

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2012-DR-002

ermTR GENİNİN ERİTROMİSİNE HASSAS *Streptococcus pyogenes* NZ131 ve *Staphylococcus aureus* RN4220 SUŞLARINDAKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Erman ORYAŞIN

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. H. Halil BIYIK

II. Danışman
Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Erman ORYAŞIN tarafından hazırlanan *ermTR* geninin eritromisine hassas *Streptococcus pyogenes* NZ131 ve *Staphylococcus aureus* RN4220 suşlarındaki etkilerinin incelenmesi başlıklı tez, 01.06.2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	:Prof. Dr. İsmail KARABOZ		Ege Üni
Üye	:Doç. Dr. H. Halil BITİK		ADÜ
Üye	:Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU		Ege Üni
Üye	:Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ		ADÜ
Üye	:Yrd. Doç. Dr. Gamze Başbülbul ÖZDEMİR		ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla XX.XX.2012 tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

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.

...../...../20...

Erman ORYAŞIN

ÖZET

***ermTR* GENİNİN ERİTROMİSİNE HASSAS *Streptococcus pyogenes* NZ131 ve *Staphylococcus aureus* RN4220 SUŞLARINDAKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Erman ORYAŞIN

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. H. Halil BIYIK
II. Danışman: Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN
2012, 111 sayfa

ermTR geni özellikle streptokoklarda makrolidlere direnç sağlayan en yaygın genlerden biridir. *ermTR* klonlanarak hassas suşlardaki etkisi gözlenmemiştir. Bu çalışmanın amacı izogenik durumda *ermTR* geninin etkisini göstermektir. Şimdiye kadar sadece sekans benzerliği ile tanımlanmış *ermTR* etkisi hakkında bilgi sağlamıştır. *ermTR*'nin makrolid duyarlılığı üzerindeki etkisini görmek için bu zamana kadar klonlama yapılamamıştır.

ermTR geni regülatör bölgesi dahil edilerek ve hariç tutularak *pUC18* plazmidi içerisine klonlanmış ve sonrasında *pJIM2246* plazmidine subklonlanmıştır. *pJIM2246* içerisinde regülatör bölgesi veya bölgesiz rekombinant plazmidler *Streptococcus pyogenes* NZ131 ve *Staphylococcus aureus* RN4220 suşlarına transformasyon yoluyla aktarılmıştır. *ermTR* genini alan suşların MLS grubu antibiyotiklere hassasiyeti 0.5µg/ml eritromisin ile indüklenerek ve indüklenmeden ölçülmüştür.

Bu çalışma diğer metilazlar ile ErmTR metilazı arasında iki ana fark ortaya koymuştur. i) ErmTR tarafından sağlanan eritromisin direncinin düzeyi düşüktür. ii) ErmTR metilasyonu ile oluşan klindamisin (Linkomisin) direncinin düzeyi makrolidlerden daha yüksek saptanmıştır. *ermA* ve *ermB* gibi diğer metilazlar sürekli sentez halindeyken linkomisine ve makrolidlere yüksek düzey direnç sağlamaktadır. Bu metilazlar 23S rRNA'nın 2058. pozisyonundaki adenini metillemektedirler. Ayrıca bu pozisyonlardaki mutasyonlar da yüksek düzey dirence neden olmaktadır. ErmTR'nin metilasyon bölgesinin belirlenmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir. ErmTR 23S rRNA'nın 2058. pozisyonu dışındaki diğer başka bir bölgeyi metilleme olasılığı öngörülmüştür.

Anahtar sözcükler: *ermTR*, makrolid direnci, metilasyon, regülatör bölge, MİK, indüksiyon

ABSTRACT**EFFECTS OF *ermTR* GENE IN ERYTHROMYCIN SUSCEPTIBLE
Streptococcus pyogenes NZ131 and *Staphylococcus aureus* RN4220**

Erman ORYAŞIN

Ph. D. Thesis, Department of Biology
Supervisor: Assoc. Prof. H. Halil BIYIK
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Bülent BOZDOĞAN
2012, 111 pages

ermTR is one of the most common gene that confers resistance to macrolides especially in *Streptococcus*. The effect of *ermTR* was never shown in isogenic conditions. The purpose of the present study was to show the effect of *ermTR* in isogenic conditions by cloning *ermTR* and transferring this gene to a Gram positive bacteria. Total DNA was extracted from *S. pyogenes* C1 and was used for amplification of *ermTR* gene. Modified primers with addition of restriction sites were used to simplify cloning. Amplicons as well as pUC18 were restricted than mixed and ligated. Transformants were selected after electrotransformation of *E. coli* DH10B and DB10 on selectif media. Recombinant plasmids were purified, restricted and subcloned in a shuttle plasmid pJIM2246 and were used for transformation of *E. coli* DH10B. Recombinant pJIM2246 plasmids with *ermTR* gene were introduced to *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 and *S. pyogenes* NZ131by electroporation.

MICs for *E. coli* and *S. aureus* transformed with *ermTR* gene. The construct contained no regulatory region to see the effect of ErmTR methylase continuously synthesized.

This study showed two main differences between ErmTR and other methylases. i) Level of erythromycin resistance conferred by ErmTR remains low. ii) Lincomycin resistance level conferred by ErmTR methylation is higher than macrolide. Other methylases *ermA*, *ermB* confer high level of macrolide resistance and high level lincomycin resistance if the synthesis is permanent. These methylases methylates adenine at position 2058 of 23S rRNA. Also mutations at that position confer high level resistance. Further studies are necessary to determine methylation site of ErmTR. ErmTR may methylate an other site than A2058 at 23S rRNA.

Key words: *ermTR*, macrolide resistance, methilation, regulatory region, MIC, induction

ÖNSÖZ

Lisans eğitimimden doktora sürecimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bana olan güvenini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, her koşulda pozitif düşünme yollarını gösteren, önümdeki süreçte de her konuda yanımda hissedeceğim değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. H. Halil BIYIK 'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam süresince o eşsiz bilimsel desteğinin yanında, maddi manevi her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübelerinden yararlanma ihtiyacımın hiçbir zaman bitmeyeceği iyi bir araştırmacı olmak için örnek aldığım ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN hocama en içten saygı dilekelerimle teşekkür ederim.

Değerli katkılarından dolayı tez jüri hocalarım Sayın Prof. Dr. İsmail KARABOZ, Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU, Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Gamze Başbülbul ÖZDEMİR 'e teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim süresince her türlü olanakları kullanmamızı sağlayan ve bilimsel ihtiyaçların en iyi şekilde sağlanmasındaki üstün gayreti ve hayat boyu örnek alacağım hocalarımdan biri olan Merkez Araştırma Laboratuvar Müdürümüz Sayın Prof. Dr. Serhan SAKARYA'ya, bilgi, tecrübe ve pozitif yönlendiriciliğini her daim yanımda hissettiğim Sayın Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, benimle güzel dostluklarını paylaşan akademik çalışmaların yanında eşsiz eğlenceli zamanlar ve paylaşımlarda bulunduğum değerli arkadaşlarım yüksek lisans öğrencileri Ömer YILDIZ, Mehmet ÖZTÜRK ve Elif KAYA 'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için ADU-FEF-11017 No'lu Proje ile bize kaynak sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Daire Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tüm yaşamımda her zaman yanımda olan en büyük desteğim, başarıım için maddi ve manevi hiçbir şeyi esirgemeyen, her konuda sonsuz özverileriyle beni minnettar kılan babam Nail ORYAŞIN 'a annem Hülya ORYAŞIN ve kardeşim Ebru ORYAŞIN 'a içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Streptokoklar	1
1.1.1. Sınıflandırma.....	1
1.1.1.1. Brown Sınıflandırması	2
1.1.1.2. Sherman Sınıflandırması.....	2
1.1.1.3. Lancefield Sınıflandırması	2
1.1.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	3
1.1.3. Epidemiyolojisi	3
1.1.4. Streptokokların Yaptığı Hastalıklar	3
1.1.5. Streptokokların Tedavisi ve Direnç Mekanizmaları	5
1.1.6. Önemli İnfeksiyon Etkeni β -Hemolitik Streptokoklar ve Özellikleri.....	6
1.1.6.1 A Grubu β -Hemolitik Streptokoklar (<i>S. pyogenes</i>).....	6
1.1.6.2 B Grubu β -Hemolitik Streptokoklar (<i>S. agalactiae</i>)	7
1.1.6.3 C Grubu β -Hemolitik Streptokoklar.....	7
1.1.6.4 G Grubu β -Hemolitik Streptokoklar	7
1.2. Stafilokoklar.....	8
1.2.1. Sınıflandırma.....	9
1.2.2. Morfoloji, Boyanma ve Biyokimyasal Özellikleri.....	10
1.2.3. Epidemiyolojisi	11
1.3. Antibiyotikler	12

1.3.1. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları	13
1.3.1.1. Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler	15
1.3.1.2. Protein Sentezini İnhibe Edenler	16
1.3.1.3. Nükleik Asit Sentezini İnhibe Edenler	17
1.3.1.4 Hücre Zarınının Fonksiyonunu Değiştirenler	17
1.3.2. Antibiyotik Direnci.....	18
1.3.3. Antibiyotiklere Direnç Gelişim Mekanizmaları	19
1.4. MLS Grubu Antibiyotikler	24
1.4.1. Makrolidler	24
1.4.2. Linkozamidler.....	28
1.4.3. Streptograminler	28
1.4.4. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin Direnci	29
1.4.4.1. Antibiyotiğin Hedefinde Değişiklik Olması (23S rRNA metilasyonu ve mutasyonu).....	33
1.4.4.2. MLS _B Direnç Ekspresyonunda Farklılıklar	39
1.4.4.3. Stafilokoklarda MLS _B Direnç Ekspresyonu	39
1.4.4.4. Streptokoklarda ve Enterokoklarda MLS _B Direnci	40
1.4.4.5. Aktif Efluks Pompası	41
1.4.5. erm(TR) Metilazı.....	45
2. KAYNAK ÖZETLERİ / KURAMSAL TEMELLER	47
3. MATERYAL VE YÖNTEM	51
3.1. Materyal.....	51
3.1.1. Bakteri, Plazmid ve Büyüme Ortamları	51
3.1.2. Stok Antibiyotiklerin ve Solüsyonların Hazırlanması	51
3.1.2.1. Ampisilin	51
3.1.2.2. Kloramfenikol.....	52
3.1.2.3. Klindamisin	52
3.1.2.4 3M Sodyum Asetat Çözeltisi.....	52
3.1.2.5 10X TBE Tamponu	52
3.1.3. Kimyasallar.....	53
3.2. Laboratuvar Metotları.....	53

3.2.1. <i>ermTR</i> Geninin pUC18 Vektörü İçerisine Klonlanması	53
3.2.1.1. <i>ermTR</i> genini çoğaltmak için modifiye primerlerin dizayn edilmesi.....	53
3.2.1.2. <i>Streptococcus pyogenes</i> C1 suşundan total DNA ekstraksiyonu	55
3.2.1.3. PCR programlama ve PCR reaksiyonunun hazırlanması.....	56
3.2.1.4. PCR ürünlerinin elektroforezi	58
3.2.1.5. pUC18 içeren <i>Escherichia coli</i> DH10B suşundan plazmit ekstraksiyonu.....	58
3.2.1.6. <i>pUC18</i> plazmidi ile klonlanacak lider peptidli ve peptidsiz <i>ermTR</i> genlerini içeren amplikonların restriksiyonu	61
3.2.1.7. <i>pUC18</i> plazmidi ile klonlanacak lider peptidli ve peptidsiz <i>ermTR</i> genlerini içeren amplikonların ligasyonu.....	63
3.2.1.8. Elektrokompentan <i>E. coli</i> DH10B hücrelerinin hazırlanması.....	65
3.2.1.9. Ampisilin-Xgal-IPTG seçici besiyerinin hazırlanması	66
3.2.1.10. Ligasyon ürünlerinin elektrotransformasyonu	66
3.2.1.11. İnsert alan kolonilerin seçimi ve doğrulanması.....	67
3.2.2. pUC18 İçinde İnsert Taşıyan Rekombinan Plazmidlerin pJIM2246 ile Füzyonu	70
3.2.2.1. pUC18 İçinde İnsert Taşıyan Rekombinan Plazmidlerin ve pJIM2246 plazmidinin restriksiyonu	71
3.2.2.2. Füzyon plazmidlerinin ligasyonu	73
3.2.2.3. Füzyon plazmidlerinin elektrotransformasyonu.....	73
3.2.2.4. Füzyon plazmidini içeren kolonilerin seçimi	74
3.2.3. <i>ermTR</i> Genini İçeren Füzyon Plazmidlerinin <i>E. coli</i> DB10, <i>E. faecalis</i> JH2-2, <i>S. aureus</i> RN4220 ve <i>S. pyogenes</i> NZ131 Bakterilerine Aktarılması.....	75
3.2.4. MİK Değerlerinin Belirlenmesi	76
3.2.5. Eritromisin – Klindamisin Çift Disk Testi	77
4. BULGULAR	78
4.1. <i>S. pyogenes</i> C1 Suşundan Total DNA Ekstraksiyonu ve Klonlanacak <i>ermTR</i> Fragmanlarının Çoğaltılması.....	78

4.2. Çoğaltılan <i>ermTR</i> Fragmanlarının pUC18 Vektörüne Ligasyonu ve Elektrotransformasyonu	79
4.3. İnserti Alan Kolonilerin Seçimi ve Doğrulanması	80
4.4. pUC18 İçinde İnsert Taşıyan Rekombinan Plazmidlerin pJIM2246 ile Füzyonu.....	83
4.5. Füzyon Plazmidlerinin Eritromisin ve Klindamisine Hassas <i>E. coli</i> DB10, <i>E. faecalis</i> JH2-2, <i>S. aureus</i> RN4220 ve <i>S. pyogenes</i> NZ131 Bakterilerine Aktarılması	84
4.6. MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	84
4.6.1. <i>E. coli</i> DB10 için MİK değerlerinin belirlenmesi	84
4.6.2. <i>E. faecalis</i> JH2-2 için MİK değerlerinin belirlenmesi.....	86
4.6.3. <i>S. aureus</i> RN4220 için MİK değerlerinin belirlenmesi	87
4.6.4. <i>S. pyogenes</i> NZ131 için MİK değerlerinin belirlenmesi	88
4.7. Eritromisin – Klindamisin ift Disk Testi	89
4.7.1. Eritromisinden başka diğer Makrolidlerle fenotipin incelenmesi.....	90
5. SONUÇ ve TARTIşMA	93
KAYNAKLAR.....	98
ÖZGEçMİş.....	104

SİMGELER DİZİNİ

ABC	ATP-Binding-Cassette
ATP	Adenosine Triphosphate
BHI	Brain Heart Infusion Agar
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
Cat	Chloramphenicol asetil transferase
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Erm	Erythromycin ribosome methylase
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
MH	Mueller-Hinton
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MLS _B	Makrolid, Linkozamid, Streptogramin B
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NAM	N-Asetil Muramik Asit
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
pH	Power of Hydrogen
PTC	Peptidyl Transferase Center
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
TE	Tris-EDTA

tRNA	Transfer Ribonucleic Acid
X-Gal	beta-galactosidase

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu	21
Şekil 1.2. Makrolid ve ketolidlerin moleküler yapıları	25
Şekil 1.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i> ‘deki makrolid direncinin dünyadaki dağılımı.....	27
Şekil 1.4. Linkomisin ve klindamisin moleküler yapıları	28
Şekil 1.5. Streptogramin A ve B’nin moleküler yapıları.....	29
Şekil 1.6. Regulator bölgeler.....	32
Şekil 1.7. 23S rRNA’ da peptidil transferaz merkezinin (PTC) yapısı	33
Şekil 1.8. <i>erm</i> genlerine ait lider peptidler	45
Şekil 1.9. <i>ermTR</i> mRNA’sının regülatör bölgesinin ikincil yapısı	46
Şekil 3.1. Gen bankasındaki FM162351 nolu <i>ermTR</i> sekansı	54
Şekil 3.2. <i>ermTR</i> genini klonlamak amacıyla amplifikasyonda kullanılacak primer dizileri.....	55
Şekil 3.3. pUC18 plazmidinin yapısı	60
Şekil 3.4. Kompetan hücreler ile ligasyon ürünlerinin transformasyon küvetine aktarılması	66
Şekil 3.5. Elektroporator cihazı.....	67
Şekil 3.6. Seçici besiyeri plaklarının incelenmesi.....	68
Şekil 3.7. Lider peptidi içeren (FI) ve içermeyen (FII) <i>ermTR</i> genlerinin pUC18 plazmidine klonlanması	69
Şekil 3.8. pJIM2246 plazmidinin temsili yapısı.....	70
Şekil 3.9. İnsert taşıyan pUC18 plazmidi ve füzyon yapılacak olan pJIM2246 plazmidinin <i>EcoRI</i> ile restriksiyonunun şematize gösterilmesi	72
Şekil 3.10. Füzyon plazmidi oluşturma basamakları	75
Şekil 4.1. <i>ermTR</i> geninin regülatör bölgeyi içeren (FI) ve içermeyen (FII) kısımının PCR ile çoğaltılmasından sonraki elektroforez görüntüsü ..	79
Şekil 4.2. Regülatör bölgeyi içeren (FI) ve regülatör bölgeyi içermeyen (FII) <i>ermTR</i> geni fragmanlarının pUC18 vektörü ile ligasyonu	80

Şekil 4.3. Ampisilin-Xgal-IPTG içeren seçici besiyerinde mavi beyaz koloni ayrımı	81
Şekil 4.4. pUC18 içerisine klonlanmış <i>ermTR</i> fragmanlarının restriksiyon analizi ile gösterilmesi	81
Şekil 4.5. pUC18 vektörü içerisine klonlanmış FI ve FII fragmanlarının PCR ile çoğaltılması	82
Şekil 4.6. Plazmidlerin füzyon için kullanılan restriksiyon enzimi ile kesimi ve her iki vektörün açığa çıkartılması	83
Şekil 4.7. Eritromisin direnç fenotipi	90
Şekil 4.8. Azitromisin direnç fenotipi	91
Şekil 4.9. Telitromisin direnç fenotipi.....	91
Şekil 5.1. Peptidil transferaz bölgesinin ikincil yapısı	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre sınıflandırılması.....	14
Çizelge 1.2. Antibiyotik direncinin biyokimyasal ve genetik yolları.....	20
Çizelge 1.3. Makrolidlerin sınıflandırılması	26
Çizelge 1.4. MLS direncinin mekanizması	31
Çizelge 1.5. rRNA metilaz genleri	36
Çizelge 1.6. Efluks ve inaktivasyon genleri	43
Çizelge 3.1. Primerlerin Tm değerlerinin gösterilmesi	56
Çizelge 3.2. <i>ermTR</i> geninin <i>S. pyogenes</i> C1 DNA'sından çoğaltılması için kullanılan Thermal Cycler programı	57
Çizelge 3.3. <i>ermTR</i> geninin <i>S. pyogenes</i> C1 DNA'sından çoğaltılması için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri	58
Çizelge 3.4. pUC18 plazmid DNA'sının <i>PstI</i> ve <i>BamHI</i> endonükleazları ile kesim reaksiyonu bileşenleri	61
Çizelge 3.5. Lider peptidi içeren (FI) <i>ermTR</i> geni amplikonunun <i>PstI</i> ve <i>BamHI</i> endonükleazları ile kesim reaksiyonu bileşenleri ..	62
Çizelge 3.6. Lider peptidi içermeyen (FII) <i>ermTR</i> geni amplikonunun <i>PstI</i> ve <i>BamHI</i> endonükleazları ile kesim reaksiyonu bileşenleri ..	62
Çizelge 3.7. Lider peptidi içeren (FI) <i>ermTR</i> geni amplikonu ile pUC18 vektörü için ligasyon reaksiyonu	64
Çizelge 3.8. Lider peptidi içermeyen (FII) <i>ermTR</i> geni amplikonu ile pUC18 vektörü için ligasyon reaksiyonu bileşenleri	64
Çizelge 3.9. İçinde insert taşıyan pUC18 plazmid DNA'larının <i>EcoRI</i> endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri	71
Çizelge 3.10. Füzyon yapılacak olan pJIM2246 plazmid DNA 'sının <i>EcoRI</i> endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri	72
Çizelge 3.11. İnsert içeren pUC18 vektörü için ligasyon reaksiyonu	73
Çizelge 4.1. <i>ermTR</i> genleri aktarılmış <i>E. coli</i> DB10 bakterisinde MİK ölçüm değerleri	85

Çizelge 4.2. <i>ermTR</i> genleri aktarılmış <i>E. faecalis</i> JH2-2 bakterisinde	
MİK ölçüm değerleri	86
Çizelge 4.3. <i>ermTR</i> genleri aktarılmış <i>S. aureus</i> RN4220 bakterisinde	
MİK ölçüm değerleri	87
Çizelge 4.4. <i>ermTR</i> genleri aktarılmış <i>S. pyogenes</i> NZ131 bakterisinde	
MİK ölçüm değerleri	88

1. GİRİŞ

1.1. Streptokoklar

Streptokoklar doğada çok yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır. Hem insanlarda hem de hayvanlarda çeşitli irinli hastalıklara neden olurlar. Bir kısmı normal sağlıklı kişilerin florasında bulunurken bazıları da enfeksiyon etkenidir.

İlk kez 1874 yılında Billroth yara ve erizipel lezyonlarının pürülan eksudalarında zincir yaparak üreyen kokları tanımlamış ve Fehleisen 1882- 1883'de bu bakterilerin saf kültürünü elde ederek, gönüllülerde erizipel oluşturmuştur. Rosenbach (1884) ise, "*S. pyogenes*" olarak isimlendirmiştir. Brown (1919), kanlı agardaki aktivitelerine göre streptokokları alfa (α), beta (β) ve gama (γ) hemolitik diye ayırmıştır (Bisno vd., 2000; Koneman vd., 1992; Mandell vd., 2005). G.R. Dick (1924), kızıl hastalığının, hemolitik streptokok enfeksiyonu olduğunu bildirmiştir. Rebecca Lancefield presipitasyon ve Griffith aglütinasyon yöntemleriyle streptokokların immünolojisini araştırmışlar ve Lancefield (1933) patojen streptokokları, hücre duvarında bulunan karbonhidrat antijenlerine göre, çeşitli serolojik gruplara ayırmıştır (Kayser vd., 2005; Lehman vd., 2007).

1.1.1. Sınıflandırma

Streptokoklar, hemoliz oluşturma, biyokimyasal özellikler ve immunolojik karakterler olmak üzere üç genel kritere göre sınıflandırılmışlardır. Bu kriterleri temel alan araştırmacıların adlarıyla Brown, Sherman ve Lancefield sınıflandırması olarak üç sınıflandırma bulunmaktadır (Mandell vd., 2005).

1.1.1.1. Brown Sınıflandırması

Brown, streptokokları kanlı agarda oluşturduğu hemoliz tipine göre üç gruba ayırmıştır. Bunlar:

β -hemoliz oluşturanlar: Kolonileri çevreleyen eritrositlerin tamamen erimeleri sonucu belirgin ve şeffaf bir hemoliz zonu oluştururlar.

α -hemoliz oluşturanlar: Kolonileri çevreleyen eritrositlerin kısmi hemolizi sonucu yeşilimsi bir renk meydana getirirler.

Hemoliz oluşturmayanlar: Besiyerindeki eritrositleri eritmezler.

Bunlar içerisinde daha çok β -hemoliz oluşturan streptokoklar insan ve hayvanlarda infeksiyon meydana getirirler (Wilke Topçu vd., 2002; Koneman vd., 1999).

1.1.1.2. Sherman Sınıflandırması

Sherman streptokokları yüksek ısı ve pH derecelerinde üremeleri, hemoliz yapma ve biyokimyasal özelliklerine göre Piyojenik, Viridans, Laktik Streptokoklar ve Enterokoklar olarak dört gruba ayırmıştır (Mandell vd., 2005).

1.1.1.3. Lancefield Sınıflandırması

Streptokokların gruplandırılması hücre duvarında bulunan C polisakkarit maddesi ile bu maddeye karşı tavşanlardan elde edilen bağışık serum arasındaki presipitasyon reaksiyonuna göre A'dan V'ye kadar harfler ile gösterilen serolojik gruplara ayrılmıştır. A, B, C, D, F ve G grupları genellikle insanlarda sık enfeksiyon etkenidirler. Hemoliz yapmayan ve α - hemoliz yapan streptokoklar yeterli antijen farklılığı gösteremedikleri için serolojik olarak gruplandırılmamışlardır (Forbes vd., 2002; Ruoff vd., 2003).

1.1.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Streptokoklar tek tek kokların veya diplokokların yan yana gelmesinden oluşan, tek bir hat boyu bölündüklerinde ve bölünen koklar birbirlerinden ayrılmadıklarında, kısa veya uzun zincirler halinde bulunan mikroorganizmalardır. Sporsuz ve hareketsizdirler. Anilin boyaları ile kolay boyanırlar, gram pozitiflerdir.

1.1.3. Epidemiyolojisi

A grubu β -hemolitik Streptokoklar (AGBHS) özellikle 5-15 yaş arası çocuklarda görülen bakteriyel farenjit ve tonsillitin en yaygın rastlanan etkeni olmakla birlikte, her yaş grubunda infeksiyonlara neden olabilir. İnsanların iç içe yaşama eğilimi gösterdiği ve asemptomatik farinks taşıyıcılığının arttığı kış ayları, bu infeksiyonların en sık görüldüğü mevsimdir. Üst solunum yolu (ÜSY)'ndaki mikroorganizmalar, çevreye damlacıklar aracılığı ile yayıldığı gibi, direk fiziksel temas ile de bulaşabilir. Bu nedenle aynı aile içinde veya toplu yaşanan yerlerde kolaylıkla yayılır. Epidemiler dışında deri taşıyıcılığı yaygın değildir (Mandell, 2005).

1.1.4. Streptokokların Yaptığı Hastalıklar

İrinli (süpüratif) ve irinsiz (non-süpüratif) olarak aşağıda belirtilen çeşitli hastalıklar meydana getirirler (Bisno, 2000; Koneman, 1992; Winn, 2006).

- Anjin, tonsilit ve farenjit: Özellikle A Grubu β -Hemolitik Streptokoklar (AGBHS) 'lar olmak üzere C Grubu β -Hemolitik Streptokoklar (CGBHS) ve G Grubu β -Hemolitik Streptokoklar (GGBHS) 'lar da farenjit yapar. Boğaz ve baş ağrısı, ateş, lökositoz ve lenf bezlerinde büyüme görülür. Cerahatli ve cerahatsiz çeşitli komplikasyonlar ortaya çıkabilir.

- Sinüzit, otitis media ve mastoidit yapabilirler.
- Menenjit ve beyin absesi meydana getirebilirler.
- Peritonsiller abseleri gözlenebilir.
- Solunum yolunun diğer infeksiyonları (larenjit, trakeit ve pnömoni) oluşabilir. BHS pnömonileri hızlı ilerleyici ve ciddi bir klinik tablo geliştirir.
- Septisemi ve buna bağlı osteomyelit, artrit ve sellülit süpüratif komplikasyonları ortaya çıkmaktadır.
- Kızıl: Eritrojenik toksin oluşturan streptokokla meydana gelir. Çene ve ağız çevresi dışında, kulak arkasında başlayan döküntüler gözlenir. Dil papillaları geniş ve kurudur (çilek dili). Hastalar iyileştikten sonra deri kavlaması görülebilir.
- Streptokokal pyoderma (Deri infeksiyonları):
 - a- Sellülit: Deri altı dokusunun AGBHS'larla meydana gelen infeksiyonudur. Lenfanjit ve lokal lenfadenopati gelişebilir.
 - b- Erizipel (Yılancık): Deri ve derialtı dokularının lenfanjitli bir hastalığıdır. Kırmızı, lokal ısı yükselmiş ve ağrısız deri lezyonu, normal deriden keskin bir sınırla ayrılmıştır. Burun üzeri ve her iki yanakta olmak üzere, çoğunlukla yüzedir.
 - c- İmpetigo ve fronküloz: Yüzeysel deri lezyonudur. AGBHS veziküler döküntüsü püstülleşir, üzeri kabukla örtülür. Fronküloz, kıl folliküllerinin iltihabıdır.

Deri veya yara infeksiyonlarında, menstürel tampon kullanımıyla ilişkili olmaksızın, stafilokokal toksik şok sendromuna benzer belirtiler gösteren *S. pyogenes* gözlenmiş ve toxic shock-like syndrome (TSLs) şeklinde isimlendirilmiştir. Bu toksinler ayrı etki mekanizmalarına sahiptir.

- Puerperal ateş (Lohusalık ateşi): AGBHS ve CGBHS'ların endometriumu infekte etmesiyle oluşan, asepsinin yetersiz olduğu dönemlerde görülen hastalıktır.
- Fokal infeksiyonlar: Streptokoklar, fokal infeksiyonların en önemli etkenlerindedir.
- Müşterek infeksiyon etkeni olan streptokoklar: Difteri, grip, boğmaca ve tüberkülozda süperinfeksiyon yapabilir.

1.1.5. Streptokokların Tedavisi ve Direnç Mekanizmaları

Streptokok infeksiyonlarının tedavisinde oral ya da parenteral penisilin türevleri ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Penisilin kullanılmadığında, alternatif olabilecek antibiyotiklere karşı gelişen direnç, ayrı bir sorun oluşturmaktadır. Bakteriyel tonsilit ve farenjitlerin erken tedavisi morbiditeyi azaltmakla birlikte esas önemli olan akut romatizmal ateş (ARA) ve akut glomerulonefrit (AGN) gibi ciddi komplikasyonları önlemektir (Mandel, 2005).

Bugüne kadar yapılan yayınlarda in-vitro penisilin direncine rastlanmamıştır. Penisilin allerjisi olanlarda eritromisin ve diğer makrolidler sıklıkla kullanılmaktadır. 1950'lerin sonlarında ilk eritromisin direncinin bildirilmesinden sonra giderek makrolid direncinde artış görülmüştür. Eritromisin direnci farklı mekanizmalarla gelişebilmektedir. Bakteride *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermTR*) geni tarafından kodlanan metil transferazın ribozomal bağlanma bölgesinde sağladığı değişiklikle makrolid, linkozamid ve streptogramin-B (MLS_B) grubu antibiyotiklerin hedefe bağlanması engellenir (MLS_B fenotipi). MLS_B tipi direnç, in-vitro deneylerde eritromisin ve klindamisine direncin saptandığı konstitütif (KMLS_B) tipte olabilir veya indüklenebilmektedir (İMLS_B). Ayrıca bakteride *mef-A* geninin kodladığı bir membran proteini ile 14-15 üyeli makrolidler hücre dışına pompalanabilmekte (M fenotipi) ve bu dirençten linkozamid ve streptograminler etkilenmemektedir (Varaldo, 1999; Bemer-Melchior, 2000).

Telitromisin ketolid sınıfı antibiyotiklerin ilk üyesidir ve eritromisinin semisentetik türevidir. Ketolidler yapı olarak 14 üyeli makrolid grubundan geliştirilmiştir. Makrolidlere benzer şekilde bir makrolaktom halkası içerir. Bu halkanın üçüncü pozisyonunda yer alan L-cladinose şekeri yerine keto grubu eklenmesi ile ketolidler oluşturulmuştur. Keto grubu stafilokoklarda ve streptokoklarda MLS_B direncinin indüklenmesini önler. Telitromisin 50 S rRNA'nın yanısıra 30 S rRNA'ya da etkilidir. MLS_B direncine yol açan ribozamlara bağlanma oranı ise 20 kat daha fazladır. Bu farklılık makrolide dirençli suşlara karşı telitromisinin daha güçlü etkinlik göstermesini sağlar. KMLS_B tipi dirence sahip AGBHS'larda etkili değilken, İMLS_B ve M fenotipindeki dirençten etkilenmez. Akut tonsillofarenjit, akut sinüzit, toplum kökenli pnömoni ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) akut alevlenmelerinin tedavisinde endikedir (Bozdoğan, 2003, Gonzales, 2005).

1.1.6. Önemli İnfeksiyon Etkeni β -Hemolitik Streptokoklar ve Özellikleri

1.1.6.1. A grubu β -Hemolitik streptokoklar (*Streptococcus pyogenes*)

AGBHS akut farenjitin en sıklıkla rastlanan bakteriyel etkeni olup, kutanöz ve sistemik infeksiyonlardan da sıklıkla izole edilir ve yol açtığı akut romatizmal ateş (ARA) ve akut glomerulonefrit (AGN) nedeniyle tıbbi önemi büyüktür (Koneman, 1992; Forbes, 2002).

AGBHS'lar özellikle 5-15 yaş arası çocuklarda görülen bakteriyel farenjit ve tonsillitin en yaygın rastlanan etkeni olmakla birlikte, her yaş grubunda infeksiyonlara neden olabilir. İnsanların iç içe yaşama eğilimi gösterdiği ve asemptomatik farinks taşıyıcılığının arttığı kış ayları, bu infeksiyonların en sık görüldüğü mevsimdir.

1.1.6.2. B grubu β -Hemolitik streptokoklar (*Streptococcus agalactiae*)

Streptococcus agalactiae, gram pozitif diplokoklar olup, koyun kanlı agarda gri-beyaz koloniler oluşturur. Kolonileri çevreleyen hemoliz zonu oldukça dardır. Nadiren hemoliz oluşturmazlar ya da α -hemoliz yaparlar. Anaerobik ortamda oranj pigment üretimleri tipiktir. *Streptococcus agalactiae* tarafından üretilen ve ısıya dayanıklı bir protein olan Christie, Atkins, Munc-Peterson faktörü (CAMP faktörü), *Staphylococcus aureus*'un ürettiği β -lizinin koyun kanlı agarda oluşturduğu hemolize sinerjik etki yapar.

BGBHS'lar, sıklıkla farenks, gastrointestinal sistem (GİS) ve vajen florasında bulunurlar. 15-45 yaş arası kadınların vajen florasında daha sıklıkla görülürler (%5-40). Sayıları menstruasyon öncesi ve gebelik sırasında (%25-40) artar (Ruoff, 2003).

1.1.6.3. C grubu β -Hemolitik streptokoklar

CGBHS'lar esas olarak evcil hayvanların, kuşların, tavşanların patojeni olup insanlarda nadiren infeksiyon etkenidirler ve nazofarenks, deri ve genital sistemin normal florasında bulunabilirler. Bu grup içinde 4 tür yer almaktadır; *Streptococcus dysagalactiae*, *S. equisimilis*, *S. zooepidemicus*, *S. equi*. Bunlardan *S. equisimilis*, insan infeksiyonlarından en sıklıkla izole edilen türdür (Winn, 2006).

1.1.6.4. G grubu β -Hemolitik streptokoklar

GGBHS'lar, Lancefield grup G antijenlerine ilaveten, diğer streptokoklarda bulunan bazı antijenlere de (protein T, M tipleri, polisakkarit) sahiptirler ve *S. pyogenes* tarafından salgılanan streptolizin O'ya benzer bir hemolizin üretirler. Bu yüzden GGBHS ile infekte kişilerde, anti streptolizin O titresinde artış saptanır (Winn vd., 2006).

1.2. Stafilokoklar

Stafilokoklar, ilk olarak 1878'de Robert Koch tarafından tanımlanmış ve 1880'li yıllarda bu mikroorganizmaların yüzeysel süpüratif inflamasyona, septisemi ve pyemiye yol açabileceği açıklanarak patojeniteleri vurgulamış ve aynı yıl Pasteur tarafından sıvı besi yerinde üretilmiştir. *Staphylococcus* terimi Grekçe *staphyle* (üzüm salkımı) kelimesinden türetilmiştir ve bu karakteristik özelliklerinden dolayı 1882 yılında Ogston tarafından bu mikroorganizmalar "*Staphylococcus*" olarak isimlendirilmiştir (Bannerman vd., 2003).

1928 yılında Alexander Fleming tarafından Penisilinin keşfedilip 1941 yılında klinikte kullanılmaya başlanmasıyla stafilokok enfeksiyonlarının seyri değişmiştir. Fakat 1944 yılına gelindiğinde ilk kez Kirby tarafından penisilinaz üreten stafilokoklar bildirilmiş, 1960'lı yılların sonunda ise gerek hastanelerden gerek toplumdan izole edilen suşların %80'den fazlası penisiline dirençli hale gelmiştir. 1959 yılında klinik kullanıma sunulan ve penisilinaza dirençli ilk semisentetik antimikrobiyal ajan olan metisiline karşı 1961 yılında ilk dirençli *S. aureus* suşları bildirilmiştir. Bunu 1970'li yıllarda yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe (klindamisin, kloramfenikol, tetrasiklinler, makrolidler, rifampin, aminoglikozidler ve trimetoprim-sulfametoksazol) direnç gelişmesi izlemiştir. Antibiyotiklere çoklu direnç gösteren MRSA suşları 1980'lerin sonlarında ve 1990'lı yıllarda tüm dünyaya yayılmış ve hastanelerde en sık rastlanan nozokomiyal patojenler arasında yerini almıştır (Schmitz ve Jones, 1997).

Staphylococcus aureus günümüzde de en yaygın hastane enfeksiyonu nedenidir, özellikle hastane pnömonisi, cerrahi yara enfeksiyonu ve kalp damar sistemi enfeksiyonlarına neden olurlar (Panlilio vd., 1992; Waldvogel, 2000).

1.2.1. Sınıflandırma

Stafilokoklar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1986 yılındaki baskısında *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* cinsleri ile birlikte "Micrococcaceae" ailesi içinde sınıflandırılmıştır. Moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte daha sonra yapılan DNA-ribozomal RNA hibridizasyonları, 16S rRNA sekans analizleri gibi genetik çalışmalar ve kemotaksonomik analizler (hücre duvarı kompozisyonu, hücresel yağ asitleri gibi) aslında bu mikroorganizmaların birbirlerinden farklı olduklarını göstermiş ve tek bir aile içinde toplanmaması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar planokoklar ve stafilokokların *Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus* grubu üyeleri ile yakın filogenetik ilişki içinde olduklarını göstermiştir (Koneman, 1997). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin yeni baskısında stafilokoklar *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfında, *Bacillales* takımındaki *Staphylococcaceae* ailesi içinde Genus I olarak sınıflandırılmıştır (Garrity, 2000).

Günümüzde *Staphylococcus* genusunda 35 tür ve 17 alt tür saptanmıştır (Bannerman vd., 2003). Stafilokok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre en az dört grup altında toplanabilirler;

Staphylococcus epidermidis grubunda; *S.epidermidis*, *S.capitis*, *S.warneri*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* ve *S.saccharolyticus* türleri, *Staphylococcus saprophyticus* grubunda; *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri, *Staphylococcus simulans* grubunda; *S. simulans*, *S. carnosus* türleri, *Staphylococcus sciure* grubunda; *S. sciure*, *S. lentus* türleri yer almaktadır. *S. aureus*, *S.auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* herhangi bir gruba sokulamamış türlerdir. 35 tür saptanmış olmasına karşın insanlardaki stafilokok enfeksiyonlarından birinci sırada *S. aureus* izole edilmektedir. Fırsatçı patojenler olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da sıklıkla enfeksiyona sebep olurlar . Daha nadiren *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans* da fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (Waldvogel, 2000).

1.2.2. Morfoloji, Boyanma ve Biyokimyasal Özellikleri

Stafilokoklar; hareketsiz, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif, Gram pozitif koklardır. *S. aureus subs. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* dışındaki türler fakültatif anaerobdur. Bu iki tür anaerob ortamlarda ürer ve fakültatif anaerob olan diğer türlerin aksine çoğunlukla katalaz negatiftirler. Stafilokokların, sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa dayanıklılıkları fazladır. Kapsülsüzdürler ve en tipik üremeleri kanlı agardadır. Optimal üreme ısıları 30-37 °C ve pH değerleri de 7-7.5'tir. Kolonileri; yuvarlak, düzgün, kabarık, mat, S tipinde olup; *S. aureus* kökenlerinin çoğunda sarı pigment ve beta hemoliz görülür. Bu hemoliz; koyun, insan veya at kanlı agarda ortaya çıkabilir ve uzun süreli inkübasyonlarda daha belirgin hale gelir. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'un bazı kökenlerinde de sarı veya turuncu pigment ile hemoliz görülebilir. Bu organizmalar; mikroskopik olarak; tek tek, ikili, tetrat şeklinde veya kısa zincirler halinde dizilim gösterebilirler (Waldvogel, 2000).

Stafilokoklar, % 10 ve daha az NaCl içeren ortamlarda üreyebilirler. Başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit meydana getirirler. Gaz oluşturmazlar. Lizostafine duyarlı, lizozime dirençlidirler. Mannitole etkileri değişken olup özellikle *S. aureus* bu şekere etkilidir. Bu yüzden mannitol fermentasyonu bu bakteriyi diğerlerinden ayırmada kullanılan bir özelliktir. *S. saprophyticus* da novobiyosine dirençli olması ile diğer stafilokoklardan ayrılır (Hajek, 1996).

S. aureus'u diğer stafilokoklardan ayırmak için koagülaz, mannitol fermentasyonu ve deoksiribonükleaz testleri kullanılır. Bu testlerin pozitif sonuç vermesi, bakterinin *S. aureus* olduğunu gösterir.

1.2.3. Epidemiyolojisi

S. aureus'un doğal kaynağı insandır. Yenidoğan döneminde *S. aureus* kökenleri; göbek çevresi, perianal bölge, deri ve bazen de gastrointestinal sistemde kolonize olurlar. Bundan sonraki dönemde ise daha çok burunda kolonize olurlar. Sağlıklı erişkinlerde kolonizasyon oranı, % 10-20'si kalıcı olmak üzere % 30–50 arasında değişmektedir (Waldvogel vd., 2000).

Bakterinin etken olduğu hastane infeksiyonlarında en önemli kaynak, hastalar veya hastane personelinin burun taşıyıcılığıdır. *S. aureus*; başta burun olmak üzere aksiller bölge, vajen, farinks veya yaralı deri bölgelerinde infeksiyon oluşturmadan kolonize olabilir. Bu şekilde burun mukozası veya deride kolonize olan bakteri, küçük bir travma sonrası kana veya derin dokulara yayılır ve virülans faktörleri ile konak savunma mekanizmalarının etkilerine bağlı olarak ciddiyeti değişen infeksiyonlar oluşturur (CDC, 2002).

1.3. Antibiyotikler

19. yüzyılın ikinci yarısında, mikrobiyolojinin en büyük atılımını yapan, steril idrarda iyi üreyen şarbon basillerinin diğer bakterilerle kirlenmiş idrarda üreyemediklerini ve sonunda öldüklerini saptayan Pasteur ve Joubert, bu gözlemlerinin nedenlerini deneysel olarak ortaya çıkarmak istemişlerdir. Bu araştırmacılar, diğer bakterilerle kontamine idrara karıştırılan şarbon basillerinin deney hayvanlarında hastalık oluşturmadığını ortaya koymaları, enfeksiyonların antibiyotiklerle tedavisi alanındaki ilk adımları oluşturmuştur (Chambers vd., 2001).

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. 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 kullanıma giren bu antibiyotik, birçok gram pozitif ve gram negatif mikroorganizma yanında *Mycobacterium* 'lara karşı da çok etkili olmuştur. 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 gelişmelerine yol açmış, sonuçta, etkinliğini giderek yitirmiş ve daha dar alanlarda daha bilinçli olarak kullanılmaya başlanmıştır. II. Dünya Savaşı'nın sonlarına doğru streptomisin ve kloramfenikol bulunarak, günümüze kadar yüzlerce antimikrobiyal ajan literatüre kazandırılmıştır (Chambers vd., 2001).

1.3.1. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları

Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmakokinetik özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler.

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 sadece in vitro verilere dayandırılan tedavi başarısızlıkla sonuçlanabilir. Bu nedenle antimikrobiyal ilaç seçiminde etki mekanizması (farmakodinamik) ve ilacın vücuttaki hareketi (farmakokinetik) kritik önem taşımaktadır (Abdel-Rahman ve Kearns, 2004).

Bakterilerin sadece üremelerini durduranlar için “bakteriyostatik”; bakterilerin ölümüne neden olanlar için ise “bakterisidal” etkili antibiyotik terimleri kullanılmaktadır. Günümüzde mikroorganizma hücrelerini oluşturan değişik yapılar üzerinde farklı mekanizmalarla etki ederek o organizmanın üreyip çoğalmasını engelleyebilen ya da ölümüne neden olan çok sayıda gerek *statik* gerekse *sidal* etkili antimikrobiyal ilaç kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin bazıları bakteri hücre duvarının yapımını, bazıları hücre zarının yapımını ya da zarın fonksiyonlarını engelleyerek; bazıları protein sentezinin yapı taşları olan ribozomları, bazıları ise onun yeni nesiller vermesinde en önemli oluşumları olan nükleik asitlerini hedef alarak etkilerini gösterirler. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre genel olarak; hücre duvarı sentezini inhibe edenler, protein sentezini inhibe edenler, nükleik asit sentezini inhibe edenler ve hücre zarının fonksiyonunu değiştirenler olarak sınıflandırılırlar (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1: Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre sınıflandırılması.

<p>Hücre duvarı sentezini inhibe edenler</p>	<p>Beta-laktamlar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Penisilinler • Beta-laktamaz inhibitörleri • Sefalosporinler • Karbapenemler • Monobaktamlar <p>Glikopeptidler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vankomisin • Teikoplanin <p>Sikloserin</p> <p>Basitrasin</p> <p>Fosfomisin</p>
<p>Protein sentezini inhibe edenler</p>	<p>30S ribozomal alt üniteyi etkileyenler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aminoglikozitler • Tetrasiklinler <p>50S ribozomal alt üniteyi etkileyenler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kloramfenikol • Makrolidler • Linkozamidler • Fusidik asit • Puromisin
<p>Nükleik asit sentezini inhibe edenler</p>	<p>DNA sentezini inhibe edenler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sülfonamidler ve trimetoprim • Kinolonlar <p>RNA sentezini inhibe edenler</p>
<p>Hücre zarının fonksiyonunu değiştirenler</p>	<p>Polimiksinler</p> <p>Polienler</p> <p>Azoller</p>

1.3.1.1. Hücre duvarının sentezini inhibe edenler

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

Hücre duvarı bakterinin bütünlüğünü koruyan, bölünme ve çoğalmasını sağlayan kısımdır. Hücre duvarı murein denilen bir polimer bileşikden 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 yapılı 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.
 2. Pentapeptid yan zinciri oluşup NAM (N-asetil muramik asit)'a eklenmesi.
 3. Peptidoglikan zincirinin transpeptidasyon ve transglikozilasyonla oluşması.
- Vankomisin, basitrasin, sikloserin gibi antibiyotikler bu aşamaya kadarki olaylarda inhibisyon yaparak etkili olurlar. Örneğin glikopeptidler 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 oluşmaktadır. 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 peptit bağı oluşamaz ve çapraz peptit bağlar ile kafes benzeri duvar oluşumu durmuş olur. Duvar yapımında etki gösteren transpeptidaz, karboksipeptidaz ve endopeptidaz enzimleri penisilinle bağlanabildiklerinden bunlara *penisilin bağlayan proteinler* (PBP) 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).

1.3.1.2. Protein sentezini inhibe edenler

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 bakteri ribozomları ile birleşerek mRNA tarafından yönetilen protein sentezini bozarlar. Memeli hücrelerindeki ribozomlar (80S) bakterilerindekinden farklı olduğundan bunlar memeli hücrelerindeki protein sentezini bozmazlar. Bu grup ilaçlar ribozomlarda farklı etkilere neden olmaktadır. Bu etkiler;

- Aminoasitlerin aktivasyonunu yani tRNA'ya bağlanmasını inhibe etme,
- mRNA'nın ribozomlara bağlanmasını veya aminoasil-tRNA bileşiğinin ribozom mRNA kompleksine bağlanmasını inhibe etme,
- Peptidil transferaz etkinliğini azaltarak peptid bağları oluşumunu inhibe etme,
- mRNA üzerindeki kodonların, tRNA'lar tarafından yanlış okunmasına neden olma

şeklinde sıralanabilir (Lina G vd., 1999).

1.3.1.3. Nükleik asit sentezini inhibe edenler

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 sentezi altında yapılan 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).

1.3.1.4. Hücre zarının fonksiyonunu değiştirenler

Sitoplazma zarı mikroorganizma için gerekli maddelerin dış ortamdan difüzyon veya aktif transportla alındığı osmotik bir engeldir. Buraya etkili antibiyotikler sitoplazma zarının geçirgenliğini artırıp 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).

1.3.2. Antibiyotik Direnci

Tarih boyunca, insanlar ve mikroorganizmalar arasında bir savaş süregelmiştir. Çağlar boyunca veba, sıtma, tüberküloz ve son olarak HIV (Human Immunodeficiency Virus) virüsü milyonlarca insanın hastalanmasına ve ölmesine neden olmuştur. 1928’lerde penisilin 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. Antibiyotik direnci ilk kez, bu ilaçların en çok kullanıldığı yerler olan hastanelerde saptanmıştır. Sülfonamid dirençli *Streptococcus pyogenes* 1930’larda bir askeri hastanede ortaya çıkmıştır. Penisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, 1940’larda başlayan penisilin kullanımından kısa bir süre sonra Londra hastanelerinden bildirilmiştir. Benzer şekilde, streptomisin kullanımından çok kısa bir süre sonra *Mycobacterium tuberculosis* bu ilaca karşı direnç geliştirmiştir. Birden çok ilaca karşı ilaç gelişimi geç 1950’ler ve erken 1960’larda enterik bakteriler arasında (*Escherichia coli*, *Shigella* ve *Salmonella*) ortaya çıkmıştır. Bu suşlar, özellikle gelişmekte olan ülkelerde klinik sorunlar yaratmış ve tedavi maliyetlerini artırmışlardır. Giderek artan antibiyotik kullanımına bağlı olarak direnç sıklığı hızla artış göstermiş, antibiyotiklerin kontrolsüz kullanılması bu durumu sürüklemiştir (Tenover, 2006)

Mikroorganizmaların antimikrobiklere karşı gösterdiği “direnç doğal (intrinsik)” ve “kazanılmış (genotipik, kalıtsal) direnç” diye iki ana bölümde ele alınabilir. Doğal direncin temelinde mikroorganizmaların metabolik olarak inaktif fazda bulunması veya ilacın etki mekanizmasına uygun hedef yapıların bulunmaması vardır. Kazanılmış antibiyotik direnci ya mikroorganizma kromozomunda oluşan mutasyonlarla ya da transpozan, plazmid veya integron aracılığıyla direnç geninin duyarlı mikroorganizmalara aktarılması ile ortaya çıkmaktadır. Antimikrobiklere karşı gelişen direnç esas olarak bu yolla olmakta ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli kökenler ortaya çıkıp yayılmaktadır.

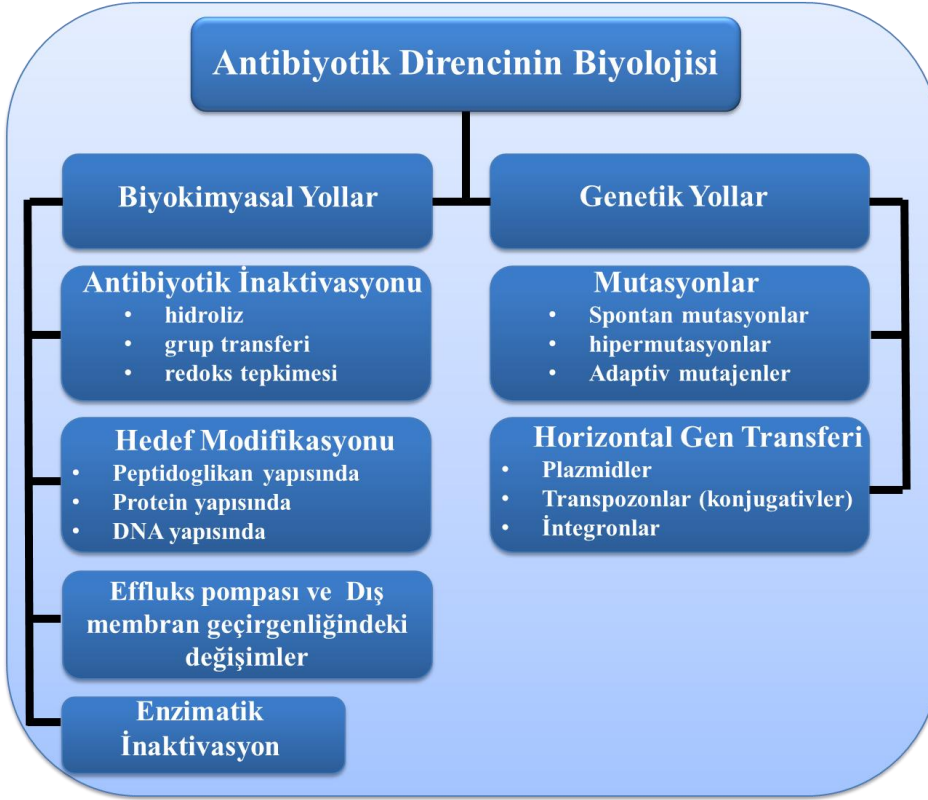
Normal dozda antimikrobiyal ajan verilmesine rağmen mikroorganizmanın ölmemesi ya da üremesinin baskılanamaması durumuna ‘antibiyotiklere direnç gelişimi’, bu bakteriye de ‘dirençli bakteri’ denir. Bakteriyel direncin günlük yaşamda sorun olmasının birçok nedeni vardır. Öncelikle, dirençli bakteriler arasında yer alan stafilokoklar, enterokoklar, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas* türleri hastanelerde yaygın enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Edmond vd., 1999). Bakteriyel direnç, tedavi başarısızlıklarıyla özellikle kritik yoğun bakım hastalarında daha pahalı antibiyotik kullanımlarını gerektirmekte, hastanede yatış süresinin uzaması, morbidite ve mortalitede artış ile sonuçlanabilmektedir. 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).

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).

1.3.3. Antibiyotiklere Direnç Gelişim Mekanizmaları

Geçtiğimiz yıllarda ve günümüzde direnç mekanizmasının anlaşılması biyokimyasal özellikli bir konu halinde ‘bakterilerde ilaca direnç nasıl gelişmektedir?’ sorusuna cevaplar aramaktadır. Bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizması biyokimyasal ve genetik yollarla olmaktadır. Çizelge 1.2 ’de antibiyotik direnç mekanizmasının biyokimyasal ve genetik yolları özetlenmiştir (Dzidik vd., 2008).

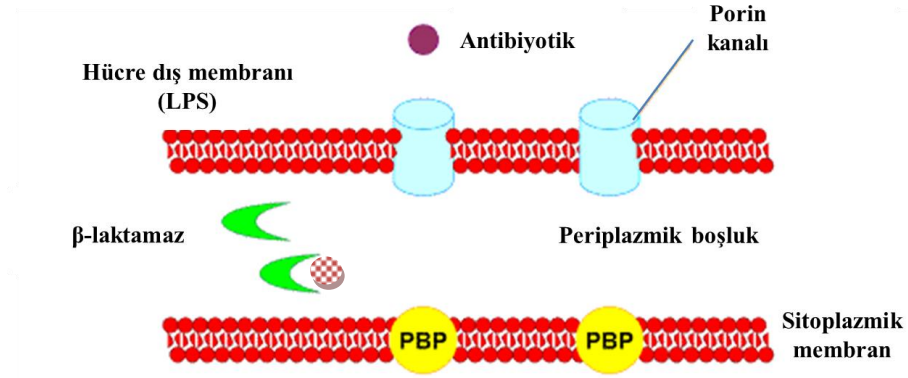
Çizelge 1.2: Antibiyotik direncinin biyokimyasal ve genetik yolları.



Bir mikroorganizmanın antibiyotiğin öldürücü (bakterisid) veya çoğalmasını önleyici (bakteriyostatik) etkisinden korunabilme kapasitesi “direnç” olarak tanımlanabilir. Bakterilerde antibiyotik direncinin oluşumunda birkaç mekanizma söz konusudur:

Antibiyotiği inaktive eden enzimler yoluyla: Çoğu antibiyotikler hidrolitik kimyasal bağlara duyarlıdır (örneğin esterler ve amidler). Bazı enzimler bu bağların koparılmasıyla antibiyotiklerin aktivitelerini kaybetmelerine neden olurlar. Bu enzimler bakteriler tarafından üretilir ve bakteri içerisinde antibiyotik zenginleşmeden inaktif hale getirilir. Klasik hidrolitik amidazlar penislinin β -laktam halkasını kıran β -laktamazlar ve sefalosporinlerdir. Çoğu Gram negatif ve pozitif bakterilerde bu enzimler üretilir ve şimdiye kadar 200’den fazla β -laktamaz tanımlanmıştır (Dzidik vd., 2008).

Gram pozitif bakterilerin β -laktamazları ekzoenzimlerdir ve antibiyotikleri dış ortamda hidrolize ederler. Gram negatif β -laktamazları ise periplazmik bölgede etkin olmaktadır. Porlardan geçen antibiyotiği inaktive ederek etki gösterirler (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu.

Kromozomal β -laktamazlar konstitütif (yapısal) enzimlerdir. Penisilinaz, sefalosporinaz ve geniş spektrumlu β -laktamazlar bu grup enzimlerdir. Ortamda β -laktam bulunmadığında da sentezlenmektedirler.

Hedef Modifikasyonu: Hedefin modifikasyonu ile antibiyotiğe duyarlılığın değişimi olarak ifade edilebilir. Antibakteriyel ajanın hücrede bağlandığı hedef proteinin yapısı veya protein dışındaki yapılar değişebilmektedir (pnömokoklarda penisilin-bağlayıcı protein 2b değişikliği sonucu gelişen penisilin direnci). 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).

Effluks Pompası ve Dış Membran Geçirgenliğindeki Değişim: Bakterinin dış membranında bulunan ve antibiyotiklerin 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). 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 birbirlerine 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).

Enzim İnaktivasyonu: Bu mekanizma β -laktam antibiyotikler, aminoglikozidler, kloramfenikol ve makrolidlerde önemlidir. Beta-laktamazlar en önemli enzim grubunu oluşturmaktadır. Ayrıca aminoglikozidleri modifiye eden enzimler (asetilasyon, adenilasyon fosforilasyon), 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 beta-laktamaz olan penisilinaz sentezleyen stafilokoklar tüm dünyaya yayılmıştır. 1960'lı yıllardan sonra ise sefalosporinlerin keşfi ile Gram negatif basillerde bulunan sefalosporinazlar 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).

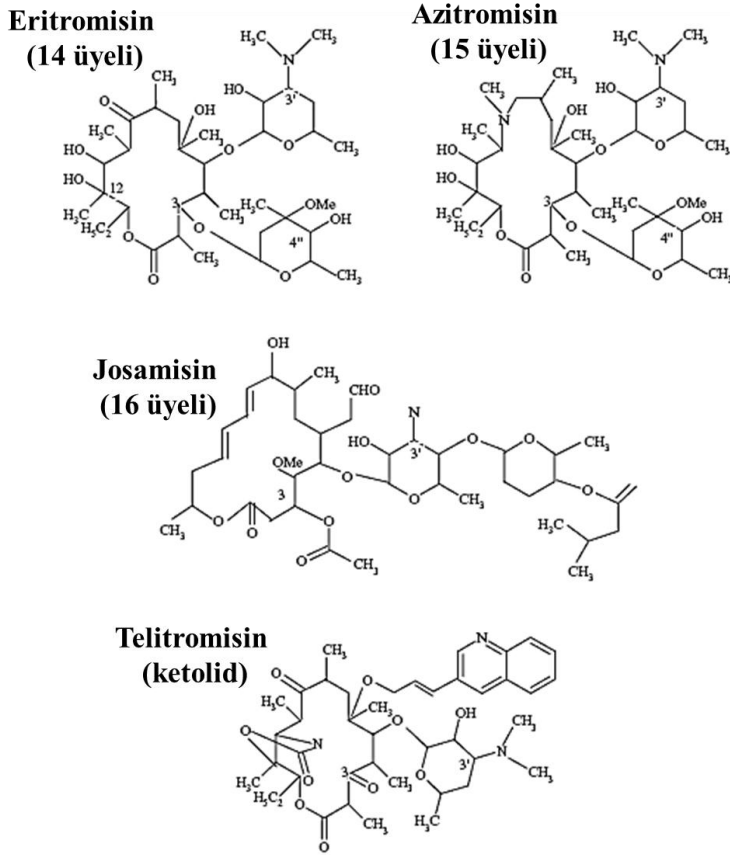
1.4. MLS Grubu Antibiyotikler; Makrolidler, Linkozamidler, Streptograminler

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.

Makrolidler, linkozamidler ve streptograminler (streptogramin B) ribozama bağlanarak bakteri çoğalmasını inhibe eden önemli ilaç gruplarıdır. MLS_B grubu antibiyotikler özellikle gram pozitif bakteriler üzerine etkilidirler. Gram negatif basiller dış membranın hidrofobik bileşikler geçirmemesi nedeniyle ribozomları bu antibiyotiklere hassas olmasına rağmen MLS grubu antibiyotiklere doğal olarak dirençlidir.

1.4.1. Makrolidler

Eritromisin, eritromisin A, B ve C olarak üç antibiyotiğin bir karışımı halinde Filipinlerden izole edilen ve *Streptomyces erytreus* tarafından üretilen doğal bir antibiyotiktir. Yapıları benzer bu antibiyotiklerden eritromisin A, 1952 yılında *Lilly Research Laboratories* tarafından saflaştırılmış ve “Ilotycin” adıyla terapötik ilaç olarak kullanılmıştır. Aynı yıllarda Haight ve Finland, pnömokoklar, enterokoklar ve stafilokoklarda, *multistep selection* ile in vitro olarak, *Staphylococcus aureus* infeksiyonunun tedavisinde ise in vivo eritromisine direnç gelişimini bildirmişlerdir. Eritromisine dirençli suşlar ayrıca karbomisin, spiramisin, oleandomisin ve streptogramine de dirençli olarak bulunmuştur (Bozdoğan, 2004). Şekil 1.2.’de 14 üyeli makrolidlerden eritromisin, klaritromisin, 15 üyeli makrolid azitromisin ve bir ketolid olan telitromisinin yer almaktadır.



Şekil 1.2: Makrolid ve ketolidlerin moleküler yapıları.

Yapı ve etki mekanizmaları: Makrolidler iki veya daha fazla amino ya da 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 (Çizelge 1.3). Tüm makrolidler bakterilerde RNA bağımlı protein sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe ederek bakteriyostatik etki ederler. Bu etkinliklerini 70S ribozomun 50S sub-ünitesine bağlanarak aynı yere t-RNA molekülünün bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını önleyerek sağlarlar.

Çizelge 1.3: Makrolidlerin sınıflandırılması

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

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.

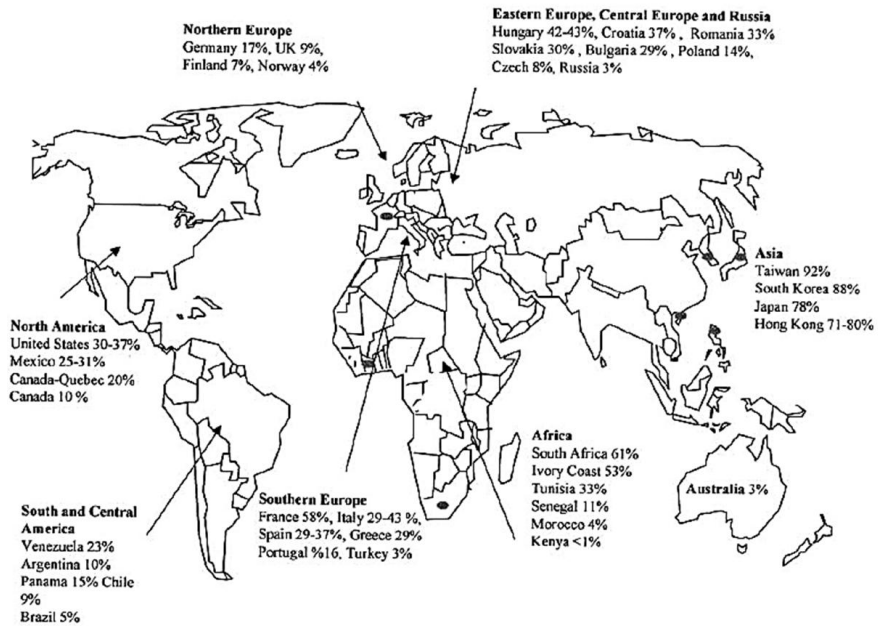
Global değerlendirme çalışmaları streptokoklar arasında direnç oranlarında artış olduğunu göstermektedir. Antibiyotik kullanımı, makrolidler gibi antibiyotikler ile diğerlerinin çoklu ilaç dirençli suşlarda daha güçlülerin seçimiyle patojenik bakteriler arasında antibiyotik direnciyle korole olduğu görülmektedir.

Makrolidlerin kullanımıyla, makrolid direncindeki artma da paralel olarak dünyada ortaya çıkmaktadır.

Uzak doğu ülkelerinde makrolid direncinin dağılımı oldukça yüksektir. Bununla birlikte, birbirlerinden önemli ölçüde farklı olan komşu ülkelerde, diğer faktörlerle birlikte, makrolid kullanımıyla direnç gelişimide farklı oranlarda gelişebilmektedir. Örneğin, makrolid direnci birbirlerine omşu olan Birleşik

Devletler 'de %36 'iken Kanada'da %10; Slovakya'da %30 'iken Çek Cumhuriyeti'nde %8; Yunanistan'da %29 'ken Türkiye'de %2, Fransa'da %58 'ken Almanya'da %17 olarak belirlenmiştir.

Şekil 1.3 'de gösterildiği gibi, streptokoklarda makrolid direnç oranları, Asya'da, Güney Avrupada, Batı Avrupa'nın bazı ülkelerinde ve Birleşik Devletler'de oldukça yüksekken, Kuzey Avrupa, Rusya, Güney Amerika'da ve Avustralya'da oldukça düşüktür (Bozdoğan ve Appelbaum, 2004).

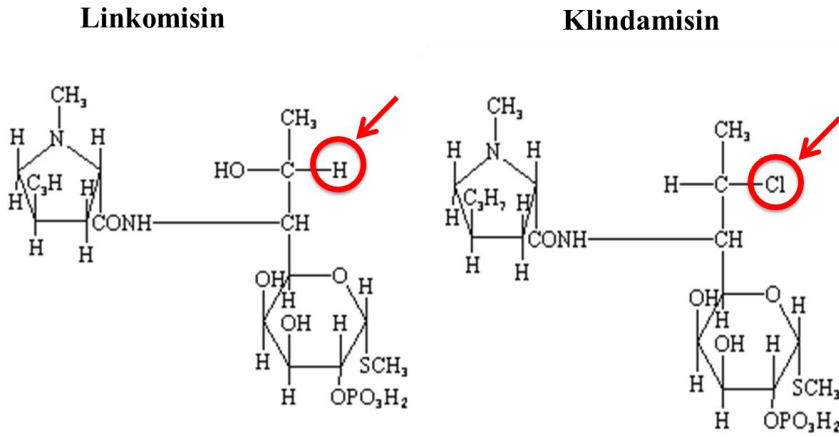


Şekil 1.3: *Streptococcus pneumoniae* 'deki makrolid direncinin dünyadaki dağılımı.

Streptokoklardaki ana makrolid direnç mekanizması bir *mef* geni ile kodlanan efluks mekanizması veya *erm* genleri ile ribozomal metilasyona bağlı makrolid hedefindeki modifikasyon ile bazende ribozomal proteinlerdeki (L4-L22) veya 23S rRNA 'daki mutasyonlarla ilişkilidir.

1.4.2. Linkozamidler

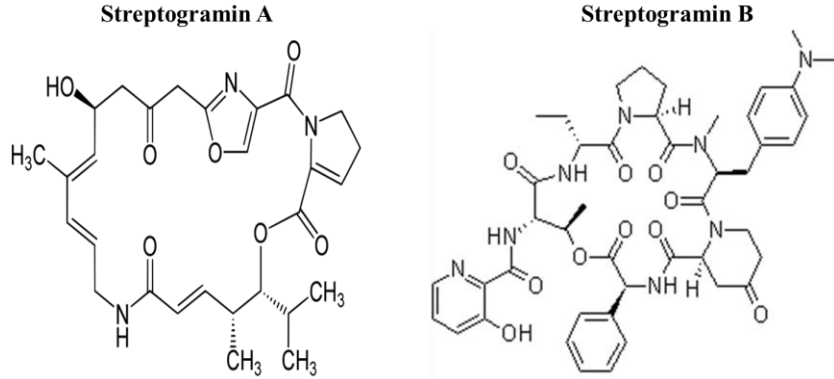
İlk olarak 40 yıl kadar önce kullanıma giren linkozamidlerin ilk iki üyesi linkomisin ve klindamisinidir. Gram pozitif mikroorganizmalar ve anaerob mikroorganizmalara etkin olan bu ilaçlar bazı mikoplazma ve protozoonlara karşı da etkilidirler. Linkozamidler antibakteriyel spektrum ve etki mekanizması 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 1.4).



Şekil 1.4: Linkomisin ve klindamisinin moleküler yapıları (Kaynak: <http://www.bmb.leeds.ac.uk/mbiology/ug/ugteach/icu8/antibiotics/protein.html>)

1.4.3. Streptograminler

Doğal olarak *Streptomyces spp.* 'den sentezlenen streptograminler MLS ailesine dahil yarı-sentetik antibiyotiklerdir. Yapısal olarak birbirleriyle ilişkisiz iki grup molekülden oluştuğu için diğer antibiyotikler arasında özel bir yerleri vardır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5: Streptogramin A ve B'nin moleküler yapıları (Kaynak: <http://en.wikipedia.org/wiki/Streptogramin>)

S. aureus ve KNS (koagülaz negatif stafilokoklar)'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).

1.4.4. Makrolid-Linkozamid-Streptogramin Direnci

Makrolidlerin ribozama bağlanması sentezlenen peptidin stabilizasyonunu bozar ve oluşan peptidin protein sentezi daha tamamlanmadan önce serbest bırakılmasına neden olur. 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 gelişmektedir:

- i) Hedef bölge değişikliği (ribozamal metilasyon, mutasyon),
- ii) Eflüks pompası (Antibiyotiğin aktif olarak dışarı pompalanması)
- iii) Antibiyotiğin inaktive edilmesi

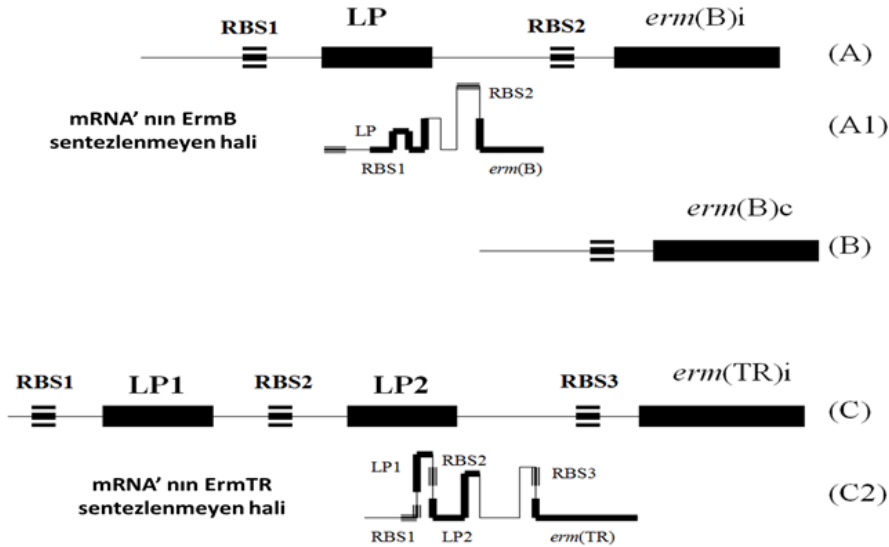
En yaygın direnç mekanizması ise *erm* genleriyle kodlanan metilazlar aracılığı ile oluşur. Makrolidlerde karşı ana direnç mekanizması RNA metilazların varlığıdır. Bu metilazlar 23S ribozomal RNA' nın 2058 nolu adenin bazını metillerler. Ribozomda oluşan bu metilasyon makrolid, linkozamid ve streptogramin B grubu antibiyotikler arasında çapraz dirence sebep olurlar. Bu dirence MLS_B direnci adı verilir. Bu direncin nedeni ise metilasyon sonucu MLS_B grubu antimikrobialerin ribozoma bağlanmasının inhibe edilmesidir. Çizelge 1.4.'de MLS_B direncinin mekanizması yer almaktadır.

Çizelge 1.4: MLS direncinin mekanizması (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>)

rRNA metilaz (32)	Effluks (16)	İnaktivasyon Enzimleri (19)			
		Esteraz (2)	Lizis (2)	Transferaz (11)	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), (33), (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)

Her sene tanımlanan metilazlara yenileri eklenmektedir. Başlangıçta harflerle tanımlanan bu metilazlar alfabedeki harflerin bitmesi nedeni ile son zamanlarda rakamlarla isimlendirilmektedir. Bugüne kadar 41 adet metilaz belirlenmiştir (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>).

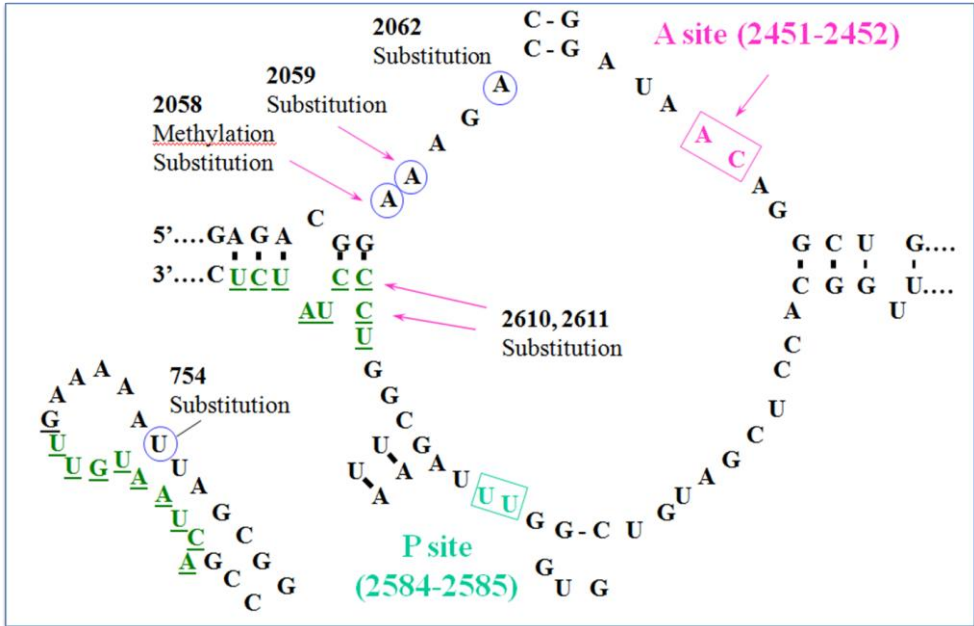
ermA ve *ermC* genleri en çok stafilokoklarda, *ermB* geni enterokoklarda ve streptokoklarda görülmektedir. *ermTR* geni ise *Streptococcus pyogenes* suşunda ilk kez tanımlanmış olup bu türdeki en yaygın metilaz grubunu oluşturmaktadır. Erm metilazının sentezi ortamda makrolidlerin bulunmasıyla indüklenebilir. Genellikle 14 ve 15 üyeli makrolidler, 16 üyeli makrolidlere göre direnci daha çok indüklerler. Stafilokoklarda linkozamidler direnci indüklemeyiz. Direncin indüklenmesi protein sentez aşamasında yani translasyon aşamasında gerçekleşir. Eritromisin bağlanmasıyla mRNA 'da konformasyonel değişiklikler oluşur ve daha önce ikincil RNA yapısında ribozomun ulaşamadığı RBS (ribosome binding side) artık ribozomun bağlanabileceği hale gelir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6: Regulator bölgeler. Bu şekilde, *ermB* geninin indüklenebilir ve konstitütif regulator bölgeleriyle *ermTR* 'nin indüklenebilir regülâtör bölgesi gösterilmiştir (Bozdoğan ve Appelbaum, 2004).

1.4.4.1. Antibiyotiğin hedefinde değişiklik olması (23S rRNA metilasyonu ve mutasyona bağlı direnç):

Makrolidlere en yaygın direnç tipi 23S rRNA'nın V nolu bölgesinde bulunan 2058. pozisyonundaki adenine bir metil grubunun di-metilasyon yada mono-metilasyon yoluyla eklenmesi sonucu gelişir. Metilasyona bağlı olarak 23S rRNA yapısı değişir (Şekil 1.7). 23S rRNA'nın V nolu bölgesi peptidil transferaz merkezinin (PTC) yapısını oluşturur. PTC, P bölgesine bağlanmış olan tRNA'nın taşıdığı peptidin, A bölgesine bağlanan tRNA'nın taşıdığı yeni amino aside translokasyonla aktarıldığı yerdir. Metilazlar *erm* genleri (*erythromycin resistance methylase*) ile kodlanırlar.



Şekil 1.7: 23S rRNA' da peptidil transferaz merkezinin (PTC) yapısı. Dirence neden olan mutasyon (substitüsyon) noktaları yuvarlak içine alınmıştır. II ve V nolu bölgelerin birbirleriyle ilişkide olduğu bazlar altı çizilerek gösterilmiştir. Aminoasid ve peptid taşıyan transfer RNA'ların peptidil transferaz merkezinde bağlandığı A (aminoasil) ve P (peptidil) bölgeleri altı çizilerek gösterilmiştir.

V. bölgedeki 2058, 2059, 2610, 2611 nolu bazlardaki nokta mutasyonları ve 2058 nolu bazın metilasyonu makrolid direnci oluşmasına neden olur. 2062 nolu bazın mutasyonu 16 atomlu makrolidlere ve 2. bölgedeki 754 nolu bazın değişmesi ise makrolid ve ketolidlere direnç gelişmesine neden olur (Bozdoğan ve Appelbaum, 2004).

Ribozomal metilasyon makrolidler yanında linkozamid ve streptogramin B grubu ilaçlara da direnç gelişmesine neden olur bu nedenle bu direnç fenotipine 'MLS_B fenotipi' denir. MLS_B grubu olarak adlandırılan bu antibiyotiklerin ribozom üzerindeki bağlanma yerlerinin yakın olması çapraz direncin nedeni olarak bildirilmiştir. Metilazların A2058 bazını metillemesiyle ribozomda konformasyonel değişiklikler oluşur ve bu antibiyotiklerin ribozoma bağlanması engellenir.

Erm genlerinin ifadesi konstitütif veya indüklenabilir olabilir. Eritromisin direncinin indüklenebilirliği ilk olarak Weisblum ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Weisblum 1995). Eğer direnç konstitütif ise Erm metilazı sürekli sentezlenir ve suş makrolid, linkozamid ve streptogramin B antibiyotiklerine dirençli olur. İndüklenabilir direnç olduğunda ise suş linkozamid ve 16 üyeli makrolidlere hassas fakat eritromisin, klaritromisin ve azitromisinin dahil olduğu 14- ve 15- üyeli makrolidlere ise dirençli olurlar.

Antibiyotiklerin indüklenme özellikleri bakteriden bakteriye değişebilir. Örneğin 14 ve 15 üyeli makrolidler stafilokoklarda iyi indükleyicidirler. Streptokoklarda ise *ermB* geninin ifadesi eritromisin ve azitromisin yanında linkozomidlerde de indüklenebilirler. Şekil 1.4'de görüldüğü gibi, antibiyotiklerin indüklenme özelliği, antibiyotiklerin yapısı, genlerin regülatör bölgesi gibi farklı faktörlere bağlı olarak değişebilir. İndüklenabilir *ermC* geninin mRNA'sında lider peptid ve birbirleriyle eşleşen ve hairpin oluşturabilen segmentler bulunmaktadır.

Regülatör bölge olarak adlandırılan bu bölgede 19 aminoasidlik peptid (lider peptid) kodlayan ORF mevcuttur. İndüksiyon olmadığında *erm* genini ribozoma bağlayan bölgesi (RBS) hairpin içinde kaldığında ribozom mRNA'ya bağlanamaz ve Erm proteininin sentezi gerçekleşemez (Bozdoğan ve Appelbaum, 2004).

Erm metilazları genellikle yüksek düzeyde direnç sağlamalarına karşı ErmTR 'nin sağladığı MİK düzeyi düşüktür. Eritromisin ile indüklendikten sonra bile makrolid direnç düzeyi yükselmez. Oysa *erm(A)*, *erm(B)* ve *erm(C)* ile indüksiyondan sonra yüksek düzey direnç gelişir. *ermTR* ile ise eritromisin ile indüksiyondan sonra makrolidlere direncin artmadığı fakat klindamisine direncin arttığı gözlemlenmiştir (Syrogiannopoulos, 2003).

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 amino asit 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, 1995; Roberts vd., 1999). *erm(A)* ve *erm(C)* tipik olarak stafilokok gen sınıflarıdır. *erm(B)* ve *erm(TR)* genleri daha çok streptokok ve enterekoklarda ve *erm(F)* genleri *Bacteroides* türleri ve diğer anaerobik bakterilerde yaygındır (Roberts vd., 1999).

Çizelge 1.5: 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)	pAMβ-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	X82819
			<i>erm</i> (2)	pBT233,pMD101	X64695
<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	X82665-68
			<i>erm</i> (C)	pSES5	Y09001
			<i>erm</i> (C)	pSES4	Y09002
			<i>erm</i> (IM)	pIM13	M13761
			<i>erm</i> (M)	pNE131	M12730
			<i>erm</i> (M)	pPV141	U82607
			<i>erm</i> (M)	pPV42	AF019140

Tablo 1.5: rRNA metilaz genleri (Devam)

Sınıf	Protein	Gen	Gen İçeriği		Plazmid,	Gen
	Adı	Adı	% DNA	Homolojisi	Transpozon	Bankası
D	Erm(D)	<i>erm(D)</i>	<i>erm(D)</i>	97%99%	pBD90 pBA423	M29832 L08389 M77505
E	Erm(E)	<i>erm(E)</i>	<i>erm(E)</i>	99%	pUC31, pIJ43	X51891 M11200
F	Erm(F)	<i>erm(F)</i>	<i>erm(F)</i>	98%100%	pBF4	M14730
		<i>erm(F)</i>			Tn4351	M17124
		<i>erm(FS)</i>			pBI106,Tn4551	M17808
		<i>erm(FU)</i>			Kromozomal	M62487
G	Erm(G)	<i>erm(G)</i>	<i>Erm(G)</i>	99%	pBD370	M15332
		<i>erm(G)</i>			Tn7853	L42817
H	Erm(H)	<i>erm(H)</i>	<i>car(B)</i>		pOJ159	M16503
I	Erm(I)	<i>erm(I)</i>	<i>mdm(A)</i>			ND
N	Erm(N)	<i>erm(N)</i>	<i>tlr(D)</i>			X97721
O	Erm(O)	<i>erm(O)</i>	<i>lrm</i>	84%	pLST391	M74717
			<i>srm(A)</i>			AJ223970
Q	Erm(Q)	<i>erm(Q)</i>	<i>erm(Q)</i>		Kromozomal	L22689
R	Erm(R)	<i>erm(R)</i>	<i>erm(R)</i>			M11276,
S	Erm(S)	<i>erm(S)</i>	<i>erm(SF)</i>	100%	pET23	M19269
			<i>tlr(A)</i>			P45439
T	Erm(T)	<i>erm(T)</i>	<i>erm(GT)</i>	85%-99%	pGT633	M64090
			<i>erm(LF)</i>		pLME300	AJ488494
U	Erm(U)	<i>erm(U)</i>	<i>lmr(B)</i>		pPZ303	
V	Erm(V)	<i>erm(V)</i>	<i>erm(SV)</i>			U59450
W	Erm(W)	<i>erm(W)</i>	<i>myr(B)</i>			
X	Erm(X)	<i>erm(X)</i>	<i>erm(CD),erm(A)</i>	%99	pNG2	M36726
			<i>erm(Y)</i>		Tn5432	U21300
					pAP2	NC005206
Y	Erm(Y)	<i>erm(Y)</i>	<i>erm(GM)</i>		pMS97	AB014481
Z	Erm(Z)	<i>erm(Z)</i>	<i>srm(D)</i>			ND

Tablo 1.5: rRNA metilaz genleri (Devam)

Sınıf	Protein Adı	Gen Adı	Gen İçeriği % DNA Homolojisi	Plazmid, Transpozon	Gen Bankası
30	Erm(30)	<i>erm(30)</i>	<i>pikR1</i>	Kromozomal	AF079138
31	Erm(31)	<i>erm(31)</i>	<i>pikR2</i>	Kromozomal	AF079138
32	Erm(32)	<i>erm(32)</i>	<i>tlr(B)</i>	Kromozomal	AJ009971
33	Erm(33)	<i>erm(33)</i>			AJ313523
34	Erm(34)	<i>erm(34)</i>			AY234334
35	Erm(35)	<i>erm(35)</i>			AF319779
36	Erm(36)	<i>erm(36)</i>	<i>erm(MT)</i>		AF462611
37	Erm(37)	<i>erm(37)</i>		Kromozomal	Z74025
38	Erm(38)	<i>erm(38)</i>		Kromozomal	AY154657
39	Erm(39)	<i>erm(39)</i>		Kromozomal	AY487229
40	Erm(40)	<i>erm(40)</i>		Kromozomal	AY570506
41	Erm(41)	<i>erm(41)</i>		Kromozomal	EU177504

1.4.4.2. MLS_B direnç ekspresyonunda farklılıklar.

MLS_B 'nin ekspresyonu yapısal veya indüklenabilir olabilir. 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 translasyon zayıflaması modeline göre ve ayrıca muhtemel *erm(A)* ve *erm(B)* faktörlerinin durumuna göre, indüksiyon transkripsiyondan sonra oluşmaktadır (Weisblum vd., 1995).

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.

1.4.4.3. Stafilokoklarda MLS_B direnci

Stafilokoklarda *erm(A)* ve *erm(C)* faktörleri predominanttır (Lina vd., 1999). *erm(A)* genleri daha çok metisiline dirençli suşlarda yaygındır ve transpozonlarla karşılanmaktadır, oysa eritromisin direncinden sorumlu olan *erm(C)* genleri daha çok metisiline duyarlı suşlarda yaygındır ve plazmidlerle karşılanmaktadır. 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.

1.4.4.4. Streptokok ve enterekoklarda MLS_B direnci

erm(B) sınıfına ait genlerin yaygınlığı ve *erm(TR)*, streptokok ve enterekoklarda ribozomal metilasyonla oluşan dirençlerin büyük çoğunluğunun nedenidir. İndüklenebilir 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. pneumoniae* 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., 1999). Yapısal fenotip vakalarında benzer şekilde makrolid ve linkozamid kullanılamamaktadır. *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 ve tek bir *S. pnömoni* suşunda bulunmuştur (Kataja vd., 1999; Syrogiannopoulos vd., 2001). Genin mevcut olmasıyla indüklenebilir eritromisin direnci düşük MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) 1–8 mg/mL ve yüksek MİK 11-28 mg/mL 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.

1.4.4.5. Aktif effluks pompası

Gram negatif bakterilerde, makrolidler gibi, kromozomlarla kodlanan pompalar hidrofobik bileşiklere karşı intirinsik dirence katkıda bulunmaktadır. Gram pozitif organizmalarda, makrolid rezistansı 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 (Ross vd., 1990). *msr(A)* direnci orjinal olarak *Staphylococcus epidermidis* 'de 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.

Effluks sisteminin multikomponent yapıda olup, 14-15 halkalı makrolidlere ve tip B streptograminlere spesifik effluks pompalarının oluşumu *msr(A)* ve kromozomal genlerle olmaktadır (Ross vd., 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 antimikrobilyallere 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 koagülaz 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., 2000).

MefA 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, MİK 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 vd., 2000). *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* veya *S. agalactiae* suşlarında *erm(B)* ve *mef(A)* gen kombinasyonları bulunmuştur. Bu suşlar MLS_B fenotipe sahiptir (McGee vd., 2001). Çizelge 1.6'da effluks ve inaktivasyon genleri görülmektedir.

Çizelge 1.6: Efluks ve inaktivasyon genleri (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>)

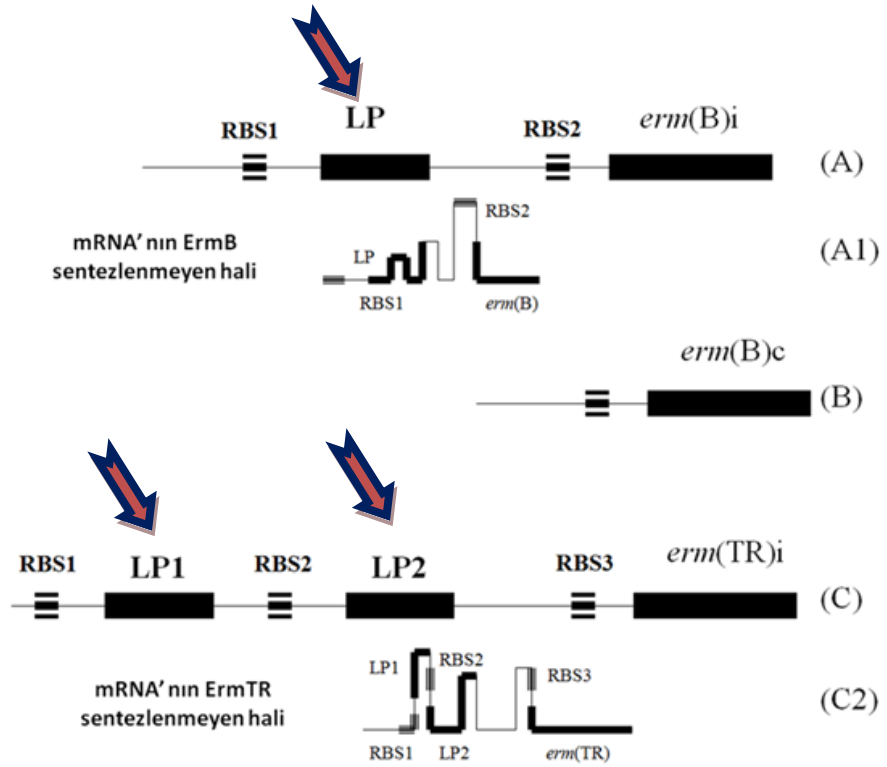
Direnç Profili	Protein adı	Gen adı	Gen İçeriği % DNA Homolojisi	Plazmid/ transpozon	Gen Bankası
ATP Bağlayıcılar					
Linkomisin	Car(A)	<i>car(A)</i>	<i>car(A)</i>	pOJ158	M80346
Eritromisin	Msr(A)	<i>msr(A)</i>	<i>msr(A)</i> %98-100	pUL5054	X52085
Streptogramin B	Msr(C)	<i>msr(C)</i>	<i>msr(SA)</i>	pEP2104	AB013298 M81802 AY004350
			<i>msr(SA')</i>	pMS97	
			<i>msr(B)</i>	Kromozomal	
	Msr(D)a	<i>msr(D)</i>	Mel %98-100	Tn1207.2	AF313494 AJ243209 AF227521 SA318993, AF274302
				orf5	Tn1207.1
Linkomisin	Lsa(A)	<i>lsa</i>	<i>lsa(A)</i>	Kromozomal	AY4225127
	Lsa(B)	orf3	<i>lsa(B)</i>	pSCFS1	AJ579365
Oleandomycin	Ole(B)	<i>ole(B)</i>	<i>ole(B)</i>	pALOR26E	L36601
	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
	Vga(A)LC	<i>vga(A)LC</i>	<i>vga</i>		DQ823382
	Vga(B)	<i>vga(B)</i>	<i>vga(B)</i>	pIP1633	U82085
	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>		AY064721-22		
	<i>mef(E)</i>	pAT15-5	U83667		
	<i>mef(E)</i>	Kromozomal	AF274302		
			<i>mef(B)</i>	pP286	FJ196385

Tablo 1.6: Effluks ve inaktivasyon genleri (devamı)

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	pl1100,pAT63	M11277
	Ere(B)	<i>ere(A)</i>	<i>ere(B)</i> %99	pLQ1723 pIP1527 pAT72	AF099140 A15097 X03988
Liyazlar					
Streptogramin B	Vgb(A)	<i>vgb(A)</i>	<i>vgb(A)</i>	pIP524	M20129
	Vgb(B)	<i>vgb(B)</i>	<i>vgb(B)</i>	pIP1714	AF015628
Linkomisin	Lnu(A)	<i>lnu(A)</i>	<i>lin(A)</i> <i>lin(A)</i>	pIP856 pIP855	M14039
	Lnu(B)	<i>lnu(B)</i>	<i>lin(B)</i>	pVM25	AJ238249
	Lnu(C)	<i>lnu(C)</i>		MtnLNU	AY928180
	Lnu(D)	<i>lnu(D)</i>			EF452177
	Lnu(F)	<i>lnu(F)</i>			AJ561197
	Lnu(G)	<i>lnu(G)</i>			DQ836009
	Streptogramin A	Vat(A)	<i>vat(A)</i>	<i>vat(A)</i>	pIP680
Vat(B)		<i>vat(B)</i>	<i>vat(B)</i>	pIP52	U19459
Vat(C)		<i>vat(C)</i>	<i>vat(C)</i>	pIP1714	AF015628
Vat(D)		<i>vat(D)</i>	<i>sat(A)</i>	pAT15	L12033
Vat(E)		<i>vat(E)</i>	<i>sat(G)</i>		AF139725
		<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
	<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
	Mph(B)	<i>mph(B)</i>	<i>mph(B)</i>	pTZ3714	D85892
	Mph(C)	<i>mph(C)</i>	<i>mph(BM)</i> <i>mph(C)</i>	pMS97 pSR1	AB013298 AF167161
	Mph(D)	<i>mph(D)</i>	<i>mph(D)</i>		AB048591

1.4.5. *erm*(TR) Metilazı

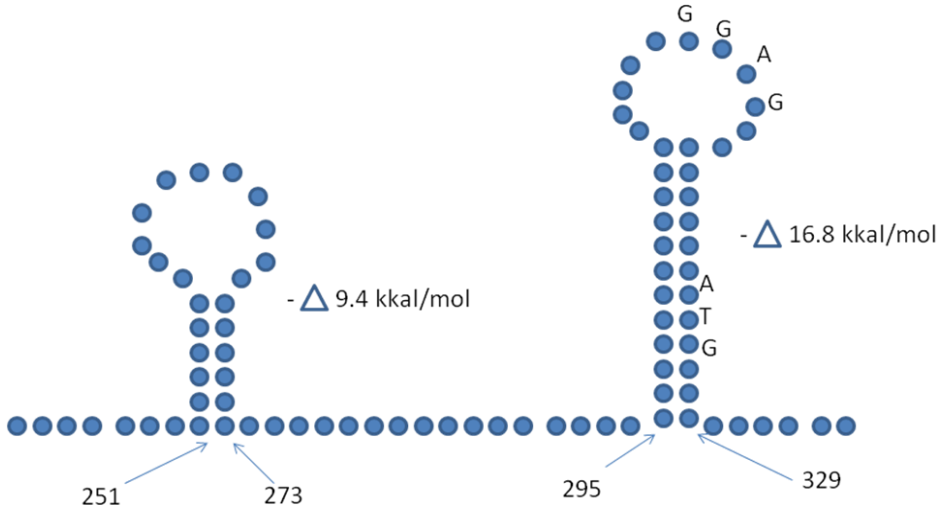
ermTR geni ilk olarak *S. pyogenes* türünde bulunmuştur. *ermTR* geni dejenere primerler kullanılarak çoğaltılmış ve sekans analizi yapılmıştır. Gen bankasıyla karşılaştırıldığında en yakın homoloji *ermA* (82.5%) ile bulunmuştur. Yazarlar da PCR ile çoğalttıkları bu genin bir metilaz olduğu ve makrolidlere direnç sağladığı çıkarımını yapmışlardır (Seppala vd., 1998). *ermTR* geni mRNA'sında *ermA* genine benzer şekilde metilaz geni öncesinde kodlayan 2 bölge (ORF) bulunmaktadır. Bu genlerin 15 ve 19-amino asid içeren lider peptidleri kodladığı varsayılmaktadır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8: *erm* genlerine ait lider peptidler. Lider peptidler ok ile gösterilmiştir.

Giovanetti ve arkadaşları (2002), 12294bp büyüklüğünde *ermTR* içeren bir fragmanı sekanslamış ve gen bankasına göndermiştir (FM162351). Bu sekansta yalnızca 1 lider peptid vardır ve 41 amino asiden oluşmaktadır.

Bu uzun lider peptidin ikinci parçası daha önce tanımlanan lider peptid 2 ile homoloji göstermektedir (Fines vd., 2001). Giovanetti ve arkadaşlarının sekansladığı *ermTR* geninin regülör bölgesinin ikincil yapısı Şekil 1.9 'da gösterildiği gibidir.



Şekil 1.9: *ermTR* mRNA'sının regülör bölgesinin ikincil yapısı.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İlk kez 1874 yılında Billroth zincir yaparak üreyen kokları tanımlamış ve Fehleisen 1883’de bu bakterilerin saf kültürünü elde etmiştir. Rosenbach, 1884 yılında bu bakterileri “*S. pyogenes*” olarak isimlendirmiştir. Brown (1919), kanlı agardaki aktivitelerine göre streptokokları alfa (α), beta (β) ve gama (γ) hemolitik diye ayırmıştır (Bisno vd., 2000; Koneman vd., 1992; Mandell vd., 2005). G.R. Dick (1924), kızıl hastalığının, hemolitik streptokok infeksiyonu olduğunu bildirmiştir. Rebecca Lancefield presipitasyon ve Griffith aglütinasyon yöntemleriyle streptokokların immünolojisini araştırmışlar ve Lancefield (1933) patojen streptokokları, hücre duvarında bulunan karbonhidrat antijenlerine göre, çeşitli serolojik gruplara ayırmıştır (Kayser vd., 2005; Lehman vd., 2007).

Stafilokoklar, ilk olarak 1878’de Robert Koch tarafından tanımlanmış ve 1882 yılında Ogston tarafından bu mikroorganizmalar “*Staphylococcus*” olarak isimlendirilmiştir (Bannerman vd., 2003).

1928 yılında Alexander Fleming tarafından Penisilinin keşfedilip 1941 yılında klinikte kullanılmaya başlanmasıyla stafilokok enfeksiyonlarının seyri değişmiştir. 1959 yılında klinik kullanıma sunulan ve penisilinaza dirençli ilk semisentetik antimikrobiyal ajan olan metisiline karşı 1961 yılında ilk dirençli *S. aureus* suşları bildirilmiştir. Bunu 1970’li yıllarda yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe (klindamisin, kloramfenikol, tetrasiklinler, makrolidler, rifampin, aminoglikozidler ve trimetoprim-sulfametoksazol) direnç gelişmesi izlemiştir. Antibiyotiklere çoklu direnç gösteren MRSA suşları 1980’lerin sonlarında ve 1990’lı yıllarda tüm dünyaya yayılmış ve hastanelerde en sık rastlanan nozokomiyal patojenler arasında yerini almıştır (Schmitz ve Jones, 1997).

Stafilokok varyantları üzerinde çalışmalar yapan Alexander Fleming, *Penicillium* kültür filtratlarının, birçok bakteriye karşı güçlü biçimde etkin bulmuş ve etkili maddeye 'penicillin' adını vermiştir. 1943 yılında *Actinomycetes* türleri üzerinde çalışmalar yapan Waksman ve arkadaşları, *Streptomyces griseus* kültürlerinden 'streptomisin' adını verdikleri bir madde elde etmişlerdir. 1944 yılında kullanıma giren bu antibiyotik, birçok gram pozitif ve gram negatif mikroorganizma yanında *Mycobacterium* 'lara karşı da çok etkili olmuştur. (Chambers vd., 2001).

19. yüzyılın ikinci yarısında, steril idrarda iyi üreyen şarbon basillerinin diğer bakterilerle kirlenmiş idrarda üreyemediklerini ve sonunda öldüklerini saptayan Pasteur ve Joubert, bu gözlemlerinin nedenlerini deneysel olarak ortaya çıkarmak istemişlerdir. Bu araştırmacılar, diğer bakterilerle kontamine idrara karıştırılan şarbon basillerinin deney hayvanlarında hastalık oluşturmadığını ortaya koymaları, enfeksiyonların antibiyotiklerle tedavisi alanındaki ilk adımları oluşturmuştur (Chambers vd, 2001).

Staphylococcus aureus günümüzde de en yaygın hastane enfeksiyonu nedenidir, özellikle hastane pnömonisi, cerrahi yara enfeksiyonu ve kalp damar sistemi enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Panlilio vd., 1992; Waldvogel vd., 2000).

Stafilokoklar; hareketsiz, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif, Gram pozitif koklardır. Kapsülsüzdürler ve en tipik üremeleri kanlı agardadır. Optimal üreme ısıları 30-37 °C ve pH değerleri de 7-7.5'tir. Kolonileri; yuvarlak, düzgün, kabarık, mat, S tipinde olup; *S. aureus* kökenlerinin çoğunda sarı pigment ve beta hemoliz görülür. Bu hemoliz; koyun, insan veya at kanlı agarda ortaya çıkabilir ve uzun süreli inkübasyonlarda daha belirgin hale gelir. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'un bazı kökenlerinde de sarı veya turuncu pigment ile hemoliz görülebilir. (Waldvogel vd., 2000). Günümüzde *Staphylococcus* genusunda 35 tür ve 17 alt tür saptanmıştır (Bannerman vd., 2003).

Bakterilerin sadece üremelerini durduranlar için “bakteriyostatik”; bakterilerin ölümüne neden olanlar için ise “bakterisidal” etkili antibiyotik terimleri kullanılmaktadır. Günümüzde mikroorganizma hücrelerini oluşturan değişik yapılar üzerinde farklı mekanizmalarla etki ederek o organizmanın üreyip çoğalmasını engelleyebilen ya da ölümüne neden olan çok sayıda gerek *statik* gerekse *sidal* etkili antimikrobiyal ilaç kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin bazıları bakteri hücre duvarının yapımını, bazıları hücre zarının yapımını ya da zarın fonksiyonlarını engelleyerek; bazıları protein sentezinin yapı taşları olan ribozomları, bazıları ise onun yeni nesiller vermesinde en önemli oluşumları olan nükleik asitlerini hedef alarak etkilerini gösterirler. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre genel olarak; hücre duvarı sentezini inhibe edenler, protein sentezini inhibe edenler, nükleik asit sentezini inhibe edenler ve hücre zarının fonksiyonunu değiştirenler olarak sınıflandırılırlar (Opal ve Pop-Vicas, 2010).

Antibiyotik direnci ilk kez, bu ilaçların en çok kullanıldığı yerler olan hastanelerde saptanmıştır. Sülfonamid dirençli *Streptococcus pyogenes* 1930’larda bir askeri hastanede ortaya çıkmıştır. Penisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, 1940’larda başlayan penisilin kullanımından kısa bir süre sonra Londra hastanelerinden bildirilmiştir. Benzer şekilde, streptomisin kullanımından çok kısa bir süre sonra *Mycobacterium tuberculosis* bu ilaca karşı direnç geliştirmiştir. Birden çok ilaca karşı ilaç gelişimi geç 1950’ler ve erken 1960’larda enterik bakteriler arasında (*Escherichia coli*, *Shigella* ve *Salmonella*) ortaya çıkmıştır (Koren, 1997, Tenover, 2006)

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).

Eritromisin, eritromisin A, B ve C olarak üç antibiyotiğin bir karışımı halinde Filipinlerden izole edilen ve *Streptomyces erytreus* tarafından üretilen doğal bir antibiyotiktir. Yapıları benzer bu antibiyotiklerden eritromisin A, 1952 yılında *Lilly Research Laboratories* tarafından saflaştırılmış ve “Ilotycin” adıyla terapötik ilaç olarak kullanılmıştır. Aynı yıllarda Haight ve Finland, pnömokoklar, enterokoklar ve stafilokoklarda, *multistep selection* ile in vitro olarak, *Staphylococcus aureus* infeksiyonunun tedavisinde ise in vivo eritromisine direnç gelişimini bildirmişlerdir. Eritromisine dirençli suşlar ayrıca karbomisin, spiramisin, oleandomisin ve streptogramine de dirençli olarak bulunmuştur (Bozdoğan ve Appelbaum, 2004).

ermA ve *ermC* genleri en çok stafilokoklarda, *ermB* geni enterokoklarda ve streptokoklarda görülmektedir. *ermTR* geni ilk olarak *S. pyogenes* türünde bulunmuştur. *ermTR* geni dejenere primerler kullanılarak çoğaltılmış ve sekans analizi yapılmıştır. Gen bankasıyla karşılaştırıldığında en yakın homoloji *ermA* (82.5%) ile bulunmuştur (Seppala vd., 1998).

Şimdiye kadar yaklaşık olarak 41 *erm* geni olduğu bildirilmiştir (Roberts vd., 1999).

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).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri, Plazmid ve Büyüme Ortamları

Bu çalışmada kullanılan *Streptococcus pyogenes* C1 suşu Marche Polytechnic University Medical School (Ancona, İtalya)'dan Assos. Prof. Eleonora Giovanetti'den, *Streptococcus pyogenes* NZ131, *Staphylococcus aureus* RN4220, *Escherichia coli* DH10B, *Escherichia coli* DB10, *E. coli* vektörü pUC18 ve gram pozitif mekik vektör pJIM2246 Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Epidemiyoloji Birimi koleksiyonundan temin edilmiştir.

Streptococcus pyogenes C1, *Streptococcus pyogenes* NZ131, *Staphylococcus aureus* RN4220, *Escherichia coli* DH10B ve *Escherichia coli* DB10 %15 gliserol içeren besiyerinde -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

Streptococcus pyogenes C1 ve *Streptococcus pyogenes* NZ131 bakterileri, %5 koyun kanlı Brain Heart Infusion Agar (BHIA) besiyerinde 37 °C'de anaerobik jar içerisinde üretilmiştir. *Staphylococcus aureus* RN4220, *Escherichia coli* DH10B ve *Escherichia coli* DB10 bakterileri, BHIA besiyerinde 37 °C'de üretilmişlerdir.

3.1.2. Stok Antibiyotiklerin ve Solüsyonların Hazırlanması

3.1.2.1. Ampisilin (100 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktarda ampisilin tartılarak saf suda çözülür. Bakteriyel filtreden (0.2 µm) geçirilerek steril bir şekilde ependorf tüplerine paylaştırılır ve -20 °C'de muhafaza edilir. Besiyerine istenilen son konsantrasyon elde edilebilecek şekilde ilave edilir.

3.1.2.2. Kloramfenikol (100 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktarda kloramfenikol tartılarak % 96'lık etil alkol içerisinde çözülür. Bakteriyel filtreden (0.2 µm) geçirilerek steril bir şekilde ependorf tüplerine paylaştırılır ve -20 °C'de muhafaza edilir. Besiyerine istenilen son konsantrasyon elde edilebilecek şekilde ilave edilir.

3.1.2.3. Klindamisin (10 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktarda klindamisin tartılarak saf suda çözülür. Bakteriyel filtreden (0.2 µm) geçirilerek steril bir şekilde ependorf tüplerine paylaştırılır ve -20 °C'de muhafaza edilir. Besiyerine istenilen son konsantrasyon elde edilebilecek şekilde ilave edilir.

3.1.2.4. 3 M Na-asetat (pH 5.3)

Hazırlanmak istenen hacimde, 3 M olacak şekilde Na-asetat tartılır ve manyetik karıştırıcı üzerinde bir miktar saf suda çözülür. Glasiyal asetik asit ile pH'sı ayarlanır ve saf su ile istenilen hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilir.

3.1.2.5. 10X TBE Tamponu (pH 8.0)

Bileşenler	Miktar
Tris-baz	121,10 g
Borik asit	61,83 g
EDTA	5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml 'ye tamamlanarak Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülerek ve otoklav yapılarak sterilize edilir. Kullanım konsantrasyonu olan 1 litre 0.5 X yapmak için 50 ml 10X TBE alınarak üzerine 950 ml saf su ilave edilir.

3.1.3. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ile DNA modifiye edici enzimler (DNA kesme enzimleri, RNaz, DNA ligaz, Alkalin fosfataz), taq DNA polimeraz ve antibiyotikler ile diğer kimyasal malzemeler Fermentas, AppliChem, Koçak Farma, Merck, Difco, Oxoid ve eczanelerde satılan ticari preparatlardan satın alınmıştır.

3.2. Laboratuvar Metotları

3.2.1. *ermTR* Geninin pUC18 Vektörü İçerisine Klonlanması

3.2.1.1. *ermTR* geninin amplifikasyonu için modifiye primerlerin dizayn edilmesi

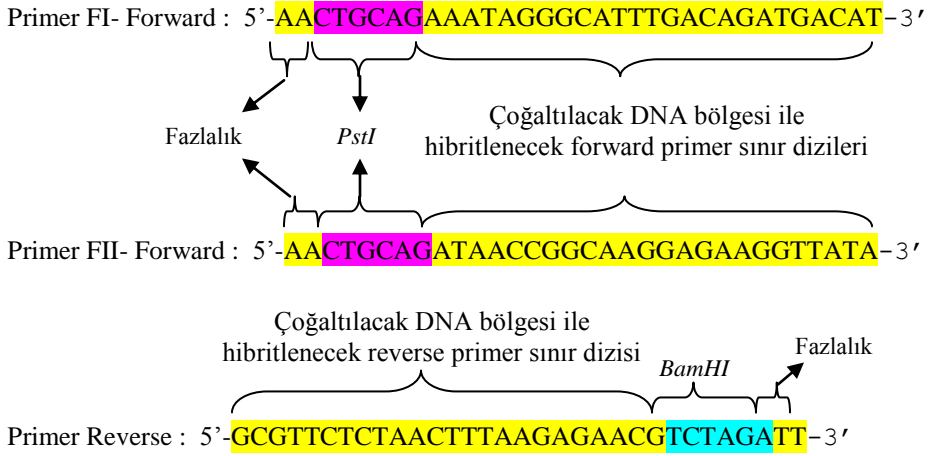
Dr. Giovanetti ve arkadaşları (2002) tarafından çalışılmış *ermTR* içeren *S. pyogenes* C1 suşu Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a gönderilmiştir. *S. pyogenes* C1 suşundan *ermTR* genini klonlamak amacıyla hem lider peptidli hemde lider peptidi içermeyen fragmentleri çoğaltacak primerler dizayn edilmiştir.

S. pyogenes C1 'e ait *ermTR* geninin baz dizileri incelenerek *metilaz* geninin amplifikasyonu için uygun primer bölgeleri belirlenmiştir. Dizi üzerindeki primer bölgeleri Şekil 3.1.'de sarı renk ile belirtilmiştir. PCR ürününün vektörlere ligasyonunu kolaylaştırmak amacı ile yapışkan uç açığa çıkacak şekilde Primer FI-Forward ve FII-Forward'ın ucuna *PstI* (5'-CTGCAG-3'), Primer Reverse'ün ucuna *XbaI* endonükleazına ait tanıma dizileri (5'-TCTAGA-3') ilave edilmiştir.



Sekil 3.1: Giovanetti ve arkadaşları 2002 tarafından gen bankasına gönderilen FM162351 nolu *ermTR* sekansı. Şekilde FI ile ifade edilen sekans bölgesi lider peptidli, FII ile gösterilen bölge ise lider peptidi içermeyen *ermTR* sekansıdır. Dizayn edilen modifiye primerler sarı renk ile gösterilmiştir. Mor renkli olarak belirtilen kısımlar *PstI* restriksiyon enzim kesim bölgesini, Açık mavi ile belirtilen sekans bölgesi ise *XbaI* restriksiyon enzim kesim bölgesini göstermektedir.

Primerlerin uçlarına ilave edilen endonükleazlar, gen bölgesi içerisinde tanıma bölgesine sahip olmaması ve vektör DNA'lar üzerindeki çoklu klonlama bölgesinde (MCS) kesim yapan enzimlerden olmaları gibi önemli unsurlar göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Bu kriterler göz önünde bulundurularak dizayn edilen ve *ermTR* geninin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2: *ermTR* genini klonlamak amacıyla amplifikasyonda kullanılacak primer dizileri.

3.2.1.2. *Streptococcus pyogenes* C1 suşundan total DNA ekstraksiyonu

S. pyogenes C1 bakterisi %5 koyun kanı agar içeren BHI Agar besiyerinde anaerobik jarla 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek üretilmiştir. Üretilen bakteriden InstaGene Matrix DNA izolasyon kiti ile total DNA izole edilmiştir. Instagene Matrix DNA izolasyon kiti için uygulanan protokol aşağıda belirtildiği gibidir.

- Steril 1.5 ml'lik ependorf tüpü içerisine 1 ml steril suda, *S. pyogenes* C1 bakterisinden birkaç koloni alınarak süspanse edilmiştir.
- 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.

- Pellet üzerine 200 µl InstaGene matrix kit solüsyonundan eklenerek pellet süspansiyonu edildikten sonra 56 °C 'de 15-30 dk. inkübe edilmiştir.
- 10 saniye yüksek hızda vorteksledikten sonra ependorf tüpü 100 °C 'lik ısı bloğunda veya su banyosunda 8 dk. bekletilmiştir.
- Tekrar 10 saniye yüksek hızda vortekslenen ependorf tüpü, 12000 rpm'de 2-3 dk. santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası oluşan süpernatant DNA içeriği olarak PCR için hazır hale gelmiştir. Amplifikasyon için kullanıldıktan sonra -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.3. PCR programlama ve PCR reaksiyonunun hazırlanması

Primerlerin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık (T_m =Annealing Temperature), primer uzunlukları dikkate alınarak her iki primer için de ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Primerlerin T_m değerleri $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü kullanarak hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre T_m değerleri (kalıp ipliğe özgü olan altı çizili diziler) Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Primerlerin T_m değerlerinin gösterilmesi.

Primer İsmi	Primer Dizisi (5' - 3')	T_m Değeri
FI-Forward	AACTGCAGAAATAGGGCATTGACAGATGACAT	68
FII-Forward	AACTGCAGATAACCGGCAAGGAGAAGGTTATA	68
Reverse	GCGTTCTCTAACTTTAAGAGAACGTCTAGATT	68

Bu durumda annealing (bağlanma) sıcaklığı her iki primer için de 60 °C alınmıştır (Bağlanma sıcaklığı hesaplanan T_m değerinin aşağısında alınmaktadır). T_m hesaplanırken her iki primerde de kalıp DNA ile homoloji gösteren ve altı çizili olarak verilen diziler hesaba katılmıştır. Çünkü diğer dizilerin kalıp DNA üzerinde komplementeri olmadığından birinci döngüde sarkık olarak kalacaklardır.

Dolayısıyla tüm baz dizileri dikkate alınarak T_m değerleri hesaplınsaydı primerlerin kalıp DNA'ya yapışması mümkün olmazdı. İşte bundan dolayı T_m değerleri hesaplanırken bu diziler hesaba katılmamıştır.

ermTR genini hem lider peptidli hemde lider peptidsiz olarak çoğaltmak için kullanılan *thermal cycler* programı çizelge 3.2'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2: *ermTR* geninin *S. pyogenes* C1 DNA'sından çoğaltılması için kullanılan Thermal Cycler programı.

Grup Numarası	Sıcaklıklar	Süre	Döngü Sayısı
1	94 °C	4 dk.	1
2	94 °C 60 °C 72 °C	45 sn. 45 sn. 90 sn.	35
3	72 °C	10 dk.	1
4	10 °C	∞	1

PCR reaksiyonu mümkün olduğu kadar steril şartlarda ve U.V. ile steril edilmiş steril hava kabininde, en son enzim ilave edilecek şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyonda, standart taq DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. *ermTR* geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri Tablo 3.3.'de verilmiştir.

PCR reaksiyonu, Çizelge 3.3 'de 1.5 ml'lik DNaz, RNaz free ependorf tüpünde hazırlanmış ve 50 µl'lik hacimlerde 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alikotlanarak daha önce programlanmış olan *thermal cycler* cihazının örnek bloğuna yerleştirilerek cihaz çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.3: *ermTR* geninin *S. pyogenes* C1 DNA'sından çoğaltılması için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri.

İçerik	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
Taq Buffer	10X	5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	4 µl	2 mM
dNTP	10 mM	1 µl	0.2 mM
<i>ermTRFI</i> / <i>ermTRFII</i>	100 pmol/µl	0.2 µl	0.4 pmol
<i>ermTRR</i>	100 pmol/µl	0.2 µl	0.4 pmol
Taq Polimeraz	5 U/µl	0.3 µl	0.03 U/µl
<i>S. pyogenes</i> C1 DNA'sı		2 µl	-
Deionize steril su	-	37.3 µl	-
TOPLAM	-	50 µl	-

3.2.1.4. PCR ürünlerinin elektroforezi

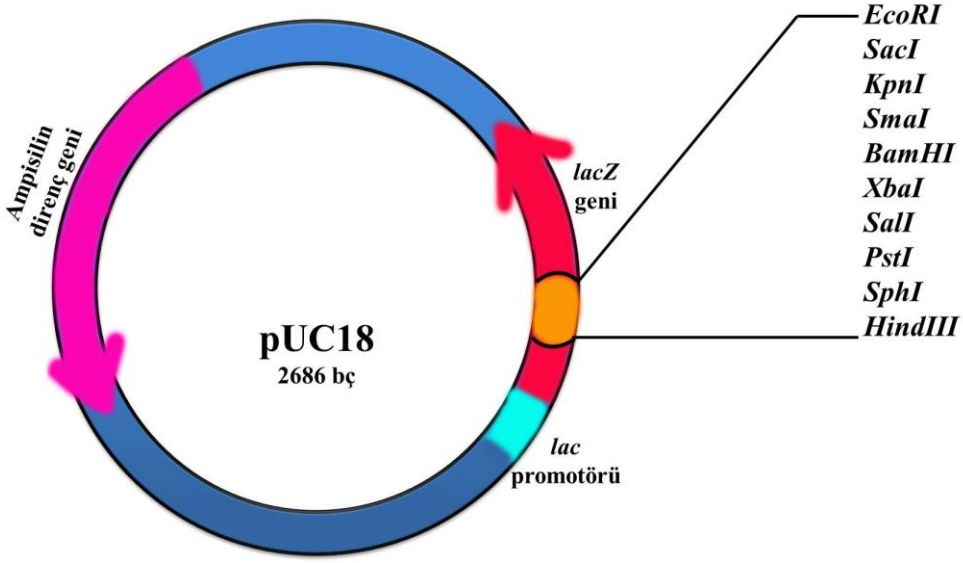
PCR programı tamamlandıktan sonra reaksiyon ürününe 5:1 oranında yükleme tamponu ilave edilmiş ve hafifçe pipetaj yapılarak homojenize hale getirilmiştir. Elde edilen karışım, markır DNA ile birlikte % 1'lik agaroz jelin kuyularına dikkatli bir şekilde yüklenmiş ve 100 V'da 30 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. Pozitif amplifikasyon görülen ampikonlar klonlama işlemi için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.5. pUC18 içeren *Escherichia coli* DH10B suşundan plazmit ekstraksiyonu

E.coli'den, *pUC18* plazmid DNA'sı GeneJET™ Plazmid Miniprep Kit (Fermentas) kullanılarak aşağıda belirtilen protokol uygulanarak elde edilmiştir.

- BHI broth besiyerinde 100 µg/ml üretilen pUC18 içeren *E.coli* DH10B bakterisi steril mikrosantrifüj tüpüne 1.5 ml aktarılmış ve 13000 rpm'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant atılarak pellet üzerine 250 µl Resüspansiyon solüsyonundan eklenmiş ve homojenize hale getirilmiştir.
- Üzerine 250 µl Lizis solüsyonundan eklenerek ependorf tüpü 4-5 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Üzerine 350 µl Nötralizasyon solüsyonundan eklenmiş ve ependorf tüpü 4-5 kez alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 13000 rpm'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası hücre yıkıntıları ve kromozomal DNA'yı içeren pelletli kısma dokunmadan, dikkatlice süpernatantlı kısım pipet yardımıyla alınmış ve kit ile verilen filtrelili ependorfa aktarılmıştır. 1 dk. 13000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
- Koleksiyon tüpünde biriken sıvı kısım atılmış ve filtrelili kısım üzerine 500 µl Yıkama solüsyonu eklenerek 1 dk. 13000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.
- Koleksiyon tüpünde biriken sıvı kısım atılarak filtrelili ependorf boş olarak 1 dk. 13000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
- Filtrelili kısım yeni bir steril ependorf tüpü içerisine yerleştirilerek alkolün uzaklaşması için 37 °C'lik etüvde 5 dk. bekletilmiş ve üzerine 50 µl Elution solüsyonundan eklenip 2 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 13000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası filtrelili kısım atılmış ve ependorf tüpü içerisinde biriken saf plazmid DNA'sı gelecek çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Çoğaltılan *ermTR* amplikonunun klonlanması için seçilen *pUC18* plazmid vektörünün yapısı Şekil 3.3 'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.3: pUC18 plazmidinin yapısı (2686 bç).

pUC18 plazmid vektöründe ampisilin direnç geni ve *E. coli lac* (laktöz) operonundan β -galaktozidaz'ın α -komplementini (amino-terminal parçasını) kodlayan *lacZ* geni bulunmaktadır. Bu gen içine açık okuma çerçevesini (open reading frame -ORF-) bozmayacak şekilde restriksiyon endonükleaza ait tanıma dizileri yerleştirilerek oluşturulan 'çoklu klonlama bölgesi' enzim aktivitesine zarar vermez. Bu özelliği ile pUC18 vektörü β -galaktozidaz'ın karboksiterminal parçasını kodlayan konakçı *E. coli* hücreleriyle birlikte kullanılır. Aynı zamanda aktivite göstermeyen bu iki parça bir araya geldiğinde aktif bir enzim oluşturur. β -galaktozidaz, kromogenik ve laktöz analogu bir madde olan X-gal'i (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) parçalayarak mavi renkli bir madde oluşumu sağlandığından, X-gal 'li plaklarda bu özellikteki bakteriler mavi renkli görünürler. Çoklu klonlama bölgesi içine yapılan klonlamada β -galaktozidaz'ın α -komplementi sentezlenemediği için (gen inaktive edildiğinden), aynı ortamda rekombinant plazmiti taşıyan bakteriler beyaz renkli koloni oluştururlar.

3.2.1.6. *pUC18* plazmidini ile klonlanacak lider peptidli (FI) ve lider peptidsiz (FII) *ermTR* genlerini içeren ampliconların restriksiyonu

İzolasyonu yapılan pUC18 plazmid DNA'sı ile restriksiyon kesim yerleri eklenmiş modifiye primerler ile çoğaltılan lider peptidi içeren (FI) ve içermeyen (FII) *ermTR* geni ampliconları *PstI* ve *BamHI* endonükleaz enzimleri ile kesilerek düz zincir (doğrusal) haline getirilmiştir. *ermTR* genini çoğaltmak için kullanılan primerlere klonlamayı daha kolay ve doğru yönde yapabilmek amacıyla eklenen *PstI* ve *BamHI* endonükleazları genom üzerinde sırasıyla 5'-CTGCAG-3', 5'-GGATCC-3' dizilerini tanıyan ve DNA'yı keserek yapışkan uç oluşturan enzimlerdir. pUC18 plazmid DNA'sının *PstI* ve *BamHI* endonükleazları ile kesim reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.4.'de, FI ve FII fragmanlarını içeren ampliconların *PstI* ve *BamHI* endonükleazları ile kesim reaksiyon bileşenleri ise Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da verilmiştir. Ampliconların her biri için ayrı bir plazmid restriksiyon reaksiyonu kurulmuştur.

Çizelge 3.4: pUC18 plazmid DNA'sının *PstI* ve *BamHI* endonükleazları ile kesim reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Alınan Miktar
pUC18 plazmid DNA'sı	10 µl
Fast Digest Buffer	2 µl
<i>PstI</i>	1 µl
<i>XbaI</i>	1 µl
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	1 µl
Deionize Su	5 µl
TOPLAM	20 µl

PstI ve *BamHI* kesim uçlarına sahip olacak pUC18 vektörü, uçlar uyumlu olmadığı için plazmidin kendi içinde ligasyon yapması mümkün olmasa da reaksiyon sırasındaki olası bütün alternatiflerin önlenmesi için reaksiyona Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) eklenmiş ve 5' uçları defosforile edilmiştir.

Çizelge 3.5: Lider peptidi içeren (FI) *ermTR* geni amplikonunun *PstI* ve *BamHI* endonükleazları ile kesim reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Alınan Miktar
Lider Peptidli (FI) <i>ermTR</i> geni amplikonu	10 µl
Fast Digest Buffer	2 µl
<i>PstI</i>	1 µl
<i>XbaI</i>	1 µl
Deionize Su	6 µl
TOPLAM	20 µl

Çizelge 3.6: Lider peptidi içermeyen (FII) *ermTR* geni amplikonunun *PstI* ve *BamHI* endonükleazları ile kesim reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Alınan Miktar
Lider Peptidsiz (FII) <i>ermTR</i> geni amplikonu	10 µl
Fast Digest Buffer	2 µl
<i>PstI</i>	1 µl
<i>XbaI</i>	1 µl
Deionize Su	6 µl
TOPLAM	20 µl

Çizelge 3.4, 3.5 ve 3.6 'da belirtilen kesim reaksiyonları 37 °C'de yaklaşık 30 dakika inkübe edildikten sonra 5'er µl'leri alınarak DNA markırı ile %1 w/v'lik agaroz jelde incelenmiştir. Geriye kalan reaksiyon ürünleri presipitasyon ile saflaştırılmıştır. Presipitasyon reaksiyonu için aşağıda belirtilen protokol uygulanmıştır.

- Geriye kalan 15 µl'lik restriksiyon ürünü üzerine 85 µl steril distile su eklenerek hacim 100 µl'ye çıkarılmıştır.
- 100 µl'lik restriksiyon ürünü içeren hacim içerisine hacim/hacim olacak şekilde yani 100 µl Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (24:25:1) eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra, 13000 rpm'de +4 °C'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası oluşan üst şeffaf faz yeni bir ependor içerisine dikkatlice alınır. Bu aşamada klonlanmak istenen amplikonun restriksiyon reaksiyonundaki üst faz ile klonlanacağı vektöre ait üst faz birleştirilmiştir.
- Üzerine 1/10 hacimde 20 µl 3 M Na Asetat (pH:5.2) eklenip karıştırıldıktan sonra, aynı hacimde 220 µl %100'lük isopropanol eklenip karıştırılmış ve 20 dk. -20 °C'de bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası 13000 rpm'de +4 °C'de 20-30 dk. santrifüj edilmiştir.
- Dikkatli bir şekilde üst sıvı atılarak pellet üzerine 300 µl %70'lik etanol eklenmiş ve 13000 rpm'de +4 °C'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası üst sıvı atılarak pellet kuruduktan sonra ligasyon reaksiyonu için 17 µl steril distile suda çözülmüştür.

3.2.1.7. *pUC18* plazmidi ile klonlanacak lider peptidli (FI) ve lider peptidsiz (FII) *ermTR* genlerini içeren amplikonların ligasyonu

Ligasyona hazır hale getirilen ve presipitasyon aşamasında birleştirilmiş pUC18 vektörü ile amplikonlar için uygulanan ligasyon reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7: Restriksiyonları yapılmış ve presipitasyon aşamasında birleştirilmiş Lider peptidi içeren (FI) *ermTR* geni amplikonu ile pUC18 vektörü için ligasyon reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Alınan Miktar
Lider Peptidli (FI) <i>ermTR</i> geni + pUC18 plazmidi	17 µl
T4 DNA Ligaz Buffer	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
TOPLAM	20 µl

Lider peptidi içeren (FI) *ermTR* geni amplikonu ile pUC18 vektörü için için uygulanan ligasyon reaksiyon işlemi aynı şekilde lider peptidi içermeyen (FII) ile pUC18 vektörü karışımı için de Çizelge 3.8’de belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Çizelge 3.8: Lider peptidi içermeyen (FII) *ermTR* geni amplikonu ile pUC18 vektörü için ligasyon reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Alınan Miktar
Lider Peptidsiz (FII) <i>ermTR</i> geni + pUC18 plazmidi	17 µl
T4 DNA Ligaz Buffer	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
TOPLAM	20 µl

Elde edilen ligasyon reaksiyonları 16 °C’de 1 gece inkübe edilmiştir. Daha sonra ligasyon ürünleri için daha önce açıklandığı şekilde presipitasyon işlemi uygulanarak enzim ve diğer kimyasallar gibi inhibitörlerden arındırılmıştır. Son olarak ligasyon karışımı *E. coli* DH10B bakterisine transferde kullanılmak üzere 10 µl steril distile su ile sulandırılmış ve transformasyona kadar -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.1.8. Elektrokompentan *E. coli* DH10B hücrelerinin hazırlanması

Kompetan bakteri oluşturmada kullanılan *E. coli* DH10B bakterisi, aşağıda belirtilen protokol uygulanarak kompetan hale getirilmiş ve ligasyon reaksiyon ürünü ile elektrotransformasyonda kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir. *E. coli* DH10B bakterisinden kompetan hücre eldesi aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

- *E. coli* DH10B ekilmiş plaktan tek bir koloni alınarak 5 ml BHI (Brain-Heart Infusion) broth besiyerine inoküle edilerek 37 °C’de gecelik kültüre bırakılmıştır.
- Ertesi gün 50 ml BHI broth içeren tüpe, 1 ml gecelik kültürden inoküle edilmiş ve 37 °C’de yaklaşık 3 saat inkübe edilerek OD600 ‘deki absorbans değeri OD 0.6-0.8 oluncaya kadar inkübe edilmiştir (sonraki tüm işlemler soğuk zincirde sürdürüldü).
- Absorbansı 0.6-0.8’e erişen 50 ml bakteri kültürünü içeren tüp 5000 rpm’de 10 dakika +4 °C’de santrifüj edilmiştir.
- Üst sıvı uzaklaştırılarak pellete 10 ml soğuk steril distile su eklenerek homojenize edilmiş ve +4 °C’de 5000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilerek üst sıvı atılarak, pellet üzerine tekrar 10 ml steril soğuk distile su eklenip +4 °C’de 5000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
- Üst sıvı uzaklaştırılarak 10 ml soğuk %10 gliserol içeren steril distile sudan eklenmiş, karıştırıldıktan sonra +4 °C’de 5000 rpm’de 10 dk. santrifüj sonrası üst sıvı atılmıştır.
- Üzerine tekrar 10 ml soğuk %10 gliserol içeren steril distile sudan eklenerek karıştırılmış ve +4 °C’de 5000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilip, üst sıvı atılmıştır.
- Pellet üzerine %10 gliserol içeren steril distile sudan 1 ml eklendikten sonra hafif pipetaj ile homojenize hale gelen hücreler, 100 µl’lik bölümlere ayrılarak kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.1.9. Ampisilin-Xgal-IPTG seçici besiyerinin hazırlanması

Plaklarda rekombinantların tespiti için mavi-beyaz koloni seçimine dayalı besiyerinin hazırlanması için gerekli olan plak sayısına yetecek kadar besiyeri tartılıp hazırlanarak otoklavlanmıştır. Besiyeri içerisine pUC18 vektöründe yer alan ampisilin direnci ile ayırım için 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin ilave edilmiştir. *lacZ* geninin insert alıp almamasına göre mavi-beyaz renk oluşturması özelliği için ortama %2'lik X-gal 'den 2.5 µl/ml ve IPTG'den 5 µl/ml olacak şekilde ilave edilip besiyeri şişesi iyice karıştırıldıktan sonra petrilere 20 'şer ml olarak dağıtılmıştır.

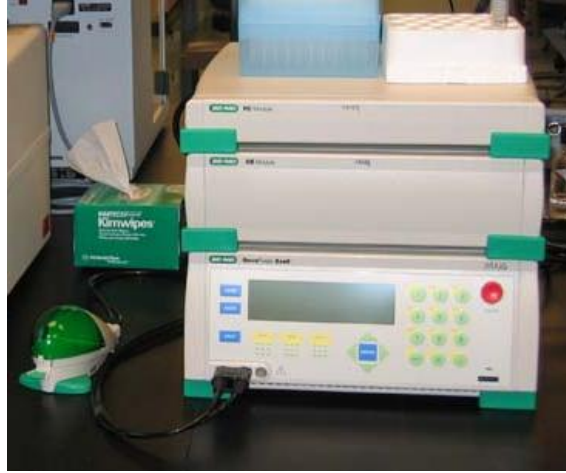
3.2.1.10. Ligasyon ürünlerinin elektrotransformatasyonu

Lider peptidli (FI) ve lider peptidsiz (FII) *ermTR* genini taşıyan amplikonlarla ayrı ayrı ligasyonu yapılan pUC18 vektöründen 10 µl, hazırlanan *E. coli* DH10B kompetan hücrelerinden ise 100 µl alınarak aynı tüpte birleştirilmiş ve elektrotransformatasyon küvetine alınmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Kompetan hücreler ile ligasyon ürünlerinin transformasyon küvetine aktarılması. 10 µl ligasyon ürünü ile 100 µl kompetan hücreyi içeren karışım 0.2 mm çaplı elektrotransformatasyon küveti içerisine okla gösterildiği yere gelecek şekilde aktarılmıştır.

Daha sonra elektrotransformasyon kuveti Şekil 3.5 'te gösterilen elektroporatör cihazına (Cellject Duo - Thermo) yerleştirilmiş ve kapasitansı 15 μF 'e, rezistans 335 Ω 'a ve voltaj 2.5 KV'a getirilip elektrik şoku verilmiştir.

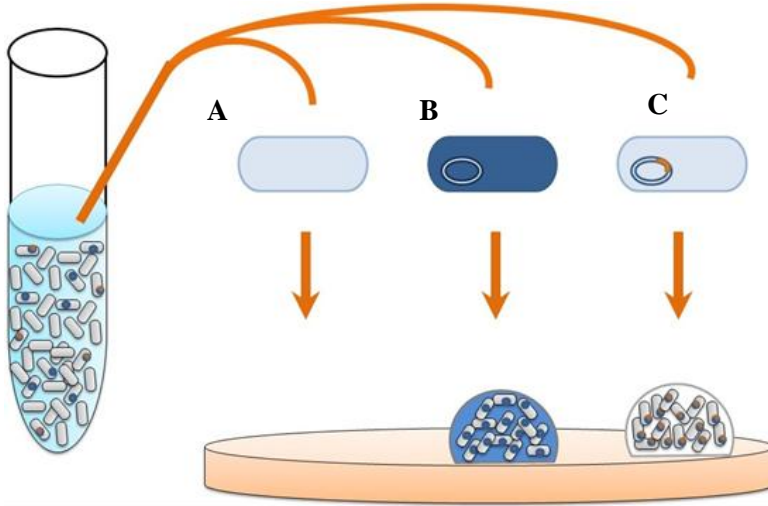


Şekil 3.5: Elektroporatör cihazı.

Elektrik şokundan hemen sonra cihazdan alınan küvet içerisine 1 ml BHI broth eklenerek steril bir ependorf tüpü içerisinde 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her bir transformasyon için seçici Ampisilin-Xgal-IPTG içeren besiyerine 50 ve 200 μl 'lik hacimler halinde yayma ekim yapılmıştır. Ertesi gün seçici besiyeri üzerinde üreyen mavi-beyaz koloniler değerlendirmeye alınmıştır.

3.2.1.11. İnsert alan rekombinan plazmidleri içeren kolonilerin seçimi ve doğrulanması

Normalde pUC18 plazmidini barındıran *E. coli*'ler, ampisilin-Xgal-IPTG içeren besiyerinde üreyerek mavi koloni oluştururlar. Bu klonlama plazmitinde restriksiyon kesim bölgeleri *lacZ* gen bölgesi üzerindedir ve hedef DNA fragmanının bu bölgeye eklenmesi enzimin transkripsiyonunu durduracağından, bu durumda *E.coli* kolonileri beyaz renkte olacaktır (Şekil 3.6).

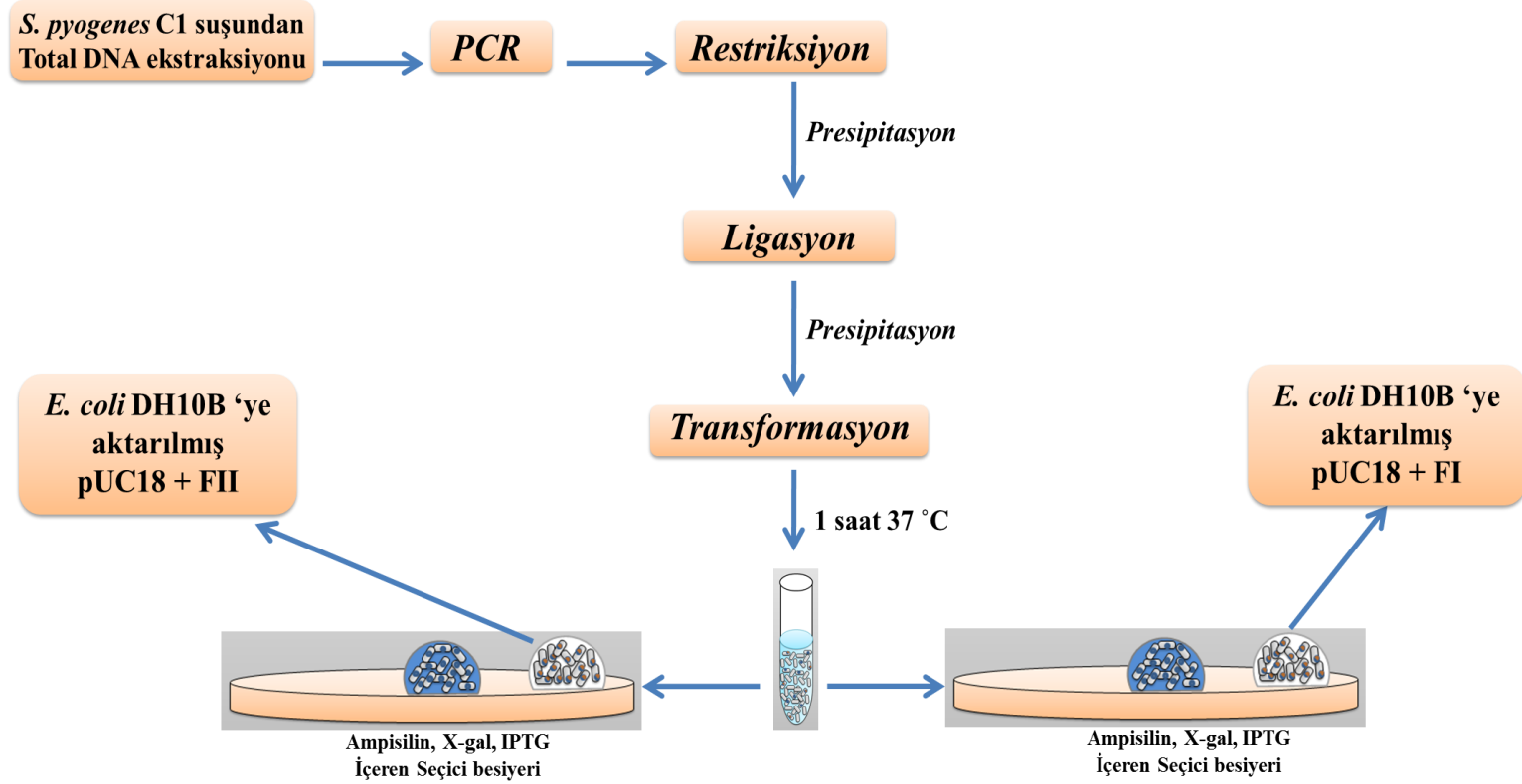


Şekil 3.6: Plakların incelenmesi. A-) Hiç vektör içermeyen bakteriler seçici besiyerinde üreyememiştir. B-) Yalnızca vektörü içeren bakteriler seçici besiyerinde mavi renkli koloniler oluştururlar. C-) insertli vektörü içeren bakteriler seçici besiyerinde beyaz renkli koloniler şeklinde üremişlerdir.

Beyaz kolonilerden plazmid ekstraksiyonu için seçilmiş ve 100 µg/ml ampisilin içeren BHI broth besiyerinde 37 °C’de inkübe edilerek geliştirilmiştir. Tüpte üreyen transformantlardan daha önce belirtildiği şekilde plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır. Plazmid pUC18 vektörü içerisinde klonlamak için kullandığımız *PstI* ve *XbaI* enzimleriyle kesilerek, elektroforezi yapılmış ve plazmid ile insert incelenmiştir.

Ayrıca ermTRFI, ermTRFII (Forward) ve ermTRR (Reverse) primerleri kullanılarak pUC18 içerisindeki insert PCR ile çoğaltılmaya çalışılmıştır. PCR için 0.2 µl’lik tüplere 30 µl dağıtılacak şekilde PCR miksi hazırlanıp dağıtılmıştır. Her tüp içerisine beyaz kolonilerden bir tanesi petri üzerinde yeri numaralandırılarak alınmış ve tüpte homojenize edilmiştir. PCR sonrası ampikonlar % 1’lik agaroz jelde yürütülmüş ve ampikon büyüklükleri değerlendirilmiştir.

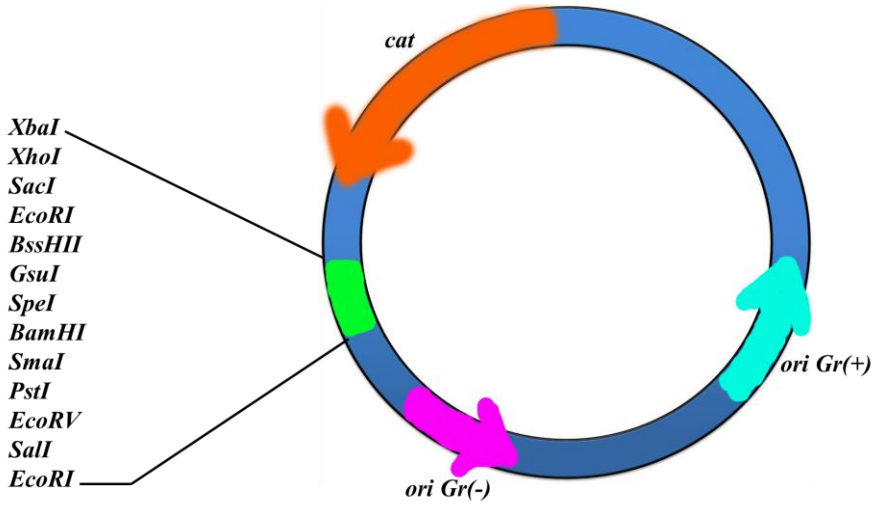
Şimdiye kadar gerçekleştirilen tüm işlemler şekil 3.7 ’da özetlenmiştir.



Şekil 3.7: Lider peptidi içeren (FI) ve içermeyen (FII) ermTR genlerinin pUC18 plazmidine klonlanması.

3.2.2. pUC18 İçinde İnsert Taşıyan Rekombinan Plazmidlerin pJIM2246 ile Füzyonu

pUC18 yalnızca Gram negatif bakterilerde çoğalabileceği için Gram pozitif bakterilerde *ermTR* geninin ekspresyonu için yeterli değildir. Bu nedenle FI ve FII fragmanını taşıyan pUC18 plazmidi, pJIM2246 plazmidi ile füzyonu yapılmıştır. Yapısı şekil 3.8 'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.8: pJIM2246 plazmidinin temsili yapısı. Çoklu klonlama bölgesine yerleştirilen insert *cat* (kloramfenikol asetil transferaz) promotörü altında ifade edilmektedir.

pJIM2246 plazmidi, hem *E. coli* 'de hemde gram pozitif bakteriler olan *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Streptococcus pyogenes* 'de çoğalabilen bir plazmidtir. Füzyonu gerçekleştirmek amacıyla *ermTR* genini klonladığımız pUC18 vektörü ile pJIM2246 vektörü için restriksiyon, ligasyon ve transformasyon işlemleri uygulanmıştır.

3.2.2.1. pUC18 içinde insert taşıyan rekombinan plazmidlerin ve pJIM2246 plazmidinin restriksiyonu

Lider Peptidli (FI) ve lider peptidi içermeyen (FII) *ermTR* genini ayrı ayrı içeren pUC18 vektörü ile füzyonu yapılacak olan pJIM2246 mekik (shuttle) vektörünün kesim reaksiyonları Çizelge 3.9, ve 3.10 'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilerek 37 °C'de yaklaşık 30 dakika inkübe edilmişlerdir. İncert taşıyan herbir rekombinan pUC18 plazmid için ayrı bir pJIM2246 vektörü restriksiyona bırakılmıştır.

Reaksiyon kurulurken yapışkan uçların kendi içinde ligasyon yapmasını ve reaksiyon sırasındaki olası bütün alternatiflerin önlenmesi için reaksiyona alkalen fosfataz (CIAP) eklenmiş ve 5' uçları defosforile edilmiştir.

Şekil 3.9 'de restriksiyon işlemi şematize edilerek gösterilmiştir.

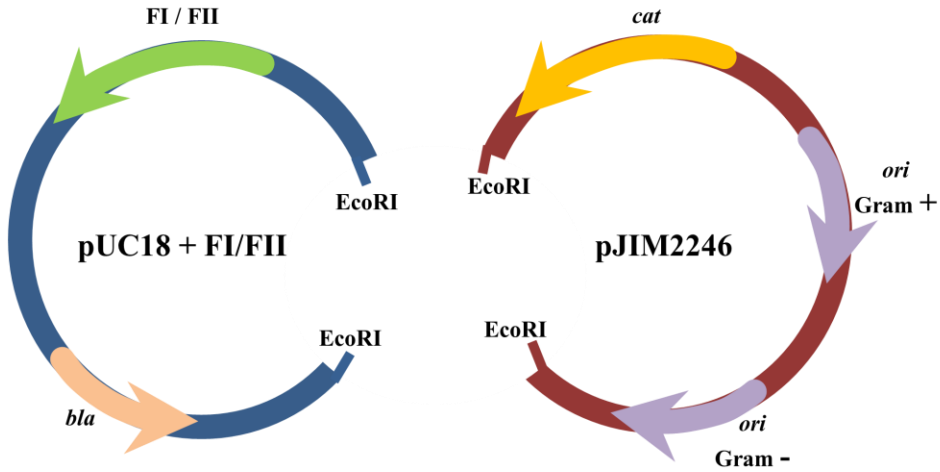
Çizelge 3.9: İçinde insert taşıyan pUC18 plazmid DNA'larının *EcoRI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Alınan Miktar
İncert içeren pUC18 plazmid DNA'sı	10 µl
Fast Digest Buffer	2 µl
<i>EcoRI</i>	1 µl
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	1 µl
Deionize Su	6 µl
TOPLAM	20 µl

Çizelge 3.10: Füzyon yapılacak olan pJIM2246 plazmid DNA 'sının *EcoRI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Alınan Miktar
pJIM2246 plazmid DNA'sı	10 µl
Fast Digest Buffer	2 µl
<i>EcoRI</i>	1 µl
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	1 µl
Deionize Su	6 µl
TOPLAM	20 µl

Vektörler kesildikten sonra 5'er µl'eri alınarak DNA markırı ile %1 w/v'lik agaroz jelde incelenmiştir. Geriye kalan reaksiyon ürünleri presipitasyon ile saflaştırılmıştır. Presipitasyon reaksiyonu daha önce belirtilen protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9: İnsert taşıyan pUC18 plazmidini ve füzyon yapılacak olan pJIM2246 plazmidinin *EcoRI* ile restriksiyonunun şematize gösterilmesi.

3.2.2.2. Füzyon plazmidlerinin ligasyonu

Alkol presipitasyonu sırasında fenol aşamasında üst fazların aynı ependorf tüpü içerisinde birleştirilerek karıştırılan restriksiyon ürünleri T4 ligaz enzimi ile Çizelge 3.11 'de belirtildiği miktarlarda bileşenler kullanılarak ligasyon yapılmıştır. Lider peptidi içeren ve içermeyen *ermTR* geni için hazırlanan, pJIM2246 vektörü ile füzyon işlemleri her biri için ayrı ayrı yapılmıştır.

Çizelge 3.11: İnsert içeren pUC18 vektörü için ligasyon reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Alınan Miktar
İnsert içeren (FI ve/veya FII) pUC18 plazmidi	17 µl
T4 DNA Ligaz Buffer	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
TOPLAM	20 µl

Hazırlanan reaksiyonlar 16 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Daha sonra ligasyon ürünleri için daha önce açıklandığı şekilde presipitasyon işlemi uygulanarak enzim ve diğer kimyasallar gibi inhibitörlerden arındırılmıştır. Son olarak ligasyon karışımı *E. coli* DH10B bakterisine transferde kullanılmak üzere 10 µl steril distile su ile sulandırılmış ve transformasyona kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2.3. Füzyon plazmidlerinin elektrotransformasyonu

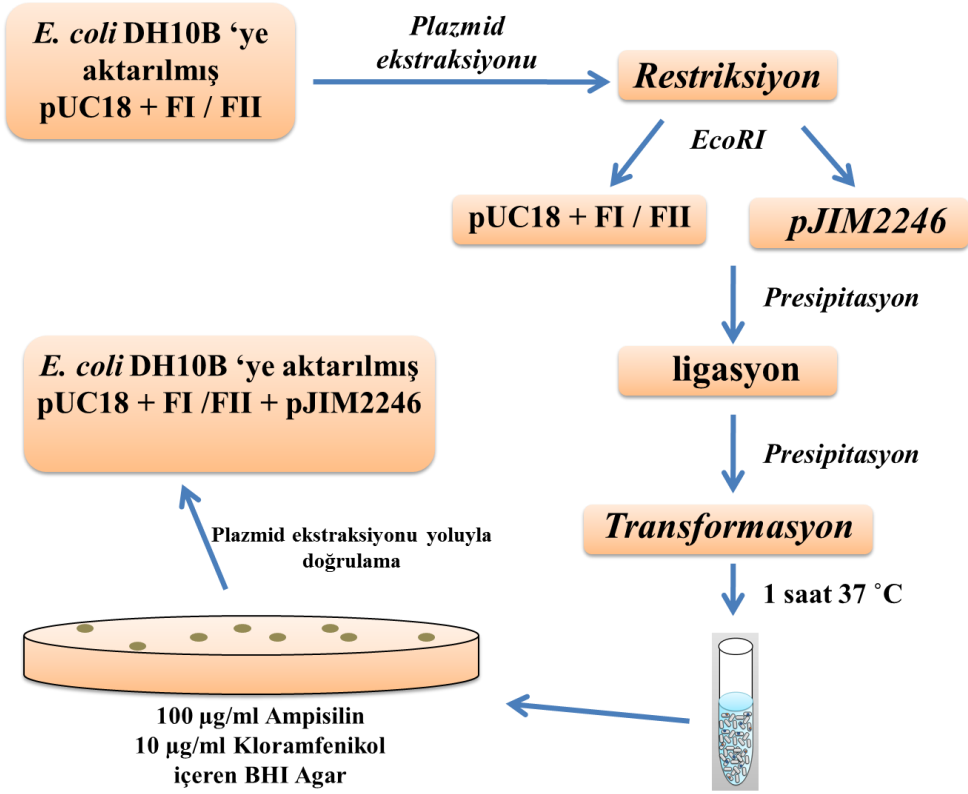
İçinde insert taşıyan rekombinan pUC18 ile füzyon için ligasyonu gerçekleştirilmiş vektörleri elektrotransformasyon *E. coli* DH10B kompetan hücrelerine aktarılmıştır. Bu işlem için ligasyonu yapılmış füzyon plazmidlerinden 10 µl, kompetan hücrelerden ise 100 µl alınmış ve elektrotransformasyon küvetinde birleştirilmişlerdir.

Elektroporatör cihazına (Cellject Duo - Thermo) yerleştirilen küvet, cihazın kapasitansı 15 μF 'e, rezistans 335 Ω 'a ve voltaj 2.5 KV'a getirilmesiyle elektrik şoku verilmiştir. Elektrik şokundan hemen sonra cihazdan alınan küvet içerisine 1 ml BHI broth eklenerek steril bir ependorf tüpü içerisinde 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her bir transformasyon için seçici ampisilin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve kloramfenikol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) içeren BHI agar besiyerine 50 ve 200 μl 'lik hacimler halinde yayma ekim yapılmıştır. Ertesi gün seçici besiyeri üzerinde üreyen koloniler seçilerek değerlendirilmeye alınmıştır.

3.2.2.4. Füzyon plazmidini içeren kolonilerin seçimi

Ampisilin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve kloramfenikol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) içeren BHI agar besiyerinde üreyen kolonilerden seçilmiş ve bu antibiyotikleri içeren BHI broth besiyerinde 37 °C'de inkübe edilerek geliştirilmiştir. Tüpte üreyen transformantlardan daha önce belirtildiği şekilde plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır. Plazmidlerin füzyonu için kullanılan *EcoRI* enzimiyle kesilerek, elektroforezi yapılmış ve plazmidler ayrı ayrı incelenmiştir. Restriksiyon sonrası elektroforez görüntüsünde insert içeren Rekombinan pUC18 ve pJIM2246 büyüklüklerine bakılarak jel üzerinde ayrı ayrı görüldüğünde istenilen doğrulukta olduklarına karar verilmiştir. Doğrulanması yapılan plazmidleri içeren bakteriler üretilip ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C 'de stoklanmıştır.

Bu aşamaya kadar füzyon plazmidini oluşturmak için gerçekleştirilen restriksiyon, ligasyon, transformasyon ve seçici besiyerinden kolonilerin seçimine dayalı basamakların tümü şekil 3.10 'da özetlendiği şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.10: Füzyon plazmidi oluşturma basamakları.

3.2.3. *ermTR* Genini İçeren Füzyon Plazmidlerinin *E. coli* DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131 Bakterilerine Aktarılması

E. coli DH10B, *ermTR* geninin izogenik koşullarda etkisinin gözlemlenebilmesi için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle regülatör bölgesi olan ve regülatör bölgesi olmayan *ermTR* genini içeren pUC18 plazmidi ile füzyonu gerçekleştirilmiş pJIM2246 plazmidleri eritromisin ve klindamisine hassas *E. coli* DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131'e aktararak etkisi gözlemlenmiştir.

E. coli DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131 bakterileri için kompetan hücre eldesi daha önce belirtildiği gerçekleştirilmiştir.

ermTR genini içeren füzyon plazmidlerinin elektrotransformasyon yoluyla aktarımları için elektroporatör cihazına kapasitans 15 μF 'e, rezistans 335 Ω 'a ve voltaj 2.5 KV'a ayarlanarak elektrik şoku verilmiştir. Elektrik şokundan hemen sonra cihazdan alınan küvet içerisine 1 ml BHI broth eklenerek steril bir ependorf tüpü içerisinde 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası her bir farklı bakteri transformasyonu için seçici besiyeri hazırlanmıştır. *E. coli* DB10 için ampisilin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve kloramfenikol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) içeren BHI agar besiyerine 50 ve 200 μl 'lik hacimler halinde yayma ekim yapılmıştır. *E. faecalis* JH2-2 ve *S. aureus* RN4220 için kloramfenikol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) içeren BHI agar besiyerine ekim yapılmıştır. *S. pyogenes* NZ131 için ise kloramfenikol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) içeren %5 koyun kanlı BHI agar besiyerine ekim yapılarak transformantların seçimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) Değerlerinin Belirlenmesi

Bir mikroorganizmanın gözle görülebilir olarak üremesinin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu MİK olarak belirlenir. Antimikrobiyal ajanların MİK değerlerinin tespit edilmesi için dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Dilüsyon testlerinde, antimikrobiyal ajanın dilüsyonlarını içeren mikropalak kuyucuklarında ya da agar yüzeyinde üremenin gözle görülebilir olması temel alınır. Bu tez çalışmasında MİK değerlerinin tespiti için mikrodilüsyon MİK yöntemi uygulanmıştır.

Regülatör bölgesi olan ve regülatör bölgesi olmayan *ermTR* geniyle transforme edilen *E. coli* DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131 bakterileri MİK değerlerinin belirlenmesi için ele alınacaktır. Tüm MİK konsantrasyonları için indüksiyonlu veya indüksiyonsuz olarak 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eritromisin ve klindamisin ölçülerek kullanılmıştır. MİK değerleri eritromisin, ve klindamisin için belirlenmiştir. Regülatör bölgenin indüksiyon yapısı için olduğu kadar regülatörsüz bölge bulunan transformantlar içinde indükleyici olarak klindamisin ve eritromisin kullanılmış, MİK değerleri regülatör bölge bulunan ve

bulunmayan *ermTR* geni ile transforme olmuş *E. coli* DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131 suşları için belirlenmiştir.

CLSI önerileri doğrultusunda 24 saatlik bakteri kültüründeki kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanıp son inokülüm konsantrasyonu 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde, 1/100 oranında sulandırılmıştır. *S. pyogenes* NZ131 için tüm işlemler % 3 at kanı (Horse blood Laked-Sigma) içeren MH broth içerisinde gerçekleştirilmiştir. Steril U tabanlı plaklara 50 µl Mueller-Hinton sıvı besiyeri konmuştur. İlk kuyucuğa 256 µg/ml antibiyotik içeren çözeltiden 50 µl konulup, antibiyotiklerin konsantrasyonları 128-0.06 µg/ml olacak şekilde seri sulandırmaları yapılmıştır. Füzyon plazmidini içeren her bir transformant için MİK ölçüm mikroplağı hazırlanırken bir seride klindamisin, ikinci seride eritromisin ve üçüncü seride ise her bir kuyucuğa 0.5 µg/ml eritromisin ilave edilmiş klindamisin içeren antibiyotik dilüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra antibiyotik içeren kuyucuklara 5 µl bakteri süspansiyonu eklenip 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiş ve gözle üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonları MİK olarak saptanmıştır. Tüm testlerde ilgili referans bakteri kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

3.2.5. Eritromisin – Klindamisin Çift Disk Testi

Eritromisin (15µg) ve klindamisin (2µg) diskleri % 5 koyun kanı içeren Mueller-Hinton Agarda birbirinden 15-20 mm uzaklığa yerleştirilerek fenotipik özellikleri araştırılmıştır. İnkübasyondan sonra klindamisin zonunda kütleşme görülmeyen mikroorganizmalar klindamisine duyarlı, klindamisin diskinin eritromisin diskinin bakan kenarındaki zonda bir kütleşme olması “D” zonu olarak, yani indüklebilir (İMLSB) klindamisin direnci gösterir olarak tanımlanmıştır. Sadece eritromisin dirençli, klindamisin hassas ve klindamisin zonunun eritromisin yönünde kütleşme yoksa M fenotipi, hem eritromisin hem de klindamisin dirençli olanlar konstitütif (KMLSB) fenotip olarak tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

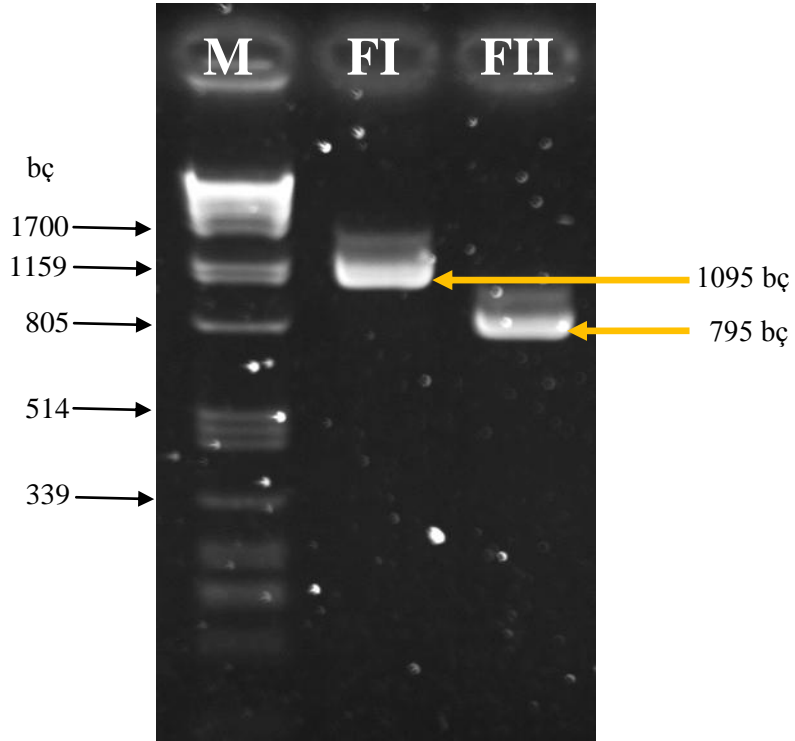
4.1. *S. pyogenes* C1 Suşundan Total DNA Ekstraksiyonu ve Klonlanacak *ermTR* Fragmanlarının Çoğaltılması

S. pyogenes C1 suşundan hedeflenen bölgelerin çoğaltılması için InstaGene Matrix total DNA ekstraksiyon kiti ile yapılan DNA ekstraksiyonu sonrası istenilen bölgelerin amplifikasyonu için modifiye primerlerle PCR işlemi uygulanmıştır.

Bu amaçla kullanılan kendi dizayn ettiğimiz *ermTRFI* ile *ermTRR* primerleri *ermTR* genini regülatör bölgeyi de içerecek şekilde, *ermTRFII* ile *ermTRR* primerleri ise *ermTR* genini regülatör bölgesi olmadan çoğaltmak için kullanılmıştır. Regülatör bölgeyi içeren (FI) *ermTR* geni sekansı 1120 bp, regülatör bölgeyi içermeyen (FII) *ermTR* geni sekansı ise 810 bp 'lik uzunluktadır.

PCR koşulları olarak thermal cycler cihazına başlangıç ayrılması 94 °C 'de 4 dk, ayrılma 94 ° C 'de 45 sn, bağlanma 60 °C 'de 45 sn, uzama 72 ° C'de 90 sn ve son uzama ise 72 °C 'de 10 dk olarak kurulmuş ve 35 döngü gerçekleştirilmiştir.

PCR için 0.2 ml'lik tüplere 50 µl dağıtılacak şekilde PCR miksi hazırlanmış ve *S. pyogenes* C1 suşunun total DNA 'sı ile yukarda belirtilen koşullarda amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Lider peptidi içeren (FI) ve lider peptidi içermeyen (FII) *ermTR* geninin PCR ile çoğaltılmasından sonra elde edilen elektroforez görüntüsü Şekil 4.1 'de gösterilmiştir.

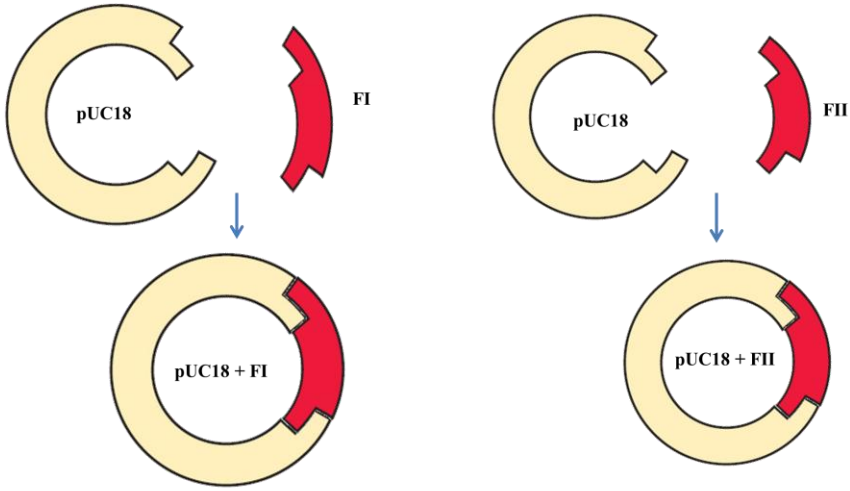


Şekil 4.1: *ermTR* geninin regülatör bölgeyi içeren (FI) ve içermeyen (FII) kısmının PCR ile çoğaltılmasından sonraki elektroforez görüntüsü.

Şekil 4.1 'de görüldüğü gibi regülatör bölgeyi içeren (FI) fragmanı 1095 bç ve regülatör bölgeyi içermeyen (FII) fragmanı ise 795 bç büyüklüğünde çoğaltılmış ve pUC18 vektörüne klonlanmaya hazır hale gelmiştir.

4.2. Çoğaltılan *ermTR* Fragmanlarının pUC18 Vektörüne Ligasyonu ve Elektrotransformasyonu

Her iki fragmanı çoğaltmak için dizayn edilen primerlere doğru ve kolay şekilde klonlamayı sağlamak için forward primerlerine *PstI* ve reverse primerlerine ise *XbaI* restriksiyon enzimlerinin tanıyacağı kesim bölgeleri eklenmiştir. Fragmanların klonlanacağı pUC18 vektörü de aynı enzimlerle kesilmiş ve yapışkan uçların oluşturulmasıyla ligasyon işlemi uygulanmıştır (Şekil 4.2).

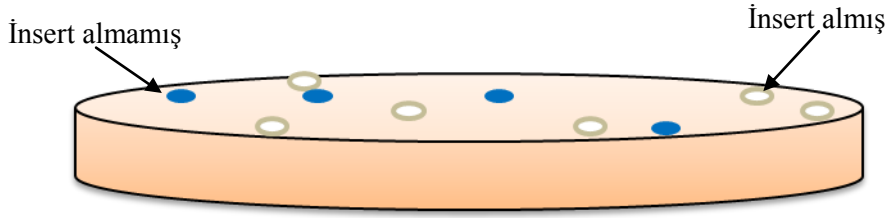


Şekil 4.2: Regülatör bölgeyi içeren (FI) *ermTR* geni fragmanı ile regülatör bölgeyi içermeyen (FII) *ermTR* geni fragmanı ayrı ayrı pUC18 vektörü ile ligasyonu yapılmıştır.

Her bir *ermTR* geni fragmanı (FI ve FII) ayrı ayrı pUC18 vektörü ile ligasyona tabi tutulmuş ve sonrasında elektrotransfomasyon yoluyla *E. coli* DH10B bakterisine transforme edilmiştir.

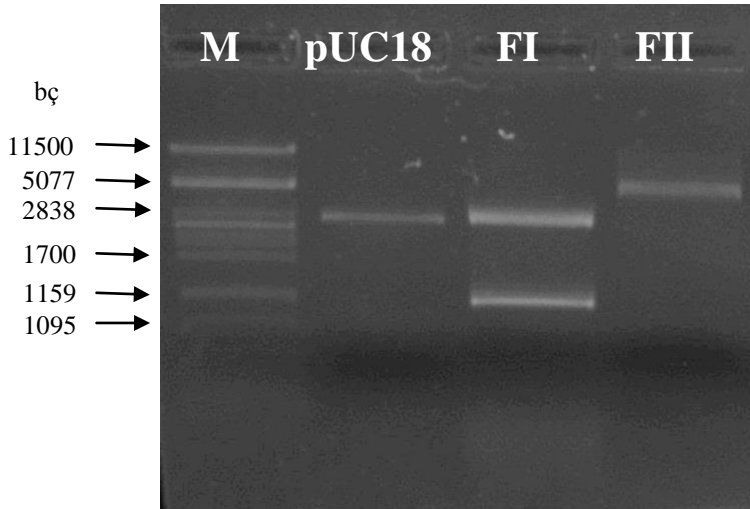
4.3. İnserti Alan Kolonilerin Seçimi ve Doğrulanması

Transformasyon sonrası istenilen insertleri içeren rekombinan plazmidlerin bulunduğu koloniler ampisilin-Xgal-IPTG içeren seçici besiyerinde mavi beyaz koloni ayrımı tekniği ile seçilmişlerdir. Seçici ortamda ampisilin konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Buna göre hiç vektör içermeyen bakteriler seçici besiyerinde üreyememiştir. Yalnızca vektörü içeren bakteriler seçici besiyerinde mavi renkli koloniler oluşturmuş, insertli vektörü içeren bakteriler seçici besiyerinde beyaz renkli koloniler şeklinde üremişlerdir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Ampisilin-Xgal-IPTG içeren seçici besiyerinde mavi beyaz koloni ayrımı.

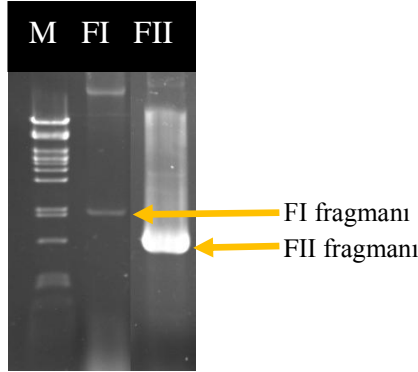
Ampisilin-Xgal-IPTG içeren seçici besiyerinde üreyen beyaz kolonilerden seçilmiş ve plazmid ekstraksiyonu için 100 µg/ml ampisilin içeren 2 ml BHI broth besiyerine ekilerek 37 °C’de inkübe edilmiştir. Tüpte gelişen hücrelerden daha önce belirtildiği şekilde plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır. Rekombinan plazmid *PstI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleriyle kesilip, elektroforezi yapılarak plazmid ve insert incelenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: pUC18 içerisinde klonlanmış *ermTR* fragmanlarının restriksiyon analizi ile gösterilmesi. M ile gösterilen kısım lambda-*PstI* markırıdır. pUC18 ile isimlendirilmiş kısımda insert içermeyen vektör, FI ile gösterilen kısım pUC18 vektörü içerisinde regülatör bölgeyi içeren fragmanı, FII ile gösterilen kısımda ise pUC18 vektörü içerisinde regülatör bölgeyi içermeyen fragmanı göstermektedir.

Şekil 4.4 'de görüldüğü gibi pUC18 vektörü içerisine klonlamak amacıyla kullanılan enzimlerle, plazmid ekstraksiyonu sonrası kesim yapılmış ve insert ile plazmid açığa çıkartılarak doğrulama yoluna gidilmiştir. FI ile gösterilen kısımda tam beklenildiği gibi 1095 bp'lik bir insert, FII ile gösterilen kısımda ise 795 bp'lik bir insert olduğu görülmüştür. pUC18 ile gösterilen kısımda ise linear hale gelmiş yaklaşık 2.7 kb 'lık vektör görülmüştür.

Ayrıca ermTRFI, ermTRFII (Forward) ve ermTRR (Reverse) primerleri kullanılarak pUC18 içerisindeki insert PCR yoluyla çoğaltılmış ve rekombinan plazmidi içeren koloninin doğruluğu teyit edilmiştir. Plazmidin restriksiyon yoluyla doğrulanması için seçilen koloni ekilmiş ve üredikten sonra InstaGene Matrix DNA izolasyon kiti ile DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra dizayn ettiğimiz primerlere ile PCR reaksiyonu kurulmuştur. PCR sonrası elektroforezde beklenen büyüklükte görülen bant klonlamanın konfirmasyonunu sağlamıştır (Şekil 4.5).

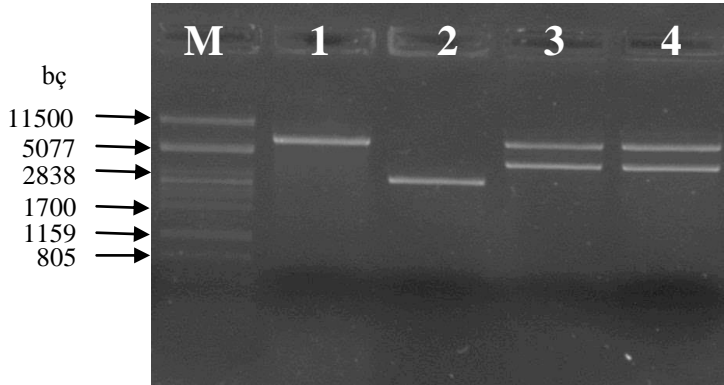


Şekil 4.5: pUC18 vektörü içerisine klonlanmış FI ve FII fragmanlarının PCR ile çoğaltılması.

4.4. pUC18 İçinde İnsert Taşıyan Rekombinan Plazmidlerin pJIM2246 ile Füzyonu

pUC18 vektörü yalnızca Gram negatif bakterilerde çoğalabileceği için Gram pozitif bakterilerde *ermTR* genlerinin ekspresyonu için yeterli değildir. Bu nedenle FI ve FII fragmanlarını taşıyan pUC18 plazmidleri, pJIM2246 plazmidini ile füzyonu yapılmıştır. pJIM2246 plazmidinin seçici markır antibiyotik direnç geni *cat* (kloramfenikol asetil transferaz) olduğundan seçici ortam besiyerinde kloramfenikol kullanılmıştır.

Bu amaçla her iki plazmid *EcoRI* ile kesilmiş ve ligasyon işlemi sonrası elektrotransformasyon yoluyla ligantlar *E. coli* DH10B bakterisine transforme edilmişlerdir. Transformasyon sonrası 1 saat 37 °C'de sıvı BHI brothda üretilen transformantlar 100 µg/ml ampisilin ile 10 µg/ml kloramfenikol içeren seçici besiyerine yayılmış ve ertesi gün bu ortamda gelişen kolonilerden alınarak doğrulukları plazmid analizi ile gösterilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Füzyon işlemi sonrası plazmidlerin füzyon için kullanılan restriksiyon enzimi ile kesilmesi ile her iki vektörün açığa çıkartılması. 1 numaralı kısımda yalnızca pJIM2246, 2 numaralı kısımda pUC18, 3 numaralı kısımda içinde FI fragmanını taşıyan pUC18 ile füzyonu yapılmış pJIM2246, 4 numaralı kısımda ise içinde FII fragmanını taşıyan pUC18 plazmidini ile füzyonu yapılmış olan pJIM2246 plazmidleri görülmektedir. Markır olarak lambda-*PstI* kullanılmıştır.

4.5. Füzyon Plazmidlerinin Eritromisin ve Klindamisine Hassas *E. coli* DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131 Bakterilerine Aktarılması

E. coli DH10B, *ermTR* geninin izogenik koşullarda etkisinin gözlemlenebilmesi için yetersiz kaldığından dolayı füzyon plazmidleri eritromisin ve klindamisine hassas *E. coli* DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131 bakterilerine elektrotransformasyon ile aktararak seçici agar besiyerlerinden koloniler seçilmiştir. Seçilen kolonilerden PCR yoluyla *ermTR* genlerinin varlığı araştırılmış ve uygun büyüklükte bant veren transformantlar stoklanarak ileri çalışmalar için saklanmıştır.

4.6. MİK Değerlerinin Belirlenmesi

MİK değerleri, eritromisin, klindamisin ve 0.05 µg/ml eritromisin ile indüklenmiş klindamisin için regülatör bölge bulunan ve bulunmayan *ermTR* genini taşıyan füzyon plazmidi ile transforme olmuş *E. coli* DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131 bakterileri için ayrı ayrı ölçülmüştür. Ölçümler için CLSI kriterlerine uygun olacak şekilde U tabanlı 96 kuyucuklu mikroplyet plağında mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. *ermTR* genini içermeyen referans bakteriler (*E. coli* DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131) kontrol olarak kullanılmıştır.

4.6.1. *E. coli* DB10 için MİK değerlerinin belirlenmesi

Regülatör bölgeyi içeren ve içermeyen *ermTR* genini taşıyan füzyon plazmidi, eritromisin ve klindamisine hassas *E. coli* DB10 bakterisine transformasyon yoluyla aktarılmış ve mikrodilüsyon MİK ölçümü yoluyla değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1: *ermTR* genleri aktarılmış *E. coli* DB10 bakterisinde MİK ölçüm değerleri.

	Klindamisin	Klindamisin + Eritromisin (0.05 µg/ml)	Eritromisin
<i>E. coli</i> DB10	8	< 0.06	0.5
<i>E. coli</i> DB10 içinde <i>ermTR</i>+rb	> 256	> 256	16
<i>E. coli</i> DB10 içinde <i>ermTR</i>	> 256	> 256	8

Tablo 4.1 'de görüldüğü gibi regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+rb) plazmidin aktarıldığı *E. coli* DB10 bakterisinde klindamisin için MİK değeri 256 µg/ml 'nin üzerinde, eritromisin için MİK değeri ise 16 µg/ml olarak bulunmuştur. Eritromisin ile indüklendiği zaman ise klindamisin MİK değeri yine 256 µg/ml 'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığı *E. coli* DB10 bakterisinde klindamisin için MİK değeri 256 µg/ml 'nin üzerinde, eritromisin için MİK değeri ise 8 µg/ml olarak bulunmuştur. Eritromisin ile indüklendiği zaman ise klindamisin MİK değeri yine 256 µg/ml 'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Kontrol olarak kullanılan ve *ermTR* genine sahip olmayan *E. coli* DB10 bakterisinde MİK değerleri klindamisin için 8 µg/ml, eritromisin için 0.5 µg/ml ve eritromisinle indüklenmiş klindamisin için ise 0.06 µg/ml'nin altında ölçülmüştür.

Kontrol bakterisine göre eritromisin için MİK değeri regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+rb) *ermTR* geni aktarıldığında 32 kat, regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığında 16 kat artış olduğu görülmüştür. Klindamisin için MİK değeri *ermTR*+rb ve *ermTR* genleri için 32 'şer katın üzerinde arttıkları görülmüştür. 0.05 µg/ml eritromisin ile indüklenmiş klindamisin için regülatör bölge bulunan ve bulunmayan *ermTR* geninin aktarıldığı durumda MİK değeri kontrole göre 4266 katın üzerinde arttığı görülmüştür.

4.6.2. *E. faecalis* JH2-2 için MİK değerlerinin belirlenmesi

Regülatör bölgeyi içeren ve içermeyen *ermTR* genini taşıyan füzyon plazmidi, eritromisin ve klindamisine hassas *E. faecalis* JH2-2 bakterisine transformasyon yoluyla aktarılmış ve mikrodilüsyon MİK ölçümü yoluyla değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2: *ermTR* genleri aktarılmış *E. faecalis* JH2-2 bakterisinde MİK ölçüm değerleri.

	Klindamisin	Klindamisin + Eritromisin (0.05 µg/ml)	Eritromisin
<i>E. faecalis</i> JH2-2	4	<0.06	2
<i>E. faecalis</i> JH2-2 içinde <i>ermTR</i> + <i>rb</i>	>256	>256	32
<i>E. faecalis</i> JH2-2 içinde <i>ermTR</i>	>256	>256	8

Tablo 4.2 'de görüldüğü gibi regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+*rb*) *ermTR* geninin aktarıldığı *E. faecalis* JH2-2 bakterisinde klindamisin için MİK değeri 256 µg/ml 'nin üzerinde, eritromisin için MİK değeri ise 32 µg/ml olarak bulunmuştur. Eritromisin ile indüklendiği zaman ise klindamisin MİK değeri yine 256 µ/ml 'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığı *E. faecalis* JH2-2 bakterisinde klindamisin için MİK değeri 256 µg/ml 'nin üzerinde, eritromisin için MİK değeri ise 8 µg/ml olarak bulunmuştur. Eritromisin ile indüklendiği zaman ise klindamisin MİK değeri yine 256 µ/ml 'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Kontrol olarak kullanılan ve *ermTR* genini içermeyen *E. faecalis* JH2-2 bakterisinin MİK değerleri klindamisin için 4 µg/ml, eritromisin için 2 µg/ml ve eritromisinle indüklenmiş klindamisin için ise 0.06 µg/ml'nin altında ölçülmüştür.

Kontrol bakterisine göre eritromisin için MİK değeri regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+rb) *ermTR* geni aktarıldığında 16 kat, regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığında 4 kat artış olduğu görülmüştür. Klindamisin için MİK değeri *ermTR*+rb ve *ermTR* genleri için 64 katlık artışın üzerinde oldukları görülmüştür. 0.05 µg/ml eritromisin ile indüklenmiş klindamisin için regülatör bölge bulunan ve bulunmayan *ermTR* geninin aktarıldığı durumda MİK değeri kontrole göre 4266 katın üzerinde arttığı görülmüştür.

4.6.3. *S. aureus* RN4220 için MİK değerlerinin belirlenmesi

Regülatör bölgeyi içeren ve içermeyen *ermTR* genini taşıyan füzyon plazmidi, eritromisin ve klindamisine hassas *S. aureus* RN4220 bakterisine transformasyon yoluyla aktarılmış ve mikrodilüsyon MİK ölçümü yoluyla değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3: *ermTR* genleri aktarılmış *S. aureus* RN4220 bakterisinde MİK ölçüm değerleri.

	Klindamisin	Klindamisin + Eritromisin (0.05 µg/ml)	Eritromisin
<i>S. aureus</i> RN4220	0.5	<0.06	1
<i>S. aureus</i> RN4220 içinde <i>ermTR</i> +rb	>256	>256	64
<i>S. aureus</i> RN4220 içinde <i>ermTR</i>	256	256	32

Çizelge 4.3 'de görüldüğü gibi regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+rb) *ermTR* geninin aktarıldığı *S. aureus* RN4220 bakterisinde klindamisin için MİK değeri 256 µg/ml 'nin üzerinde, eritromisin için MİK değeri ise 64 µg/ml olarak bulunmuştur. Eritromisin ile indüklendiği zaman ise klindamisin MİK değeri yine 256 µg/ml 'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığı *S. aureus* RN4220 bakterisinde klindamisin için MİK değeri

256 µg/ml, eritromisin için MİK değeri ise 32 µg/ml olarak bulunmuştur. Eritromisin ile indüklendiği zaman ise klindamisin MİK değeri 256 µ/ml olduğu görülmüştür. Kontrol olarak kullanılan ve *ermTR* genini içermeyen *S. aureus* RN4220 bakterisinin MİK değerleri klindamisin için 0.5 µg/ml, eritromisin için 1 µg/ml ve eritromisinle indüklenmiş klindamisin için ise 0.06 µg/ml'nin altında ölçülmüştür.

Kontrol bakterisine göre eritromisin için MİK değeri regülatör bölgeyi içeren (*ermTR+rb*) *ermTR* geni aktarıldığında 64 kat, regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığında 32 kat artış olduğu görülmüştür. Klindamisin için MİK değeri *ermTR+rb* aktarıldığında 512 katın üzerinde ve yalnızca *ermTR* geni aktarıldığında ise 512 katlık artış görülmüştür. 0.05 µg/ml eritromisin ile indüklenmiş klindamisin için regülatör bölge bulunan (*ermTR+rb*) *ermTR* geni aktarıldığında 4266 katın üzerinde, regülatör bölge bulunmayan *ermTR* geninin aktarıldığı durumda MİK değeri kontrole göre 4266 kat arttığı görülmüştür.

4.6.4. *S. pyogenes* NZ131 için MİK değerlerinin belirlenmesi

Regülatör bölgeyi içeren ve içermeyen *ermTR* genini taşıyan füzyon plazmidi, eritromisin ve klindamisine hassas *S. pyogenes* NZ131 bakterisine transformasyon yoluyla aktarılmış ve mikrodilüsyon MİK ölçümü yoluyla değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: *ermTR* genleri aktarılmış *S. pyogenes* NZ131 bakterisinde MİK ölçüm değerleri.

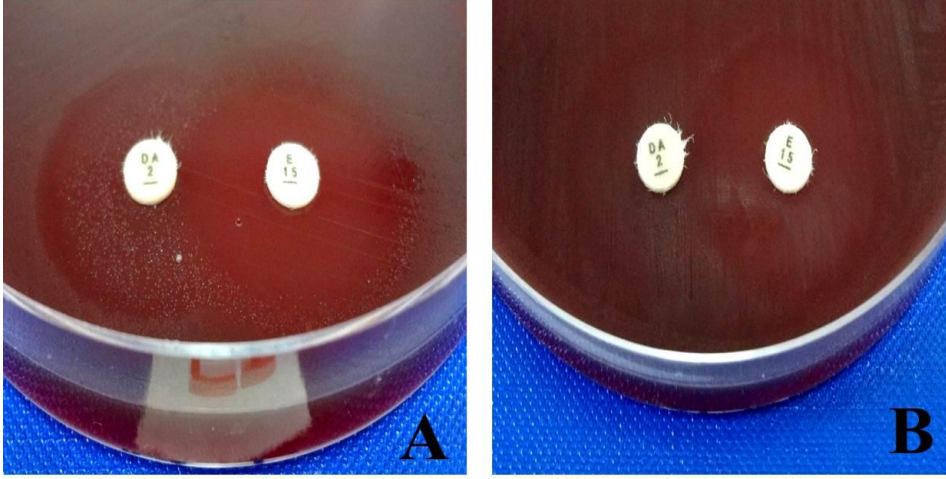
	Klindamisin	Klindamisin + Eritromisin (0.05 µg/ml)	Eritromisin
<i>S. pyogenes</i> NZ131	< 0.06	< 0.06	0.25
<i>S. pyogenes</i> NZ131 içinde <i>ermTR+rb</i>	4	>128	8
<i>S. pyogenes</i> NZ131 içinde <i>ermTR</i>	128	128	8

Çizelge 4.3 'de görüldüğü gibi regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+*rb*) *ermTR* geninin aktarıldığı *S. pyogenes* NZ131 bakterisinde klindamisin için MİK değeri 4 µg/ml, eritromisin için MİK değeri ise 8 µg/ml olarak bulunmuştur. Eritromisin ile indüklendiği zaman ise klindamisin MİK değeri yine 128 µ/ml 'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığı *S. pyogenes* NZ131 bakterisinde klindamisin için MİK değeri 128 µg/ml, eritromisin için MİK değeri ise 8 µg/ml olarak bulunmuştur. Eritromisin ile indüklendiği zaman ise klindamisin MİK değeri 128 µ/ml olduğu görülmüştür. Kontrol olarak kullanılan ve *ermTR* genini içermeyen *S. pyogenes* NZ131 bakterisinin MİK değerleri klindamisin için >0.06 µg/ml, eritromisin için 0.25 µg/ml ve eritromisinle indüklenmiş klindamisin için ise 0.06 µg/ml'nin altında ölçülmüştür.

Kontrol bakterisine göre eritromisin için MİK değerinde regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+*rb*) ve içermeyen *ermTR* geni aktarıldığında 32 kat artış olduğu görülmüştür. Klindamisin için MİK değeri *ermTR*+*rb* aktarıldığında 66 kat, yalnızca *ermTR* geni aktarıldığında ise 2133 katlık artış görülmüştür. 0.05 µg/ml eritromisin ile indüklenmiş klindamisin için regülatör bölge bulunan (*ermTR*+*rb*) *ermTR* geni aktarıldığında 2133 katın üzerinde, regülatör bölge bulunmayan *ermTR* geninin aktarıldığı durumda MİK değeri kontrole göre 2133 kat arttığı görülmüştür.

4.7. Eritromisin – Klindamisin Çift Disk Testi

S. pyogenes NZ131 bakterisine regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+*rb*) ve içermeyen *ermTR* geni aktarıldıktan sonra fenotipik özellikleri Eritromisin (15µg) ve klindamisin (2µg) diskleri % 5 koyun kanı içeren Mueller-Hinton Agarda birbirinden 15-20 mm uzaklığa yerleştirilerek araştırılmıştır (Şekil 4.7).

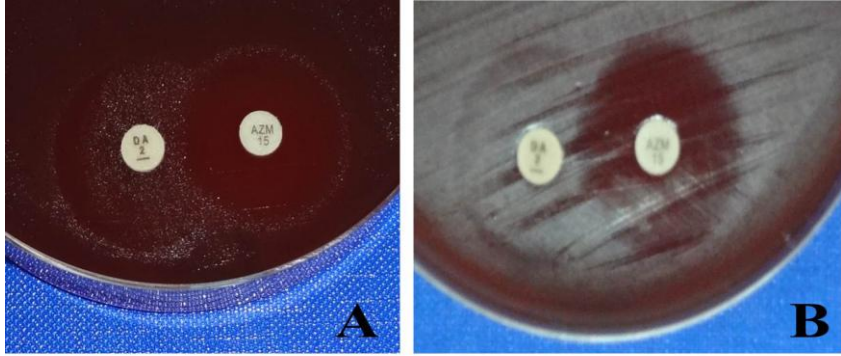


Şekil 4.7: Eritromisin direnç fenotipi. A ile gösterilen şekilde regülatör bölgeyi içeren (*ermTR+rb*) *ermTR* geninin aktarıldığı *S. pyogenes* NZ131 bakterisinin eritromisin-klindamisin çift disk testi ile verdiği fenotip görülmektedir. B ile gösterilen kısımda ise regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığı *S. pyogenes* NZ131 bakterisindeki fenotip görülmektedir.

Şekil 4.7 'den de anlaşılacağı gibi A ile gösterilen kısımda regülatör bölgeyi içeren (*ermTR+rb*) *ermTR* geninin aktarıldığı *ermTR* genini içeren *S. pyogenes* NZ131 bakterisinde eritromisinin indükleyebildiği yere kadar, klindamisin zonu içerisinde bir üreme görülmektedir. Şekilde B ile gösterilen regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geni aktarılmış *S. pyogenes* NZ131 bakterisinde ise klindamisin zonu içerisinde tamamen bir üreme görülmektedir.

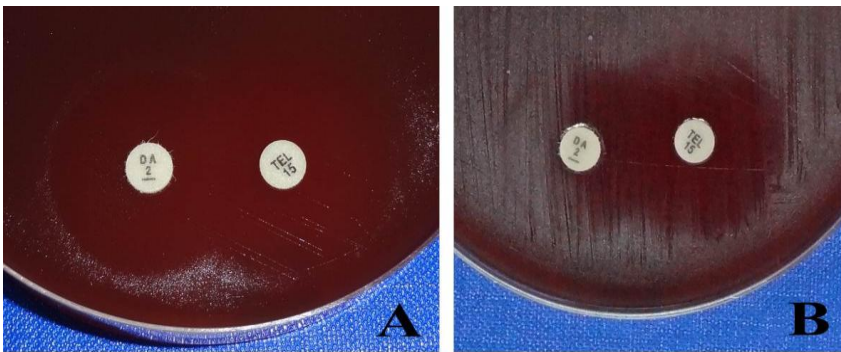
4.7.1. Eritromisinden başka diğer Makrolidlerle fenotipin incelenmesi

Eritromisin – Klindamisin çift disk testi, eritromisin yerine 15 üyeli bir makrolid üyesi olan azitromisin ile ketolid grubu bir makrolid olan telitromisin ile de denenmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8: Azitromisin için direnç fenotipi. Şekilde A ile gösterilen kısımda regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+*rb*) *ermTR* geninin aktarıldığı *S. pyogenes* NZ131 bakterisinin azitromisin-klindamisin çift disk testi ile verdiği fenotip görülmektedir. B ile gösterilen kısımda ise regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığı *S. pyogenes* NZ131 bakterisindeki fenotip görülmektedir.

A ile gösterilen kısımda regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+*rb*) *ermTR* geninin aktarıldığı *ermTR* genini içeren *S. pyogenes* NZ131 bakterisinde azitromisinin indükleyebildiği yere kadar, klindamisin zonu içerisinde bir üreme görülmektedir. Şekilde B ile gösterilen regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geni aktarılmış *S. pyogenes* NZ131 bakterisinde ise klindamisin zonu içerisinde tamamen bir üreme görülmektedir.



Şekil 4.9: Telitromisin için direnç fenotipi.

Şekilde A ile gösterilen kısımda regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+*rb*) *ermTR* geninin aktarıldığı *S. pyogenes* NZ131 bakterisinin telitromisin-klindamisin çift disk testi ile verdiği fenotip görülmektedir. B ile gösterilen kısımda ise regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geninin aktarıldığı *S. pyogenes* NZ131 bakterisindeki fenotip görülmektedir.

A ile gösterilen kısımda regülatör bölgeyi içeren (*ermTR*+*rb*) *ermTR* geninin aktarıldığı *ermTR* genini içeren *S. pyogenes* NZ131 bakterisinde telitromisinin indükleyici etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekilde B ile gösterilen regülatör bölgeyi içermeyen *ermTR* geni aktarılmış *S. pyogenes* NZ131 bakterisinde ise klindamisin zonu içerisinde sadece telitromisinin etkili olamadığı diğer kısımda üreme görülmektedir.

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 kullanıma 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 geçmiştir.

erm genleriyle, *S. pneumoniae* eritromisine ve klaritromisine (14 üyeli makrolidlere) ve Azitromisin (15 üyeli makrolidlere) dirençli olmaktadır. Eğer direnç mekanizması indüklenebilir ise, bu bakteriler klindamisine duyarlı olmaktadır. Bununla birlikte, tedavide klindamisin kullanımı güvenli olmamaktadır, çünkü klindamisin pnömokoklarda direnci indüklemektedir. Telitromisin gibi ketolidler, direnci indüklemezler ve *ermB* ile meydana gelmiş enfeksiyonun tedavisinde kullanımı güvenlidir. Ayrıca çok az bir orandaki suşlarda, *ermB* ile telitromisine direnç gelişmiştir. *ermB* geni tarafından kodlanan metilazlar ve bazı *ermTR* genleri *S. pyogenes*'e karşı telitromisinin aktivitesini değiştirir. Sonuç olarak bazı genlerin *S. pneumoniae* 'e ve *S. pyogenes* 'e karşı etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır.

Erm metilazları arasında *ermA*, *ermB* ve *ermC* en çok çalışılanlarıdır. Ancak *ermTR* metilazları çok az çalışılmıştır. Diğer metilazlardan farklı olarak *ermTR* de iki önemli nokta vardır:

- a) *ermTR* ile gerçekleşen direnç düzeyi yüksek değildir: diğer metilazlar için >128mg/L olan MİK değeri bu metilazda 4mg/L' dir.
- b) Eritromisinle indüksiyonda eritromisin direnci artmazken linkomisin direnci artar. (Syrogiannopoulos vd., 2003)

ermTR geni, PCR ile varlığı tespit edilmiş ve streptokoklarda en yaygın makrolid direnç mekanizmasıdır. Fakat izogenik ortamda bu genin makrolid hassasiyetine etkisi çalışılmamıştır. Çalışmamız fenotipik olarak diğer *erm* genlerinden farklı olan ErmTR metilazının etkisinin izogenik olarak çalışıldığı ilk çalışma olma özelliği göstermektedir.

Bu çalışma ile özellikle aşağıda belirtilen başlıklar altında yatan sorular aydınlatılmaya çalışılmıştır.

- i) *ermTR* geninin makrolid hassasiyeti üzerindeki etkisi
- ii) *ermTR* geni regülatör bölgesinin etkisinin anlaşılması
- iii) Regülatör bölgesi ve bölgesiz *ermTR* genlerinin aktarılmasıyla elde edilen MİK düzeylerinin değerlendirilmesi
- iv) *ermTR* 'nin bir direnç mekanizması olup olmadığı

Fines (2001) ve arkadaşları antibiyotik baskısı altında *ermTR* geninin regülatör bölgesinde mutasyon oluşturmuş ve bu bölge eritromisine ve klindamisine hassas *E. coli* DB10 bakterisine aktarmışlardır. Mutantlarda ölçülen MİK değerlerinde klindamisinde 128 katın üzerinde bir artış gözlenirken, eritromisin MİK değerinde bir değişiklik olmamıştır. Ayrıca, eritromisin duyarlılığı 1 µg/ml ve klindamisin duyarlılığı 0.03 µg/ml olan *S. pyogenes* UCN1 klinik izolatında, 0.12 ile 1 µg/ml 'lik konsantrasyonlarda klindamisin baskısı uygulanmıştır. Bu baskı sonucunda klindamisin MİK değeri 64 µg/ml olurken, eritromisinin değeri değişmemiştir. Fines ve arkadaşları regülatör bölgedeki meydana gelen değişiklikleri incelemiş fakat bu değişikliklerin etkileri üzerine çalışmamışlardır.

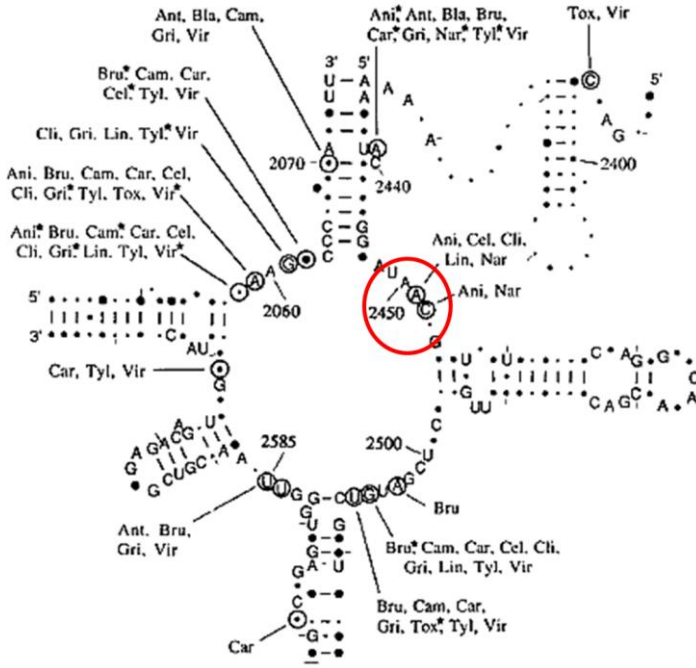
Syrogianopoulos ve arkadaşları (2003), *ermTR* geni içeren *S. pneumoniae* izolatlarında indüksiyonlu ve indüksiyonsuz eritromisin, klindamisin ve miyokamisin MİK değerlerine bakmışlardır. Buna göre herhangi bir indüksiyon olmadan yapılan ölçümde bu üç antibiyotik için MİK değerleri düşük bulunmuştur. Yalnızca eritromisin ile indüksiyon sonrasında klindamisin MİK değerinin oldukça fazla oranda arttığı bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda ise herhangi bir antibiyotik baskısı uygulanmadan izogenik olarak regülatör bölgeyi içeren ve içermeyen *ermTR* geni ayrı ayrı *E. coli* DB10, *E. faecalis* JH2-2, *S. aureus* RN4220 ve *S. pyogenes* NZ131 suşlarına aktarılarak eritromisin, klindamisin ve 0.05 µg/ml eritromisinle indüklenmiş klindamisin için MİK değerleri ölçülmüştür. Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4 'de görüldüğü gibi klindamisin MİK değerleri oldukça yüksek oranda artarken, eritromisin MİK değerlerindeki artış düşük kalmıştır. Ayrıca *S. pyogenes* NZ131 suşunda regülatör bölgeyi içermeyen (konstitütif) *ermTR* geni için yapılan MİK ölçümünde, regülatör bölgeyi içeren suşa göre daha çok oranda klindamisin MİK artışı saptanmıştır. Bu suşta regülatör bölgeyi içeren ve içermeyen *ermTR* genleri için yapılan ölçümlerde eritromisin MİK değerlerinin aynı olduğu ve düşük kaldığı görülmüştür.

Çalışmamız ErmTR ile diğer ErmA ve ErmB gibi metilazlar arasında iki ana fark ortaya koymuştur.

- i) ErmTR'nin sağladığı eritromisin direnç düzeyi düşüktür.
- ii) Klindamisine direnç düzeyi makrolidler için sağladığı dirençten daha fazladır.

ErmA ve ErmB 'nin 23S rRNA 'daki 2058. pozisyondaki adenini metillemeleri yüksek düzey eritromisin direnci sağlamaktadır. Bu metilazlarda yalnızca sürekli sentez halinde klindamisine yüksek düzey direnç görülmektedir. O halde, ErmTR farklı direnç fenotipi gösterdiğinden A2058 dışında bir bazı metilleme olasılığı ileri çalışmalarla gösterilmelidir. Krillov ve arkadaşlarının (1997) çalışmasında peptidil transferaz merkezi üzerinde etkilenen bölgelerde hangi antibiyotiklere direnç geliştiği gösterilmiştir (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. : Peptidil transferaz merkezinin ikincil yapısı.

ErmTR 'nin, ErmA ve ErmB metilazlarından farklı olarak eritromisine düşük düzeyde, klindamisine ise yüksek düzeyde direnç göstermesi 2058. pozisyon dışında Krillov ve arkadaşlarının (1997) Şekil 5.1 'de görüldüğü gibi peptidil transferaz merkezi üzerinde belirttiği 2451. pozisyondaki adeninin metillenmesi durumunu olası kılmaktadır. Daha ileri çalışmalarla bu bölgedeki metilasyonun kanıtı aranmalıdır.

Çalışmamız genel olarak *S. pyogenes* ile ilişkili olan ve bu bakterilerde daha sıklıkla rastlanan *ermTR* geninin izogenik koşullardaki etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olması özelliği yanında, etkisinin *S. aureus*, *E. faecalis* için gözlemlendiği ilk çalışma olmasıyla da ayrı bir önem taşımaktadır. Fines ve arkadaşları (2001) *ermTR* regülatör bölgesinde oluşturdukları mutasyonun etkisini yalnızca eritromisin ve klindamisine hassas *E.coli* DB10 suşunda ve *S.pyogenes* UCN1 ve UCN5suşlarında denemişlerdir.

Jalava ve arkadaşları (2001), diğer makrolidlere dirençli suşlarda dahil olmak üzere, çeşitli Gram pozitif bakterilere karşı telitromisin kullanılabilirliğini göstermişlerdir. Bu çalışmaya göre telitromisin MİK 'lerini yalnızca konstitutif *ermB* direnç genini taşıyan *S. pyogenes* suşları için yüksek bulmuşlardır. Konstitutif *ermB* direnç genine sahip *S. pyogenes* suşlarının dağılımının düşük olduğu ülkelerde telitromisin güvenli bir şekilde kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz diğer bir çıktı ise ketolid grubundan olan telitromisin ile yaptığımız çift disk testi ile göze çarpmaktadır. Şekil 4.9 B kısmında görüldüğü gibi regülatör bölgeyi içermeyen yani sentezin sürekli (konstitutif) olduğu durumda telitromisin klindamisin direncini indükleyici etkisinin olmadığı ve *ermTR* direnç genine sahip *S. pyogenes* bakterilerinde tedavide kullanılabileceğinin göstergesi olmuştur.

Bu tez çalışmasında eritromisin direnç geni olan *ermTR* geninin regülatör bölgesi ve bölgesiz etkisi gözlemlenmiş ve buna görede, eritromisin direnci düşük düzeyde kalırken klindamisin direncinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durumdan yola çıkılarak kurulan hipoteze göre ErmTR metilazı 23S rRNA nın V no'lu domaininde bulunan 2058. pozisyondaki adeninden farklı olarak başka bir bölgeyi metilleme olasılığı mevcuttur. Bu durumun açıklığa kavuşturulması ve bilim dünyasına sunulması için daha ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aydın, K. 2007. Makrolidler ve linkozamidler. **Ankem Dergi**, 21(Ek 2):57-61, Erişim [<http://www.ankemdernegi.org.tr>]
- Bannerman, T.L., Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H. 2003. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase positive cocci that grow aerobically. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed., ASM Press, pp 384-404. Washington D.C.
- Bemer-Melchior, P., Juvin, M.E., Tassin, S., Bryskier, A., Schito, G.C., Drugeon, H.B. 2000. In vitro Activity of the new ketolide telithromycin compared with those of macrolides against *Streptococcus pyogenes*: Influences of resistance mechanisms and methodological factors. **Antimicrob Agents Chemother**, 2999-3002.
- Bisno, A.L., Rijn, I.V.D. 2000. Classification of Streptococci. In: Principles and Practice of Infectious Diseases (Mandell GL, Bennett JE, Dolin RI) 5th ed. pp. 186-188 Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Bozdogan, B., Appelbaum, P.C., Kelly, L.M., Hoellman, D.B., Tambic-Andrasevic, A., Drukalska, L. ve ark. 2003. Activity of telithromycin compared with seven other agents against 1039 *Streptococcus pyogenes* pediatric isolates from ten centers in central and eastern Europe. **Clin Microbiol Infect**, 9: 741-5.
- Bozdogan, B., Appelbaum, P.C., 2004. Macrolide resistance in Streptococci and *Haemophilus influenzae*. **Clin Lab Med**, 24(2):455-75
- Centers for Disease Control (CDC) and Prevention. 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, Morb. Mortal. Wkly. 51: 565–67.
- Chambers, H.F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerg Infect Dis**; 7: 178-82.
- CLSI. 2006. M7- A7, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.

- Dutka-Malen, S., Leclercq, R., Coutant, V., et al. 1996. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptides resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 34: 1875-9.
- Dzidik, S., Suskovic, J., Kos, B. 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. Antibiotic resistance in bacteria, Food Technol. *Biotechnol*, 46 (1) 11–21.
- Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N., Wenzel, R.P. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a 3-year analysis. *Clin Infect Dis*; 29: 239-44. USA.
- Fines, M., Gueudin, M., Ramon, A., Leclercq, R. 2001. In vitro selection of resistance to clindamycin related to alterations in the attenuator of the erm(TR) gene of *Streptococcus pyogenes* UCN1 inducibly resistant to erythromycin. *J Antimicrob Chemother*, 48(3):411–6.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S. 2002. *Streptococcus, Enterococcus, and Similar Organisms. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed. St. Louis: Mosby. pp. 298-315.
- Garrity, G., Holt, J.G. 2000. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: an overview of the road map to the manual*. New York: Bergey's Manual Trust.
- Giovanetti, E., Magi, G., Brenciani, A., Spinaci, C., Lupidi, R., Facinelli, B., Varaldo, P.E. 2002. Conjugative transfer of the erm(A) gene from erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* to macrolide-susceptible *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*. *J Antimicrob Chemother*, 50(2):249-52.
- Gonzales, J.J., Andreu, A., and the Spanish Group for the Study of Perinatal Infection from the Spanish Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2005. Multicenter study of the mechanisms of resistance and clonocal relationships of *Streptococcus agalactiae* isolates resistant to macrolides, lincosamides, and ketolides in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2525-2527.

- Hajek, V., Meugnier, H., Bes, M. et al. 1996. *Staphylococcus saprophyticus* subs. *Bovis* subs. *nov.* isolated from bovine nostrils. ***Int. J Syst. Bacteriol***, 46: 792–96.
- Horinouchi, S., Byeon, W.H., 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.
- Jalava, J., Kataja, J., Seppala, H., Huovinen, P: 2001. In vitro activities of the novel ketolide telithromycin (HMR 3647) against erythromycin- resistant *Streptococcus* species. ***Antimicrob Agents Chemother***, 45:789-93.
- Kataja, J., Huovinen, P., Skurnik, M., Seppala, H. 1999. Eritromisin resistance genes in group a streptococci in finland: the finnish study group for antimicrobial resistance. ***Antimicrob Agents***, 43: 48–52.
- Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. 2005. Streptococcus and Enterococcus. ***Medical Microbiology***, 234-244.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. 1992. The Gram-positive cocci part II: streptococci and streptococcus-like bacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. pp.11 J.B.Lippincott Company, Philadelphia.
- Koren, G. 1997. Therapeutic drug monitoring principles in the neonate. ***Clinical Chemistry***, 43:1 222-227.
- Leblebicioğlu, H., Ulusoy, S., Usluer, G. 2003. Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler. Bilimsel Tıp, Ankara.
- Leclercq, R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. ***Clin Infect Dis***, 15;34(4):482-92.
- Lehman, D.C., Mahon, C.R., Suvarna, K. 2007. Streptococcus, Enterococcus, and other catalase-negative gram-positive cocci. ***Text Book of Diagnostic Microbiology***. Third ed. Saunders, an imprint of elsevier inc. pp. 382-395.

- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., 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, D.M. 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 8: 557-84.
- Mandell, G.L., Bennett, J.E., and Dolin, R. 2005. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier, pp 2361-2457, Philadelphia.
- McGee, L., Klugman, K.P., 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.
- McManus, M.C. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm*, 54: 1420-33.
- Medeiros, A.A. 2007. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of, β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*, 24: 19-45.
- Opal, S.M., Pop-Vicas, A. 2010. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, (eds). Principles and Practise of Infection Diseases, 7th ed. Churchill Livingston Elsevier, pp 279-95, Philadelphia.
- Panlilio, A.L., Culver, D.H., Gaynes R.P., Banerjee S, Henderson T.S., Tolson J.S., Martone W.J. 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol*. pp.582-586.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., Seppala, H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. 43:2823–30.
- Rosato, A., Vicarini, H., Bonnefoy, A., Chantot, J.F., 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, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S., Wootton, J.C. 1990. Inducible eritromisin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. 4:1207–14.
- Ruoff, K.L., Whiley, R.A., Beighton, D. 2003. Streptococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, editör. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. pp. 405-421 ASM Press, Washington.
- Santagati, M., Iannelli, F., Oggioni, M.R., Stefani, S., Pozzi, G. 2000. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. 44: 2585–7.
- Schmitz, F.J., Jones, M.E. 1997. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? *Int J Antimicrob Agents*, 9: 1-19.
- Schmitz, F.J., Sadurski, R., Kray, A., vd. 2000. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. 45:891–4.
- Seppälä, H., Skurnik, M., Soini, H., Roberts, M.C., Huovinen, P. 1998. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(2):257-62.
- Stratton, C.W. 1996. Mechanisms of Action for Antimicrobial Agents. General Principles and Mechanisms for Selected Classes of Antibiotics, in Lorian V. (ed.) Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed. Williams & Wilkins, 579-603, Baltimore.
- Syrogianopoulos, G.A., Grivea, I.N., Ednie, L.M., vd. 2003. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance inducibility of *Streptococcus pneumoniae* carrying *erm(A)*, *erm(B)*, or *mef(A)*. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:2699–702.

- Syrogiannopoulos, G.A., Grivea, I.N., Tait-Kamradt, A., vd. 2001. Identification of an *erm(A)* eritromisin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Greece. ***Antimicrob Agents Chemother***, 45:342–4.
- Tait-Kamradt, A., Davies, T., Appelbaum, P.C., vd. 2000. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. 44:3395–401.
- Tenover, F.C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. ***Am J Med***, 119: 3-10.
- Varaldo, P.E., Debbia, E.A., Nicoletti, G., Pavesio, D., Pipa, S., Schito, G.C., Tempera, G., and the Artemis-Italy Study Group. 1999. Nationwide Survey in Italy of Treatment of *Streptococcus pyogenes* Pharyngitis in Children: Influence of Macrolide Resistance on Clinical and Microbiological Outcomes. ***Clin Infect Dis***, 29: 869-73.
- Waldvogel, F.A. 2000. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Benett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. pp. 2069-2089 Churchill Livingstone, New York.
- Weisblum, B. 1995. Eritromisin resistance by ribosome modification. ***Antimicrob Agents Chemother***, 39:577–85.
- Wilke, T.A., Söyletir, G., Doğanay, M. 2002. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Cilt 2 Etkenlere Göre İnfeksiyonlar. pp. 1467-1497.
- Winn, C.W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenber, P., Woods, G., 2006. editör. Gram-Positive Cocci Part II: Streptococci, Enterococci, and the “Streptococcus-Like Bacteria”. Koneman’s Kolor Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. 13:672-764 J.B.Lippincott Company, Philadelphia.;
- Woodford, N., Ward, M.E., Kaufmann, M.E., vd. 2004. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extendedspectrum beta-lactamases in the UK. ***J Antimicrob Chemother***, 54: 735-43.
- Zhong, P., Cao, Z., Hammond, R., vd. 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 : Erman ORYAŞIN

Doğum Yeri ve Tarihi : Çorum, 27-05-1981

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

Basbulbul G., Biyik H., Kalyoncu F., Kalmis E., **Oryasin E.** Determination of Microfungi Flora of Soil Polluted by Industrial Wastewater in Aydın, İzmir and Manisa City. **Ekoloji** 20, 80, 66-73 (2011).

Basbulbul Ozdemir G., **Oryasin E.**, Biyik H. H., Ozteber M., Bozdogan B. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Enterococcal Isolates of Different Sources. **Indian J Microbiol**, doi:10.1007/s12088-011-0143-0 (2011).

Turkyılmaz, S., Tekbıyık, S., **Oryasin, E.**, Bozdogan, B. “Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Milk” **Zoonoses Public Health**, 57, 197-203 (2010).

Türkyılmaz, S., Yıldız, O., **Oryasin, E.**, Kaynarca, S., Bozdogan, B. “Molecular Identification of Bacteria Isolated from Dairy Herds with Mastitis” **Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.**16(6):1025-1032 (2010).

Biyik, H., Kalyoncu, F., **Oryasin, E.**, Azbar, N., Kalmis, E., and Basbulbul G. "Evaluation of wild and commercial types of *Pleurotus* strains for their ability to decolorize cibacron black W-NN textile dye" **African Journal of Microbiology Research**, 3(6), 325-329 (2009).

b) Bildiriler

-Uluslar arası

Babat Y., Yazıcı V., **Oryaşın E.**, Bozdoğan B. Prevalence of virulence factors among enterococci isolated from patients of a teaching hospital in Turkey. 31e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), **CNIT – Paris La Défense, France**, 1-2 December 2011.

Oryasin E., Bozdogan. B.. The effect of *ermTR* gene in isogenic conditions on erythromycin and lincomycin susceptibilities of *S. aureus* RN4220. 21st ECCMID / 27th ICC, **Milan-Italy**, 7-10 May 2011.

Arslan U., Demir E., **Oryasin E.**, Tuncer I., Findik D., Bozdogan. B.. MLST types of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a university hospital isolated from blood samples in Konya, Turkey. 21st ECCMID / 27th ICC, **Milan-Italy**, 7-10 May 2011.

Ozturk M., **Oryasin E.**, Guclu O., Bozdogan B. High level antimicrobial non-susceptibility rates among environmental bacteria isolated from Iztuzu Beach in Dalyan, Turkey. 21st ECCMID / 27th ICC, **Milan-Italy**, 7-10 May 2011.

Oryasin E., Basbulbul G., Biyik H. H., Bozdogan B. "Identification and antimicrobial susceptibilities of Enterococci isolated from environmental samples in Aydin Turkey" **110th General Meeting American Society for Microbiology**, San Diego, California USA, San Diego Convention Center May 23-27, 2010.

Oryasin E., Basbulbul G., Biyik H. H., Ogun E., Bozdogan B. "Identification and distribution of alkaliphilic bacteria isolated from Van Lake, the largest soda lake, in Turkey" **110th General Meeting American Society for Microbiology**, San Diego, California USA, San Diego Convention Center May 23-27, 2010.

Demirpek U., Eskin Z., Demir E, **Oryasin E.**, Ozyurt M., T. Haznedaroglu, Bozdogan B. "Identification and Antimicrobial Susceptibilities of Beta Hemolytic Streptococci Isolated from Patient in a Tertiary Hospital" **110th General Meeting American Society for Microbiology**, San Diego, California USA, San Diego Convention Center May 23-27, **2010**.

Yildiz O., **Oryasin E.**, Aktepe O., Arslan U., Bayramoglu G., Coban A. Y., Coskuner A., Guducuoglu H., Karabiber N., Oncu S., Otkun M. T., Ozkutuk N., Ozyurt M., Sener A. G., Bozdogan B. "t030 is the most common spa type among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from Turkish Hospitals." **110th General Meeting American Society for Microbiology**, San Diego, California USA, San Diego Convention Center May 23-27, **2010**.

Demirpek U., Erdem Z., **Oryasin E.**, Türkyılmaz S., Bozdoğan B. "Persistence of Escherichia coli clones in recurrent urinary tract infections among patients with spinal cord injury" **110th General Meeting American Society for Microbiology**, San Diego, California USA, San Diego Convention Center May 23-27, **2010**.

Oryasin E., Bilir E., Yazici V., Appelbaum P. C., Bozdogan B. "Effects of vanA, vanH, and vanX Genes in Vancomycin Susceptible Staphylococcus aureus RN4220" **American Society for Microbiology 109th General Meeting**, Philadelphia, PA, USA. **2009**.

-Ulusal

Erman ORYAŞIN, Bülent BOZDOĞAN. *Enterococcus faecalis* JH2-2 ve *Escherichia coli* DB10 suşlarında *ermTR* geninin izogenik koşullarda eritromisin ve klindamisin hassasiyetine etkisi. **15. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi**, Manavgat/Antalya, p:188. (2011). (Sözlü Bildiri).

Bülent BOZDOĞAN, Murat TELLİ, **Erman ORYAŞIN**, Esra DEMİR, Yasin TIRYAKI, Yavuz OKULU. İlköğretim çağındaki çocuklarda beta hemolitik streptokok taraması ve izole edilen suşların antibiyotik hassasiyetleriyle emm tiplerinin belirlenmesi. **15. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi**, Manavgat/Antalya, p:178. (2011). (Sözlü Bildiri).

Erman ORYAŞIN, Serhan SAKARYA, Bülent BOZDOĞAN. Biyoluminesans genlerinin aktarıldığı bakterilerde yayılan ışığın ölçülmesi esasına dayanarak alternatif bir minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ölçüm yöntemi. **15. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi**, Manavgat/Antalya, p:211. (2011)

Emine Bilir, **Erman Oryaşın**, Mehmet Öztürk, Bülent Bozdoğan. Linkozamidlere inaktivasyonla direnç yaygınlığı ve transfer edilebilirliği. **15. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi**, Manavgat/Antalya, p:207. (2011)

Erman ORYAŞIN, Ömer YILDIZ, Emine BİLİR, Vesile YAZICI, Bülent BOZDOĞAN “VanA tipi vankomisin direnç genlerinin *Staphylococcus aureus* RN4220 suşunda vankomisin duyarlılığına etkisinin araştırılması” **XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi**, Bodrum, (2008) (Sözlü Bildiri).

Erman ORYAŞIN, Gamze BAŞBÜLBÜL, Halil BIYIK, Bülent BOZDOĞAN “Enterokok Suşlarında Bakteriyosin Üretiminin Mikrobiyolojik ve Genetik Yollarla Araştırılması” **XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi**, Bodrum, (2008) (Sözlü Bildiri).

Türkyılmaz, S., Tekbıyık, S., **Oryaşın, E.**, Bozdoğan, B. “Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk” **VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)**, 07–09 Ekim, VAN, (2008).

Halil BIYIK, Erbil KALMIŞ, Gamze BAŞBÜLBÜL, Taner YONAR, Fatih KALYONCU, **Erman ORYAŞIN**, Öznur KOÇ "Toprakdan İzole Edilen Bazı Fungal Organizmaların Tekstil Boyalarında Renk Giderimi Potansiyellerinin Araştırılması" **19. Ulusal Biyoloji Kongresi** , TRABZON (2008).

Öznur KOÇ, **Erman ORYAŞIN**, Aslı ŞAHİNER, H. Halil BIYIK "Aydın İl Merkezi Sınırları İçerisinde Bulunan Bazı İlköğretim Okullarının Bina İçi ve Bina Dışı Havaasının Fungus Yoğunluğunun Belirlenmesi" **19. Ulusal Biyoloji Kongresi** , TRABZON (2008).

Z. Burcu BAKIR ATEŞLİER, Gamze BAŞBÜLBÜL, Bülent BOZDOĞAN, Kubilay METİN, **Erman ORYAŞIN**, Öznur KOÇ, H. Halil BIYIK "Lipolitik Aktiviteye Sahip Termofilik Bakterilerin 16S rRNA Analizi ile Tanınması" **Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, MALATYA (2007).**

Gamze BAŞBÜLBÜL, Z. Burcu BAKIR ATEŞLİER, Bülent BOZDOĞAN, Kubilay METİN, **Erman ORYAŞIN**, H. Halil BIYIK "Antimikrobiyal Etkiye Sahip Termofilik Bakterilerin 16S rRNA Analizi ile Tanınması" **Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, MALATYA (2007).**

Erman ORYAŞIN, Gamze BAŞBÜLBÜL, H. Halil BIYIK, Sevin KIRDAR, Neriman AYDIN, Bülent BOZDOĞAN "Çevresel Enterokoklarda Makrolidlere ve Linkozamidlere Direnç Mekanizmaları" **4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), ANKARA (2006).**

Gamze BAŞBÜLBÜL, **Erman ORYAŞIN**, H. Halil BIYIK, Kubilay METİN, Bülent BOZDOĞAN "Alangüllü (Aydın) jeotermal kaynağından izole edilen termofilik bakterilerin 16S rRNA analizi ile tanınması" **4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), ANKARA (2006).**

Erman ORYAŞIN, H. Halil BIYIK, Gamze BAŞBÜLBÜL, Bülent BOZDOĞAN "Çeşitli Çevresel Örneklerden İzole Edilen Enterokokların Antibiyotiklere Karşı Dirençlerinin Tespiti" **18. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Kuşadası/AYDIN (2006).**

Gamze BAŞBÜLBÜL, Z. Burcu BAKIR ATEŞLİER, Burcu İŞMAN, Esin POYRAZOĞLU, **Erman ORYAŞIN**, Kubilay METİN, H. Halil BIYIK "Menderes Nehrine deşarj Edilen Bazı Fabrika Arıtım Tesislerinin Çıkış Sularının Mevsime Bağlı Olarak Mutajenitelerinin, AMES/Salmonella test Sistemiyle Belirlenmesi" **18. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Kuşadası/AYDIN (2006).**

Gamze Başbülbül, H.Halil Bıyık, İlknur Babahan, Hüseyin Anıl, Nursabah Sarıkavaklı, **Erman ORYAŞIN** "Hidrazonların Di, Tri, Tetra Oksimli Türevlerinin Sentezi Ve Anti-Bakteriyal Aktivitelerinin İncelenmesi" **18. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Kuşadası/AYDIN (2006).**

Deniz AKTAŞ UYGUN, A. Alev KARAGÖZLER, Gamze BAŞBÜLBÜL, Murat UYGUN, **Erman ORYAŞIN** "Aydın Yöresinden Toplanan Zeytin Yaprağı (*Olea europaeae* L.) Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi" **18. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)**, Kuşadası/AYDIN (2006).

M.Balkaya, H.Bıyık, T.Karagence, **E.Oryaşın**, Ö.Arat, H.Ünsal "Asetil Kolin ve Epinefrinin Bakteriler ve Protozoonlar Üzerine Etkileri-İlk Bulgular" **XXXI. Ulusal Fizyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)**, Gaziantep, (2005)

c) Katıldığı Projeler

Antibiyotiklerin etkilerinin belirlenmesinde biyoluminesans marker genleri kullanan yeni bir yöntem geliştirilmesi: Biyofilmde MİK ölçümü, hücre içi enfeksiyonda MİK ölçümü ve bakterisidal etki belirlenmesi, **TÜBİTAK Projesi, 109T948, Bursiyer, 2010.**

Characterization of clindamycin resistance mechanism in *Enterococcus faecium* ADU1, Programme of Integrated Actions (**PIA-FRANCE**)-**BOSPHORUS (TURKEY-TUBİTAK)**, **107S143, Bursiyer, 2008.**

Antibiyotiklere direncin yayılmasında çevre bakterilerinin önemi. Çevre örneklerinden izole edilen enterokokların antibiyotik dirençleri ve direnç mekanizmalarının tespiti ve moleküler epidemiyolojik analizlerinin yapılması, **TÜBİTAK Projesi, 107T164, Yardımcı Araştırmacı, 2007.**

Aydın İl Merkezi Sınırları İçerisinde Bulunan Bazı İlköğretim Okullarının Ev İçi ve Ev Dışı Havaşının Fungus Yoğunluğunun Belirlenmesi, **ADÜ-BAP-FEF-0715, Yardımcı Araştırmacı, 2007.**

Staphylococcus aureus'da Vankomisin Direncinin Genetik Temelleri; vanA, vanH ve vanX Genlerinin Vankomisine Hassas *Staphylococcus aureus* RN4220'de Etkilerinin Araştırılması **TÜBİTAK Projesi, 105S388, Yardımcı Araştırmacı, 2005.**

Topraktan izole edilen bazı fungal organizmaların tekstil boyalarında renk giderimi potansiyellerinin araştırılması, **TÜBİTAK Projesi, 104Y393, Yardımcı Araştırmacı, 2005**

Aydın İli Evsel ve Endüstriyel Atıklarının Mutajenik Aktivitesinin Ames Testi İle Belirlenmesi, **ADÜ-BAP-FEF-3012, Yardımcı Araştırmacı, 2003.**”

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : eoryasin@adu.edu.tr
ermanoryasin@gmail.com

Tarih :