

## GİRİŞ

Antimikrobiyal önemi her geçen sene artan bir halk sağlığı problemidir. Günümüzde gıda kaynaklı patojenler de dahil antibiyotik direnç gösteren enfeksiyonlar giderek artmaktadır. Antibiyotik direncin küresel olarak hızlı yayılımında yatay gen transferinin, özellikle de plazmid kaynaklı gen aktarımının büyük rolü vardır.

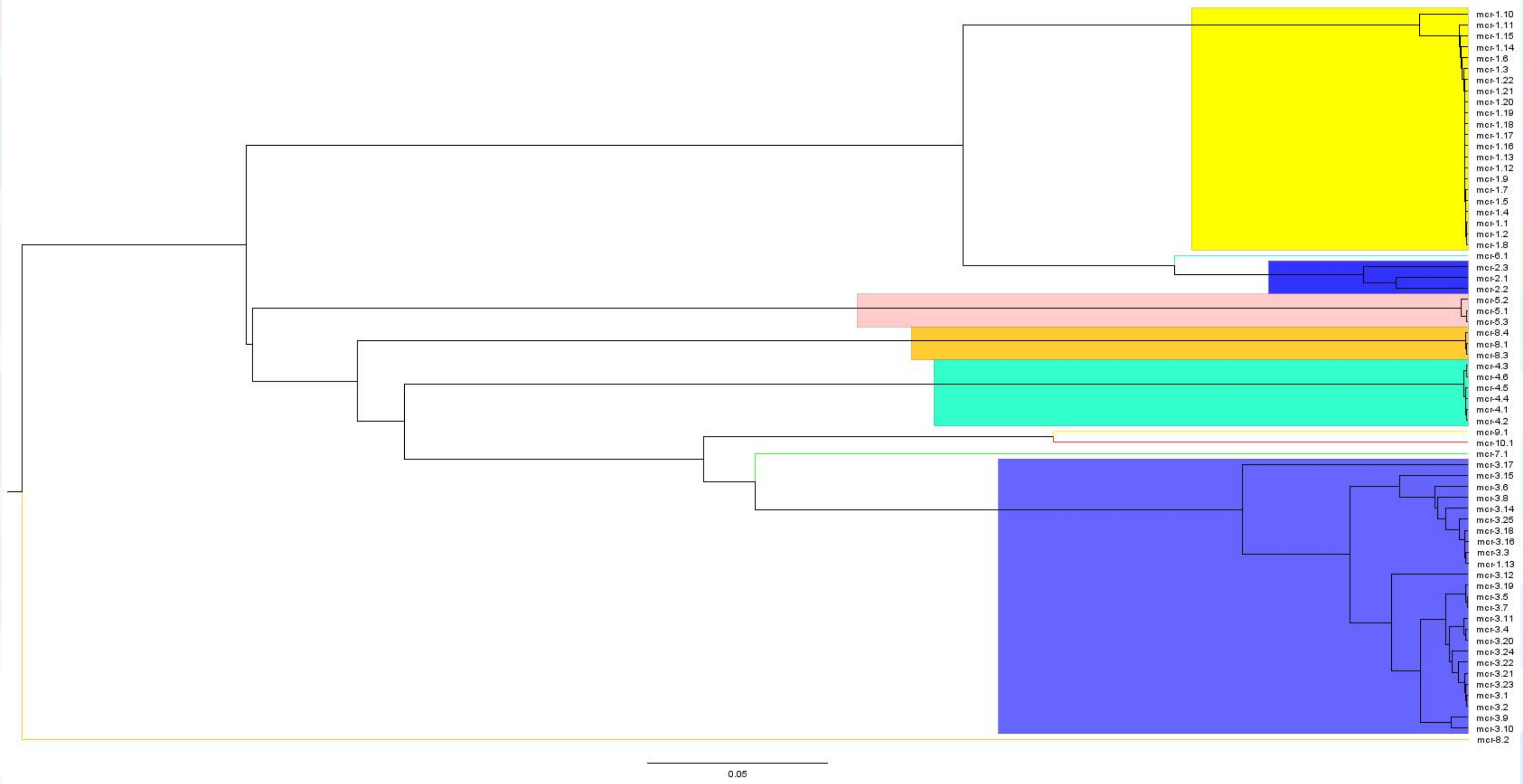
Kolistin çoklu ilaç direnç gösteren Gram (-) bakterilere karşı son çare olarak kullanılan nefrotoksik bir antibiyotiktir.

Daha önce sadece dikey gen transferi yoluyla aktarılabildiği düşünülen kolistin direncinin, plazmid üzerinde bulunan mobile colistin resistance (*mcr-1*) geni ile yatay olarak transfer edilebildiği görülmüştür (Liu vd., 2016). Bu keşfin hemen ardından *mcr-1* geninin tüm kıtalara yayıldığı görülmüştür. Dahası, ilk genin farklı varyantları olduğu (*mcr-2,3,4,5,6,7,8,9,10*) ve bu varyantların farklı türlere yayıldığı anlaşılmıştır.

**Çalışmamızın temel amacı biyoinformatik araçlarla şimdiye kadar tespit edilen tüm mcr genlerini kapsayacak hızlı ve ucuz bir tarama yöntemini *in silico* olarak geliştirmektir.**

## BULGULAR

### mcr homologlarının genetik yakınlıklarını gösteren filogenetik ağaç



## METOT

Plazmid aracılığıyla gen transferinin genotipik olarak hızlı bir şekilde belirlenmesi için *mcr* genlerinin filogenetik yakınlıkları belirlenmiştir.

Tüm *mcr* homologları ve bunların varyantları National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide veritabanından indirilmiştir.

Sekanslar DNASTAR paket programının Megalign modülü ile sıralanmış, baz seviyesinde yakınlıkları incelenmiştir.

European Molecular Biology Laboratory (EMBL) üzerinde bulunan çoklu sekans sıralama yöntemlerinden Clustal OMEGA kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Filogenetik ağaç FigTree 1.4 kullanılarak görüntülenmiştir.

Çalışmamız süresinde raporlanan 9 *mcr* homologu için PrimerPlex 2 paket programı kullanılarak *in silico* multiplex PCR metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen primerler NCBI BLAST aracı kullanılarak sekanslara karşı test edilmiştir. *mcr-10* homologu yakın zamanda keşfedildiğinden çalışmamıza dahil edilememiştir.

### NCBI veritabanında bulunan mcr homologları

Gen	Erişim	Tür	Uzunluk	Kaynak	Ülke
mcr-1.1	MK405590	<i>Escherichia coli</i>	1626	Human	Myanmar
mcr-1.2	NG_051170	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1826	Human	Italy
mcr-1.3	NG_052861	<i>Escherichia coli</i>	1826	Chicken	China
mcr-1.4	KY041856	<i>Escherichia coli</i>	1626	Sewage	China
mcr-1.5	KY271416	<i>Escherichia coli</i>	1626	Human	Argentina
mcr-1.6	NG_052893	<i>Salmonella enterica</i>	1826	Human	China
mcr-1.7	KY488488	<i>Escherichia coli</i>	1626	Sewage	China
mcr-1.8	NG_054697	<i>Escherichia coli</i>	1626	Poultry	Brunei
mcr-1.9	KY780959	<i>Escherichia coli</i>	1626	Swine	Portugal
mcr-1.10	NG_055583	<i>Moraxella sp</i>	1626	Porcine	UK
mcr-1.11	NG_055784	<i>Escherichia coli</i>	1829	Human	Peru
mcr-1.12	LC337668	<i>Escherichia coli</i>	1626	Pork	japan
mcr-1.13	MG384739	<i>Escherichia coli</i>	1626	Turkey	Germany
mcr-1.14	NG_057460	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1826	Chicken	China
mcr-1.15	NG_061610	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1823	Chicken	China
mcr-1.16	MK568462	<i>Escherichia coli</i>	1626	Chicken	China
mcr-1.17	MK568463	<i>Escherichia coli</i>	1626	Cow	China
mcr-1.18	NG_064789	<i>Escherichia coli</i>	1826	Chicken	China
mcr-1.19	MK490674	<i>Salmonella enterica</i>	1626	Egg	China
mcr-1.20	NG_065450	<i>Escherichia coli</i>	1626	Pig	UK
mcr-1.21	MN958883	<i>Escherichia coli</i>	1626	Human	China
mcr-1.22	MN017134	<i>Escherichia coli</i>	1626	Chicken	Nigeria
mcr-2.1	NG_051171	<i>Escherichia coli</i>	1817	Porcine	Belgium
mcr-2.2	MG545606	<i>Moraxella pluranimalium</i>	1617	Sheep	Spain
mcr-2.3	NG_065452	<i>Escherichia coli</i>	1817	Swine	Thailand
mcr-3.1	NG_055505	<i>Escherichia coli</i>	1826	Porcine	China
mcr-3.2	NG_055523	<i>Shigella sonnei</i>	1826	Human	Thailand
mcr-3.3	NG_055783	<i>Aeromonas veronii</i>	1823	Chicken	China
mcr-3.4	NG_055492	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1826	Human	Thailand
mcr-3.5	NG_055492	<i>Escherichia coli</i>	1826	Human	China
mcr-3.6	MH094747	<i>Aeromonas veronii</i>	1623	Chicken	China
mcr-3.7	MG198058	<i>Escherichia coli</i>	1626	Porcine	UK
mcr-3.8	MF598079	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1623	Fish	Germany
mcr-3.9	NG_055663	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1626	Fish	Germany
mcr-3.10	NG_055799	<i>Aeromonas caviae</i>	1826	Duck	China
mcr-3.11	NG_056184	<i>Escherichia coli</i>	1626	NA	China
mcr-3.12	NG_057484	<i>Escherichia coli</i>	1626	Swine	Brazil
mcr-3.13	NG_060514	<i>Aeromonas caviae</i>	1623	Human	China
mcr-3.14	NG_060515	<i>Aeromonas bivalvium</i>	1623	Aquatic	China
mcr-3.15	NG_060516	<i>Aeromonas media</i>	1623	Chicken	China
mcr-3.16	NG_060517	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1623	Chicken	China
mcr-3.17	NG_060518	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	1623	Chicken	China
mcr-3.18	NG_060519	<i>Aeromonas caviae</i>	1623	Aquatic	China
mcr-3.19	NG_055497	<i>Citrobacter freundii</i>	1823	Swine	China
mcr-3.20	NG_055493	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1826	Human	Thailand
mcr-3.21	NG_065453	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1626	Human	France
mcr-3.22	NG_060581	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1783	Swine	Thailand
mcr-3.23	NG_060583	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1826	Human	Thailand
mcr-3.24	NG_060580	<i>Shigella sonnei</i>	1826	Human	Thailand
mcr-3.25	NG_060585	<i>Aeromonas veronii</i>	1823	Human	China
mcr-4.1	NG_057470	<i>Escherichia coli</i>	1626	Pig	Germany
mcr-4.2	MG459157	<i>Escherichia coli</i>	1626	Pig	Germany
mcr-4.3	NG_057461	<i>Enterobacter cloacae</i>	1626	Human	Singapore
mcr-4.4	NG_057465	<i>Escherichia coli</i>	1626	Pig	Spain
mcr-4.5	NG_057464	<i>Escherichia coli</i>	1626	Pig	Spain
mcr-4.6	NG_061608	<i>Salmonella enterica</i>	1626	Pig	Spain
mcr-5.1	NG_055658	<i>Salmonella Paratyphi B</i>	1844	Human	Germany
mcr-5.2	NG_057467	<i>Escherichia coli</i>	1641	Pig	Germany
mcr-5.3	NG_061405	<i>Escherichia coli</i>	1644	Horse	Brazil
mcr-6.1	NG_055781	<i>Moraxella sp</i>	1617	Porcine	UK
mcr-7.1	NG_056413	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1820	Chicken	China
mcr-8.1	NG_061399	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1898	Pig	China
mcr-8.2	MH638291	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2149	NA	China
mcr-8.3	MH598530	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1698	Human	France
mcr-8.4	MH791448	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1698	Chicken	China
mcr-9.1	MK791138	<i>Salmonella enterica</i>	1620	Human	USA

NCBI veritabanında yer alan *mcr* homologları tespit edilmiştir. Bu genlerin buldukları tür, sekans uzunlukları (bp), kaynakları ve buldukları ülke tablo haline getirilmiştir.

- Görsel kolaylık sağlaması için her homolog farklı bir renkte vurgulanmıştır
- mcr* homologları kendi varyantları içinde çok farklılık göstermese de homologlar arası farklar gözlenmiştir.
- mcr-6* ve *mcr-2* homologları filogenetik olarak birbirine yakın bulunmuştur. Benzer bir yakınlık *mcr-9* ve *mcr-10* arasında da gözlenmiştir.
- mcr 8.2* geni diğer genlerden daha uzun olduğundan (2149 bp) ağaçta ayrılmıştır.

Primer İsmi	Sekans	Hedef Gen	Ürün Uzunluğu (bp)	Tanım	Kapsadığı varyasyonlar
mcr1Forward	ATCCTCGCCGTGCTAATGC	<i>mcr-1</i>	552	<i>Escherichia coli</i>	1.10 hariç tüm varyasyonlar
mcr1Reverse	ACTGTATCTTGACTTGTGCTACT				
mcr2Forward	CGGTGTCTCGCTGTTATGG	<i>mcr-2</i>	847	<i>Escherichia coli</i>	sadece 2.1
mcr2Reverse	GGTGTCTGCTGCTGTTATGG				
mcr3Forward	GTGGCGTTTCAGCAGTCTTA	<i>mcr-3</i>	1,066	<i>Escherichia coli</i>	3.1 ve 3.2
mcr3Reverse	GCAGATGGCGCTTGTGGT				
mcr4Forward	GTGTTCGTGCTCGGTGAGA	<i>mcr-4</i>	235	<i>Escherichia coli</i>	tüm varyasyonlar
mcr4Reverse	TAAGCAGTGTGGCGTAATCG				
mcr5Forward	GATTCGGCTCACCTGTAATGAC	<i>mcr-5</i>	1,403	<i>Salmonella enterica</i>	yalnız 5.1
mcr5Reverse	CCTCCATGTTCTCTCCAA				
mcr6Forward	CGCTCGGTGTGATGAAGGT	<i>mcr-6</i>	1,561	<i>Moraxella sp</i>	varyasyon yoktur
mcr6Reverse	GGATGGTGTTCATAGTGTGGT				
mcr7Forward	ACTACTGATTCGCTGCTGCTC	<i>mcr-7</i>	1,245	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	varyasyon yoktur
mcr7Reverse	GTGTCATTGTGGTTGCTCT				
mcr8Forward	ATGACACAGCATAGTCTTGGT	<i>mcr-8</i>	1,766	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	yalnız 8.1
mcr8Reverse	TCAGTAGAGTCGGCGTAATCG				
mcr9Forward	AGGAATCGTGCATGTTCAAGT	<i>mcr-9</i>	397	<i>Salmonella enterica</i>	varyasyon yoktur
mcr9Reverse	CAGGTGTGTATAGTGCCTTATAG				

- Çalışmamız süresince bilinen 9 homolog için 18-25 bp boylarında 18 primer (9 forward 9 reverse) geliştirilmiştir.
- Primerlere ait en düşük erime sıcaklığı (Tm) 53.7 en yüksek Tm ise 56 °C'dir.
- Ürünlerin jel görüntüsünde kolay ayrıştırılabilirliği için her primer arasında en az 150 bp boşluk bırakılmıştır.
- Tüm homologlara ait pozitif örneğe erişilemediğinden bu metot laboratuvar ortamında denenmemiştir.

## REFERANSLAR

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Thompson, J. D. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), 539.

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., Shen, J. 2016. "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study", *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161-168.

Rolf S. Kaas, Pimlapas Leekitcharoenphon, Frank M. Aarestrup, Ole Lund. Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE* 2014; 9(8): e104984.  
Rambaut, A. (2014). FigTree 1.4. 2 software. Institute of Evolutionary Biology, Univ. Edinburgh.

## SONUÇLAR

Ülkemizde henüz yaygın olarak raporlanmasa da plazmid aracılı kolistin direnci dünya çapında büyük bir halk sağlığı problemidir.

*mcr* genlerinin genetik farklılıklarında buldukları tür, kaynak veya ülkenin bir etkisi gözlenmemiştir.

Tasarlanan multiplex PCR metodu ile *mcr-1* ve *mcr-9* arasındaki tüm homologlar ve bunlara ait bir çok varyasyonun hızlı testi mümkün olacaktır. Bu metot sayesinde hem sarf malzemesinden hem de zamandan tasarruf edilecektir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.