



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENFEKSİYON ETKENİ *BACTEROIDES* İZOLATLARININ
PROTEİN SENTEZİNİ İNHİBE EDEN ANTİBİYOTİKLERE
KARŞI OLUŞAN DİRENCİN FENOTİPİK ve GENOTİPİK
YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

BERMAL TEKEŞ

YÜKSEK LİSANS BİTİRME TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. NURVER ÜLGER TOPRAK

2020, İSTANBUL

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENFEKSİYON ETKENİ *BACTEROIDES* İZOLATLARININ
PROTEİN SENTEZİNİ İNHİBE EDEN ANTİBİYOTİKLERE
KARŞI OLUŞAN DİRENCİN FENOTİPİK ve GENOTİPİK
YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

BERMAL TEKEŞ

YÜKSEK LİSANS BİTİRME TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. NURVER ÜLGER TOPRAK

2020, İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı

Bermal TEKEŞ

İmza

TEŞEKKÜR

Bitirme tezimi hazırlarken çalışmalarımın ilerlemesinde, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen ve Yüksek Lisans eğitim dönemimde olduğu kadar insani ilişkilerinde de sonsuz desteği ile gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurver ÜLGER TOPRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Yaşamımın her alanında bana yol gösteren, çalışmamın her aşamasında beni destekleyen ve hep yanımda olan amcam Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Marmara Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji ailesine ve bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Arzu İLKİ'ye teşekkür ederim. İlk geldiğim günden itibaren ablam gibi olan Uzm. Dr. Elvan SAYIN'a ve Dr. Öncü AKGÜL'e canım tez yoldaşım çalışmamın her aşamasında birlikte olduğum Semra EMİNOĞLU 'na çok teşekkür ediyorum.

İstanbul da başlayan eğitim serüvenimde adeta bir baba şefkati ile yaklaşan en büyük destekçim olan Doktor Öğretim Üyesi Burak AKSU hocama ve ailem gibi, adeta bir gölge misali yanımda olan Doktor Öğretim Üyesi Seda NEMLİ hocama desteklerinden dolayı teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Son olarak da içinde tamamen sevgi ve saygının olduğu bir ortamda beni büyüten sahip olduğum en değerli şey olan aileme içtenlikle teşekkür ediyorum.

Bernal TEKEŞ
İSTANBUL, 2020

Bu tez çalışması Marmara BAP tarafından desteklenmiştir.

Proje NO: SAG-C-YLP-100719-026

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BEYAN	i
TEŞEKKÜR.....	ii
RESİMLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1 Anaerop Bakterilerin Tarihçesi	5
4.2. <i>Bacteroides fragilis</i> Grubu Bakteriler	6
4.3. <i>Bacteroides fragilis</i> Grubu Bakterilerin Patogenezi	7
4.3.1 Konak Faktörleri.....	7
4.3.2 Virülans Faktörleri	7
4.4. <i>Bacteroides fragilis</i> Grubu Bakterilerin Oluşturdukları Enfeksiyonlar	9
4.5. <i>Bacteroides fragilis</i> Grubu Bakterilerine Bağlı Enfeksiyonların Tedavisi	9
4.6. <i>Bacteroides fragilis</i> Grubu Bakterilerin Enfeksiyonların Laboratuvar Tanısı ..	9
4.7. <i>Bacteroides fragilis</i> Grubu Bakterilerin Antimikrobiyallere Direnç Durumu ve Direnç Geliştirme Mekanizmaları	10
4.7.1. Makrolid-linkozamid-streptogramin (MLS) direnci	11
4.7.2. Tetrasiklin antibiyotiğinin etki mekanizması ve direnci	11
4.7.3. Tigesiklin antibiyotiğinin etki mekanizması ve direnci	11

4.7.4. Diğer antimikrobiyallere direnç	12
4.7.4.1. Beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç	12
4.7.4.2. 5-Nitroimidazole direnç	13
4.7.4.3. Kloramfenikole direnç	13
4.7.4.4. Kinolonlara direnç	13
4.8. <i>Bacteroides fragilis</i> Grubu Bakterilerin Antimikrobiyallere Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	14
5. GEREÇ ve YÖNTEM	15
5.1. Gereçler	15
5.1.1. Besiyerleri	15
5.1.1.1, Brucella agar.....	15
5.1.1.2, Brucella sıvı besiyeri	15
5.1.1.3, Skim milk	15
5.1.2. Kullanılan stok solüsyonları	16
5.1.2.1. Sodyum Hidroksit, Normal (N).....	16
5.1.2.2. Hemin (5 mg/ml)	16
5.1.2.3. Vitamin K1 (10 mg/ml).....	16
5.1.2.4. Koyun kanı	16
5.1.2.5. EDTA (0,5 M)	16
5.1.2.6. TBE tamponu (10X)	17
5.1.2.7 Antibiyotikler	17
5.2. Yöntemler	17
5.2.1. Kütle spektrometre (MALDI-TOF MS) ile tanımlama	17
5.2.2. Antimikrobiyal duyarlılıkların saptanması.....	18
5.2.2.1. Brucella agar hazırlığı	18
5.2.2. 2. Antimikrobiyallerin hazırlanması ve stok solüsyonları.....	18

5.2.2. 3. Bakteri inokülasyonlarının hazırlığı ve ekimleri	19
5.2.2. 4. Sonuçların okunması ve değerlendirme aşaması.....	19
5.2.3. Antibiyotik direnç genlerinin saptanması.....	20
5.2.3.1. Bakteri kültürlerinden DNA izolasyonu.....	20
5.2.3.2 Direnç genlerinin amplifiye edilmesi	20
6. BULGULAR	21
6.1. Kütle spektrometre (MALDI-TOF MS) ile tanımlama	21
6.2. Antimikrobiyallere duyarlılık profili	21
6.3. Antimikrobiyal direnç gen profili.....	21
7.TARTIŞMA ve SONUÇ	26
8. KAYNAKLAR.....	31
9. EKLER.....	38
9.1 Etik Kurul Onayı.....	38
9.2 Kullanılan Makine ve Techizat	39
10. ÖZGEÇMİŞ	40

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1: <i>Bacteroides fragilis</i> izolatının koyun kanlı Brucella agardaki görüntüsü.....	6
Resim 2: <i>Bacteroides fragilis</i> grubu bakterilerin mikroskoptaki görünümü	7
Resim 3: Antibiyotikli besiyerinde, anaerop ortamda, 48 saatlik inkübasyonun sonunda BFG izolatlarının üreme durumu.....	19



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: PCR analizi ile direnç genlerinin saptanması için kullanılan oligonükleotid primerleri ve reaksiyon koşulları.....	20
Tablo 2: İzolatların elde edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı.....	21
Tablo 3: BFG izolatlarının klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline duyarlılık profilleri ve direnç geni bulundurma durumu	23
Tablo 4: BFG izolatlarının tetrasiklin, tigesikline ve klindamisine duyarlılık profiline göre direnç genlerinin dağılımı.....	24
Tablo 5: BFG bakterilerinin izole edildikleri klinik örneklerle göre klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline duyarlılık durumları.....	25

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BFG: *Bacteroides fragilis* grubu

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

M.Ö: Milattan Önce

M.S: Milattan Sonra

Yy: Yüzyıl

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

µl: Mikrolitre

µg: Mikrogram

L: Litre

PNL: Polimorf Nüveli Lökositler

LPS: Lipopolisakkarit

FDA: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi

PBP: Penisilin Bağlayıcı Proteinler

MİK: Minimal İnhibitör Konsantrasyonu

Enfeksiyon Etkeni *Bacteroides* İzolatlarının Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direncin Fenotipik ve Genotipik Yönden Araştırılması

Bermal Tekeş, Nurver Ulger Toprak,
Tıbbi Mikrobiyoloji

1. ÖZET

Amaç: Kolon mikrobiyotasının önemli bir bölümünü oluşturan *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) bakteriler, anaerob kaynaklı enfeksiyonlar arasında birinci sırada izole edilen bakteri grubunda yer almaktadır. Klinik ipuçlarının çok özel olmaması, tedavinin etken bakterinin türüne göre değişiyor olması, antibiyotiklere direncinin bilinmesini gerekli kılmaktadır. Yapılan bu çalışmada; BFG bakterilerin protein sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı oluşan direnci hem genotipik olarak hem de BFG bakterilerin in-vitro ortamda antibiyotik duyarlılık yöntemleri kullanılarak fenotipik olarak tespit etmek hedeflerimiz arasında yer almıştır.

YÖNTEM: Hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarında, klinik örneklerden izole edilmiş ve stoklanmış 2017 ve 2018 yılına ait toplam 83 BFG bakteri çalışmaya alınmıştır. İzolatların protein sentezini inhibe eden antimikrobiyallere karşı oluşan duyarlılık profilinin belirlenmesinde Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kabul ettiği (CLSI,2007), referans yöntem olarak M11-A7 dökümanında belirtilen agarda dilüsyon metodu ile tespit edilmiştir. Antibiyotik direncine neden olabileceği düşünülen tetX, tetQ, tetX1, tet36, tetM ve ermF direnç genleri ise, özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır.

BULGULAR: Çoğu batın içi absesinde olmak ile (n=32) apse, (n=4), kan (n=14), doku (n=14) gibi çeşitli örneklerden izole edilen BFG bakterileri MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. Tüm türler için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri belirlenmiştir; Tetrasiklin ve Klindamisin direncinde rol alan tetX (n=33), tetQ (n=41), tetX1 (n=14), tet36 (n=22), tetM (n=26), ermF (n=47) genleri pozitif olarak bulunmuştur.

SONUÇ: Elde ettiğimiz veriler de Klindamisin antibiyotiğine karşı fenotipik direnci olmayan izolatlarda (n=11) ermF sessiz geni, tetrasikline antibiyotiği içinde; tetX (n=1), tetQ (n=3), tetX1 (n=2), tet36 (n=1), tetM (n=3) sessiz genleri gözlemlenmiştir. Bu durumun ileriki zamanlarda direnç oranlarının artışı ile karşımıza çıkacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Bacteroides fragilis* grubu bakteri, tetrasiklin, tigesiklin, klindamisin, kloramfenikol, direnç genleri

Phenotypical and Genotypical Investigation of Resistance to Antibiotics Inhibiting Protein Synthesis of Infectious *Bacteroides* Isolates

Bermal Tekeş, Nurver Ulger Toprak,
Medical Microbiology

1. ABSTRACT

AIM: *Bacteroides fragilis* group (BFG) bacteria, which constitute an important part of colon microbiota, are most commonly isolated in anaerobic infections. The aim of this study; to determine the susceptibility profile of BFG bacteria, isolated in the microbiology laboratory of Marmara University Pendik Training and Research Hospital, against to tetracycline, tigecycline, clindamycin and chloramphenicol antimicrobials. We also planned to investigate the presence of resistance genes for these antimicrobials in the BFG isolates.

METHOD: This study eighty three clinical specimens were examined for isolation of the BFG group bacteria in Medical Microbiology Laboratory between the 2017 between 2018. The isolates identification of the sensitivity profiles against antimicrobials inhibiting protein synthesis Clinical and Laboratory Standards Institute accepts (CLSI,2007) reference method by the dilution method in the agar indicated in the M11-A7 document. Additionally, the presence of 6 genes encoding antibiotic resistance was determined by PCR.

CONCLUSİONS: The most of in isolated from deep seated abscess (n=32), abscess (n=4), blood (n=14), tissue (n=14) the frequency of isolation of different BFG group bacteria from various clinical specimens The isolated were identified MALDI-TOF MS methods. Antibiotic resistance rates against to, tetracyclin and clindamycin resistance genes; tetX (n=33), tetQ (n=41), tetX1 (n=14), tet36 (n=22), tetM (n=26), ermF (n=47) positive found.

RESULT: The analyzed environmental BFG strains were highly resistant to the tested antibiotics. Clindamycin antibiotics not resistance phenotypical isolates is (n=11) ermF; tetracycline in antibiotics tetX (n=1), tetQ (n=3), tetX1 (n= 2), tet36 (n=1), tetM (n=3) silent genes. As a result antibiotic stewardship and infection control is very important in the are of multidrug-resistance and lack of development new antimicrobial agents

KEYWORDS: BFG bacteria, clindamycin,tetracyclin, cholarmfenicol,clindamycin, resistance genes

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Anaerop enfeksiyonlarının yaygın olarak görülmesi, mortalite ve morbitide oranlarının yüksek seyretmesi, klinik ipuçlarının çok özel olmaması, tedavinin etken bakteri türüne göre değişmesi, etkenin tanımlanmasını ve antibiyotiklere karşı oluşan direncin bilinmesini gerekli kılmaktadır.

Son yıllarda anaerop bakterilere bağlı enfeksiyonların, antibiyotiklere artan oranda direnç gösterdikleri, bu artışın en büyük nedeni enfeksiyon etkeni olan *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) bakterilerin yer aldığı bildirilmektedir. Farklı ülkelerden ve daha önceki çalışmalarımızdan elde edilen verilere göre BFG bakterilerinin beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri, karbapenemler ve metronidazol gibi sınırlı sayıda antibiyotiğe duyarlı oldukları gösterilmiştir (Murray PR ve ark., 2016).

Tetrasiklin, klindamisin gibi protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren antibiyotiklere yıllar içinde gelişen yüksek direnç artışı bu antibiyotikleri tedavide kullanılamaz duruma getirmiştir. Bakteriler arası direnç aktarımı daha çok plazmid ve transpozonlarla gerçekleşmektedir (Bacic M. ve ark., 2005).

Anaerop bakterilerin duyarlılıklarını belirlemede "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)", referans yöntem olarak agarda dilüsyon metodunu kabul etmiştir (CLSI, 2007). Zahmetli, pek de pratik olmayan bu yöntemin rutin laboratuvar hizmetlerinden ziyade belirli zaman dilimlerinde yapılacak, antibiyotiklere direnç gelişiminin izlendiği sürveyans çalışmalarında kullanılması uygun görülmektedir. Bu bağlamda periyodik olarak laboratuvarımızda, klinik örneklerden üretilen BFG bakterilerinin antibiyotiklere direnç durumlarını belirleyerek, klinisyenin ampirik tedavide uygun antibiyotiği seçmesine yardımcı olunmaktadır.

Bu çalışmada, son iki yılda laboratuvarımızda izole edilen enfeksiyon etkeni BFG bakterilerinin protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren Tetrasiklin, Tigesiklin, Klindamisin ve kloramfenikol antimikrobiyallerine duyarlılıklarının, anaeroplur için önerilen agarda dilüsyon yöntemiyle saptanması amaçlanmıştır.

Aynı zamanda organizmalarımızda bu antimikrobiyallere direnci kodlayan tetQ, tetX, tetM, tet36, ermB, ermF, ermG genlerinin varlığını araştırılması planlanmıştır. Elde edilecek fenotipik bulgular ve moleküler veriler ile direnç aktarımı ile ilgili bağlantıların varlığı incelenmiştir. Elde edilecek veriler doğrultusunda ileride yapılacak olan direnç gen aktarım deneylerine bir öngörü kazanmak da hedeflerimiz arasında bulunmaktadır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1 Anaerop Bakterilerin Tarihçesi

Anaerop kaynaklı enfeksiyonlar ile ilgili bilgilerin geçmişi milattan önceki (M.Ö) yıllara kadar uzanmaktadır. M.Ö 4.yüzyıl'da (yy) Hipokrat tetanozu, milattan sonraki (M.S) 4.yy'da Xenophon Yunan askerlerinde akut nekrotizan ülseratif gingiviti tanımlamışlardır. Antonie Van Leeuwenhoek 1680 yılında 'animalcules' adını verdiği bazı canlıların oksijensiz ortamda yasayabildiklerini söylemiştir (Keşli, 2001; Finegold, 1994).

1861'de Louis Pasteur tarafından keşfedilen; *Clostridium butyricum* bakterisini mikroskop altında ıslak preparatlarda oksijen ile temas eden alanlarda hareketini kaybettiğini gözlemlemiş ve bugün dahi kullanmaya devam ettiğimiz 'anaerobes' kelimesinin kökeni olan 'anaerobies' ilk olarak kullanan bilim insanıdır. Pasteur, ayrıca *C.butyricum*'un oksijen yokluğunda bütirik asidi fermente ettiğini keşfetmiştir. 19.yy'ın sonuna kadar hayvanlarda ve insanlarda hastalık yapabilen *Clostridium* türlerini sıvı ve katı besiyerlerinde üretmiş ve tanımlanmıştır (Keşli, 2010).

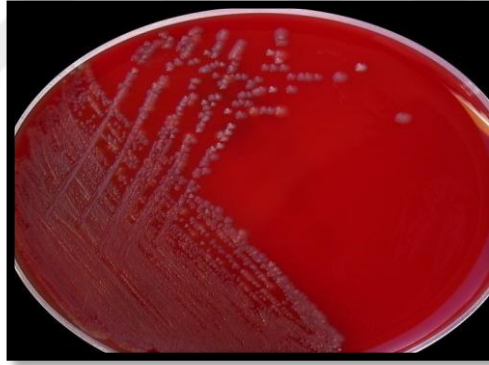
Bacteroides cinsi bakterilerden *B. fragilis*, Veillon ve Zuber tarafından 1898 yılında üretilmiş, *Bacillus fragilis* olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, 1919'da Castellani ve Chalmers oluşturdukları tür sınıflandırmasında *Bacteroides* cinsi içine bu bakteriyi tür olarak dâhil etmişlerdir (Gürler ve ark., 1986). Anaerop bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde 1940'larda antibiyotikler kullanılmaya başlanmış, bu antibiyotiklere 1970'li yıllarda yenileri eklenmiştir (Finegold ve ark.,2005). Ancak zaman içinde antibiyotiklere direnç gelişmiştir. *Bacteroides* cinsi bakterilerde ilk olarak 1966 yılında penisilin antibiyotiğine karşı gelişen direnci saptamış, 1972'de tetrasikline, 1976'da metronidazole, 1978'de sefoksitin ve 1983'te imipeneme karşı gelişen dirençler bildirilmiştir (Garcia ve ark.,1995; Rasmussen ve ark., 1997). Dünyanın pek çok ülkesinde tigesiklin, kloramfenikol ve klindamisin antibiyotiklerine karşı da artan oranda direncin geliştiği bildirilmektedir (Soki ve ark., 2006).

4.2. Bacteroides fragilis Grubu Bakteriler

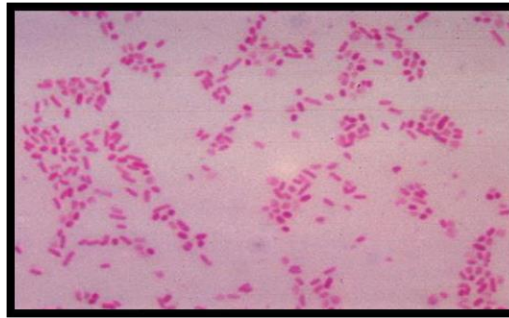
Bacteroides cinsi bakteriler insan ve hayvanların ağız, üst solunum yolu, barsak ve ürogenital sistemlerinin mikrobiyotasında yer alan gram negatif anaerop bakterileridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, biyokimyasal özellikleri, nükleik asit-baz kompozisyonu ve homolojisi gram negatif anaerop bakterilerin sınıflandırılmasında birtakım değişikliklere neden olmuş olup, halen yeni tür tanımlanmaları devam etmektedir. Bu nedenle sınıflandırmadaki yerleri değişime uğramaktadır (Winn ve ark.,2006).

BFG bakteriler, katı besiyerinde şekil1’de görüldüğü üzere yuvarlak grimsi görüntüye sahip pleomorfik bir görsele bürünür. Özellikle de %20 safrada üreyebilen, kanamisin, vankomisin ve kolistin antibiyotiklerine dirençlidir (Brooks ve ark., 2014).

Şekil 2’de mikroskopik görüntüsü de göstermektedir ki hareketsiz, oldukça soluk boyanan yuvarlak uçlu, eni yaklaşık olarak 0,5–0,8 µm, boyu 1,5–9 µm arasında değişen gram negatif basil ya da kokobasillerdir (Löfmark, 2005).



RESİM 1: Bacteroides fragilis Bakterisinin Koyun Kanlı Brucella Ağardaki Görüntüsü



RESİM 2: BFG Bakterilerin Mikroskopisi

4.3 Bacteroides fragilis Grubu Bakterilerin Patogenezi

4.3.1 Konak Faktörleri

Bacteroides fragilis grubu bakteriler kolon mikrobiyotasının büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Küçük olasılıkla olsa dahi, kadın genital bölgesinde, nadir olarak ağız boşluğu ve üst solunum yolu mikrobiyotasında da yer almaktadırlar. Travma, cerrahi müdahaleler, kesici ve delici alet yaralanmaları, organ perforasyonları gibi çeşitli nedenlerle mukoza bütünlüğünün bozulması halinde bu bakteriler dokulara veya dolaşıma geçerek ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Bu sırada, bakterilerden direkt olarak veya kompleman aktivasyonu ile uyarılan polimorf nüveli lökositler (PNL), anaerob bakteriler üzerinde bakteriyostatik etki gösterebilmektedir. Ayrıca dolaşım sisteminde aktif rol alan antikorlar ve kompleman sistemi devreye girerek bakteriyemi gelişimini önlenmektedir (Willis ve ark., 1991; Zaleznik ve ark., 1989).

4.3.2 Virülans Faktörleri

Enfeksiyonun başlama sebebi özellikle konak faktörlerine bağlı olmakla birlikte, enfeksiyonun prognozunda bakterilerin virülansı önemli rol oynamaktadır. Anaerob enfeksiyonlarında en sık izole edilen *B. fragilis* türünün BFG bakterilerinin diğer üyelerine göre daha fazla virülans özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir (Nakano ve ark., 2011). Patogeneizde önemli yere sahip virülans faktörleri dört ana başlıkta incelenebilir.

4.3.2.1 Tutunmayı sağlayan yüzey yapıları

a) Kapsül: Kolonizasyon ya da enfeksiyon yapabilmek için BFG bakterilerinin epitel hücrelerine tutunabilme yeteneği önemlidir. *B. fragilis*'in kapsül yapısı barsak mukozasına bağlanabilir, bu nedenle barsağın peristaltik hareketlerinden ve dışkı oluşum sürecinden etkilenmemektedir (Rotstein, 1986).

b) Lipopolisakkarit (LPS): BFG bakterilerde, apse oluşumunu sağlayan LPS tabakasına sahiptir. Ancak Lipid A kompozisyonundaki farklılık nedeniyle LPS'nin enterik bakterilere göre daha zayıf etki oluşturduğu gözlenmiştir (Finlay ve ark., 1991; Nakano ve ark., 2004).

c) Dış zar proteinleri: BFG bakterilerine özgü dış zar proteinleri saptanmıştır. Proteinlerin kompozisyonu ve miktarı üreme şartlarına bağlı olarak değiştiği, ortamda demirin bulunmasının, bakterinin üremesinde ve protein profilinin belirlenmesinde büyük paya sahip olduğu belirlenmiştir. Enfeksiyon sürecinde demiri kullanma konusunda bakteri ile konak arasında büyük bir yarış bulunmaktadır. Demir bulunmayan ortamlarda *B. fragilis* ürettiğinde, üç protein yapımının baskılandığı, bu proteinlerden IROMP'ın antikor yapımını indüklemeye önemli işleve sahip olduğu tespit edilmiştir (Botta ve ark., 1994).

d) Pilus ve Lektin: Özellikle kapsülsüz suşlarda epitele tutunmadan sorumlu diğer önemli faktörlerden biridir (Linberg ve ark.,1990).

4.4.2.2 İnvazyon

Epitel yüzeyine tutunan bakterinin enfeksiyon oluşturmak için izleyeceği ikinci aşama invazyondur. Bakterilerin salgıladıkları enzimler invazyonda oldukça önemlidir (Wexler ve ark., 2007). *Bacteroides*'ler de invazyona yardımcı olan, doku hasarı oluşturan ya da bakteriyi konak savunmasından koruyan değişik birçok enzim salgılamaktadır. Bunlara örnek olarak heparinaz, kondroitin sülfataz, kollajenaz, hyalüronidaz, nöraminidaz, heparinaz ve fibrinolizin verilebilir. BFG bakterilerin büyük çoğunluğu β -laktamaz ve diğer antibiyotikleri inaktive eden enzimleri üreterek penisilin ve türevleri basta olmak üzere pek çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirirler (Cavallaro ve ark., 2001).

4.3.2.3 Enfeksiyon alanında çoğalma ve konağın savunma sisteminden kaçma

Periton boşluğuna geçen BFG bakterilerinin oluşturduğu inflamatuvar yanıtla bağlı olarak sızan plazma, bakteri etrafında bir fibrin ağı oluşturmaktadır. Bu fibrin ağı, bakterinin yayılmasını dolayısıyla bakteriyemiye önlemekte aynı zamanda bakteriyi fagositozdan korumaktadır (Torun ve ark., 1999). *B. fragilis*'in polisakkarit yapısındaki kapsülü de antifagositik özelliğe sahiptir. Diğer yandan BFG bakterileri birtakım protein ve kısa zincirli yağ asitleri üreterek, fagositik hücrelerin fonksiyonlarını bozmakta ve konağın savunma sisteminden kaçabilmektedirler (Nord ve ark.,1990).

4.3.2.4 Salgılanan toksinler

Bazı *B. fragilis* türleri, özellikle çocuklarda sekretuar tipte ishal yapan fragilizin adı verilen, ısıya duyarlı metallo-enzim yapısında sitotoksik etkiye sahip enterotoksin salgılamaktadırlar (Sears ve ark., 2009).

4.3.3 Savunma Sisteminden Uzaklaşma Mekanizması

Periton boşluğuna yerleşen BFG bakterilerinin oluşturduğu inflamatuvar cevaba göre sızıntı yapan plazma, bakteri etrafında bir fibrin ağı oluşturmaktadır. Bu fibrin ağı, bakterinin yayılmasını dolayısıyla bakteriyemiye önlemekte olup aynı zamanda bakteriyi de fagositozdan korumaktadır (Rotstein ve ark., 1992). *B. fragilis*'in polisakkarit yapısındaki kapsülü de antifagositik özelliğe sahiptir. Diğer yandan BFG bakterileri birtakım protein ve kısa zincirli yağ asitleri üreterek, fagositik hücrelerin fonksiyonlarını bozmakta ve konağın savunma sisteminden saklanabilmektedir (Snydman ve ark., 2010).

4.4 Bacteroides fragilis Grubu Bakterilerin Enfeksiyonların Laboratuvar Tanısı

Diğer anaeroplarda olduğu gibi BFG enfeksiyonlarının tanısı zahmetli ve zaman alıcıdır. Tanıda başarılı sonuçlar alabilmek için, uygun örneğin alınması, laboratuvara uygun şekilde ve kısa sürede gönderilmesi, laboratuvarda olması gerektiği şekilde işleme alınması, anaerob inkübasyon koşullarının sağlanması ve uygun tanımlama yöntemlerinin seçilmesi gerekmektedir.

Normal mikrobiyota ile kontamine olan örneklerden anaerob kültür yapmanın herhangi tanısal değeri bulunmamaktadır. Anaeroplarda kültür için uygun olanlar, normalde steril vücut sıvıları, derin apselerden enjektör ya da iğne ile alınan aspirasyon örnekleri veya doku biyopsi örnekleridir. Örneklerin eküvyonla alınması önerilmemektedir, ancak sadece eküvyonla alınabiliyorsa, mutlaka oksijenden yoksun anaerob ortamın sağlandığı transport sistemlere konulması gerekmektedir (Citron ve ark., 2012). Doku örneklerinin veya enjektörle alınan örneklerin (öncelikle örneklerin alınması esnasında çekilen hava şırıngadan atılmalıdır), anaerob transport besiyerine aktarılacak oda ısısında laboratuvara nakledilmelidir (Citron ve ark., 2012).

Laboratuvara gönderilen örneklerden uygun besiyerlerine ekim yapılmalı ve boyalı preparat hazırlanmalıdır. Gram boyalı preparatların; inflamatuvar hücreler ve bakterilerin varlığı, bakteri morfolojisindeki farklılıklar, şekil, büyüklük ve dizilimleri hakkında verdiği bilgiler tanı için birer ipucu olabilmektedir.

Anaerop bakteri enfeksiyonları genellikle farklı morfolojiye sahip bakteriler ile üremesi nedeniyle klinik örneklerin, taze hazırlanmış kanamisinli-vankomisinli veya safralı agar gibi seçici besiyerlerine aynı zamanda seçici olmayan besiyerlerine ekilmesi önerilmektedir. Ekilmiş plakların 35-37 °C’de, 48 saat anaerop ortamda inkübe edilmesi, bu inkübasyonun sonunda plaklarda üremenin olmaması durumunda Bu sürenin 5 gün daha uzatılması gerekmektedir. Sıvı besiyerlerinin inkübasyon süresi 7 gün olmalı ve her gün takip edilmelidir. Kültürlerin inkübasyonun da kullanılan değişik sistemler bulunmaktadır. Bu amaçla; anaerop kabinler, kavanozlar (GasPak, gaz doldurulabilir kavanozlar) ve plastik torbalar kullanılabilir.

Kültürlerde oluşan kolonilerin özellikleri (çap, şekil, renk, yüzey özellikleri, hemoliz olup olmadığı) incelenip, her bir farklı koloninin gerçek anaerop olup olmadığı aerotolerans testi ile belirlenmelidir. Aerotolerans testinin sonucuna göre; zorunlu anaeroplardan gram boyama yönteminde, soluk ve düzensiz boyanan, tek ya da çiftler halinde bulunan, yuvarlak uçlu gram negatif basil ya da kokobasillerdir, BFG bakteriyi düşündürmektedir. Tanımlama amacıyla kullanılan kanamisin, vankomisin ve kolistin antibiyotiklerine dirençli olan bu bakterilerin biyokimyasal özelliklerine, karbonhidratları fermente etme durumlarına göre tür düzeyinde tanımlanmaları yapılmaktadır. Bu testlerin yeterli olmadığı durumlarda veya araştırmalarda gaz-likit kromatografisi ile metabolizmaları sırasında oluşan ürünler veya bakteri yağ asitleri kompozisyonu tayin edilerek veya moleküler testler ile bakteri için özgün kısımların gen dizisi belirlenerek daha ileri tanımlamalar da yapılabilir (Citron ve ark., 2007).

Bakteriyemi, eklem enfeksiyonları, protez enfeksiyonları, osteomyelit ya da beyin apsesi gibi özel durumlar dışında, rutinde antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılması birçok hasta izolatu için gerekmebilir.

Antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılmasının gerekli olduğu durumlarda CLSI (M11-A7)'nin önerdiği agarda dilüsyon ya da sıvıda dilüsyon yöntemleri kullanılmalıdır. Agarda dilüsyon yöntemi tüm anaerop bakteriler için uygulanabilir iken, sıvıda dilüsyon sadece BFG bakteriler için önerilmektedir. Her iki yöntemin de zor, zahmetli ve zaman alıcı olmaları nedeniyle daha çok sürveyans araştırmalarında kullanılmaları tercih edilmektedir (Ulger ve ark., 2005). Acil ve özel durumlarda, CLSI tarafından önerilmeyen ancak FDA (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanan E-test yöntemi antimikrobiyal duyarlılığın saptanması için kullanılabilir (Hecht ve ark., 2006).

4.5 Dünya da ve Türkiye de Antimikrobiyal Direnç İstatistiđi

Antibiyotik tüm dünyada en sık kullanılan ilaç grubudur. Ülkemizde de tüm dünyada olduğu gibi özellikle de yatan hastalarda en fazla tüketilen ilaçlar arasında yer almaktadır (CLSI, 2009; Brook ve ark.,2013). Antibiyotiklerin gereksiz ve uygun olmayan kullanımı, hastalarda yan etki sıklığında artışa ve antibakteriyel direncin artmasına bağlı olarak tedavide başarısızlığına neden olmaktadır.

Uygunsuz ya da gereksiz antibiyotiklerin kullanılması daha geniş açıdan bakıldığında hastane bütününde dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına, dolayısıyla hem morbidite ve mortalitenin hem de maliyetin artmasına neden olmaktadır. İndüklenebilen ve diğer direnç mekanizmaları nedeniyle artan dirençli mikroorganizmalara karşı kullanılacak antibiyotik sayısının sınırlı olduğından gereksiz geniş spektrumlu antibiyotik kullanımını kısıtlamak gerekir. Bu nedenle antibiyotiklerin doğru hastada, doğru endikasyonla, doğru doz aralığında ve doğru sürede verilmesi olarak tanımlayabileceğimiz “akılcı antibiyotik kullanımı” antibiyotik direncinin artmasını yavaşlatacak en uygun strateji olarak görünmektedir (Goldstein ve ark., 2011; Davies ve ark.,2010). Ülkemizde 2003 Mart tarihinden itibaren yürürlüğe giren Bütçe Uygulama Yönergesi ile bazı antibiyotiklerin (karbapenemler, glikopeptidler vb) geri ödenmesi için Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji uzmanının veya Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Uzmanının onayı istenmektedir.

Bu gelişmelere rağmen, antibiyotiklerin uygunsuz kullanım oranlarının %60'lara kadar (%30-50) çıktığını bildiren birçok çalışma bulunmaktadır (WHO,2015 Meggersee ve ark., 2015). Son yıllarda yapılan diğer araştırma odağı ise; antibiyotik kullanımı ile antimikrobiyal direnç oranları arasındaki ilişkidir. Bu ilişkiden doğan antimikrobiyal direnç oluşumunun kaynağını aynı zamanda doğru antibiyotiklerin kullanılmaması oluşturmaktadır. Dünyada da giderek artan biçimde antibiyotik kullanım ve artan direnç oranları ile gündeme gelmekte ve ana amaç tüm nedenlerini ortadan kaldırmaya eğilerek direnç oranlarının azaltılması olmaktadır. Antibiyotik kullanımının azaltılmasına yönelik uluslararası ve ulusal programlar birçok farklı ülkede yıllardır devam etmektedir. Bunun yanı sıra son yıllarda doğrudan direnç oranlarını hedef alan daha spesifik tedbirler ve programlar üzerine düşünölmeye başlamış ve son derece olumsuz etki tahminleri nedeniyle uluslararası ve ulusal politikaların en önemli uygulama alanlarından biri haline gelmiştir.

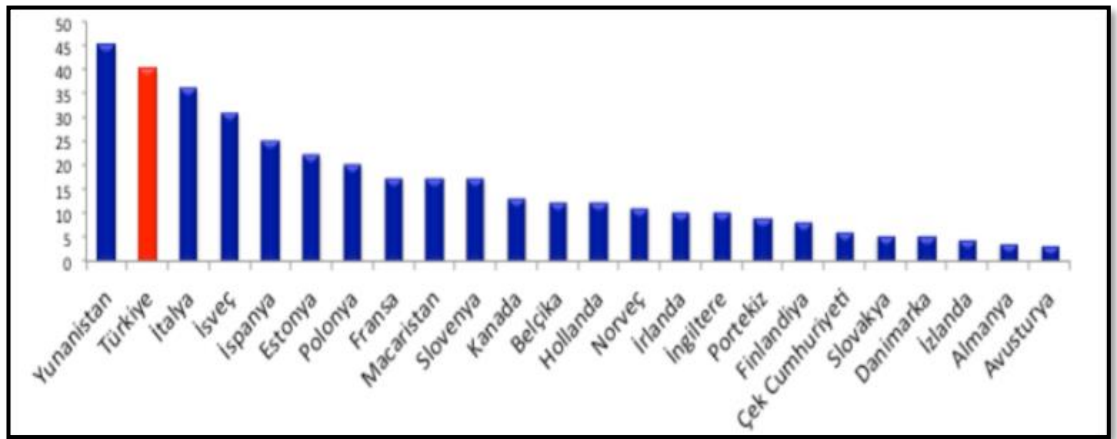
Antimikrobiyal direnç, sağlık, ekonomi, sürdürülebilirlik gibi birçok farklı kanaldan etki yaratabildiğı gibi mücadele için de birçok farklı paydaş arasında koordinasyonu gerektirmektedir. Son yıllarda dünyada tedbir setlerinin odağında, tek başına antibiyotik kullanımının azaltılması değil, direnç oluşumuna ilişkin diğer tüm nedenleri ortadan kaldırmaya yönelik uygulamalarla direnç oranlarının düşürölmesi yer almaktadır. Türkiye, dünyada verisi olan ölkeler arasında antimikrobiyal direnç oranlarının en yüksek olduğı ikinci ölkedir. Bununla birlikte antibiyotik tüketim seviyesinin de dünyada en yüksek olduğı ölkedir. Aradaki ilişki nedeniyle de önümüzdeki dönemde direnç oranlarının artma potansiyeli en yüksek ölkeler arasında bulunmaktadır. Tüm bu nedenlerle antimikrobiyal direnç Türkiye için önemli bir tehdit unsurudur. Dolayısıyla son yıllarda antibiyotik kullanım oranlarının düşürölmesine ilişkin çalışmalar Türkiye'deki sağlık gündeminin en üst sıralamalarında yer almaktadır. İlgili kamu kurumları tarafından birçok farklı çalışma yürütölmekte ve tasarlanan planlamalar hızla uygulamaya konulmaktadır.

Bu çerçevede bu çalışma kapsamında Dünyada ve Türkiye’de antimikrobiyal direncin mevcut durumu incelenmekte, ekonomik etkilerine ilişkin önümüzdeki dönem tahminleri ortaya konmakta, farklı ülkelerdeki uygulamalar değerlendirilmekte ve son olarak uygulanan politikaların yanı sıra Türkiye’de neler yapılabileceğine ilişkin öncelikli bir öneri seti tartışılmaktadır. Hedefe yönelik doğru antibiyotik kullanımı, bunun için de direnç verisinin takibi gündemde ilk sıralarda yer almaktadır.

Dünya da ve Türkiye’de antibiyotik kullanımına bağlı olarak gelişen antimikrobiyal direnç değerlendirilecek olursak;

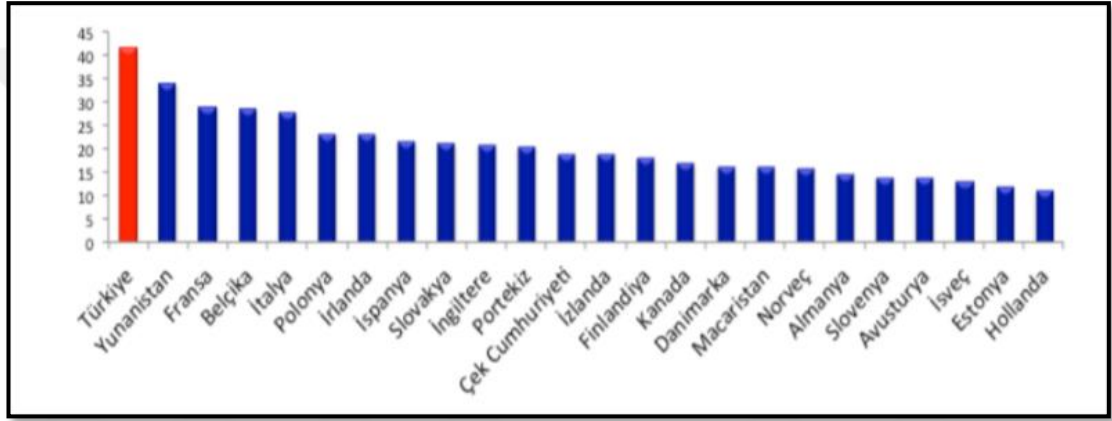
Dünyada antimikrobiyal direnç oranlarının en yüksek olduğu ülke Tablo 1 ’de görüldüğü üzere, Yunanistan’dır. Yunanistan’ı Türkiye izlemektedir. Türkiye’nin yalnızca 2014 yılı verisine ulaşılabilirdiği için geçmişten günümüze değişime ilişkin değerlendirme yapılamasa da bazı ülkeler için değişimi değerlendirmek mümkündür.

Verisi olan ülkelere yalnızca dördünün antimikrobiyal direnç düzeylerinde düşüş meydana gelmiştir. İngiltere’de 2005 yılında %14 olan direnç düzeyi 2014 yılında %10’a düşmüştür. Belçika’da ise, direnç düzeyi 2014 yılında 2005 yılına göre %25 oranında azalmıştır. Belçika’yı direnç seviyesindeki %6’lık düşüşle İrlanda ve %4’lük düşüşle Portekiz izlemektedir. Bunun yanı sıra antimikrobiyal direncin 2005-2014 arasında en fazla arttığı ülkeler Danimarka, İtalya, Yeni Zelanda, Yunanistan ve Çek Cumhuriyeti’dir (TEGAV).



SEKİL 1: Dünya ‘da antimikrobiyal direnç düzeyi

Her ne kadar tek başına tüketim seviyelerini değerlendirmek yeterli olmasa ve asıl odağın direnç seviyeleri ve tüm nedenlerine çevrilmesi gereklidir. En önemli göstergelerden ve tedbir alanlarından biri olarak tüketilen antibiyotik seviyesi ülkelere göre tablo 2’de verilmiş olan istatistiki bilgilerde mevcuttur. Küresel boyutta toplam antibiyotik tüketimi 2000-2010 yılları arasında %30 oranında artmıştır. Tüketim genel olarak yüksek gelirli ülkelerde daha fazla iken, tüketimdeki artış en fazla düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşanmıştır. Türkiye’den sonra en fazla antibiyotik tüketen ülke, antimikrobiyal direnç seviyesinin en yüksek olduğu Yunanistan’dır. Türkiye’yi 35,1 birimle Yunanistan takip etmektedir (TEGAV).

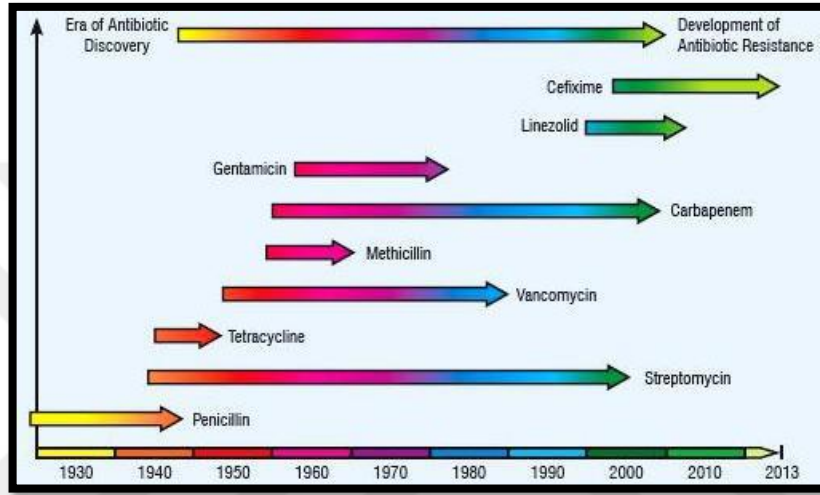


Şekil 2: Dünyada Antibiyotik Tüketim Seviyesi, 1000 kişiye düşen tanımlanan günlük doz, 2014

4.6 Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler; bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan, bakterilerin çoğalmalarını engelleyen ya da öldüren ilaç türüdür (Anonim, 2015). Antibiyotikler, biyolojik kaynaklı veya sentetik olarak elde edilen ilaçlardır. Yirminci yüzyılda bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki mekanizmaları ile bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanması, tıp tarihinde bir dönüm noktası olmuştur. Ancak bakteriler, çevrelerinde meydana gelen değişiklere hızlı bir şekilde uyum sağlama ve hayatta kalma yetenekleri oldukça yüksek canlılardır. Bakterilerin bu özellikleri göz önüne alındığında, son 50 yıl içinde tanımlanan antibiyotik direncinin beklenen bir sonuç olduğu ortadadır (Lober ve ark.,2000).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) raporlarına göre antibiyotik direnci toplum sağlığını tehdit eden ve hızlıca artış gösteren önemli bir problemdir (WHO,2015). Yapılan bir araştırmada, 400 farklı türde 20.000'den fazla potansiyel direnç geninin varlığını açıklamışlardır (Davies ve ark., 2010). Antibiyotiklerin kullanılması ile bakteriler bu antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları geliştirmeye başlamışlardır. Tablo 3 'te bu gelişim süreci gösterilmiştir.



Sekil 3: Antibiyotiğin Keşfi ve Ona Eşlik Eden Antibiyotik Direnci

BFG bakterilerin neden olduğu karın içi enfeksiyon ve bakteriyemi gibi hastalıklar antibiyotikler ile tedavi edilmediği takdirde kişinin ölümüne sebep olabilmektedir (Wexler ve ark., 2007) *B. fragilis* tedavisinde kullanılan en etkili antibiyotikler; penisilin, sefalosporin, karbapenem, klindamisin ve metronidazol'dür. Bununla birlikte son yıllarda *B. fragilis*'in antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği raporlarda bildirilmiştir (Snydman ve ark., 2002; Ülger ve ark., 2004).

Avrupa da yapılan araştırmalara göre *B. fragilis* izolatlarının %24,2 ile %28,5'inin klindamisine dirençli olduğunu ortaya koymuştur (Eitel ve ark.,2013). Yapılan başka bir çalışmada; 1980 yılında ABD'de yapılan bir araştırmada klindamisine %6 direnç belirtilmiş fakat 2007'de bu oran %35'e kadar yükselmiştir (Control, 2013).

Karbapenem direncinin de, metalo-beta-laktamaz bölgesini kodlayan *cfiA* geninin varlığı sebebiyle olduğu gösterilmiştir. ABD ve Avrupada yapılan araştırmalarda imipeneme olan direncin %1'den daha düşük olduğu belirtilmiştir. Sefoksitin direncinin ise Avrupa'da %13,7 iken ABD'de %9 olduğu rapor edilmiştir. *B. fragilis*'in sebep olduğu enfeksiyonlar için kullanılan en etkili antibiyotik metronidazoldür.

Bu antibiyotik tedavi için diğer antibiyotikler denendikten sonra son çözüm olarak belirlenen ve 5-nitroimidazol ajanı olan metronidazoldür. Dünya çapında metronidazol direncinin ise %1 ile %5 oranları arasında yer aldığı rapor edilmiştir. 23 *B. fragilis* izolatının genetik analizleri sonucunda metronidazol dirençli suşların hiçbirinde *nima-j* genini taşımadığı bildirilmiş, ayrıca hiçbir izolatta *cfxA* ve *ermf* genleri de tespit edilmemiştir.

Tetrasikline dirençli izolatların tümü *tetQ* genini içerirken, tigesikline duyarlı oldukları yapılan araştırmalarda tespit edilmiştir. Dirençli bir suшта ise *cfiA* geni üzerindeki promotor bölgede G bazının A bazına dönüştüğü tespit edilmiştir (Bartha ve ark.,2011). β -laktam antibiyotikler (penisilin, karbapenemler, sefalosporinler ve monobaktamlar) etkilerini, bakterinin hücre duvar sentezinin son basamağında peptidoglikan zincirini birbirine bağlamakla görevli olan trans peptidasyon işlevini bozarak gösterirler (Nakano ve ark.,2011). Bu antibiyotikler, hücre duvarının oluşumunda etkili olan penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanarak duvar yapımına engel olmaktadır (Türkkan ve ark.,2008). Bir direnç mekanizması, bakteri kromozomunda mutasyon sonucu yeni PBP'ler oluşur ve β -laktam antibiyotikler bu PBP'lere bağlanamadığı için antibiyotikler etkilerini gösteremez. Başka bir direnç mekanizmasında ise kromozomlarda oluşan mutasyon sonucu dış membrana proteinlerinde yapısal mutasyonel değişiklikler meydana gelir. Bu durumda β -laktam antibiyotikler hücre içine giremez ve PBP'lere ulaşamaz. Son bir direnç mekanizması ise; BFG bakterilerin A.B.D, Japonya ve Avrupa ülkelerinde %75-100 oranında β -laktamaz ürettikleri bildirilmiştir. β -laktamazlar, β -laktam halkasının amid bağıını hidrolize ederler ve β -laktam antibiyotikleri inaktif hale getirmektedir (Nord ve ark.,1990; Rasmussen ve ark.,1997).

Makrolid-Linkozamid-Streptogramin (MLS) grubu antibiyotikler, farklı gruplara ait olmalarına rağmen, aynı ribozomal alt üniteye bağlanarak etki gösterirler ve burada oluşan mutasyonlar bu üç antibiyotiğe birden direnç (MLS direnci) geliştirmektedir (Uzun ve ark.,2014).

Anaerob bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda MLS antibiyotikleri içinde en fazla klindamisin kullanılmaktadır (Roberts ve ark., 1995). Klindamisin, bakteri ribozomunun 50S alt-birimine bağlanır, aynı yere tRNA molekülünün bağlanmasını ve aynı zamanda peptid zincirinin uzamasını engeller böylelikle bakteride protein sentezini engellemiş olur.

Bakteri ribozomunun 50S alt birimindeki 23S rRNA'da bulunan adenin yan zincirinin metilasyonu sonucu MLSB antibiyotiklerinin ortak hedef bölgelerine bağlanma isteği azalmakta ve ilaç etkisini gösterememektedir. Bakteri tarafından salınan ve metilasyonu sağlayan N-metil transferaz (metilaz)'ı *erm* genleri kodlamaktadır ve *B. fragilis*'te *erm FU*, *erm FS* ve *erm F* genleri tanımlanmış ve direnç %5-20 olarak bulunmuştur (Uzun ve ark., 2014; Bush ve ark., 1995).

Tetrasiklin direnci ise dünya genelinde %80-90 civarında olup son 40 yıldır kullanılmamaktadır. Direnç tetrasiklin hedef bölgesi olan ribozomlarda meydana gelen değişimlerle ortaya çıkmıştır (Roberts ve ark., 1995).

Metronidazol ise 5' nitroimidazol türevleri içinde en fazla kullanılan antibiyotiktir. Metronidazolün nitro grubu indirgendiğinde, aktif olarak bakteriyostatik etki gösterir ve anaerob ortamlarda sabit kalır. Oksijenli ortamda ise indirgenen yapı hızlı bir şekilde eski halini alır. Oksijensiz ortamda indirgenen metronidazolün hidroksiamin yapısı bakterinin DNA'sına bağlanır ve çift sarmal yapıyı bozarak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engellemiş olur. Metronidazole direnç nitroredüktaz enzim aktivitesinde azalma ile ve hücre içine antibiyotik girişinde azalma ile gerçekleşmektedir. Dirence *nim A* ve *nim B* genlerinin sebep olduğu bildirilmiştir (Rasmussen ve ark., 1997).

Kloramfenikol ise bakteri ribozomunun 50 S alt birimine bağlanır ve protein sentezini durdurarak antimikrobik etki gösterir. *Bacteroides*'lerde asetil transferaz ve nitroredüktaz enzimlerini kodlayan iki direnç geni tanımlanmıştır. Bu enzimler 8 kloramfenikolün yapısında değişimlere sebep olmuş ve bakteri ribozomuna bağlanamadığı için ilaç etkisini gösteremediği tespit edilmiştir (Flick ve ark.,2002).

4.6.1 Tigesiklin Antibiyotiğinin Etki Mekanizması ve Direnci

Tigesiklin bir minosiklin türevi olup FDA tarafından 2005 yılında onaylanan ilk antibiyotiktir. Bakteri ribozomunun 30S alt birimine bağlanır ve tRNA'nın A bölgesine bağlanmasını engelleyerek protein sentezini durdurur böylelikle bakteriyostatik etki gösterir.

Yapısal olarak tetrasiklinlere benzese de tetrasikline özgü pompa mekanizmasından ve tet M proteinin neden olduğu değişikliklerden etkilenmemektedir. Çok sayıda gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmaya karşı in vitro etki göstermektedir. Tigesiklinin FDA tarafından özellikle intraabdominal ve deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında kullanılması önerilmiştir (Greer, 2006). GPAK'larda tigesikline karşı henüz bilinen gelişmiş bir direnç söz konusu değildir (Goldstein ve ark., 2006; Hawser SP., 2010).

Direncin gelişmemesi, tigesiklinin ribozomlara bağlanma afinitesinin kuvvetli olmasına ve molekülüne eklenen büyük zincirin bu antibiyotiğin efluks ile hücre dışına atılmasının engellemesine bağlanmaktadır (Greer, 2006).

4.6.2 Kloramfenikol Antibiyotiğinin Etki Mekanizması ve Direnci

Kloramfenikol; bakterilerin ribozomunun 50S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe ederek bakteriler üzerinde bakteriyostatik bir etkiye sahiptir. Birçok anaerob bakterileri üzerinde de etkilidir.

Geçmişte enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların yapısı ve etkilenme durumu yeterince bilinmediğinden merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında sıklıkla tercih edilmiştir. Ancak bu antibiyotik oldukça yüksek toksisiteye sahiptir. Ölümcül aplastik anemi gibi ciddi komplikasyonlara sebep olabilmektedir. Ayrıca yeni doğanlarda kullanıldığında ya da anneden bebeğe kan yoluyla geçtiğinde “gri bebek sendromu”na sebep olabilmektedir. İlacın toksik yan etkileri nedeniyle başta ABD olmak üzere bazı ülkelerde kullanımı sınırlandırılmıştır (Brook ve ark., 2013).

Kullanılmasının sınırlandırılması nedeniyle kloramfenikole direnç az görülmektedir. Nadiren de olsa bazı *Bacteroides* türlerinde bu antibiyotiğe karşı direnç bildirilmiştir. *Bacteroides* izolatlarında, nitroredüktaz ve asetil transferaz enzimlerinin yapımlarını kodlayan iki direnç geni tanımlanmıştır. Bu enzimlerin etkisiyle kloramfenikol yapısal değişikliklere uğramakta ve ribozoma bağlanamamaktadır. GPAK'larda ise şu ana kadar kloramfenikole karşı direnç görülmemiştir (Rasmussen ve ark., 1997; Britz ve ark., 1978).

4.5.3 Tetrasiklin Antibiyotiğinin Etki Mekanizması ve Direnci

Tetrasiklinler geniş spektrumlu ve anaerop enfeksiyonların tedavisinde ilk kullanılan antibiyotiktir.

Buna rağmen bugün BFG bakterileri suşlarının hemen hemen tümü bu antibiyotiğe dirençlidir (%80-90). Tetrasiklinlerin, klinik enfeksiyonların tedavisi ve besicilikte üreme arttırıcı olarak yaygın kullanımları çeşitli direnç determinantlarının çıkıp yayılmasına yol açmıştır. Buna bağlı olarak da tetrasiklinlerin ilk seçenek kullanıldığı enfeksiyonların sayısı yıllardır sınırlı kalmıştır (Gajdacs ve ark.,2017).

Tetrasiklinlere bakteriyel direncin ana mekanizmaları eflüks (atım), ribozomal koruma ve tetrasiklin modifikasyonudur. Bakteri ribozomunun 30S alt ünitesine bağlanmak suretiyle protein sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Doğada en yaygın olarak görülen direnç şekli ribozomal korumalıdır (Sarkar ve ar.,2015). Ribozom koruyucu proteinleri kodlayan *tetQ* ve *tetM* genleri sıklıkla konjugatif transpozonların üzerinde bulunurlar. Tetrasiklinler sitoplazma zarından hem enerjiye bağımlı aktif transport sistemleri hem de enerjiden bağımsız mekanizmalarla hücre içine girer ve ribozomların 30S alt ünitesine bağlanıp aminoasit tRNA'nın ribozoma bağlanmasını engelleyerek, protein sentezini durdururlar (Fletcher ve ark.,1991).

4.6.4 Klindamisin Antibiyotığının Etki Mekanizması ve Direnci

Klindamisin, gram pozitif aerob bakterilere ve özellikle de gram pozitif ve gram negatif anaerob bakteriler üzerinde de etkilidir. Anaerob enfeksiyonların tedavisinde sıkça tercih edilmektedir. Ancak uzun süre kullanımında psödomembranöz kolite neden olabilirler.

Etkilerini bakteri ribozomunun 50S alt ünitesine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek gösterirler. Bu yolla makrolid/linkosmid/streptogramin B'ye karşı da direnç gelişmektedir (MLS direnci). Klindamisin direnciyle ilişkilendirilen *erm* genlerinin varlığı gösterilmiştir (Rasmussen ve ark., 1986; Reig ve ark, 1992; Roberts, 1995)



5. MATERİYAL ve YÖNTEMLER

5.1 MATERİYAL

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne mikrobiyolojik inceleme amacıyla laboratuvarımıza gönderilen klinik materyallerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen ve -80 C° de stoklanan son 2 yıla ait BFG bakterileri çalışmaya alınmıştır.

5.1.1 Besiyerleri

Çalışmamızda kullanılan tüm besiyerleri taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

5.1.1.1 Brucella Agar

Brucella Agar toz besiyerinden (BD, Fransa) 1L hazırlamak için;

- ✓ Toz halindeki besiyerinden 43 g hassas terazi de tartıldı.
- ✓ %5 defibrine koyun kanı olacak şekilde distile sudan 950 ml distile su ölçülüp 1000 ml'lik balon jojeye aktarıldı.
- ✓ Besiyerini kullanıma hazırlamak ve steril etmek amacıyla 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.
- ✓ 50°C'ye kadar besiyeri soğutulması sağlandı.
- ✓ Besiyeri eli yakmayacak kıvama gelince içerisine hemin (%5 µg/ml), K1 vitamini (%1 µg /ml) ve %5 defibrine koyun kanı eklendi.
- ✓ 4mm kalınlıkta olacak şekilde steril plaklara döküldü.

5.1.1.2 Brucella Sıvı Besiyeri

Brucella Broth toz besiyerinden (BD, Fransa) 1L hazırlamak için

- ✓ Toz halindeki besiyerinden 28 g hassas terazi de tartıldı.
- ✓ 1L'e tamamlanacak şekilde distile suda süspanse edildi.
- ✓ Besiyerini kullanıma hazırlamak ve steril etmek amacıyla 121°C'de 5 dakika otoklavlanmıştır.
- ✓ 50°C'ye kadar besiyeri soğutulmuştur.

Hemen kullanılmayan sıvı besiyeri +4 °C'de saklanmıştır. Kullanmadan önce kaynatılarak içerisindeki oksijen uzaklaştırılmıştır.

5.1.1.3 Skin Milk

Ticari olarak (Oxoid, İngiltere) alınan toz halindeki yağsız sütü (skim milk powder) kullanıma hazırlamak için;

- ✓ Toz besiyerinden 10 g hassas terazi ile tartıldı.
- ✓ 90 ml'ye tamamlanacak şekilde distile su içerisinde süspanse edildi.
- ✓ Karışıma 10 ml gliserol eklenerek sıcak su banyosunda homojen hale getirildi.
- ✓ Süspansiyondan 2 ml'lik kriyo tüplere birer ml dağıtıldıktan sonra, tüplerin kapakları hafifçe kapatılarak 121°C'de 5 dakika otoklavlandı.
- ✓ Otoklavlama işleminden sonra kriyo tüplerin kapakları sıkıca kapatılmış kullanıncaya kadar buzdolabında saklandı.

Skin milk besiyeri kültürde üretilen anaerop bakterileri -80°C'de saklamak amacıyla kullanılmıştır.

5.1.2 Kullanılan Stok Solüsyonları

5.1.2.1 Sodyum Hidroksit, Normal (N)

Hemin hazırlığı için;

- ✓ NaOH 40 mg hassas terazi de tartılarak balon jojeye aktarıldı.
- ✓ Total hacmi 1L'ye tamamlanacak şekilde distile su eklendi.

40 mg NaOH, 1000 ml su içerisinde çözülerek 1N NAOH elde edilmiştir.

5.1.2.2. Hemin (5 mg/ml)

- ✓ Ticari olarak alınan Heminden 0,5 g hassas terazide tartıldı.
- ✓ Hazırlanmış olan NaOH (1N) solüsyonundan 10 ml ölçülerek 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı.
- ✓ Total hacmi 100 ml'ye tamamlanana kadar distile su eklendi.
- ✓ Kullanıma hazırlamak ve steril etmek amacıyla 121°C'de 5 dakika otoklavlanmıştır ve ışığa karşı hassas olan Hemin koyu renk şişenin içerisinde buzdolabında saklanmıştır.

5.1.2.3 Vitamin K1 (10 mg/ml)

K1 vitamini 10 mg (Konakion 10 mg 1 ml ampül, Roche) BFG bakterilerin üremesi için daha kolay üremesi için zorunluluk gerektirmeyen ve ticari olarak alınan maddedir.

5.1.2.4 Koyun Kanı

Defibrine olmuş koyun kanı (GBL, Türkiye) steril plastik tüplere bölüştürülerek - 20 °C’de saklanmıştır. Kullanılacağı zaman 37 °C’lik su banyosunda ya da 2-8 °C’de bir gece bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır.

5.1.2.5 EDTA (0,5 M)

- ✓ 93,05 g EDTA hassas terazi ile tartıldı.
- ✓ 200 ml distile su içerisinde magnetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü.
- ✓ NaOH tabletleriyle pH: 8’e ayarlanmıştır. Daha sonra hacim distile su ile 500 ml’ye tamamlandı.

5.1.2.6 TBE Tamponu (10X)

- ✓ Borik asit 55 g
- ✓ Tris 108 g hassas terazi ile tartıldı.
- ✓ Tris ve borik asit 800 ml distile su içerisine konularak manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.
- ✓ Üzerine 40 ml 0,5 M EDTA eklendi.
- ✓ NaOH tabletleri ile solüsyonun pH’ı 8’e ayarlanmış ve hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

Kullanılacağı zaman bu 10X TBE stok tamponu 1\10 oranında distile su ile sulandırılmıştır.

5.1.2.7 Antibiyotikler

- ✓ Klindamisin (Sigma-Aldrich, ABD)
- ✓ Kloramfenikol (Sigma-Aldrich, ABD)
- ✓ Tetrasiklin (Sigma-Aldrich, ABD)
- ✓ Tigesiklin (Sigma-Aldrich, ABD)

5.2 YÖNTEMLER

5.2.1 Kütle Spektrometre (MALDI-TOF MS) ile Tanımlama

BFG bakterilerin tür düzeyinde tanımlamalarını VITEK® MS (bioMérieux, Fransa) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz basamakları şu şekilde yapılmıştır.

- ✓ Kültürü yeni yapılmış bakteriden bir koloni alınarak VITEK® MS slaydının kuyucuğuna öze yardımı ile yayılmıştır.
- ✓ Yayılmış olan her bir kuyucuğa 1 µl matriks solüsyonu (2,5-dihidroksibenzoik asit ve α -siyano-4-hidroksisinnamik asit) damlatılıp kurumaya bırakıldı.
- ✓ Kuruyan slayt cihaz içine yerleştirilerek lazer ışınları ile bakteri hücre duvar yapısı arasında reaksiyon vermesi beklenildi.
- ✓ Elde edilen kütle spektrum grafiği sistemin V3.0 bilgi veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması sağlandı.
- ✓ Sistemin kalibrasyonu ve bakterilerin tanımlanma kontrolü için ATCC *E.coli* 8739 kökeni kullanılmıştır.

5.2.2 Antimikrobiyal Duyarlılıkların Saptanması

Protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerin duyarlılık profillerinin fenotipik olarak belirlenmesinde CLSI'nın M11-A7 dökümanında belirtilen agarda dilüsyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. (CLSI, 2007).

5.2.2.1 Brucella Agar Hazırlığı

Agarda dilüsyon metodunun hazırlık aşamasının ilk kısmı olan besiyeri hazırlığı için; anaerob bakterilerin kolaylıkla koloni oluşturabileceği zengin besin içeriklerine sahip brucella agar kullanılmıştır.

- ✓ CLSI'nın önerisine göre, Brucella Agar toz besiyerinden distile su ile sulandırılarak hazırlanan karışım otoklavda steril edildi.
- ✓ Yüksek sıcaklıktaki besiyeri 50 °C'ye kadar soğutulması sağlandı.
- ✓ Besiyerine K vitamini (10µg/ml) ve hemin (5µg/ml) ve %5 oranında defibrine koyun kanı eklendi.
- ✓ Ardından, seri dilüsyonlar ile hazırlanmış antibiyotiklerin bulunduğu plaklara antibiyotik solüsyonu ve besiyeri oranı 1/10 olacak şekilde (ve 4 mm kalınlıkta) hazırlanan besiyerine aktarıldı.
- ✓ Antibiyotiklerin besiyerinde homojen dağılması için plaklar S çiziliyormuş gibi hafifçe sarsılarak eşit dağıtıldı.
- ✓ Düz bir zeminde soğumaya bırakılmıştır.

5.2.2.2 Antimikrobiyallerin Hazırlanması ve Stok Solüsyonları

Antibiyotiklerin seri dilüsyonları ve çözme işlemleri CLSI'nın M11-A7 dökümanında belirtilen sulandırma şemasına göre yapılmıştır. Antibiyotiklerin çözücüler ve dilüsyon sıvıları Tablo 4' te gösterilmiştir (CLSI, 2007).

Antimikrobiyaller	Çözücü	Dilüsyon Sıvısı
Kloramfenikol	%95 etanol	Steril edilmiş distile su
Tetrasiklin	Steril edilmiş distile su	Steril edilmiş distile su
Tigesiklin	Steril edilmiş distile su	Steril edilmiş distile su
Klindamisin	Steril edilmiş distile su	Steril edilmiş distile su

Tablo 1: Antimikrobiyallerin Çözücüler ve Seri Dilüsyon Sıvıları

Kullanılacak antimikrobiyal ilaçlar için stok çözeltilerin ilk yoğunlukları 5120 µg/ml olacak şekilde, CLSI'nın önerdiği, aşağıda yer alan formüle göre hesaplanarak yapılmıştır.

$$\text{Hacim (ml)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Antimikrobiyalin Potensi}}{\text{İstenen Konsantrasyon (µg/ml)}}$$

Antibiyotiklerin hazırlanan stok solüsyonları kullanılıncaya kadar Kloramfenikol -80 °C'de Klindamisin, Tetrasiklin +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Stok solüsyonlarından her bir antibiyotik için seri dilüsyonlar hazırlanarak besiyeri içinde 1\10 oranında plaklara eklenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız antibiyotiklerin konsantrasyon aralıkları tablo 5 'te gösterildiği gibi yapılmıştır.

Antibiyotikler	Konsantrasyon Aralıkları (µg/ml)
Kloramfenikol	0,125-256
Tetrasiklin	0,125-64
Tigesiklin	0,125-8
Klindamisin	0,125-256

Tablo 2: Kullanılacak Antibiyotikler ve konsantrasyon Aralıkları

5.2.2.3 Bakteri İnokülümlerinin Hazırlığı ve Ekimleri

Bakteri inokülüm hazırlığı ve ekim basamakları CLSI 'nın önerdiği basamaklar kullanılarak yapılmıştır (CLSI, 2007).

- ✓ BFG bakteri izolatları Brucella agardaki 48 saatlik taze kültürden öze yardımı ile alınıp içerisinde Brucella sıvı besiyeri olan steril cam tüplere homojen bir şekilde karıştırılarak eklendi.
- ✓ İzolatların ekimleri tamamlandıktan sonra ağızları kapalı olan cam tüpler anaerobik jarın içerisine dikkatli bir şekilde yerleştirildi.

- ✓ Anaerobik ortam sağlandıktan sonra 37 °C’de 24 saat inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonrası kültürden yeni steril içerisinde Brucella sıvı besiyeri olan cam tüplere alınarak 0,5 McFarland (1,5x10⁸ CFU/ml) yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı.
- ✓ Ardından bu bakteri süspansiyonu 1/10 oranında sulandırılmış ve antibiyotikli besiyerlerine, 10’ar µl nokta şeklinde eklenerek inoküle edilmiştir. Bu işlem; Bakterilerin inokülasyonu en düşük antibiyotik konsantrasyonu içeren besiyerinden başlanarak yüksek konsantrasyon içeren besiyerlerine doğru yapılmıştır.
- ✓ İnokulumlar kuruduktan sonra plaklar anaerop koşullarda 37 °C’de 48 saat inkübe edildi.
- ✓ Kontrol amacıyla antibiyotik içermeyen iki besiyeri plağına ekim yapılarak biri aerop diğeri anaerop ortamda inkübasyonu sağlanmıştır
- ✓ Kontrol kökeni olarak ATCC *Bacteroides fragilis* 25285 kullanılmıştır.

5.2.2.4 Sonuçların Okunması ve Değerlendirme Aşaması

Agar dilüsyon sonuçlarının değerlendirilme aşamaları CLSI ve EUCAST verilerinde belirtilen referans aralıklarına göre sonuçlandırılmıştır. Referans aralıkları Tablo 3’te gösterildiği gibi (CLSI, 2007; EUCAST,2015); Üremenin olmadığı ilk en düşük antibiyotik konsantrasyonu minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak kabul edilmiştir. Damlaların bırakılmasına bağlı izler Şekil 6 ‘teki gibi kabul edilip, bir koloni şeklinde üremeler değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Antimikrobiyaller	CLSI’ya Göre Sınır Değerler MİK (mg/ml)			EUCAST’a Göre Sınır Değerler MİK (mg/ml)	
	S≤	I	R≥	S≤	R≥
Kloramfenikol	8	16	32	8	8
Tetrasiklin	4	8	16	DY	DY
Tigesiklin	DY	DY	DY	DY	DY
Klindamisin	2	4	8	4	4

Tablo 3: CLSI ve EUCAST Kriterlerine Göre Anaerop Bakteriler İçin Çeşitli Antibiyotik Sınır Değerleri

Tablo 3’te gösterilen R: dirençli, S: duyarlı, DY: referans alınan kitapçıkta henüz sınır değeri belirlenememiştir. Anlamları taşımaktadır.



RESİM 3: Klindamisin için Kolonilerin Değerlendirme Durumu

5.2.3 Antibiyotik Direnç Geni Saptanması

Yöntemlerin ikinci kısmı olup; bu kısımda fenotipik olarak MİK değerleri saptanan izolatların Klindamisin ve Tetrasiklin antimikrobiyallerinin genotipik açısından direnç genleri ve sessiz genlerin varlığını saptamak amacıyla moleküler yöntemler kullanılmıştır.

5.2.3.1 Bakteri Kültürlerinden DNA İzolasyonu

B. fragilis grubu bakterilerin genomik analizinin ilk basamağı olup Fang ve ark., 1999’ da oluşturmuş oldukları protokol modifiye edilerek uygulanmıştır.

- ✓ İzolatların taze kültürlerinden bir öze dolusu bakteri örneği alındı.
- ✓ 200 µl apirojen su içerisinde süspanse edildi.
- ✓ Süspansiyonlar 95 °C’de 15 dakika ısı bloğunda tutuldu.
- ✓ 10 000Xg devirde 5 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Üst kısım bakteri DNA’sı olarak kullanıldı.
- ✓ EldRe edilen DNA ekstraktları kısa sürede işleme alınması halinde 4 °C’de muhafaza edilmiştir, uzun süre muhafaza etmek için -20 °C’de saklanmıştır.

5.2.3.2 Genotipik Belirlemenin PCR Aşaması

5.2.3.2.1 Tetrasiklin ve Klindamisin Direnç Geninin PCR Aşaması

Tetrasiklin Direncine neden olan tetX, tetQ, tetX1, tet36 ve tetM genlerinin PCR analizleri yapılmıştır. PCR toplam reaksiyon hacmi 20µl olacak şekilde Tablo 4'teki tetQ, tetX, tetX1, tet36 ve tetM genlerinin primer sekansları kullanılarak bir PCR tüpüne konulmuştur. toplam da iki tane kontrol kullanılmıştır. İlk kontrolde doğru bandın çıkma durumunu kontrol edebilmek için; Her PCR'da I. negatif kontrol olarak *ATCC B. fragilis* izolatının DNA'sı çalışılmıştır. II. Negatif kontrol olarak çalışılan grup primerlerin kontrolünü sağlamak amacıyla PCR tüpüne DNA yerine aynı miktar steril saf su eklenmiştir. PCR tüpüne konan bileşenlerin PCR'da kullanılacak malzemeler Tablo 5' te gösterilmiştir.

Primer Adı	Primerin Sekansı	PCR Döngüsü (s: saniye, dk: dakika,)
tetX (Forward)	5'TTAGCCTTACCAATGGGTGT 3'	95 °C 15 s (denatürasyon), 55 °C 30 s (hibridizasyon), 72°C 30 s (uzama), 35 döngü
tetX (Reverse)	5'CAAATCTGCTGTTTCATTTCG 3'	
tetQ (Forward)	5'ATCGGTATCAATGAGTTGTT3'	95°C 15 s (denatürasyon), 50 °C 1dk. (hibridizasyon)
tetQ (Reverse)	5'GACTGATTCTGGAGGAAGTAA3'	72°C 30 s (uzama), 35 döngü
tetX1 (Forward)	5'TCAGGACAAGAAGCAATGAA3'	95°C 15 s (denatürasyon), 50°C 1 dk (hibridizasyon), 72°C 30 s (uzama), 32 döngü
tetX1 (Reverse)	5'TATTTCTGGGGTTGTCAAAC3'	
tet36 (Forward)	5'TTTCTGGCAGAGGTAGAACG3'	95 °C 15 s (denatürasyon), 57°C 30 s (hibridizasyon), 72°C 30 s (uzama), 35 döngü
tet36 (Reverse)	5'TTAATTCCTTGCCTTCAACG3'	
tetM (Forward)	5'ATCCTTTCTGGGCTTCCATT3'	95°C 15 s (denatürasyon), 59°C 30 s (hibridizasyon), 72°C 30 s (uzama), 35 döngü
tetM (Reverse)	5'TCCGTCACATTCCAACCATA3'	
ermF (Forward)	5'TAGATATTGGGGCAGGCAAG3'	95°C 15 s (denatürasyon), 58 °C 1 dk (hibridizasyon), 72 C 30 s (uzama),
ermF (Reverse)	3'GGAAATTGCGGAAGTGCAAA5'	

Tablo 4: Primerlerin Sekansları ve PCR döngüleri

PCR BİLEŞENLERİ	KONSANTRASYON	20 µl REAKSİYON KARIŞIMINDAKİ MİKTAR
Primer F (100 pmol)	10 pmol/µl	0,3 µl
Primer R (100 pmol)	10 pmol/µl	0,3 µl
10XPCR Master Mix	1X PCR tamponu	4,5 µl
Genomik DNA	150ng	2 µl
Bidistile su	-	14.9 µl

Tablo 5: PCR Bileşenleri ve Reaksiyon Konsantrasyonları

PCR ürünleri jel elektroforezinde görüntülenerek değerlendirilmiştir.

5.2.3.4 PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Değerlendirme Aşaması

Agaroz; esas itibariyle deniz yosunundan üretilmiş bir çeşit polisakkarittir. %1'lik konsantrasyonda hazırlanmıştır. Kullanım amacı DNA moleküllerini ayırtmak ve moleküler ağırlıklarını tespit etmektir. %1'lik agaroz jel hazırlamak için:

- ✓ 0,4 g agaroz hassas terazide tartılarak içinde 40 ml olan 1X'lik TBE eklenmiş erlene boşaltıldı.
- ✓ Mikro dalga fırında yüksek sıcaklıkta 3 dk eritilerek homojen bir kıvama gelmesi sağlandı.
- ✓ Jel oda ısısına gelmeye başladığında karışımın içine EtBr stoğundan 1µl eklenerek karıştırıldı.
- ✓ Tarakları yerleştirilmiş olan elektroforez tankının içine jel dökülerek soğuması beklenildi.
- ✓ Soğuma işlemi bitip jel tamamen donduktan sonra PCR ürünleri 6 µl alınarak kuyucuklara yüklenildi.
- ✓ 70V elektriksel akım altında PCR ürünlerinin moleküler ağırlıklarına göre belli bir noktaya kadar yürümesi sağlandı.
- ✓ Yürütülme işlemi tamamlandıktan sonra UV ışın altında görüntülenerek bandın varlığına göre değerlendirme yapılmıştır.

6. BULGULAR

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne mikrobiyolojik inceleme amacıyla laboratuvarımıza gönderilen çoğu batın içi absesinde(n=32) olmakla birlikte apse (n=4), kan (n=14), doku (n=14) gibi çeşitli klinik örneklerden izole edilen BFG bakterileri çalışmaya alınmıştır.

6.1 Kütle Spektrometre (MALDI-TOF MS) ile Tanımlama

VITEK MS (bioMérieux, Fransa) ile yapılan tanımlamada toplam 83 izolat kullanılmıştır. Tanımlanan izolatların; sekiz farklı bakteri türünden (n=48) *Bacteroides fragilis* ve (n=18) *Bacteroides thetaiotaomicron* en çok rastlanılan bakteri türleri olup; (n=6) *Parabacteroides distasonis*, (n=4) *Bacteroides ovatus*, (n=5) *Bacteroides vulgatus*, (n=1) *Bacteroides uniformis* ve (n=1) *Bacteroides coccae* şeklinde tanımlama yapılmıştır. Sadece bir izolat tür olarak tanımlanamamıştır. Tanımlamanın güvenilirliği %99,9 kesinliktedir.

6.2 Antimikrobiyal Duyarlılıkların Saptanması

Çalışmaya alınan tüm izolatların, protein sentezini inhibe eden antibiyotik duyarlılık profilleri hem CLSI hem de EUCAST kılavuzlarına göre değerlendirilmiştir. İlk olarak EUCAST kılavuzunda yer alan sınır değerleri değerlendirmeye alınmıştır. Bu kılavuzda belirtilmeyen antibiyotiklerin duyarlılıklarında CLSI değerleri temel alınmıştır. Tigesiklin antibiyotiği için ise; FDA tarafından önerilen sınır değerleri (duyarlı: ≤ 4 mg/L, dirençli: ≥ 8 mg/L) temel alınmıştır.

İzolatların CLSI ve EUCAST verilerine göre MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini kapsayan antibiyotiklere duyarlılık profilleri Tablo 6' da gösterildiği gibi değerlendirilmeye alınmıştır.

Antimikrobiyaller	MİK ₅₀ (mg/ml)	MİK ₉₀ (mg/ml)	MİK Aralığı (mg/ml)
Kloramfenikol	2-4	8	0,007->32
Tetrasiklin	16-32	64	0,062-64

Tigesiklin	0,5-1	4-8	<0.007-8
Klindamisin	16	>32	<0.016- 256

Tablo 6: İzolatların MİK ve Sınır Değerleri

Çalışmaya alınan BFG bakteri türlerinin protein sentezini inhibe eden antibiyotiklere duyarlı olmayan izolatlar CLSI kılavuzuna göre sayı ve yüzde olarak tablo 7’ de gösterilmiştir. Hem CLSI kılavuzunda hemde EUCAST kılavuzunda Tigesiklin antibiyotiği için bir sınır değeri gösterilmemiştir. Tigesiklin antibiyotiği için ise; FDA tarafından önerilen sınır değerleri (duyarlı: ≤ 4 mg/L, dirençli: ≥ 8 mg/L) temel alınıp; *Bacteroides fragilis* (n=1) %2,08; *Bacteroides thetaiotaomicron* (n=4) %22,22; *Parabacteroides distasonis* (n=2) %16,66; *Bacteroides ovatus* (n=1) %25; olarak dirençli bulunmuştur. *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides coccae* izolatlarında direnç saptanmamıştır.

İzolatlar	Kloramfenikol	Tetrasiklin	Klindamisin
<i>Bacteroides fragilis</i> (n=48)	%10,41 (n=5)	%81,25 (n=39)	%58,33 (n=28)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (n=18)	%16,66 (n=3)	%83,33 (n=15)	%88,88 (n=16)
<i>Parabacteroides distasonis</i> (n=6)	%50 (n=3)	%100 (n=6)	%100 (n=6)
<i>Bacteroides ovatus</i> (n=4)	%9,09 (n=1)	%90,90 (n=10)	%72,72 (n=8)
<i>Bacteroides vulgatus</i> (n=5)	%20 (n=1)	%100 (n=5)	%60 (n=3)
<i>Bacteroides uniformis</i> (n=1)	–	%100 (n=1)	%100 (n=1)
<i>Bacteroides coccae</i> (n=1)	–	%100 (n=1)	%100 (n=1)

Tablo 7: Antimikrobiyallere Duyarlı Olmayan İzolatların Türleri ve Yüzdeleri (CLSI)

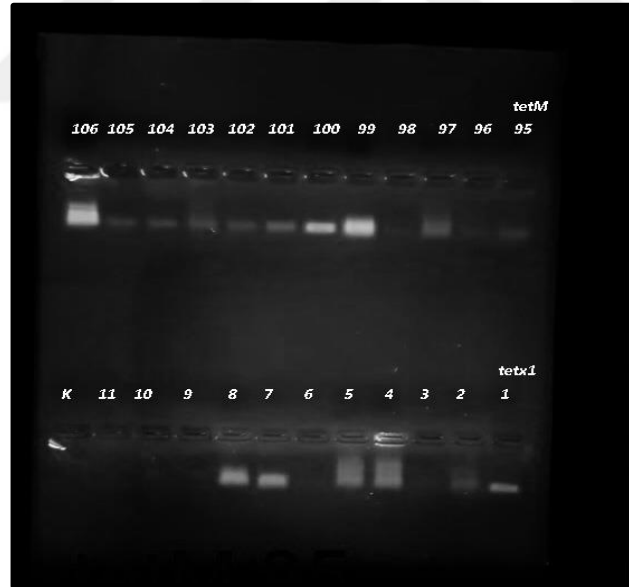
Kökenlerin sırasıyla antimikrobiyal dirençleri CLSI ‘den referans alınarak Tablo 7’de gösterildiği gibi belirlenmiştir. Tablo 7’ deki verilere göre; tüm izolatlar için Kloramfenikol direnci %15,66; Tetrasiklin direnci %92,77; Klindamisin direnci %75,90; Tigesiklin direnci %9,63 olarak bulunmuştur. Değerlendirmeye orta düzeyde duyarlı olanlarda dahil edilmiştir.

CLSI ve EUCAST kılavuzunda Klindamisin antibiyotiği için aynı sınır değerleri verilmiştir. EUCAST kılavuzunda Tetrasiklin antibiyotiği için sınır değeri belirtilmemiştir. Kloramfenikol antibiyotiğine duyarlı olmayan izolatlar EUCAST kılavuzuna göre; *Bacteroides fragilis* (n=36) %75; *Bacteroides thetaiotaomicron* (n=14) %77,77; *Parabacteroides distasonis* (n=6) %100; *Bacteroides ovatus* (n=3) %60; *Bacteroides vulgatus* (n=4) %80; *Bacteroides uniformis* (n=1) %100; *Bacteroides coccae* (n=1) %100 olarak bulunmuştur.

6.3 Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması

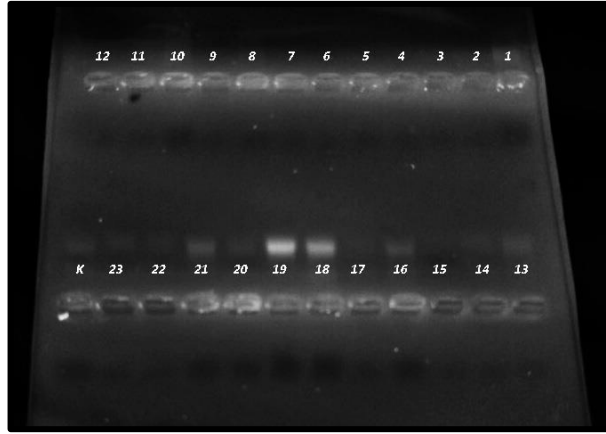
6.3.1 Tetrasiklin Direnç Genlerinin Saptanması

Tetrasiklin direncine neden olan tetX, tetQ, tetX1, tet36 ve tetM genlerinin PCR analizleri Tablo 4'te verildiği gibi yapılmıştır. Tetrasiklin antibiyotiğine direnç geni saptanırken; fenotipik olarak duyarlı olan ve olmayan bütün izolatlar çalışmaya alınmıştır. Bandın varlığı UV ışınının altında bakılarak şekil 7,8,9'daki gibi bazı görüntüler elde edilmiştir.



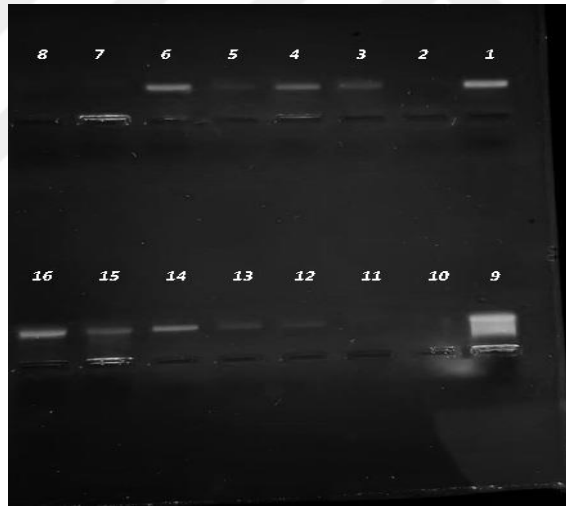
RESİM 4: tetM ve tetx1 jel elektroforez görüntüsü

Şekil 7 'de tetM ve tetx1 direnç genine özgü primerler kullanılarak elde edilmiş 83 izolattan 95-106 numaralı tetM direnç geninde 9 izolat pozitif sonuç vermiştir; 1-11 numaralı tetx1 direnç geninde 6 izolat pozitif sonuç vermiştir. Kontrol olarak ATCC 2585 *B.fragilis* kullanılmıştır.



RESİM 4: tet36 direnç genin jel elektroforez görüntüsü

Şekil 8’ de gösterildiği gibi 83 izolattan 1-23 numaralandırılmış izolatin tet36 direnç genine ait bant görüntüsü elde edilmiştir. 1-23 arasındaki izolatların tamamı *B.fragilis* olup yalnız 5 tanesinde pozitif sonuç görülmüştür.



RESİM 5: tetX direnç genin jel elektroforez görüntüsü

Şekil 9’ da 83 izolattan 1-16 numaralandırılmış izolatların tetx jel elektroforez görüntüsü verilmiştir. 11 izolat pozitif sonuç vermiştir.

Tetrasiklinlerin geniş spektrumlu ve anaerop enfeksiyonların tedavisinde ilk kullanılan antibiyotik olduğu bilinmektedir. Buna rağmen bugün BFG bakterileri suşlarının hemen hemen tümünün bu antibiyotiğe dirençli olduğu gözlemlenmiştir.

En büyük nedenleri arasında direnç genleri gelmektedir. Elde edilen verilere göre; tüm izolatlardan tetX direnç genine %44,57; tetQ direnç genine %55,42; tetx1 direnç genine %26,50; tet36 direnç genine %24,16; tetM direnç genine %31,32 oranlarında sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya alınan izolatların tür bakımından direnç durumları Tablo 8’ de gösterilmiştir.

İzolatlar	tetX	tetQ	tetx1	tet36	tetM
<i>Bacteroides fragilis</i> (n=48)	%35,41 (n=17)	%43,75 (n=21)	%18,75 (n=9)	%27,08 (n=13)	%22,91 (n=11)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (n=18)	%50 (n=9)	%55,55 (n=10)	%27,77 (n=5)	%22,22 (n=4)	%33,33 (n=6)
<i>Parabacteroides distasonis</i> (n=6)	%50 (n=3)	%66,66 (n=4)	%50 (n=3)	%33,33 (n=2)	%50 (n=3)
<i>Bacteroides ovatus</i> (n=5)	%54,54 (n=6)	%63,63 (n=7)	%20 (n=1)	%40 (n=2)	%60 (n=3)
<i>Bacteroides vulgatus</i> (n=5)	%40 (n=2)	%40 (n=2)	%33,33 (n=3)	%22,22 (n=2)	%22,22 (n=2)
<i>Bacteroides uniformis</i> (n=1)	–	%100 (n=1)	–	–	%100 (n=1)
<i>Bacteroides coccae</i> (n=1)	–	%100 (n=1)	–	–	%100 (n=1)

Tablo 8: İzolat Türleri ve Tetrasiklin Direnç Geni Yüzdeleri

6.3.2 Klindamisin Direnç Geni Saptanması

Klindamisin direncinde rol alan erm geninin PCR analizleri Tablo 4’te verildiği gibi yapılmıştır. klindamisin antibiyotiğine direnç geni saptanırken; fenotipik olarak duyarlı olan ve olmayan bütün izolatlar çalışmaya alınmıştır. Bandın varlığı UV ışınının altında bakılarak Tablo 9’da yorumlanmıştır.

Direnç Geni	<i>Bacteroides fragilis</i> (n=48)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (n=18)	<i>Parabacteroides distasonis</i> (n=6)	<i>Bacteroides ovatus</i> (n=5)	<i>Bacteroides vulgatus</i> (n=5)	<i>Bacteroides uniformis</i> (n=1)	<i>Bacteroides coccae</i> (n=1)
ermF	%56,25 (n=27)	%66,66 (n=12)	%33,33 (n=2)	%40 (n=2)	%80 (n=4)	–	–

Tablo 9: İzolat Türleri ve Klindamisin Direnç Geni Yüzdeleri

Elde edilen verilere göre %56,62 oranında Klindamisin direncinde rol alan ermF geni rol oynamaktadır. 7 farklı izolat türünden sadece *Bacteroides coccae* ve *Bacteroides uniformis* izolatlarında ermF genine rastlanılmamıştır.

7.TARTIŞMA ve SONUÇ

Anaerop bakteriler üst solunum yolları, gastrointestinal ve ürogenital sistem mikrobiyotasının önemli bir kısmını oluştururlar. Normal şartlar dahilinde konak ile bir denge halinde bulunan bu bakteriler, doku bütünlüğünün zarar görmesi halinde fırsatçı patojen durumuna gelerek çok ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadırlar.

Çok ciddi enfeksiyonlara yol açtığı bilinen anaerop bakterilerin izolasyon ve identifikasyonları oldukça güçtür. Bu da bölgelerden yeterli verinin elde edilememesine sebep olmaktadır. Ancak anaerop bakterilerin izolasyonu güç ve zaman alıcı olsa da kolon mikrobiyotasının önemli bir bölümünü oluşturan BFG bakteriler anaerop kaynaklı enfeksiyonlardan birinci sırada izole edilmektedir. Günümüzde başarılı anaerop kültür çalışması yapılan laboratuvarlarda, anaerop çalışma için kabul edilen klinik örneklerden değişen oranlarda (%25-50) anaerop bakterilerin izole edildiği bildirilmektedir (Murray ve ark.,2016). Bu sayı anaerop kaynaklı enfeksiyonlara karşı ciddi mücadeleleri ve önemi göstermektedir. Çalışmamızda %38,55 batın içi apsesi olmak üzere; %4,81 kan, %16,86 doku ve %16,86 apse gibi çeşitli klinik örneklerden yedi farklı BFG bakteri türlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplam 83 izolattan, (n=48) *Bacteroides fragilis* ve (n=18) *Bacteroides thetaiotaomicron* en çok rastlanılan bakteri türleri olup; (n=6) *Parabacteroides distasonis*, (n=5) *Bacteroides ovatus*, (n=5) *Bacteroides vulgatus*, (n=1) *Bacteroides uniformis*, ve (n=1) *Bacteroides coccae* şeklinde tanımlama yapılmıştır.

Son yıllarda anaerop bakterilere bağlı enfeksiyonların, antibiyotiklere artarak direnç gösterdikleri, direnç artışının en fazla enfeksiyon etkeni olan BFG bakteriler arasında yer aldığı bildirilmektedir (Haldorsen ve ark.,2011). Buna karşın BFG başta olmak üzere tüm anaerop bakteriler arasında antibiyotik direnci, direnç genlerinin yayılması ve dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonlarda uygunsuz tedaviye bağlı klinik başarısızlıklar ile ilgili veriler son yıllarda Citron ve ark. yaptığı araştırmalar ile Hecht ve ark. yaptığı çalışmalarda sıklıkla bildirilmektedir (Citron ve ark.,2012; Hecht ve ark.,2006).

CLSI, yukarıda sözü edilen artan direnç sorunu nedeniyle antibiyotiklere karşı direnç profili öngörülemeyen ve oldukça virulan seyreden Gram negatif çomaklardan olan *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*'a antibiyotik duyarlılık testi yapılmasını tavsiye etmektedir. Bizde çalışmamızda bu tavsiyenin izinden giderek tez çalışmamızın temelini hazırladık.

Farklı ülkelerden ve daha önceki çalışmalardan elde edilen verilere göre BFG bakterilerinin beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri, karbapenemler ve metronidazol gibi sınırlı sayıda antibiyotiğe duyarlı oldukları gösterilmiştir (Haldorsen ve ark.,2011; Fletcher ve ark.,1991; Toprak ve ark.,2004). Tetrasiklin, klindamisin gibi protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren antibiyotiklere yıllar içinde gelişen yüksek direnç artışı bu antibiyotikleri tedavide kullanılamaz duruma getirmiştir.

Makrolid-linkozamid-streptogramin (MLS) grubunda yer alan klindamisin, bakteri ribozomunun 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir. Klindamisin direnç, 23S ribozomal RNA'da metilasyon sonucu gelişmekte ve antibiyotik hedef bölgeye bağlanamamaktadır. Metilasyondan sorumlu çok sayıda *erm* geni (*ermF*, *ermFS*, *ermG*, *ermB*) bildirilmiştir (Seifert ve ark.,2010). Türkan ve ark. Hecht ve ark. farklı zamanlarda yaptıkları çalışmalarda bu genlerin genel olarak plasmid ve transpozonlar gibi mobil genetik yapılarda lokalize olduklarından dolayı bakteriden bakteriye kolayca aktarılabileceğini bildirmişlerdir (Türkan ve ark., 2008; Hecht ve ark., 2006).

Klindamisin direnci günümüzde anaerob bakteriler arasında artış gösterme eğilimindedir. Son yıllarda özellikle *B. fragilis* grup üyeleri arasında klindamisin direnci tüm dünyada önemli boyutlara ulaşmış olup çoğu çalışmada %10-40 oranlarında direnç elde edilmiştir. Bu nedenle klindamisin anaerob enfeksiyonların ampirik tedavisinde artık önerilmemekte ve tercih edilmemektedir (Türkkan, 2008; Snyderman, 2002; Hecht, 2006; Aldridge, 2001; Wybo, 2007). Klindamisin direnci *B. fragilis* dışındaki *Bacteroides* türlerinden özellikle *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron* ve *B. caccae* suşları arasında genellikle daha yaygın olup bazı çalışmalarda direnç oranlarının %50-70'lere ulaştığı gözlenmiştir (Türkkan, 2008; Hecht, 2006; Behra-Mielliet, 2003). *Bacteroides* dışındaki anaeroplarda klindamisine direnç nispeten daha düşük oranlarda seyretmekle birlikte bu durum son yıllarda direnç oranlarında artışa dikkat çekilmektedir.

Anaerop Gram negatif basillerden Prevotella, Fusobacterium ve Porphyromonas suşlarının ortalama %10'unda klindamisine karşı direnç geliştiğini Hecht ve ark. yaptığı antibiyotik duyarlılık çalışmasında bildirilmektedir (Hecht, 2006; Hecht, 2005).

Yaptığımız çalışmada; Klindamisin antibiyotiğine direncin %75,90 oranında olduğu görülmüştür. Ülkemizde 5 yıl önceki verilere göre BFG üyelerinde %24 ile %56 oranlarında bildirilen direnç değerleri ile yapılan önceki sürveyans çalışmaları dikkate alındığında, elde ettiğimiz sonuçların uyumlu olduğu gözlenmektedir (Nagi ve ark.,2011). Aynı zamanda Klindamisin antibiyotiğine karşı dirençte rol olan ermF geninin %56,62 oranında pozitif çıkması ile genin fenotipik olarak yansımaları kanıtlar niteliktedir.

Son yıllarda kullanılamaz hale gelen tetrasiklin antibiyotiğine direnç; efflux pompası ve protein sentezi inhibisyonu olmak üzere iki önemli mekanizma ile gerçekleşmektedir. Gelişen bu dirence neden olan tetQ, tetX, tetM, tetx1, tet36 gibi direnç genleri mevcuttur. Ülger ve ark. protein sentezini inhibe eden antibiyotikler üzerine yaptıkları çalışmada; klindamisine dirençli kökenlerin, aynı etki mekanizmasına sahip antibiyotiklerden tetrasiklin ve kloramfenikole istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla direnç göstermekte olduğunu belirtmişlerdir (Ülger ve ark.,2014). Chau Minh ve ark. abdominal enfeksiyonlardan izole edilmiş BFG bakterilerde antibiyotik direnç genleri ile ilgili yaptıkları çalışmada tetrasiklin antibiyotiğine direncin anlamlı olarak en fazla tetQ geninin rol aldığını göstermişlerdir (Chau ve ark., 2013). Yapılan bu çalışmalar; tüm izolatlarımız için %92,77 oranında bulduğumuz tetrasikline direncini kanıtlar niteliktedir. Eş zamanlı olarak tetrasiklin direncine neden olabilecek tüm spesifik genlerin moleküler analizleri yapılmış olup; tetQ direnç genine %55,42; tetX direnç genine %44,57; tetx1 direnç genine %25,30; tet36 direnç genine %27,71 ve tetM direnç genine %32,53 oranında pozitif olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız; Chau Minh ve ark. tetQ ile ilgili yaptıkları öngörüyü desteklemektedir.

Yapısal özellikleri nedeniyle tigesiklin, tetrasiklini inaktive eden direnç mekanizmalarından etkilenmez. Komplike karın içi enfeksiyonlarının, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının ve çok antibiyotiğe dirençli organizmalarla anaeroplara yaptığı miks enfeksiyonların tedavisinde tigesiklin başarılı sonuçlar vermektedir. Ancak geniş katılımlı sürveyans çalışmalarında yüksek MİK değerine sahip BFG İzolatları saptanmıştır. Nagy ve ark. yaptıkları bir çalışma sonucunda yüksek MİK değerine sahip izolatlarda tetX ve tetX1 genlerinin sıklıkla görülmesi, aerob bakterilerde tetrasiklin direncine yol açabilen bu tet genlerinin tigesiklinde direnç geliştirme potansiyelinde olabileceği ileri sürülmüştür (Nagy ve ark.,2011).

Avrupa’da çok merkezli olarak yapılan bir araştırma da BFG bakterilerin *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella spp.* gibi çoklu ilaca dirençli aerob bakterilere oranla direncin %1,7 oranında seyrettiğini yayınlamışlardır. Tigesiklin ile ilgili Kanada’da Snyderman ve ark. yaptıkları çalışmada BFG bakterilerin tigesiklin antibiyotiğine olan direncin %34,1 oranında yüksek olduğunu bildirmiştir (Snyderman ve ark.,2012).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre; %14,58 oranında tigesiklin antibiyotiğine direnç bulunmuştur. Ortaya çıkan direnç yüzdesinin tetrasikline direncinde rol alan genlerin transpozal etkisi olabileceğini ve izolatların bölgesel olarak elde edilme yerlerine göre değişiklik gösterebileceğini de düşündürmektedir.

Tigesiklin antibiyotiği gibi direnç oranı nadir olarak görülmeye başlayan kloramfenikol antibiyotiğinde ise; Ülger ve ark. %2 oranında direnç saptaması dışında bir bildiriye rastlanılmamıştır. Bunun en büyük nedenleri arasında yayımlanan diğer bildirilerde kloramfenikolün, toksik yan etkilerinin olması nedeniyle ilacın az kullanılmasına bağlanmaktadır. Bizim çalışmamızda ise; kloramfenikole direnç oranı %13,54 olarak bulunmuştur. Tür bakımından direnç oranı en fazla *Bacteroides thetaiotaomicron* ‘da görülmüştür. Yüzdelik olarak korkutucu olmasa da bu oranın uzun vadede artacağı ve sayılı sayıda antibiyotiğe direnç göstermeyen BFG bakterilerin tedavisindeki risklerin öngörüsü olabileceğini düşündürmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; BFG bakteri türleri arasında görüldüğü üzere, çalışmaların yapıldığı coğrafi bölgelere, merkezlere hatta aynı merkezin farklı bölümlerine göre direnç varlığını değişikliktir. Merkezlerin antibiyotik kullanım politikası direnç oluşumunda ve merkezler arası direnç profil farklılığı ayrı öneme sahiptir. Aynı zamanda CLSI referans olarak gösterdiği antimikrobiyal duyarlılık testlerinden agarda dilüsyon yönteminin oldukça zahmetli ve maliyetli bir yöntem olması, anaerob bakterilerinin izolasyonun gerçekleşmesi için özel koşullar gerektirmesi nedeniyle elde edilen veriler oldukça sayılıdır.

Elde ettiğimiz sonuçların hem hastanemizin veri tabanına hemde ülkemizin diğer hastaneleri için önemli sonuçları barındırmaktadır. Tedavide sayılı sayıda kullanılan antibiyotiklerin şu anki verilerimize göre dirençlerde artışın olduğunu göstermektedir.

Verilerimize göre; fenotipik olarak direncin söz konusu olmadığı fakat; barındırdıkları direnç genleri ile Klindamisin antibiyotiğine karşı fenotipik direnci olmayan izolatlarda (n=12) ermF sessiz geni, tetrasikline antibiyotiği içinde; tetX1 (n=1), tet36 (n=1), tetM (n=1) sessiz genleri gözlemlenmiştir. Bu durumun ileriki zamanlarda direnç oranlarının artışı ile karşımıza çıkacağını düşünmekteyiz. Bu sonuçların daha sonra yapmayı planladığımız araştırmalara ve ülkemizde yapılacak olan diğer çalışmalara kaynaklık yapacağına düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

- Anonim, (2015). "Akıllı İlaç Kullanımı " Available at: http://www.akilciilac.gov.tr/?page_id=1009&lang=tr_TR. Accessed 25.07.2015.
- Bacic M, Parker AC, Stagg J et al. Genetic and Structural analysis of the *Bacteroides* conjugative transposon CTn341. J Bacteriol 2005; 187: 2858–2869.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standards, M11-A7. 2007, 7th ed. CLSI, Pennsylvania, USA.
- Bartha, N.A., Soki, J., Edit, U., Nagy, E., 2011. Investigation of the prevalence of tetQ, tetX and tetX1 genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. Int. J. Antimicrob. Agents 38, 522–525.
- Botta GA, Arzese A, Minisini R, Trani G. Role of structural and extracellular virulence factors in gram-negative anaerobic bacteria. Clin Infect Dis 1994; 18:260–264.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-33.
- Britz ML, Wilkinson RG. Choramphenicol acetyltransferase of *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Cgemother. 1978; 14: 105-11.
- Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 2013 Jul;26(3):526-46.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology Çeviren: Yenen OS. Jawetz, Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji. 26. basım, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul; 2014, s: 229-236.
- Cavallaro JJ, Wiggs LS and Miller JM. Evaluation of the BBL Crystal Anaerobe Identification System. J Clin Microb. 2001;35(12): 3186-3191.
- Control, C.f.D. ve Prevention, (2013). "Multidrug-Resistant *Bacteroides fragilis* Seattle, Washington, 2013", MMWR. Morbidity And Mortality Weekly Report, 62: 694.

Citron DM, Tyrrell KL, Goldstein EJ. *Peptoniphilus coxii* sp. nov. and *Peptoniphilus tyrrelliae* sp. nov. isolated from human clinical infections. *Anaerobe*. 2012;18(2): 244-248.

Davies, J. ve Davies, D., (2010). "Origins and Evolution Of Antibiotic Resistance", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74: 417-433.

Eitel, Z., Soki, J., Urban, E., Nagy, E., Anaerobic, E.S.G., 2013. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe* 21, 43–49.

Fletcher HM, Macrina FL. Molecular survey of clindamycin and tetracycline resistance determinants in *Bacteroides* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 35:2415–2418, 1991.

Flick, M.J. ve Konieczny, S.F., (2002). "Identification of Putative Mammalian DLactate Dehydrogenase Enzymes", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295: 910-916

Finegold SM. Anaerobic bacteria: general concepts. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious diseases*. 5th ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone, 2000: 2519-36.

Finegold Sm, Harrell Lj, Hecht Dw, Jenkins Sg, Pierson C, Venezia R, Rihs J, Gorbach L, National Survey On The Susceptibility Of B.Fragilis Group: Report and Analysis Of Trends For 1997-2000, *Clin Infect Diseases*, 2002;35(Suppl 1): P126-34.

Finegold SM, "Review of early research on anaerobes," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 18, no. Supplement 4, pp. S248–S249, 1994.

Finlay-Jones JJ, Kenny PA, Nulsen MF, Spencer LK, Hill NL, McDonald PJ. Pathogenesis of intraabdominal abscess formation: abscess-potentiating agents and inhibition of complement-dependent opsonization of abscess-inducing bacteria. *J Infect Dis* 1991; 164:1173–179.

Gajdacs, M., Spengler, G., Urban, E., 2017. Identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: Rubik's cube of clinical microbiology *Antibiotics-Basel* 6, 29.

Garcia-Rodriguez JA, Garcia-Sanchez JE, Munoz-Bellido JL: Antimicrobial resistance in anaerobic bacteria: current situation. *Anaerobe* 1:69 (1995)

Greer ND. Tigecycline (Tygaci): the first in the glycylcline class of antibiotics. Proc. 2006;19(2):155-161.

Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. Comparative in vitro susceptibilities of 396 unusual anaerobic strains to tigecycline and eight other antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(10): 3507-13.

Goldstein EJC, Citron DM. Resisatance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, part I. Clin Microbiol Newsl. 2011; **33**: 1-8.

Gürler N. Muayene maddelerinden izole edilen *Bacteroides* cinsi bakterilerin tiplendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Tezi, İstanbul, 1986.

Hawser SP. Activity of tigecycline and comparators against recent clinical isolates of *Finogoldia magna* from Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29(8): 10113.

Hecht D.W., Anaerobes: Antibiotic resistance, clinical significance and the role of susceptibility testing. Anaerobe; volume 12, 2006; 12:115-21.

Keşli, R. Çeşitli klinik Örneklerden İzole Edilerek Tanımlanan Anaerob Bakteriler ve E-Test Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıkların Belirlenmesi. Uzmanlık tezi, Erzurum, 2001.

Keşli R., Çelebi S. Çeşitli Klinik Örneklerden izole Edilerek Tanımlanan Anaerob Bakteriler ve E-Test Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi (2010) 40 (2): 87 – 96

Linberg AA, Weintraub A, Zahringer U, Rietschel ET. Structureactivity relationships in lipopolisaccharides of *Bacteroides fragilis*. Rev Infect Dis 1990; 12:133–141.4

Lober B. Bacteroides, Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium Species (and Other Medically Important Anaerobic Gram-Negative Bacilli). In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Eds. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2000: 2561-2570

Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C., Inducible metronidazole resistance and nim genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. Antimic Agents and Chemoth, 2005; 1253-1256

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology Çeviren: Us AD, Başustaoglu A. Tıbbi Mikrobiyoloji. 7.baskı, Pelikan Yayıncılık Ltd. Şti., Ankara; 2016, s:258-264.

Meggersee, R. ve Abratt, V., (2015). "The occurrence Of Antibiotic Resistance Genes İn Drug Resistant *Bacteroides fragilis* Isolates From Groote Schuur Hospital, South Africa", Anaerobe, 32: 1-6.

Nagy, E., Urban, E., Nord, C.E., Res, E.S.G.A., 2011. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. Clin. Microbiol. Infect. 17, 371–379. Nagy, E., Urban, E., Nord, C.E., Res, E.S.G.A., 2011. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. Clin. Microbiol. Infect. 17, 371–379.

Nakano V, Nascimento e Silva A, Merino VRC, Wexler HM, Avila-Compos MJ. Microbial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal Bacteroidales strains. Clinics. 2011; 66(4): 543-547.

Nakano V, Avila-Campos MJ. Virulence markers and antimicrobial susceptibility of bacteria of the *Bacteroides fragilis* group isolated from stool of children with diarrhea in São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99(3):307-12, 2004.

Nord Ce, Hedberg M, Resistance to β -Lactam antibiotics in anaerobic bacteria, Rev Infect Dis. 1990; 12(suppl 2) p231-234.

Rasmussen BA, Kovacs E. İdentification and DNA sequence of a new *Bacteroides fragilis* insertion sequence-like element. Plasmid, 1997; 25(2): 141-4

Reig M, Fernandez MC, Ballesta JPG, Baquero F. Inducible expression of ribosomal clindamycin resistance in *Bacteroides vulgatus*. Antimicrob Agents Chemother 1992;36: 639-42.

Roberts MC., Distribution of tetracycline and Makrolid-linkozamid-streptograminB resistance genes in anaerobic bacteria, Clin infect disease 1995;(suppl1): p20

Rotstein OD. Role of fibrin deposition in the pathogenesis of intraabominal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11:1064–1068.

Rotstein O, Pruet T L., Sorenson JJ., Fiegall VD, Nelson RD. and Simmons RL., A *Bacteroides* by product inhibits human polymorphonuclear leukocyte function. Arch.Surg. 1986; 121: 81-88.

Sarkar, A., Pazhani, G.P., Dharanidharan, R., Ghosh, A., Ramamurthy, T., 2015. Detection of integron-associated gene cassettes and other antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe* 33, 18–24.

Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clinic Microbiol Rev.*; 22(2):349-69, 2009.

Seifert H, Dalhoff A, PRISMA study Grup. German multicentre survey of the antibiotic Susceptibility of *Bacteroides fragilis* group and *Prevotella* species isolated from intra-abdominal infections: results from the PRISMA study. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2405-10.

Snydman, D.R., Jacobus, N.V., McDermott, L.A., Goldstein, E.J.C., Harrell, L., Jenkins, S.G., Newton, D., Patel, R., Hecht, D.W., 2017. Trends in antimicrobial resistance among *Bacteroides* species and *Parabacteroides* species in the United States from 2010–2012 with comparison to 2008–2009. *Anaerobe* 43, 21–26.

Soki J, Edwards R, Hedberg Fang H, Nagy E, Nord CE. Examination of the *cfiA*-mediated carbapenem resistance *Bacteroides fragilis* strains from a European antibiotic susceptibility survey. *Int. J Antimicrob Agents* 2006; 28(6): 497-502

Toprak Ülger N, Çelik C, Çakıcı O, Söyletir G. Antimicrobial susceptibilities of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* strains isolated from clinical specimens and human intestinal microbiota. *Anaerobe* 2004 (**10**): 255-259

Torun M.M. Anaerob bakterilerde direnç mekanizmaları. 4. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Program ve Özet Kitabı. 17-19 Mayıs 1999, İstanbul, s105- 18.

Türkkan, A., A., Klinik örneklerden soyutlanan anaerob bakterilerin tanımlanması ve e-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Uzmanlık tezi, Eskişehir, 2008.

Uzun, B. Gungor, S. Pektas, B. Aksoy, G.A. Yula, E. Kocal, F. ve Kaya, S., (2014). "Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B (MLSB) Resistance Phenotypes in Clinical *Staphylococcus* Isolates And Investigation Of Telithromycin Activity", *Mikrobiyoloji Bulteni*, 48: 469-476.

Ülger T.N., Yağcı A., Çelik C, Çakıcı Ö, Söyletir G., Enterotoksin geni pozitif ve negatif *Bacteroids fragilis* izolatlarının antibiyotiklere direnç durumlarının karşılaştırılması., *Mikrobiyol bült.* 2005; 39: 145-152.

Zaleznik D.K. and Asper D.L.K, Role of bacterial virulence factors in pathogenesis of anaerobic infections in humans. Academic press, San Diego, 1989, p: 81-95.

Wexler, H.M., 2007. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin. Microbiol. Rev. 20, 593

WHO. Changing History. World Health Report 2015.

Willis AT. Abdominal sepsis: In Duerdan B.I. and Drasar B.S. (ed.) anaerobes in human disease. Wiley-Liss, New York, 1991, p: 197-223.

Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006, p:877-944.



9. EKLER

9.1 Etik Kurul Onayı



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Etik Kurulu

PROJENİN ADI : Enfeksiyon Etkeni Bacteroides İzolatlarının Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direncin Fenotipik ve Genotipik Yönden Araştırılması
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof. Dr. NURVER ÜLGER TOPRAK
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR : Bernal TEKEŞ
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 17.12.2018-253

Sayın; Prof. Dr. NURVER ÜLGER TOPRAK

253 protokol nolu "Enfeksiyon Etkeni Bacteroides İzolatlarının Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direncin Fenotipik ve Genotipik Yönden Araştırılması" isimli projeniz Enstitümüz Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

F. Arıcıoğlu.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Komisyon Başkanı

Doç.Dr. İlhan DEMİRBÜKEN

Prof. Dr. Dilşad SAVE

Prof.Dr. Hülya ASÇI

Prof.Dr.Tuğba TUNALI AKBAŞ

Prof.Dr. Neşe KAHİÇECİK

Prof.Dr. Hakan ARIKAN

Doç.Dr. M. Ümit UĞURLU

Doç.Dr. Betül OKUYAN

Av. Funda IŞIK

Av. Öncel Onur AKBAŞ



Marmara Üniversitesi Geliştirme
Komitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü 14080 Kadıköy /
İSTANBUL

0 (216) 414 44 23/17 (Pbx)
0 (216) 414 44 23

saglik.ogrenci@marmara.edu.tr
<http://saglik.marmara.edu.tr>

Ayrıntılı bilgi için:
Süleyman
TÜRKMENÖĞÜ

9.2 Kullanılan Makine ve Techizat

Projede Kullanılacak Mevcut Makine – Teçhizat Listesi	
Adı/Modeli	Projede Kullanım Amacı
Soğutmalı santrifüj	DNA izolasyonunda seperasyon işleminde protein yapılarının bozulmaması için kullanılır
Manyetik karıştırıcı	Bileşenlerin homojen karışımı için
Su banyosu	Uygun sıcaklığı elde etmek için
Binoküler mikroskop	Mikroskobik identifikasyon için
Kaba terazi	Uygun tartım yapmak için
Çalkalayıcı etüv	Uygun ortam ve homojen karışımda inkübasyon için
Etüv	Mikroorganizmaların inkübasyonunu sağlamak
Santrifüj	İzolasyon işlemlerinde bileşenlerin seperasyonu için
Buzdolabı	Gelen örnekleri kısa süreliğine saklamak
Derin dondurucu (Eksi 20°C)	İzole edilen nükleik asitleri saklamak
Derin dondurucu (Eksi 80°C)	İzolatların saklanması için
Mikrosantrifüj	Küçük hacimli örneklerin seperasyonu için
Rotor gene Q	Nükleik asit amplifikasyonu yapmak
UV Transilluminatör	Agaroz jeldeki bantları gözlemek
Jel fotoğraflama ünitesi	Agaroz jeldeki bantları kaydetmek/ dosyalamak
Elektroforez ünitesi	PCR ürünlerini incelemek
PH metre	Solüsyonların PH derecelerini ölçmek
Pastör fırını	Cam/metal malzemelerin sterilizasyonunu sağlamak
Otoklav	Besiyerleri vb solüsyonların sterilizasyonunu sağlamak
Tıbbi atık kutusu	Kullanılan malzemelerin atılımını sağlamak için

10. ÖZGEÇMİŞ
BERMAL TEKEŞ

Doğum Yılı:	08.09.1995
Yazışma Adresi:	Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji A.B Fevzi Çakmak Mahallesi Muhsin Yazıcıoğlu Caddesi No:10 34899, Pendik, İstanbul
Telefon:	0531-292-34-26
Faks:	
e-posta:	bermalt.21@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TÜRKİYE	Gümüşhane Üniversitesi	Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi	Lisans	5	2017
TÜRKİYE	Marmara Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Yüksek Lisans	-Devam Ediyor	-Devam Ediyor

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Gen Dizileme, Biyoinformatik, DNA ekstraksiyonu, Kromozomal analizler, sitogenetik, Doku Tipleme, C++, Genome Analyze, Bakteriyoloji, Anaerobik mikroorganizmalar, Biyoteknoloji, Kanser Genetiği, RFLP, ChemCAD, AutoCAD, Next Generation Sequence, Linux, Unix

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Deniz CANBOLAT, Melike SEFAOĞLU, Bermal TEKEŞ , Hasan YETİK, Büşra YILMAZ ve İbrahim TURAN “Gümüşhane ve Çevresinde Bulunan Bazı Endemik Bitki Türlerinin Yaprak Kısımlarının Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması” IV. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi 7-8 Nisan 2016 Elazığ, Türkiye Bildiri Özetleri Kitabı Syf 9, pp
Aykut ERDOĞAN, Gülşen ŞAHİN, Sümeyye ARLAN, Yakup ARTİK, Bermal TEKEŞ Arife KAÇIRAN ve İbrahim TURAN “Gümüşhane ve Çevresinde Bulunan Bazı Endemik Bitki Türlerinin Çiçek Kısımlarının Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması” IV. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi 7-8 Nisan 2016 Elazığ, Türkiye Bildiri Özetleri Kitabı Syf 15, pp
Semra Eminoğlu - Bermal Tekeş - Ahmet Sehan Aras - Hatice Sara Tanca - İsmail Yiğit Polat - Tuba Dilek Erdoğan - Ömer Faruk Oka - Toufik Djerboua - Elvan Sayın - Nurver Ülger Toprak - Güner Söyletir “Enfeksiyon Etkeni Bactreoides Fragilis Grubu Bakterilerinin Metronidazole Direncinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Belirlenmesi” 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 28 Ekim – 1 Kasım 2019 İzmir, Türkiye Bildiri Özetleri Kitabı Syf P161

Projeler

1. Gümüşhane ve Çevresinde Bulunan Endemik Pimpinellaanisetum Bitki Türünün Antidiyabetik ve Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması TÜBİTAK 2209-A Proje No: 1919B011600541- Araştırmacı
2. Gümüşhane ve Çevresinde Bulunan Bazı Endemik Bitki Türlerinin Fenolik İçeriklerinin Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması TÜBİTAK 2209-A Proje No: 1919B011403632 Araştırmacı
3. Gümüşhane ve Çevresinde Yetişen Kuşburnu (<i>Rosa canina</i>) Bitki Türünün Rakım Farkına Göre C Vitamini değerleri ve Antioksidan Özelliklerinin Karşılaştırılması TÜBİTAK 2209-A Proje No: 1919B011702436 Araştırmacı
4. Enfeksiyon Etkeni Bacteroides İzolatlarının Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direncin Fenotipik ve Genotipik Yönden Araştırılması Marmara BAP Proje NO: SAG-C-YLP-100719-0260 Araştırmacı

