Protein analizi | Microarray (DNA chip) teknolojisi |

2.4 16SrDNA PCR Yöntemi

Organizmaları moleküler tanımlamada PCR'da kullanılan hedef gen, genellikle prokaryotlar için 16S rRNA ve ökaryotlar için ise 18S rRNA'yı kodlayan genler olmaktadır (55, 56). Ayrıca mikrobiyolojide bakterileri kültüre etmeden tanımlama yapabilecek bir yöntemdir. Yöntem literatürde daha çok 16S rRNA PCR olarak anılmaktadır, bununla birlikte yaptığımız PCR'da DNA'yı çoğalttığımız ve RT enzimi kullanmadığımız için 16S rDNA PCR olarak adlandırma da tercih edilebilmektedir.

Prokaryot ribozomların küçük alt birimlerinin ribozomal RNA'sına 16S rRNA denir. Bu rRNA, kromozomların DNA'sından kopyalandığında, buna 16S rDNA denir. Transkripsiyon süreci boyunca 16S rRNA'nın üretilmesinden sorumlu olan aynı genidir. 16S rRNA, prokaryotların ribozomlarındaki 30S alt biriminin bir elemanını oluşturur. 16S rDNA, çift sarmallı kromozomal DNA olan 16S rRNA'yı kodlayan geni oluşturur (Tablo 2.5) (57)

Tablo 2.5. 16S rRNA ve 16S rDNA özellikleri

| 16S rRNA | 16S rDNA |
|--|--|
| Prokaryotik ribozomların 30 S ünitesinin küçük alt birimini oluşturur | Prokaryotlarda 16S rRNA'yı kodlayan geni oluşturur |
| RNA nükleotitlerinden oluşurlar | DNA nükleotitlerinden oluşurlar |
| Tek sarmallı | Çift sarmallı |
| Yalnızca kodlayan bölgeleri vardır | Hem kodlayan hem de kodlamayan bölgeler içerir |
| Urasil bulunur | Urasil bulunmaz |
| Timin bulunmaz | Timin bulunur |
| 23S rRNA alt birimleriyle etkileşime girerek büyük ve küçük alt birimlerin birleşmesini destekler. | Prokaryotları tanımlamak için önemlidir. |

16S rRNA'nın tüm prokaryotik organizmalarda bulunması, yeterli büyüklükte ve işlevsel olarak sabit olması, tüm hücrelerde hem yüksek düzeyde korunmuş hem de değişken çok sayıda bölgeye sahip olması; bu genlerin standart olarak kabul edilmesini ve moleküler tanımlamada yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır (58, 59).

16S rRNA dizi analizi 1987 yılında, prokaryotik türler arasında korunan 16S bölgesinin fonksiyonunu ortaya koyması sonucu ilk defa Woese adlı mikrobiyolog tarafından ortaya konulmuştur (60- 62).

16S, 23S ve 5S rRNA genleri bakteriyel kromozom üzerinde bir operonla birlikte düzenlenmiştir. 16S ile 23S rRNA arasındaki ayırıcı bölgenin baz dizi sırası türe özgü olup çok değişken bir yapıdadır. PCR ile 16S rRNA bölgesinin spesifik primerler kullanılarak çoğaltılması ve baz dizisinin belirlenmesi ile ayırıcı bölgenin dizi sırası belirlenmekte, böylece türlerin %97 oranında tanımlanması sağlanmaktadır (63).

Bu yöntemde bakterilerin tanımlanması; öncelikle DNA'nın izolasyonu, 16S ileri ve geri primerleri kullanılarak izole edilen DNA'nın PCR ile çoğaltılması, çoğaltılan DNA'nın baz dizi sırasının tespiti ve bu sıranın, veri tabanında (GenBank ve benzeri) bulunan mikroorganizmalara ait baz dizi sıraları ile karşılaştırılarak (örneğin BLAST fonksiyonu) mikroorganizmanın isimlendirilmesi aşamalarından oluşmaktadır (64-66).

2.5 RAPD PCR

Moleküler biyoteknolojideki ilerlemeler sayesinde, genetik polimorfizmi saptamak için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Williams ve ark. RAPD'yi, Welsh ve McClellandise AP-PCR'ı geliştirmişlerdir (67, 68). RAPD ve AP-PCR taksonomi ve filogenide kullanılmaktadır.

Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmanın yerine rastgele seçilmiş bir ya da birden fazla primer ile DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilir ve önceden DNA baz dizisinin bilinmesi gerekmemektedir (68, 69).

Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farkları, agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunlukta baz çifti bantlarının oluşmasına neden olmaktadır. Kullanılan primerler kısadır, 9-10 bazlık kadardır, G-C'den zengindirler. Bağlanma ısısı 35-45 °C'ye düşürülmüştür. Bağlanma esnasında primerler, kromozom üzerinde hem kendilerine özgül bölgelere hem de diğer bölgelere rastlantısal olarak rastgele bağlanmaktadır. Aynı türün farklı suşlarında primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirlerine uzaklıkları farklı olduğundan jel elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklı olmaktadır. Eğer suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde bir mutasyon gerçekleşirse bant polimorfizmi meydana gelmektedir. Amplifikasyon sonunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri karşılaştırılarak, aynı bant profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkili kabul edilmektedir (70).

Bu yöntemin avantajları uygulanmasının kolay olması, kısa sürede sonuç verebilmesi (69, 70), oldukça duyarlı ve ucuz olmasıdır (54).

RAPD PCR'in dezavantajı ise standardizasyonun sağlanmasındaki güçlüklerdir. Laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlamak için farklı türler için farklı öneriler yapılabilir. M13, universal primeri kullanılması, standardize edilmiş amplifikasyon karışımı, aynı model ısı döngü cihazında (thermalcycler) standart bir amplifikasyon protokolüyle uygulanması bunlar arasında olabilir. Tüm salgın izolatları aynı anda çalışılmalı ve sonuçlar en az 3 kez tekrarlanmalıdır (69, 70).

A.C. Hilton ve arkadaşları 1997 yılındaki *Salmonella* cinsi bakterilerde RAPD-PCR için yaptıkları optimizasyon çalışmasında; reaksiyon tamponu bileşiminin *Salmonella*'nın RAPD analizinde önemli bir faktör olduğunu tespit etmiştir (71). Buna karşın, Meunier ve Grimont 1993 yılındaki çalışmasında, değişen Tris, KCl ve MgCl₂ konsantrasyonları ile elde ettikleri üç farklı tamponla aynı RAPD profillerini elde etmiştir (72). MgCl₂ konsantrasyonunun PCR'i etkilediği bilinmektedir (73). KCl ve (NH₄)₂SO₄ gibi diğer tuzlar, primer annealing aşamasını veya Taq polimerazın kendisini doğrudan etkileyerek PCR özgülüğünü etkileyebilmektedir (74). Bu etkiler, A.C. Hilton ve arkadaşlarının 1997 yayınında *Salmonella*'nın RAPD analizinde gözlenmiştir. Sonuç olarak, RAPD-PCR yöntemiyle her laboratuvarında aynı protokollerle farklı sonuçlar alınabilmektedir, yöntemin standardizasyonu kolay değildir.

1993 yılında Greg A. Penner ve ark. iki yulaf bitkisinde kendi protokolleriyle (Ottawa protokolü) RAPD PCR çalışması yapmışlar, bantlar elde etmişler. Aynı protokol aynı yulaf bitkileriyle Kuzey Amerika'daki diğer altı laboratuvarında test edilmiş, bu laboratuvarlardan dördü Ottawa protokolünü kullanarak çok az parçayı çoğaltmış veya hiç çoğaltmamış. Gönderilen altı laboratuvar, ancak kendi protokollerini geliştirerek RAPD-PCR'da bant elde edebilmiştir. Bu çalışma ile RAPD-PCR'in standardizasyonunun kolay olmadığı ve bunun için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu ortaya konmuştur (75).

RAPD PCR primerleri üreten firmanın talimat kataloğunda (Eurofinsgenomics RAPD 10-mer Kits and Primers, Eurofins Genomic, Almanya) (76), RAPD PCR sonucu oluşan amplifikasyon ürünlerinin sayısı bölümünde her reaksiyon için farklı amplifikasyon ürünleri sayısının primer dizisine, genomik diziye ve genom boyutuna bağlı olduğu belirtilmiştir. Primer bağlanma bölgelerinin bir genom boyunca rastgele dağıldığı varsayılarak, olasılık hesabıyla amplifikasyon ürünleri sayısının yaklaşık $2.5 \times 10^9 \times G$ olacağı tahmin edilmiştir; burada G, baz çiftlerindeki haploid genomun boyutudur. Örneğin, marul yaklaşık 2×10^9 baz çiftlik bir haploid genom boyutuna sahip olduğundan formüle göre, genetik heterozigotluğun derecesine bağlı olarak tipik bir reaksiyonun 5 ila 10 bant vermesi gerektiği öngörülmüştür. Bu tahmin, maruldaki gerçek sonuçlara yakın bulunmuştur (77). Bununla birlikte, *E. coli*'nininki ($G = 4 \times 10^6$ baz çifti) gibi çok daha küçük genom boyutları için, yukarıdaki formülün çoğu primerle hiç bant oluşturmaması gerektiği; ancak birkaç laboratuvarın prokaryotik DNA'dan çoklu amplifikasyon ürünleri rapor ettiği belirtilmiştir. Bu tür sonuçların primer ve DNA hedefi arasındaki uyumsuzluk temelinde açıklanabileceği sonucuna ulaşılmıştır (78) .

2.6 Yeni Nesil Dizileme

1970'li yıllarda Sanger ve arkadaşları (79) ile Maxam ve Gilbert (80) zincir sonlandırma ve fragmentasyon teknikleri ile DNA'nın dizilimini sağlayan yöntemler geliştirmişlerdir. 1980'li yıllarda Kary Mullis tarafından PCR'ın keşfi ile moleküler genomik alanda çok büyük ilerlemeler olmuştur. Yüksek verimli dizileme teknolojileri dahil, giderek artan çeşitli moleküler yöntemler son on yılda ortaya çıkmıştır.

Sanger yönteminin kısıtlılıkları daha ucuz ve hızlı sekans teknolojilerine ihtiyacı arttırmıştır. Bu nedenle, yeni nesil dizileme (YND) yöntemleri ortaya çıkmıştır. 2004 yılında YND teknikleri tanıtılmış ve moleküler biyoloji ve genetik alanında birçok hızlı gelişme olmuştur (81).

YND ile yüksek hacimde paralel dizileme yapılarak milyonlarca DNA fragmanı aynı anda sekanslanabilmektedir. Bu sayede tüm genomun sekanslanması kısa bir süre almaktadır. YND yöntemleri; DNA fragmanlarının bakteriyel klonlanmasının yerine hücre içermeyen sistem oluşturularak YND kütüphanelerinin hazırlanmasına imkan sağlamaktadır. Aynı anda milyonlarca kısa dizileme yapılabilir. Sekans çıktısı, elektroforeze ihtiyaç duyulmaksızın direkt tespit edilebilmektedir. YND ile oluşturulan çok sayıda okumalar hızlıca tüm genom dizilimini sağlamaktadır. Buna karşın, YND dezavantajı ise göreceli olarak kısa okumalar yapması olup; bunların genomda birleştirilmesi zordur. Bu sebeple, yeni hizalama algoritmalarının geliştirilmesi gerekmektedir (82).

YND teknolojisi, genom üzerindeki çok sayıda hedef gen bölgesi veya genomun tamamı hakkında kısa sürede, düşük maliyetle, yüksek çözünürlükte genomik bilgi elde edilmesini sağlamıştır. Günümüzde kullanılan YND sistemlerinden bazıları Applied Biosystems SOLID, Roche 454, Ion Torrent, Illumina Genome Analyzer, Helicos ve Pacific Biosciences'dir (83). En çok kullanılan YND platformları ise; Ion Torrent PGM ve Illumina MiSeq'tir. Bu platformların temel aşamaları; kütüphane hazırlama, dizileme, görüntüleme ve elde edilen verilerin analiz edilmesidir (84).

İlerleyen teknolojiyle birlikte üçüncü nesil dizi analizi yöntemleri ortaya çıkmıştır. Pacific Biosciences (PacBio) bunlardan biridir. Bir ZMW (sıfır modlu dalga kılavuzu) ışık enerjisini, aydınlatıcı ışığın dalga boyuna göre boyutları daha küçük olan bir alana yönlendiren küçük bir odadır. ZMW tasarımı ve kullanılan ışığın dalga boyu sebebiyle; ZMW'nin altında, DNA polimerazın uzayan bir zincirdeki DNA'ya bağlanan her bir baz ile birleştiği yerde görüntüleme gerçekleşir. Ortamda dört nükleotid, farklı floresan boyalarla etiketlenmiştir. Uzayan zincire bir nükleotid eklendiğinde, doğru floresan boyalı nükleotid bağlandıkça, milisaniye ölçeğinde görüntüleme gerçekleşir. Uzun okuma yapar; ortalama 10 kb üzeri okuma yapılabilir, bazı özel okumalarda ise 60 kb'a kadar çıkabilir. Amplifikasyon gerektirmez, tek tip derinlikte okuma yapılır. Tek molekül

düzeyinde çalışma yapılır, CSS (Circular Consensus Sequencing) ile moleküler düzeyde doğruluk sağlanması mümkündür (85).

Nanopor teknolojisi de üçüncü nesil dizi analizi teknolojilerinden biridir. Sağlık ve biyomedikal araştırma alanında giderek daha önemli hale gelmiş olup, ince bir zara nano ölçekli bir delik yerleştirilerek ve elektrokimyasal sinyali ölçerek çalışır. Nanopor teknolojisi nükleik asitleri ve diğer biyomakromolekülleri araştırmak için kullanılabilir. Nanopore teknolojisinin en başarılı uygulamalarından biri olan Oxford Nanopore Teknolojisi, dördüncü nesil gen dizileme teknolojisini başlangıcını işaret etmektedir (86). Bu teknoloji tek DNA molekülünü real-time dizileme yapan ucuz ve hızlı bir yöntemdir; DNA molekülünün nano boyuttaki porlardan geçişi sırasında nükleotidlerin oluşturduğu elektrofizyolojik değişiklikleri analiz ederek DNA dizisini ortaya çıkarır. Oxford Nanopore teknolojisi ile kütüphane hazırlığı ve sekanslama çok kısa sürede ve pratik olarak yapılabilmektedir. Ayrıca PCR basamağının da ortadan kalkması ile dizi analizi süresi günlerden saatlere düşmektedir. Teknolojinin diğer önemli avantajı 10^4 – 10^6 baz kadar çok uzun okumalar yapabilmesidir (87). Nanopor teknolojisi her ne kadar yüksek hatalı okuma oranına sahip olsa da DNA dizilemesi konusunda oldukça önemli bir teknolojiyi temsil etmesi, uzun okumalar yapabilmesi, daha önceki teknolojilere göre çok daha ucuz ve hızlı olması nedeniyle oldukça önemlidir (88).

YND sayesinde tüm genom, ekzom ve hedefe yönelik dizileme, ayrıca epigenomik, RNA dizileme ve hatta tek hücre dizileme gibi pek çok birbirinden farklı uygulama yapılabilmektedir (89).

YND teknolojilerinin sistemsel farkları, yöntemsel değişiklikleri olsa da temelde aynı basamakları içermektedir. Bunlar, kütüphane hazırlanması, kütüphanenin işaretlenmesi, tekrar çoğaltılması (enrichment), tüm kütüphanenin aynı anda dizilenmesi ve biyoinformatik araçlar ile bir referansa göre ya da de novo olarak dizilenen parçaların tekrar birleştirilmesi basamaklarıdır (90).

Bu teknikler sayesinde genomik bilgi oldukça hızlı elde edilmektedir. Klinik tanıda kullanılması da gittikçe artmaktadır. Mikrobiyoloji, onkoloji, embriyoloji, genetik, metabolik hastalıkların tanısı gibi birçok tıp dalında YND kullanılmaktadır.

İnsan mikrobiyom örnekleri için geniş ve kamuya açık veritabanları mevcuttur. Çalışmalar belirli vücut bölgeleri, hastalık tipleri ve çevresel koşullar ile belirli mikrobiyota tiplerinin ilişkilendirilebildiğini göstermektedir (91, 92). YND platformlarında evrensel primerler kullanılmaktadır. YND yöntemleri, karmaşık mikrobiyal toplulukların profilini çıkarmada en çok kullanılan ve geniş kullanım alanına sahip yöntemleri oluşturmaktadır (93).

Yeni nesil DNA dizileme teknolojilerindeki ilerlemelerle, tüm mikrobiyom analizini olanaklı hale getiren metagenom biliminin ortaya çıkması ve hız kazanması sağlanmıştır. Bir mikrobiyomun çeşitliliğinin saptanması için geliştirilen yöntemlerden en çok tercih edileni, daha önce veri tabanlarına kayıtlı taksonomik bilgilerin referans olarak kullanılması ve yeni verilerin taksonomik ünitelere ayrıştırılmasıdır. Tüm genom dizilemesinin kullanılmadığı durumlarda sadece 16S rRNA genleri dizilerek bu yeni verilerin bilinen dizilerle eşleşmesine dayalı taksonomik profillemeye yapılabilmektedir (94, 95).

Kültürde etken izole edilme şansının az olduğu artrit, ensefalit gibi örneklerde YND ile kısa sürede sonuç alınabilmektedir. Ensefalit olgularının %63'üne, geleneksel yöntemlerle tanı konulamamaktadır. Literatürde YND yöntemleri kullanılarak *Leptospira*, Astrovirus ve Bornavirus saptanan ensefalit olguları bulunmaktadır (96-99).

YND yöntemleri, hastane enfeksiyon kontrol programları ve salgın tespitlerinde Multi Lokus Sekans Tipleme (MLST) ve benzeri yöntemlerden çok daha doğru ve kesin sonuçlar sağlamaktadır (100). Bakteriyolojide YND ile kültür işlemleri yapılmadan kısa sürede virulans faktörleri, direnç genleri, MLST'nin standart çalışma aşamalarına gerek kalmadan MLST sonuçları elde edilebilmektedir.

Varyant analizinde, tüm genom dizileme sayesinde filogenetik ağaçların, faj elemanlarının, virülans faktörlerinin, plazmidlerin ve salgın suşuna özgü bölgelerin karakterizasyonunun yanı sıra yeniden sıralama analizi ve DNA yapısal varyasyonlarının saptanması gibi detaylı bilgi sağlanabilmektedir (101, 102).

YND yöntemleriyle direnç genlerinin saptanmasıyla antibiyotik duyarlılıkları hakkında bilgi edinilebilmektedir; ancak bir genin varlığı, direnç varlığı ile eş anlamlı olmadığı gibi bir genin yokluğu da direnç olmaması ile eş anlamlı olmamaktadır. Beta laktamaz genleri gibi, gen aktarımı ile gelişen dirençlerde ve *rpoB*, *gyrA* gibi özgül genlerdeki mutasyonlara bağlı gelişen dirençlerde direnci saptamada bu yöntemler başarılı olmaktadır. YND teknolojileri; birden fazla genle oluşan karmaşık düzenleyici sistemlerle oluşan dirençlerde, ekspresyon artışı ile oluşan dirençlerde antibiyotik direnci tespitinde yetersiz kalabilmektedir. Sonuç olarak, tüm genom dizileme verisinin antibiyotik duyarlılığını belirlemede kullanımı henüz sınırlı kalmaktadır. Direnç geni varlığı veya mutasyonu, dirence neden olmayabileceği gibi, indüklenebilir dirençle de ilgili olabilmektedir. YND özet olarak, antibiyotik duyarlılığına ait kantitatif veri sağlayamamaktadır (103, 104).

YND teknolojileri; klinikte hastadaki patojenle, patojenin genomunun bilgisi arasındaki ilişkinin incelenmesi ile yeni virülans faktörlerini belirleme imkanı sağlamaktadır. Klinik bakteriyolojide epidemiyolojik tiplendirme için de kullanılabilir (105). Klinik virolojide virüs hastalık ilişkisi belirlemede, rezervuarlar ve bulaş yollarının belirlenmesinde, antiviral ilaç direnci saptamada, ilaca dirençli mutant oranı saptamada kullanılabilir. YND teknolojileri, özellikle HIV enfeksiyonunda reseptör tropizminin belirlenmesinde kullanılmaktadır (106).

Teknolojideki gelişmelerle, maliyetlerin düşmesi ile YND yöntemleri daha yaygınlaşmaktadır. Tüm gelişmelere rağmen; veri tabanlarındaki güncellemenin yavaşlığı ve ayrıca veri analizi için biyoinformatik bilgisine sahip olma gerekliliği YND kullanımının yaygınlaşmasının önündeki engellerden bazılarıdır (106).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 İzolatların Seçimi ve Örneklerin İşlenmesi

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik 2.4 tarafından 24.11.2021 tarih ve 09-13 numaralı etik kurul onayı alınarak çalışmalar yürütülmüştür. Mart 2018-Kasım 2021 tarihleri arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hastanesi kliniklerinden laboratuvarımıza gelen rutin idrar kültürü örneklerinden saklanmış ve -80°C'de muhafaza edilmekte olan 31 farklı izolat çalışmamıza dahil edildi. Phoenix (BD, USA) cihazı ile *Myroides odoratus/odoratimimus* olarak isimlendirilmiş olan izolatlar her hastanın ilk örneği seçilerek çalışmaya alındı. Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları izolasyonun yapıldığı tarihteki raporlanan sonuçtan elde edildi. Bakteriler çalışma öncesi çözdürülerek, tek koloni ekimi yapılacak şekilde BBL nutrient agar (BD, ABD) besiyerinde 36°C atmosferik koşulda 18-24 saat inkübasyondan sonra diğer işlemlere alındı.

3.2. Bakterilerden DNA Ekstraksiyonu

İzolatlarımız ve negatif kontrol (DNAz RNAz free distile su (Multicell, Wisent Inc.) ile DNA ekstraksiyonu (GeneMATRIX TISSUE & BACTERIAL DNA Purification Kit, Polonya) yaptık;

I. Spin-Kolon Aktivasyonu

1. Spin kolona **30 µl aktivasyon Tamponu T** uyguladık ve tüm lizati spin kolona aktarana kadar oda sıcaklığında tuttuk.

II. Örnek Hazırlama

1. 1,5 ml ependorf tüpünde; doğrudan petri kabından seçtiğiniz bakteri kolonisini, **300 µl tampon Lyse BG** içinde süspansiyon ettik.

2. Süspansiyon hücrelerine **50 µl tampon BL** ve **2 µl RNase A** ekledik. Birkaç kere ters çevirerek veya 3 saniye vorteks ile karıştırdık.

3. Numuneyi 37°C'de 15 dakika inkübe ettik.
4. Yeniden süspansiyon edilmiş hücre peletine **20 µl Proteinaz K** ekleyip birkaç kere ters çevirerek veya 3 sn vorteks ile karıştırdık.
5. Örneği 56°C'de 30 dakika inkübe ettik.
6. **350 µl tampon Sol T** ekledik. Birkaç kere ters çevirerek veya 3 sn vorteks ile karıştırdık.
7. Örneği 56°C'de 5 dakika inkübe ettik.
8. Numuneyi 15 saniye vorteksledik.

III. DNA izolasyonu

1. Bir dakika boyunca 12 000 x g'de santrifüj ettik.
2. Tüm lizati, toplama tüpüne yerleştirilen spin kolona transfer ettik.
3. Spin kolonu 11.000 x g'de 1 dakika santrifüjledik.
4. Spin kolonu çıkarıp, altta toplama tüpünde bulunan sıvıyı (akışı) atıp, spin kolonu toplama tüpüne geri yerleştirdik.
5. **500 µl Wash TX1** tamponu ekleyip ve 1 dakika boyunca 11.000 x g'de santrifüj ettik.
6. Spin kolonu çıkarıp, akışı atıp ve spin kolonu toplama tüpüne geri yerleştirdik.
7. **500 µl Wash TX2** tamponu ekleyip ve 1 dakika boyunca 11.000 x g'de santrifüj ettik.
8. Wash TX2 tamponunun izlerini kaldırmak için 1 dakika boyunca 11.000 x g'de döndürdük.
9. Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne (1,5-2 ml) yerleştirip ve bağlı DNA'yı ayırtmak için **50-150 µl Elüsyon tamponu** ekledik.
10. Spin kolon /toplama tüpü düzeneğini oda sıcaklığında 2 dakika inkübe ettik.

11. 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj ettik.

12. Spin kolonu çıkarıp, toplama tüpünü kapattık. DNA'yı analiz/manipülasyon için hazır hale getirdik.

3.3 16S rDNA PCR Yöntemi ile İzolatların Moleküler Tiplendirilmesi ve İsimlendirilmesi

Çalışmamızda 31 adet *Myroides* spp. izolatını 16S rDNA PCR yöntemiyle ileri primer olarak 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' ve geri primer olarak 1492R 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3' universal primerleriyle (BM Lab.Sis, Ankara, Türkiye) çoğalttık. Primerleri, DNaz RNAz free distile su (Multicell, Wisent Inc.) ile sulandırdık, 10 pmol/µl derişiminde primerler elde ettik. 4 µl 5x Firepol Mastermiks (Solis BioDyne, Estonya); 0,5 µl forward primer (Metabion, Almanya); 0,5 µl reverse primer (Metabion, Almanya); 10 µl DNaz RNAz free distile su ile 16S rDNA PCR'ın mastermiksini hazırladık, 5 µl ekstraksiyon ürünlerini ekleyip PCR döngüsünü başlattık. Laboratuvarımızdaki PCR cihazını (CFX-96 Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, ABD) kullanarak; 95°C'de 5 dk; 30 siklus 95°C'de 30sn, 57°C'de 45 sn, 72°C'de 1 dk; 72°C'de 5 dk olacak şekilde amplifikasyon programında PCR işlemini tamamladık.

PCR ürünlerini, 100 volt akım uygulayarak; 40 dakika %1,5 agaroz jel elektroforezinde yürütüp (Resim 3.1), BioVision (Vilber, Smart İmaging) programı ile görüntülerini aldık.

3.4 Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez tankını maksimum çizgisini geçmeyecek şekilde 1xTBE Buffer ile doldurduk.

70 ml. 1xTBE Buffer (10x TBE Bufferı, New Bioscience; steril distile su ile sulandırıp 1x haline getirdik) ile %1,5 agarozu (Prona, Biomax) karıştırdık.

Mikrodalga fırında kaynatmadan ısıttık. Çıkarıp soğumadan elektroforez tankının tarakların olduğu bölüme döktük.

PCR ürünlerimizi ve DNA ladderımızı (100 bp DNA Ladder, Solis Biodyne, Estonya) agaroz jelde görünmeyi sağlayan, DNA boyası (BIO-View™, BioShop Canada) ile 5:1 oranında karıştırıp agaroz jel elektroforezine yükledik. Elektroforezi 100 V; 40 dk. olarak gerçekleştirdik. Görüntüleri, bant oluşumlarını BioVision (Vilber, Smart Imaging) programı ile kaydettik.



Resim 3.1. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

3.5 Sanger Sekanslama

Elde ettiğimiz 16S rDNA PCR ürünlerini Sanger Sekanslama yapılması amacıyla BM Laboratuvar Sistemleri (BM Lab.Sis, Ankara, Türkiye)'ne gönderdik.

BM Lab.Sis'de, PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılmış olup, kitin prosedürlerine uyularak saflaştırılma yapılmıştır. PCR ürünlerinin Sanger dizilemesi, Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak yapıldı .

Bu işlemlerden sonra bize gelen Sekans verilerinin forward ve reverse dosyalarından BioEdit Sequence Alignment Editor uygulaması (Versiyon.7.2.5) ile konsensus sekans dizisi oluşturduk. Uyumlu olan dizileri fas/fasta dosyası formatına dönüştürdük.

3.6 RAPD PCR ile Örneklerin Filogenetik İlişkisinin Araştırılması

Çalışmaya aldığımız izolatların ekstraksiyon ürünleri ile OPA-10:5'-GTGATCGCAG-3'; OPB-15:5'-GGAGGGTGTT-3' primerlerini (BM Lab.Sis, Ankara, Türkiye) kullanarak RAPD PCR yaptık (107).

Kim HS. ve arkadaşlarının (107) yayınındaki protokole göre örnek başına 4 µL Mastermiks, 1 µL 10 pmol/ µL primer, 10 µL DNAz RNAz free su ve 5 µL DNA ekstraksiyon ürünü kullanarak PCR yaptık. OPA-10 ve OPB-15 primerleri ile; *M. odoratus*, *M.odoratimimus* izolatlarımız ve *E.coli* ATCC 25922 bakterisi ile PCR'ı tamamladık (94°C -5dk, 35 siklus (94°C –30sn, 35°C – 1dk, 72°C -1dk), 72°C -5dk). Yayındaki protokolü uygulamamıza rağmen *Myroides* cinsi hiçbir izolatımızla bant elde edemedik. Bundan sonra farklı protokollerle PCR denemeleri yapmaya başladık.

Deneme 1: 4 µL Mastermiks, 1 µL 10 pmol/ µL primer, 10 µL DNAz RNAz free su ve 5 µL DNA ekstraksiyon ürünü kullanarak ve annealing sıcaklığını 32°C yaparak yeni bir protokolle PCR yaptık.

Deneme 2: Aynı primerlerle optimum annealing sıcaklığını bulmak için diğer değişkenler sabit kalmak üzere gradient PCR (40°C-30°C arasında 8 farklı annealing sıcaklıklarıyla) tasarladık.

Deneme 3: Farklı primerler denemeye karar verdik. Chehid Chakroun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (108) kullanılan primerlerle in silico PCR (109) tasarladık hiçbir bant elde edemeyince; Operon RAPD 10mer Kit (Cosmo Genetech, South Korea) dökümanından (110) Chehid Chakroun ve arkadaşlarının yayınındaki (108) primerlere baz dizisi olarak yakın olanları seçerek daha önce tam genom analizi yapıp GenBank'a yüklenmiş *Myroides* sp.'lerle in silico PCR denemeleri yapıp (109) en azından bir bant çoğalması tahmin ettiğimiz, uygun olabilecek üç adet primer; OPH-06 (ACGCATCGCA), OPH-11 (CTTCCGCAGT) ve OPH-15 (AATGGCGCAG) sentezlettik (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara, Türkiye), Deneme 1'deki protokolle PCR yaptık.

Deneme 4: A. Jacobs ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki (111) gibi annealing süresini 30sn.den 1dk.ya; döngü içindeki elongasyon evresini de 1dk.dan 2dk.ya uzattık. Aynı zamanda ekstraksiyon ürünlerimizi ısıtarak reaksiyona eklemeyi denedik.

Deneme 5: Kullandığımız mastermikse ek olarak reaksiyona MgCl₂ iyonu ve Taq polimeraz ekleme, başka bir mastermiks ile PCR deneme durumlarını da değerlendirdik (71, 112-116). Döngü içindeki denaturasyon süresini 1dk.dan 30sn.ye indirdik.

Deneme 6: Bovine Serum Albumin (BSA) eklemek de PCR iyileştiricileri arasında olduğundan BSA (lyophilized powder, ≥ %96, SigmaAldrich, Merck, Almanya) ile PCR döngüsü yaptık. BSA sulandırmak için 0,0125 mg. BSA ve 2,5 ml. DNaz RNAz free suyu karıştırıp filtreli enjektör (Whatman, Sigma, Almanya) ile steril ettik ve reaksiyon başına 0,4 µl kullandık. BSA ile daha önce bant elde edemediğimiz tür olan *M.odoratimimus* için elimizdeki primerlerle gradient (30°C-40°C arasında 8 farklı annealing sıcaklıklarıyla) RAPD PCR tasarladık.

M.odoratus için de daha önce (Deneme 2) bant elde ettiğimiz annealing sıcaklığı 38°C'de PCR yaptık.

Deneme 7: RAPD PCR ile sınırlı sayıda bant elde ettiğimizden, daha fazla bant elde edip edemeyeceğimizi görmek amacıyla AP-PCR çalışması yaptık. Reaksiyon başına 0,4 µl BSA kullanarak, 20 pmol/ µL konsantrasyondaki M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') primerinden (BM Lab.Sis, Ankara, Türkiye) 1 µl, mastermiksten 4 µl, DNAz RNAz free sudan 10 µl, ekstraksiyon ürününden 5 µl ekleyerek AP-PCR'ı 2 siklus (94°C – 5dk, 45°C - 5dk, 72°C - 5dk), 2 siklus (94°C – 5dk, 43°C - 5dk, 72°C - 5dk) ve 35 siklus (94°C – 1dk, 40°C - 1dk, 72°C - 2dk) olarak uyguladık.

3.7 İlk ve Son İzolatın Tam Genom Analizi

Tam genom dizilime işlemleri hizmet alımı ile BM Laboratuvar Sistemlerine yaptırıldı. Hizmet alımı ile yapılan işlemler 3.7.1-4 ile kısaca açıklanmıştır.

3.7.1 Kütüphane Hazırlama

DNA bozunması ve kontaminasyonu %1 agaroz jeller üzerinde izlenmiş. DNA saflığı, NanoPhotometer® spektrofotometre (IMPLEN, CA, USA) kullanılarak kontrol edilmiştir. DNA konsantrasyonu, Qubit® 2.0 Fluorometer'de (Life Technologies, CA, ABD) Qubit® DNA Assay kiti kullanılarak ölçülmüştür.

3.7.2 Kütüphane Oluşturma ve Kalite Kontrol

DNA örneği hazırlıkları için girdi malzemesi olarak örnek başına toplam 1.0µg DNA ile sıralama kütüphanesi, üreticinin önerileri izlenerek NEBNext® DNA Kitaplığı Hazırlama kiti kullanılarak oluşturulmuştur. Her numuneye indeksler eklenmiştir. Genomik DNA, kesme yoluyla rastgele 350bp'lik bir boyuta parçalanmış, ardından DNA parçalarının uçları parlatılmış, A-kuyruğu yapılmış ve Illumina dizilemesi için NEBNext adaptörüyle bağlanmıştır ve ayrıca P5 ve indekslenmiş P7 oligoları ile PCR zenginleştirilmiştir. PCR ürünleri saflaştırılmış (AMPure XP sistemi) ve sonuçtaki kütüphaneler boyut dağılımı için Agilent 2100

Bioanalyzer tarafından analiz edilmiştir ve gerçek zamanlı PCR kullanılarak ölçülmüştür.

3.7.3 Sıralama

Yukarıda oluşturulan bu kütüphaneler, Illumina Novaseq 6000 platformu ile sıralanmış olup; 350bp civarında insert boyutu ile 150bp çift uçlu (paired end) okumalar üretilmiştir.

3.7.4 Yeniden Sıralama Adımları

Konsensus veri dizisi oluşturulmasında, sırasıyla kalite kontrol: FastQC (117), trimming: trimmomatic (118), mapping: Bowtie2 (119), harita sıralaması: samtools (120), varyant arama ve filtreleme: bcftools (121), varyant annotation: snpEff (122), contig üretimi: vcf-consensus (123) yöntemleri ve programları uygulanmıştır.

3.7.5 İzolatların Tam Genom Dizilerinde Yapılan analizler

İlk ve son izolatın (*M.odoratimimus* izolat 1 ve *M.odoratimimus* izolat 31) tam genom analizini veri analizi yöntemleri ile yaptık (124-127).

3.7.5.1 İzolatların Kalite Kontrol (QC) Raporu

1 ve 31 nolu izolat için forward ve reverse okumalarının FastQC (version 0.11.9) raporlarını değerlendirdik.

3.7.5.2 Consensus Dizilimi Oluşturduktan Sonraki İşlemler

Gen-Protein Sentezi İlişkisinin Gösterilmesi (Annotation Oluşturma)

ProkkaAnnotation v.3.2.1 ile annotation oluşturduk.

Online Veritabanları Sonuçlarının Karşılaştırılması

Center for Genomic Epidemiology (CGE) <http://www.genomicepidemiology.org/> (128) PathoFinder ile izolatların patojen olma ihtimalini ve izolatların genomlarındaki patojen ve nonpatojen protein üreten bölgeleri araştırdık.

Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Saptanması

CGE ResFinder-4.1, CGE Kmer ResFinder, CGE ResFinderFG-2.0 sunucusundan (128), CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (125) ve Pathofact pipeline (veri işleme hattı, VIH) (129) araçlarından; her iki izolatın Illumina dosyalarının ham verilerini kullanarak ADG tespit ettik.

İzolatların ANI Raporunun Oluşturulması

Ezbiocloud.net sitesindeki ANI Calculator ile her iki izolat için ANI değeri elde ettik.

SNP Analizi

Sekans okuma ham verileri kullanılarak CGE sitesindeki CSIPhylogeny, web arayüzü ile SNP analizi yaptık.

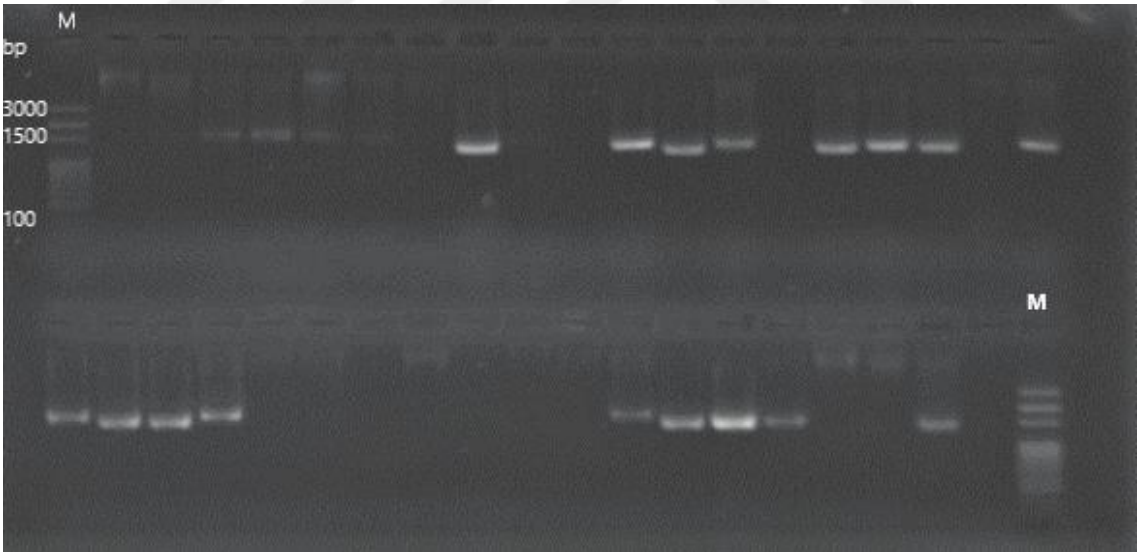
3.7.6 İzolatların GenBank Kaydının Yapılması ve Erişim Numaralarının Alınması

1 ve 31 numaralı *M.odoratimimus* izolatımızı <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/> kayıt portalını kullanarak GenBank'a kaydettik ve erişim numaralarını sistem üzerinden aldık.

4. BULGULAR

4.1 16S rDNA PCR Yöntemi ve Sanger Sekans Analizi ile İzolatların İsimlendirilmesi

16S rDNA PCR ürünlerini agaroz jel elektroforezinde (Resim 4.1), BioVision (Vilber, Smart İmaging) programı ile izolatlarımızdan elde ettiğimiz tek bantların boylarını 1470 bp. civarında ölçtük. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (130) online sitesi ile izolatlarımızı BLAST analiziyle isimlendirdik. 16S rDNA yöntemi ile 31 adet *Myroides* spp. izolatımızdan 26 adedini *M.odoratimimus* ve 5 adedini (**10, 11, 14, 26 ve 28 nolu izolat**) *M.odoratus* olarak tür düzeyinde tanımladık. BM Lab. Sis.(Ankara, Türkiye)'den gelen Sanger sekans verilerinden elde ederek hazırladığımız konsensus diziler kullanılarak <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/genbank/> aracılığıyla izolatlarımıza GenBank erişim numarası aldık (131) (Tablo 4.1).



Resim 4.1: 16S rDNA PCR ürünlerinin elektroforez sonrası görüntülerinin alınması.

Tablo 4.1: İzolatlarımızın GenBank erişim numaraları

| izolat no | İzolatların GenBank Erişim numaraları | izolat no | İzolatların GenBank Erişim numaraları |
|-----------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|
| 1 | OQ632774 | 17 | OQ625546 |
| 2 | OQ632775 | 18 | OQ625547 |
| 3 | OQ625537 | 19 | OQ625548 |
| 4 | OQ625538 | 20 | OQ625549 |
| 5 | OQ625539 | 21 | OQ625550 |
| 6 | OQ625540 | 22 | OQ625551 |
| 7 | OQ632776 | 23 | OQ625552 |
| 8 | OQ625541 | 24 | OQ632778 |
| 9 | OQ632777 | 25 | OQ625553 |
| 10 | OQ625542 | 26 | OQ625477 |
| 11 | OQ625479 | 27 | OQ625554 |
| 12 | OQ625476 | 28 | OQ625555 |
| 13 | OQ625543 | 29 | OQ625556 |
| 14 | OQ625544 | 30 | OQ632779 |
| 15 | OQ625478 | 31 | OQ625557 |
| 16 | OQ625545 | | |

10, 11, 14, 26 ve 28 nolu izolatlar *M.odoratus*, diğerleri *M.odoratimimus*' tur.

İzolatlarımızın elde edildiği hastaların yaş ortalaması 69.8; yaşların medyan değeri 73'tür. En genç hasta 37, en yaşlı hasta 95 yaşındadır. Hastaların 14 adedi kadın, 17 adedi erkektir. Hastanede kalış süresi en az 1 gün, en fazla 363 gündür. Hastaların hastanede yatış süresi medyan değeri 90, aritmetik ortalaması 126,7'dir Bütün izolatların tümü idrar kültürlerinden elde edilmiştir.

Hastaların çoğu komorbiditeleri olan YB. hastalarıdır. İki hasta hariç hastalara üriner girişim yapılmıştır. *Myroides* izolatlarının elde edildiği hastaların demografik özellikleri (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3)'de sunulmuştur.

Tablo 4.2: *Myroides odoratimimus* izole ettiğimiz hastaların demografik özellikleri

| İzolat no | Yatış süresi | Hasta yaşı | Cinsiyet | Üriner girişim | Son durum | Ek hastalıkları | Kullandıkları antibiyotikleri | *KDÜ |
|-----------|--------------|------------|----------|--|-----------|----------------------------------|---|------|
| 1 | 88 | 55 | E | sonda | sağ | pnömoni, KOAH, yanık | imipenem, kolistin | yok |
| 2 | 260 | 75 | E | sonda | ex. | pnömoni, KY, SVH | pip-tazo, imipenem, kolistin, cipro, rif | var |
| 3 | 363 | 51 | E | sonda | ex. | DM, SVH, protein malnutrisyonu | ertapenem, flukonazol | var |
| 4 | 300 | 76 | E | sonda | ex. | pnömozeptis, üroseptis | imipenem, kolistin, pip-tazo+cipro, flukonazol, ampisilin | var |
| 5 | 79 | 60 | E | sonda | ex. | SVH, HT, DM | meropenem, kolistin, vankomisin, flukonazol | var |
| 6 | 140 | 89 | K | sonda | ex. | SVH | meropenem, kolistin, | var |
| 7 | 113 | 81 | K | sonda | sağ | SVH, DM | seftizoksim, kolistin | var |
| 8 | 56 | 63 | E | sonda | ex. | postop. splenektomi, pnömotoraks | cipro, vanko | yok |
| 9 | 316 | 41 | K | sonda | ex. | ampli dizanteri sonrası HÜS+ ABY | vankomisin, kolistin, meropenem | var |
| 12 | 1 | 71 | E | **TUR-P, sistoskopi, 35 gün kalıcı sonda | Sağ | BPH, DM | fosfomisin, koamoksilav | yok |
| 13 | 346 | 78 | K | sonda | ex. | ABY | kolistin, meropenem, flukonazol | var |

| izolat no | Yatış süresi | Hasta yaşı | Cinsiyet | Üriner girişim | Son durum | Ek hastalıkları | Kullandıkları antibiyotikleri | *KDÜ |
|-----------|--------------|------------|----------|----------------|-----------|------------------------------------|---|------|
| 15 | 1 | 61 | E | sonda, TRUS | Sağ | metastatik prostatik adenokarsinom | kolistin, meropenem flukonazol | var |
| 16 | 312 | 68 | E | sonda | ex. | ABY | kolistin, meropenem | var |
| 17 | 246 | 86 | K | sonda | ex. | HT, SVH, ensefalopati | vankomisin, kolistin, meropenem, flukonazol | var |
| 18 | 123 | 37 | K | sonda | ex. | yok | vankomisin, kolistin, meropenem, flukonazol, pip-tazo, ciprofloksasin | var |
| 19 | 121 | 81 | E | sonda | ex. | SVH | sefoperazon-slbaktam, cipro, vankomisin, kolistin | var |
| 20 | 52 | 64 | K | yok | ex. | HT | pip-tazo, ciprofloksasin | var |
| 21 | 175 | 82 | E | sonda | ex. | bilateral pnömotoraks | vankomisin, kolistin | var |
| 22 | 90 | 59 | E | sonda | ex. | HT | vankomisin, pip-tazo, | yok |
| 23 | 1 | 62 | E | ***TUR-MT | ex. | HT, mesane adenokarsinomu | yok | yok |
| 24 | 13 | 60 | K | sonda | ex. | yok | yok | yok |
| 25 | 12 | 76 | K | yok | ex. | ABY, Alzheimer | flukonazol | yok |
| 27 | 85 | 78 | E | sonda | ex. | BHAC, dispne | kolistin, meropenem, flukonazol | var |
| 29 | 140 | 83 | K | sonda | ex. | femur boyun kırığı | meropenem, kolistin | var |
| 30 | 35 | 69 | E | sonda | ex. | SVH, HT | kolistin, meropenem, flukonazol | var |
| 31 | 12 | 91 | K | sonda | ex. | HT, DM | meropenem, kolistin | var |

| izolat no | Yatış süresi | Hasta yaşı | Cinsiyet | Üriner girişim | Son durum | Ek hastalıkları | Kullandıkları antibiyotikleri | *KDÜ |
|--|--------------|------------|----------|----------------|-----------|-----------------|-------------------------------|------|
| <p>*KDÜ: karbapenem dirençli üreme varlığı, **TUR-P: Transüretal Prostat Rezeksiyonu, ***TUR-MT: Transüretal Mesane Kanseri Rezeksiyonu, TRUS: Transrektal USG. YB: Yoğun Bakım Ünitesi, Ex: exitus- ölüm, E: erkek, K: kadın, Pip-tazo: piperasilin-tazobactam, Cipro: ciprofloksasin, Rif: rifampisin, KY: kalp yetmezliği, SVH: serebrovasküler hastalık, DM: Diyabetes Mellitus, HT: Hipertansiyon, HÜS: Hemolitik Üremik Sendrom, ABY: Akut Böbrek Yetmezliği, BHAC: Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu</p> <p>Hastaların demografik bilgilerine Hastane Bilgi Yönetim Sistemi (HBYS) üzerinden erişilmiştir.</p> | | | | | | | | |

Tablo 4.3: *Myorides odoratus* izole ettiğimiz hastaların demografik özellikleri

| izolat no | Yatış süresi | Hasta yaşı | Cinsiyet | Üriner girişim | Son durum | Ek hastalıkları | Kullandıkları antibiyotikleri | *KDÜ |
|---|--------------|------------|----------|----------------|-----------|---------------------------------------|-------------------------------------|------|
| 10 | 28 | 81 | K | sonda | ex. | pnömoni, SVH | moksifloksasin, kolistin, meropenem | var |
| 11 | 56 | 95 | K | sonda | ex. | SVH | kolistin, meropenem | var |
| 14 | 153 | 74 | K | sonda | ex. | SVH, barsak akut iskemik bozukluğu | kolistin, meropenem, vankomisin | var |
| 26 | 65 | 45 | E | sonda | sağ | kaza sonrası renal prankimde hematoma | kolistin, meropenem | yok |
| 28 | 145 | 73 | E | sonda | ex. | SVH, Alzeihmer, | kolistin, meropenem, flukonazol | var |
| <p>*KDÜ: karbapenem drençli üreme varlığı, YB: Yoğun Bakım Ünitesi, Ex: exitus-ölüm, E: erkek, K: kadın, SVH: serebrovasküler hastalık</p> <p>Hastaların demografik bilgilerine Hastane Bilgi Yönetim Sistemi (HBYS) üzerinden erişilmiştir.</p> | | | | | | | | |

4.2 RAPD PCR ile İzolatlar Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

RAPD PCR için Kim HS. ve arkadaşlarının (107) yayınında OPA-10 primeri ile sekiz; OPB-15 primeri ile dört adet bant elde edilmiştir. Aynı protokol ile *Myroides* cinsi bakteri izolatlarımızda biz herhangi bir bant elde edemedik. Ardından yaptığımız denemelerde sırasıyla aşağıdaki sonuçları elde ettik.

Deneme 1: Herhangi bir primerle veya türle bant elde edemedik.

Deneme 2: OPB-15 primeri ve *M. odoratus* izolatıyla annealing sıcaklıkları; 40°C, 39°C, 38°C sıcaklıklarında üçer bant elde ettik. Bant sayısı sıcaklık düştükçe azalmaktaydı. Bu çalışmada, yalnızca *M.odoratus* ve OPB-15 primeri ile 40°C, 39°C, 38°C annealing sıcaklıklarında bantlar elde edebildik. *M.odoratus* için bant elde edebildik (Resim 4.2) ancak *M.odoratimimus* için bant göremedik.



1-8 arası: *M.odoratus* ve OPA-10 primeri ile, **9-16 arası:** *M.odoratus* ve OPB-15 primeri ile

1-8 ve 9-16 arası RAPD PCR annealing sıcaklıkları soldan sağa sırasıyla 40, 39, 38, 36, 34, 32, 30.6, 30 °C olarak değişmektedir.

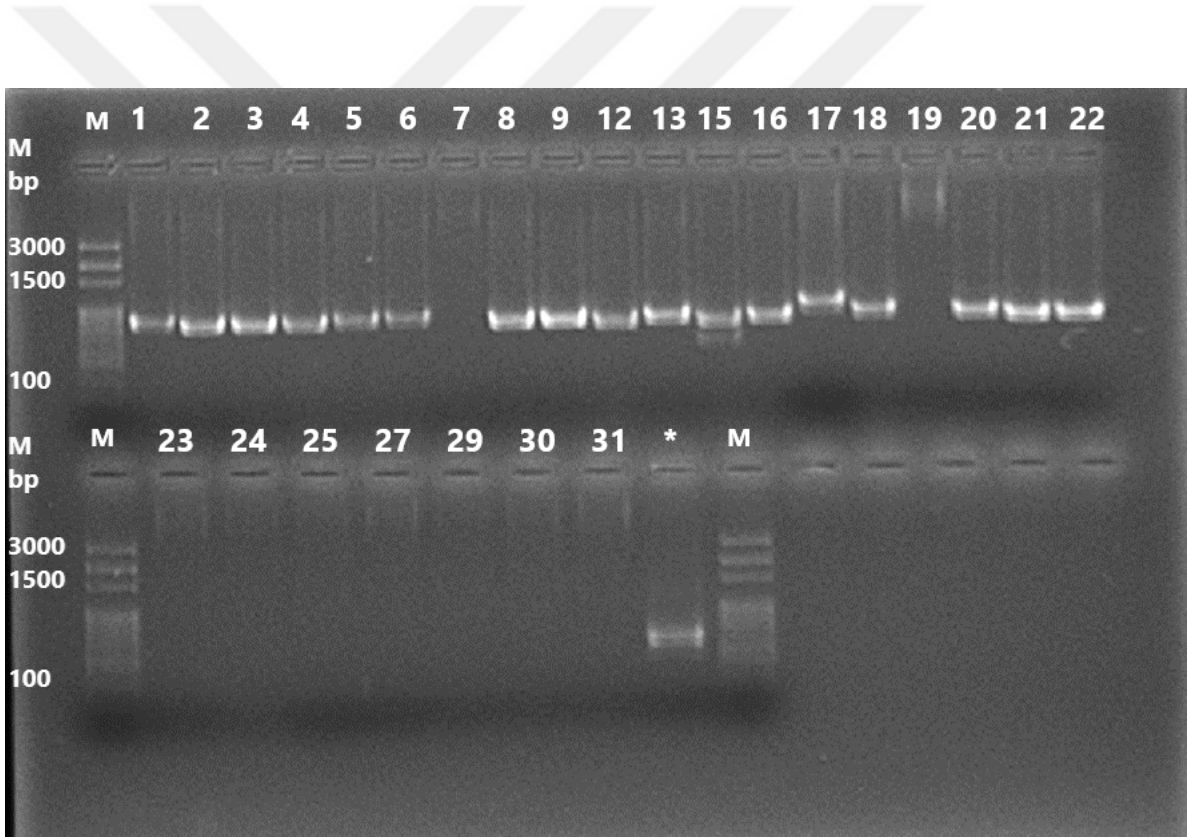
Resim 4.2. *M.odoratus* ile OPA-10 ve OPB-15 primerleriyle gradient PCR

Deneme 3: Yalnızca *M.odoratus* türü ile OPH-15 ve OPA-10 primerleri ile bir adet; OPB-15 primeri ile iki adet bant elde edebildik. OPH-6 ve OPH-11 ile her iki türde bant elde edemedik.

Deneme 4: OPH-06, OPH-15 ve OPA-10 ile iki türde de bant göremedik.

Deneme 5: Taq polimeraz ve MgCl₂ miktarlarını artırmak veya farklı bir mastermiks kullanmak ile *M.odoratimimus* türünde yine sadece tek bant görebildik.

Deneme 6: *M.odoratimimus* türü izolatlarımızla annealing sıcaklığı 35°C, 32,5°C ve 30°C'de **OPA-10** primeri ile dokuz adet izolat hariç tek bant elde ettik (Resim 4.3). *M.odoratus* için annealing 38°C'de, **OPB-15** primeri ile bant elde edebildik (Resim 4.4).



*ATCC *E.coli* 25922

Resim 4.3. OPA-10 primeri ile *M.odoratimimus* türüyle RAPD-PCR

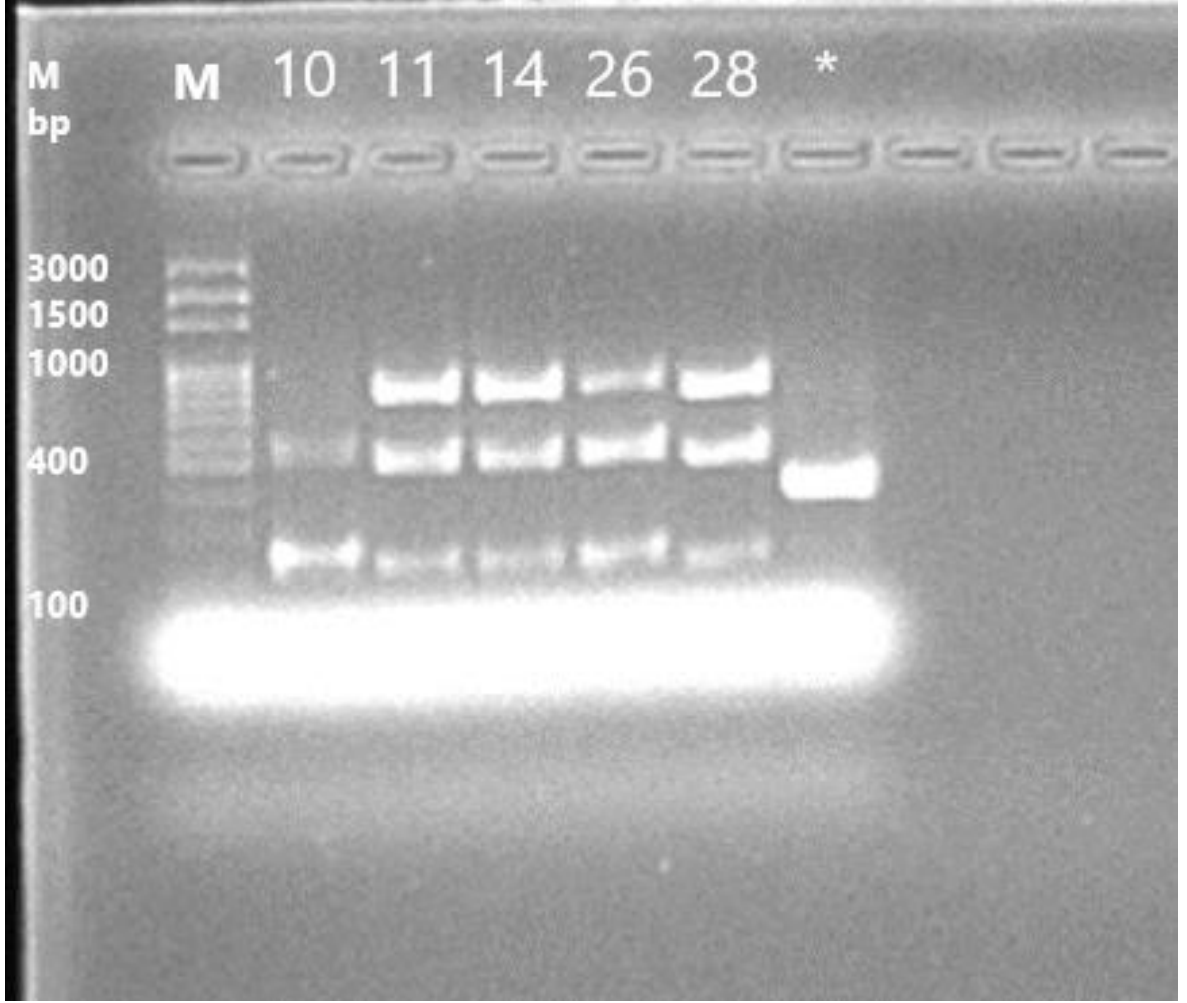
Resim 4.3'teki **15** ve **17** nolu izolatlar hariç tüm bantlar 700 bp. civarındadır. 15 nolu izolatta iki adet bant bulunmakta olup, biri 500 bp. diğeri, 700 bp. civarındadır. 17 nolu izolatın bantı 1000 bp. civarındadır.

15 nolu izolatın elde edildiği hasta, prostat adeno karsinomu tanılı poliklinik hastasıdır. Hastanın izolasyon tarihi öncesinde hastanemizde yatışı bulunmamaktadır. Hasta sağ kalan gruptadır; 15 nolu izolat test edilen antibiyotiklerden **levofloksasine** duyarlıdır. 15 nolu bant görüntüsünde OPA-10 primeri ile 500 bp. ve 700 bp. civarında iki adet bant elde edilmiştir.

17 nolu izolatın elde edildiği hasta, yoğun bakımda yatan komorbiditeleri bulunan kadın hastadır, hastanın 246 gün hastanemizde yatış süresi olup yatışı süresince iki adet daha *Myroides* sp. üremesi olmuştur. Sonraki üremelerde test edilen antibiyotiklerin tümüne direnç saptanmıştır. Hastanın durumu exitus ile sonuçlanmıştır. 17 nolu izolat **gentamisin, imipenem, levofloksasin, piperasilin-tazobactam, amikasin, tobramisin** duyarlıdır. 17 nolu bant görüntüsünde OPA-10 primeri ile diğer bantlardan daha yukarıda,1000bp. civarında bir bant gözlenmiştir.

12 nolu izolatın elde edildiği hasta, dış merkezde izolasyon tarihinden 35 gün kadar önce kalıcı idrar sondası takılmış olan prostat kanseri tanılı, poliklinikten gelen idrar kültüründe üreme saptanan hastadır. Hastanın izolasyon tarihinden önce hastanemizde yatışı bulunmamaktadır, hasta sağ kalan hasta grubundadır; 12 nolu izolat test edilen antibiyotiklerden **ciprofloksasin, imipenem, levofloksasin** antibiyotiklerine duyarlı saptanmıştır. OPA-10 primeri ile diğer izolatlarla benzer bp.seviyesinde, 700 bp.civarında bant gözlenmiştir.

Tüm izolatlar, Phoenix NMIC paneli ile (BD, Phoenix, ABD) test edilmişti. **12, 15 ve 17** hariç tüm izolatlar test edilen tüm antibiyotiklere (amikasin, amoksisilin-klavulonat, ampisilin, sefazolin, sefiksim, seftazidim, seftriakson, siprofloksasin, ertapenem, fosfomisin, gentamisin, imipenem, levofloksasin, nitrofurantoin, piperasilin-tazobaktam, tigesiklin, tobramisin, trimetoprim-sülfometoksazol) dirençli bulunmuştu.



*ATCC *E.coli* 25922

Resim 4.4. OPB-15 primeri ile *M.odoratus* türüyle RAPD-PCR

Resim 4.4'teki izolatlar, çalışmamızdaki *M. odoratus* türü bakterilere aittir. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarında fark bulunmamakta ve test edilen tüm antibiyotiklere dirençlidirler. **11, 14, 26 ve 28** numaralı izolatların bantları 3 adettir; 800 bp, 450 bp ,150 bp civarındadır. **10** numaralı izolatın bantları ise 2 adettir; 450 ve 150 bp. civarındadır.

Deneme 7: RAPD PCR'da bant sayısının az olması ve dokuz adet izolatta hiç bant elde edemememiz üzerine yaptığımız AP-PCR deneme çalışmasında;

7, 19, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 31 nolu dokuz adet izolatta RAPD-PCR'da olduğu gibi bant elde edemedik. Diğer izolatlardaki bant sayılarını da RAPD-PCR'daki gibi tek bulduk.

Sonuç olarak RAPD ve AP PCR'da yaptığımız standardizasyon çalışmalarımızda reaksiyonlara BSA eklemenin PCR'ın çalışmasını sağladığını gözlemledik; ancak tüm denemelerimize rağmen RAPD-PCR ve AP-PCR için ideal sayıda bant elde edilen bir amplifikasyon protokolü geliştiremedik.

Hastalardan elde edilen izolatların listesi, yatak bilgileri, antimikrobiyal direnç durumları, RAPD özellikleri Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'te listelenmiştir.

Tablo 4.4. Hastalardan elde ettiğimiz *Myroides odoratimimus* izolatları ve özellikleri

| İzolat no | İzolasyon tarihi | Salon-yatak numarası | Bakteri panrezistans durumu | RAPD bant özelliği |
|-----------|------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1 | 03. 2018 | B-6 | var | tek |
| 2 | 04. 2018 | A-4 | var | tek |
| 3 | 04. 2018 | A-3 | var | tek |
| 4 | 04. 2018 | A-5 | var | tek |
| 5 | 05. 2018 | B-2 | var | tek |
| 6 | 06. 2018 | B-1. | var | tek |
| 7 | 07. 2018 | D-3 | var | * |
| 8 | 11. 2018 | C-1 | var | tek |
| 9 | 03. 2019 | C-2 | var | tek |
| 12 | 06. 2019 | Plk-1 | yok | tek |
| 13 | 06. 2019 | A-8 | var | tek |
| 15 | 07. 2019 | Plk-2 | yok | çift |
| 16 | 06. 2019 | C-6 | var | tek |

| | | | | |
|--|----------|-----|-----|-------------|
| 17 | 08. 2019 | C-1 | yok | Farklı, tek |
| 18 | 09. 2019 | A-9 | var | tek |
| 19 | 12. 2019 | C-4 | var | * |
| 20 | 01. 2020 | A-9 | var | tek |
| 21 | 02. 2020 | E-2 | var | tek |
| 22 | 03. 2020 | B-1 | var | tek |
| 23 | 12. 2020 | F-2 | var | * |
| 24 | 09. 2021 | A-5 | var | * |
| 25 | 11. 2021 | G-1 | var | * |
| 27 | 01. 2020 | A-2 | var | * |
| 29 | 02. 2020 | B-5 | var | * |
| 30 | 07. 2018 | B-5 | var | * |
| 31 | 11. 2021 | C-2 | var | * |
| A-E: farklı yoğun bakım servisleri, F-G: yoğun bakım dışı farklı servisler, Plk-1, Plk-2: poliklinik hastası, * Bant yok | | | | |

Tablo 4.5. Hastalardan elde ettiğimiz *Myroides odoratus* izolatları ve özellikleri

| İzolat no | İzolasyon tarihi | Salon-yatak numarası | Bakteri panrezistans durumu | RAPD bant özelliği |
|------------------------------------|------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 10 | 06. 2019 | B-3 | var | iki adet |
| 11 | 06. 2019 | C-2 | var | üç adet |
| 14 | 06. 2019 | C-3 | var | üç adet |
| 26 | 01. 2020 | A-8 | var | üç adet |
| 28 | 01. 2020 | C-4 | var | üç adet |
| A-C: farklı yoğun bakım servisleri | | | | |

M.odoratus olarak tanımladığımız **10, 11, 14, 26** ve **28** numaralı izolatların izolasyon tarihleri 10, 11 ve 14 için Haziran 2019; 26 ve 28 için Ocak 2020'dir (Tablo 4.5). Haziran 2019'da farklı hastalardan beş adet; Ocak 2020'de farklı hastalardan iki adet *M.odoratimimus* elde edilmiştir. *M.odoratus* izole edilen

hastaların yattıkları salonlardan aynı tarihte *M.odoratimimus* da izole edilmiştir. Bu verilere göre hastaların yatak numarası, izolasyon tarihi ve elde edilen *Myroides* izolatı arasında ilişki saptayamadık.

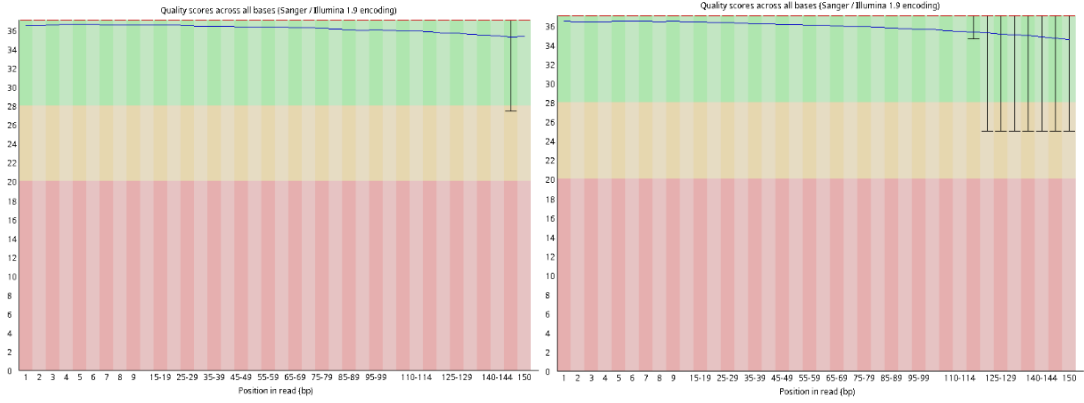
Hastanede *Myroides* spp. izolasyonları sonrasında yapılan sürveyans faaliyetleri kapsamında tıbbi cihazlardan, yatak çevrelerinden, hastaların peçete ve ıslak mendil gibi kişisel malzemelerinden, kullanılmamış foley sonda uçlarından örnekler alınmış olup, bu süreç kapsamında çevre örneklerinde izolasyon sağlanamadığı için çalışmamıza dahil edilememiştir.

4.3. İlk ve Son İzolatın Tam Genom Analizi

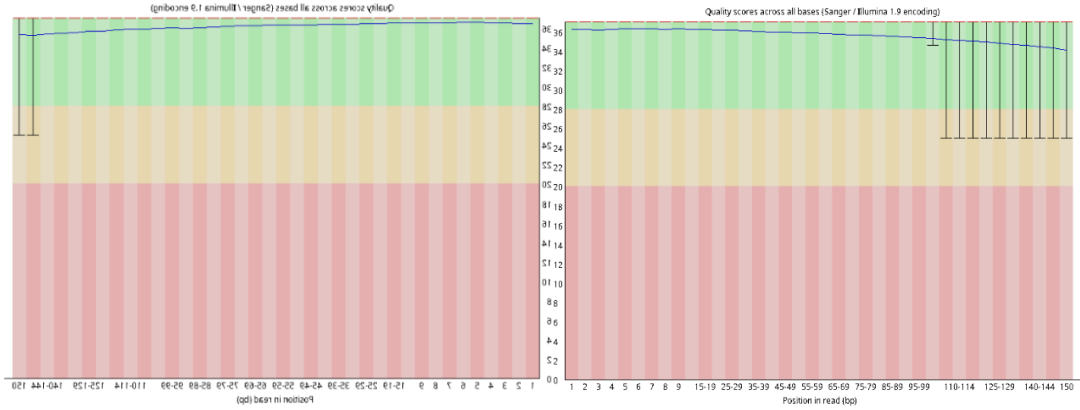
Çalışmamızdaki ilk ve son izolatın tam genom dizilemesini BM Laboratuvar'ına yaptırdık. BM Lab.Sis'ten gelen verilerle çeşitli online araçları kullanarak sonuçlar elde ettik.

4.3.1. İzolatların Kalite Kontrol (QC) Raporu

1 ve 31 nolu izolat için forward ve reverse okumalarının FastQC (127) (version 0.11.9) raporları sonuçlarını kalite skoru yüksek olarak değerlendirdik (Resim 4.5, Resim 4.6). İzolatlarımızın yapılan sekanslamasının analiz etmeye uygun kalitede olduğunu gördük.



Resim 4.5: 1 nolu izolatin soldan sağa; forward ve reverse dosyalarının kalite skoru



Resim 4.6: 31 nolu izolatin soldan sağa; forward ve reverse dosyalarının kalite skoru

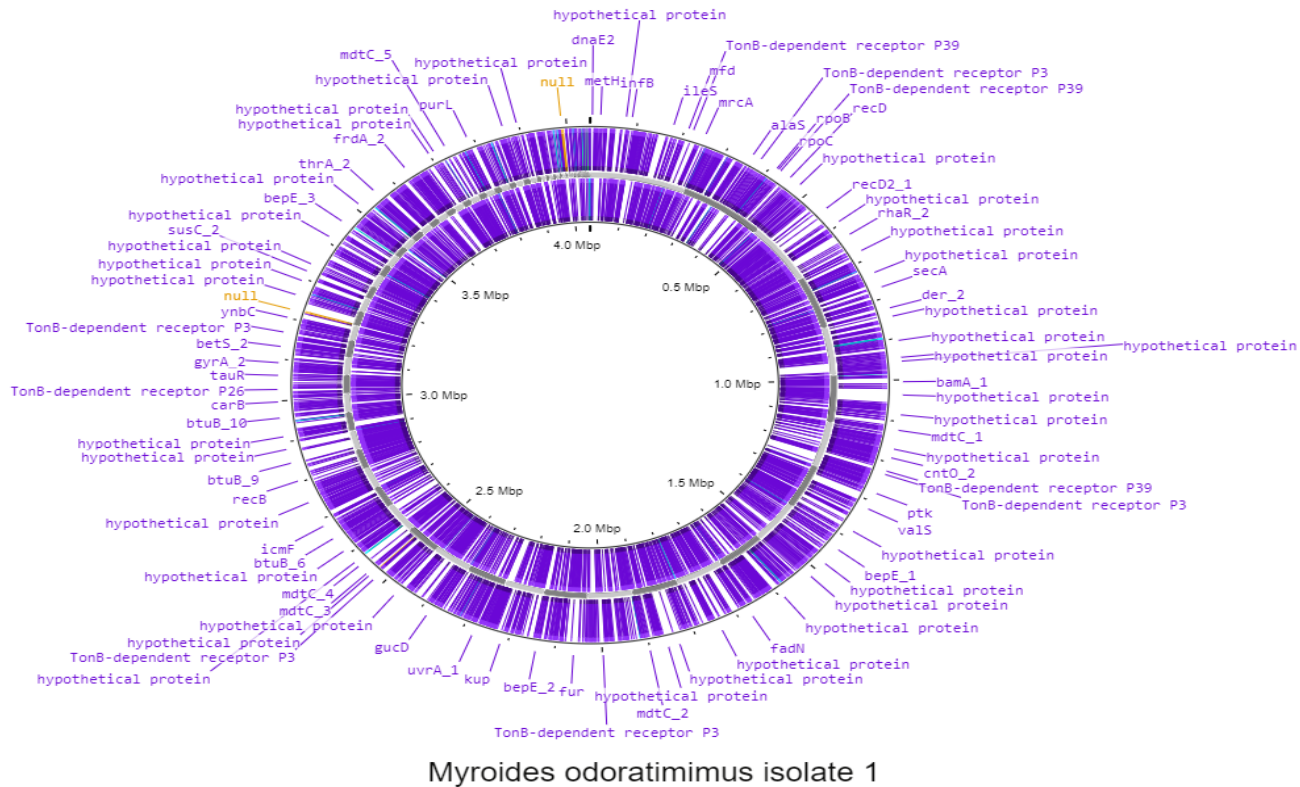
4.3.2. Consensus Dizilimi Oluşturduktan Sonraki İşlemler

Gen-Protein Sentezi İlişkisinin Gösterilmesi (Annotation Oluşturma)

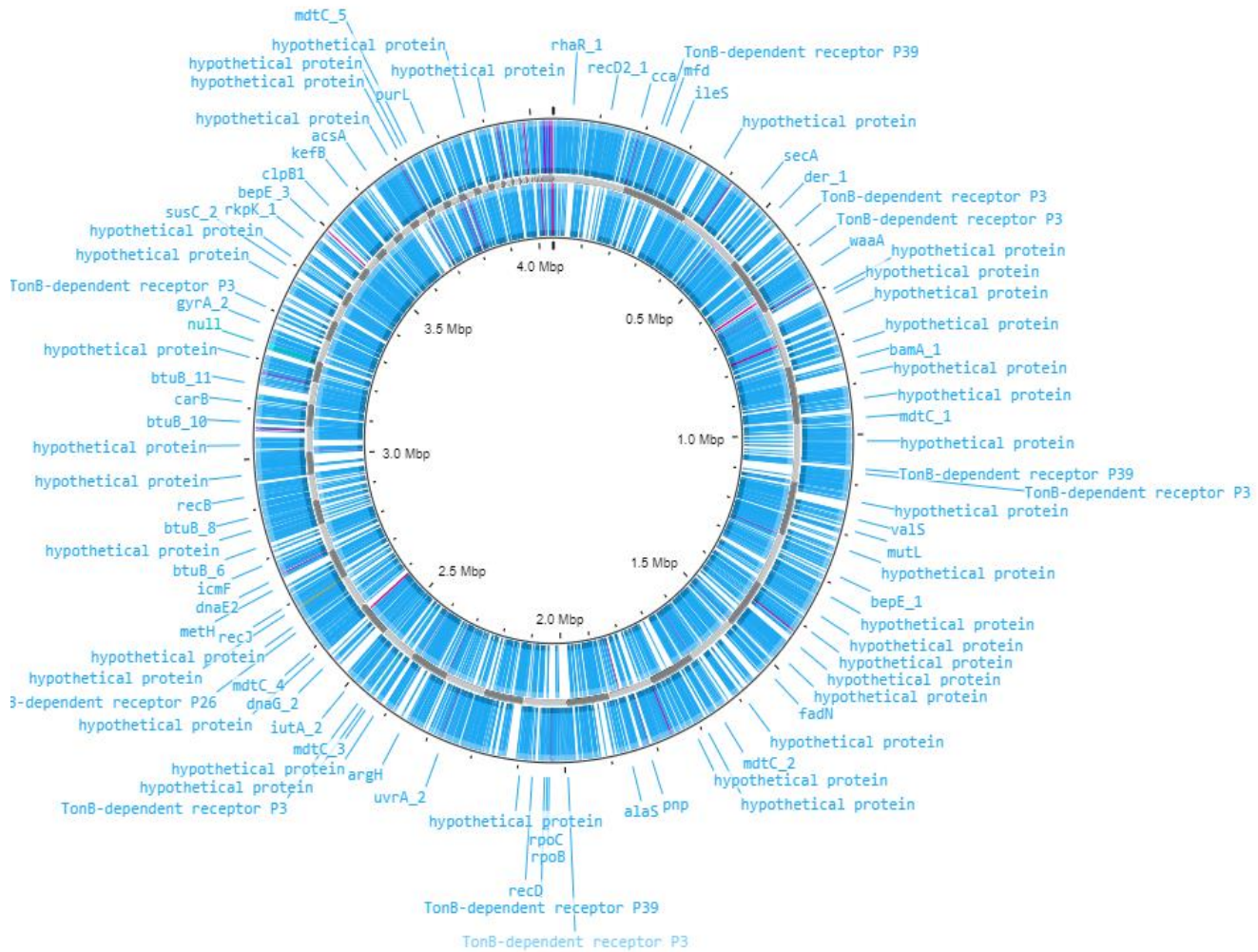
Prokka uygulamasının (132) ProkkaAnnotation v.3.2.1 (126) versiyonu ile toksin, virulans faktörleri, antibiyotik direnç genlerini (ADG) gösteren annotation

verisini iki izolatomuz için oluşturduk. Her iki izolatomuzda GlmU, capL, clpP, sodB, ureA, ureB, ureG, eno proteinlerini kodlayan gen bölgeleri saptadık.

Her iki izolatomuzda multidrug rezistan protein MdtL, MdtE, Stp, MdtB, MdtC, NorM ve MdtA; kolistin rezistan protein EmrA ve EmrB; putatif multidrug rezistan ABC taşıyıcı ATP-binding/permeaz protein YheI; linearmisin rezistan permeaz protein LnrN; fosmidomisin rezistan protein; tetrasiklin rezistan protein sınıf C ve tetrasiklin rezistan protein sınıf C tetA_2; antiseptik rezistan protein qacA; metisilin rezistan düzenleyici protein MecI kodlayan gen bölgelerini saptadık. Virulans faktörlerinden korunmuş virulans faktör B (cvfB); ayrıca toksin ParE1, antitoksin ParD1, serin/treonin-protein kinaz toksin HipA tespit ettik. Her iki izolatomuzla Prokka ile Proksee arayüzünde (127) annotation elde ettik (Resim 4.7, Resim 4.8, Resim 4.9).

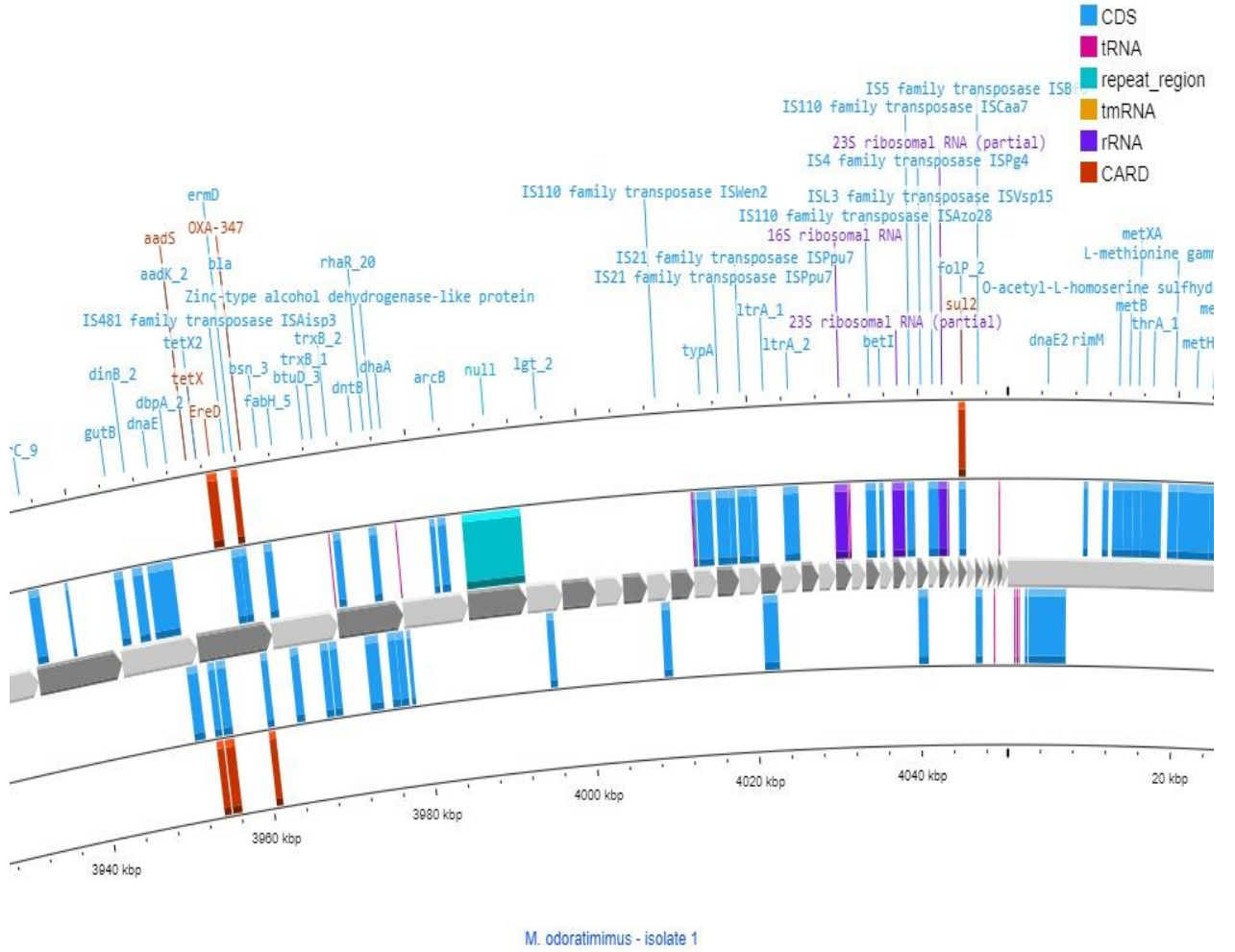


Resim 4.7: 1 nolu izolataın Prokka ile Proksee arayüzündeki annotation haritası



Myroides odoratimimus isolate 31

Resim 4.8: 31 nolu izolatin Prokka ile Proksee arayüzündeki annotation haritası



Resim 4.9: 1 nolu izolatin gen ve genin kodladığı proteinlerin Prokka ve CARD ile Proksee arayüzündeki annotation haritasının yakından görünümü

Online Veritabanları Sonuçlarının Karşılaştırılması

Center for Genomic Epidemiology (CGE) servisler (124) bölümü PathoFinder aracı ile analiz raporunda 1 ve 31 nolu izolat için insan patojeni olma olasılığının 0.266 olduğu, izolatların muhtemelen insan dışı patojen olabileceği bilgisine ulaştık. Rapordan her iki izolatin da Propionil-CoA karboksilaz, ATP

sentaz, açıl-CoA dehidrogenaz zincir proteini, sülsinil-CoA sentetaz, 50S ribosomal protein L16, 30S ribosomal protein S12 ve S14, açıl taşıyıcı protein, hipotetik protein, translasyon başlatıcı faktör IF-1 proteinlerini kodladığı ve bunlardan yalnızca ABQ04565 protein ID kodlu hipotetik proteinin (133) patojen ailelerle eşleştirildiği verisini elde ettik.

Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Saptanması

CGE ResFinder-4.1 (Tablo 4.6), KmerResistance-2.2 sunucusundan (Tablo 4.7 ve Tablo 4.8) her iki izolat için ADG tespit ettik. CGE ResFinderFG-2.0 sunucusundan ise yalnızca sülfometazin direncini saptadık.

Tablo 4.6. CGE ResFinder-4.1 aracı ile 1 ve 31 nolu izolatın dirençli olduğu ilaç sınıfları, antibiyotik direnç genleri ve genlerin GenBank erişim numaraları

| İlaç sınıfı | ADG | ADG GenBank erişim no | ADG bölgesiyle eşleşme %si, skoru |
|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| makrolid; linkozamid; streptogramin | <i>ErmF</i> | M17808 | 99.38 |
| Makrolid | <i>EreD</i> | KP265721 | 93.4 |
| sulfamethoksazole | <i>sul2</i> | AY034138 | 100.0 |
| glisiklin; tetrasiklin | <i>tetX</i> | M37699 | 99.83 |
| beta laktam-betakaktamaz inhibitörü | <i>MUS-1</i> | AF441286 | 99.46 |
| beta laktam grubu | <i>OXA-347</i> | ACWVG01000053 | 100.0 |

Tablo 4.7. 1 nolu izolatin KmerResistance-2.2 sunucusu raporu sonuçları

| Şablon | Skor | Beklenen değer | Şablon uzunluğu | *Sorgu_id | **Sorgu_kapsamı |
|---|----------|----------------|-----------------|-----------|-----------------|
| <i>Myroides odoratimimus</i> 1 numaralı izolatin tam genomu | 28475988 | 1435 | 143641 | 82.04 | 82.04 |
| <i>blaOXA-347</i> | 202740 | 379 | 825 | 100.00 | 100.00 |
| <i>blaMUS-1</i> | 189018 | 343 | 741 | 99.46 | 100.00 |
| <i>ere(D)</i> | 296278 | 524 | 1227 | 96.66 | 100.00 |
| <i>erm(F)</i> | 202351 | 368 | 801 | 99.38 | 100.00 |
| <i>mph(E)</i> | 59939 | 450 | 885 | 85.84 | 108.99 |
| <i>sul2</i> | 241998 | 363 | 816 | 100.00 | 100.00 |
| <i>tet(X)</i> | 268741 | 509 | 1167 | 99.48 | 101.39 |
| *Sorgu id: query_id, **Sorgu_kapsamı: query_coverage | | | | | |

Tablo 4.8. 31 nolu izolatin KmerResistance-2.2 sunucusu raporu sonuçları

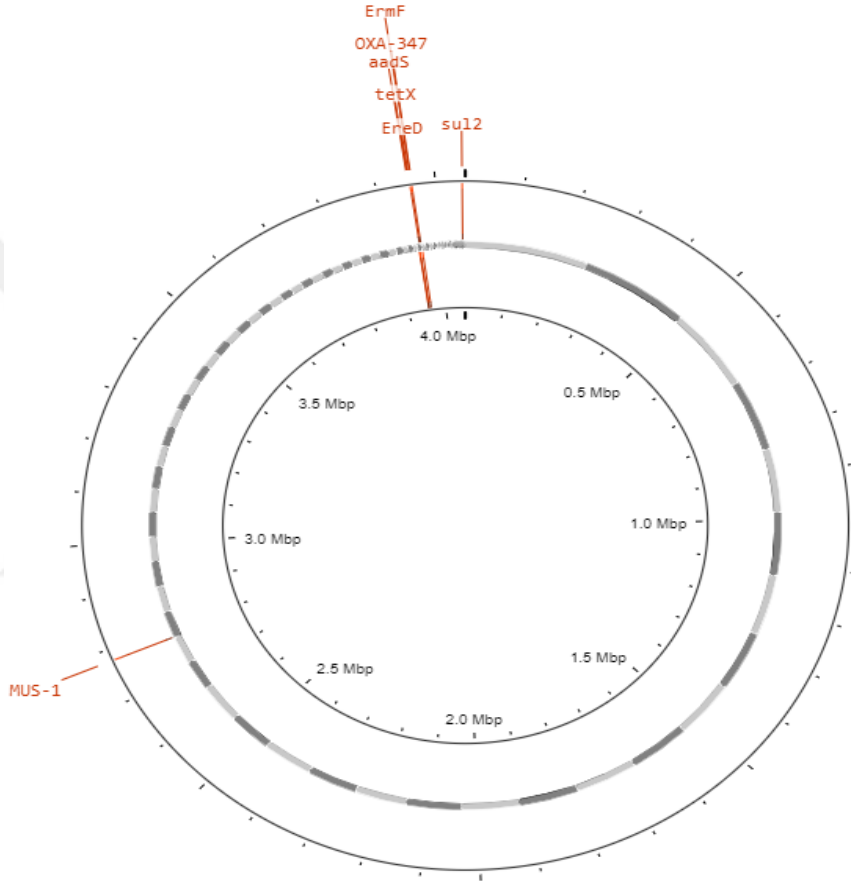
| Şablon | Skor | Beklenen değer | Şablon uzunluğu | *Sorgu_id | **Sorgu_kapsamı |
|--|----------|----------------|-----------------|-----------|-----------------|
| <i>Myroides odoratimimus</i> 31 numaralı izolatin tam genomu | 27888349 | 1409 | 143641 | 81.64 | 81.64 |
| <i>blaOXA-347</i> | 218385 | 350 | 825 | 100.00 | 100.00 |
| <i>blaMUS-1</i> | 188478 | 321 | 741 | 99.33 | 100.00 |
| <i>ere(D)</i> | 307342 | 483 | 1227 | 96.66 | 100.00 |
| <i>erm(F)</i> | 196071 | 345 | 801 | 99.38 | 100.00 |
| <i>mph(E)</i> | 58023 | 424 | 885 | 85.84 | 108.99 |
| <i>sul2</i> | 187003 | 354 | 816 | 100.00 | 100.00 |
| <i>tet(X)</i> | 227267 | 491 | 1167 | 99.74 | 101.21 |
| *Sorgu id: query_id, **Sorgu_kapsamı: query_coverage | | | | | |

Ayrıca ADG saptamak için kullandığımız CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (125, 134, 135) veritabanıyla her iki izolatta aynı direnç genlerini tespit ettik (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. CARD online aracı ile 1 ve 31 nolu izolatın dirençli olduğu ilaç sınıfları, antibiyotik direnç mekanizması ve direnç genleri

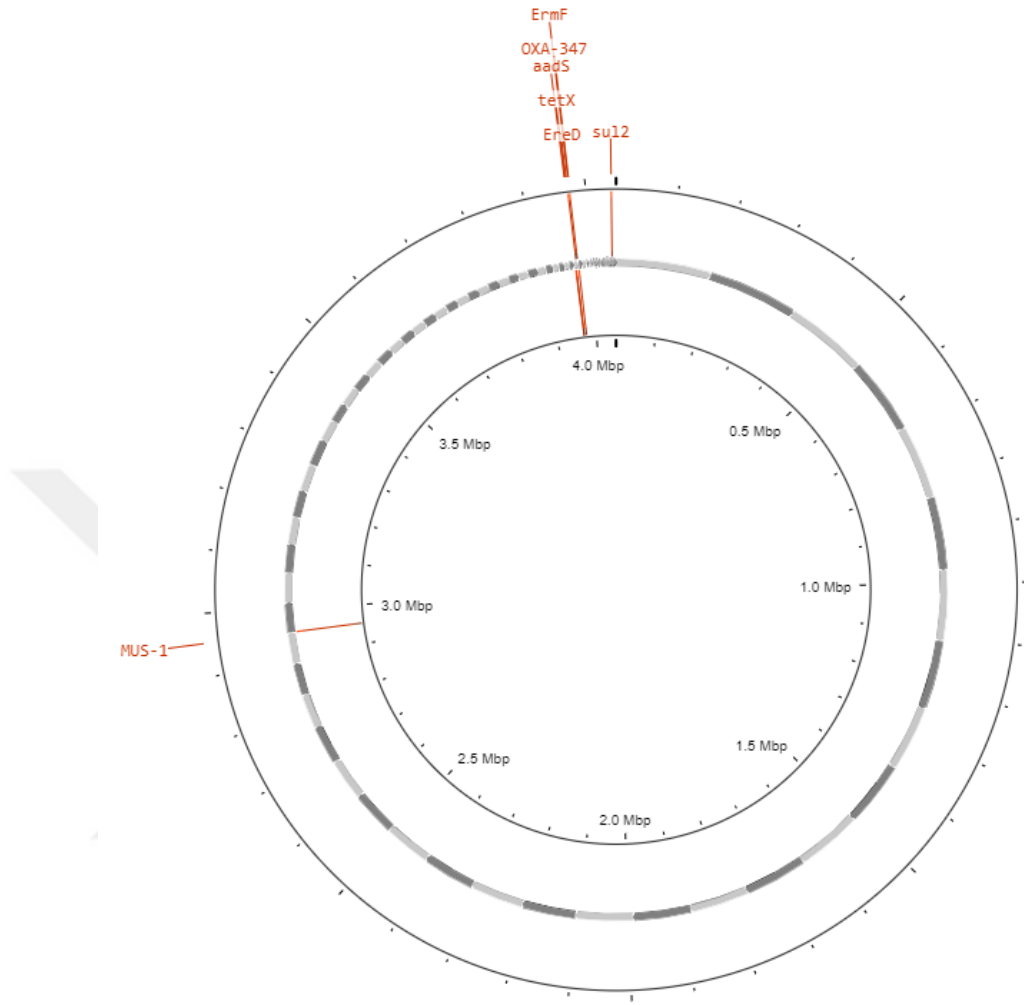
| İlaç Sınıfı | Direnç Mekanizması | ADG | ADG bölgesiyle eşleşme %si, skoru |
|---|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| dezenfektan ve antiseptik | antibiyotik efluks | <i>qacG</i> | 39.42, düşük skor, muhtemel direnç |
| karbapenem; penam; penem | antibiyotik inaktivasyonu | <i>MUS-1</i> | 98.78 |
| glikopeptid antibiyotik | antibiyotik hedef yer değişikliği | <i>vanT</i> geni; <i>vanG</i> sınıfı | 35.01, düşük skor, muhtemel direnç |
| makrolid; linkozamid; streptogramin ; streptogramin a ; streptogramin b | antibiyotik hedef değişimi | <i>ErmF</i> | 98.5 |
| makrolid | antibiyotik inaktivasyonu | <i>EreD</i> | 95.34 |
| glisiklin; tetrasiklin | antibiyotik inaktivasyonu | <i>tetX</i> | 99.48 |
| sülfonamid | antibiyotik hedef yer değişikliği | <i>sul2</i> | 100.0 |
| aminoglikozid antibiyotik | antibiyotik inaktivasyonu | <i>aadS</i> | 100.0 |
| karbapenem, sefalosporin | antibiyotik inaktivasyonu | OXA-347 | 100.0 |

Proksee arayüzü ile CARD çalıştığımızda 1 ve 31 nolu izolatta *EreD*, *ErmF*, *OXA-347*, *tetX*, *aadS*, *su12*, *MUS-1* direnç genlerine ulaştık (Resim 4.10, Resim 4.11).



Myroides odoratimimus isolate 1

Resim 4.10: 1 nolu izolatin Proksee arayüzü – CARD ile saptadığımız direnç genleri



Myroides odoratimimus isolate 31

Resim 4.11: 31 nolu izolatin Proksee arayüzü – CARD ile saptadığımız direnç genleri

ADG araştırmasında son olarak Pathofact VİH (136) kullandık. Her iki izolatta *smeC*, *mcr-1.4*, *poxxA*, *aac(6')-IY*, *sul2*, *tetX*, *ereD*, *ermF*, *floR* ve *MUS-1* ADG genlerini tespit ettik (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Pathofact VİH ile 1 ve 31 nolu izolatin direçli olduğu ilaç sınıfları, direnç mekanizması ve direnç genleri

| İlaç Sınıfı | ADG Kategorisi | Direnç Mekanizması | ADG |
|---|----------------|--------------------------------|-------------------|
| aminoglikozid, sefalosporin, penem, sefamisin | multidrug | antibiyotik efluks | <i>smeC</i> |
| peptid (kolistin gibi) | peptid | antibiyotik hedef değişimi | <i>mcr-1.4</i> |
| linkozamid, makrolid, fenikol | multidrug | antibiyotik hedef değişimi | <i>poxtA</i> |
| aminoglikozid | aminoglikozid | antibiyotik inaktivasyonu | <i>aac(6')-IY</i> |
| sulfonamid | sulfonamid | antibiyotik hedef yer değişimi | <i>sul2</i> |
| glisiklin, tetrasiklin | tetrasiklin | antibiyotik inaktivasyonu | <i>tetX</i> |
| makrolid | MLS | antibiyotik inaktivasyonu | <i>ereD</i> |
| linkozamid, makrolid, streptogramin | MLS | antibiyotik hedef değişimi | <i>ermF</i> |
| fenikol | fenikol | antibiyotik efluks | <i>floR</i> |
| karbapenem | beta-laktam | antibiyotik inaktivasyon | <i>MUS-1</i> |

Yararlandığımız ADG sunucularında ortak olarak *sul2*, *tetX*, *ereD*, *ermF* ve *MUS-1* genlerini tespit ettik. CARD ile diğerlerinden farklı olarak *qacG*, *aadS*, ve *vanT*; *vanG* sınıfı genlerini tespit ettik. Pathofact VİH ile ADG saptayan diğer araçlara göre daha fazla sayıda direnç geni; diğer araçlardan farklı olarak *smeC*, *mcr-1.4*, *aac(6')-IY* ve *floR* genlerini elde ettik. Farklı araçlar kullanmamız sonucu Pathofact VİH ile diğer araçlarla bulamadığımız kolistin direncini ve bunu kodlayan *mcr-1.4* direnç genini saptadık.

İzolatların ANI Raporunun Oluşturulması

ANI (Average Nucleotide Identity) değeri hesabı iki prokaryotik genom dizisini karşılaştırmak için bakterileri sınıflandırırken ve tanımlarken yaygın olarak

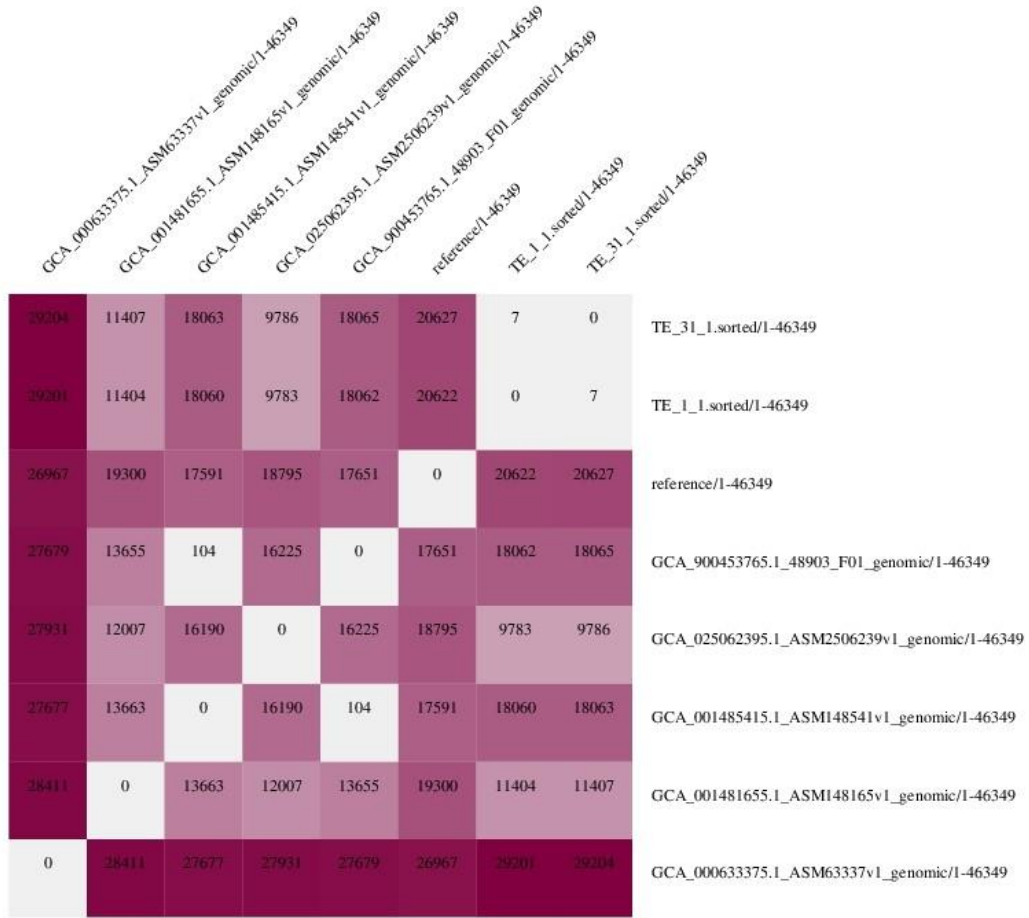
kullanılmaktadır. ANI Calculator, BLAST yerine USEARCH kullanan orijinal OrthoANI algoritmasının geliştirilmiş bir versiyonu olan OrthoANlu algoritmasını uygulamaktadır (137). ANI Calculator Ezbiocloud.net (138) kullanarak, iki izolatımızı %99.95 benzer tespit ettik (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. İzolatlarımızın ANI Calculator raporu

| Metrik (ölçümlü) | Değer |
|---|--------------|
| OrthoANlu değeri (%) | 99.95 |
| 1 nolu izolat genom uzunluğu (bp) | 4,004,520 |
| 31 nolu izolat genom uzunluğu (bp) | 4,003,500 |
| Ortalama hizalama (alignment) uzunluğu (bp) | 3,337,298 |
| 1 nolu izolat genom coverage (kapsamı) (%) | 83.34 |
| 31 nolu izolat genom coverage (kapsamı) (%) | 83.36 |

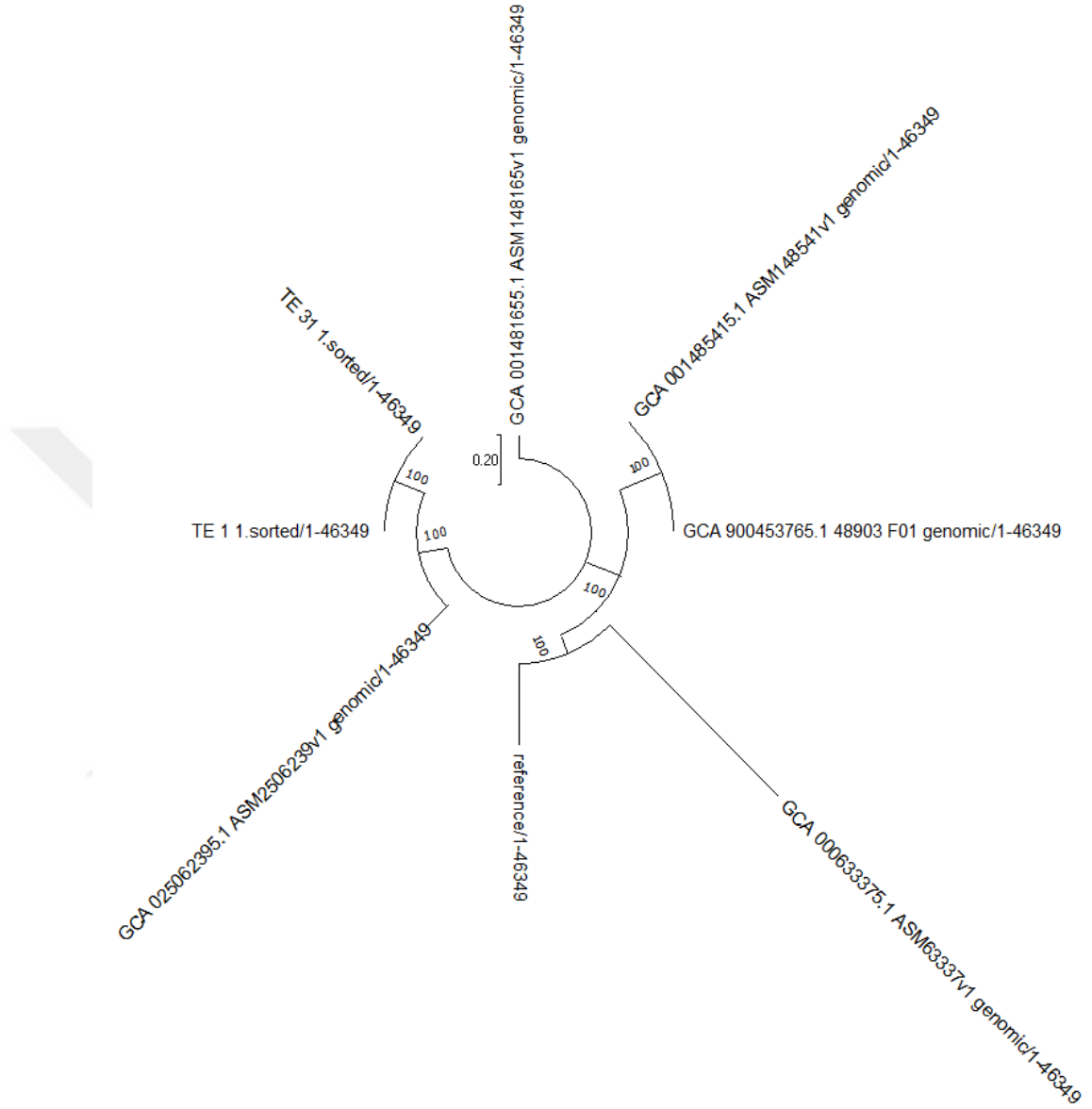
SNP Analizi

İki izolatın arasında 7 tane SNP farkı vardır ve bu iki izolat birbirlerine çok benzerdir. Bu analizde filogeni için CSIPhylogeny (139) (<https://cge.food.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>) ve Proksee arayüzünü (127)kullandık (Resim 4.12, Resim 4.13, Resim 4.14).



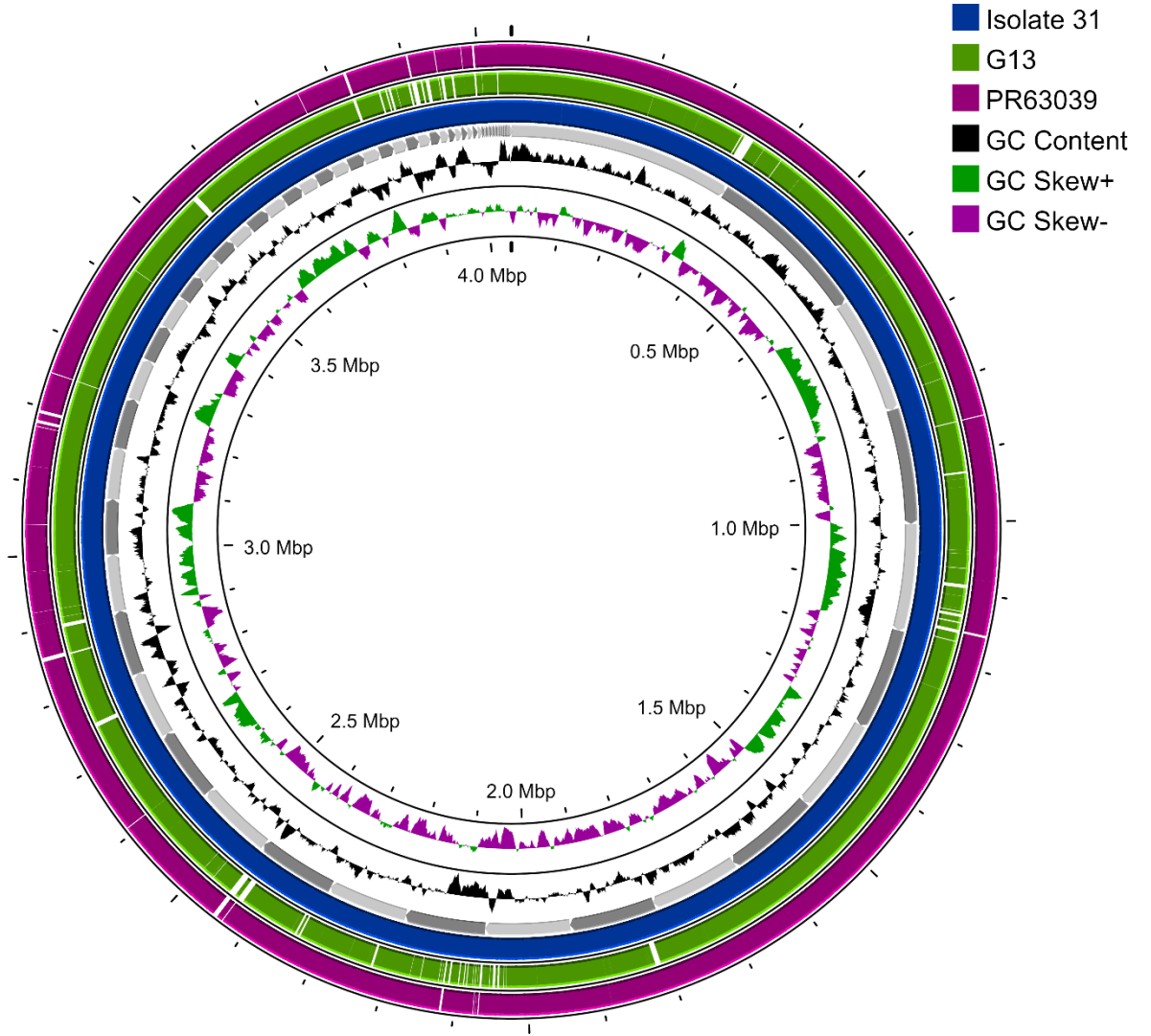
TE_1_1.ignored: *Myroides odoratimimus* 1 nolu izolat, TE_31_1.ignored: *Myroides odoratimimus* 31 nolu izolat, GCA_025062395.1_ASM2506239v1_genomic: (140), GCA_001485415.1_ASM148541v1_genomic: (141), GCA_000633375.1_ASM63337v1_genomic: (142), GCA_001481655.1_ASM148165v1_genomic: (143), reference.ignored: *M. odoratimimus* G13 kromozomu (144), GCA_900453765.1_48903_F01_genomic: (145)

Resim 4.12: CGE CSIPhylogeny ile *Myroides odoratimimus* izolat 1 ve 31 genomunun, GenBank'taki diğer *M.odoratimimus* kromozomları ve referans genom (G13) ile filogenetik ilişkinin incelenmesi



TE_1_1.ignored: *Myroides odoratimimus* 1 nolu izolat, TE_31_1.ignored: *Myroides odoratimimus* 31 nolu izolat, GCA_025062395.1_ASM2506239v1_genomic: (140), GCA_001485415.1_ASM148541v1_genomic: (141), GCA_000633375.1_ASM63337v1_genomic: (142), GCA_001481655.1_ASM148165v1_genomic: (143), reference.ignored: *M. odoratimimus* G13 kromozomu (144), GCA_900453765.1_48903_F01_genomic: (145)

Resim 4.13: MEGA programı versiyon 11.0.13 ile oluşturulan filogenetik sirküler ağaçta *Myroides odoratimimus* izolat 1 ve 31 genomunun, GenBank'taki diğer *M.odoratimimus* kromozomları ve referans genom (G13) ile filogenetik ilişkisinin karşılaştırmalı görünümü



Resim 4.14: *Myroides odoratimimus* izolat 1 ve 31 genomunun, G13 ve PR63039 izolatları kromozomları ile karşılaştırmalı görünümü (Proksee web arayüzü kullanılarak çizilmiştir.)

Çalışmamıza dahil ettiğimiz *Myroides* spp. izolatlarının Mart 2018 ile Kasım 2021 arasında dolaşımında olduğunu ve yapılan analiz ile bu iki izolat arasındaki SNP sayısının çok düşük olması sebebiyle *M.odoratimimus* izolatlarımızın tek bir kaynaktan köken alabildiğini düşündük. Kısıtlı bütçemiz sebebiyle tüm izolatların tam genom analizi yapılamamıştır.

4.3.3 İzolatların GenBank Kaydının Yapılması ve Erişim Numaralarının Alınması

1 ve 31 numaralı *M.odoratimimus* izolatımızı <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/> kayıt portalı üzerinden GenBank'a kaydettik ve erişim numaralarını aldık (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: *Myroides odoratimimus* 1 ve 31 numaralı izolatların GenBank Bioproject erişim numaraları

| İzolat numarası | Bioproject erişim numarası |
|-----------------|----------------------------|
| 1 | PRJNA967180 |
| 31 | PRJNA967385 |

5. TARTIŞMA

Myroides türleri çevresel mikroorganizmalar olarak bilinmesine rağmen insanlarda kan, idrar, balgam, yara ve kulak akıntısı gibi çeşitli klinik örneklerden nadir de olsa izole edilmiştir (146-148). *Myroides odoratimimus* ve *Myroides odoratus*, insan enfeksiyonlarından izole edilen en yaygın *Myroides* türleridir. Bunun yanı sıra literatürde *M. injenensis*'in neden olduğu bir ÜSE ve bir selülit olgusu bildirilmiştir (146). Biz de tüm örneklerimizi idrar kültüründen izole ettik. Elde ettiğimiz *Myroides* spp.'leri 16S rDNA tiplendirmesiyle beş adet *M.odoratus* ve 26 adet *M.odoratimimus* olarak isimlendirdik.

Myroides spp.'nin şimdiye kadar birkaç salgına sebep olduğu bilinmektedir. Bu salgınlar *M. odoratimimus*'un neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarıdır (14, 15, 38). Ülkemizden ilk salgın Yağcı ve ark. tarafından 2000 yılında bildirilmiştir (15). 1994-1997 yılları arasında üç yıl süren bu salgında 22 hastadan 31 adet *M. odoratimimus* izole edilmiştir. Hastaların hepsinde idrar yolu enfeksiyonu mevcutken kolaylaştırıcı faktör olarak idrar taşı veya idrar yolu neoplazmları bulunmaktadır (15). İkinci salgın ise 2012 yılında Tunus'ta bir üroloji kliniğinden bildirilmiştir (14). 7 adet *M. odoratimimus* tespit edilen bu salgında hastaların biri hariç hepsinde üriner sistemde taş olmasından dolayı hastalara yatışı esnasında endoürolojik cerrahi uygulanmıştır. Tüm izolatlar test edilen tüm antibiyotiklere dirençli olmasına rağmen üç hastanın siprofloksasin ve rifampisin ile başarıyla tedavi edilebildiği bildirilmiştir (14). Romanya'daki bir hastanede meydana gelen üçüncü salgın ise Haziran-Ağustos 2017 tarihleri arasında *M. odoratimimus*'a bağlı dört ÜSE vakasıdır. Hastaların üçü hastane enfeksiyonu kabul edilmiş ve bu salgında da tüm *Myroides* izolatları test edilen tüm antibiyotiklere dirençli olmasına rağmen iki hastanın tigesiklin ile başarılı bir şekilde tedavi edilebildiği belirtilmiştir (38). Her ne kadar izole edilen *Myroides* türleri test edilen antibiyotiklere dirençli olsa da, tedavide birtakım rejimler denenmiş ve bunun bazı hastalarda etkili olduğu görülmüştür (14, 38). Bizim izolatlarımızın elde edildiği hastalar da bu salgınlardaki gibi ÜSE ya da idrar yolu kolonizasyonuydu ve biz de tüm izolatlarımızı sadece idrar kültüründen elde ettik.

Gülmez ve ark, 228 hastanın idrar (215), beyin omurilik sıvısı (BOS) (6), doku (4), kateter (2), kan (1), periton (1), drenaj sıvısı (1) ve trakeal aspirasyon (1) materyalinden elde ettiği 437 kültür örneğiyle yaptıkları çalışmada dahil edilen tüm izolatların antimikrobiyal direnç oranlarını; amikasin %96,7, imipenem %99,1, levofloksasin %95,2, PIP/TZP %96,5, seftazidim %97,83, siprofloksasin %96,5 ve tobramisin %99,1 olarak bulmuştur (149). Literatürde görüldüğü gibi *Myroides* türleri karbapenem ve çoklu ilaç direnç sebebi ile hastane enfeksiyonları için önemli bir risk oluşturmaktadırlar.

Çalışmamızda izolatların ait olduğu iki hasta hariç tüm hastalar üriner girişim yapılmış hastalardır. Bir hastaya TURP; bir hastaya TUR-MT; bir hastaya da TRUS işlemi yapılmıştır. İki hastanın üriner neoplazmı, bir hastanın BPH bulunmaktaydı. İzolatların elde edildiği hiçbir hastada üriner taş öyküsüne rastlanmamıştır. Eldeki veriler ışığında üriner girişim öyküsünün *Myroides* sp. ÜSE gelişimi için risk faktörü olabileceği düşünülebilir.

Myroides spp. enfeksiyonları genellikle bağımsızlığı baskılanmış hastalarda görülmektedir; ancak immun kompetan konaklarda da enfeksiyon bildirilmiştir (12, 13). Literatürde *Myroides* spp. enfeksiyonları diyabet, mesane neoplazmı, kronik böbrek yetmezliği, KOAH, karaciğer hastalığı, cilt ülseri ve kronik steroid kullanımı olan hastalarda gösterilmiştir (146). Bizim de **12, 15, 23** numaralı izolatların elde edildiği hastalar hariç tüm hastalar YBÜ.'nde yatmaktaydı ve hemen hepsinin eşlik eden hastalıkları mevcuttu.

İzolatların elde edildiği hastalarda serebrovasküler hastalık, kalp hastalıkları, koroner arter hastalığı (KAH), son dönem böbrek hastalığı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), üriner neoplazm, BPH, DM gibi komorbid hastalıklar mevcuttu. *Myroides* türlerinin yüksek glukoz konsantrasyonlarında iyi üremesi (146, 150) ve komorbiditesi olan hastaların *Myroides* sp. enfeksiyonuna ve kolonizasyonuna yatkın olması nedeniyle özellikle diabetes mellituslu hastalarda idrar yolu enfeksiyonlarında etken olabileceği düşünülebilir. Ayrıca bakteri kolonizasyonunun enfeksiyonlar için risk faktörü olabileceği akıldan çıkarılmamalıdır (151).

Yaptığımız çalışmada, *Myroides* spp. izolatlarının tamamını 16S rDNA dizilimini kullanarak tür düzeyinde tanımladık. Bu sonuç literatüre uygun olarak *Myroides* türlerini etkin bir şekilde ayırt etmek için 16S rDNA PCR yönteminin bir referans yöntem olarak kullanılabileceğini desteklemektedir (47). Percy Schröttner ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmada MALDITOF-MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ve moleküler yöntemlerin tür düzeyinde tanımlama için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır (47). Kutlu ve arkadaşlarının 2020 yılındaki yayınında farklı bir marka MALDITOF (MALDI-TOF-MS, bioMérieux, Nürtingen, Almanya) cihazı kullanmış olup tür düzeyinde tanımlama yapılamamıştır ve 16S rDNA temelli sekanslama ile tür düzeyinde tanı elde edilmiştir (52). Yıldırım ve arkadaşları ise 2023 yılındaki çalışmasında *Myroides* spp. izolatını Percy Schröttner ve arkadaşlarının kullanmış olduğu marka MALDITOF (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ile tür düzeyinde tanımlamışlardır (148). Tür düzeyindeki tanımlamanın bu cins bakterilerde zor olduğu bilinmektedir. Moleküler tanımlama ve MALDITOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) tür düzeyinde tanımlamada kullanılmaktadır. Kutlu ve arkadaşlarının kullanmış olduğu MALDITOF (MALDI-TOF-MS, bioMérieux, Nürtingen, Almanya) cihazı tür düzeyinde tanımlamada başarısız olmuştur. Biz de moleküler tanımlama ile 5 adet *M. odoratus* ve 26 adet *M. odoratimimus* bularak tür düzeyinde tanımlamamızı gerçekleştirdik. Böylece hastanemizde eş zamanlı olarak iki farklı *Myroides* türünün dolaşımında olduğunu gösterdik. Bu durum moleküler tiplendirme yöntemleri öncesinde bakterinin tür düzeyinde tanımlanmasının önemini göstermektedir.

Hastane kaynaklı *Myroides* spp. enfeksiyonlarının kaynağı genellikle bilinmemektedir; ancak enfeksiyonlar çoğunlukla kontamine bir su kaynağına maruz kaldıktan sonra veya girişim ya da travma sonrasında ortaya çıkmıştır (13, 14, 38). Hastanede salgın sırasında çevresel örnekleme yapmak önemlidir (152). Çevre örneklerinin rutin olarak toplanması önerilmemektedir; ancak salgınlar esnasında önemli bilgiler sağlaması ve salgına neden olan mikroorganizmanın kaynağının saptanması amacıyla mutlaka çevresel örnekleme yapılmalıdır.

Hastanede *Myroides* spp. izolasyonları sonrasında yapılan sürveyans faaliyetleri kapsamında tıbbi cihazlardan, yatak çevrelerinden, hastaların peçete ve ıslak mendil gibi kişisel malzemelerinden, kullanılmamış foley sonda uçlarından örnekler alınmış olup, bu süreç kapsamında evre örneklerinde izolasyon sağlanamadığı için çalışmamıza dahil edilememiştir.

Yaptığımız araştırmada iki farklı *Myroides* türü elde ettik. 10, 11, 14, 26 ve 28 numaralı izolatları *M.odoratus*, geri kalan izolatları *M.odoratimimus* olarak isimlendirdik. 10, 11 ve 14 numaralı izolatların izolasyon tarihleri Haziran 2019 iken 26 ve 28 numaralı izolatlar için Ocak 2020'ydi. Bununla birlikte Haziran 2019'da farklı hastalardan beş adet; Ocak 2020'de farklı hastalardan iki adet *M.odoratimimus* elde ettik. *M.odoratus* izole edilen hastaların yattıkları salonlardan aynı tarihte *M.odoratimimus* da elde ettik. Bu sonuçlara dayanarak hastaların yatak numarası, izolasyon tarihi ve elde edilen *Myroides* türünün kaynağı arasında ilişki saptanamamıştır.

Salgınlar esnasında izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılmış olan RAPD-PCR'da Kim HS. ve arkadaşlarının çalışmasında izolatlar arasında özdeş patern elde edilmiştir (107). Yağcı ve arkadaşlarının çalışmasında da RAPD-PCR ve PFGE yapılmış olup RAPD-PCR için özdeş profillerin elde edildiğı belirtilmiş olup yayına jel görüntüsü eklenmemiştir ve kullanılan primerler yayında belirtilmemiştir. Bu yüzden kendi izolatlarımızla karşılaştırma yapamadık. Ayrıca yaptıkları PFGE'de, 1994-1995 yılları arasındaki ve 1995-1997 yılları arasındaki paternler kendi arasında özdeş saptanmıştır (15). Benzer şekilde Kutlu ve arkadaşları PFGE yapmış olup izolatları arasında aynı paterni elde etmiştir (52). S.Ktari ve arkadaşları PFGE ile iki ayrı periyotta iki farklı patern elde etmiştir (14). Biz de RAPD-PCR ile izolatlarımız arasındaki filogenetik ilişkiyi inceledik ve izolatlarımızda aynı türlerin kendi içinde benzer bant oluşturduğunu saptadık. İzolatlarımızın tümüne PFGE veya YND analizi yapmakla daha kapsamlı bilgi edinebilirdik; ancak bütçemizin sınırlı olması nedeniyle yapamadık.

İzolatlarımızın arasında farklı direnç paternine sahip olan 15 ve 17 nolu örnekler ile RAPD-PCR'da diğerlerinden farklı bant gözlemedik. Klonal ilişki araştırmada kullanılan RAPD-PCR ve AP-PCR yöntemlerinde standardizasyon zordur ve yöntemlerin ayırım gücü düşüktür. Kim HS. ve arkadaşlarının (107) yayınında OPA-10 primeri ile sekiz; OPB-15 primeri ile dört adet bant elde edilmiştir. Aynı protokol ile *Myroides* cinsi bakteri izolatlarımızda biz herhangi bir bant elde edemedik.

RAPD çalışmalarının standardizasyonu ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (71-75). Sonuç olarak, RAPD-PCR yöntemiyle her laboratuvarında aynı protokollerle farklı sonuçlar alınabilmektedir, yöntemin standardizasyonu kolay değildir. RAPD PCR primerleri üreten firmanın talimat kataloğunda (Eurofinsgenomics RAPD 10-mer Kits and Primers, Eurofins Genomic, Almanya) (76), RAPD PCR sonucu oluşan amplifikasyon ürünlerinin sayısı bölümünde her reaksiyon için farklı amplifikasyon ürünleri sayısının primer dizisine, genomik diziye ve genom boyutuna bağlı olduğu belirtilmiştir. (77). Prokaryotlardaki küçük genom boyutları için ürettikleri çoğu primerle hiç bant oluşmaması gerektiği; ancak birkaç laboratuvarın prokaryotik DNA'dan çoklu amplifikasyon ürünleri rapor ettiği belirtilmiştir. Bu tür sonuçların primer ve DNA şablonu arasındaki uyumsuzluk temelinde açıklanabileceği sonucuna ulaşılmıştır (78). Bizim çalışmamızda da ideal sayıda bir RAPD bant sayısı elde edememiş olmamız tüm bu anlatılan sebeplerle olabilir.

Myroides cinsi bakteriler hastanede muhtemelen su gibi bir kaynaktan varlığını sürdürmektedir. Ayrıca hastaneye gelen çiçek topraklarında veya toprakla uğraşan yoğun bakım çalışanlarında aralıklı olarak kolonizasyon olması muhtemeldir. Bu nedenle el hijyenine uyumun sağlanması; mekanik ventilasyon, santral venöz kateterlerin sık kullanımının önlenmesi; hastaların hastanede kalış sürelerinin kısaltılması; uygunsuz antibiyotik kullanımının önlenmesi gibi enfeksiyon kontrol ve hijyen önlemleri *Myroides* sp. enfeksiyon ve kolonizasyonunu önlemek için gereklidir.

Çalışmamızda *M.odoratimimus* olarak adlandırdığımız ilk ve son izolatin arasında 7 SNP farkı bulunduğunu, iki izolatin birbirine çok benzer olduğunu tespit ettik. Buna göre Mart 2018-Kasım 2021 arasında *M.odoratimimus* için aynı bakterinin dolaşımında olduğu söylenebilir. Tüm izolatlara YND analizi yapabileseydik izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi detaylandırabilirdik. Bütçemizin kısıtlı olması nedeniyle yalnızca ilk ve son izolatta yaptık.

Shaohua Hu ve arkadaşları üç farklı çevresel (H1bi, L41, CCUG.12700) ve üç farklı klinik patojen (CCUG.12901, CCUG.10230, CIP.101113) *M.odoratimimus* ile yaptıkları tam genom analizinde, kapsül ve kapsüler polisakkaritler (GalE, GlnU, wbjD/wecB n, ugd, uppS, RmlA, RmlB, capL, wecC); hücre içi yaşama ve invazyon faktörleri (katA, clpP, EF-Tu, sodB); moleküler şaperonlar (hsp60, DnaK); üreaz (ureA, ureB, ureG); acinetobactin (bauE); streptokokkal enolaz (eno); hem biyosentezi (hemB, hemL) ve T4SS efektörleri (Trans-2-enoylCoAredüktaz) proteinlerini elde etmiştir (2). Biz de her iki izolatomızda GlnU, capL, clpP, sodB, ureA, ureB, ureG, eno proteinlerini saptadık.

Yararlandığımız ADG sunucularında ortak olarak *sul2*, *tetX*, *ereD*, *ermF* ve *MUS-1* genlerini tespit ettik. CARD ile diğerlerinden farklı olarak *qacG*, *aadS*, ve *vanT*; *vanG* sınıfı genlerini tespit ettik. Pathofact VİH ile ADG saptayan diğer araçlara göre daha fazla sayıda direnç geni; diğer araçlardan farklı olarak *smeC*, *mcr-1.4*, *aac(6)-IY* ve *floR* genlerini elde ettik. Farklı araçlar kullanmamız sonucu Pathofact VİH ile diğer araçlarla bulamadığımız kolistin direncini ve bunu kodlayan *mcr-1.4* direnç genini saptadık. Bu bilgilere göre, Pathofact VİH ile diğer araçlara göre daha fazla sayıda direnç geni elde ettik ve kolistin direncine de ulaştık. Kurt ve arkadaşları tam genom analizi sonuçlarında Pathofact veri işleme hattı kullanmamışlar ve izolatlarında kolistin direnç genini raporlamamışlardır. (153). Farklı araçlarla analiz yapmak farklı verilere ulaşmak için kullanılabilir.

Myroides spp. geniş antibiyotik direncine sahiptir; ancak direnç mekanizmaları halen belirsizdir (29). Kromozomal olarak kodlanan iki metallo-beta-laktamaz, *M. odoratus* için *TUS-1* ve *M. odoratimimus* için *MUS-1*'in beta-

laktamlara karşı dirençle ilgili olduğu düşünülmektedir (28). Pek çok suşun beta-laktamlara, monobaktamlara, karbapenemlere ve aminoglikozidlere dirençli olduğu kabul edilmiştir (38). Yaygın ilaç direnci nedeniyle, uygun antibiyoterapi seçimi oldukça zordur. Rifampisin ile kombine kinolonların tedavi için uygun ilaçlar olduğu bildirilmektedir. Öte yandan bazı vakalarda tigesiklin, meropenem, kotrimoksazol veya piperasilin/tazobaktam olumlu klinik sonuçlar vermiştir (38). Bizim de üçü hariç tüm izolatlarımız test edilen tüm antibiyotiklere dirençlidir. 12 nolu izolatın test edilen antibiyotiklerden ciprofloksasin, imipenem, levofloksasin antibiyotiklerine duyarlı olduğu; 15 nolu izolatın test edilen antibiyotiklerden sadece levofloksasine duyarlı olduğu ve 17 nolu izolatın ise gentamisin, imipenem, levofloksasin, piperasilin-tazobactam, amikasin, tobramisin duyarlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle tür düzeyinde hızlı ve güvenilir tanımlama yöntemleri ile antibiyotik test yöntemlerinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarları için önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Myroides türleri çoğul ilaç direnci gösterdiğinden ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olabileceğinden, etkili tedaviyi seçmek için hızlı ve güvenilir tanımlama yöntemleri gerekmektedir. Ayrıca bu mikroorganizma insanda nadiren enfeksiyona sebep olsa da pan-dirençli doğası ve direnç genlerinin türler arası transfer tehdidi potansiyeli göz önüne alındığında, klinisyenlerin *Myroides* spp. enfeksiyonuna ve bunun salgınlara neden olma ihtimaline karşı dikkatli olmaları gerekmektedir. Bu organizma nerede ve ne zaman izole edilmiş olursa olsun, rapor edilmelidir.

Hastanemiz YB. Servisi 2018 Mart ayından önce farklı bir binada bulunmaktaydı. 1, 2, 3, 4 numaralı hastaların *Myroides odoratimimus* izolasyonu hastalar eski binada iken yapılmış olup daha sonra servis ve hastalar şu anki binaya taşınmıştır. YND sonucuna göre yaklaşık 44 aylık bir zaman farkına ve taşınma durumuna rağmen ilk ve son izolat aynı klondan köken alıyor olabilir. Bu bilgiler ışığında tek kaynaktan hastalar arasında çapraz bulaş ile salgın olabileceği düşünülebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. *Myroides* cinsi mikroorganizmalar, genellikle yoğun bakım ünitelerinde karşımıza çıkmaktadır. Bizim de 12, 15, 23 numaralı isolatların elde edildiği hastalar hariç tüm hastalar YBÜ.'nde yatmaktaydı ve hemen hepsinin eşlik eden hastalıkları mevcuttu. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda dirençli ÜSE'lerde *Myroides* cinsi akla gelmelidir.
2. Bu türlerle enfeksiyonlar en sık idrar yolu enfeksiyonu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bizim de tüm örneklerimiz sadece idrar kültüründen elde edilmiştir.
3. DM, KBY, KOAH, KY, siroz, malignite gibi sistemik hastalıklar ve kortikosteroid kullanımı gibi immunsupresyon durumları ile üriner kateterizasyon, üriner neoplazm varlığı, üriner girişim de bu mikroorganizmalarla enfeksiyon ve kolonizasyonu artırmaktadır. İzolatları elde ettiğimiz hastalardan ikisi hariç tümünde sistemik hastalıklar ve komorbid durumlar mevcuttu.
4. Bu cins bakterilerde tür düzeyinde tanımlama yapmak için 16S rDNA PCR ya da MALDITOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) gerekmektedir. Biz de isolatlarımızı 16S rDNA PCR ile; 5 adet *M.odoratus*, 26 adet *M.odoratimimus* olarak tespit ettik. 16S rDNA temelli moleküler tanımlama tür ayırımında kullanılabilir.
5. Bu mikroorganizmalar, çoğul ilaç direnci barındırmaktadır. Bizim de 12, 15 ve 17 nolu üç adet izolatomuz hariç tüm izolatomuz test edilen tüm antibiyotiklere dirençlidir. 12 nolu izolat test edilen antibiyotiklerden ciprofloksasin, imipenem, levofloksasin antibiyotiklerine duyarlıdır. 15 nolu izolat test edilen antibiyotiklerden yalnızca levofloksasine duyarlıdır. 17 nolu izolat gentamisin, imipenem, levofloksasin, piperasilin-tazobactam, amikasin, tobramisin duyarlıdır. Bu bakterilerde tür tanımlaması ve

antibiyotik duyarlılık testi yapmak tedavi için yol gösterici olabilir ve önerilmektedir.

6. İzolatlar arasındaki filogenetik ilişki analizinde RAPD ve AP PCR uyguladık. Bu yöntemler kolay ve ucuz olmasına rağmen, *Myroides* cinsi izolatlarımızla yaptığımız çalışmamızda standardizasyon aşamasında oldukça zorlandık. Tüm denemelerimize rağmen RAPD-PCR ve AP-PCR için ideal sayıda bant elde edilen bir amplifikasyon protokolü geliştiremedik. *M.odoratimimus* türü 26 adet izolatımızın 16 adedinde tek, yalnızca 12 nolu izolatta iki bant tespit ettik. *M.odoratus* türü beş adet izolatımızın dört adedinde üç, bir adedinde iki bant elde ettik. Bu cins bakterilerde RAPD veya AP PCR yerine PFGE ya da YND yöntemleri tercih edilebilir.
7. RAPD ve AP PCR çalışmalarımızla bu PCR yöntemlerin standadizasyonunun zor ve ayırım gücünün düşük olduğunu bulduk. Yaptığımız denemelerde reaksiyonlara BSA eklemenin, PCR'ın çalışmasını sağladığını gözlemledik. Bu konuda çok merkezli ve daha çok örnek üzerinden yapılan çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.
8. *M.odoratimimus* olarak adlandırdığımız ilk ve son izolatin tam genom analizi sonucunun birbirine çok benzer olduğunu, Mart 2018'den beri *M.odoratimimus* için aynı bakterinin dolaşımında olduğunu düşündük. YND yöntemleri filogenetik ilişki analizinde oldukça faydalıdır. Bütçemizin kısıtlı olması sebebiyle tüm izolatlarımıza YND yapamadık.
9. PathoFinder aracı ile analiz raporunda 1 ve 31 nolu izolat için insan patojeni olma olasılığının 0.266 olduğu, izolatların muhtemelen insan dışı patojen olabileceği bilgisine ulaştık. Rapordan her iki izolatin da Propionil-CoA karboksilaz, ATP sentaz, açıl-CoA dehidrogenaz zincir proteini, sülsinil-CoA sentetaz, 50S ribosomal protein L16, 30S ribosomal protein S12 ve S14, açıl taşıyıcı protein,

hipotetik protein, translasyon başlatıcı faktör IF-1 proteinlerini kodlayan genleri içerdiği bilgisini elde ettik.

10. Her iki izolatomızda *GlmU*, *capL*, *clpP*, *sodB*, *ureA*, *ureB*, *ureG*, *eno* proteinlerini kodlayan genleri saptadık.
11. YND analizi verilerimizle Pathofact VİH kullanarak *mcr1.4* genini ve kolistin direncini tespit ettik. Birkaç farklı analiz aracı kullanmakla ek veriler kazanılabilir, farklı araçların kullanılması önerilir.
12. YND ile ilk ve son izolatta aynı klonal ilişkiyi saptadığımızdan, hastalarda çapraz bulaşın olabileceğini düşündük. Bu nedenle olası salgınlardan korunmak için genel hijyen kuralları önem kazanmaktadır.
13. *Myroides* türleri çoğul ilaç direnci gösterdiğinden ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olabileceğinden, etkili tedaviyi seçmek için hızlı ve güvenilir tanımlama yöntemleri gerekmektedir.
14. *Myroides* cinsi bakteriler insanda nadiren enfeksiyona sebep olsa da pan-dirençli doğası ve direnç genlerinin türler arası yüksek transfer potansiyeli göz önüne alındığında, klinisyenlerin *Myroides* spp. enfeksiyonuna ve bunun salgınlara neden olma tehdidine karşı dikkatli olmaları önemlidir. Bu nedenle bu organizma nerede ve ne zaman izole edilmiş olursa olsun rapor edilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Gunzer F, Rudolph WW, Bunk B, Schober I, Peters S, Müller T, Oberheitmann B, Schröttner P. Whole-genome sequencing of a large collection of *Myroides odoratimimus* and *Myroides odoratus* isolates and antimicrobial susceptibility studies. *Emerg Microbes Infect* 2018 Apr 4;7(1):61.
2. Hu S, Cao L, Wu Y, Zhou Y, Jiang T, Wang L, Wang Q, Ming D, Chen S, Wang M. Comparative genomic analysis of *Myroides odoratimimus* isolates. *Microbiologyopen*. 2019 Feb;8(2):e00634.
3. Hu S, Jiang T, Zhou Y, Ming D, Gao H, Wang M. Genomic analysis of the multi-drug-resistant clinical isolate *Myroides odoratimimus* PR63039. *Mol Genet Genomics*. 2017 Feb;292(1):133-144.
4. Ming DS, Chen QQ, Chen XT. Analysis of resistance genes in pan-resistant *Myroides odoratimimus* clinical strain PR63039 using whole genome sequencing. *Microb Pathog*. 2017 Nov;112:164-170.
5. Stutzer, M. J. Zur Frage Über die Fäulnisbakterien im Darm. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I Orig* 1923; 91: 87–90.
6. Stutzer, M. & Kwaschnina, A. Aussaaten aus dem Fäzes des Menschen gelbe Kolonien bildende Bakterien (Gattung *Flavobacterium* u. a.). *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I Orig* 1929; 113, 219–225.
7. Marc V, Paul S, Urbain T, Bart H, Bernardet JF, Peter V, Karel K. Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) strains to a new genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 1996; 46, 926–932.
8. Gary W.Procop, Elmer W. Koneman, William M. Janda. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 7th Edition; 2017. p: 378t.

9. Yoon J, Maneerat S, Kawai F, Yokota A. *Myroides pelagicus* sp. nov., isolated from seawater in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006 Aug;56(Pt 8):1917-1920.
10. Zhang XY, Zhang YJ, Chen XL, Qin QL, Zhao DL, Li TG, Dang HY, Zhang YZ. *Myroides profundus* sp. nov. isolated from deep-sea sediment of the southern Okinawa Trough. *FEMS Microbiol Lett*. 2008 Oct;287(1):108-12.
11. Cho SH, Chae SH, Im WT, Kim SB. *Myroides marinus* sp. nov. a member of the family Flavobacteriaceae, isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011 Apr;61(Pt 4):938-941.
12. Maraki S, Sarchianaki E, Barbagadakis S. *Myroides odoratimimus* soft tissue infection in an immunocompetent child following a pig bite: case report and literature review. *Braz J Infect Dis*. 2012; 16: 390–2.
13. Benedetti P, Pellizzer G, Rassa M, Pavan G, Sefton A. Septic shock, pneumonia, and soft tissue infection due to *Myroides odoratimimus*: Report of a case and review of *Myroides* infections. *Infection*. 2010; 39(2):161-165.
14. Ktari S, Mnif B, Koubaa M, Mahjoubi F, Ben Jemaa M, Mhiri MN, Hammami A. Nosocomial outbreak of *Myroides odoratimimus* urinary tract infection in a Tunisian hospital. *J. Hosp. Infect*. 2012; 80, 77–81.
15. Yağci A, Cerikçioğlu N, Kaufmann ME, Malnick H, Söyletir G, Babacan F, Pitt TL. Molecular typing of *Myroides odoratimimus* (*Flavobacterium odoratum*) urinary tract infections in a Turkish hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2000; 19: 731–732.
16. Crum-Cianflone, N. F. Matson, R. W. & Ballon-Landa, G. Fatal case of necrotizing fasciitis due to *Myroides odoratus*. *Infection*. 2014; 42(5):931-5.

17. Holmes B, Snell JJ, Lapage SP. *Flavobacterium odoratum*: a species resistant to a wide range of antimicrobial agents. *J Clin Pathol.* 1979; 32: 73–7.
18. Davis JM, Peel MM, Gillians JA. Colonization of an amputation site by *Flavobacterium odoratum* after gentamicin therapy. *Med J Aust.* 1979; 2: 703–4.
19. Ranjan M, Karade S, Rahi P, Singh S.P. and Sen S. Urosepsis due to Multi Drug Resistant *Myroides odoratimimus*: A Case Report. *Int. J.Curr. Microbiol.App.Sci.* 2017; 6(8): 1930-1935.
20. Ferrer C, Jakob E, Pastorino G, Juncos LI. Right-sided bacterial endocarditis due to *Flavobacterium odoratum* in a patient on chronic hemodialysis. *Am J Nephrol.* 1995; 15: 82–4.
21. MacFarlane DE, Baum-Thureen P, Crandon I. *Flavobacterium odoratum* ventriculitis treated with intraventricular cefotaxime. *J Infect.* 1985; 11: 233–8.
22. Elantamilan, D. B. Choudhury, A. B. Khyriem, V. W. Lyngdoh and J. Rajbongshi Septicaemia caused by *Myroides* spp: a case report. *JMM Case Reports.* 2015; 2(5).
23. Garrity GM, Bell J a, Lilburn TG, Lansing E. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's *Man Syst Bacteriol.* 2nd ed. New York, USA; 2004. p.315.
24. S. Spanik, J. Trupl, V. Krcmery, Nosocomial catheter-associated *Flavobacterium odoratum* bacteraemia in cancer patients, *J. Med. Microbiol.* 1998; 47 (2) 183.
25. Suganthi R, Shanmuga Priya T, Saranya A, Kaleeswaran T. Relationship between plasmid occurrence and antibiotic resistance in *Myroides odoratimimus* SKS05-GRD isolated from raw chicken meat. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013 Jun;29(6):983-90.

26. Hummel AS, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CM. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Feb;73(3):730-9.
27. Al-Bayssari C, Gupta SK, Dabboussi F, Hamze M, Rolain JM. MUS-2, a novel variant of the chromosome-encoded β -lactamase MUS-1, from *Myroides odoratimimus*. *New Microbes New Infect.* 2015 Jun 27;7: 67-71.
28. Mammeri H, Bellais S, Nordmann P. Chromosome-Encoded Lactamases TUS-1 and MUS-1 from *M. odoratus* and *M. odoratimimus* (Formerly *Flavobacterium odoratum*), New Members of the Lineage of Molecular Subclass B1 Metalloenzymes. *Antimicrobial Agents and, Chemotherapy.* 2002; 46(11): 3561-3567.
29. Hu SH, Yuan SX, Qu H, Jiang T, Zhou YJ, Wang MX, Ming DS. Antibiotic resistance mechanisms of *Myroides* sp. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2016 Mar;17(3):188-99.
30. Kutlu H, Avci M, Dal T, et al. A Healthcare-Associated Outbreak of Urinary Tract Infections Due to *Myroides odoratimimus*. *Jap J Infect Dis* 2020;73(6): 421–26.
31. Hsueh PR, Wu JJ, Hsieh WC. Bacteremic necrotizing fasciitis due to *Flavobacterium odoratum*. *Clin Infect Dis.* 1995;21: 1337–8.
32. Bachman KH, Sewell DL, Straubaugh LJ. Recurrent cellulitis and bacteremia caused by *Flavobacterium odoratum*. *Clin Infect Dis.* 1996; 22: 1113–4.
33. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant SR, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds) *Manual of clinical microbiology*, 8th edn. American Society for Microbiology, Washington, DC; 2003: pp 749–779.

34. Hoffman PS. Antibiotic resistance mechanism of *Helicobacter pylori*. *Canadian journal of Gastroenterology* 1999; 13: 243–249.
35. Kono M, Sasatsu M, Makino K. R-plasmid conferring resistance to ampicillin, carbenicillin and erythromycin in a *Flavobacterium odoratum* strain. *Microbios Lett* 1980; 14: 55–58.
36. Ming, De-song, Chen, Qing-qing, Chen, Xiao-tin. Analysis of resistance genes in pan-resistant *Myroides odoratimimus* clinical strain PR63039 using whole genome sequencing. In *Microbial Pathogenesis* November 2017; 112:164-170.
37. Lorenzin G, Piccinelli G, Carllassara L, Scolari F, Caccuri F, Caruso A, De Francesco MA. *Myroides odoratimimus* urinary tract infection in an immunocompromised patient: an emerging multidrug-resistant micro-organism. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018 Aug 6;7: 96.
38. Licker M, Sorescu T, Rus M, Cirlea N, Horhat F, Jurescu C, Botoca M, Cumpănaș A, Timar R, Muntean D. Extensively drug-resistant *Myroides odoratimimus* – a case series of urinary tract infections in immunocompromised patients. *Infect Drug Resist*. 2018;11: 743-749.
39. Ali MJ, Joseph J, Sharma S, Naik MN. Canaliculitis with isolation of *Myroides* species. *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg*. 2015;33:S24–S25.
40. Chen XL, Xie BB, Bian F, Zhao GY, Zhao HL, He HL, Zhou BC, Zhang YZ. Ecological function of myroilysin, a novel bacterial M12 metalloprotease with elastinolytic activity and a synergistic role in collagen hydrolysis, in biodegradation of deep-sea, high-molecularweight organic nitrogen. *Appl Envir Microbiol*. 2009;75: 1838–44.
41. Pompilio A, Galardi G, Gherardi G, et al. Infection of recurrent calcaneal ulcer caused by a biofilm-producer *Myroides odoratimimus* strain. *Folia Microbiol (Praha)* 2018;63(2):203–7.

42. Bremer PJ, Monk I, Butler R. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/Flavobacterium spp. Biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Lett Appl Microbiol.* 2002;35: 321–5.
43. Ram H, Kumar A, Thomas L, Dastager SG, Mawlankar R, Singh VP. *Myroides indicus* sp. nov. isolated from garden soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015 Nov;65(11):4008-4012.
44. Pérez-Lazo G, Morales-Moreno A, Soto-Febres F, Jove-Químpér H, Morales-Castillo L, Palomares-Reyes C, Del Valle-Mendoza J, Aguilar-Luis M, Silva-Caso W. First report of *Myroides phaeus* bacteraemia identified by Polymerase chain reaction and genetic sequencing. *IDCases.* 2020 Jan 18;19:e00695.
45. Zhang P, Liu M, Fu J, Zhong C, Zong G, Cao G. Identification of a mobilizable, multidrug-resistant genomic island in *Myroides odoratimimus* isolated from Tibetan pasture. *Sci Total Environ.* 2020 Jun 25;723:137970.
46. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2004 May;2(5):414-24.
47. Percy Schröttner, Wolfram W. Rudolph, Bodo R. Eing, Sebastian Bertram, Florian Gunzer. Comparison of VITEK2, MALDI-TOF MS, and 16S rDNA sequencing for identification of *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 79. 2014; 155–159.
48. Gaynes RP, H.T. Surveillance of nosocomial infections In: Mayhall CG, editörs. *Hospital epidemiology and infection control.* 2 th ed. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins; 1999: pp.1285-1317.
49. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008;36(5):309-32.

50. Türkiye hastane enfeksiyonları srveyans rehberi. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Ulusal Hastane Enfeksiyonları Srveyans ve Kontrol Birimi. TC Sağlık Bakanlığı; Ankara; 2009.

51. Yang S, Liu Q, Shen Z, Wang H, He L. Molecular Epidemiology of *Myroides odoratimimus* in Nosocomial Catheter-Related Infection at a General Hospital in China. *Infect Drug Resist.* 2020 Jun 25;13: 1981-1993.

52. Kutlu HH, Avcı M, Dal T, Arı O, Durmaz R. A Healthcare-Associated Outbreak of Urinary Tract Infections Due to *Myroides odoratimimus*. *Jpn J Infect Dis.* 2020 Nov 24;73(6):421-426.

53. Gkbulut Bektaş ř, Tmtrk A, Akdağ AG, İzdeş S. An outbreak of urinary tract infections due to *myroides* spp. in adult intensive care unit: risk factors and control procedures. *GKDA Derg.* 2021;27(3):210-5.

54. ztrk R. Hastane enfeksiyonları kontrolnde moleküler mikrobiyoloji metotlarının nemi. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eyll 2007, Malatya. Kurs Kitabı, pp: 64-75.

55. Gonzalez, J. and Saiz-Jimenez C. Unknown Microbial Communities on Rock Art Paintings. Consequences for Conservation and Future Perspectives. Coalition: CSIC Thematic Network on Cultural Heritage; 2005(10): p. 4-7.

56. Dakal T.C. and Arora P.K, Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*; 2012: 11(1): p. 71-104.

57. Chatellier, S. et al. "Comparison of Two Approaches for the Classification of 16S rRNA Gene Sequences." *Journal of Medical Microbiology*, vol. 63, no. Pt_10; 2014: pp. 1311–1315.

58. Gngr N.D. Some Molecular Techniques Applied In Determination of Environmental Microbial Diversity. *Sigma*; 2015: 33: p. 54-64.

59. Rastogi G. and Sani R.K. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment, in *Microbes and microbial technology*; 2011: Springer. pp. 29-57.
60. Woese C.R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* Vol. 51; 1987:pp. 221-271.
61. O'Sullivan D.J. Methods for analysis of the intestinal microflora;1999:pp. 23-45.
62. G.W. Tannock. *Probiotics: A Critical Review*. Horizon Scientific. Wymondham, UK. Press; (Woese 1987, O'Sullivan 1999): p.164.
63. Stackebrandt E. and B.M. Goebel. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J of Syst Bacteriol* Vol. 4; 1994: pp. 846-849.
64. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. DNA Sequencing with ChainTerminating Inhibitors. *PNAS* Vol. 74(12);1977:pp. 5463-5467.
65. Brosius J., Palmer M.L., Kennedy P.J. and Noller H.F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Esherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 75(10);1978:pp. 4801–4805.
66. Balcazar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Vendrell D., Girones O. and Muzquiz L. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comp Immunol Microb.*, Vol. 30; 2007: pp. 111-118.
67. Atienzar FA, Jha AN. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res.* 2006 Nov-Dec;613(2-3):76-102.
68. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct;18(4):657-86.
69. Bardakcı F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol* 2001; 25: 185-96.

70. Yağcı A. Restriction Fragment Length Polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri. Ed: Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 2001; 149-60.
71. Hilton AC, Banks JG, Penn CW. Optimization of RAPD for fingerprinting Salmonella. Lett Appl Microbiol. 1997 Apr;24(4):243-8.
72. Meunier, J.-R. and Grimont, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Research in Microbiology 1993; 144, 373–379.
73. Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D. and Honeycutt, R.L. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. BioTechniques 1993; 14, 214–217.
74. Saiki, R. The design and optimisation of the PCR. In PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification; 1989:pp 7–16.
75. Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Methods Appl. 1993 May;2(4):341-5.
76. Erişim:<https://eurofinsgenomics.jp/media/29294/eurofinsrapd-10mer-kit-protocol-v101.pdf>
77. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov 1;88(21):9828-32.
78. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990 Nov 25;18(22):6531-5.
79. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7.

80. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Feb;74(2):560-4.
81. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931-45.
82. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):376-80.
83. Quiñones-Mateu ME, Avila S, Reyes-Teran G, Martinez MA. Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. *J Clin Virol*. 2014 Sep;61(1):9-19.
84. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:251364.
85. Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015 Oct;13(5):278-89.
86. Lin B, Hui J, Mao H. Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing. *Biosensors (Basel)*. 2021 Jun 30;11(7):214.
87. Wang Y, Yang Q, Wang Z. The evolution of nanopore sequencing. *Front Genet*. 2015 Jan 7;5:449.

88. Mikheyev AS, Tin MM. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Mol Ecol Resour*. 2014 Nov;14(6):1097-102.
89. Mardis ER. DNA sequencing technologies: 2006-2016. *Nat Protoc*. 2017 Feb;12(2):213-218.
90. Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. *Genomics* 2009; 93(2): 105-111.
91. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar 13;13(4):260-70.
92. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):207-14.
93. Varoni EM, Bavarian R, Robledo-Sierra J, Porat Ben-Amy D, Wade WG, Paster B, Kerr R, Peterson DE, Frandsen Lau E. World Workshop on Oral Medicine VII: Targeting the microbiome for oral medicine specialists-Part 1. A methodological guide. *Oral Dis*. 2019 Jun;25 Suppl 1:12-27.
94. Singleton DR, Furlong MA, Rathbun SL, Whitman WB. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Sep;67(9):4374-6.
95. Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Jan;73(1):278-88.
96. Brown JR, Morfopoulou S, Hubb J, Emmett WA, Ip W, Shah D, Brooks T, Paine SM, Anderson G, Virasami A, Tong CY, Clark DA, Plagnol V, Jacques TS, Qasim W, Hubank M, Breuer J. Astrovirus VA1/HMO-C: an increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 2015 Mar 15;60(6):881-8.
97. Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, Biagtan M, Bashir H, Yu G, Salamat SM, Somasekar S, Federman S, Miller S, Sokolic R, Garabedian E,

Candotti F, Buckley RH, Reed KD, Meyer TL, Seroogy CM, Galloway R, Henderson SL, Gern JE, DeRisi JL, Chiu CY. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. *N Engl J Med*. 2014 Jun 19;370(25):2408-17.

98. Naccache SN, Peggs KS, Mattes FM, Phadke R, Garson JA, Grant P, Samayoa E, Federman S, Miller S, Lunn MP, Gant V, Chiu CY. Diagnosis of neuroinvasive astrovirus infection in an immunocompromised adult with encephalitis by unbiased next-generation sequencing. *Clin Infect Dis*. 2015 Mar 15;60(6):919-23.

99. Hoffmann B, Tappe D, Höper D, Herden C, Boldt A, Mawrin C, Niederstraßer O, Müller T, Jenckel M, van der Grinten E, Lutter C, Abendroth B, Teifke JP, Cadar D, Schmidt-Chanasit J, Ulrich RG, Beer M. A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N Engl J Med*. 2015 Jul 9;373(2):154-62.

100. Erişim:<https://www.genomeweb.com/research-funding/cdc-earmarks-23m-ngs-bioinformatic-approaches-combat-infectious-disease#.ZGHX5XZBzIU>

101. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra R, Chin CS, Iliopoulos D, Klammer A, Peluso P, Lee L, Kislyuk AO, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman JC, Steyert SR, Frimodt-Møller J, Struve C, Petersen AM, Krogfelt KA, Nataro JP, Schadt EE, Waldor MK. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med*. 2011 Aug 25;365(8):709-17.

102. Chin CS, Sorenson J, Harris JB, Robins WP, Charles RC, Jean-Charles RR, Bullard J, Webster DR, Kasarskis A, Peluso P, Paxinos EE, Yamaichi Y, Calderwood SB, Mekalanos JJ, Schadt EE, Waldor MK. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N Engl J Med*. 2011 Jan 6;364(1):33-42.

103. Arias CA, Panesso D, McGrath DM, Qin X, Mojica MF, Miller C, Diaz L, Tran TT, Rincon S, Barbu EM, Reyes J, Roh JH, Lobos E, Sodergren E, Pasqualini R, Arap W, Quinn JP, Shamoo Y, Murray BE, Weinstock GM. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. *N Engl J Med*. 2011 Sep 8;365(10):892-900.

104. Tran TT, Panesso D, Gao H, Roh JH, Munita JM, Reyes J, Diaz L, Lobos EA, Shamoo Y, Mishra NN, Bayer AS, Murray BE, Weinstock GM, Arias CA. Whole-genome analysis of a daptomycin-susceptible enterococcus faecium strain and its daptomycin-resistant variant arising during therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):261-8.

105. Kong Z, Zhao P, Liu H, Yu X, Qin Y, Su Z, Wang S, Xu H, Chen J. Whole-Genome Sequencing for the Investigation of a Hospital Outbreak of MRSA in China. *PLoS One*. 2016 Mar 7;11(3):e0149844.

106. Archer J, Weber J, Henry K, Winner D, Gibson R, Lee L, Paxinos E, Arts EJ, Robertson DL, Mimms L, Quiñones-Mateu ME. Use of four next-generation sequencing platforms to determine HIV-1 coreceptor tropism. *PLoS One*. 2012;7(11):e49602.

107. Kim HS, Hong SB, Lee DH, Kim WS, Son BR, Shin KS. Molecular Epidemiologic Study of Urinary Tract Infection by Myroides species (*Flavobacterium odoratum*). *Infect Chemother*. 2003; 35(4):199-204.

108. Chehid Chakroun, Maria C. Urdaci, Didier Faure, Francine Grimont, Jean-François Bernardet. Random Amplified Polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation among isolates of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* and among *Flavobacterium* species. *Diseas Of Aquatic Organisms*. Vol.31;1997: 187-196.

109. Erişim: <http://insilico.ehu.es/PCR/>

110. Erişim: <http://www.cosmogenetech.com/cosmo/upload/files/brochure/operon%20RAPD%20kit.pdf>

111. Jacobs A, Chenia HY. Biofilm-forming capacity, surface hydrophobicity and aggregation characteristics of *Myroides odoratus* isolated from South African *Oreochromis mossambicus* fish. *J Appl Microbiol*. 2009 Dec 1;107(6):1957-66.
112. Quintaes BR, Leal NC, Reis EM, Hofer E. Optimization of randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction for molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004 Mar-Apr;37(2):143-7.
113. Sahoo L, Das BK, Parhi J, Mukherjee SC. DNA fingerprinting of *Flavobacterium columnare* using RAPD-PCR. *Indian J Microbiol*. 2010 Oct;50(Suppl 1):10-6.
114. Flemming L, Rawlings D, Chenia H. Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. *Res Microbiol*. 2007 Jan-Feb;158(1):18-30.
115. Sowmya R, Sachindra NM. Biochemical and Molecular Characterization of Carotenogenic *Flavobacterium* Isolates from Marine Waters. *Pol J Microbiol*. 2016;65(1):77-88.
116. Stefańska I, Kwiecień E, Górzyńska M, Sałamaszyńska-Guz A, Rzewuska M. RAPD-PCR-Based Fingerprinting Method as a Tool for Epidemiological Analysis of *Trueperella pyogenes* Infections. *Pathogens*. 2022 May 10;11(5):562.
117. Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res*. 2018 Aug 24; 7:1338.
118. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114-20.
119. Langdon WB. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min*. 2015 Jan 8;8(1):1.

120. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078-9.
121. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, Whitwham A, Keane T, McCarthy SA, Davies RM, Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021 Feb 16;10(2):giab008.
122. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012 Apr-Jun;6(2):80-92.
123. Müller H, Jimenez-Heredia R, Krolo A, Hirschmugl T, Dmytrus J, Boztug K, Bock C. VCF. Filter: interactive prioritization of disease-linked genetic variants from sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jul 3;45(W1):W567-W572.
124. Erişim: <https://www.genomicepidemiology.org/services/>
125. Erişim: <https://card.mcmaster.ca/>
126. Erişim: https://kbase.us/applist/apps/ProkkaAnnotation/annotate_contigs/release?gad=1&gclid=CjwKCAjw6vyiBhB_EiwAQJRopvYsf8iaoG9dTJeJ9Vo0nSI8kKKZFyDL_X5SCY3dIHRASBfbTQ7BoCSgUQAvD_BwE
127. Erişim: <https://proksee.ca/>
128. Erişim: <http://www.genomicepidemiology.org/>
129. Erişim: <https://git-r3lab.uni.lu/laura.denies/PathoFact>
130. Erişim: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
131. Erişim: <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/genbank/>

132. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014 Jul 15;30(14):2068-9.
133. Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABQ04565.1>
134. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K, Canova MJ, De Pascale G, Ejim L, Kalan L, King AM, Koteva K, Morar M, Mulvey MR, O'Brien JS, Pawlowski AC, Piddock LJ, Spanogiannopoulos P, Sutherland AD, Tang I, Taylor PL, Thaker M, Wang W, Yan M, Yu T, Wright GD. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jul;57(7):3348-57.
135. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T, Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson TA, Brinkman FS, Wright GD, McArthur AG. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D566-D573.
136. de Nies L, Lopes S, Busi SB, Galata V, Heintz-Buschart A, Laczny CC, May P, Wilmes P. PathoFact: a pipeline for the prediction of virulence factors and antimicrobial resistance genes in metagenomic data. *Microbiome*. 2021 Feb 17;9(1):49.
137. Yoon SH, Ha SM, Lim J, Kwon S, Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017 Oct;110(10):1281-1286.
138. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017 May;67(5):1613-1617.
139. Bland C, Ramsey TL, Sabree F, Lowe M, Brown K, Kyrpides NC, Hugenholtz P. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics*. 2007 Jun 18;8:209.

140. Erişim:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_025062395.1/
141. Erişim:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_001485415.1
142. Erişim:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000633375.1/
143. Erişim:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_001481655.1/
144. Erişim:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NZ_CP037427.1
145. Erişim:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_900453765.1/
146. LaVergne S, Gaufin T, Richman D. Myroides injenensis Bacteremia and Severe Cellulitis. *Open Forum Infect Dis.* 2019 Jun 17;6(7):ofz282.
147. Vaneechoutte M, Nemec A, Kämpfer P, et al. Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella and other nonfermentative Gram-negative rods. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, et al. editors. *Manual of Clinical Microbiology.* Washington DC: ASM Press; 2015: pp. 823-824.
148. Yıldırım M.H, Bayındır-Bilman F, Kaya S, Yurtsever SG, Müderris T. Nadir Görülen Bir İdrar Yolu Enfeksiyonu Etkeni: Myroides odoratimimus. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg* 2023;53(1):55-59.
149. Gülmez A, Ceylan AN, Özalp O. An Increasing Threat in Intensive Care Units, Evaluation of Multi-Drug-Resistant Myroides spp. *Infections and Risk Factors.* *J Hosp Infect.* 2023 Apr 22:S0195-6701(23)00123-8.
150. Endicott-Yazdani TR, Dhiman N, Benavides R, Spak CW. Myroides odoratimimus bacteremia in a diabetic patient. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2015 Jul;28(3):342-3.
151. Aycan IO, Celen MK, Yilmaz A, Almaz MS, Dal T, Celik Y, Bolat E. Colonização bacteriana por causa do aumento da carga de trabalho da equipe de enfermagem em unidade de terapia intensiva (Bacterial colonization due to increased nurse workload in an intensive care unit). *Rev Bras Anesthesiol.* 2015 May-Jun;65(3):180-5. Portuguese.

152. AYGÜN, G. (2003). Yoğun bakım birimi infeksiyonlarında çevre şartlarının önemi. *Klimik Dergisi*. 16 (3): 106-107.

153. Kurt AF, Mete B, Houssein FM, Tok Y, Kuskucu MA, Yucebag E, Urkmez S, Tabak F, Aygun G. A pan-resistant *Myroides odoratimimus* catheter-related bacteremia in a COVID-19 patient and review of the literature. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2022 Mar 21.

