

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-YL-2011-0001**

**ÇEVRE ENTEROKOKLARINDA LİNKOZAMİDLERE
İNAKTİVASYON YOLUYLA DİRENÇ**




Emine BİLİR BAŞ

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN**

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Emine BİLİR BAŞ tarafından hazırlanan “Çevre Enterokoklarında Linkozamidlere İnaktivasyon Yoluyla Direnç” başlıklı tez, 03.12.2010 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

<u>Ünvanı, Adı Soyadı</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmzası</u>
Başkan : Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN	ADÜ	
Üye : Yrd. Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ	ADÜ	
Üye : Yrd. Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ÖZDEMİR	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

07/02/2011

Emine BİLİR BAŞ

ÖZET

ÇEVRE ENTEROKOKLARINDA LİNKOZAMİDLERE

İNAKTİVASYON YOLUYLA DİRENÇ

Emine BİLİR BAŞ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN
2011, 86 sayfa

Bu çalışmada *Enterococcus faecium* ADU1 suşunda tespit edilen linkozamid direncinin mekanizmasının belirlenmesi ve transfer tespiti amaçlanmıştır. Gots' testiyle linkozamidlere direncin inaktivasyon yoluyla olduğu tespit edilmiştir. Çevreden izole edilen *Enterococcus faecium* ADU1 suşunda linkozamidlere direnç sağlayan *linA*, *linB*, *lnu(C)* ve *lnu(D)* genlerinin varlığı PCR yoluyla araştırılmış ve *linB* geni için bu suşun pozitif olduğu saptanmıştır. Direnç geni *Enterococcus faecalis* JH2-2 suşuna konjugasyonla aktarılmış ve transkonjugantlarının PFGE profili analizi sonucu plazmidik bir geçiş olduğu düşünülmüştür. Invers PCR yöntemi kullanılarak *linB* geninin üzerinde bulunduğu genetik elemanın tespitine çalışılmıştır. Invers PCR ile elde edilen ampikonun DNA dizi analiz sonucu *Enterococcus faecium* ADU1 izolatındaki *linB* geninin üzerinde bulunduğu genetik elemanın, daha önce *Enterococcus faecalis*'de tanımlanmış olan pEF418 plazmidine özgü genlerin *Enterococcus faecium* ADU1 izolatında varlığı spesifik primerlerle PCR yapılarak ve ampikon sekanslanarak araştırılmış ve doğrulanmıştır.

Sonuç olarak çevre suşundan ilk kez linkozamidlerin inaktivasyonuna bağlı direnç tespit edilmiş ve şimdiye dek yalnızca insanda ve hayvanda enfeksiyon etkeni olan suşlarda görülen nükleotidiltransferazların çevre suşlarında da olabileceği gösterilmiştir. Bu genin transfer edilebilir bir plazmid üzerinde olması enfeksiyon etkeni olan suşlara geçişini ve direncin yaygınlaşmasını kolaylaştıracaktır.

Anahtar sözcükler: *E. faecium*, *E. faecalis*, linkozamid, makrolid, streptogramin, *linA*, *linB*, *lnu(C)*, *lnu(D)*, antibiyotik direnci

ABSTRACT**RESISTANCE TO LINCOSAMIDES BY INACTIVATION AMONG ENVIRONMENTAL ENTEROCOCCUS**

Emine BİLİR BAŞ

M.A. Thesis, Department of Biology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN
2011, 86 pages

The aim of this study was to determine the mechanism of lincosamide resistance of *Enterococcus faecium* ADU1 strain. Transferability of lincosamide resistance was also tested. Lincosamide inactivation of this strain was determined by Gots' test. Presence of lincosamide inactivation genes *linA*, *linB*, *lnu(C)* and *lnu(D)* genes in ADU1 strain was tested and this strain was found positive for *linB*. Transferability of inactivation gene to *Enterococcus faecalis* JH2-2 strain was investigated by conjugation. Analysis of transconjugant's PFGE profile indicated a plasmidic transfer of resistance. Inverse PCR method was used to determine the genetic environment of *linB* gene. Sequence analysis of amplicon obtained by inverse PCR indicated that *linB* gene was carried on a previously described plasmid, pEF418. Using specific primers for pEF418E amplicons were obtained and sequence analysis confirmed that ADU1 carries pEF418.

Lincosamide inactivation genes were reported previously only in strains isolated from human and animal samples. To the best of our knowledge for the first time we showed presence of a lincosamides inactivation gene in an environmental sample. As a result presence of nucleotidyl transferases gene in environmental isolates was confirmed with our study. The fact that this gene is carried on a transferable plasmid indicates the possibility of quick dissemination of this gene in the environment.

Key words: *E. faecium*, *E. faecalis*, lincosamides, macrolides, streptogramins, *linA*, *linB*, *lnu(C)*, *lnu(D)*, antibiotic resistance

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince destek ve ilgisini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, güler yüzü ve fikirleri ile bize daima yol gösteren değerli hocam, danışmanım Sayın Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a,

Tüm çalışmam boyunca değerli yardımlarını esirgemeyen sevgili Erman ORYAŞIN'a,

Yaşamımın her döneminde deneyimleri ile yolumu aydınlatan, beni bugünlere getiren sevgili annem ve babama, her zaman anlayışıyla yanımda olan eşime ve dostluğunu her an yanımda hissettiğim Volkan IŞIK'a

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASIiii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASIv
ÖZET.....	...vii
ABSTRACTix
ÖNSÖZ.....	...xi
SİMGELER DİZİNİxvii
ŞEKİLLER DİZİNİxix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	...xxi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enterokoklar	1
1.1.1. Mikrobiyolojileri	2
1.1.2. Epidemiyolojileri	3
1.1.3. Bazı enterokok türlerinin özellikleri	5
1.1.4. Enterokokların Neden Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları	7
1.1.5. Virulans Faktörleri	8
1.2. Antibiyotikler.....	10
1.2.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi	11
1.2.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları	12
1.2.3. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları.....	12
1.2.3.1. Hücre duvarının sentezini önleyerek veya litik enzimleri aktive ederek üremeyi durduranlar	13
1.2.3.2. Hücre zarının fonksiyonunu bozanlar.....	14
1.2.3.3. Protein sentezini etkileyenler	14
1.2.3.4. Nükleik asit sentezini bozanlar	15
1.2.3.5. Antimetabolitler	15
1.2.4. Antibiyotik Direnci.....	15
1.2.4.1. Antibiyotiklere direnç gelişim mekanizmaları	16
1.2.5. MLS Grubu Antibiyotikler; Makrolidler, Linkozamidler, Streptograminler	20
1.2.5.1. Makrolidler	21
1.2.5.2. Linkozamidler	23
1.2.5.3. Streptograminler	23
1.2.5.4. Makrolid-Linkozamid-Streptogramin Direnci.....	24

2. KAYNAK ÖZETLERİ / KURAMSAL TEMELLER.....	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM	36
3.1. Materyal	36
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri	36
3.1.1.1. MHA (Mueller-Hinton agar) (Oxoid)	36
3.1.1.2. BHIA (Brain heart infusion agar) (Oxoid).....	36
3.1.1.3. BHIB (Brain heart infusion broth) (Oxoid)	37
3.1.2. Kullanılan Ayıraçlar, Solusyonlar, Kitler, Testler	37
3.1.2.1. DNA ekstraksiyonu için hazırlanan solüsyonlar, kitler.....	37
3.1.2.2. PFGE (Pulsed Field Jel Elektrofrezisi) için hazırlanan solüsyonlar ..	38
3.1.2.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	39
3.1.2.4. Elektrofrez.....	39
3.1.2.5. API 20 strep galeri kiti	40
3.1.3. Kullanılan Suşlar	40
3.1.4. Kullanılan Primerler	40
3.2. Yöntem	41
3.2.1. <i>E. faecium</i> ADU1 Suşunun Mikrobiyolojik Karakterizasyonu.....	41
3.2.1.1. <i>E. faecium</i> ADU1 suşunun biyokimyasal özellikleriyle tanımlanması	41
3.2.1.2. <i>E. faecium</i> ADU1 suşunun antibiyotik hassasiyet değerlerinin ölçülmesi	41
3.2.1.3. Linkozamid inaktivasyon testi.....	41
3.2.2 <i>E. faecium</i> ADU1 Suşu İle Yapılan Moleküler Çalışmalar	42
3.2.2.1. Total DNA ekstraksiyonu	42
3.2.2.2. ADU1 suşunda linkozamid inaktivasyon genlerinin aranması.....	43
3.2.2.3. <i>linB</i> geninin transfer edilebilirliği.....	44
3.2.2.4. Transkonjugantların analizi.....	45
4. BULGULAR	51
4.1. <i>E. faecium</i> ADU1 suşunun biyokimyasal özellikleriyle tanımlanması.....	51
4.2. <i>E. faecium</i> ADU 1 Suşunun Antibiyotik Hassasiyet Değerlerinin Ölçülmesi	51
4.2.1. Disk Difüzyon Testi	51
4.2.2. Agar Dilüsyon Yoluyla MIC Değerlerinin Tespiti.....	52

4.2.3. Linkozamid İnaktivasyon Testi.....	54
4.3. <i>E. faecium</i> ADU1 Suşu İle Yapılan Moleküler Çalışmalar	55
4.3.1. Total DNA Ekstraksiyonu	55
4.3.2. Linkozamid İnaktivasyon Genlerinin Aranması.....	56
4.3.3. <i>linB</i> Geninin Transfer Edilebilirliği	57
4.3.4. Transkonjugantların Analizi.....	60
4.3.4.1. Transkonjuganlarda <i>linB</i> geninin aktarımının doğrulanması.....	60
4.3.4.2. Aktarılan mobil genetik elemanın pulsed field jel elektroforezi (PFGE) ile test edilmesi	61
4.3.4.3. Invers PCR yöntemi ile <i>linB</i> geninin üzerinde bulunduğu genetik elemanın tespiti.....	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	76
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ.....	86

SİMGELER DİZİNİ

ABC	ATP-Binding-Cassette
ADH	Arginine dihydrolase
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMD	Starch Fermentation
ARB	Arabinose
ATP	Adenosine Triphosphate
BHI	Brain Heart Infusion Agar
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Erm	Erythromycin ribosome methylase
ESC	Esculin
ESP	EDTA, Sodium Lauroyl Sarcosine, Proteinaz K
GLU	Glucose
GLYG	Glycogen Fermentation
GSBL	Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
HIP	Hippurat Hidrolizi
HIV	Human Immunodeficiency Virus
INH	Isonicotinylhydrazine
INU	Inulin
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokoklar
LAC	Fermentation of Lactose
LAP	Lösin Aminopeptidaz
MAN	Mannitol Fermentation
MCL	Maximum Contaminant Level
MFS	Major Facilitator Super Family
MHA	Mueller-Hinton Agar
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MLS _B	Makrolid, Linkozamid, Streptogramin B
MNTL	Mannitol

MPG	Metil-A-D-Glukopiranozit
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Sodyum Klorür
NAM	N-Asetil Muramik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
PAL	Alkaline Phosphatase
PBP	Penisilin Bağlayan Proteinler
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
pH	Power of Hydrogen
PRV	Pirüvat
PYR	Pirolidonil Betanaftilamid
RAF	Raffinoz
RIB	Riboz
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
SBTL	Sorbitol
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOR	Sorbitol
SORB	Sorboz
SUK	Sükroz
TE	Tris-EDTA
TRE	Trehalose
t-RNA	Transfer Ribonucleic Acid
VP	Voges-Proskauer
α -GAL	α Galaktozidaz
β -GAL	β -Galaktozidaz
β -GUR	β -Glukuronidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Enterococcus faecalis</i> 'in elektron mikroskop görüntüsü	2
Şekil 1.2. Makrolid ve ketolidlerin yapıları.....	21
Şekil 1.3. Linkomisin ve klindamisin yapıları	23
Şekil 1.4. Streptogramin A ve B'nin yapıları.....	24
Şekil 3.1. <i>E. faecium</i> ADU1 verici suşu ile <i>E. faecalis</i> JH2-2 alıcı suşunun BHI agar üzerine inoküle edilmiş durumu	44
Şekil 3.2. InstaGene Matrix (Bio-Rad) ile DNA ekstraksiyonu aşamaları	46
Şekil 3.3. Nucleotide Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ile <i>linB</i> dizisi sorgulama sonucu.....	48
Şekil 4.1. Gots' testi sonucu görülen zonlar.....	54
Şekil 4.2. <i>E. faecium</i> ADU1 suşunda total DNA ekstraksiyonu sonucunda görülen plazmidler.....	55
Şekil 4.3. <i>E. faecium</i> ADU1 suşunda <i>linA</i> , <i>linB</i> , <i>Inu(C)</i> , <i>Inu(D)</i> için spesifik primerlerle yapılan PCR görüntüsü.....	56
Şekil 4.4. Eritromisin, rifampisin ve füzidik asit içeren seçici besi yerinde 48 saatlik inkubasyondan sonra üreyen transkonjugantlar.....	57
Şekil 4.5. Seçilen 1, 2, 3 ve 4 numaralı transkonjugantlarda Gots' testi uygulaması	58
Şekil 4.6. Seçilen 5, 6, 7 ve 8 numaralı transkonjugantlarda Gots' testi uygulaması	59
Şekil 4.7. Seçilen 9 ve 10 numaralı transkonjugantlarda ve <i>E. faecium</i> ADU1 ile <i>E. faecalis</i> JH2-2 suşlarında Gots' testi uygulaması	60
Şekil 4.8. Seçilmiş olan 9 adet transkonjugantda görülen <i>linB</i> amplikonları.....	60
Şekil 4.9. PFGE profilleri.....	61
Şekil 4.10. <i>EcoRI</i> ve <i>HindIII</i> kesimi ve ligasyon sonrası yapılan inverse PCR sonucu	62
Şekil 4.11. INVLINB1 ve INVLINB2 primerleriyle çoğaltılarak sekans analizine gönderilen <i>HindIII</i> amplikonundan elden edilen sekans sonucunun GenBankası (BLAST) ile karşılaştırılması	64
Şekil 4.12. INVLINB1 ve INVLINB2 primerleriyle çoğaltılarak sekans analizine gönderilen <i>HindIII</i> amplikonundan elden edilen sekans sonucunun Gen Bankası (BLAST) ile karşılaştırılması	65
Şekil 4.13. INVLINB1 ve INVLINB2 primerleriyle çoğaltılarak sekans analizine gönderilen <i>HindIII</i> amplikonundan elden edilen sekans analizi sonucu.....	66

Şekil 4.14. *linB* genini taşıyan pEF418 plazmidinin dizi analizi..... 67

Şekil 4.15. *linB* geninin pEF418 plazmidi üzerinde yer alıp almadığını tespit
etmeye yönelik dizayn edilen primerlerle yapılan PCR ve elektroforez sonucu... 74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Gram pozitif katalaz negatif kokların fenotipik özellikleri.....	4
Çizelge 1.2. Enterokok türlerinin biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri	6
Çizelge 1.3. Antibiyotiklere direnç gelişim mekanizmaları.....	18
Çizelge 1.4. Makrolidlerin sınıflandırılması	22
Çizelge 1.5. MLS direncinin mekanizması	25
Çizelge 1.6. rRNA metilaz genleri	27
Çizelge 1.7. Effluks ve inaktivasyon genleri.....	33
Çizelge 3.1. Kullanılan primerler ve dizilimleri.....	40
Çizelge 3.2. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	43
Çizelge 4.1. ADU1 suşunun biyokimyasal özellikleri ve identifikasyon için kullanılan kit API 20 Strep (bioMérieux) sonuçları	51
Çizelge 4.2. ADU1 suşunun yapılan disk difüzyon testi ile antibakteriyellere duyarlılıkları.....	52
Çizelge 4.3. ADU1 suşunun yapılan agar dilüsyon yoluyla antibakteriyellere duyarlılıkları.....	53
Çizelge 5.1.Linkozamid direnç genlerinin bulunduğu suşlar ve izole edildiği yerler.....	75

1. GİRİŞ

1.1. Enterokoklar

Enterokok terimi ilk defa 1899'da Fransa'da Thiercelin tarafından kullanılmıştır. Aynı yıl MacCallum ve Hastings daha sonradan hemolitik bir enterokok olduğu anlaşılan *Micrococcus zymogenes* adını verdikleri endokardite yol açan bir bakteri tanımlamışlardır. 1906'da Andrewes ve Horder, endokarditli bir hastadan izole ettikleri bakteriyi *Streptococcus faecalis* olarak tanımlamıştır (Murray, 1990). Streptokoklar 1919 yılında Brown tarafından kanlı agarda yaptıkları hemoliz tipine göre alfa, beta, gama hemolitik olarak ilk defa sistematik olarak sınıflandırılmıştır (Brown, 1919). R. Lancefield, 1933 yılında streptokokları hücre duvarında bulunan polisakarit C maddesinden yararlanarak presipitasyon testi ile A'dan V'ye kadar gruplandırmıştır (Lancefield, 1933). Sherman ise streptokokları; hemoliz, üreme derecesi ve özellikleri, biyokimyasal özellikleri ve antijen yapılarına göre, piyojen, laktik, viridans streptokoklar ve enterokoklar olarak 4 gruba ayırmıştır (Sherman, 1937). *S. faecalis* ve *S. faecium*'un *Streptococcus* genusundan değişik bir genetik yapıya sahip olmaları nedeniyle farklı bir genusa alınmalarını ilk kez 1970 yılında Kalina önermiştir (Kalina, 1970). Schleifer ve Kilpper-Balz 1984'te *S. faecalis* ve *S. faecium*'un streptokoklardan ayrılarak *Enterococcus* cinsine aktarılmasını önermişlerdir. Daha sonra bu cins içindeki bakteriler *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. alodoratus*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. mundhi*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. flavescens*, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. saccharolyticus*, *E. columbae* ve *E. cecorum* gibi çeşitli türlere ayrılmışlardır (Facklam, 1998).

Enterokoklar çevre şartlarına son derece dayanıklı bakterilerdir. Geniş bir pH spektrumunda üreyebilirler. Uygun olmayan temizlik (dekontaminasyon ve dezenfeksiyon) koşullarında canlılıklarını sürdürebilirler, bu da özellikle hastane ortamında kalıcı olmalarını sağlar. Birçok epidemiyolojik çalışma enterokokların hastane ortamında insandan insana sağlık çalışanlarının elleri aracılığı ile veya kontamine araç gereç ile yayıldığını göstermiştir (Sümerkan, 2002).

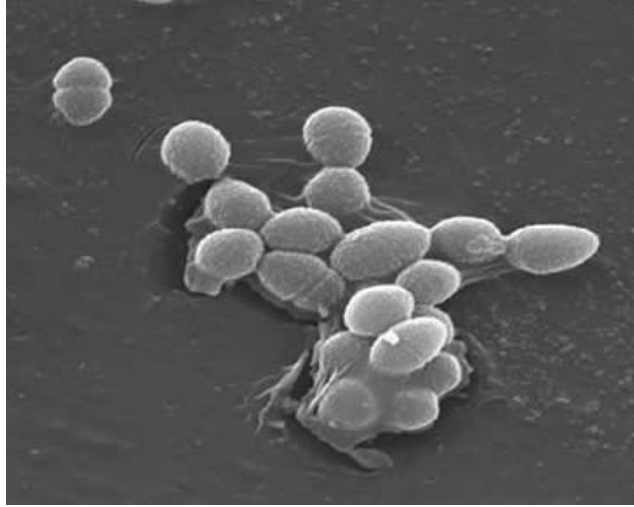
Son 20 yıldır metisilin direnci nedeniyle en tehlikeli mikroorganizma sayılan *S. aureus* yerini; hem doğal dirençli yapısıyla, hem de hospitalizasyon, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve yoğun bakım ünitesi ihtiyacındaki artışın

beklenen sonucu olarak enterokoklara bırakmıştır. Bu haliyle enterokoklar maalesef tıp dünyasının ana problemlerinden biri olmaya adaydır.

1.1.1. Mikrobiyolojileri

Enterokoklar tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde görülen, fakültatif anaerob, Gram pozitif koklardır. Mikroskopik olarak streptokok türlerinden ayırt edilemezler. Bazen Gram pozitif kokobasil şeklinde görülebilirler. Katalaz negatiflerdir, fakat bazı kökenlerinde 'pseudo catalase' yapımı vardır (Ruoff vd., 1990).

Bugüne kadar 35 tip enterokok tanımlanmıştır. Ama klinik olarak en önemli iki patojen *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur. Şekil 2.1. *E. faecalis*'in elektron mikroskop görüntüsü yer almaktadır. Tüm enterokok enfeksiyonlarının %80'inden bu iki mikroorganizma sorumludur. *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum* ve *E. mundhi* daha az sıklıkla insanlarda enfeksiyona neden olur (Çelik ve Alhan, 2008).



Şekil 1.1. *Enterococcus faecalis*'in elektron mikroskop görüntüsü

Kaynak: http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus_faecalis Photo by:Pete Wardell / CDC

Enterokoklar 10–45°C’de üreyebilen, %6,5 NaCl’lü ortamlarda üremeyi sürdürebilen, 60°C’de 30 dakika canlı kalabilen ve eskülünü hidrolize edebilen bakterilerdir. Ayrıca pH 9,6’da, %40 safra tuzu içeren besiyerinde üreyebilirler. Fakültatif anaerob bakterilerdir. Sitokrom enzimleri olmadığından katalaz negatiftirler. Glikozdan gaz oluşturmazlar. Kanlı jelozda enterokok kolonileri büyükçe, gri, parlak, buğulu görünümde olup alfa, beta hemolitik ya da non-hemolitiklerdir. *E. cecorum*, *E. columbae* ve *E. saccharolyticus* dışında kalan tüm kökenler PYR (pirolidonil betanaftilamid) maddesini hidrolize ederler. *E. flavescens*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* gibi bazı kökenler hareketlidirler. *E. faecalis*, *E. faecium*’un tersine %0.04 tellürit içeren ortamda ürer ve agarda siyah koloniler yaparlar. (Yıldırım, 2007).

1.1.2. Epidemiyolojileri

İnsanlarda, esas olarak gastrointestinal florada bulunmaları nedeni ile gerek hastane gerekse hastane dışı ortamda endojen kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. İnsanlarda doğumdan hemen sonra kolonize olmaktadır. *E. faecalis* diğer enterokok türlerine göre dışkıda daha yüksek oranda bulunmaktadır. Hastane ortamında bulunan stetoskop, kapı tokmağı, yatak, komidin gibi cansız maddeler üzerinde uzun süre yaşayabilmektedir. Dirençli enterokokların yayılımına elektronik termometreler de yardım edebilir. Bu nedenle enterokoklar gerek cansız maddeler aracılığı ile gerekse sağlık personeli ile hastadan hastaya taşınarak hastane enfeksiyonu etkeni olarak salgınlara yol açabilmektedir. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, enterokokların hastadan hastaya ve hatta hastaneler arası yayılabilmesinde bu bakterilerin normal bağırsak florasında bulunmasının temel risk faktörü olduğunu göstermiştir (Butler, 2006).

Enterokok enfeksiyonlarının %60’ı nozokomiyaldir. Bu enfeksiyonların yarısı yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. Enterokoklar CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından 1990-1992 yıllarında *E. coli* ve stafilokoklardan sonra 3. sık görülen nozokomiyal etken olarak bildirilmiştir. Bütün nozokomiyal enfeksiyonların %10’unda, bakteremilerin %9’unda ve nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının yaklaşık %16’sında etkendirler (Holm ve Mascini, 1999).

Lactococcus, *Aerococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türleri gibi bazı Gram pozitif, katalaz negatif koklarda da benzer özellikler bulunur (Çizelge 2.1.). *Lactococcus* ve *Aerococcus* türleri grup D antiserumu ile reaksiyon vermemeleri; *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türleri de PYR negatif olmaları ile enterokoklardan ayrılırlar (Durmaz, 2008).

Çizelge 1.1. Gram pozitif katalaz negatif kokların fenotipik özellikleri

Cins	Vankomisin	Glikozdan Gaz Oluşurma	PYR	LAP	%6,5 NaCl	10°C'de Üreme	45°C'de Üreme	Eskülin Hidrolizi	Hareket
<i>Enterococcus</i>	S-R	-	+	+	+	+	+	+	D
<i>Streptococcus</i>	S	-	-**	+	-*	-	D	D	-
<i>Lactococcus</i>	S	-	+	+	D	+	D	+	-
<i>Leuconostoc</i>	R	+	-	-	D	+	D	D	-
<i>Pediococcus</i>	R	-	-	+	D	-	D	-	-
<i>Gemella</i>	S	-	D	+	-	-	-	-	-
<i>Vagococcus</i>	S	-	+	+	+	+	D	+	+

PYR: L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide, **LAP:** Lösin aminopeptidaz yapımı,

D: Değişken, **S:** Duyarlı, **R:** Dirençli

*Bazı beta-hemolitik streptokoklar %6,5 NaCl' de ürerler. ** Grup A streptokoklarda görülebilir. Kaynak: (Ulusoy ve Usluer, 2004).

1.1.3. Bazı enterokok türlerinin özellikleri

E. faecalis: Gastrointestinal flora üyesidir. Ağız, hepatobiliyer sistem ve vajinadan da izole edilmiştir. İnsan kaynaklı enfeksiyonlardan en sık sorumlu tutulan türdür.

Ayrıca çeşitli hayvanlarda da bulunur. Üriner infeksiyon dışında yara, periton sıvısı, derin pelvik apse, endokardit ve kan kültürlerinden de izole edilmiştir. Beta hemolitikdir ve %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer.

E. faecium: İnsan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunur. Yiyecek, sebze ve yemlerden de izole edilmiştir. İki biyotipi vardır. *E. faecalis*'e göre antimikrobiyallere daha dirençlidir. Alfa hemolitikdir ve %6,5'luk NaCl, pH 9,6'da ürer.

E. durans: Süt ve kuru gıdadan izole edilmiştir. İnsan ve hayvanda nadiren bağırsak ve üriner sistemden izole edilmiştir. Alfa hemolitikdir. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer. 50°C'de üremez.

E. avium: Kuşlar, tavuk, köpek gibi hayvanlardan izole edilmiştir. İnsan gastrointestinal sistem florasının da bir parçasıdır. Apandisit, otit ve beyin apselerinden izole edilmiştir. Alfa hemolitikdir ve %6,5'luk NaCl'de üremesi zayıftır. H₂S üretir, pigment yapmaz.

E. casseliflavus: Bitki ve toprakta bulunur. Vankomisine dirençlidir. İnsanda fırsatçı infeksiyonlar yapabilirler. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer. Hareketlidir, sarı pigment yapar.

E. gallinarum: Evcil kuşların gastrointestinal sisteminde bulunur. İnsanda hemodiyalizli bir hastadan da izole edilmiştir. Vankomisine dirençlidir. Koyun kanlı ağarda hemoliz yapmaz ancak at kanlı ağarda beta hemoliz yapabilir. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer. Hareketlidir, pigment yapmaz.

E. hirae: Domuz ve tavuklarda bulunur. Önceden atipik *E. faecium* olduğu kabul edilirdi. Hemoliz yapmaz. 10-45°C arasında üreyebilir. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6 da ürer (Brrrie ve Christou, 1990).

Çizelge 1.2. Enterokok türlerinin biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri (Yayla, 2007)

Grup,Tür	Grup D antijen	Safraeskulin agarda üreme	%6,5 NaCl 'de üreme	10°C'de üreme	45°C'de üreme	LAP	PYR	Hareket	Sarı pigment	ADH	HIP	GLU	MNT	SORB	ARB	ASİT ÜRETİMİ				
																SBLT	RAF	SUK	PRV	MGP
Grup I																				
<i>E. avium</i>	+	+	+		+	+	+	-	-	-	D	+	+	+	+	+	-	+	+	D
<i>E. gilvus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>E. malodoratus</i>	+	+	+		-	+	+	-	-	-	D	+	+	+	-	+	+	+	+	D
<i>E. Pallens</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. pseudoavium</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	D
<i>E. saccharolyticus</i>	-	+	+			+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Enterococcus sp.</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
Grup II																				
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	D	D	+	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+		+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	D	+	+	D	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	D	+	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>E. haemoperoxidus</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+ ^z	+	+	+	+	-	-	D	-	+	-	+
<i>Enterococcus sp.</i>	+	+	+	+	+	+ ^z	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Grup III																				
<i>E. dispar</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	D	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. durans</i>	+	+	+		+	+	+	-	-	+	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>E. ratti</i>	+ ^z	+	+	+	+	+	+	-	-	+	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. villorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Grup IV																				
<i>E. asini</i>	+	+	-	D	D	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	D
<i>E. cecorum</i>	-		-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>E. sulfurous</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>E. phoenicicola</i>		-	-	-	-				-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Enterococcus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Grup V																				
<i>E. columbae</i>	-	+	+			+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>E. canis</i>		+	+			+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	D	+	+
<i>E. moraviensis</i>	+	+	+	+	-	+	D	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+

Çizelge 1.2.'de LAP: lösin aminopeptidaz; PYR: L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide; ADH: arjinin dihidrolaz; HIP: hippurat hidrolizi; GLU: glukoz; MNTL: mannitol; SORB: sorboz; ARB: arabinoz; SBTL: sorbitol; RAF: raffinoz; SUK: sükröz; PRV: pirüvat; MPG: metil-a-D-glukopiranozit; ^z:zayıf pozitif; D: değişken'i ifade etmektedir.

1.1.4. Enterokokların Neden Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları

Üriner sistem enfeksiyonları: Üriner sistem enfeksiyonları enterokokların yol açtığı klinik hastalıkların en sık görülen tipidir ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen enterokokların en sık kaynağı idrar kültürleridir (Moellering, 2005). Enterokokların etken olduğu üriner sistem enfeksiyonlarının çoğu nozokomiyaldir ve çoğunlukla üriner kateterizasyon ile birlikte bulunur. Özellikle yapısal bozukluğu veya tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonu olan hastalarda sıktır (Murray, 1998). Enterokoklar hastanede yatmayan genç, sağlıklı kadınlarda komplike olmamış sistit gibi üriner enfeksiyonların %5'inden azını oluşturur (Söyletir ve Çerikçioğlu, 2002).

Endokardit: Enterokoklar viridens streptokoklar ve *Staphylococcus aureus*'dan sonra üçüncü en sık rastlanan infektif endokardit etkenidir (Willke vd., 2002). Enterokoklar bakteriyel endokarditlerin yüzde 5-15'ini oluştururlar (Moellering, 2005). Enterokok endokarditi süt çocuklarında nadirdir, çocuklarda bazen görülebilir. Erkeklerde ve 50 yaş üzeri popülasyonda daha sıktır. Sıklıkla etken *E. faecalis*'dir. Vakaların çoğunda altta yatan bir kalp kapak hastalığı veya prostetik kapak bulunmakla beraber, enterokoklar normal kapaklarda da enfeksiyona yol açabilirler. İlaç bağımlılarında %5-53 oranında etken olabildikleri gösterilmiştir (Murray, 1998 ; Willke vd., 2002). Hastalık cerrahi yolla ya da manüplasyonlarla gastrointestinal sistemden veya çoğunlukla da genitoüriner enfeksiyon ve genitoüriner bölgeye tıbbi girişim uygulanmasından kaynaklanır. En sık aort ve mitral kapak tutulur. Enterokoklar genellikle subakut bakteriyel endokardite neden olurlar (Moellering, 2005).

Bakteriyemi: Enterokok bakteriyemisi enterokok endokarditinden daha sık görülen bir enfeksiyondur ve sıklığı giderek artmaktadır. Endokardit hastane dışı kaynaklı enterokok bakteriyemilerinin 1/3'ünde görülürken nozokomiyal bakteriyemilerde endokardit oranı %1'in altındadır (Murray, 1998).

Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar: Enterokoklar karın içi ve pelvik enfeksiyonlarda sıklıkla karışık aerob ve anaerobik floranın bir parçası olarak bulunurlar. Ancak bu enfeksiyonlardaki rolü tartışmalıdır. Bu enfeksiyonlarda çoğu zaman enterokoklara etkisi olmayan antimikrobik ilaçlarla yapılan tedavi ile başarılı sonuç almak mümkün olmuştur (Willke vd., 2002). Bununla birlikte enterokokların nefrotik sendrom ya da sirozlu hastalar ile ayaktan sürekli periton diyalizi gören hastalarda peritonit yaptığı ve sezeryan sonrası apseye neden oldukları bilinmektedir (Murray, 1998).

Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları: Enterokoklar nadiren derin doku enfeksiyonlarına yol açarlar. Sıklıkla cerrahi yara enfeksiyonları, dekübitus ülserleri ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında alınan klinik örneklerden Gram negatif basil ve anaerob bakteriler ile birlikte izole edilebilirler. Ancak bu olgularda enterokokların klinik önemini değerlendirmek karın içi apselerinde olduğu gibi zordur (Moellering, 2005).

Menenjit: Enterokok menenjitleri genellikle santral sinir sisteminde anatomik bir defekt, önceden geçirilmiş beyin ameliyatı ya da kafa travması gibi faktörlerin varlığında görülür. Ayrıca bakteriyemi düzeyi yüksek olan endokardit, AIDS ve akut lösemi gibi hastalarda bazen enterokoklara bağlı menenjitler görülebilmektedir (Eroğlu vd., 2003). Erişkinlerde bildirilen olguların çoğu enterokokal endokarditi veya üriner sistem enfeksiyonu olan, beyin cerrahisi ile ilgili girişim uygulanan ya da immun sistemi baskılanmış hastalardır (Çetinkaya Sardan, 2002).

Pediyatrik enfeksiyonlar: Bakteriyolojik olarak konfirme edilmiş neonatal sepsis ve menenjit olgularının %13'ünde enterokokların etken olduğu bildirilmiştir. Düşük doğum ağırlığı, erken doğum, bağırsak rezeksiyonu veya diğer abdominal cerrahi girişimler ve sefalosporin grubu antibiyotik tedavileri yenidoğan yaş grubunda enterokokal sepsis gelişimi için önemli risk faktörleridir (Çetinkaya Sardan, 2002).

1.1.5. Virulans Faktörleri

Genel olarak enterokoklar, *S. aureus*, *S. pyogenes* gibi mikroorganizmalar kadar intrinsik virulansa sahip değildir. Klasik bir virulans faktörü olmamasına rağmen enterokokların çok sayıda antimikrobiyal ajana dirençli olması, geniş spektrumlu

antibiyotik tedavisi alan hastalarda yaşamalarına ve çoğalmalarına imkan tanıyarak süperinfeksiyonlara yol açmalarına neden olmaktadır (Moellering, 2005). Çalışmalarda enterokokal bakteriyemilerde %42-68 oranında mortalite bildirilse de bu hastaların ileri derecede düşük olması ve çoğunda polimikrobiyal bakteriyemi bulunması nedeniyle, enterokokların mortalitedeki rolleri tam olarak tespit edilememektedir (Edmond vd., 1995). Bazı çalışmalarda da enterokokların mortalitedeki rolleri % 31-37 oranında saptanmıştır (Kreft vd., 1992).

Sitolizin: Salgınlardan izole edilen *E. faecalis* suşlarında %60'a varan sıklıkta saptanabilen bir virülans faktörüdür. Hemolitik özellik taşımaktadır. Sitolizin kodlayan gen bölgesi plazmid üzerinde ya da bakteriyel kromozoma entegre olarak bulunabilmektedir. Toksik aktivitesi ile birlikte, çok sayıda Gram pozitif bakteriyi etkileyebilen bakteriyosin olarak da işlev gördüğü gösterilmiştir. Toksin insan ile at kanlı agarlarda hemolitik aktiviteye sahipken, koyun eritrositlerinde etkili olmayışı klinik laboratuvarlarda tanısıl açıdan önemli bir özelliktir (Gültekin, 2004). İnsanlarda patojen olan enterokok suşları arasında, sitolizin üretenlerin oranının, patojen olmadığı düşünülen suşlardan fazla olduğu gösterilmiştir (Tailor vd., 1993).

Agregasyon Faktörü: Birçok özelliği ile bakterinin virülansına katkıda bulunmaktadır. Bir yüzey proteinidir. Etkin alıcı ve verici hücre birleşmesini sağlayarak plazmid transferini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda bakterilerin agregasyonunu da sağlayarak virülansa katkıda bulunmaktadır. Agregasyon faktörü, enterokoklara kalp kapakları ve böbrek epitel hücrelerine bağlanma, endokardit ve üriner sistem infeksiyonu oluşturma yeteneğini sağlamaktadır. Özellikle katater infeksiyonlarında, *E. faecalis* izolasyonu *E. faecium*' a göre daha fazladır (Gültekin, 2004).

Jelatinaz (Proteaz): Bu enzim jelatin, kollajen, kazein, hemoglobin, insülin, fibrinojen gibi biyolojik olarak aktif peptidleri parçalayabilen bir ekstrasellüler çinko-endopeptidazdır. Hastanede yatanlarla toplumdaki bireyler arasında feçesten izole edilen enterokoklar arasında jelatinaz üretiminin farklı olduğu düşünülmektedir (Kanemitsu, 2001). *E. faecium* suşlarının neden olduğu endokardit ve nozokomial infeksiyonlarda proteaz üretiminin daha fazla olduğu bulunmuştur (Jett vd., 1994).

Ekstraselüler Süperoksit: *E. faecalis* suşlarının büyük çoğunluğu ve bazı *E. faecium* türleri tarafından sentezlenmektedir. Süperoksitlerin proteinler, nükleik asit ve lipidler gibi biyolojik yapılar üzerinde tahrip edici etkileri vardır. Süperoksit üretiminin bakterinin yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (Gültekin, 2004).

Ekstraselüler Yüzey Proteini: İlk kez *E. faecalis* türlerinde tanımlanan bu büyük yüzey proteininin kompleks bir yaplanması bulunmaktadır. Karboksil ucu hücre duvarına tutunmayı sağlarken, proteinin iç kısmında tekrarlayan ünitelerden oluşan ve moleküle uzayıp kısalabilme özelliği kazandıran bölge bulunmaktadır. Bu proteinin bakterinin immün yanıtta kaçışını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Gültekin, 2004).

Kapsüler Polisakkarid Antijeni: Enterokok polisakkarid antijeni, hücre duvarı, beta-D glikoz 1 fosfat, teikoik asit ve tetraheteroglikan komponentlerinden oluşur. Enterokok virülansının yanısıra enfeksiyona karşı immünütedede rolü vardır ve aşı çalışmalarında araştırılmaktadır (Gültekin, 2004).

Antibiyotik Direnci: Nozokomiyal enterokokal enfeksiyonların kabaca iki basamaklı bir yol izlediği söylenebilir. Öncelikle hastanın hastaneye yatışından kısa bir süre sonra intestinal florada bulunan, antibiyotik dirençli, sitolitik toksin oluşturma gibi virülans özelliklerine sahip suşlar, antibiyotik kullanımı sonucu duyarlı suşların ortadan kalkmaları ile birlikte sayıca artmakta ve sonraki aşamada, hastaların bir kısmında gastrointestinal floradan kaynaklanan bu suşlar doku invazyonuna neden olmaktadır. Virülans faktörleri arasında bulunan antibiyotik direnci suşların intestinal florada seçilip çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi faktörler de doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır (Gültekin, 2004).

1.2. Antibiyotikler

Sözlüklere göre Yunanca *anti* (karşı) ve *bios* (yaşam) sözcüklerinden türetilen antibiyotik sözcüğü, yine sözlüklerdeki tanımlamasıyla özellikle küf mantarlarında bulunan ya da yapay olarak üretilen, bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları yok eden maddelerin ortak adıdır. Antibiosis sözcüğü ise, yine sözlüklerdeki tanımlamasına göre, “Mikroorganizmalar arasındaki karşıtlık”tır (Aktuğlu, 1997; Tunçtan ve Buharalıoğlu, 2005).

1.2.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi

Mikrobiyolojinin en büyük atılımını yaptığı 19. yüzyılın ikinci yarısında, mikroorganizmaların sağaltımda yararlanılabilecek potansiyele sahip olabileceklerini ilk düşünen Pasteur ve Joubert olmuştur. Steril idrarda iyi üreyen şarbon basillerinin diğer bakterilerle kirlenmiş idrarda üreyemediklerini ve sonunda öldüklerini saptayan araştırmacılar, bu gözlemlerinin nedenlerini deneysel olarak ortaya çıkarmak istemişlerdir. Pasteur ve Joubert'in, diğer bakterilerle kirlenmiş idrara karıştırılan şarbon basillerinin deney hayvanlarında hastalık oluşturamadığını ortaya koymaları, enfeksiyonların antibiyotiklerle sağaltımı alanındaki ilk adımları oluşturmuştur (Chambers, 2001).

1935 yılında Domagh enfeksiyon hastalıklarının modern kemoterapisini sülfonamidlerle başlatmış ve prontosil üzerinde yaptığı çalışmalardan ötürü 1938 yılında Nobel ödülünü kazanmıştır. Sülfonamid çağı hızla gelişmiş, 10 yıl içinde 5400 değişik sülfonamid türevinin sentezi yapılmış, önemli bir bölümü de klinikte denenmiştir. Penisilinin klinikte ilk denendiği 1942 yılına kadar sülfonamidler antibakteriyel kemoterapinin en etkili ilacı olarak yaygın biçimde kullanılmışlardır (Aktuğlu, 1997).

Londra'da St Mary's Hospital'da stafilokok varyantları üzerinde çalışmalar yapan Alexander Fleming, bir rastlantı sonucu kültür ortamına bulaşmış bir küf mantarının çevresinde stafilokokların üreyemediklerini, tersine öldüklerini görmüştür. Bu mantarın kültür filtratları, deneysel enfeksiyonlarda birçok bakteriye karşı güçlü biçimde etkin bulunmuş ve Fleming, üreyen küf mantarlarının *Penicillium* türünden oluşundan esinlenerek, etkili maddeye '*penicillin*' adını vermiştir. 1940 yılında Oxford Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Florey, Chain ve Abraham penisilinin farelerde oluşturulan streptokok enfeksiyonlardaki yüksek etkinliğini deneysel olarak kanıtlamış ve sonuçlarını Mayıs 1940'da yayınlamışlardır (Aktuğlu, 1997).

1939 yılından başlayarak 1943 yılına kadar *Actinomycetes* türleri üzerinde çalışmalar yapan Waksman ve arkadaşları, sonunda, *Streptomyces griseus* kültürlerinden streptomisin adını verdikleri bir madde elde etmişlerdir. 1944 yılında sağaltım alanına giren bu antibiyotik, birçok Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizma yanında *Mycobacterium*'lara karşı da çok etkili olmuştur. Uzun

ve yıpratıcı II. Dünya Savaşı'nın geniş insan kitlelerine yaydığı tüberküloz hastalığının denetim altına alınmasında büyük katkısı olan streptomisin, özellikle Gram negatif mikroorganizmalarda ve *Mycobacterium*' larda giderek artan direnç gelişmesine yol açmış, sonuçta, etkinliğini giderek yitirmiş ve daha dar alanlarda daha bilinçli olarak kullanılmaya başlanmıştır. II. Dünya Savaşı'nın sonlarına doğru streptomisin, kloramfenikol ve klortetrasiklin bulunmuş ve günümüze kadar yüzlerce antimikrobiyal ajan literatüre kazandırılmıştır (Chambers, 2001).

1.2.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları

Antibiyotikleri çeşitli kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür. Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmakokinetik özelliklerine göre olmak üzere çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre bakteriyostatikler ve bakterisidler olmak üzere iki şekilde sınıflandırılırlar (Ulusoy, 1999), (Aktuğlu, 1997).

Enfeksiyonların antimikrobiyallerle tedavisinde başarı uygun ilaç seçimi ve kullanımına bağlıdır. Tedavi planlanırken hastalığa sebep olan patojeni ve onun ilaç duyarlılığını gösteren *in vitro* veriler de önem taşır ancak ilacın yapısı ve etki mekanizmaları ile ilgili bilgi olmaksızın sadece *in vitro* verilere dayandırılan tedavi başarısızlıkla sonuçlanır. Bu nedenle antimikrobiyal ilaç seçiminde etki mekanizması (farmakodinamik) ve ilacın vücuttaki hareketi (farmakokinetik) kritik önem taşır (Abdel-Rahman ve Kearns, 2004).

1.2.3. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Antimikrobik maddeler başlıca beş mekanizma ile antimikrobik etki gösterirler(Sağduyu H, 1993):

1. Hücre duvarı sentezini durdurma,
2. Hücre zarı işlevini bozma,
3. Mikroorganizmanın protein sentezini bozma,
4. Mikroorganizmanın nükleik asit sentezini inhibe etme,
5. Antimetabolik etki

1.2.3.1. Hücre duvarının sentezini önleyerek veya litik enzimleri aktive ederek üremeyi durduranlar

β -laktam antibiyotikler (penisilinler, sefalosporinler), glikopeptidler (vankomisin, teikoplanin), novobiosin, basitrasin, sikloserin gibi antimikrobik maddeler bu mekanizma ile etkili olurlar (Sağduyu H, 1993).

Hücre duvarı bakterinin bütünlüğünü koruyan, bölünme ve çoğalmasını sağlayan kısımdır. Hücre duvarı murein denilen bir polimer bileşikten oluşmaktadır. Bu madde bir mukopolisakkarit olan lineer peptidoglikan zincirlerinin yan dallarla birbirine bağlanması sonucu oluşur. Bu tabaka Gram pozitif bakterilerde kalın olup 50-100 peptidoglikan molekül tabakasından oluşur. Gram negatif bakterilerde peptidoglikan tabaka daha ince ve esnek olup 1-2 molekül tabakasından yapıldır ve bunun dışında da bir lipopolisakkarit-lipoprotein yapıları ikinci bir tabaka bulunmaktadır. Bakteri hücre duvarı, dış ortamdan aktif transportla alınan suda çözülmüş pek çok maddenin yükselttiği hücre içi osmotik basınca karşı direnir bakterinin bütünlüğünü koruyarak parçalanmasına engel olur. Hücre duvarının sentezi değişik basamaklar halinde oluşur; murein sentezinde en az 30 çeşit enzim görev alır ve sentez dört basamakta gerçekleşir:

1. Heksozların öncü nükleotidlere dönüştürülerek aktive edilmesi sağlanır.
2. Pentapeptid yan zinciri oluşup NAM (N-asetil muramik asit)'a eklenir.
3. Peptidoglikan zinciri transpeptidasyon ve transglikozilasyon yoluyla oluşur.

Vankomisin, basitrasin, sikloserin gibi antibiyotikler bu aşamaya kadarki olaylarda inhibisyon yaparak etkili olurlar. Örneğin glikopeptitler hücre duvarı öncü maddeleri D-alanil-D-alanin ile kompleks yaparak peptidoglikan sentezini bozar. Basitrasin bakteri hücre duvarı sentezi için esas bir basamak olan lipid profosfatın defosforilasyonunu inhibe eder (basitrasin ayrıca sitoplazmik membran üzerine bozucu etki yapar).

4. Çapraz bağlanma (transpeptidasyon): Yapıca bir kafese benzeyen hücre duvarında peptidoglikan zincirlerin arasında da bağlar oluşacaktır. Transpeptidaz enziminin aktif serin bölgesi, alanin yerine onun analogu gibi davranan penisilin molekülüne geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanır. Sonuçta bir başka NAM'a bağlı pentapeptitle peptid bağı oluşamaz ve çapraz peptid bağlar ile kafes benzeri duvar

oluşumu durmuş olur. Duvar yapımında etki gösteren transpeptidaz, karboksipeptidaz ve endopeptidaz adlı bu enzimlere penisilinle bağlanabildiklerinden PBP (penisilin bağlayan proteinler) denir. PBP'lere bağlanan antibiyotikler bu enzimleri inhibe eder, çünkü β -laktam antibiyotiklere bağlanan enzim (PBP) kendi substratına bağlanamaz, böylece duvar sentezi durur. Bu şekilde enzimleri inhibe olan bakteri bölünemez, gelişemez veya deforme olur (Opal ve Pop-Vicas, 2010).

1.2.3.2. Hücre zarının fonksiyonunu bozanlar

Sitoplazma zarı mikroorganizma için gerekli maddelerin dış ortamdan difüzyon veya aktif transportla alındığı osmotik bir engeldir. Buraya etkili antibiyotikler sitoplazma zarının geçirgenliğini arttırıp sitoplazma içindeki genellikle ufak moleküllü bileşiklerin (aminoasitler, nükleotitler, potasyum) dışarı çıkmasına neden olup mikroorganizmanın ölümüne neden olurlar. Bu maddeler üremesi tamamlanmış mikroorganizmalara da etkili olurlar. Örneğin katyonik deterjan etkisi yapan polimiksinler bakteri hücre zarındaki fosfolipidlerin fosfat bölümleriyle birleşir, kendi moleküllerinin lipofilik bölümünü hücre zarı lipidlerine yerleştirir ve bunları bozar. Sonuçta mikroorganizmanın geçirgenliği artar, osmotik denge bozulur ve hücre içeriği dışarı sızar. Polimiksinler, nistatin, amfoterisin B, imidazoller bu mekanizma ile etkili olurlar (Stratton, 1996).

1.2.3.3. Protein sentezini etkileyenler

Aminoglikozidler (streptomisin, neomisin, kanamisin, gentamisin, tobramisin, amikasin), tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler (eritromisin, azitromisin, klaritromisin, roksitromisin), linkozamidler (linkomisin, klindamisin) bu şekilde etki ederler. Bu grup antibiyotikler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek etkili olurlar. Bunların bir kısmı bakterilerin ribozomları ile birleşip orada m-RNA tarafından yönetilen protein sentezini bozarlar. Memeli hücrelerindeki ribozomlar (80S) bakterilerdekinden farklı olduğundan bunlar memeli hücrelerindeki protein sentezini bozmazlar. Bu grup ilaçlar ribozomlarda farklı etkilere neden olurlar. Bu etkiler;

- Kodon okumada hata oluşması
- Aminoasid-tRNA'nın ribozom mRNA kompleksine bağlanmasını inhibe etmesi
- Aminoasid-tRNA'nın peptidiltransferaz merkezine bağlanmasının engellenmesi
- Sentezlenen peptidin protein sentezi tamamlanmadan erken ribozomdan ayrılmasına neden olması şeklindedir

1.2.3.4. Nükleik asit sentezini bozanlar

Rifampin, nalidiksik asit ve diğer kinolonlar (ofloksasin, siprofloksasin, norfloksasin, pefloksasin), nitrofuranlar, vidarabin, asiklovir, griseofulvin, nitroimidazole türevleri (metronidazole, tinidazole, ornidazole) bu şekilde etki ederler. Bu grup antibiyotikler DNA (Deoksiribonükleik asit) sentezini veya DNA'dan mRNA sentezini bozarak etki gösterirler. Bu grupta memeli hücrelerinin çekirdeğini etkileyen sitotoksik ilaçlar vardır ve bir kısmı tümör tedavisinde kullanılırlar (antineoplastikler-mitomisin, aktinomisin, doksorubisin vd.). Memeli hücreleri üzerinde fazla toksik olmayan rifamisinler ve kinolonlar antibiyotik olarak kullanılırlar (Edmond vd., 1999).

1.2.3.5. Antimetabolitler

Bu grupta sulfonamidler, INH (izoniazit), ethambutol, dihidrofolat redüktaz inhibitörleri (trimethoprim, primetamin), 5- fluorositozin bulunmaktadır. Antimetabolitler yapıcı normal substratlara benzer ve enzimlerin üzerindeki etkin yerler için onlarla yarışır. Bunlar bakterilerin metabolizması için gerekli bazı maddelerin sentezini bozarlar (Öztürk, 1997).

1.2.4. Antibiyotik Direnci

Tarih boyunca, insanlar ve mikroorganizmalar arasında süregelen bir savaş olmuştur. Çağlar boyunca önce veba, sıtma, tüberküloz ve son olarak HIV (Human Immunodeficiency Virus) virüsü milyonlarca insanın hastalanmasına ve ölmesine neden olmuştur. 1928'lerde penisilinin Alexander Fleming tarafından keşfinden sonra antibakteriyel ilaç gelişimi ivme kazanmış ve gerek antibakteriyel ajanların etkisi ile gerekse hijyen ve temiz su kaynakları gibi başka etkenlerin katkısı ile bu

savaş insanoğlunun lehine dönmüştür (Tenover, 2006). Bununla birlikte penisilinin kullanıma girdiği 1940'lı yıllardan itibaren bakteriyel direnç de gündeme gelmiştir. Antimikrobiyal ajanların kullanımı arttıkça direnç de artmış, bu durum yeni ilaçların keşfini zorunlu hale getirmiştir. Keşfedilen her yeni ilaca da hızla direnç gelişimi sorunun giderek büyümesine neden olmuştur (Tenover, 2006; Krause, 1992).

Normal dozda antimikrobiyal ajan verilmesine rağmen mikroorganizmanın ölmemesi ya da üremesinin baskılanmaması durumuna antibiyotiklere direnç gelişimi, bu bakteriye de dirençli bakteri denir. Bakteriyel direncin günlük yaşamda sorun olmasının birçok nedeni vardır. Öncelikle, dirençli bakteriler arasında yer alan stafilokoklar, enterokoklar, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas* türleri hastanelerde yaygın enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Edmond vd., 1999). Bakteriyel direnç tedavi başarısızlıklarına da neden olmaktadır. Bu durum özellikle kritik yoğun bakım hastalarında daha pahalı antibiyotik kullanımlarını gerektirmekte, hastanede yatış süresinin uzaması, morbidite ve mortalitede artış ile sonuçlanabilmektedir (Mülazımoğlu L, 2000). Dirençli bakterilerin yaygınlaşması hastanede olduğu gibi toplumda da enfeksiyon kontrol önlemlerinde sorunlara yol açmaktadır. Klinik önemi olan MRSA (metisilin dirençli *S. aureus*) ve GSBL (geniş spektrumlu beta-laktamaz) üreten *E. coli* gibi bakterilere toplum kökenli enfeksiyonlarda da sık rastlanmaya başlanmıştır (Chambers, 2001; Woodford vd., 2004). Son olarak direnç gelişimi ekonomik açıdan bakıldığında hastane maliyetlerini de arttırmaktadır (McGowan, 2001). Antibiyotik direnci aslında evrimin ve bakteri genetiğinin doğal bir ifadesidir (Opal ve Pop-Vicas, 2010). Çeşitli etkenler kalıtsal bakteri potansiyelinin artmasına ve yayılmasına katkıda bulunur. Bu etkenler arasında en önemlileri antibiyotik tüketiminde artış, uygunsuz antibiyotik kullanımı, gıda endüstrisinde ve diğer alanlarda yaygın ve kontrolsüz antibiyotik kullanımı, yoğun bakım ünitelerinin artma ve immün sistemi bozulmuş hastaların sayısındaki artışlardır (Tenover, 2006).

1.2.4.1. Antibiyotiklere direnç gelişim mekanizmaları

Bakterilerin antibiyotiklere olan direnci ikiye ayrılır: doğal direnç ve kazanılmış direnç. Doğal direnç bakterilerin kromozomal direncidir. Örneğin Gram negatif bakteriler hücre yapılarından dolayı vankomisine doğal dirençlidirler. Benzer

şekilde zorunlu anaeroblar aminoglikozidlere, mikoplazma beta-laktam antibiyotiklere genetik olarak dirençlidir (Opal ve Pop-Vicas,2010).

Kazanılmış direnç farklı mekanizmalar ile antibiyotik baskısı altında gelişmektedir. En sık rastlanan mekanizma nokta mutasyonları sonucu nükleotidlerde oluşan değişimlerdir. Bu değişiklikler “mikroevolüsyoner değişimler” olarak adlandırılır. Mutasyonlar bakteri yüzeyindeki antibiyotiklerin hedef bağlanma yerindeki değişiklikler ya da enzimatik substrat değişikliği ile sonuçlanmaktadır. Nokta mutasyonları örneğin, genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların gelişiminden sorumludur (Kuyucu, 2007). Direnç gelişiminde bir diğer mekanizma ise “makroevolüsyoner değişimler” olarak adlandırılan ve bakterinin geniş DNA segmentlerindeki genomik düzenlemelerdir. Bu düzenlemeler bakteriyel kromozom ya da plazmidin bir bölgesindeki geniş DNA bölümlerinin bir diğer bölgesine inversiyon, duplikasyon, insersiyon, delesyon ya da transpozisyonu şeklinde olmaktadır. Bakteriyel genomdaki bu düzenlemeler integron, transpozon ve insersiyon sekansları olarak adlandırılan özel genetik elemanlar aracılığı ile gerçekleşir (Lupski, 1987). Üçüncü genetik değişim mekanizması ise bakterinin yabancı DNA’yı plazmidler, bakteriyofajlar, çıplak DNA parçaları ya da diğer bakteriden transpoze genetik eleman olarak (örneğin vertikal geçiş) almasıdır. Dış ortamdan alınan yabancı DNA mikroorganizmanın genetik değişkenliğine ve antimikrobiyal ajan baskısı altında seçilmesine neden olmaktadır (Medeiros, 1997).

Normal şartlarda da mikroorganizma ortamında her zaman birkaç adet kendiliğinden direnç geni taşıyan bakteri bulunabilir. Dirençli bakteriler ile duyarlı bakteriler arasında direnç geni transferi olabilir. Bu ortama antibiyotik eklendiğinde duyarlı bakteriler ölürken, antibiyotiğe dirençli az sayıdaki bakteri yaşar ve çoğalır. Antibiyotik kullanımı devam ederse dirençli suşların sayısı artar. Antibiyotik yokluğunda ise bir iki kuşak sonra kendiliğinden duyarlı bakteriler tekrar ortaya çıkar ve bir süre sonra koloni tekrar o antibiyotiğe duyarlı hale gelir (Opal ve Pop-Vicas, 2010). Antibiyotik direnç genleri edinildikten sonra bu genler bakteriler arasında transformasyon, trasdüksiyon, konjugasyon ya da transpozisyon aracılığı ile nakledilebilir. Konjugasyonda bakteriler birbirlerine kısa DNA parçacıklarını geçirirler. Bu olay, değişik bakteri türleri arasında olabilir. Transformasyonda ise bakteri dış ortamdan çıplak DNA almaktadır. Trandüksiyonda ise bakteri, bakteriyofaj tarafından enfekte edilir ve direnç genini kazanır. Transpozisyonunda ise transpozonlar denilen gen kasetleri taşıyan DNA

bölgelerinin plazmid ya da bakteriyofajlar aracılığı ile başka bir bakteriye iletimi söz konusudur (Landman vd., 2007; Lupski, 1987).

Kendiliğinden mutasyonlar ya da genetik alışveriş sonucu gelişen antibiyotik direncinde başlıca mekanizmalar Çizelge 1.3.'de görülmektedir.

Çizelge 1.3. Antibiyotiklere direnç gelişim mekanizmaları (McManus, 1997)

<i>Direnç Mekanizması</i>	<i>Etki şekli</i>
Enzimatik İnaktivasyon	Antibakteriyel ajanı inaktive eden enzimin etkisinin değiştirilmesi (Stafilokoklarda eritromisin direnci veya beta-laktamazlar);
Geçirgenliğin Değişmesi	Dış membran protein kanallarının yapısında değişiklik sonucu antibiyotiklerin hücreye girişinin önlenmesi (<i>E.coli</i> 'de OmpF değişikliği);
Hedef Değişikliği	Antibakteriyel ajanın hücrede bağlandığı hedef proteinin yapısının değişmesi (Pnömonoklarda penisilin-bağlayıcı protein 2b değişikliği sonucu gelişen penisilin direnci);
Aktif Effluks	İlacın hücre içine girmesinden sonra aktif atılımını sağlayan pompa sistemleri (Kinolon direnci)

Enzimatik inaktivasyon: Bu mekanizma β -laktam antibiyotikler, aminoglikozidler, kloramfenikol ve makrolidlerde önemlidir. Beta-laktamazlar en önemli enzim grubunu oluşturmaktadır. Ayrıca aminoglikozidleri modifiye eden enzimler (asetilizasyon, adenilizasyon fosforilizasyon), kloramfenikol asetil transferaz ve makrolidleri inaktive eden esterazlar da bu mekanizma ile gelişen dirençten sorumludur.

Beta-laktamazlar: Beta-laktam grubu antibiyotikler penisilin keşfinden 60 yıl geçmesine rağmen günümüzde de pek çok hastalığın tedavisinde ilk seçenek

olmaya devam eden en önemli antibiyotik gruplarını oluşturmaktadır. Bu grupta penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktam (aztreonam) yer almaktadır. Beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç yukarıda anlatılan 4 yol ile de gelişmektedir. Ancak bu yollar arasında en önemlisi beta-laktamaz üretimidir (McManus, 1997). Penisilin geliştirilmesinden sonraki yıllarda öncelikle ilk beta-laktamaz olan penisilnaz sentezleyen stafilokoklar tüm dünyaya yayılmıştır. 1960'lı yıllardan sonra ise sefalosporinlerin keşfi ile Gram negatif basillerde bulunan beta-laktamazlar yayılarak önemli bir direnç mekanizması haline gelmiştir. Önceleri sadece Gram negatifler ile sınırlı kalan bu enzimler beta-laktam sınıflarının gelişmesi ve kullanımının daha da yaygınlaşması sonucu daha fazla organizmada ve daha fazla çeşitte görülür hale gelmiştir (Medeiros, 2007). Beta-laktamazlar kromozomal ya da plazmid kontrolünde sentezlenirler. Plazmidler kromozom dışı genetik elemanlar olup direncin yayılmasında çok önemlidirler. Gram negatif bakterilerde direnç genleri plazmidler aracılığı ile konjugasyonla yayılmaktadır (McManus, 1997; Medeiros, 2007). Gram pozitif bakterilerde beta-laktamazlar ekzoenzim olarak hücre dışına salgılanırken, Gram negatif bakterilerde enzim periplazmik boşlukta bulunur. Bu nedenle Gram negatif bakterilerde az miktarda enzim bile antibiyotiklerin etkisiz hale getirilmesi için yeterli olmaktadır (Livermore, 1995).

Gecirgenliğin değişmesi: Başlangıçta sadece Gram pozitif bakterilere özgü olduğu sanılan bu direnç mekanizmasının son yıllarda Gram negatiflerde de olduğu saptanmıştır. Bakterinin dış membranında bulunan ve antibiyotiklerin (özellikle penisilin grubu) hücre içine girmesini sağlayan porin proteinlerinin yapılarının mutasyonlar sonucu değişmesi ya da kaybı sonucu direnç gelişmektedir. Özellikle beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumludur. Tedavi sırasında aminoglikozidlere ve karbapenemlere de bu mekanizma ile direnç gelişimi bildirilmektedir (Opal ve Pop-Vicas, 2010).

Antibiyotik hedefinde değişiklik: Antibiyotiğin bakteride hedefi olan yapılarda gelişen mutasyonlar sonucu oluşan direnç türüdür. Makrolidler, linkozamidler ve streptograminlere direnç gelişiminde antibiyotiklerin hedefi olan ribozomal yapılarda değişim olmaktadır. Kısaca MLS_B (Makrolid, Linkozamid, Streptogramin B) direnci olarak adlandırılan bu direnç *S. aureus*, *S. sanguis*, *B. fragilis* gibi bakterilerde gelişmektedir (Opal ve Pop-Vicas, 2010). Benzer şekilde ribozomal değişiklikler tetrasiklin, aminoglikozid, ketolid ve oksazolidinonlarda da bildirilmektedir. Hücre duvarı sentezini baskılayan glikopeptidlere direnç

gelişiminde de peptidoglikan prekürsörlerinin yapılarındaki değişiklik önemlidir. Özellikle entrokoklarda glikopeptid direnci bu şekilde gelişmektedir ve genin diğer Gram pozitif bakterilere taşınmasında transdüksiyon mekanizması etkilidir (Dutka-Malen vd., 1996). Hedef enzimlerde değişiklik şeklinde gelişebilen direnç türü beta-laktam antibiyotiklerde görülmektedir. Sitoplazma membranında yer alan penisilin bağlayıcı proteinlerin yapısındaki değişiklikler başta *S. pneumoniae* olmak üzere Gram pozitif bakterilerde görülen bir direnç türüdür. PBP'lerin yapısındaki değişiklikler *S. aureus* ve *E. faecium*'da indüklenebilen türde olup beta-laktam antibiyotik kullanımı sırasında uyarılabilmektedir (Tenover, 2006). Kinolon direnci ise DNA giraz geninde meydana gelen mutasyon sonucu gelişmektedir. Sulfonamidlere direnç gelişiminden sorumlu genler bakterinin folik asit sentezinde görev alan ve antibiyotiğin etki ettiği dihidropteorat sentetaz, trimetoprim direncinde ise dihidrofolat redüktaz enzimlerinin yapılarının değişmesine neden olmaktadır (Opal ve Pop-Vicas, 2010).

Etkin effluks (Atım pompaları): Gram negatif bakterilerdeki tetrasiklin, bazı Gram pozitif bakterilerde gelişen makrolid ve streptogramin, *P. aeruginosa*'da beta-laktam ve stafilokoklarda gelişen kinolon direncinden etkin atım pompaları sorumludur. Bu sistemler benzemeyen birçok molekülü fark eder ve dışarı atar. Bakterilerde bu tür pompalar yaygın olarak bulunmaktadır. Örneğin *E. coli*'de 250'den fazla pompa geni vardır (Tenover, 2006; Opal ve Pop-Vicas, 2010).

1.2.5. MLS Grubu Antibiyotikler; Makrolidler, Linkozamidler, Streptograminler

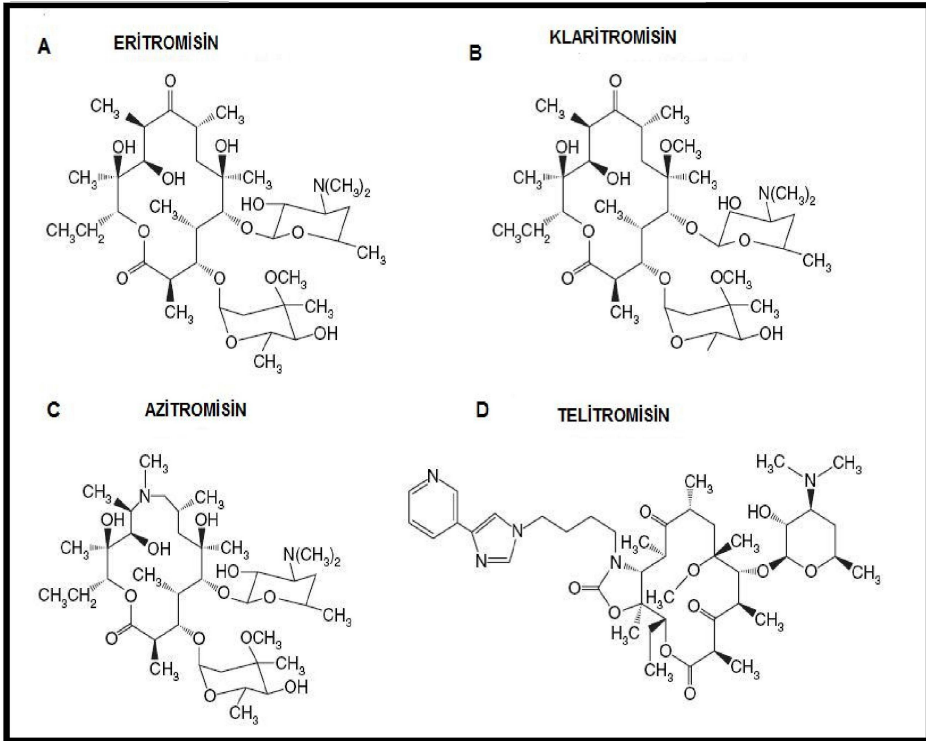
Makrolid, linkozamid ve streptograminler farklı yapıda olmalarına rağmen benzer etki mekanizmalarına ve ortak direnç mekanizmasına sahip oldukları için aynı grupta incelenirler ve MLS grubu antibiyotikler olarak adlandırılırlar.

Bu grup antibiyotikler bakteri ribozomunun 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezinin elongasyon safhasında etkili olarak bakteriyel protein sentezini inhibe ederler. Bunun sonucunda zincir sonlanır ve protein sentezi geri dönüşümlü olarak durur. Gram negatif basiller dış membranın hidrofobik bileşikleri geçirmemesi nedeniyle ribozomları bu antibiyotiklere hassas olmasına rağmen doğal olarak dirençlidirler. (Balaban, 2008)

1.2.5.1. Makrolidler

1952'de *Streptomyces erythreus*'den elde edilen eritromisin ile başlayan makrolid grubu antibiyotikler; günümüzde de düşük yan etkiye sahip olmaları, geniş etkinlik, yüksek doku ve serum düzeyleri ile halen önemini sürdürmektedir. 1952 yılında eritromisinin kullanıma girmesinden sonra, 1980 ile 1990 yılları arasında 2. kuşak eritromisin türevleri roksitromisin, klaritromisin, azitromisin kullanıma girmiştir. Antimikrobiyal ajanlara gelişen direnç sonucu çeşitli enfeksiyonların tedavisinde yeni antibiyotiklerin geliştirilme gereksinimi ortaya çıkmıştır. Bu süreç sonunda makrolidlerin yeni bir sınıfını oluşturan yarısentetik bir antibiyotik grubu olan ketolidler geliştirilmiştir.

Telitromisin bu yeni ailenin ilk üyesidir (Aydın, 2007). Şekil 1.2.'de 14 üyeli makrolidlerden eritromisin, klaritromisin, 15 üyeli makrolid azitromisin ve bir ketolid olan telitromisin yer almaktadır.



Şekil 1.2. Makrolid ve ketolidlerin yapıları (Şener vd., 2005.)

Yapı ve etki mekanizmaları: Makrolidler ≥ 2 amino veya doğal şekerlerin değişik büyüklüklerdeki lakton halkalarına bağlanmasıyla oluşmaktadır (Leclercq, 2002).

İçerdikleri lakton halkası sayısına göre makrolidler sınıflandırıldığında 14 üyeli (eritromisin, roksitromisin, klaritromisin, diritromisin, fluritromisin), 15 üyeli (azitromisin), 16 üyeli (spiramisin, josamisin, midekamisin, rokitamisin, miokamisin) gruplara ayrılmaktadır. (Çizelge1.3.) Tüm makrolidler bakterilerde protein sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe ederek bakteriyostatik etki ederler.

Çizelge1.4. Makrolidlerin sınıflandırılması (Tünger, 2008)

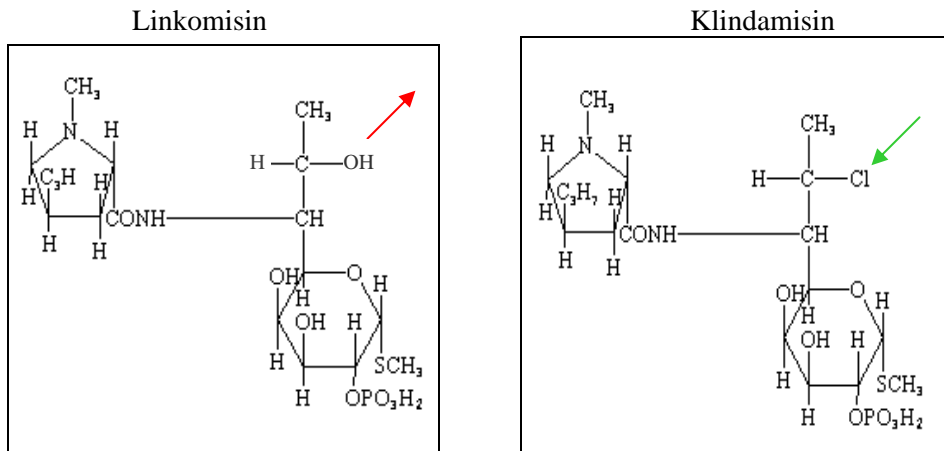
Makrolid Türü	Doğal	Yarı sentetik
14 karbonlu	Eritromisin Oleandomisin	Roksitromisin Diritromisin Klaritromisin
15 karbonlu		Azitromisin
16 karbonlu	Josamisin Spiramisin Tilosin Midekamisin Kitasamisin	Rokitamisin Miokamisin Tilmikosin

Şekil 1.2.'de 14 üyeli makrolidlerden eritromisin, klaritromisin, 15 üyeli makrolid azitromisin ve bir ketolid olan telitromisinin yer almaktadır.

Makrolidler yüksek intrasellüler konsantrasyona erişip intrasellüler patojenlerin tedavisinde yararlı sonuçlar vermektedir. Halen oldukça yararlı bir antibiyotik olmasına rağmen, özellikle gastrointestinal irritasyon, sınırlı etki spektrumu, gastrik asit insitabilitesi, uygunsuz doz, az veya orta absorpsiyon ve doku penetrasyonu ve nispeten kısa yarı ömür gibi dezavantajlarından dolayı eritromisin, yerini azitromisin ve klaritromisin gibi yeni makrolid antibiyotiklere bırakmaktadır (Aydın, 2007).

1.2.5.2. Linkozamidler

İlk olarak 40 yıl kadar önce kullanıma giren linkozamidlerin ilk iki üyesi linkomisin ve klindamisinidir. Gram pozitif mikroorganizmalar ve anaerob mikroorganizmalara etkin olan bu ilaçlar bazı mikoplazma ve protozoonlara karşı da etkilidirler. Linkozamidler antibakteriyel spektrum ve etki mekanizması açısından eritromisin ile benzerlik gösterirler. Linkomisin kimyasal yapı olarak prolin amino asidi ile kükürtlü amino oktoz molekülünün oluşturduğu bir amin olup, bu yapıda hidroksil grubu yerine klor atomu yerleştirilmesi ile klindamisin elde edilmiştir (Şekil 1.3.).



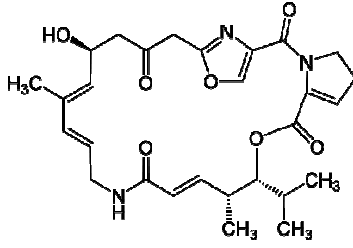
Şekil 1.3. Linkomisin ve klindamisin yapıları

Kaynak:

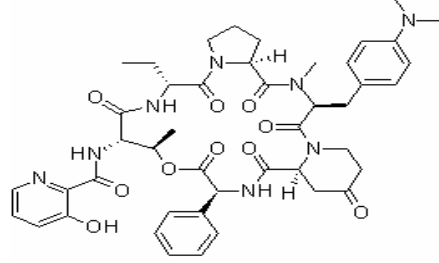
(<http://www.bmb.leeds.ac.uk/mbiology/ug/ugteach/icu8/antibiotics/protein.html>)

1.2.5.3. Streptograminler

Doğal olarak *Streptomyces spp.*'den sentezlenen streptograminler MLS ailesine dahil antibiyotiklerdir. Yapısal olarak birbirleriyle ilişkisiz iki grup molekülden oluştuğu için diğer antibiyotikler arasında özel bir yerleri vardır (Şekil 1.4.). *S. aureus* ve KNS (koagülaz negatif stafilkoklar)'lere metisilin ve eritromisin duyarlılığına bağlı olmaksızın tek başlarına bakteriyostatik etkili iken iki grup molekül birlikte sinerjik etkili olarak bakterisidal etki gösterirler (Leblebicioğlu vd., 2003).



Streptogramin A



Streptogramin B

Şekil 1.4. Streptogramin A ve B'nin yapıları

Kaynak: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streptogramin_A.svg

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streptogramin_B_\(general_structure\).png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streptogramin_B_(general_structure).png)

1.2.5.4. Makrolid-Linkozamid-Streptogramin Direnci

Birçok Gram negatif bakteri (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* türleri, *Acinetobacter sp.*) MLS_B antibiyotiklere dış membranlarının geçirgen olmaması nedeniyle intrinsik olarak dirençlidir.

MLS tipi direnç esas olarak üç mekanizma ile gelişir:

1. Antibiyotiğin hedefinde değişiklik olması
2. Antibiyotiğin inaktive edilmesi
3. Antibiyotiğin aktif olarak dışarı pompalanması (aktif effluks)

Makrolidlerde karşı ana direnç mekanizması RNA metilazların varlığıdır. Çizelge 1.4.'de MLS_B direncinin mekanizması yer almaktadır. Ribozomun 50 S alt birimindeki 23 S RNA'sındaki 2058 no'lu adenin bir metilaz enzimi ile metillenir veya dimetillenir ve bu şekilde değişmiş hedefe makrolidler bağlanamaz. Bu linkozamid ve streptogramin çapraz direncine de neden olur. Bu dirence MLS_B direnci adı verilir. Gram pozitif koklarda bu enzimin sentezi yapısal veya indüklenbilir karakterdedir. Plazmid veya transpozonlarda kodlanabilmektedir (Öztürk, 1997).

Çizelge 1.5. MLS direncinin mekanizması (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>)

rRNA metilaz (32)	Effluks (16)	İnaktivasyon Enzimleri (19)			
		Esteraz (2)	Lizis (2)	Transferaz (11)	4 Fosforilaz (4)
<i>erm</i> (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H), (N), (O), (Q), (R), (S), (T), (U), (V), (W), (X), (Y), (Z), (30), (31), (32), (33), (34), (35), (36), (37), (38), (39), (40), (41)	<i>mef</i> (A), <i>mef</i> (B), <i>msr</i> (A),(C),(D) <i>car</i> (A), <i>lmr</i> (A) <i>srm</i> (B), <i>tlc</i> (C), <i>ole</i> (B), (C) <i>lsa</i> (A), (B), <i>vga</i> (A),(B),(C)	<i>ere</i> (A), (B)	<i>vgb</i> (A), (B)	<i>lnu</i> (A),(B),(C),(D),(F) <i>vat</i> (A), (B), (C) <i>vat</i> (D), (E), (F)	<i>mph</i> (A),(B)(C),(D)

Antibiyotiğin hedefinde değişiklik olması (Ribozomal metilasyon): 1956 yılında eritromisinin tedavide kullanımından hemen sonra stafilokoklara karşı direnç ortaya çıkmıştır (Weisblum, 1995a). Biyokimyasal çalışmalar antibiyotiklere karşı direnç gelişimine hedef ribozomlardaki metilasyonun neden olduğunu göstermiştir, bu durum makrolidler, linkozamidler ve streptogramin B, sözde MLS_B fenotipine karşı çapraz direnç gelişmesine neden olmaktadır (Weisblum, 1995b). Daha sonra MLS_B fenotipi çok sayıda mikroorganizmada rapor edilen *erm* (eritromisin ribozom metilaz) genindeki varyasyonla kodlanmıştır (Roberts vd., 1999). Eritromisin dirençli streptokok suşları ilk kez İngiltere’de 1959 yılında ve Kuzey Amerika’da 1967 yılında rapor edilmiştir (Lowbury ve Hurst, 1959; Dixon, 1968). Şimdiye kadar, makrolid ve linkozamidlere karşı en yaygın direnç gelişim mekanizması olarak ribozomal metilasyon görülmektedir.

Patojenik bakterilerde, Erm proteinleri olgunlaşmamış büyük ribozomal (50S) subünit parçası olan 23S rRNA’daki adenini dimetiller. A2058 nükleotidi 23S ribozomal RNA’nın korunmuş V bölgesinde bulunmaktadır, bu durum MLS_B antibiyotiklerinin bağlanmasında anahtar rol oynamaktadır. Metilasyonun bir sonucu olarak, eritromisinin hedefe bağlanması engellenmektedir. Makrolidler, linkozamidler ve streptogramin B’nin 23S rRNA’daki bağlanma yerlerinin örtüşmesi bu 3 sınıf antibiyotiğe karşı çapraz direnç gelişmesine neden olmaktadır. Gram pozitif türler, spiroketler ve anaeroblar da içeren birçok mikroorganizma çeşidi Erm metilazı üretmektedirler (Weisblum, 1995a).

Şimdiye kadar yaklaşık olarak 41 *erm* geni olduğu bildirilmiştir (Roberts vd., 1999). (Çizelge 1.5.) Patojenik bakterilerde, bu faktörler çoğunlukla plazmid ve transpozonlara aittir, bunlar kendi kendine transfer edilebilmektedir. Tanımlamada artan karmaşıklığı önlemek için bir isimlendirme sistemi geliştirilmiştir. *Erm* genlerinin aminoasit sekans oranı <%80 sonucuna göre farklı harflerle tanımlaması vardır. Bu yeni isimlendirme Erm proteinine karşılık gelecek şekilde *erm* genlerini 21 sınıfa ayırmaktadır. Patojenik mikroorganizmalarda dört major sınıf belirlenmiştir, bunlar *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), ve *erm*(F)’dir. (Weisblum, 1995a; Roberts vd., 1999). *erm*(A) ve *erm*(C) tipik olarak stafilokok gen sınıflarıdır. *erm*(B) genleri daha çok streptokok ve enterekoklarda ve *erm*(F) genleri *Bacteroides* türleri ve diğer anaerobik bakterilerde yaygındır (Roberts vd., 1999).

Çizelge 1.6. rRNA metilaz genleri (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>)

Sınıf	Protein Adı	Gen Adı	Gen İçeriği % DNA Homolojisi	Plazmid, Transpozon	Gen Bankası
A	Erm(A)	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (A) 83%	Tn554	X03216
			<i>erm</i> (TR)		AF002716
B	Erm(B)	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (AM) 98%-100%	Tn1545	X52632
			<i>erm</i> (AM)	pAM β -1	Y00116
			<i>erm</i> (AM)	pAM77	K00551
			<i>erm</i> (B)	Tn917	M36722
			<i>erm</i> (B)	pAD2	M11180
			<i>erm</i> (B)	pTE44	NC_003528
			<i>erm</i> (B)		AJ294530
			<i>erm</i> (AMR)		U86375
			<i>erm</i> (BC)	pIP1527,	M19270
			<i>erm</i> (P), <i>erm</i> (BP)	pIP402	U18931
			<i>erm</i> (IP)	pIP501	X72021
			<i>erm</i> (Z), <i>erm</i> (BZ1), <i>erm</i> (BZ2)	Tn5398	AF109075
			<i>erm</i>	pLEM3	U48430, X82819
			<i>erm</i> (2)	pBT233, pMD101	X64695, X66468
<i>erm</i> (80)	pTE80	AF08045			
C	ErmC	<i>erm</i> (C)	<i>erm</i> (C) 99%-100%	pE194	V01278
			<i>erm</i> (C)	pT48	M19652
			<i>erm</i> (C)	pE5	M17990
			<i>erm</i> (C)	pJR5	L04687
			<i>erm</i> (C)	pA22	X54338
			<i>erm</i> (C)	pSES6	X82668 X82665, X82667
			<i>erm</i> (C)	pSES5	Y09001
			<i>erm</i> (C)	pSES4a	Y09002
			<i>erm</i> (C)	pSE20	U35228
			<i>erm</i> (C)	pSES21	Y09003
			<i>erm</i> (C)	J3356 pOX7	U36911
			<i>erm</i> (IM)	pIM13	M13761
			<i>erm</i> (M)	pNE131	M12730
			<i>erm</i> (M)	pPV141	U82607
<i>erm</i> (M)	pPV42	AF019140			
D	Erm(D)	<i>erm</i> (D)	<i>erm</i> (D) 97%-99%	pBD90	M29832
			<i>erm</i> (J)	pBA423	L08389
			<i>erm</i> (K)		M77505
E	Erm(E)	<i>erm</i> (E)	<i>erm</i> (E) 99%	pUC31, pIJ43	X51891

Çizelge 1.6. rRNA metilaz genleri (Devam)

Sınıf	Protein Adı	Gen Adı	Gen İçeriği % DNA Homolojisi	Plazmid, Transpozon	Gen Bankası
			<i>erm</i> (E2)		M11200
F	Erm(F)	<i>erm</i> (F)	<i>erm</i> (F) 98%-100%	pBF4	M14730
		<i>erm</i> (F)		Tn4351	M17124
		<i>erm</i> (FS)		pBI106, Tn4551	M17808
		<i>erm</i> (FU)		Kromozomal	M62487
G	Erm(G)	<i>erm</i> (G)	<i>erm</i> (G) 99%	pBD370	M15332
		<i>erm</i> (G)		Tn7853	L42817
H	Erm(H)	<i>erm</i> (H)	<i>car</i> (B)	pOJ159	M16503
I	Erm(I)	<i>erm</i> (I)	<i>mdm</i> (A)		ND
N	Erm(N)	<i>erm</i> (N)	<i>tlr</i> (D)		X97721
O	Erm(O)	<i>erm</i> (O)	<i>lrm</i> 84%	pLST391	M74717
			<i>srm</i> (A)		AJ223970
Q	Erm(Q)	<i>erm</i> (Q)	<i>erm</i> (Q)	Kromozomal	L22689
R	Erm(R)	<i>erm</i> (R)	<i>erm</i> (R)		M11276, AY623658
S	Erm(S)	<i>erm</i> (S)	<i>erm</i> (SF) 100%	pET23	M19269
			<i>tlr</i> (A)		P45439
T	Erm(T)	<i>erm</i> (T)	<i>erm</i> (GT) 85%-99%	pGT633	M64090
				Kromozomal	AY89413
			<i>erm</i> (LF)	pLME300	AJ488494
U	Erm(U)	<i>erm</i> (U)	<i>lmr</i> (B)	pPZ303	
V	Erm(V)	<i>erm</i> (V)	<i>erm</i> (SV)		U59450
W	Erm(W)	<i>erm</i> (W)	<i>myr</i> (B)		
X	Erm(X)	<i>erm</i> (X)	<i>erm</i> (CD), <i>erm</i> (A) 99%-100%	pNG2	M36726, X51472
			<i>erm</i> (Y)	Tn5432	U21300
				pAP2	NC_005206
Y	Erm(Y)	<i>erm</i> (Y)	<i>erm</i> (GM)	pMS97	AB014481
Z	Erm(Z)	<i>erm</i> (Z)	<i>srm</i> (D)		ND
30	Erm(30)	<i>erm</i> (30)	<i>pikR1</i>	Kromozomal	AF079138
31	Erm(31)	<i>erm</i> (31)	<i>pikR2</i>	Kromozomal	AF079138
32	Erm(32)	<i>erm</i> (32)	<i>tlr</i> (B)	Kromozomal	AJ009971
33	Erm(33)	<i>erm</i> (33)			AJ313523
34	Erm(34)	<i>erm</i> (34)			AY234334
35	Erm(35)	<i>erm</i> (35)			AF319779
36	Erm(36)	<i>erm</i> (36)	<i>erm</i> (MT)		AF462611
37	Erm(37)	<i>erm</i> (37)		Kromozomal	Z74025
38	Erm(38)	<i>erm</i> (38)		Kromozomal	AY154657
39	Erm(39)	<i>erm</i> (39)		Kromozomal	AY487229
40	Erm(40)	<i>erm</i> (40)		Kromozomal	AY570506
41	Erm(41)	<i>erm</i> (41)		Kromozomal	EU177504

MLS_B direnç ekspresyonunda farklılıklar: MLS_B'nin ekspresyonu yapısal veya indüklenabilir olabilir. İndüklenabilir dirençte, bakteriler metilaz kodlamayan inaktif mRNA üretirler. mRNA sadece makrolid indükleyicisinin varlığında aktive olabilmektedir. Buna karşılık, yapısal ekspresyonda, indükleyici olmadan aktif mRNA metilazı üretilmektedir. İndüksiyon, metilaz için yapısal *erm* genindeki zayıflatıcı etkinin varlığıyla ilgilidir. *erm(C)* durumundaki translyasyon zayıflaması modeline göre ve ayrıca muhtemel *erm(A)* ve *erm(B)* faktörlerinin durumuna göre, indüksiyon transkripsiyondan sonra oluşmaktadır (Weisblum, 1995b).

İndükleyicinin bulunması mRNA'nın yeniden düzenlenmesine neden olmaktadır, bu durum ribozomlarda metilaz kodlayan sekansların translyasyonuna olanak sağlar. Suşlar indüklenabilir *erm* geni barındıran indükleyicilere dirençlidir fakat makrolid ve linkozamidlerin indükleyici olmayanlarına karşı hassas kalmaktadır. İndüksiyonun spesifitesinde genetik altyapı ve bakteriyel çevre rol almaktadır. Uygulamada, stafilokok ve streptokok/enterekoklarla karakterize belirli türlerde öncelikli *erm* gen dağılımı olması, indüklenabilir MLS_B direncinin bir kaç major fenotipini göz önüne alınmasına neden olmaktadır.

Bu nedenle, indüklenabilir makrolid direncindeki farklılık kompleks fenotiplere yol açabilmektedir. Buna karşılık, metilazın yapısal olarak üretimi genellikle MLS_B ilaçlarına karşı yüksek düzeyli çapraz direnç gösteren fenotipler vermektedir.

Stafilokoklarda MLS_B direnç ekspresyonu: Stafilokoklarda *erm(A)* ve *erm(C)* faktörleri predominanttır (Lina vd., 1999). *erm(A)* genleri daha çok metisiline dirençli suşlarda yaygındır ve transpozonlarla karşılaşmaktadır, oysa eritromisin direncinden sorumlu olan *erm(C)* genleri daha çok metisiline duyarlı suşlarda yaygındır ve plazmidlerle karşılaşmaktadır. İndüklenabilir ekspresyon faktörleri benzerdir, MLS_B antibiyotiklere dirençleri farklıdır çünkü antibiyotiklerin indükleme kapasiteleri de farklıdır. 14-15 halkalı olan makrolidler, dirençli olan suşlarda indükleyicidir. Buna karşılık, 16 halkalı makrolidler, ticari olarak mevcut linkozamidler ve streptogramin B'ler indükleyici olarak aktif kalamamaktadırlar.

Streptokok ve enterekoklarda MLS_B direnç ekspresyonu: *erm(B)* sınıfına ait genlerin yaygınlığı ve *erm(A)* sınıfının alt kümesi olan *erm(TR)*, streptokok ve enterekoklarda ribozomal metilasyonla oluşan dirençlerin büyük çoğunluğunun nedenidir. İndüklenabilir gen ekspresyonu, stafilokoklarda farklı fenotipler

oluşmasını sağlar; bu fenotipler eritromisine yüksek veya düşük direnç, klindamisine ise duyarlılık veya direnç gösterilmesine neden olur. Fenotipler ve onların genotipleri arasındaki korelasyon hala anlaşılammıştır. β -hemolitik streptokok, ağız streptokokları, *S. pnömonia* ve enterekoklarından oluşan çeşitli streptokok türlerinde indüklenebilir *erm*(B) gen ekspresyonu mevcuttur. Klindamisin ve 16 halkalı makrolidler dahil MLS_B grup üyelerinin bir çoğunda, ErmB metilaz üretiminin çeşitli derecelerde indükleyicileri vardır (Horinouchi vd., 1983). Haberci genlerdeki füzyonun azalmasını içeren indüksiyon çalışmalarında, MLS_B fenotipleri makrolidlere ve linkozamidlere karşı yüksek düzeyli çapraz dirençle karakterizedir. Bunlar daha çok pnömokoklarda belirlenmiştir ve sık sık indüklenebildikleri gösterilmiştir (Rosato vd., 1998; Rosato vd., 1999; Zhong vd., 1998). Yapısal fenotip vakalarında benzer şekilde makrolid ve linkozamid kullanılmamaktadır. *erm*(B) içeren *S. pnömonia*'nın diğer suşları klindamisine duyarlı iken 14-15 ve 16 halkalı makrolidlere dirençli görülmektedir. Eritromisin ve klindamisin arasında bir antagonizma olması, açık çift disk difüzyon testinde yapıldığı gibi, indüklenebilir metilaz üretimini göstermektedir.

β -hemolitik streptokoklarda *erm*(TR) geni yaygındır fakat *S. pnömoni* suşlarında nadirdir (Kataja vd., 1999; Syrogiannopoulos vd., 2001). Genin mevcut olmasıyla indüklenebilir eritromisin direnci düşük MIC (Minimal Inhibitory Concentration)=1-8 mg/l ve yüksek MIC=11-28 mg/l düzeylerde ekspresyonu yapılmaktadır, oysa 16 halkalı makrolid ve klindamisin aktif kalmaktadır. Ayrıca eritromisin ve klindamisin arasında antagonizma olduğu gösterilmiştir. Yine, yapısal MLS_B direnci, *erm* gen sınıfına bakmaksızın, makrolid ve linkozamidlere çapraz direnç gelişimine neden olmaktadır.

Hedef mutasyonu

23S rRNA: *În vitro* *E. coli* mutant seleksiyonunda eritromisine yüksek oranda direnç olması, bu antibiyotiğin ribozoma bağlanma yerinin belirlenmesi için önemli olmaktadır. Türlerle bağlı olarak, bakteriler 23S rRNA kodlayan bir ile birkaç *rrn*' (rRNA operon)'ye sahiptir. Genel olarak, patojenlerde 1 veya 2 *rrn* kopya mutasyon gözlemlenmiştir ve her kopya mutasyon taşımaktadır. *Mycobacterium avium* ve *Helicobacter pylori* suşlarında klaritromisin direncinin büyük çoğunluğundan bu mekanizma sorumludur (Vester ve Douthwaite, 2001). Benzer mutasyonlar *Treponema pallidum* ve *Propionibacterium* türlerinde de

gösterilmiştir. Son zamanlarda klinik suşlar ve laboratuvar mutasyonları *S. pnömonia*'da tanımlanmıştır (Tait-Kamradt, 2000).

Aktif effluks: Gram negatif bakterilerde, makrolidler gibi, kromozomlarla kodlanan pompalar hidrofobik bileşiklere karşı intirinsik dirence katkıda bulunmaktadır. Gram pozitif organizmalarda, makrolid direnci iki sınıf pompanın aktif effluks yapmasıyla kazanılmaktadır, bu pompalar ATP-bağlayan süper ailesinin (ABC = ATP-Binding-Cassette) ve major kolaylaştırıcı süper ailesinin (MFS= Major Facilitator Super Family) üyeleridir.

Bugüne kadar stafilokoklarda makrolid direncini sağlayan effluks proteinleri, plazmidlerle taşınan *msr(A)* genleriyle kodlanmış ABC taşıyıcılarıdır. *msr(A)* direnci orjinal olarak stafilokok epidermidisde belirlenmiştir ve daha sonra *S. aureus*'u da içeren birçok stafilokok türlerinde de bulunmuştur. ABC taşıyıcılarının fonksiyonu için ATP gerekmektedir ve membranın sitozolik yüzeyinde kanal oluşumu için iki membran bölgesi ve iki ATP bağlanma bölgesi şekillenmiştir. *msr(A)* geni ABC taşıyıcısının iki ATP bağlanma bölgesini oluşturan proteini kodlamaktadır. MsrA pompasının transmembran bileşeninin yapısı bilinmemektedir (Ross vd., 1990).

Effluks sisteminin multikomponent yapıda olduğu görülmektedir, 14-15 halkalı makrolidlere ve tip B streptograminlere spesifik effluks pompalarının oluşumu *msr(A)* ve kromozomal genlerle olmaktadır (Ross, 1990). İndüklenebilir ekspresyonla direnç gerçekleşmektedir. Eritromisin ve diğer 14- 15 halkalı makrolidler indükleyicidir, fakat streptogramin B indükleyici değildir. Bu nedenle, eritromisinle indüksiyonundan sonra suşlar sadece streptogrmin B'ye dirençlidir. Klindamisin ne indükleyicidir ne de pompa için substrattır ve böylece suşlar bu antimikrobiyallere tamamen duyarlıdır. Beklendiği gibi, yapısal mutasyonlar hem eritromisine hem de streptogramin B'ye dirençlidir fakat klindamisine tamamen duyarlı kalmaktadır. Bu fenotip MLS_B indüklenebilir fenotiplerden çift-disk difüzyon testi kullanılarak kolayca ayırtedilebilir, bu eritromisin ve klindamisin arasında etkileşimin az olduğunu göstermektedir. Bu belirleyici koagulaz negatif stafilokoklarda yaygındır ve *S. aureus*'un metisiline duyarlı suşlarında artmış olduğu bulunmuştur. Avrupa'da yapılan son çalışmalarda insidansı % 13 olarak bildirilmiştir (Schmitz vd., 2000).

msr(A) geni streptokoklarda bulunamamıştır. Streptokok cinsinde, effluks pompasını *mef(A)* geni kodlamaktadır ve bu *S. pneumoniae* ve *S. pyogenes*, diğer streptokok türleri (ağız streptokokları, grup C ve G streptokoklar ve *Streptococcus agalactiae*), ve enterokokların klinik izolatlarında bulunmuştur. Orjinal *mef(A)* geni *S. pyogenes*'de bildirilmiştir (Tait-Kamradt vd., 1997).

Mef(A) proteini MFS ailesine aittir ve membranı 12 kez geçmektedir. Effluks, proton hareket gücüyle yapılmaktadır ve sadece 14 ve 15 halkalı makrolidleri etkilemektedir. Eritromisin indüksiyonundan sonra bile, 16 halkalı makrolidlere veya streptograminlere direnç yoktur. Direnç 14 ve 15 halkalı makrolidlerle indüklenmektedir fakat diğer makrolidler ve klindamisinle indüklenmemektedir. *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* veya *S. agalactiae* suşları *mef(A)* bulundurmaktadır. Bunlar düşük ve orta düzeyde makrolidlere karşı, MIC ile klaritromisine, azitromisine ve eritromisine direnç sağlamaktadır. *mef(A)* genleri konjugasyonla *S. pyogenes* ve *S. pneumoniae* arasında transfer edilmektedir ve *S. pneumoniae*'de transpozonlarla taşınmaktadır (Santagatii 2000). *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* veya *S. agalactiae* suşlarında *erm(B)* ve *mef(A)* gen kombinasyonları bulunmuştur. Bu suşlar MLS_B fenotipe sahiptir (McGee, 2001). Çizelge 1.6.'da effluks ve inaktivasyon genleri görülmektedir.

Çizelge 1.7. Effluks ve inaktivasyon genleri
(<http://faculty.washington.edu/marilynr/>)

Direnç Profili	Protein adı	Gen adı	Gen İçeriği % DNA Homolojisi	Plazmid/transpozon	Gen Bankası
ATP Bağlayıcılar					
Linkomisin	Car(A)	<i>car(A)</i>	<i>car(A)</i>	pOJ158	M80346
Eritromisin	Msr(A)	<i>msr(A)</i>	<i>msr(A)</i> 98%-100%	pUL5054	X52085
Streptogramin B			<i>msr(SA)</i>	pEP2104	
			<i>msr(SA')</i>	pMS97	AB013298
			<i>msr(B)</i>		M81802
	Msr(C)	<i>msr(C)</i>	<i>msr(C)</i> 96%	Kromozomal	AY004350
					AF313494
					AJ243209
	Msr(D)a	<i>msr(D)</i>	<i>Mel</i> 98%-100%	Tn1207.2	AF227521
					SA318993,
					AF274302
			<i>orf5</i>	Tn1207.1	AF227520
Linkomisin	Lsa(A)	<i>lsa</i>	<i>lsa(A)</i> <i>abc-23</i>	Kromozomal	AY4225127
	Lsa(B)	<i>orf3</i>	<i>lsa(B)</i>	pSCFS1	AJ579365
Oleandomycin	Ole(B)	<i>ole(B)</i>	<i>ole(B)</i>	pALOR26E	L36601
Oleandomycin	Ole(C)	<i>ole(C)</i>	<i>ole(C)</i>		L06249
Spiramycin	Srm(B)	<i>srm(B)</i>	<i>srm(B)</i>	pKC514	X63451
Tylosin	Tlr(C)	<i>tlc(C)</i>	<i>tlc(C)</i>		M57437
Streptogramin A	Vga(A)	<i>vga(A)</i>	<i>vga</i>	pIP524	M90056
Streptogramin A	Vga(A)LC	<i>vga(A)LC</i>	<i>vga</i>		DQ823382
Linkomisin					
Streptogramin A	Vga(B)	<i>vga(B)</i>	<i>vga(B)</i>	pIP1633	U82085
Streptogramin A	Vga(C)	<i>vga(C)</i>	<i>vga(C)</i>	pKKS825	FN377602
Major Kolaylaştırıcılar					
Linkomisin	Lmr(A)	<i>lmr(A)</i>	<i>lmr(A)</i>	pLST21	X59926
Eritromisin	Mef(A)	<i>mef(A)</i>	<i>mef(A)</i> 90%-100%	p53-6	U70055
			<i>mef(A)</i>	Tn1207.1	AF227520
			<i>mef(A)</i>	Tn1207.2	AF227521
			<i>mef(A)</i>		AY064721, AY064722
					AY071835, AY071836
			<i>mef(E)</i>	pAT15-5	U83667
			<i>mef(E)</i>	Kromozomal	AF274302, AF376746
Eritromisin			<i>mef(B)</i>	pP286	FJ196385

Çizelge 1.7. Effluks ve inaktivasyon genleri (Devam)

Direnç Profili	Protein adı	Gen adı	Gen İçeriği % DNA Homolojisi	Plazmid/transpozon	Gen Bankası
Esterazlar					
Eritromisin	Ere(A)	<i>ere(A)</i>	<i>ere(A)</i> 92%-100%	pI1100, pAT63	M11277
				pLQ1723	AF099140
					AF326209
					AF512546_2
Eritromisin	Ere(B)	<i>ere(B)</i>	<i>ere(B)</i> 99%	pIP1527	A15097
			<i>ere(B)</i>	pAT72	X03988
Liyazlar					
Streptogramin B	Vgb(A)	<i>vgb(A)</i>	<i>vgb</i>	pIP524	M20129
Streptogramin B	Vgb(B)	<i>vgb(B)</i>	<i>vgb(B)</i>	pIP1714	AF015628
Linkomisin	Lnu(A)	<i>lnu(A)</i>	<i>lin(A)</i>	pIP856	
			<i>lin(A)</i>	pIP855	M14039
Linkomisin	Lnu(B)	<i>lnu(B)</i>	<i>lin(B)</i>	pVMM25	AJ238249
Linkomisin	Lnu(C)	<i>lnu(C)</i>		MtnLNU	AY928180
Linkomisin	Lnu(D)	<i>lnu(D)</i>			EF452177
Linkomisin		<i>lnu(F)</i>	<i>lnu(F)</i>		AJ561197, EU118119
			<i>lnu(G)</i>		DQ836009
Streptogramin A	Vat(A)	<i>vat(A)</i>	<i>vat</i>	pIP680	L07778
Streptogramin A	Vat(B)	<i>vat(B)</i>	<i>vat(B)</i>	pIP52	U19459
Streptogramin A	Vat(C)	<i>vat(C)</i>	<i>vat(C)</i>	pIP1714	AF015628
Streptogramin A	Vat(D)	<i>vat(D)</i>	<i>sat(A)</i>	pAT15, pAT421	L12033, AF368302
Streptogramin A	Vat(E)	<i>vat(E)</i>	<i>sat(G)</i> 99%		AF139725, AF229200
			<i>sat(G)</i>		AF153312
		<i>vat(E)</i>			NC_004566
		<i>vat(E-3)</i>			AF242872
		<i>vat(E-4)</i>			AY043211
		<i>vat(E-5)</i>			AY043209
		<i>vat(E-6)</i>			AY043210
		<i>vat(E-7)</i>			AY043212
		<i>vat(E-8)</i>			AY043213
Streptogramin A	Vat(F)	<i>vat(F)</i>			AF170730
Fosforilazlar					
Makrolidler	Mph(A)	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i> 99%	pTZ3519	D16251
			<i>mph(K)</i>	pGE64	U36578
Makrolidler	Mph(B)	<i>mph(B)</i>	<i>mph(B)</i>	pTZ3714, pTZ3723	D85892
Makrolidler	Mph(C)	<i>mph(C)</i>	<i>mph(BM)</i> 100%	pMS97	AB013298
			<i>mph(C)</i>	pSR1	AF167161
Makrolidler	Mph(D)	<i>mph(D)</i>	<i>mph(D)</i>		AB048591

2. KAYNAK ÖZETLERİ / KURAMSAL TEMELLER

Linkozamidler, makrolidler ve streptograminlerle birlikte aynı antibiyotik grubunda anılırlar. Kimyasal yapıları farklı olan bu antibiyotiklerin bir arada gruplanmasında etki mekanizmalarının benzerliği yanında direnç mekanizmalarının çapraz olarak bu üç grup antibiyotiği de etkilemesi sayılabilir.

Her ne kadar metilaza bağlı çapraz direnç yaygınsa da bu ilaç gruplarına özgü direnç mekanizmaları da mevcuttur. Linkozamidlere izole direnç sağlayan mekanizmalardan en önemlisi bu antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonudur. Bugüne dek tanımlanan enzimlerin hepsi linkozamidlere nükleotidil grubu aktaran nükleotidil transferaz enzimleridir. İlk tanımlanan enzimler *Staphylococcus haemolyticus* BM4610 ve *Staphylococcus aureus* BM4611 suşlarında bulunmuş ve 14 aminoasit farklılığı gösteren bu enzimlerin sırasıyla *linA* ve *linA'* adı verilen genler tarafından kodlandığı gösterilmiştir (Brisson-Noel 1986). Daha sonra ise *E. faecium* HM1025, *S. agalactiae* UCN36 ve *S. uberis* suşlarında sırasıyla *linB*, *lnu(C)* ve *lnu(D)* genleri bulunmuştur (Bozdoğan 1999, Achard 2005, Petinaki 2008). Linkozamidlere doğal dirençli olan *E. coli* X1D61 suşundan ise *linF* geni karakterize edilmiştir (Heir vd.,2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1. MHA (Mueller-Hinton agar) (Oxoid)

Kurutulmuş Sığır Ekstraktı	300g
Kazein Hidrolizat	17,5g
Nişasta	1,5g
Agar	17g

38 g besiyeri 1000 ml distile suya ilave edilip eritilmiş, pH değeri $7,3\pm 0,1$ 'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edilmiş, otoklav sonrası $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulup steril petri kutularına dökülmüştür.

3.1.1.2. BHIA (Brain heart infusion agar) (Oxoid)

Beyin Ekstraktı	12.5 g
Kalp Ekstraktı	5.0 g
Pepton	10.0 g
D (+) glikoz	2.0 g
Sodyum Klorür	5.0 g
Di Sodyum Fosfat	2.5 g
Agar	10.0 g

47 g besiyeri 1000 ml distile suya ilave edilip eritilmiş, pH değeri $7,4\pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edilmiş, otoklav sonrası $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulup steril petri kutularına dökülmüştür.

3.1.1.3. BHIB (Brain heart infusion broth) (Oxoid)

Beyin Ekstraktı	12.5 g
Kalp Ekstraktı	5.0 g
Pepton	10.0 g
D (+) glikoz	2.0 g
Sodyum Klorür	5.0 g
Di Sodyum Fosfat	2.5 g

37 g besiyeri 1000 ml distile suya ilave edilip eritilmiş, pH değeri $7,4\pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edilmiş, otoklav sonrası $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulup steril petri kutularına dökülmüştür.

3.1.2. Kullanılan Ayıraçlar, Solusyonlar, Kitler, Testler

3.1.2.1. DNA ekstraksiyonu için hazırlanan solüsyonlar, kitler

EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) (0,25 M)

Disodium EDTA- $2\text{H}_2\text{O}$ 93,05g

EDTA 800 ml distile suya ilave edilip eritilmiş, NaOH ile pH'ı 8,0'e ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edilmiştir.

Tris (1 M)

Tris Base 121g

Tris base 800 ml distile suda eritilmiş ve yaklaşık olarak 60 ml HCl ilave edilerek pH'ı 7,6'ya ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edilmiştir.

TES

50 μl 1 M Tris pH 8,0; 25 μl 0.25 M EDTA pH 8,0; 700 μl % 50'lik sükröz, 5 ml'ye tamamlayacak kadar su eklenerek karıştırılmıştır.

% 10'luk SDS (sodium dodecyl sulphate) solüsyonu

10 g SDS tartılmış, 100 ml distile su ile eriyene kadar karıştırılmıştır.

Lizozim Stok Solüsyonu (100mg/ml)

100 mg lizozim tartılmış ve 1ml distile su ile pipetleme yoluyla eriyene dek karıştırılmıştır.

Proteinaz K (10mg/ml)

10 mg proteinaz K tartılmış ve 1 ml distile suda eritilmiştir.

Na-Asetat (3M)

40,83 g Na Asetat tartılmış 50 ml distile su ile karıştırılmış, glasiyel asetik asitle pH'ı 5,2'ye ayarlanıp distile su ile 100ml'ye tamamlanmıştır.

InstaGene Matrix

Bio-Rad firmasından DNA ekstraksiyonu için hazır kit temin edilmiştir

3.1.2.2. PFGE (Pulsed Field Jel Elektroforezi) için hazırlanan solüsyonlar**PIV solüsyonu**

1 M NaCl ve 10 mM Tris hidroklorid karıştırılmış ve pH 7,6 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Low melting agar

200 µg agar tartılmış distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak, düşük ısıda eritilmiştir.

Lizis solüsyonu

6 mM Tris hidroklorid (pH 7,6), 1 M NaCl, 100 mM EDTA (pH 7,5), 0,5% Brij 58, 0,2% deoxycholate, 0,5% sodium lauroyl sarcosine, 20 mg/l RNase (DNase free), 3mg/ml lizozim karıştırılarak hazırlanmıştır.

ESP (EDTA, Sodium lauroyl sarcosine, Proteinaz K) solüsyonu

0,5 M EDTA (pH 9 – 9,5), 1% sodium lauroyl sarcosine ve 50 mg/l proteinaz K karıştırılarak hazırlanmıştır.

TE (Tris, EDTA) solüsyonu

10 mM Tris hidroklorid (pH 7,5) ve 0,1 mM EDTA karıştırılarak hazırlanmıştır.

TBE (Tris, Borik Asit, EDTA) solüsyonu

10x TBE (Stok Solusyon): 121, 10 g Tris Base, 61,83g borik asit ve 5,84g EDTA karıştırılarak distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. pH 8,0'e ayarlanarak buzdolabında saklanmıştır.

0,5x TBE (Kullanma Solusyonu): 50 ml 10x TBE ve 950 ml distile su karıştırılıp kullanma solusyonu hazırlanmıştır.

3.1.2.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu için Eppendorf MasterCycler gradient ve TECHNE TC-312 markalı cihazlar kullanılmıştır.

Reaksiyonun gerçekleşmesi için Taq DNA polimeraz (5U), 25 mM MgCl₂, 10X Taq Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 100 mM deoksिनükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) kullanılmıştır.

3.1.2.4. Elektroforez

Elektroforez işlemi Thermo marka elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez jelinin hazırlanması: assas terazide 2 gr. agaroz tartılıp, 500 ml'lik bir şişe içerisine konulmuştur. Ardından 100 ml ölçülen TBE solüsyonu, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilerek, karıştırılmış ve sonra mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk. kaynatılan karışım, çeşme suyu altında 40-50°C'ye kadar soğutulmuştur. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde dökülmüş ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15–20 dk. oda ısısında soğumaya

bırakılmıştır. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirilmiştir.

3.1.2.5. API 20 strep galeri kiti

Mikrobiyolojik olarak *E. faecium* ADU1 suşunun karakterizasyonu ve tanımlanması için biyokimyasal özellikleriyle suşları tanımlayan bir sistem olan bioMérieux firmasından temin edilen API 20 Strep galeri kiti kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Suşlar

Enterococcus faecium ADU1 suşu Büyük Menderes Nehri sulama kanallarından alınan örnekten izole edilmiştir. *Enterococcus. faecalis* JH2-2 ve *Micrococcus luteus* 9341 suşları ise ADÜ BİLTEM koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Primerler

Çizelge 3.1. Kullanılan primerler ve dizilimleri

Primerler	Primer Sekansları 5' → 3'	Referans
pEF418 R pEF418 F	ACA CCA GTC GAA ATG AAT TT AGG AAT ATC AAG TAA TTC ATG AAA GT	(Lourdes vd., 2007)
linA R linA F	GAG CTT CTT TTG AAA TAC ATG G GTA TTA ACT GGA AAA CAG CAA AG	(Petinaki vd., 2008)
linB R linB F	AAG GCT AAT TTC TTT TTC AAG TAC AGC TTG TAT GAT GTA ATG G	(Petinaki vd., 2008)
lnuC R lnuC F	TTC ATC AAA CTC GTA TCC CAG AAC CAG ATT TTC CAA TTT GC	(Petinaki vd., 2008)
lnuD R lnuD F	GCA TAA TAA CCT TAC GTC ATG GAA AAT GAG ATT GAC ATT TGG	(Petinaki vd., 2008)
Ori-pEF481 R Ori-pEF481 F	GCT ACA ATA ATC ACA TCC TG ATC GAC GAT GTT AAT ATA AG	(Petinaki vd., 2008)
INVLINB1 INVLINB2	GTT CCA CAA ACA ATA GGT AG TAG TGA ATA GGA GAG TAA CG	Bu çalışma
AadE R AadE F	GTA GAA TCT GGT TCA GAT G GAT TTA GTA CTT TCT TTA GC	Bu çalışma

3.2. Yöntem

3.2.1. *E. faecium* ADU1 Suşunun Mikrobiyolojik Karakterizasyonu

3.2.1.1. *E. faecium* ADU1 suşunun biyokimyasal özellikleriyle tanımlanması

Mikrobiyolojik olarak suşun karakterizasyonu ve tanımlanması için biyokimyasal özellikleriyle suşları tanımlayan bir sistem olan API 20 Strep galeri kiti kullanılmıştır. Testler sonucunda reaksiyonların pozitif veya negatif olmasına bağlı çıkan sonuçlar bilgisayar programındaki analiz kısmına yazılmıştır.

3.2.1.2. *E. faecium* ADU1 suşunun antibiyotik hassasiyet değerlerinin ölçülmesi

Disk difüzyon testi: *E. faecium* ADU1 suşunun çeşitli antibiyotiklere direnci disk difüzyon yöntemiyle incelenmiştir. 0,5 McFarland bakteri solusyonu hazırlanmış ve 4 mm yüksekliğinde dökülen Müeller Hinton besiyerine swab yardımıyla yayılmış, etüvde 5 dakika kurutulduktan sonra antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 16-18 saatlik inkubasyondan sonra inhibisyon zonları cetvel yardımıyla milimetre olarak ölçülmüştür. Eğer inhibisyon zonu yoksa değer disk çapı olan 6 mm olarak belirlenmiştir.

Agar dilüsyon yoluyla MİK değerlerinin tespiti: 128mg/l ile 0.03 mg/l değerleri arasındaki konsantrasyonlarda antibiyotik içeren Mueller Hinton besiyerleri hazırlanmış ve Steers' gereci ile bakteriden (Multipoint inoculator) 10^4 cfu/ml ekilmiş ve 16-18 saat sonra büyümeler değerlendirilmiştir. Bakterinin çoğalmadığı en küçük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir. *E. faecium* ADU1 suşunun 10 antibiyotik için MİK değerleri belirlenmiştir.

3.2.1.3. Linkozamid inaktivasyon testi

Gots' testi ile inaktivasyon varlığı test edilmiştir. İndikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* kullanılmıştır. BHI agar üzerine disk difüzyon testi yapar gibi 0,5 McFarland *M. luteus* inoküle edilmiştir. Etüvde 10-15 dakika kurutulduktan sonra 2 µg klindamisin içeren antibiyotik diski besiyerinin ortasına konmuştur. Daha sonra test edilmek istenen bakteriler çizgi halinde petri kenarından

antibiyotik diskine doğru çizgi şeklinde ekilmiştir. Antibiyotik etkisiyle oluşan inhibisyon zonunda, test edilen bakteriler eğer inaktive eden enzim sentezliyorlarsa bir küçülme sözkonusu olur. Çünkü inaktivasyon etkisiyle o bölgede antibiyotik kalmadığından *M. luteus* çoğalabilir.

3.2.2 *E. faecium* ADU1 Suşu İle Yapılan Moleküler Çalışmalar

3.2.2.1. Total DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır:

-1,5 ml'lik ependorf tüpüne alınan gecelik kültür 5 dk. 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

-Pellet 100 µl TES eklenip homojenize edilmiştir.

-10 µl lizozim eklenmiş ve 37 °C'de 1 saat bekletilmiştir.

-20 µl 0,25 M EDTA eklenip karıştırılarak üzerine tekrar 12 µl % 10'luk SDS eklenmiş ve karıştırılmıştır.

-1,5 µl Proteinaz K eklenip karıştırılmış ve 37 °C'de 30 dk. bekletilmiştir.

-15 µl Na-Asetat (3 M pH 5,0) eklenmiş ve 65°C'de 20 dk. bekletilmiştir.

-100 µl Fenol-Kloroform-İzoamilalkol eklenip 13.000 rpm'de 10 dk'da +4 °C'de santrifüj edilmiştir.

-Üst sıvı yeni bir ependorfa alınıp üzerine 100 µl izopropanol eklenmiştir.

-Bulut oluşuncaya dek vortekslenmiştir.

-13.000 rpm'de 30 dk. santrifüj edilmiştir.

-Üst sıvı atılıp kuruyuncaya kadar bekletilmiştir.

-Pellet kuruduktan sonra 50 µl TE eklenmiştir.

3.2.2.2. ADU1 suşunda linkozamid inaktivasyon genlerinin aranması

linA, *linB*, *lnuC*, *lnuD* için spesifik primerlerle PCR yapılmıştır.

Bir sonraki basamakta; soğutucuda muhafaza edilmiş ve parçalanmış olan bakteri hücreleri çıkartılıp, 12.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiş ve mixlerle birlikte çalışılacak olan steril kabine alınmıştır. Ardından 0,2 mL’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine hazırlanılan MasterMix’ten 28’er µl ilave edilmiştir. Daha sonra, santrifüj edilen örneklerin supernatant kısımlarından 2’şer µl alınıp, ilgili tüplere eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazına yüklenip, programlanmıştır. Program basamakları aşağıdaki tabloda gösterildiği gibidir:

Çizelge 3.2. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Bekletme	1	94°C	5 dk.
Denatürasyon	35	94°C	1 dk.
Bağlanma		50°C	1 dk.
Uzama		72°C	1 dk.
Bekletme	1	72°C	5 dk.
Bekletme	1	4°C	∞ dk.

Termal döngüleme cihazlarında PCR işlemleri tamamlanan örnekler; elektroforez (yürütme) için laboratuvarın diğer bir bölümüne alınmıştır.

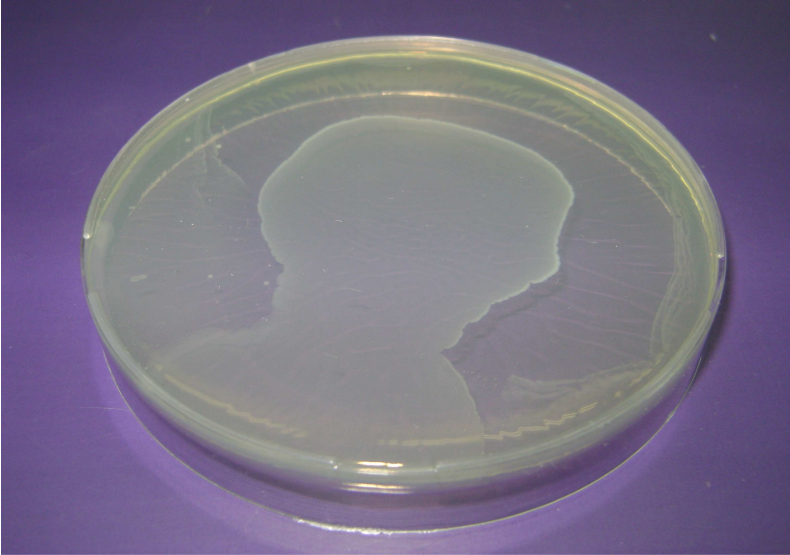
Elektroforez için örneklerin yüklenmesi: 1/6’lık elektroforez boyasından (loading dye) pipetin ucuna 4 µl alınıp, daha sonra elde edilen PCR ürünleriyle karıştırılmıştır. Oluşturulan karışımdan 10 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklenmiştir.

Elektroforez: Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 Volt (V)’luk akımda 30 dk. yürütülmüştür.

Görüntüleme: 30 dk.'lık elektroforez zamanının ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde etidyum bromürde 15 dk. boyamaya yatırılmıştır. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki uygun odacığa yerleştirilerek, ultraviyole ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirilmiştir.

3.2.2.3. *linB* geninin transfer edilebilirliği

linB geninin mobil bir genetik eleman üzerinde olup olmadığı konjugasyon yöntemiyle belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla *Enterococcus faecalis* JH2-2 alıcı suş olarak kullanılmış, *Enterococcus faecium* ADU1 izolatından linkozamid direnç karakterini alıp alamadığı konjugasyon yöntemiyle test edilmiştir. Her iki bakteri de BHI broth içerisine inoküle edilmiş ve bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Gecelik inkübasyonun ardından alıcı suştan 500 µl, verici suştan 500 µl alınarak steril eppendorf tüpü içine konmuş ve 5 dakika 10000 rpm hızda çevrilmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet 200 µl besi yerinde homojen hale getirilip BHI agar üzerine ekilmiştir 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda üreyen bakteri topluluğu üzerine bir miktar steril distile su konularak öze yardımcı karıştırılıp, pipet yardımıyla toplanarak transkonjugantların seçimi için antibiyotikli besiyerine yayılmak üzere alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *E. faecium* ADU1 verici suşu ile *E. faecalis* JH2-2 alıcı suşunun BHI agar üzerine inoküle edilmiş durumu

Enterococcus faecium ADU1 izolatının eritromisin direnci taşıdığı bilinmektedir. *E. faecalis*'e linkozamid direncinin geçişini göstermek, bu enterokok türü linkozamidlere doğal dirençli olduğu için zordur. *E. faecalis* linkozamidlere inaktivasyonla değil hücre içerisinde yeterince antibiyotik toplanmadığı için dirençlidir. Bu nedenle ADU1 suşunun eritromisine dirençli olması, JH2-2'nin ise hassas olmasından faydalanılmıştır. Eritromisin direncini almış JH2-2 suşlarında linkozamid inaktivasyonu aranarak geçişin olup olmadığı test edilmiştir.

Antibiyotikli seçici besiyerinde üreyen transkonjugant kolonileri isimlendirilerek tekrar aynı antibiyotikleri içeren besiyerinde saflaştırma için ekilmişlerdir. Bunun sonucunda toplam 10 adet transkonjugant kolonisi saflaştırılmıştır. Saf kolonileri elde edilmiş olan transkonjugantların linkozamid inaktivasyonlarındaki değişimi gözlemek amacıyla Gots' testi yapılmıştır. Bunun için indikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* 9341 kullanılmıştır. BHI agar üzerine disk difüzyon testi yapar gibi 0,5 McFarland *M. luteus* inoküle edilmiştir. Etüvde 10-15 dakika kurutulduktan sonra 2 µg klindamisin içeren antibiyotik diski besiyerinin ortasına konmuştur. Daha sonra test edilmek istenen transkonjugant bakteriler petri kenarından antibiyotik diskine doğru çizgi şeklinde ekilmiştir.

Antibiyotik etkisiyle oluşan inhibisyon zonunda, test edilen bakteriler eğer inaktive eden enzim sentezliyorlarsa bir küçülme sözkonusu olur. Çünkü inaktivasyon etkisiyle o bölgede antibiyotik kalmadığından *M. luteus* çoğalabilir.

3.2.2.4. Transkonjugantların analizi

Transkonjugantlarda *linB* geninin aktarımının doğrulanması

Elde edilen 10 adet transkonjugantta *linB* geni PCR yoluyla aranmıştır. Bunun için transkonjugantlardan InstaGene Matrix (Bio-Rad) ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. İşlem akışı Şekil 3.2.'deki gibi gerçekleşmiştir.

İzole edilen bakteri kolonisi 1ml steril distile su içerisinde süspanse edilmiştir,



12000 rpm'de 1 dk. santifürülenip süpernatant atılmıştır,



Pellet üzerine manyetik karıştırıcıda karıştırılan InstaGene Matrix kitinden 100 µl eklenmiştir,



56°C'de 20 dk. bekletilmiştir,



Süre sonunda süspansiyon yüksek hızda 10 sn. vortekslenmiştir,



Eppendorf 100 °C'de 8 dk. bekletilmiştir,



Daha sonra 10 sn. yüksek hızda vortekslenmiştir,



12000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiş,



PCR'da kullanıma hazır hale gelmiştir.

Şekil 3.2. InstaGene Matrix (Bio-Rad) ile DNA ekstraksiyonu aşamaları

Aktarılan mobil genetik elemanın Pulsed Field Jel Elektrofrezisi ile test edilmesi

E. faecalis JH2-2 dirençli hale geldiğinden geçen mobil elemanın plazmid veya transpozon olup olmadığı PFGE yapılarak test edilmiştir. *E. faecalis* JH2-2 ve dirençli hale gelmiş transkonjugantın agar içinde izole edilmiş DNA'sı *SfiI* ve *SmaI* enzimleri tarafından kesilerek PFGE cihazında yürütülmüştür.

Bunun için; Bir önceki gün 5ml BHI broth besi yerine ekilmiş ve 37°C'de inkübe edilmiş enterokoklar santrifüj edilip aynı miktarda PIV solüsyonunda homojenize edilmiştir. PIV içindeki bakteri solüsyonundan 100 µl alınıp, 100 µl %2 lik agarla karıştırılmış (low melting agar) ve kalıp içine konup katılaşması beklenmiştir. Katılaştıran plug eppendorf tüpü içerisine konmuş ve 1 ml lizis solüsyonu eklenmiştir. Bir gece (8–16 saat) 37°C'de inkübe edildikten sonra solüsyon

alınmış yerine 1 ml ESP solüsyonu ilave edilmiş ve bir gece 50°C’de inkube edilmiştir. Ertesi gün pluglar her seferinde 30’ar dakika olmak üzere en az üç kez TE solüsyonuyla yıkanmış ve 4°C’de depo edilmiştir. *SmaI* enzimi ile kesilmek üzere yeni bir eppendorf tüpü içerisine konmuş, *SmaI* buffer ile yıkanmış, 200 µl distile su, 25 µl buffer ve 2 µl enzim ilave edilip 6 saat 30°C’de inkube edilmiştir.

Enzimle kesilmiş pluglar %1’lik agaroz jeli içerisine konmuş ve % 0,5’lik TBE solüsyonu içerisinde CHEF DR III cihazında elektroforezi yapılmıştır. 22 saatlik elektroforez için initial time 5 final time 20 programı kullanılmıştır.

Invers PCR yöntemi ile *linB* geninin üzerinde bulunduğu genetik elemanın tespiti

linB genini içerdiği bilinen *Enterococcus faecium* ADU1 izolatı için Nucleotide Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ile *linB* dizisi sorgulanmıştır (Şekil 3.3.). Buna göre Bozdoğan ve arkadaşlarının 1999 yılında yayınladıkları *linB* gen dizisi alınarak invers PCR için uygun primer dizayn edilmiştir (Bozdoğan vd., 1999).

Şekil 3.3.’de sarı renkle belirtilen bölge *linB* gen dizisini göstermektedir. Bu bölge referans alınarak, *Enterococcus faecium* ADU1 izolatının üzerinde bulunduğu bölgenin tespiti için invers PCR primeri dizayn edilmiştir. Bu primerler kırmızı bold karakterle belirtilen dizilerden seçilmiştir. Bu primerler INVLINB1 ve INVLINB2 olarak isimlendirilmiştir. INVLINB1 primerinin reverse komplementi alınmıştır. Oluşturulan primerler aşağıda belirtildiği gibidir.

INVLINB1 : 5’ – GTT CCA CAA ACA ATA GGT AG – 3’

INVLINB2 : 5’ – TAG TGA ATA GGA GAG TAA CG - 3’

LOCUS AJ238249 944 bp DNA linear BCT 24-APR-1999
 DEFINITION *Enterococcus faecium* *linB* gene for nucleotidyltransferase.
 ACCESSION AJ238249
 VERSION AJ238249.1 GI:4688827
 KEYWORDS *linB* gene; nucleotidyltransferase.
 SOURCE *Enterococcus faecium*
 ORGANISM *Enterococcus faecium*
 Bacteria;Firmicutes;Lactobacillales;Enterococcaceae;Enterococcus
 REFERENCE 1
 AUTHORS **Bozdogan, B.**, Berrezouga, L., Kuo, M.S., Yurek, D.A., Farley, K.A.,
 Stockman, B.J. and Leclercq, R.
 TITLE A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to
 lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025
 JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 43 (4), 925-929 (1999)
 PUBMED 10103201
 REFERENCE 2 (bases 1 to 944)
 AUTHORS Leclercq, R.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-APR-1999) Leclercq R., Microbiology, CHU Cote de
 Nacre, Av Cote de Nacre, Caen, 14000, FRANCE

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..944
 /organism="Enterococcus faecium"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="HM1025"
 /db_xref="taxon:1352"
 gene 127..930
 /gene="linB"
 CDS 127..930
 /gene="linB"
 /function="nucleotidylation of lincosamide antibiotics"
 /experiment="experimental evidence, no additional detail
 recorded"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="lincosamide nucleotidyltransferase"
 /protein_id="CAB41414.1"
 /db_xref="GI:4688828"
 /db_xref="GOA:Q9WVY4"
 /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q9WVY4"

ORIGIN
 1 **CTACCTATTG TTTGTGGAAC** ATGATGATGC GGGGCATAAC ATCTGTACGA AAAATATTAA
 61 TTTAGGTTTG TAGAGATTTT GAGTTGCCAC AATAACTAAA AGATATTTAC ATGAAAGGGT
 121 GAAGAAATGT TAAAACAAAA AGAATTAATT GCAAACGTTA AGAATCTTAC TGAGTCAGAT
 181 GAACGAATTA CAGCTTGTAT GATGTATGGA TCGTTTACCA AAGGAGAAGT TGACCAATAC
 241 TCTGATATAG AGTTCTATAT ATTTTGTAAA CATAGTATAA CCTCGAAGTT TGATTCATCC
 301 AACTGGTTGT TTGACGTAGC TCCGTACTTG ATGCTTTATA AAAATGAGTA CGGAACAGAG
 361 GTAGTTATTT TTGATAATCT TATACGTGGG GAATTTTCATT TCCTTTCTGA AAAAGATATG
 421 AACATAATCC CCTCGTTTAA AGATTCAGGT TATATTCCCTG ATACGAAGGC TATGCTTATT
 481 TACGATGAAA CAGGGCAATT AGAAAATTAT TTATCAGAGA TAAGTGGTGC AAGACCAAAT
 541 AGACTTACTG AAGAAAATGC TAATTTTTTG TTGTGTAATT TCTCTAATCT ATGGTTGATG
 601 GGAATCAACG TTCTAAAAAG AGGAGAATAT GCTCGTTCAT TAGAACTCTT ATCACAACCT
 661 CAAAAAATA CACTACAAC TATACGTATG GCAGAAAAAA ATGCTGATAA TTGGCTAAAC
 721 ATGAGTAAAA ACCTTGAAAA AGAAATTAGC CTTGAAAAAT ATAAAAAATT TGCAAAGACC
 781 ACTGCTCGAT TAGATAAGGT AGAATTATTT GAAGCCTATA AAAATTCCTT GCTATTAGTT
 841 ATGGATTTGC AAAGTCACCT TATTGAACAA TACAACCTAA AAGTTACACA TGACATTTTA
 901 GAAAGATTGT TGAATTACAT **TAGTGAATAG GAGAGTAACG** TTAT

Şekil 3.3. Nucleotide Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ile *linB* dizisi sorgulama sonucu

Daha sonra *linB* geni içerisinde kesmeyen restriksiyon enzimleri belirlenmiş ve *Enterococcus faecium* ADU1 izolatının total DNA'sı bu enzimlerle restriksiyona bırakılmıştır. Bu amaçla *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri kullanılmıştır.

Restriksiyon işlem basamakları sırasıyla şu şekilde gerçekleşmiştir; 10 µl total DNA, 7 µl steril distile su, 1 µl enzim ve 2 µl enzim buffer ependorf içerisine alınıp 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Restriksiyonun ardından bu 20 µl'lik karışımın 5 µl'si ile elektroforez yapılmıştır. Kesim işlemi doğruladıktan sonra geriye kalan 15 µl'lik restriksiyon karışımına 85 µl steril distile su eklenmiş ve etanol presipitasyonu yapılmıştır. Bu amaçla volume/volume olacak şekilde 100 µl fenol-kloroform-izoamil alkol eklenerek +4°C'de 13000 rpm'de 5 dk. santrifuj yapılmıştır. Santrifuj sonrasında üst kısım yeni ependorf tüplerine alınıp üzerine eşit hacimde 100 µl isopropanol ve hacmin 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (pH:5,2) eklenerek -20°C'de yarım saat bekletildikten sonra +4°C'de 20 dk. 13000 rpm'de santrifuj edilmiştir. Sonra üst faz atılarak üzerine 200 µl %70'lik etanol eklenmiş ve +4°C'de 13000 rpm'de 5 dk. santrifuj yapılmış, üst faz atılıp alkolü uzaklaştırılıp kurutulan pellet üzerine 17 µl steril distile su eklenerek ligasyon işlemine başlanmıştır.

Ligasyon işleminde, 17 µl restriksiyonu yapılmış DNA örneği, 1 µl T4 DNA ligaz enzimi ve 2 µl ligaz buffer ependorf içerisine alınıp yaklaşık 16°C'de 3 saatlik inkübasyonun ardından tekrar presipitasyon adımı gerçekleştirilmiştir.

Presipitasyonun ardından Invers PCR için halkasal ve hazır hale gelen örneklerin INVLINB1 ve INVLINB2 primerleri kullanılarak amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu PCR için reaksiyon koşulları olarak 35 siklus 94°C'de 30 sn, 50°C'de 30 sn ve 72 °C'de 1 dk olarak kullanılmıştır.

Invers PCR ile elde edilen ampikon *linB* geninin üzerinde bulunduğu genetik elemanın tespiti için çift yönlü DNA dizi analizi yapılmak üzere Macrogen (Korea) firmasına gönderilmiştir.

Sekans analizi sonuçları GenBankası (BLAST) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

linB geninin pEF418 plazmidi üzerinde yer alıp almadığını tespit etmek amacıyla pEF418 plazmidine ait replikasyon orjini çoğaltabilecek primerler temin edilmiştir. Bu primerler;

Ori-pEF481-F: ATC GAC GAT GTT AAT ATA AG 103

Ori-pEF481-R: GCT ACA ATA ATC ACA TCC TG 844

Ayrıca buna ek olarak pEF418 plazmidinde bulunan *aadE* geni tarafından kodlanan aminoglikozid direnç geni varlığının araştırılması için de bu bölgeyi çoğaltacak primerler temin edilmiştir. Bu primerler;

aadE-F: GAT TTA GTA CTT TCT TTA GC

aadE-R: GTA GAA TCT GGT TCA GAT G

Elde edilen bulgular sonucu taranılan makalelerden Lourdes Garcia-Migura ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yayınlanmış çalışmada transfer edilebilir plazmidler kısmında yer alan pEF418 plazmidi için verilen primer sekansı da referans olarak alınıp temin edilmiştir. Bu primerler;

pEF418-F: AGG AAT ATC AAG TAA TTC ATG AAA GT 694

pEF418-R: ACA CCA GTC GAA ATG AAT TT 258

İnvers PCR ile elde edilen ampikon ile *linB* geninin üzerinde bulunduğu genetik elemanın tespiti için çift yönlü DNA dizi analizi sonrası, daha önce *Enterococcus faecalis*' de tanımlanmış olan pEF418 plazmidi ile sekans homolojisi gösterdiğinden temin edilen primerlerle PCR'ları yapılmıştır. Bu amaçla Gen Bankasından pEF418 plazmid sekansı üzerinden fragment büyüklükleri ve dizayn edilen primerlerin doğrulukları konfirme edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *E. faecium* ADU1 suşunun biyokimyasal özellikleriyle tanımlanması

Mikrobiyolojik olarak suşun karakterizasyonu ve tanımlanması için biyokimyasal özellikleriyle suşları tanımlayan bir sistem olan API 20 Strep galeri kiti kullanılmıştır ve ADU1 suşu *E. faecium* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.1. ADU1 suşunun biyokimyasal özellikleri ve identifikasyon için kullanılan kit API 20 Strep (bioMérieux) sonuçları

İzolat Adı	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARB	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
ADU1	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-

4.2. *E. faecium* ADU1 Suşunun Antibiyotik Hassasiyet Değerlerinin Ölçülmesi

4.2.1. Disk Difüzyon Testi

E. faecium ADU1 suşunun Mueller-Hinton agar üzerinde yapılan disk difüzyon testi sonucunda eritromisine, klindamisine, pirlimisine, ampisiline, penisiline, doksisiklin ve tetrasikline ve norfloksasine dirençli, vankomisin, teikoplanin, gentamisin, rifampisin ve kloramfenikole hassas olduğu bulunmuştur. Sınır değer olarak CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) değerleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. ADU1 suşunun disk difüzyon testi ile antibakteriyellere duyarlılıkları

İzolot Adı	ADU 1
Eritromisin	6 mm
Klindamisin	6 mm
Pirlimisin	6 mm
Ampisilin	8 mm
Penisilin	6 mm
Teikoplanin	15 mm
Doksisiklin	12 mm
Vankomisin	18 mm
Gentamisin	20 mm
Tetrasiklin	8 mm
Rifampisin	20 mm
Kloramfenikol	19 mm
Norfloksasin	12 mm

mm



Dirençli




Hassas


4.2.2. Agar Dilüsyon Yoluyla MIC Değerlerinin Tespiti

E. faecium ADU1 suşunun Mueller-Hinton agar ile 10 antibiyotik için MIC değerleri belirlenmiştir. Suş eritromisin, klindamisin, siprofloksasin, tetrasiklin ve ampisiline dirençli bulunurken rifampisin, vankomisin, teikoplanin, kloramfenikol, ve gentamisine hassas bulunmuştur (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. ADU1 suşunun agar dilüsyon yoluyla antibakteriyellere duyarlılıkları

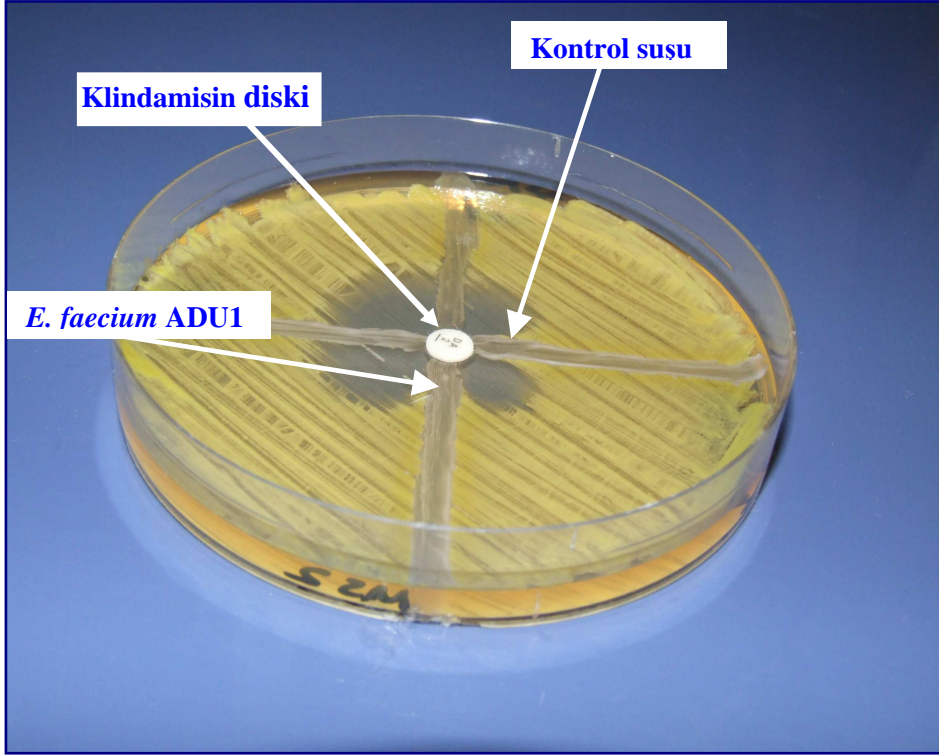
MIK mg/l	Eritromisin	Klindamisin	Ampisilin	Teikoplanin	Vankomisin	Gentamisin	Tetrasiklin	Rifampisin	Kloramfenikol	Siprofloksasin
0.6										
0.12								ADU1		
0.25										
0.50										
1										
2				ADU1		ADU1				
4					ADU1					ADU1
8									ADU1	
16										
32			ADU1							
64							ADU1			
128	ADU1	ADU1								

 Sınır dirençli değerleri

 Orta düzey direnç değerleri

4.2.3. Linkozamid İnaktivasyon Testi

BHI agar ile yapılan Gots' testi ile inaktivasyon varlığı test edilmiştir. Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi indikatör bakteri *Micrococcus luteus*, *E. faecium* ADU1 suşunun antibiyotiği inaktive ettiği bölgede çoğalmıştır.



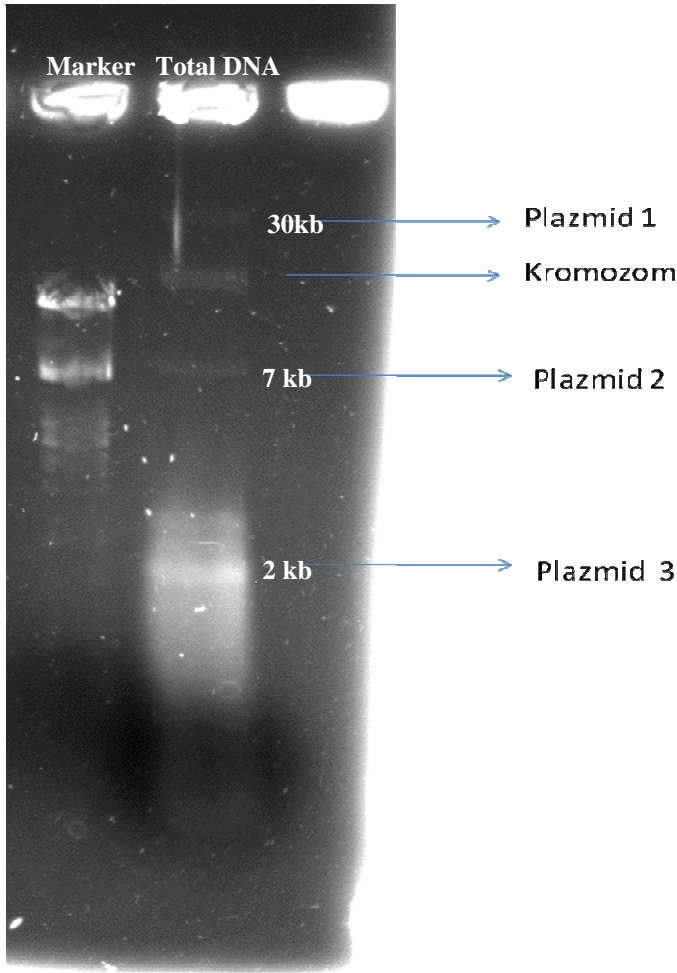
Şekil 4.1. Gots' testi sonucu görülen zonlar

Klindamisin diski inokule edilen *M. luteus* için inhibisyon zonu oluşturmuştur. Test edilen dört enterokok suşundan *E. faecium* ADU1 ve kontrol suşu pozitif sonuç verirken diğer iki enterokok suşu klindamisin diskiyle *M. luteus* için oluşan inhibisyon zonunu etkilememiş ve negatif olarak değerlendirilmiştir.

4.3. *E. faecium* ADU1 Suşu İle Yapılan Moleküler Çalışmalar

4.3.1. Total DNA Ekstraksiyonu

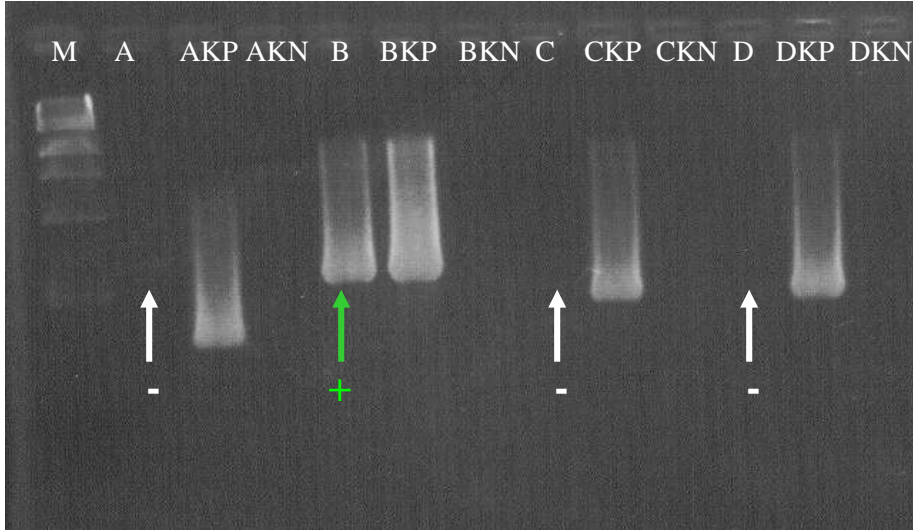
Şekil 4.2' de görüldüğü gibi Total DNA ekstraksiyonu sonucunda *E. faecium* ADU1 suşunda en az 3 plazmid varlığı tespit edilmiştir. Bu plazmidlerden büyük olanı yaklaşık 30 kb iken diğer iki plazmidten büyük olanı 7kb civarındadır. Ekstraksiyonda RNA' ya karşılık gelen bölge içinde daha parlak olarak gözlenen band ise yine plazmid olarak değerlendirilmiş olup yaklaşık 2kb civarındadır.



Şekil 4.2. *E. faecium* ADU1 suşunda total DNA ekstraksiyonu sonucunda görülen plazmidler

4.3.2. Linkozamid İnaktivasyon Genlerinin Aranması

Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi *E. faecium* ADU1 suşunda *linA*, *linB*, *lnuC*, *lnuD* için spesifik primerlerle yapılan PCR sonucunda yalnızca *linB* pozitif çıkmıştır.

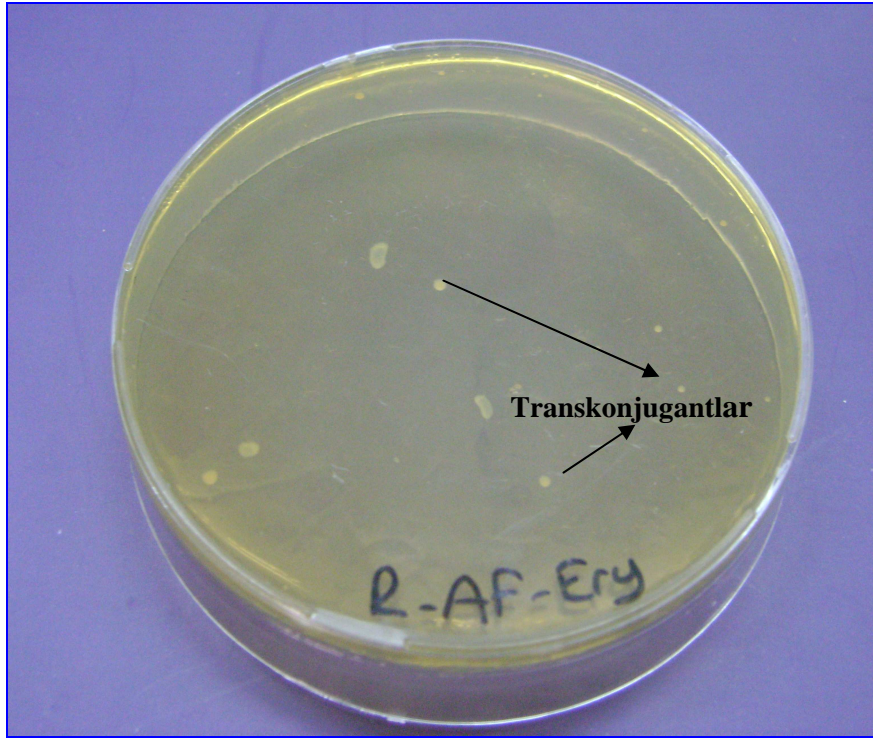


Şekil 4.3. *E. faecium* ADU1 suşunda *linA*, *linB*, *lnu(C)*, *lnu(D)* için spesifik primerlerle yapılan PCR görüntüsü

- | | | |
|------------|---|---|
| M | → | marker, |
| A | → | <i>linA</i> primerleriyle ADU1 suşu, |
| AKP ve ANP | → | <i>linA</i> için sırasıyla pozitif ve negatif kontroller, |
| B | → | <i>linB</i> primerleriyle ADU1 suşu, |
| BKP ve BKN | → | <i>linB</i> için sırasıyla pozitif ve negatif kontroller, |
| C | → | <i>lnu(C)</i> primerleriyle ADU1 suşu, |
| CKP ve CKN | → | <i>lnu(C)</i> için sırasıyla pozitif ve negatif kontroller, |
| D | → | <i>lnu(D)</i> primerleriyle ADU1 suşu, |
| DKP ve DKN | → | <i>lnu(D)</i> için sırasıyla pozitif ve negatif kontroller. |

4.3.3. *linB* Geninin Transfer Edilebilirliği

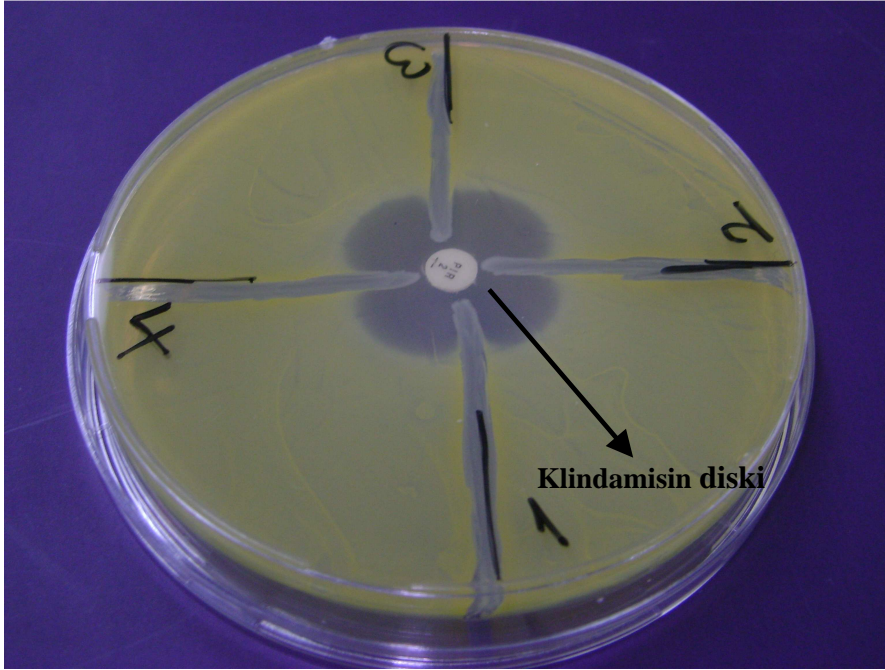
linB geninin mobil bir genetik eleman üzerinde olup olmadığını anlamak için *Enterococcus faecalis* JH2-2 alıcı suş olarak kullanılmış, *Enterococcus faecium* ADU1 izolatından linkozamid direnç karekterini alıp alamadığı konjugasyon yöntemiyle test edilmiştir. *Enterococcus faecalis* JH2-2 suşu rifampisin ve füzidik aside dirençli eritromisine ise duyarlıdır. *E. faecium* ADU1 ise rifampisin ve füzidik aside hassastır. Konjugasyonun sonucunda rifampisin (100 mg/l), füzidik asit (50 mg/l) ve eritromisin (10 mg/l) içeren besiyerinde sadece transkonjugantlar üremiştir. Füzidik asit ve rifampisin direnci kromozomal olduğu için bu dirençlerin transferi söz konusu değildir.



Şekil 4.4. Eritromisin, rifampisin ve füzidik asit içeren seçici besi yerinde 48 saatlik inkubasyondan sonra üreyen transkonjugantlar

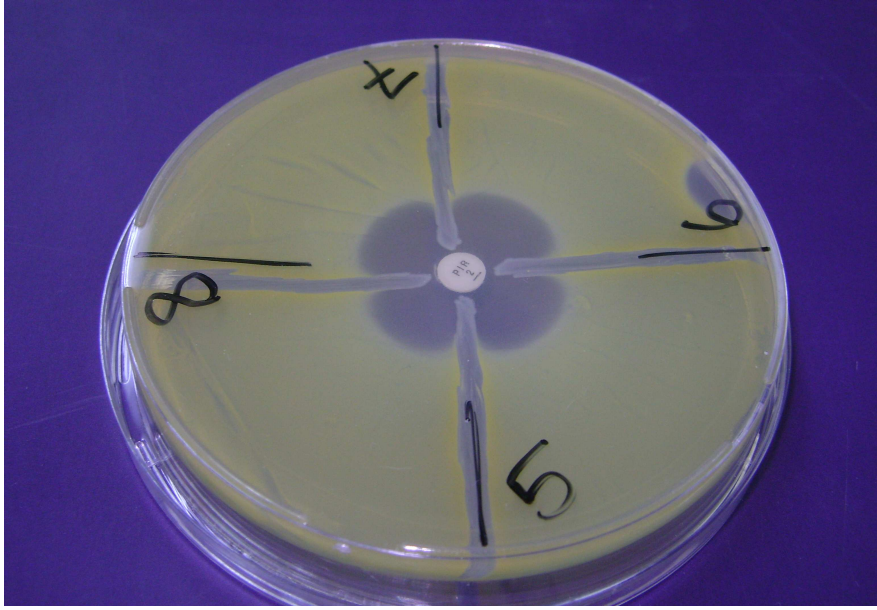
Üreyen transkonjugantların linkozamid inaktivasyonlarındaki değişimini gözlemek amacıyla Gots' testi yapılmıştır. Bunun için İndikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* 9341 kullanılmıştır. Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'de yapılan Gots' testleri sonucu linkozamid inaktivasyonları değerlendirilmiştir. Kontrol amaçlı *E. faecium* ADU1 ve *E. faecalis* JH2-2'de test edilmiştir.

Şekil 4.5.'de seçilen transkonjugantlardan 4 tanesi görülmektedir. Klindamisin diski inokule edilen *M. luteus* için inhibisyon zonu oluşturmuştur. Test edilen 1, 2, 3 ve 4 no'lu transkonjugantlar inaktivasyon yoluyla direnç gelişimine neden olmuştur.



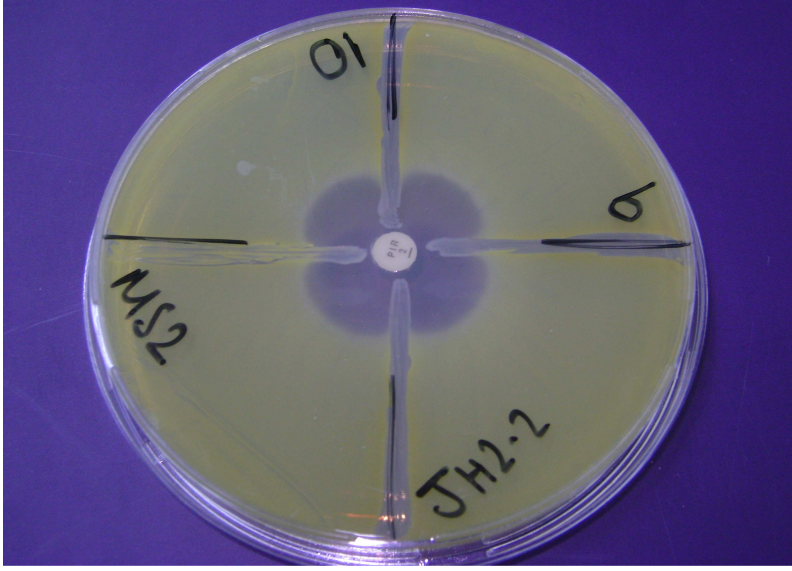
Şekil 4.5. Seçilen 1, 2, 3 ve 4 numaralı transkonjugantlarda Gots' testi uygulaması

Şekil 4.6.'da klindamisin diski inokule edilen *M. luteus* için inhibisyon zonu oluşturmuştur. Test edilen 5, 6, 7 ve 8 nolu transkonjugantlar inaktivasyon yoluyla direnç gelişimine neden olmuştur.



Şekil 4.6. Seçilen 5, 6, 7 ve 8 numaralı transkonjugantlarda Gots' testi uygulaması

Şekilde 4.7'de seçilen transkonjugantlardan 2 tanesi ve alıcı suş olarak kullanılan *E. faecalis* JH2-2 ile verici suş olarak kullanılan *E. faecium* ADU1 izolatu görülmektedir. Klindamisin diski inokule edilen *M. luteus* için inhibisyon zonu oluşturmuştur. Test edilen 9 ve 10 numaralı transkonjugantlar inaktivasyon yoluyla direnç gelişimine neden olmuştur. *E. faecalis* JH2-2 suşunun konjugasyon öncesi inaktivasyona neden olmadığı, verici suş olan *E. faecium* ADU1 izolatının ise konjugasyon öncesi inaktivasyon yoluyla dirence sahip olduğu görülmektedir.

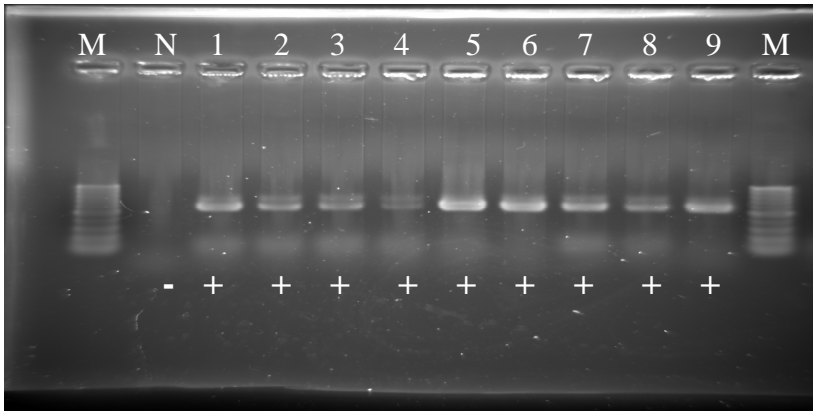


Şekil 4.7. Seçilen 9 ve 10 numaralı transkonjugantlarda ve *E. faecium* ADU1 ile *E. faecalis* JH2-2 suşlarında Gots' testi uygulaması

4.3.4. Transkonjugantların Analizi

4.3.4.1. Transkonjugantlarda *linB* geninin aktarımının doğrulanması

Elde edilmiş olan 10 adet transkonjugantta *linB* geni PCR yoluyla aranmış ve bunlardan 9 tanesinde *linB* geni pozitif bulunmuştur (Şekil 4.8.).



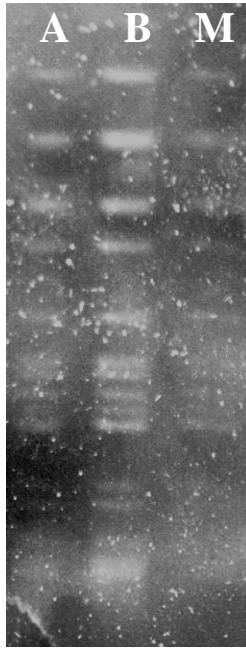
Şekil 4.8. Seçilmiş olan 9 adet transkonjugantta görülen *linB* amplikonları

M: Marker, N: Negatif kontrol 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: Transkonjugantlar

4.3.4.2. Aktarılan mobil genetik elemanın pulsed field jel elektroforezi (PFGE) ile test edilmesi

E. faecalis JH2-2 suşu dirençli hale geldiğinden geçen mobil elemanın plazmid veya transpozon olup olmadığı PFGE yapılarak test edilmiştir.

PFGE elektroforezi sonucunda elde edilen profil aşağıdaki gibidir (Şekil 4.9.). İki transkonjugantla alıcı suş arasında bariz bant farkı bulunmaması plazmidik bir geçiş ihtimalini ortaya çıkartmıştır.



Şekil 4.9. PFGE profilleri

A: Transkonjugant 9,

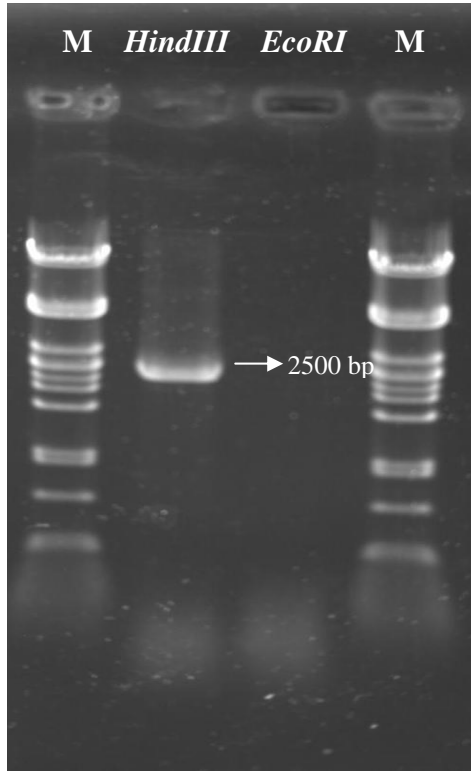
B: Transkonjugant 10,

M: Alıcı suş *E. faecalis* JH2-2

4.3.4.3. Invers PCR yöntemi ile *linB* geninin üzerinde bulunduğu genetik elemanın tespiti

linB geni içerisinde belirlenen ve geni kesmeyen restriksiyon enzimleri olan *EcoRI* ve *HindIII* ile *Enterococcus faecium* ADU1 izolatının total DNA'sı restriksiyona bırakılmıştır.

Enzim olarak kullanılan *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyonlu ürünlerden *HindIII* ile yapılan inverse PCR sonucu yaklaşık 2500 bazlık bir fragman elde edilmiştir (Şekil 4.12.). *EcoRI* ile ise amplikon elde edilememiştir.



Şekil 4.10. *EcoRI* ve *HindIII* kesimi ve ligasyon sonrası yapılan inverse PCR sonucu

M: Pst DNA Marker

linB geninin üzerinde bulunduğu genetik elemanın tespiti için çift yönlü DNA dizi analizi yapılmak üzere Macrogen (Korea) firmasına gönderilmiş olan Invers PCR ile elde edilen ampikonun sekans analizi sonuçları GenBankası (BLAST) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.). Deđerlendirme sonunda *Enterococcus faecium* ADU1 izolatındaki *linB* geninin üzerinde bulunduğu genetik elemanın, daha önce *Enterococcus faecalis*' de tanımlanmış olan pEF418 plazmidi ile sekans homolojisi gösterdiği belirlenmiştir.

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help My NCBI Sign In Register

NCBI BLAST blast suite/ Formatting Results - 9AE439RE015

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

inv-InvB1

Query ID |c|48911 Database Name nr
 Description inv-InvB1 Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.21+ Citation
 Query Length 950
 Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

Graphic Summary

Distribution of 6 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments

Color key for alignment scores

Query

0 150 300 450 600 750 900

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer

Sequences producing significant alignments:
 (Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AF408195.1	Enterococcus faecalis plasmid pEF418, partial sequence	1587	1730	98%	0.0	100%	
FM252031.1	Streptococcus suis SC84 complete genome, strain SC84	132	132	8%	4e-27	97%	
AN946015.1	Streptococcus uberis 01401 complete genome	132	132	8%	4e-27	97%	
CP000408.1	Streptococcus suis 98HAH33, complete genome	132	132	8%	4e-27	97%	
CP000407.1	Streptococcus suis 05ZYH33, complete genome	132	132	8%	4e-27	97%	

Şekil 4.11. INVLINB1 ve INVLINB2 primerleriyle çoğaltılarak sekans analizine gönderilen HindIII ampikonundan elden edilen sekans sonucunun GenBankası (BLAST) ile karşılaştırılması

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI Sign In

NCBI/BLAST/blastn suite/Formatting Results - 9AE70M7X016

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

inv-**invB2**

Query ID |c|36881 Database Name nr
 Description inv-**invB2** Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.21+ [Citation](#)
 Query Length 950
 Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

Graphic Summary

Distribution of 7 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments

Color key for alignment scores

<40 40-60 60-80 80-200 >=200

Query

0 150 300 450 600 750 900

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AF408195.1	Enterococcus faecalis plasmid pEF418, partial sequence	1720	1720	98%	0.0	99%	
FM252031.1	Streptococcus suis SC84 complete genome, strain SC84	307	307	20%	6e-80	95%	
CP000408.1	Streptococcus suis 98HAH33, complete genome	307	307	20%	6e-80	95%	
CP000407.1	Streptococcus suis OSZYH33, complete genome	307	307	20%	6e-80	95%	
AM946015.1	Streptococcus uberis 01401 complete genome	237	237	20%	8e-59	89%	

Şekil 4.12. INVLINB1 ve INVLINB2 primerleriyle çoğaltılarak sekans analizine gönderilen HindIII ampikonundan elden edilen sekans sonucunun Gen Bankası (BLAST) ile karşılaştırılması

Sekans analizi sonucunda elde edilen dizi aşağıdaki gibidir.

>inv-invB1

AGAACGAGCGCATCAATGAGTTGATTGAATTTATCCGCAAGAACAAATTC
CGCACCTTAGAATATGATGATAAGCTTACTTGATCAATGTGTTGACCATA
TACTATCTATCAATAAAACGAATATCGAAATCCAAAAGGGAAATTTTACT
TCTTGGTGGGAGAACAAAACGTTACAAGATAATTTTGAAGTGGCAGAAAA
CAAGAACTCCTTAAAGAAATAGGAAGGTTGTCTTATGCAGCAAAACGTA
GTTCAAACCTGGTCAAATAAAGTAGAAAAAAGTAAATATGGAACAACAAAT
TCTGGTTCAAACCTGGATAAGGGTTATGTTGGACATAAAGGCTGCAAAAGC
GATGAAACGTGCCAAAATATGAGTCAAGACATCAGGAAGCCGTTTTAC
AAAAATCAGAACTGCTCCACAACATTGAACAATATGATGACTTAAAAATT
TCACCACCTGAATTTCAAAAGAGTGCTTAATAGAAGCGAATGATTTATC
ATTGTCTTATGGAGATAAAGAAGTATGCAGTAATCTTAATTTAGAGTCA
ATATTGGTGATAGAGTTGCCATTATCGGAAAAAATGGGAGTGGTAAGTCT
AGTATCCTAAAATTGATTAATGGAGATGATATTAATTTACCGGAAATTT
TATGCTAGCAAGTGGACTAAAAATTTCTTATATTTGCAAGATACTTCAT
ATTTAAAAGGTAATCTATCTGAATTTGCCTATAATAATAAGATCGATGAA
ACTCTATTTAAAACGATTCTTCGTAAACTGGATTTTAAATAGAGAGCAGTT
TGATAAGAACATGGTGGATTTAGTGCTGGTCAGAAAAAGAAAGTACTAA
TTGCTAAAAGCCTTTGTGAAAGTGCACATTTGTATATATGGGATGAGCCA
TTGAACATATGATATTCTTCACGTATCCAAATGNNNNNGAATNANGNN

>inv-invB2

NNNGTNTNTGNNNTNTTATCAGCATAACCTCAGTTTTTCAAAAAACAGCG
AAGCCTATGGATATGTTCCCGTCTACCGATAGTGCAAAAAGTGTCTGGGA
TATGTTTCCGAGAACGGACATACACAAATGACATTCATTCTGTCTCTCA
ATCCATGTGGAAGCAGTATGTCTGTTAACAAGAAAATAATTATTGTTTCGT
CCTGACGAGTTGTTAGACTCGAAAAGGATAAACATCATTTTTAGAACCGG
TAGCCGATTTTTGGCTAGCGGTTTTTTGGGCTCTTTGGCAAATAGTGGTG
ATTGAATCTCGCGCTATCCTATGGAAAACCGCCTTGTGTGAGGGGCTGCG
AGACCGCTTCGATCCTAGAATTGCTGAAGCACGAATCTAGCGTCACTCAC
ATTTTCATCTTTTGACGTAGCTGAGACAAGGTGTTTTTCTTCGATCCGCTA
GTGGTTAATCTCTTTTTGGTGCAAATATGGTTTAGAATTTCTTTGCATGG
CTTAAGGGAGTGGAGAATCGGATATTAGTAGGATTTACATCCACAGATAA
AAATAGGCTTGATTTTAAACAGCGAAACTAAAATACCCTACTTAAATGAAG
TGATAGATTAGATGTTGGGTGTTAGGAGATGCTTAAAAATCCTATGCAA
TCAATAGTTTTTAGTGTTTTGTTGACTTGATCCCTAAATCGCCTGAGTACT
AAACGTTGAGTGTGTCTGCTTACTGTCACTAGCCAGTAAGTGAGACTGTA
GTTAATCTCTCATTTTTCCCAGTATTATGTTGAAAATAGCCATGAAGCGA
TTATTTCTAAAGAGTTATTTTTGCAGGCTCAAGAAGAAATTTATCGGAGA
AGTAATATCTACACAGGAGAAGGCAAGAACAAAAGAATTTATAGTAGCAA
GTACGCTTTAAGTGCCATCACCTTCTGTGGATATTGTGGCGATATTATA

Şekil 4.13. INVLINB1 ve INVLINB2 primerleriyle çoğaltılarak sekans analizine gönderilen HindIII amplikonundan elden edilen sekans analizi sonucu

linB geninin pEF418 plazmidini üzerinde yer alıp almadığını tespit etmek amacıyla pEF418 plazmidine ait replikasyon orjinini çoğaltabilecek primer, pEF418 plazmidinde bulunan aadE geni tarafından kodlanan aminoglikozid direnç geni varlığının araştırılması için bu bölgeyi çoğaltacak primer ve elde edilen bulgular sonucu taranan makalelerden Lourdes Garcia-Migura ve ark. tarafından 2007 yılında yayınlanmış çalışmada transfer edilebilir plazmidler kısmında yer alan pEF418 plazmidini için verilen primer sekansı da referans olarak alınıp PCR'lar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Gen Bankasından pEF418 plazmid sekansı üzerinden fragment büyüklükleri ve dizayn edilen primerlerin doğrulukları aşağıda görüldüğü gibi konfirme edilmiştir.

***Enterococcus faecalis* plazmid pEF418, partial sequence**

GenBankası: AF408195.1

```

LOCUS      AF408195 15890 bp      DNA      linear      BCT 11-JAN-2007
DEFINITION Enterococcus faecalis plazmid pEF418, partial sequence.
ACCESSION  AF408195
VERSION    AF408195.1  GI:15667874
KEYWORDS   .
SOURCE     Enterococcus faecalis
ORGANISM   Enterococcus faecalis
           Bacteria;Firmicutes;Lactobacillales;Enterococcaceae;Enterococcus
REFERENCE  1 (bases 1 to 15890)
AUTHORS    Gentry-Weeks,C.R., Keith,J.M., Estay,M.T. and Pikis,A.
TITLE      A resident plazmid of Enterococcus faecalis 418 contains multiple
           IS1216V elements, aminoglycoside and lincosamide resistance genes,
           and a putative ABC transporter gene with similarity to the
           Streptococcus pneumoniae macrolide efflux pump gene
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 15890)
AUTHORS    Gentry-Weeks,C.R., Keith,J.M., Estay,M.T. and Pikis,A.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (10-AUG-2001) Microbiology, Colorado State University,
           1300 Centre Street, Fort Collins, CO 80523, USA
FEATURES   Location/Qualifiers source          1..15890
           /organism="Enterococcus faecalis"
           /mol_type="genomic DNA"
           /strain="418"
           /db_xref="taxon:1351"
           /plazmid="pEF418"
           /note="resident plazmid"
           198..761/gene="repA"
           198..761
           /gene="repA"
           /note="similar to RepA of the phage resistance plazmid
           pLKS of Lactobacillus plantarum NGRI0101"
           /codon_start=1/product="putative replication protein"

```

[gene](#)
[CDS](#)

Şekil 4.14. *linB* geninin üzerinde bulunduğu *E. faecalis* suşundan izole edilen pEF418 plazmidinin dizi analizi

```

/protein_id="AAL05545.1"
/db_xref="GI:15667875"

/translation="MSNEIVKYHHELNTIPLRKFTPVMENLFFSIVSRMRDVGDKKVKQ
FTFEQLKDLNYSYKATANVRFIDDLLETTYDKLMDLRFGRSSADGLQRERFVLFNQFKID
GKADIPFAEIQVHEKALPLLNLEEWVRYSLQQFNELESSYSKTMFRLLKQYRTKGFAY
YFSKEDFHELLDDIPKRVLLQSFKSTIK"
  repeat_region 724..1533
                 /mobile_element="insertion sequence:IS1216V variant"
  gene           793..1479
                 /gene="tnpA"
  CDS           793..1479
                 /gene="tnpA"
                 /note="similar to transposase of IS1216V"
                 /codon_start=1
                 /transl_table=11
                 /product="putative transposase"
                 /protein_id="AAL05546.1"
                 /db_xref="GI:15667876"

/translation="MTMNHFKGKQFQQDVIIIVAVGYLRYNLSYREVQEILYDRGINV
SHTTIYRWVQEGKLLYQIWKKKNKSFYSWKMDETYIKIKGKWHYLYRAIDADGLTL
DIWLRKKRDTQAAYAFLLKRLVKQFDEPKVVVTDKAPSITSAFKKLKEYGFYQGTERT
IKYLNLLIEQDHRPVKRRNKFYRSLRTASTTIKGMFAIRGLYKKTREKGTLPFGFSVCT
EIKVLLGIPA"
  CDS           1850..2719
                 /note="similar to OrfX of Tn5405 from Staphylococcus
                 aureus"
                 /codon_start=1
                 /transl_table=11
                 /product="unknown"
                 /protein_id="AAL05547.1"
                 /db_xref="GI:15667877"

/translation="MVDNIKSVAEKLSLSYIEGIVLGGSRARGTHTEDSDIDIGIY
YNSEFDINTINQFATKLDDEHRNNLVVPPGAWGDWINGGWLVIINGYHVDLILRDIK
RVEQIMKDETEHGIVTANYQTGHPHGYISAMYRGELAIKILYAKNESLCELKKQAETY
PNALQKSLVNFMMFEAGFSLMFVKANSSTDDKYYIAGHVFRIVSCLNQVLFACNNAYC
INEKKAIAKLLLETFEHEKPEKYTEKVNHI FEVLGISLFECYDMTEKLYNEVNEIVSEINN
FLNEESSDERKQI"
  CDS           2700..3434
                 /note="similar to OrfY of Staphylococcus intermedius"
                 /codon_start=1
                 /transl_table=11
                 /product="unknown"
                 /protein_id="AAL05548.1"
                 /db_xref="GI:15667878"

/translation="MKENKYDDNIFFQKYSQMSRSQKGLAGAGEWETLKKMLPDFKGRVLDLGGCYGWHCIYAME
NGASSVVGVDISHKMLEVARKGKTHFPQIEYECCAIEDVDF
NMMDIPGMADEMRRPMLLIVSAKKKM"
  gene           3467..4330
                 /gene="aadE"
  CDS           3467..4330
                 /gene="aadE"
                 /note="streptomycin resistance protein; similar to
                 streptomycin adenyltransferase of Staphylococcus
                 intermedius, aminoglycoside 6-adenyltransferase of
                 Enterococcus faecalis, and aminoglycoside

```

Şekil 4.14. *linB* geninin üzerinde bulunduğu *E. faecalis* suşundan izole edilen pEF418 plazmidinin dizi analizi (Devam)

```

adenyltransferase of Enterococcus faecium"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="putative aminoglycoside 6-adenylyltransferase"
/protein_id="AAL05549.1"
/db_xref="GI:15667879"

/translation="MRSEKEMMDLVLSLAEQDERIRIVTLEGSANINIPKDEFQDYD
ITYFVSDIEPFISNDDWLNQFGNIIMMQKPEDMELFPPEEKGFSYLMLFDDYNKIDLT
LLPLEELDNYLKGDKLIKVLIDKDCRIKRDIVPTDIDYHVRKPSAREYDDCCNEFWNV
TPYVIKGLCRKEILFAIDHLNQILRFELLRMMSWKVGIKTEFSLVSGKNYKINKYID
EDLWNRLSTYRMSYENIWKSLFICHQLFREVSKAEVAELLGFDYPEYGNITRYTED
MYKKYVENDYF"
CDS 4374..4901
/note="similar to adenine phosphoribosyltransferase of
Thermotoga maritima and Bacillus halodurans"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="putative adenine phosphoribosyltransferase"
/protein_id="AAL05550.1"
/db_xref="GI:15667880"

/translation="MESTDVINEIRGILPRNSIGKYDLLTIFTHKTVFDKIVKVLSD
FQNKVDYVAAPAEIAGWILGTAIKELGVGFIVRKGDKLPYAKEEIIISTHFTDYSQQD
KSFIEISKSSIVRNKRVLIVDDWIETGSQMKALIALLEKLDCSIIGLATIGIDINEVTQ
KWIDSSFVAYIGSNI"
CDS 5114..5842
/note="similar to streptomycin 3'-adenylyltransferase
Staphylococcus aureus and the spectinomycin resistance
protein from Staphylococcus aureus transposon Tn554"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="putative spectinomycin adenylyltransferase"
/protein_id="AAL05551.1"
/db_xref="GI:15667881"

/translation="MLIGVYLYGSAVMGGLRMNSDVIDILVITNQSLSEKTRRNLNRL
MLISGKIGNIKDMRPLEVTVINQKDIVPWHFPPKYEFMYGEWLREQFEKGEIPESTYD
PDLAILLAQLRKNSINLLGPKATEVIEPVPMTDIRKAIKESLPLIASINGDERNVIL
TLARMWLTASTGEIRSKDLAAEWAIPQLPDEHATLLNKAREAYLGCVDKWEGMESV
AELVNHMKKSIESSLNLIQLPFRIV"
CDS complement(6362..6820)
/transl_table=11
/product="unknown"

/protein_id="AAL05560.1"
/db_xref="GI:15667890"

/translation="MMTCPRCLELYSEIWSKPCCKCADKTIPVDIELINVQMLLTR
GFDVSYATCYPDKEQGEIEAMEIEIHFRELYPQALFDGLPPDWIVIDEYPLGGKVL
EPVDILTCAIEYRFEEIHIQKDIAISNLETWLEEKDPQSCRAILLTLAGF"
CDS 6458..6790
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="unknown"
/protein_id="AAL05552.1"
/db_xref="GI:15667882"

```

Şekil 4.14. *linB* geninin üzerinde bulunduğu *E. faecalis* suşundan izole edilen pEF418 plazmidinin dizi analizi (Devam) μ

```

/translation="MDALFKSIFDCTCK<DINRFIKNLTAKNWVFNYPVWRWETIKES
LRIQFPKVNLFHFSFDLTLFFIIVTSGIRYIEASSEQHLNDIDEFNINRNLIGAFTT
RLRPNFTV"
  CDS 7909..9393
      /note="ATP-binding protein; putative macrolide efflux
binding genetic assembly; similar to ABC transporter ATP-
protein of Lactococcus lactis subsp. lactis"
      /codon_start=1
      /transl_table=11
      /product="putative ABC transporter"
      /protein_id="AAL05553.1"
      /db_xref="GI:15667883"

/translation="MSLINVSNLTFSEYGSYDNIFENVSFQIDTDWKLGFIGNRGRK
TTFLNLLLGKYAYSNGNISSTVKFEYFPYDVEDKSLYTIEMKSICTECMDWEIFREIS
LLDVQEDALYRPFNTLSNGEQTKVLLAALFLTASCFLLDIPEPTNHLDDIDARNVQNYL
KRKKGFIIVSHDRSLDQCVDHILSINKTNIETIQKGNFTSWWENKTLQDNFELAENKK
LLKEIGRLSYAAKRSSNWSNKVEKSKYGTNSGSKLDKGYVGHKAAKAMKRAKNIESR
HQEAVLQKSELLHNIEQYDDLKISPLEFHKECLIEANDLSLSYGDKEVCSNLNFRVNI
GDRVAIIGKNGSGKSSILKLLINGDDIKFTGNFMLASGLKISYISQDTSYLKGNLSEFA
YNNKIDETLFTLILRKLDFNREQFDKNMVDVFSAGQKKKVLIAKSLCESAHLIYWDEPL
NYIDIFSRIQIEKMILEYCPDLLFVEHDDAFCNNICTKNINLGL"
  CDS 9447..10250
      /note="similar to lincosamide nucleotidyltransferase of
Enterococcus faecium"
      /codon_start=1
      /transl_table=11
      /product="putative lincosamide nucleotidyltransferase"
      /protein_id="AAL05554.1"
      /db_xref="GI:15667884"

/translation="MLKQKELIANVKNLTESDERITACMMYGSFTKGEQDQYSDIEFY
IFLKDSITSNFDSSNWLFDVAPYLMLYKNEYGTEVVIFDNLIRGEFHFHFLSEKDMNIIP
SFKDSGYIPDTKAMLIYDETGQLENYLSEISGARPNRLTEENANFLLCNFNLWLMGI
NVLKRGEYARSLELLSQQLKNTLQIRMAEKNADNWLNMSKNLEKEISLENYKFFAKT
TARLDKVELFEAYKNSLLLVMDLQSHLIEQYNLKVTHDILERLLNYISE"
  CDS 11346..11759
      /codon_start=1

      /transl_table=11
      /product="unknown"
      /protein_id="AAL05555.1"
      /db_xref="GI:15667885"

/translation="MTAINKLLAGGNMIKTLEENIHAVIGETTEYQISEINTLLDEK
QKELIKLANKGQDYEYLVDEIDEMRDKRQTLLVEDASLSGENERINELIEFIRKKNKFR
TLEYDDKLVRKIIQNVKVEDHDFVIAFKPGIEMEI"
  CDS 12141..12722
      /note="similar to OrfX of Staphylococcus intermedius"
      /codon_start=1
      /transl_table=11
      /product="unknown"
      /protein_id="AAL05556.1"
      /db_xref="GI:15667886"

/translation="MVGNIQIVTEKLSLPPFIEGIVLGGSRARSTHTENSIDIDIGY

```

Şekil 4.14. *linB* geninin üzerinde bulunduğu *E. faecalis* suşundan izole edilen pEF418 plazmidinin dizi analizi (Devam)

```

YNSDSFDLTAINQIATELDDENRNNLVVPPGAWGDVWVGGWLVINGCHVDLILRDIK
RVEQI IKDTEQGIVTANYQTGHPHGYISAMYRGELAI SKI LYAKNESLCELKKQAEIY
    PTALKKSLMNF FIFEA EFARPDQRNKWQYHWHY"
    gene          complement(12655..13092)
                    /gene="tnpA"
    CDS          complement(12655..13092)
                    /gene="tnpA"
                    /note="TnpA; similar to putative transposase of
Enterococcus faecalis"
                    /codon_start=1
                    /transl_table=11
                    /product="transposase"
                    /protein_id="AAL05559.1"
                    /db_xref="GI:15667889"

/translation="MFKKGLFNPSDLPMKGRKPNHGQERRGKQAFRRSIHEREKDYS
QFSNEFGHLEGDTIVGLKHKSAVITLVERLSKVIITLKPCGRQAIDIENKLNHWFEV
    PKNLFKSI TFD CGKEFSNWKQISNANDIATYFADPVARIQLQI"
    repeat_region 13248..14056
                    /mobile_element="insertion sequence:IS1216V variant"
    CDS          13316..14002
                    /note="similar to transposase of Lactococcus lactis"
                    /codon_start=1
                    /transl_table=11
                    /product="putative transposase"
                    /protein_id="AAL05557.1"
                    /db_xref="GI:15667887"

/translation="MTMNHFKGKQFQQDVIIVAVGYLRYNLSYREVQEILYDRGINV
SHTTIYRWVQ EYGKLLYQIWKKKNKKS FYSWKMDETYIKIKGKWHYLYRAIDADGLTL
DIWLRKKRDTQAAYAF LKRLVKQFDEPKVVVTDKAPSITSAFKKLKEYGFYQGT EHR
IKYLNNLIEQDHRPVKRRNKFYRSLRTASTTIKGMEAIRGLYKKTREKGLTFGFSVCT
    EIKVLLGIPA"
    repeat_region 14510..15317
                    /mobile_element="insertion sequence:IS1216V variant"
    gene          complement(14563..15249)
                    /gene="tnpA"
    CDS          complement(14563..15249)
                    /gene="tnpA"
                    /note="similar to transposase of Enterococcus faecium"
                    /codon_start=1
                    /transl_table=11
                    /product="putative transposase"
                    /protein_id="AAL05558.1"
                    /db_xref="GI:15667888"

/translation="MTMNHFKGKQFQQDVIIVAVGYLRYNLSYREVQEILYDRGINV
SHTTIYRWVQ EYGKLLYQIWKKKNKKS FYSWKMDETYIKIKGKWHYLYRAIDADGLTL
DIWLRKKRDTQAAYAF LKRLVKQFDEPKVVVTDKAPSITSAFKKLKEYGFYQGT EHR
IKYLNNLIEQDHRPVKRRNKFYRSLRTASTTIKGMEAIRGLYKKTREKGLTFGFSVCT
    EIKVLLGIPA"

```

Şekil 4.14. *linB* geninin üzerinde bulunduğu *E. faecalis* suşundan izole edilen pEF418 plazmidinin dizi analizi (Devam)

ORIGIN

```

1 ccaagggaaatgacgcttttatctacatcgttttgtctgtttatctacatcgttttgtctg
61 tttatctacatcgttttgtctgtttgtacattgaattagtaatcgacgatgtaataata
121 agatgtagataaacagatattttgtatctcataacgtctgtatctcttgtgcgagtaaga
181 aaggaggatttttaaataatgtcctaataaagaatcgtaagatcatcatgaattaaatacaa
241 ttcogtttgcgaaaattacaccagtcgaaaatgaatttgttcttctcatcgatcaagaa
301 tgcgtgatgtaggtgataaaaaagtacaatttacattcgagcaataaaagatttaagca
361 attataaagcaactgcaaatgttcgatccatagatgatttagaaaacaactgatgacaaat
421 taatggatttacgttttggtagaagaagtgtgacgggttgcaactggaacgttttggtt
481 tatttaatacaatttaaaatcgacggaaaagctgatattccttttgcgtaaatcaagttc
541 atgaaaaagccttaccccttacttaataatctgaagaatgggtgctctatctctccaac
601 agttcaatgaattagaagcagttattcaaaaacaatgtttcgattactaaaacaataca
661 gaaccaaaggttctcgctttttcaaaagaagactttcatgaattacttgaatctcta
721 aaagggttcgttgcgaaagttttaaatctactatacaataaaggtagaatagataaag
781 atagcaggaggaatgacgatgaatcattttaaaggaaagcaatttcagaggatgtgat
841 attgtagccggtgggtactatcttctgtataaccttagctatcgtgaagttcaagaaatc
901 ttatatgatcgtggcattaacgtttctcacaacgagatttatcgttgggtgcaagaatc
961 ggcaaacctactatacaaatttgaaaaagaaaaataaaaaatccttttattcagtgaaa
1021 atggatgaaacgtacatcaaaattaaaggaaaatggcattatttgtatcgagccatcgat
1081 cgagatgggttaaccttggatatttgggtacgtaaaaaacgggacacacaagcagcctat
1141 gcttttcttaagcggttagtgaagcagtttgatgaaccgaaggtttagtcacagataaa
1201 gccctctattacaagtgctttaaagaactaaaagaatcagcgtttttatcaaggggaca
1261 gaacatcgtaccatataaactgaataatttgatgaacaagaccatcgtccagtaag
1321 agacgaataaattctatcgaagttacgcactgctctaccacgattaaaggcattggaa
1381 gccatcgaggattataaagaaaaccgaaaagaagggcactctctcgggtttcgggtc
1441 tgtactgaaatcaaggtattattgggaatcccagctaaatcatagataccgtaagggat
1501 tttattctttatttaaaactttgcaacagaaacttttaactaatactagaaaatcagtac
1561 atcgcaaaaagctcttgtttaaagatttatcaagggatattgtgtggaataggataccgag
1621 aaaggatcgactctgcttggaaacttatttttaacatgttagcaaaatgaatggtaa
1681 tttaaaggtattgaaaagacttcatcctaatacagcagaggtataaaaagacaattgataa
1741 gttttaactatcttttgtgaaattaaaaaaattataaataatggtgagtagaagcaaaaga
1801 tttggcttggaaatttttacagcagtgaaatcgataaaaggagcatgcttgatggtagataa
1861 tattataaatcagtagcagagaaaattatcctctctgctcttatatagaaggtattgtttt
1921 aggtggttcacgtgcaaggggcaccatacagaggatcgggatatagatcggcatccta
1981 ttacaattcagaatcatttgacataaatactattatcaatcgcctacaagctggatga
2041 tgagcatagaaaataaccttgttgtaacctccggagcagtggtggtgattggttaatggcgg
2101 cggatgggttagtcataaacgggtatcatgtggatttaattttacgtgatataaacgtgt
2161 ggaacaaaataatgaaagatcacagacggaattgttactgccaattatcagactgggca
2221 tcccacatggttatattagtgcaatgtatcgaggagaattagcagattagcaaaaactata
2281 tgctaagaatgaaagcttatgcaataaaaaacaggcagaaaacttatccaatgcttt
2341 gcgaaaagtttagtataactttttatggttgaagcagggttctctttaaagtttgaataa
2401 agcaaatcgggaacagacgataaataattatattcggggtcatgtttttcgtatagttc
2461 atgtttaaatacaagtggtattttgcatgtaataatgcttatgtatcaacgaaaagaaagc
2521 tataaaaactgcttgaacttttgaacataaacctgaaaaatataccgagaaggtaaatca
2581 tatttttgaagtactcggatctcactttttgaaatgctacgacatgaccgagaagcttta
2641 taatgaagtgaatgaaattgtatcggagataaaataactttttaaagcaggagaggttcaga
2701 tgaaagaaaacaaatattgatgataatataatttttcaaaaatacagtcfaatgagtcgct
2761 cgcagaaaaggactggctgggtgcgggagaatgggagacttgaaaagatgctacctgatt
2821 ttaagggtaagcgtgtgctttaggttaggatgaggctatggatggcactgtatatacgca
2881 tggaaaaacggtgcttctctgtagtaggtgttgatatttctcaaaaatgctcgaagtag
2941 caaaaggaaaaaccatcttccacagattgaaatgaatgctgtgcatagaagatgtgg
3001 atttcccagaggagactttgatgtaataactaagttcgttgcgtttcattatgtagcag
3061 actatgaaatttaataaaaaagatataggatgctgaaaggctgggtgcaatttaggtt
3121 ttacagttgaacatcctgttttactgctcatggaacacaagactgggtattataacgaaa
3181 aaggagaaatactgcatctcccggtggacaattattattatgagggcaaacggacagcta
3241 tgtttttggaagaaaaggttacaaaaatcatagaacactgaccacatactaaatacac
3301 tgccttcaaatagttttataaataaacagattgtggagccacagcccgagaaacatga
3361 tggatattccggggatggcggatgaaatgcgacgccaatgatgctgatgtatcggcaa

```

Şekil 4.14. *linB* geninin üzerinde bulunduğu *E. faecalis* suşundan izole edilen pEF418 plazmidinin dizi analizi (Devam)

```

3481 agaaatgatggatttagtactttctttagcagaacaggatgaacgtattcgaattgtgac
3421 aaaagaagatgtaataatatagaaaaataaacgaggagtatgtaaatgagatcagaaaa
3541 ctttgaggggtcacgcgcaaatattaatatacctaaagatgaatttcaggattatgataat
3601 tacatatTTTgtaagtgatatagaaccgTTTatatcTaatgatgactggcttaatcaatt
3661 tgggaatataataatgatgcaaaaagccggaggatggaattattcccacctgaagaaaa
3721 gggattttcctatcttatgctatttgatgattacaataaaaattgatcttacctattgcc
3781 cttggaaggttagataattacctaaggcgataaattaataaaagttcTaatgataa
3841 agattgtagaataaaagggacatagttccgactgatatagattatcatgtaagaaagcc
3901 aagcgcaagggagatgatgatgtgctgcaatgaattttggaatgtaaacacctatgttat
3961 taaaggattgtgcccgaagagatactgTTTgcaatcgatcatctgaaccagattctacg
4021 gTTTgaactacttaggatgatgtcgtggaaggTTTgggataaagacagaattttcattaaag
4081 tgttgggaaaaattataagtatattaacaaatacattgatgaagatctatggaatagatt
4141 attatctacatatcgcatggattccctatgaaaatatTTTggaagtcattatttatatgccca
4201 ccaattgTTcagggaaagtgtccaaagaggtagcagaactactggggtttgattatccaga

```

Şekil 4.14. *linB* genini taşıyan pEF418 plazmidinin dizi analizi

Buna göre pEF418 plazmid sekansı üzerinde;

Mor renk ile gösterilen primerler Lourdes Garcia-Migura ve ark. tarafından 2007 yılında yayınlanmış çalışmadan referans alınarak kullanılan primerlerdir. Yaklaşık büyüklüğü 461 baz çiftlik bölgedir. Çalışmada verilen primerler reverse komplement olarak verildiğinden sekans üzerinde reverse komplementleri alınarak işaretlenmiştir.

Sarı renk ile gösterilen aadE isimli primerler “aminoglycoside adenyltransferase” genini çoğaltan primer çiftidir. Yaklaşık büyüklüğü 528 baz çiftlik bölgedir.

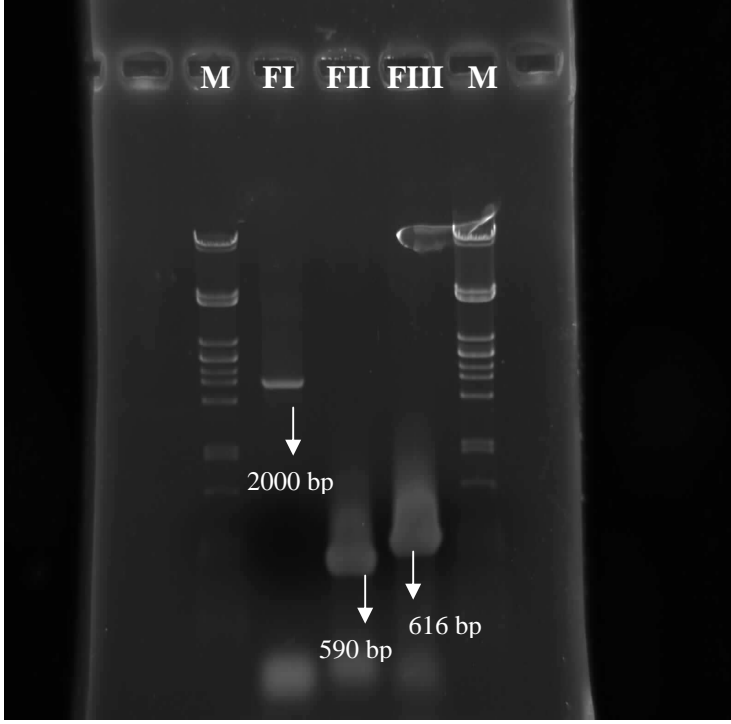
Kırmızı renk ile gösterilen ori-pEF418 isimli primerler pEF418 plazmidinin replikasyon orjinini çoğaltmak için dizayn edilmiş olan primer çiftidir. Yaklaşık büyüklüğü 726 baz çiftlik bölgedir.

pEf418 plazmid sekansı üzerinde dizayn edilen primerler ile aradaki bölgelerinde varolduğunu göstermek amacıyla,

ori-pEF418R ile aadF (849-3491 arası bölge ~2642 bp),

ori-pEF418F ile pEF418F (103-719 arası bölge ~616 bp) ve

ori-pEF418R ile pEF418F (258-848 arası bölge ~590 bp) şeklinde kullanılmıştır (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. *linB* geninin pEF418 plazmidi üzerinde yer alıp almadığını tespit etmeye yönelik dizayn edilen primerlerle yapılan PCR ve elektroforez sonucu

FI ile gösterilen dizinde ori-pEF418R ile aadF primerleri kullanılarak 849-3491 arası ~2642 bp bölge çoğaltılmak istenmiştir. Ancak primerlerin dizaynında ve genlerin sıralanışında Gen Bankasından referans alınarak elde edilen pEF418 sekansı içerisinde hedeflenen ~2642 bp 'lik bölgeden yaklaşık 2000 bp'lik bölge çoğaltılabildiği görülmüştür. FII ile gösterilen dizinde ori-pEF418R ile pEF418F primerleri kullanılarak 258-848 arası ~590 bp'lik bölge çoğaltılmıştır. FIII ile gösterilen dizinde ise ori-pEF418F ile pEF418F primerleri kullanılmıştır ve 103-719 arası ~616 bp'lik bölge çoğaltılmıştır.

linB geninin pEF418 plazmidi üzerinde yer alıp almadığını tespit etmeye yönelik dizayn edilen primerlerle yapılan PCR ve elektroforez sonucu, *linB* geninin pEF418 plazmidi üzerinde yer aldığı belirlenmiştir. Ancak sekansı verilen pEF418 plazmidinden farklı bölgeleri olduğu düşünülmektedir çünkü çoğaltılan bölgenin 2640 olması gerekirken yaklaşık 2000 bazlık fragman çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bölgede olması gereken orfX, orfY ve transpozaz genlerinde bir delesyon olabileceği ve bunun da sekans analiziyle bulunabileceği düşünülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enfeksiyon hastalıkları tarih boyunca en önemli ölüm nedeni olmuşlardır. Fakat 20. yüzyıldan itibaren antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaya başlanmasıyla kalp-damar hastalıkları ve kanser enfeksiyon hastalıklarının yerini almıştır. Ne var ki antibiyotiklerin kullanılma girmesiyle antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ve yaygınlaşması sorunu ortaya çıkmıştır. Antibiyotiklere direnç mekanizmalarının ortaya konması ve direnç yayılımının izlenmesi mikrobiyolojinin önemli alanlarından biri haline gelmiştir.

Gram pozitif etkenlerin tedavisinde linkozamid grubu antibiyotikler de kullanılmaktadır. En yaygın linkozamid direnç mekanizması 23S rRNA metilasyonudur ve MLS grubu antibiyotiklere çapraz direnç sağlar. Linkozamidlere izole direnç sağlayan mekanizmalardan en önemlisi ise bu antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonudur. Bugüne dek tanımlanan enzimlerin hepsi linkozamidlere nükleotidil grubu aktaran nükleotidil transferaz enzimleridir. İlk tanımlanan enzimler *Staphylococcus haemolyticus* BM4610 ve *Staphylococcus aureus* BM4611 suşlarında bulunmuş ve bu enzimlerin sırasıyla *linA* ve *linA'* adı verilen genler tarafından kodlandığı gösterilmiştir. Daha sonra ise *linB*, *lnu(C)* ve *lnu(D)* ve *linF* genleri bulunmuştur. (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1.Linkozamid direnç genlerinin bulunduğu suşlar ve izole edildiği yerler

Gen Adı	Bulunan Suş	İzole Edildiği Yer
<i>linA</i> (Brisson-Noel, 1986)	<i>S. haemolyticus</i> BM4610 <i>S. aureus</i> BM4611	Klinik örnekler
<i>linB</i> (Bozdoğan, 1999)	<i>E. faecium</i> HM1025	Klinik örnekler
<i>lnu(C)</i> (Achard, 2005)	<i>S. agalactiae</i> UCN36	Klinik örnekler
<i>lnu(D)</i> (Petinaki, 2008).	<i>S. uberis</i> UCN42	Hayvan örneği
<i>lin(F)</i> (Heir vd., 2004)	<i>E. coli</i> X1D61	Klinik örnekler

Linkozamidleri inaktive eden genlerin izole olarak bir bakteride bulunması L fenotipi denilen yalnızca linkozamidlere direnç sağlayan, makrolidlere ve streptograminlere ise hassasiyetin korunduğu bir fenotip ortaya çıkmaktadır. Daha

önce yapılan çalışmalar linkomisin ve klindamisine ribozomun ve nükleotidiltransferaz enzimlerinin affinitelerin farklı olduğunu ortaya koymuştur. Klindamisine olan affinitenin ribozoma olan affiniteden daha az olmasının direncin ortaya çıkması ve tespit edilmesinde zorluk ortaya çıkartabilmektedir. Hem disk difüzyon hem de MIK yöntemleriyle direnç tespitinde klindamisin yerine linkomisin kullanılmasının inaktivasyona bağlı L fenotipinin ortaya konmasında daha etkili olabileceği şimdiye dek yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Klinik kullanımının daha yaygın olması nedeniyle klindamisinin hassasiyet belirleme testlerinde tercih edilmesinin inaktivasyona bağlı direncin tespitinde hatalı negatif sonuçların çıkma olasılığını artırmaktadır. İnaktivasyona bağlı linkozamid direnci ilk olarak insanlardan izole edilen stafilokok suşlarında tespit edilmiştir. Linkozamidlere direnç genlerinden birisi olan *lnu(D)* ise mastit etkeni olarak süttten izole edilen *S. uberis* suşunda bulunmuştur. Sonuç olarak hem insanda hem de hayvanlarda bu direnç fenotipinin sanıldığından daha yaygın olduğu gösterilmiştir. Özellikle veteriner hekimlikte linkomisinin tedavi amacıyla yaygın kullanımı linkozamidlere direncin yayılmasında önemli bir faktör olabilir. Bu çalışmada izole edilen suş ise çevre örneğinden, Menderes nehir suyundan izole edilen bir suştur. Ulaşabildiğimiz kaynaklarda yaptığımız taramalara göre daha önce linkozamidlere inaktivasyon yoluyla direnç çevre suşlarında rapor edilmemiştir. Bu fenotipin çevre örneklerinde görülmesi direnç geninin yayılabilirliği açısından oldukça önemlidir. Oryaşın ve arkadaşlarının su ve toprak örneklerinden izole ettikleri 57 enterokok suşu arasında inaktivasyona bağlı direncin %10'dan fazla olduğu görülmüştür. Bu çalışma çevre örneklerinde enterokoklar arasında bu tip direncin ortaya çıkmaya başladığını göstermiştir. Oryaşın ve arkadaşlarının izole ettiği suşlardan birisi olan *E. faecium* ADU1 izolatında *linB* geninin bulunması bu direnç geninin diğer suşlar arasında da yaygın olabileceğini düşündürmüştür (Oryaşın E., 2008).

İnaktivasyon geni *linB*'nin transfer edilebilirliği üzerine yapılan deneylerde bu genin *E. faecalis* JH2-2 suşuna aktarılabildiği gösterilmiştir. Konjugasyon yoluyla transfer edilen linkozamid direncinin başka antibiyotik direnç özellikleriyle birlikte geçtiği görülmüştür. Yapılan ileri araştırmalarda *linB* geninin plazmid üzerinde olduğunu ve diğer direnç genleriyle birlikte taşındığı gösterilmiştir. Bu direnç genleri arasında aminoglikozid direnç genleri, makrolid direnç genleri bulunduğu gösterilmiştir. İnvers PCR yöntemiyle yapılan sekans çalışması ise *linB* geninin daha önce kısmi olarak sekanslanmış pEF418 plazmidini üzerinde olduğunu

göstermiştir. Konjugasyonla aktarılabilir bir plazmid olan pEF418'in direnç genlerinin yayılımında önemli olduğu aşikardır.

Çevre, hayvan ve insanlardan izole edilen örneklerde tespit edilen ve transfer edilebilir olan *linB* geninin giderek daha fazla yaygınlaşacağı düşünülmektedir. Özellikle bu çalışmayla gösterildiği gibi çevre örneklerinde olması bu genin ve beraberinde bulunduğu diğer direnç genlerinin kolaylıkla suşlar arasında transferi antibiyotik direncinin yayılmasında önemlidir. Bu konuda daha geniş sürvey çalışmaları yapılması inaktivasyona bağlı linkozamid direncinin suşlar arasındaki yayılımı ve genelde antibiyotik direncinin yayılmasındaki öneminin ortaya konması açısından önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman SM, Kearns LG. 2004. The Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Interface: Determinants of Anti-infective Drug Action and Efficacy İn Pediatrics. Textbook of Pediatric Infectious Diseases Feigin, Chenry, Demmler, Kaplan, Saunders, editors. Vol 2 5th edition pp: 2965-2983.
- Achard, A., C. Villers, V. Pichereau, and R. Leclercq. 2005. New *lnu(C)* gene conferring resistance to lincomycin by nucleotidylation in *Streptococcus agalactiae* UCN36. Antimicrob. Agents Chemother, 49:2716-2719.
- Aktuğlu Y. 1997. Giriş ve Genel Bilgiler Ed: Aktuğlu Y. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakütesi Sürekli Tıp Eđitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyum Dizisi Yayın No: 1. s;11-53.
- Aydın K. 2007. Ankem Dergi, 21(Ek 2):57-61 Makrolidler ve Linkozamidler [http://www.ankemderneği.org.tr/ANKEMJOURNALPDF/ANKEM_21_Ek_2_57_61.pdf] Erişim Tarihi:11.08.2010.
- Balaban N. 2008. Klinik materyallerden elde edilen stafilokoklarda makrolid, linkozamid ve streptogramin B direnci sıklığının disk yaklaşırma testi ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılması.Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.Doktora tezi, 128s, Ankara.
- Barrie PS, Christou NV, Patchen Dellinge E, et al. 1990. Patogenicity of the enterococcus in surgical infections annals of surgery, 212, 155-159s
- Bozdoğan, B., L. Berrezouga, M. Kuo, D. Yurek, K. Farley, B. Stockman, and R. Leclercq. 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. Antimicrob. Agents Chemother, 43:925-929.
- Bradley D. J., Huycke M., Gilmore S. 1994. Virulence of Enterococci. Clinical Microbiology. 462-478. [http://cmr.asm.org/cgi/reprint/7/4/462] Erişim Tarihi:11.08.2010.
- Brisson-Noël, A., and P. Courvalin. 1986. Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to lincosamide in *Staphylococcus haemolyticus*. Gene 43:247-253
- Brown, J. H. 1919. The use of blood agar for the study of streptococci. Rockefeller Inst. med. Res. Monogr. No. 9.
- Butler KM. 2006. Enterococcal infection in children. **Seminars** in Pediatric Infectious Disease, 17(3): 128-39.

- Chambers FH. 2001. Antimicrobial Agents. Ed: Goodman LS, Gilman A. Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, The McGraw-Hill Company, 10th edition, pp; 1143-1169, USA.
- Chambers HF. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*; 7: 178-82.
- Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, et al. 1996. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*, 22:867-79.
- Çelik, Ü., Alhan, E. 2008. Pediatrik enfeksiyonlarda zorlu patojen: enterokoklar – derleme. **Çocuk Enfeksiyonları Dergisi** , Inf (2), : 58-66.
- Çetinkaya Sardan Y. 2002. Enterokoklarla gelişen enfeksiyonlar, enfeksiyon hastalıkları serisi. 5:61-67.
- Dixon JMS Lipinski A. E. 1972. Group A streptococcus resistant to eritromisin and lincomycin. *Can Med Assoc J*; 99:1093-4. Canada. [<http://aac.asm.org/cgi/reprint/1/4/333>] Erişim Tarihi:11.08.2010.
- Durmaz G. Enterokoklar. 2008. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. (Topçu A.W, Söyletir G ve Doğanay M (ed). 3. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, 2057-2065.
- Dutka-Malen S, LeClercq R, Coutant V, et al. 1990. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptides resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1875-9.
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a 3-year analysis. *Clin Infect Dis*; 29: 239-44. USD.
- Edmond MB., Ober J. F., Weinbaum D. L., et al. 1995. Vancomycin-resistant *E. faecium* bacteriemia: Risk factors for infection. *Clinical Infections Disease*. 20:1120 - 26.
- Eroğlu C, Aydoğan S, Pekbay A. 2003. Nozokomiyal *Enterococcus faecium* menenjit: Olgu sunumu. **Turkish Journal of Infection**. 17:205-207.
- Facklam RR, 1998.Teixeria LM: Enterococcus. In collier topleywilson's microbiology and microbial infections (L, Balows A, Sussman M eds)., Vol 2 (Systematic Bacteriology).9th edition.. Edward Arnold. pp: 669-682, London.

- Gültekin M. 2004. Ed: Ulusoy, S., Usluer, G., Ünal S. Enterokoklar: Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi; 121 – 140s, Ankara.
- Heir E, Lindstedt BA, Leegaard TM, Gjernes E, Kapperud G. 2004. Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal Escherichia coli in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3:12
- Holm SE, Mascini EM. 1999. Streptococci and related genera. in: infectious diseases (Armstrong D, Cohen J ed), 14.13-14.16s, Barcelona.
- Horinouchi S, Byeon WH, Weisblum B. 1983. A complex attenuator regulates inducible resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin type B antibiotics in *Streptococcus sanguis*. *J Bacteriol* 154:1252–62.
- Jett BD, Huycke MM, Gilmore Ms. 1994. Virulence of Enterococci. *Clinic Microbiol. Rev.*, 7: 468- 478
- Kalina AP. 1970 The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int J Syst Bacteriol*, 20:185-189.
- Kanemitsu K. 2001. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. **Journal of microbiological Methods**.;47:11–16. [<http://www.sciencedirect.com/>] Erişim Tarihi:11.08.2010.
- Kataja J, Huovinen P, Seppala H. 2000. Eritromisin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins: the Macrolide Resistance Study Group, 46:789–92.
- Kataja J, Huovinen P, Skurnik M, Seppälä H. 1999. Eritromisin resistance genes in group A streptococci in Finland: The Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents* ,43: 48–52.
- Krause RM. 1992. The origin of plagues: old and new. *Science*;257: 1073-8.
- Kreft B., Marre R., Schramm U., Wirth R. 1992. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.*60(1):25–30. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC257498/>], Erişim Tarihi:11.08.2010
- Kuyucu N. 2007. **Çocuk Enfeksiyonları Dergisi** [Electronic Journal]; 1: Özel Sayı1;33-38 [<http://www.cocukenfeksiyon.org/yazilar.asp?yaziid=20&sayiid=>] Erişim Tarihi:11.08.2010.

- Lancefield R C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med.*; 57:571–595.
- Landman D, Bratu S, Kochar S, et al. 2007. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, *Antimicrob Chemother*; 60: 78-82. NY.
- Leblebicioğlu H, Ulusoy S, Usluer G. 2003. güncel bilgiler ışığında antibiyotikler. *Bilimsel Tıp*, Ankara
- Leclercq R. Mechanisms Of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of The Resistance Elements and Their Clinical Implications Antimicrobial Resistance Invited Article George M. Eliopoulos, Section Editor 482 • CID 2002:34 (15 February)
- Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*; 43:1062–6.
- Livermore DM. 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*; 8: 557-84.
- Lourdes G-M, Ernesto L., Lars Bogø J.. 2007. Transposon characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) and dissemination of resistance associated with transferable plasmids, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, doi:10.1093/jac/dkm186
- Lowbury EJJ, Hurst L. 1959. The sensitivity of staphylococcal and other wound bacteria to eritromisin. *J Clin Pathol*; 12:163–9.
- Lupski JR. 1987. Molecular mechanisms for transposition of drug-resistance genes and other movable genetic elements. *Rev Infect Dis*; 9: 357-68
- McGee L, Klugman KP, Wasas A, Capper T, Brink A. 2001. Serotype 19f multiresistant pneumococcal clone harboring two eritromisin resistance determinants (*erm*[B] and *mef*[A]), 45:1595–8, South Africa.
- McGowan JE Jr. 2001. Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis*; 7: 286-92. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631707/>] Erişim Tarihi:11.08.2010.
- McManus MC. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm*; 54: 1420-33.

- Medeiros AA. 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of, β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*; 24: 19-45.
- Medeiros AA. 2000. Cooperative evolution of mechanisms of beta-lactam resistance. *Clin Microbiol Infect*; 6: 3-5.
- Moellering RC, JR. 2005. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Churchill Livingstone. pp: 2411-2421, New York.
- Murray BE. 1998. Enterococci. In Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds): Infectious Diseases Second edition,; W. B. Saunders Company, pp 1723-1730, Philadelphia.
- Murray, B. 1990. The life and times of the enterococcus clinical microbiology. Program in infectious diseases and clinical microbiology, department of internal medicine, university of texas medical school at Houston, 46s, Houston, Texas.
- Mülazımoğlu L. Antibiyotik kullanım politikaları. III. Ulusal Yoğun Bakım İnfeksiyonları Simpozyumu. [<http://klimikdergisi.org/sayilar/63/12-13.pdf>] Erişim Tarihi: 11.08.2010.
- Opal SM, Pop-Vicas A. 2010. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds.) Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier, pp 279-95. Philadelphia.
- Oryaşın E. 2008. Çeşitli evresel Kaynaklardan İzole Edilen Enterokokların Disk Difüzyon Yöntemi İle Antibiyotik Duyarlılıklarının Tespiti. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , 89s., Aydın.
- Öztürk, R. 1997. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu, İ.Ü. Cerrahpaşa tıp fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri, pratikte antibiyotik kullanımı sempozyumu, (2-3 Mayıs 1997), s.27-51, İstanbul.
- Petinaki E, Guérin-Faubleé V, Pichereau V, Villers C, Achard A, Malbruny B, Leclercq R. 2008. Lincomycin resistance gene *lnu(D)* in *Streptococcus uberis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(2):626-30.
- Roberts M.C., MLS direncinin mekanizması, rRNA metilaz genleri, Effluks ve inaktivasyon genleri [<http://faculty.washington.edu/marilynr/>] Erişim Tarihi: 11.08.2010.

- Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*; 43:2823–30.
- Rosato A, Vicarini H, Bonnefoy A, Chantot JF, Leclercq R. 1998. A new ketolide, HMR 3004, active against streptococci inducibly resistant to eritromisin. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1392–6.
- Rosato A, Vicarini H, Leclercq R. 1999. Inducible or constitutive expression of resistance in clinical isolates of streptococci and enterococci crossresistant to eritromisin and lincomycin. *J Antimicrob Chemother*; 43:559–62.
- Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. 1990. Inducible eritromisin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. 4:1207–14.
- Ruoff KL, Maza L, Murtagh MS, et al. 1990. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J. clin. microbiol*, 28: 435-7.
- Sağduyu H. 1993. Antibiyotiklerin sınıflandırılması ve etki mekanizmaları, Antibiyotik Kullanımı ve Antibiyotiklerin istenmeyen etkileri, Logos Yayıncılık, 5-16. İstanbul.
- Santagati M, Iannelli F, Oggioni MR, Stefani S, Pozzi G. 2000. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. 44: 2585–7.
- Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, et al. 2000. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. 45:891–4.
- Sener B, Köseoglu O, Gür D, Bryskier A. 2005. Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in a university hospital. *J Chemother*, 31s ,Ankara.
- Sherman James M. 1937. THE STREPTOCOCCI. *Bacteriol Rev*. Dec;1(1):3–97.
- Söyletir G, Çerikçioğlu N. 2002. Streptokok infeksiyonları. In Willke TA, Söyletir G, Doğanay M (eds): *İnfeksiyon hastalıkları*, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, İkinci baskı 1467-1497s, İstanbul.
- Stratton CW. 1996. Mechanisms of Action for Antimicrobial Agents. *General Principles Ant Mechanisms for Selected Classes of Antibiotics*, in Lorian V. (ed.) *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed. Williams & Wilkins, 579-603, Baltimore.

- Sümerkan B. 2002. Sterilizasyon dezenfeksiyon hastane infeksiyonları kitabı – Vankomisine dirençli enterokoklar, [http://www.das.org.tr/tr/dosya/kongre/kong2002/035.pdf], Erişim Tarihi: 10.08.2010.
- Syrogianopoulos GA, Grivea IN, Tait-Kamradt A, et al. 2001. Identification of an *erm(A)* eritromisin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Greece. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:342–4.
- Şener ve Köseoğlu O, Gür D, Bryskier A. 2005. Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in a university hospital. *J Chemother*, 31s, Ankara.
- Tailor A.N.S., Bailey E., Rybak M.J. 1993. Enterococcus, an emerging pathogen. *Ann. Pharmacother*. 27: 1231 – 41s.
- Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, et al. 1997. *mefE* is necessary for the eritromisin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*, 41:2251–5.
- Tait-Kamradt A, Davies T, Appelbaum PC, et al. 2000. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America, 44:3395–401.
- Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*; 119: 3-10.
- Tunçtan B, Buharalıoğlu K, Farmakoloji Terimleri Sözlüğü. Sendrom III Tıp Terimleri Sözlüğü 2005;3(2): 3-44.
- Tünger Ö. 2008. Makrolidler, Ketolidler, Linkozamidler Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt.2 ed. Ayşe Willke Topçu, Güner Söyletir, Mehmet Doğanay 3.Baskı İstanbul Nobel Kitabevi 313-315.
- Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. 2004. Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenez, Gram pozitif bakteri infeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, 121-185s, Ankara.
- Ulusoy S. 1999. Antibiyotikler, Solunum Sistemi Enfeksiyonları, Toraks Kitapları (Toraks Dergisi Yayınları) s.125-163.
- Vester B, Douthwaite S. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutionsin 23S rRNA. 45:1–12.
- Weisblum B. 1995a. Eritromisin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother*; 39:577–85.

- Weisblum B. 1995b. Insights into eritromisin action from studies of its activity
ANTIMICROBIAL RESISTANCE • CID 2002:34 (15 February) • 491 as
inducer of resistance. Antimicrob Agents Chemother. 39: 797–805.
- Willke TA, Söyletir G, Doğanay M (eds). Infeksiyon Hastalıkları. İkinci baskı,
İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti. 2:1497-1506, 2002.
- Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, et al. 2004. Community and hospital
spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended spectrum beta-
lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother; 54: 735-43.
[<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/reprint/54/4/735>]Erişim Tarihi:11.08.2010.
- Yayla B. 2007. Eskişehir’de Tıp Fakültesi Hastanesi’nde vankomisin dirençli
enterokokların moleküler epidemiyolojik analizi. Mikrobiyoloji anabilim
dalı, tıpta uzmanlık tezi, 86 s., Eskişehir.
- Yıldırım M. 2007. Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. **Düzce
Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi** (2): 46-52.
- Zhong P, Cao Z, Hammond R, et al. 1999. Induction of ribosome methylation in
MLS-resistant *Streptococcus pneumoniae* by macrolides and ketolides.
Microb Drug Resist 5:183–8.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Emine BİLİR BAŞ
Doğum Yeri ve Tarihi : Germencik 27.07.1981

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Erciyes Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi / Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji A.B.D.
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Bildiriler

—Uluslararası: Erman ORYAŞIN, Emine BİLİR, Vesile YAZICI, Peter C. Appelbaum, Bülent BOZDOĞAN "Effects of *vanA*, *vanH*, and *vanX* Genes in Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus* RN4220"
American Society for Microbiology 109. General Meeting,
Philadelphia, PA, USA. (2009)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Tarım ve Köyişleri Bakanlığı/ 3 Yıl

İLETİŞİM

E-posta Adresi : biliremine@hotmail.com
Tarih : 07/02/2011