

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PEYNİR ve İNSAN ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN
***LACTOBACILLUS* CİNSİ BAKTERİLERİN**
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

138431

138431

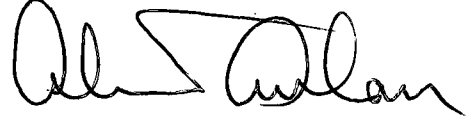
Arş. Gör. Bülent GÖGEBAKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİANTEP-2003

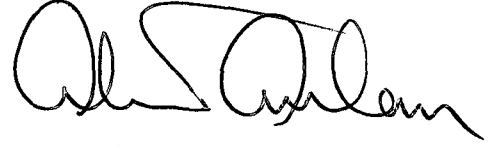
Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Onayı



Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.



Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez, tarafımdan okunmuş ve her yönü ile bir “Yüksek Lisans” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur



Yrd. Doç. Dr. Osman ÇATALOLUK

Danışman

Tez Jürisi

İmza

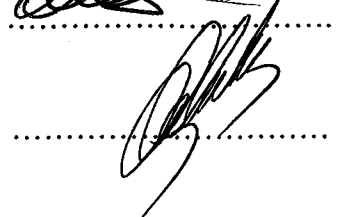
1. Prof. Dr. Ahmet ARSLAN



2. Doç. Dr. Osman HERKMEN



3. Yrd. Doç. Dr. Osman ÇATALOLUK



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜRLER.....	v
TABLoların LİSTESİ	vi
ŞEKİL ve RESİMLERİN LİSTESİ.....	vii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Laktik Asit Bakterileri	4
2.1.1. <i>Lactobacillus</i>	6
2.2. Mayalı (Fermente) Süt Ürünleri	6
2.3. İnsan Laktik Asit Bakteri Florası.....	8
2.4. İnsan LAB Florasının Kökeni.....	8
2.5. Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları.....	10
2.5.1. Beta-Laktam Antibiyotikler	12
2.5.2. Aminoglikozit Antibiyotikler	12
2.5.3. Glikopeptit Antibiyotikler.....	13
2.5.3.1. Vankomisinler.....	14
2.5.4. Tetrasiklinler.....	16
2.5.5. Makrolidler	18
2.5.6. Kloramfenikol.....	19
2.6. Antibiyotik Direncinin Genetik Temelleri.....	20
2.7. Bakterilerde Antibiyotik Dirençliliği ve Yansımaları	22
2.8. Laktik Asit Bakterilerinde Antibiyotik Direnci	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1.1. Örneklerin Kökeni ve Sayısı.....	27
3.1.2. Örneklerin Toplanması	27
3.2. GEREÇLER.....	28
3.2.1. Kimyasal Maddeler.....	28
3.2.2. Çözeltiler.....	28
3.3. CİHAZLAR	29
3.4. YÖNTEM	30

3.4.1. M.R.S. (de Man, Rogose, Sharpe) Broth	
Besiyerinin Hazırlanması.....	30
3.4.2. M.R.S. (de Man, Rogose, Sharpe) Agar Besiyerinin	
Hazırlanması	30
3.4.3. Örneklerin Çoğaltılması.....	31
3.4.4. Örneklerden Tek Koloni Bakteri Eldesi	31
3.4.5. Örneklerin Saklanması.....	31
3.4.6. Gram Boyama.....	31
3.4.7. DNA Eldesi.....	32
3.4.8. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)	33
3.4.8.1. PZT ile <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerin	
Tür Seviyesinde Tiplendirilmesi.....	33
3.4.8.2. PZT ile Antibiyotik Direnç Genlerinin Çoğaltılması	34
3.4.9. Agaroz Jelin Hazırlanması ve PZT Ürünlerinin	
Görüntülenmesi	35
3.4.10. Elektroforez Koşulları	38
4. BULGULAR	40
4.1. Bakterilerin Üretilmesi	40
4.2. Morfolojik Analizi	40
4.3. Örneklerde <i>Lactobacillus</i> Türlerinin Dağılımı	40
4.4. Vankomisin Direnci	40
4.4.1. <i>vanA</i> Tipi Direnç	41
4.4.2. <i>vanB</i> Tipi Direnç	41
4.5. Eritromisin Direnci	41
4.5.1. <i>ermA</i> Geninin Araştırılması.....	41
4.5.2. <i>ermB</i> Geninin Araştırılması.....	41
4.5.3. <i>ermC</i> Transpozon Geninin Araştırılması.....	42
4.6. Tetrasiklin Direnci	42
4.7. Kloromfenikol Direnci.....	43
5. TARTIŞMA	45
6. KAYNAKLAR	57
7. ÖZGEÇMİŞ	65

**PEYNİR ve HASTA ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN
LACTOBACILLUS CİNSİ BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Bülent GÖGEBAKAN

Yüksek Lisans Tezi

Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç Dr. Osman ÇATALOLUK

Aralık 2003, 65 sayfa

ÖZET

Süt ürünlerinde ve insanda bulunan ve Laktik Asit Bakterileri (LAB) ailesinin bir üyesi olan *Lactobacillus* türü bakterilerde *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *erm*, *ermGT*), *tetM*, *cat-TC* ve *van* (*van A*, *H*, *R*, *S*, *X*, *Y*, *Z*, *van B*, *X*, *Y*, *Z*) antibiyotik direnç genlerinin varlığı PZT yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla, 14 ağız, 32 dışkı, 36 vajina olmak üzere toplam 82 insan kökenli örnek ve 20 ticari, 50 yerel peynir, 10 yoğurt, 1 ağız sütü, 15 çökelek ve 15 tereyağı olmak üzere 111 süt kökenli örnek kullanıldı. MRS sıvı (broth) ve MRS katı (agar) besiyerlerinde üretilen örnekler Gram boyama ve mikroskopi uygulanarak morfolojik çeşitliliklerine göre agarda seyreltme yöntemiyle ortalama her örnekten 4 tek koloni alınarak tekrar MRS agara ekimi yapıldı. Sıvı besi yerinde, agara ilk ekimde üreyen bakterilerin ve tek koloni bakterilerinin DNA'ları bütün olarak (total DNA isolation) elde edildi. *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *erm*, *ermGT*), *tetM*, *cat-TC* ve *van* (*van A*, *H*, *R*, *S*, *X*, *Y*, *Z*, *van B*, *X*, *Y*, *Z*) genlerine özgün primerler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda ağız kökenli örneklerin % 68'inde, dışkı örneklerinin % 75'inde ve vajinal örneklerin % 80'inde *ermB* ve/veya *tetM* genlerine rastlandı. Buna karşılık süt kökenli örneklerin % 18'inde *ermB* ve/veya *tetM* genlerine rastlanılmıştır. Hiç bir örnekte

van ve *cat*-TC genlerine rastlanmamıştır. Ayrıca ham sütte, tereyağda, ve ağız sütünde hiçbir direnç genine rastlanılmamıştır. *ermB* ve/veya *tetM* genlerine yoğunlukla insan kökenli numunelerde rastlanılmış süt ve süt ürünlerinden sadece yerel peynirlerde, ticari peynirde ve yoğurtta rastlanılmıştır. Örneklerde yapılan tiplendirme çalışmalarında *Lactobacillus (L.) acidophilus* (48), *L. casei* (5), *L. plantarum* (44), *L. rhamnosus* (33), *L. jonsonii* (13), türleri bulunurken *L. delbrueckii*, *L. zaeae*, *L. reuteri*, ve *L. sharpeae* türlerine hiç bir örnekte rastlanılmadı. Her bir tür üzerinde yapılan PZT çalışmaları ile direnç taşıyan tür profilleri elde edilmiştir.

Sonuç olarak süt ürünlerinde antibiyotik dirençliliğin pek büyük bir çapta olmamakla birlikte önlem alınması gereken boyutlarda olduğu anlaşılmaktadır. Ağız, dışkı ve vajinal florada bulunan laktobasillerin baskın bir biçimde direnç genlerine sahip olması dirençliliğin sindirim sistemi içinde elde edildiğine veya edilebileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Lactobacillus*, *ermB*, *van*, *tetM*, ve *cat*-TC direnci, PZT, moleküler tiplendirme

**DETERMINATION OF DRUG RESISTANCE PROFILES OF
LACTOBACILLUS SPECIES FOUND IN CHEESE AND HUMAN SUBJECTS**

Res. Asist. Bülent GÖGEBAKAN

M. Sci. Thesis

**Gaziantep University Institute of Health Sciences
Department of Medical Biology**

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Osman ÇATALOLUK

December 2003, 65 pages

ABSTRACT

Resistance profiles of *Lactobacillus* species which are a member of lactic acid bacteria (LAB) were investigated in 14 mouth, 32 fecal, 36 vaginal samples of human origin (total 82) and 1 raw milk, 15 whey cheese, 50 hand-made cheese, 20 marketed cheese, and 10 yogurt samples of dairy origin (total 111). Strains were cultured in both MRS broth and agar. Gram staining was performed to bacteria grown on agar plates. Four single colonies were picked up from each agar plates. Total DNA isolation was performed to the single colonies. *Lactobacillus* species were determined by PCR with primers specific to 16S-23S rRNA intergenic sequences (IRS). Samples were found to contain *Lactobacillus crispatus* (78), *L. gasseri* (61), *L. acidophilus* (48), *L. plantarum* (44), *L. rhamnosus* (33), *L. johnsonii* (13), and *L. casei* (5). Using the same DNA samples *erm* (*ermA*, *B*, *C*, *erm*, and *ermGT*), *van* (*vanA*, *HRSXYZ*, *vanBXYZ*), *tetM*, and *cat-TC* gene clusters were searched with specific primers to these genes. In 68 % of the mouth samples, 75 % of the fecal samples, and 80 % of the vaginal samples *ermB* and/or *tetM* resistance genes were found to present. However, only 18 % of the samples of dairy origin were found to carry *ermB* and/or *tetM* resistance genes.

These results showed that drug resistance is not a big problem in dairy products. However, drug resistance is a problem to take measures in samples of human origin. Thus, it could be concluded that drug resistance may be obtained via gastrointestinal and vaginal tract not through dairy products.

Key words: *Lactobacillus*, PCR, *ermB*, *van*, *tetM*, and *cat-TC* resistance, and molecular typing



TEŞEKKÜRLER

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, tez yöneticim, hocam Yrd. Doç. Dr. Osman ÇATALOLUK'a örneklerini çalışmama sunmasında, tezimin hazırlanmasında gösterdiği titizlik ve bilimsel katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a tezime yaptığı bilimsel katkılarından dolayı ve her türlü konuda yardımlarını esirgemediği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin hazırlanması sırasında örneklerin temininde yardımcı olduğu için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın-Doğum AD. öğretim üyesi sayın Doç. Dr. İrfan KUTLAR'a, çalışmalarındaki tavsiyelerinden dolayı Uz. Dr. Nuray BÜYÜKBERBER'e, sabırla dinleyip fikir beyan ettikleri için Yusuf Ziya İĞCİ ve Faruk KUTBAY'a, bana inanarak her zaman desteklerini esirgemedikleri için aileme teşekkürlerimi sunarım.

TABLoların LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Çeşitli fermente süt ürünlerinde kullanılan başlangıç kültürleri.....	7
Tablo 2. İnsan vücudunda bulunan LAB'leri ve bulundukları bölgeler.....	9
Tablo 3. LAB'lerinin çeşitli antibiyotiklere karşı MIC (işlevsizliği sağlayan en düşük yoğunluk) değerleri	26
Tablo 4. <i>Lactobacillus</i> tür seviyesinde tiplendirmek için kullanılan primerler, baz dizileri, hedef bölgeleri, primerlerin yapışma (annealing) sıcaklıkları ve PZT reaksiyonu için MgCl ₂ yoğunlukları	33
Tablo 5. Direnç gen bölgelerinin primerlerin listesi ve baz dizileri.....	36
Tablo 6. Antibiyotiklere ait direnç gen bölgeleri, bu bölgelere özü primerler, PZT ürün büyüklüğü ve şartları.....	37
Tablo 7. VANA, VANH, VANR, VANS, VANX, VANY, VANZ, VANB, vanX, vanZ, vanB, vanA, , VANA gen bölgeleri için PZT karışımı ve şartları	38
Tablo 8. ermA, ermB, ermC ve ermGT gen bölgeleri için PZT karışımı ve şartları	38
Tablo 9. cat-TC gen bölgesi için PZT karışımı ve şartları	39
Tablo 10. <i>TetM</i> gen bölgesi için PZT karışımı ve şartları	39
Tablo 11. <i>ermA</i> gen bölgesi için PZT karışımı ve şartları.....	39
Tablo 12. İnsan ve süt ürünü kökenli örneklerde <i>Lactobacillus</i> türlerinin dağılımı	40
Tablo 13. Direnç faktörü araştırılan antibiyotikler ve örneklere dağılımı	43
Tablo 14. Direnç faktörü araştırılan antibiyotiklerin örneklere dağılım yüzdesi	44

ŞEKİL ve RESİMLERİN LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. Bakteri hücresi üzerinde antibiyotiklerin etki ettikleri bölgeler.....	11
Şekil 2. Aminoglikozid antibiyotiklerin etki mekanizması.....	13
Şekil 3. Vankomisin direnç geni	16
Şekil 4. Eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotiklerin etki mekanizması	20
Şekil 5. <i>ermB</i> -1 ve <i>ermB</i> -2 primerleri kullanılarak yapılan PZT sonucu	42
Şekil 6. <i>TetM</i> -F ve <i>TetM</i> -R primerleri kullanılarak yapılan PZT sonucu	43



SEMBOLLER ve KISALTMALAR

Bç	Baz çifti
BHPC	Bakteri Hücresi Parçalama Çözeltilisi
cat	Kloramfenikol (chloramphenicol) direnç geni
EDTA	Ethilendiamintetraasetikasit
Erm	Eritromisin (Erythromycin) direnç geni
kDa	Kilo Dalton
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MİK	Minumum İnhibe edici Konsantrasyon (Minimal Inhibition Concentration)
PZT	Polimeraz Zincir Tepkimesi (Polymerase Chain Reaction)
PBP	Penisilin Bağlanan Proteinler
Tet	Tetrasiklin (Tetracycline) direnç geni
Van	Vankomisin (Vancomycin) direnç geni
ISR	Genler arası bölge (intergenic spacer region)
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
TBE	Tris-Borik asit-EDTA tamponu

AF440277, AF440277, U75299 ve U48430 gibi ibareler GenBank (Gen Bankası) numarasını ifade etmektedir.

1. GİRİŞ

Laktik Asit Bakterileri (LAB) insan sağlığı ve gelişimi için çok önemli bir yer tutan süt ve süt ürünleri bakterileridir (1, 2, 3). LAB türleri çok eski çağlardan beri çeşitli mayalı (fermente) gıda üretiminde mayalanmayı sağlayan (başlatıcı, starter) kültür olarak kullanılmaktadır. İnsan normal mikrobiyal florasının önemli bir kısmını LAB türleri oluşturmaktadır (3, 32, 60). Bu bakteriler ağız, sindirim sistemi, vajina, deri ve saçta bulunurlar (5, 6, 7, 8) ve bulundukları bölgede gerek ürettikleri asit, asetaldehid, CO₂ ile ortamın pH değerini değiştirerek (9) gerekse ürettikleri bakteriosinlerle diğer bakterilerin gelişmelerine engel olarak düzenleyici etki yaparlar. Bunların dışında LAB ailesinin özellikle *Lactobacillus* (Laktobasillus) türleri sindirim ve solunum sistemi enfeksiyonlarında koruyucu görevleri, antikarsinojenik faaliyetleri, laktozu parçalama ve serum kolesterol seviyesini kontrol etme yeteneklerinden dolayı son yıllarda bir çok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Ayrıca LAB üzerinde viral kökenli hastalık etkenlerine karşı vektör olarak kullanılabilmeleriyle ilgili çalışmalar yapılmaktadır (2, 5, 10, 11).

Ülkemizin çeşitli yörelerinde çok değişik LAB türleri kullanılarak özgün süt ürünleri yapılmaktadır. Ticari peynir, yoğurt, krema ve kaymak gibi süt ürünlerinin üretiminde başlatıcı/mayalandırıcı (starter) kültür olarak LAB kullanılmaktadır. Ayrıca üretim sırasında çeşitli yollardan süte bulaşan dışkı kökenli LAB son ürünün içinde bulunabilirler (16). Dışkı kökenli LAB'nin süt ürünlerinde bulunması bulaşma işareti olarak kabul edilir (16). Gıdalarda bulunan LAB insan ağız, mide-bağırsak ve vajinal LAB florasının oluşturulmasında etkilidir (3, 32, 60). Farklı araştırmacıların farklı dönemlerde gönüllü insan denekleri üzerinde yaptığı *Lactobacillus* türü bakteri içeren diyetle besleyip daha sonra bu bakterilerin dışkıdan atılımını takip ederek zaman içinde floradaki değişimleri, yaygın ve yerleşik bakteri türleri ve aralarındaki ilişkileri araştırmayı esas alan çalışmalar insan LAB florasının temelde gıdalar ile alınan bakteriler tarafından oluşturulduğunu göstermiştir (3). Dışkı kökenli LAB yanında diğer bağırsak kökenli patojenlerinde bulunması bu ürünleri tüketen kişilerde hastalık meydana getirir. LAB'nin hastalık oluşturma ile ilgili çok kısıtlı bilgi vardır ve bu bilgiler tatmin edici seviyede değildir. Bu sebeple genel kanı olarak gıda maddeleriyle özellikle de süt ve süt ürünleriyle alınan ve insan ağız, mide-bağırsak ve vajina florasının bir üyesi olan LAB türlerinin hastalık etkeni olmadığı kabul edilir (25). LAB kendileri hastalık etkeni olmasa bile bir parçası olduğu ağız, mide-bağırsak ve vajina florasında kendileri ile birlikte yaşayan patojen bakterilerle aynı yaşam alanını (niche)

paylaşması sebebiyle hala şüpheleri üzerine çekmektedir. Zira kendisi patojen değilse bile birlikte bulunduğu bakterilerle genetik alış-veriş sonucunda antibiyotik direnç genlerinin aktarılması ve taşınmasına yardım etmiş olur ki bu da direkt yada dolaylı olarak antibiyotik dirençli patojenlerin gelişimini sağladığı anlamına gelir.

Günümüzde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antimikrobiyal ilaçlar çok önemli rol oynamaktadır (12, 13). Penisilinin keşfinden bu yana pek çok antimikrobiyal ilaç geliştirilerek, klinik kullanıma sunulmuştur. Bir süre kullanımı takiben patojen bakterilerin bu antibiyotiklere karşı direnç geliştirdikleri gözlenmiştir (14). Antimikrobiyal ilaçlara karşı geliştirilen bu direnç hastalığın tedavi şeklini, seyrini ve tedavi süresini ciddi şekilde etkilemekte artan maliyetler sebebi ile sağlık sektörüne büyük bir yük getirmekte ve sağlığı tehdit eden patojenlere karşı elimiz ve kolumuzun bağlanmasına sebep olmaktadır (14, 15).

Bakteriyel hastalıklar sadece sınırlı sayıda antibiyotikle tedavi edilebilmektedir. Dirençli bakterilerin yol açtığı bir enfeksiyonu önlem alınmadığı takdirde yakın gelecekte dirençli bakterileri yok edecek kadar etkili antibiyotik bulunamayabilir ve bakteriyel enfeksiyonlar tedavi edilemez duruma gelebilir. Bu amaçla bu gün modern klinik mikrobiyolojide bakterilerde antibiyotik direnci yada duyarlılık seviyelerini tespit etmek için mikrobiyolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle mikroorganizma büyüme ortamında çeşitli antimikrobiyal ilaçlara maruz bırakılarak organizmanın bu dış etkene karşı olan davranışı gözlenmektedir. Agar seyreltme (agar dilution), disk içinde yayılma (disc diffusion), minik üreme kaplarında üretim (microbroth) ve e-test (12) bu yöntemlere örnek olarak verilebilir. Bu yöntemlerde mikroorganizmanın antimikrobiyal ajana karşı fenotipik davranışları gözlemlenir. PZT ve DNA-DNA hibridizasyon gibi moleküler yöntemlerde ise mikroorganizmanın direnç faktörünü genotipik olarak taşıyıp taşımadığına bakılır (23).

Günümüzde antimikrobiyal tedavide kullanılan ve dirençli bakterilere karşı yetersiz kalan antibiyotikler, devlet bütçelerine külfet olmaya ve tedavisi mümkün olmayan hastalıklar sonucunda yaşam kalitesinin düşmesinden dolayı çok büyük önem arz etmektedir. Ülkemizde LAB direnç profilleri, ve dirençli LAB türlerine ait henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Halbuki, ülkemiz özgün süt ürünleri bakımından çok zengin bir yelpazeye sahiptir.

Bu çalışmada günlük hayatta tükettiğimiz süt ve süt ürünlerinde florayı meydana getiren LAB ailesinin bir üyesi olan *Lactobacillus* türlerinde *erm* (*ermA*,

ermB, *ermC*, *erm*, *ermGT*), *tetM*, *cat*-TC ve *van* (*van A*, *H*, *R*, *S*, *X*, *Y*, *Z*, *van B*, *X*, *Y*, *Z*) antibiyotik direnç genlerini taşıyıp taşımadıkları moleküler yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla Gaziantep ve çevresinden toplanan yerel otantik (peynir, yoğurt, tereyağı, ağız sütü, çökelek v.b.) ve ticari süt ürünleri LAB kompozisyonu, direnç yaygınlığı ve bu direncin insan mide-bağırsak ve vajina sisteminde ne ölçüde yaygın olduğu çalışma ile direk ilgisi olmamakla birlikte Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Tıp Merkezi Kadın-Doğum polikliniğine başvuran kadın hastaların vajinal ve ağız bölgelerinden alınan sürüntü örneklerinden izole edilen LAB'den elde edilen tüm DNA'larda PZT yöntemiyle araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, kok, kokobasil yada basil şekilli, kromozomal DNA yapısındaki guanin + sitozin (G+C) oranı % 55'den az olan bakterilerdir (62). Bu mikroorganizmalar tür ve cins özelliklerine bağlı olarak karbonhidratlardan laktik asidin yanı sıra asetik asit, karbondioksit, alkol ve bazı tat ve aroma maddelerini üretebilmektedirler (4). Ayrıca laktik asit bakterileri gıdaların bozulmasında rol oynayan mikroorganizmalar ve insanda hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde de ürettikleri laktik asit ve bazı antimikrobiyal maddeler (bakteriosinler v.b.) nedeniyle öldürücü etkiye sahiptirler (4, 28).

Laktik asit bakterilerini glikoz metabolizması sonucunda ürettikleri son ürüne bağlı olarak iki ana gruba ayrılır (4, 5).

1. Hekzoz şekerinden fermentasyon sonucu birincil dereceden laktik asit üreten türlere **homofermentatif laktik asit bakterileri** adı verilmiştir (56). Homofermentatif laktik asit bakterilerinin homolaktik karakterleri ortamın pH'sı, besin maddeleri ve ortamın glukoz konsantrasyonu gibi kültürel koşulların değişmesiyle farklılık gösterir. Bazı Homofermentatif laktik asit bakterileri pentozları kullanarak asetik asit ve laktik asit üretebilirler (4). Bu gruba dahil laktik asit bakterileri heterofermentatif laktik asit bakterilerine kıyasla iki kat daha fazla enerji üretebilmektedirler (56).

2. Metabolik faaliyetleri sonucu hekzozlardan laktik asit, karbondioksit (CO₂) ve etanol üreten laktik asit bakterileri ise **heterofermentatif laktik asit bakterileri** olarak adlandırılırlar (4). Heterofermentatif türler asetaldehit ve diasetil gibi tat ve aroma maddelerinin üretimi açısından önem taşırlar (4).

Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri genetik ve fizyolojik farklılıklarından dolayı glukozu farklı metabolik yollar izleyerek kullanmakta ve farklı son ürünler üretmektedirler (5). Homofermentatif laktik asit bakterileri hekzoizomeraz (glukoz fosfat izomeraz) ve aldolaz enzimine sahipken, fosfoketolaz enzimi içermezler ve Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (glikolizis) metabolik yolunu izleyerek bir molekül glukozdan iki molekül laktik asit üretirler (4). Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise bunun tam tersi hekzoizomeraz ve aldolaz enzimi yerine fosfoketolaz (transketolaz) enzimine sahiptirler. Bu gruba giren laktik asit bakterileri

glukozun yıkımında EMP metabolik döngüsü yerine pentoz fosfat (fosfoketolaz glikolitik) döngüsünü kullanırlar (4).

Bakterilerin morfolojik ve fizyolojik özelliklerini kullanarak taksonomik sınıflandırma yapmak klasik bir yaklaşımdır (5). Geçmişte laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında gram reaksiyonu, katalaz reaksiyonu, laktik asit konfigürasyonu (D, L ve DL) (5), hücre duvarı bileşenleri, hücresel yağ asitleri ve çeşitli karbonhidratları fermente edebilme yetenekleri (62) gibi özellikler kullanılmaktaydı. Ancak son yıllarda yapılan detaylı genetik çalışmalar DNA baz kompozisyonları, rRNA geni baz dizileri, hücre duvarı mukopolipeptid türleri ve enzimlerin immünolojik reaksiyonlara verdiği yanıtlar gibi özellikleri de tanımlama ve sınıflandırmada etkin bir şekilde kullanılmaya başlandı (5, 62). Laktik asit bakterileri bu tip genetik özellikleri açısından çok büyük genetik çeşitlilik göstermektedirler. Örneğin DNA baz kompozisyonu (mol Guanin + Sitozin (G+C) yüzdesi) laktik asit bakterilerinde en düşük %35 (*L. salivarius*) ve en fazla %53 (*L. fermentum*) arasında değişmektedir (4).

Laktik asit bakterilerinin taksonomik sınırları henüz kesin olarak çizilememiştir ve bu konuda değişik genetik çalışmalar sürdürülmektedir. Şu ana kadar tanımlanmış ve değişik laktik asit bakterisi grubuna dahil edilmiş mikroorganizmaların bazı genel özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

1. Bu mikroorganizmalar gelişebilmek için aminoasitlere ve B grubu vitaminler gibi besin öğeleri ile pürin ve primidin bazlarına ihtiyaç duyarlar (4).
2. Çoğu mezofilik mikroorganizmalardır. Ancak bazıları 5°C'nin altında termofilik türler ise optimum 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilir (4).
3. Bu mikroorganizmaların çoğu optimum 4,0-4,5 pH'da gelişebilmelerine rağmen bazıları 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH'larda gelişebilmektedir (4).
4. Ayrıca bu mikroorganizmaların bazıları zayıf proteolitik ve lipolitik özelliğe sahiptirler (4).

Genel olarak laktik asit bakterisi grubuna *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, ve *Leuconostoc* cinsleri dahil edilmekte iken son yıllarda yapılan taksonomik ve genetik çalışmalar sonucunda bu dört cinse *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinsleri de dahil edilmiştir (62).

2.1.1 *Lactobacillus*

Çalışmamızın esas konusunu oluşturan bu bakteriler gram pozitif, katalaz negatif ve oksidaz negatiftir, mikraerofilik ve fermentatif bazı türleri mutlak anaerob, genellikle hareketsiz ince, uzun veya kısa çubuk yada kokobasil şeklinde bakterilerdir (25). Bu bakteriler gelişebilmek için kompleks besin maddeleri ve vitaminlere ihtiyaç duyarlar ve bu türler fermente et, süt ve sebze ürünlerinin üretiminde rol oynarlar (4, 25). *Lactobacillus* cinsi üç büyük gruba ayrılmaktadır;

1. Betabakterium,
2. Streptobakterium,
3. Thermobakterium,

Zorunlu heterofermentatif *Lactobacillus* türlerinin hepsi betabakterium grubuna dahildir (25). Bu türler son ürün olarak laktik asidin yanı sıra asetik asit ve diğer organik asitleri, etil alkol ve CO₂ üretirler (4, 25). Homofermentatif ve fakültatif heterofermentatif *Lactobacillus* türleri optimum gelişme sıcaklığına göre Streptobakterium ve termobakterium olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (25, 56). Streptobakterium grubundaki *Lactobacillus* türleri hekzoz şekerinden fermentasyon yoluyla yüksek oranda laktik asit üretirler (4). Ancak glukoz yokluğunda bazı türleri laktik asit, asetik asit, etil alkol ve formik asit üretir (25). Bu grupta fakültatif heterofermentatif türler yer almaktadır. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C ve %1,5 laktik aside kadar asit üretebilirler (4). Termobakterium grubundaki *Lactobacillus* türleri hekzoz şekerinden başlıca laktik asit üretirler, pentoz şekeri ve glukonotları fermente edemezler (4). Bu grupta zorunlu homofermentatif türler yer alır, optimum gelişme sıcaklıkları 40°C civarındadır ve % 3 düzeyinde laktik asit üretirler (4, 25).

2.2. Mayalı (Fermente) Süt Ürünleri

Peynir, yoğurt, tereyağı gibi mayalı süt ürünlerinin getirilişi sırasında laktik asit bakterilerinin faaliyeti sonucu laktik asit üretimi, kefir ve kıymız gibi ürünlerde ise laktik asit ve alkol üretimi söz konusudur (4, 5). Özellikle yoğurt ve peynir üretiminde koagülasyona sebep olarak pıhtıya kendine özgü bir yapı (tekstür) kazandırmaktadır. Bunun yanında süt sanayinde kullanılan başlatıcı kültürlerin bir kısmı diasetil ve asetaldehit gibi bir takım uçucu aroma maddeleri, bazıları da alkol üretir. Ayrıca bazı başlangıç kültürler özellikle belirli tip peynirlerin olgunlaşmasında önem taşıyan lipolitik ve proteolitik faaliyete de sahiptirler (4).

Tablo 1. Çeşitli fermente süt ürünlerinde kullanılan başlangıç kültürleri

LAB türü	Kullanıldığı süt ürünleri	Kaynaklar
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	peynir, kefir	4, 31, 56
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	peynir, tereyağı, yayık altı, ekşi krem	4, 56
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	peynir, tereyağı, yayık altı, ekşi krem, kefir	4, 56
<i>Lactococcus mesenteriodes</i> subsp. <i>cremoris</i>	peynir, tereyağı, yayık altı, ekşi krem	4, 56
<i>Enterococcus faecium</i>	peynir	4, 50, 56
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	yoğurt	27, 56
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	peynir, yayık altı, kefir, kırmızı, yoğurt	4, 25
<i>Lactobacillus lactis</i>	yayıkaltı	4, 25
<i>Lactobacillus helveticus</i>	yoğurt, peynir, yayık altı	1, 25, 30
<i>Lactobacillus casei</i>	peynir, süt	25, 30, 31
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	yoğurt, yayık altı	1, 4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	peynir	4, 25, 30
<i>Streptococcus termophilus</i>	peynir, yoğurt	4, 50
<i>Leuconostoc cremorus</i>	ekşi krem. yayık altı	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	peynir	4, 50
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	peynir, yoğurt	4, 25, 56
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	süt, peynir	4, 25, 56
<i>Lactobacillus brevis</i>	süt, peynir	4, 25, 56
<i>Lactobacillus buchneri</i>	süt, peynir	4, 25, 56
<i>Lactobacillus kefir</i>	kefir	4, 25

Tüm peynir çeşitleri, yoğurt, tereyağı, kültüre edilmiş yayık altı, kültüre edilmiş ekşi krem, kefir, kıymız gibi mayalı içecekler gibi ürünlerin üretiminde de laktik asit bakterileri kullanılır (4). Süt sanayinde *Streptococcus* türleri (4), *Lactococcus* türleri (4), heterofermentatif *Leuconostoc* türleri (4) ve obligat homofermentatif ve fakültatif heterofermentatif *Lactobacillus* türleri (30, 56) peynir, yoğurt, tereyağı ve diğer mayalı süt ürünlerinin üretiminde kullanılan laktik asit bakterileri kullanılmaktadır. Başlangıç kültür olarak kullanılan LAB türleri ve bunların kullanıldığı süt ürünleri Tablo.1'de verilmiştir.

2.3. İnsan Laktik Asit Bakteri Florası

LAB bir çok gıdalarda (özellikle süt ve süt ürünlerinde) doğal olarak yada başlangıç kültürü olarak bulunmalarının yanı sıra insan ve hayvanlarda doğal mikroorganizma florasının (mikroflora) bir elemanı olarak bulunur. Tablo.2'de görüldüğü gibi bu bakterilerin insan vücudu doğal florasında en yoğun olarak bulunduğu bölgeler; ağız, sindirim sistemi, dışkı, vajina, deri ve saçtır (25, 32).

Sindirim sistemi ve vajina bakteriyel açıdan düşünüldüğünde bir çok patojen ve patojen olmayan bakteri türü için doğal yerleşim bölgesidir. Özellikle *Lactobacillus* türleri ürettikleri laktik asit sonucu ortamın pH'sını düşürmeleri (26), bazı türlerin ürettiği bakteriosinler (46) ve ürettikleri H_2O_2 ile sindirim sistemi ve vajinal floranın düzenlenmesinde ve belirlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (9). LAB'lerinin birçok türü katalaz enziminden yoksundurlar (25). Dolayısıyla H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye doğal olarak parçalayamazlar. H_2O_2 katalaz enzimi ile H_2O ve O_2 'ye dönüştürülmediği takdirde organizma için toksik etki gösterir. İnsan mikroflorasında bulunan bu *Lactobacillus* türleri ürettikleri H_2O_2 'yi parçalayamadıklarından ortama salınır ve bu H_2O_2 diğer bakteriler için öldürücü etki yaparak gelişmelerine engel olur ve böylece mikroflorayı kendi lehlerine değiştirmiş olurlar (26).

2.4. İnsan LAB Florasının Kökeni

Sağlıklı fetüs anne karnındayken mikroorganizmalar açısından sterildir (60). Yeni doğan bebekler sindirim sistemi florasını doğumdan sonra anneden aldığı süt ve diğer yediği bitki kökenli gıdalarla kazanırlar (60). *Lactobacillus* cinsi bakterilerin yeni doğanların sindirim sisteminde nasıl kolonize olduğuna dair çok kısıtlı fakat değerli çalışmalar vardır. LAB vücut sıvılarında doğal olarak bulunmazlar. Bulundukları durumlar ise patolojiktir. Oysaki LAB normal yada patolojik durumdaki insanların

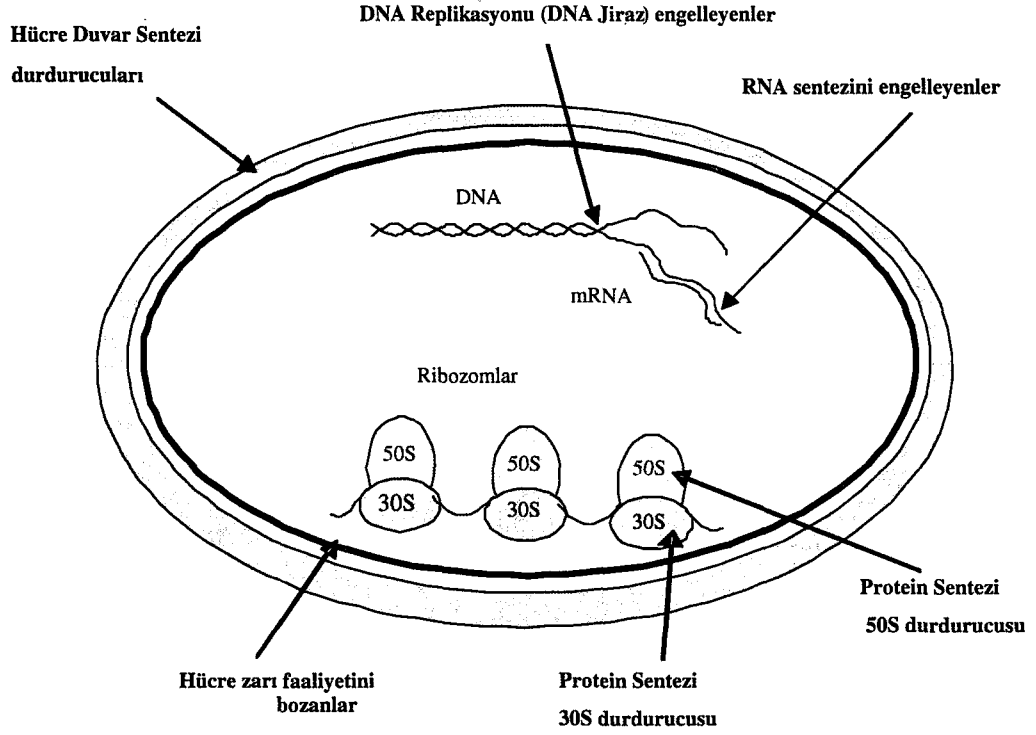
Tablo 2. İnsan vücudunda bulunan LAB ve bulundukları bölgeler.

LAB türü	Bulunduğu bölge	Kaynaklar
<i>Lactobacillus crispatus</i>	vajina, dışkı, göz, ağız, sindirim sistemi	5, 6, 9, 25, 27
<i>Lactobacillus gasseri</i>	vajina, dışkı, sindirim sistemi, ağız	5, 6, 9, 25, 27
<i>Lactobacillus fermentum</i>	vajina, dışkı, ağız	6, 7, 9, 25
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	vajina, dışkı	9
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	vajina, dışkı	9
<i>Lactobacillus plantarum</i>	vajina, dışkı, ağız	6, 7, 9, 25, 28
<i>Lactobacillus reuteri</i>	vajina, dışkı, sindirim sistemi	6, 7, 9, 25, 28
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	vajina, dışkı	7, 9, 27
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i>	vajina, dışkı, ağız, sindirim sistemi	9, 28, 31
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	vajina, dışkı, ağız, sindirim sistemi	9, 28, 31
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	vajina	9
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ağız (fariks), vajina, dışkı	5, 6, 7, 25
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	dışkı, kan	5, 6, 7, 27
<i>Lactobacillus jensenii</i>	vajina, kan	6, 25, 27
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	vajina	27
<i>Lactobacillus casei</i>	vajina, dışkı, sindirim sistemi, ağız	6
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	vajina	7
<i>Lactobacillus animalis</i>	ağız	25
<i>Lactobacillus brevis</i>	ağız, sindirim sistemi, dışkı	25
<i>Lactobacillus buchneri</i>	ağız	25

sistemlerinde ve vajinal bölgesinde normal flora elemanı olarak bulunurlar ve çevresel şartlara bağlı olarak sürekli sayı ve tür açısından değişim gösterirler. Ağız yoluyla alınan bu bakteriler mideden geçişi takiben bağırsaklara ulaşır oluşturdukları asit yoğunluğunun da yardımı ile bağırsak epitel hücrelerine yapışarak buradan itibaren yerleşme gösterirler (3). Shinoda ve arkadaşları (2001) gönüllü insan denekleri üzerinde yaptığı çalışmalarda denekleri *L. helveticus* CP53 türü içeren gıdalarla beslemiş ve bu bakterilerin burada yerleşerek adapte olduğunu dışkıdan bu bakteriyi tekrar elde ederek gözlemlemiştir. Matsumiya ve arkadaşları ise (2002) yaptıkları çalışmada anne dışkısı ve vajinasında bulunan *Lactobacillus* cinsi bakterilerin yeni doğan bebeğe geçebildiğini ve sindirim sistemi florasının oluşturulmasında etkili olduğunu göstermiştir. Yine Tannock ve arkadaşları (2000) yaptıkları çalışmada *L. rhamnosus* DR20 türünü içeren probiyotik ürünlerle beslenen insanlarda dışkıda bu bakterinin bulunup bulunmadığını, bu bakterinin besin maddeleri ile alınmasından sonra ne kadar süreyle dışkıdan atılımının gerçekleştiğini gözlemlemiştir. Hem bu araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar hem de Tablo 1’de çeşitli fermente süt ürünlerinde kullanılan başlangıç kültürleri ve tablo 2’de insan vücudunda bulunan LAB’leri ve bulundukları bölgeler karşılaştırıldığında, gıdayla beraber alınan bakterilerin sindirim sistemi LAB florasının oluşturulmasında çok önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

2.5. Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları

Günümüzde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotikler çok önemli rol oynamaktadırlar. 1920’lerde penisilinin keşfinden bu yana pek çok antibiyotik geliştirilerek klinik kullanıma sunulmuştur (15). Antibiyotikler; belirli bakteriler tarafından aynı ortamı kullanan diğer bakterilerin öldürülmesi veya gelişiminin yavaşlatılması amacıyla üretilen maddelerdir (14, 15). Antibiyotikler tıp tarihinde mucize ilaç olarak kabul edilebilecek nadir ilaçların başında gelmektedir. Penisilinin tedaviye girişiyle başlayan süreçte milyonlarca insanın ölümüne neden olan mikroorganizmalar kontrol altına alınmış, kısa sürede elde edilen başarılar ölçüsüz bir iyimserlik havasının doğmasına zemin hazırlamıştır. Bakteriyel direnç ilişkin raporlar ilk defa 1950’lerde ortaya çıkmıştır (22). Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde antibiyotikler gelişigüzel kullanılan ilaçların başında gelir.



Şekil 1. Bakteri hücresi üzerinde antibiyotiklerin etki ettikleri bölgeler (33).

Bakteri hücrelerinde, insan hücrelerinden yapı olarak farklı üç ana bölge vardır. Bunlar hücre duvarı, hücre zarı ve ribozomlardır. Antimikrobiyal ilaçlar temel olarak bu bölgelere yönelik faaliyet gösterirler (Şekil-1). Buna göre dört türlü etki mekanizması olduğu kabul edilmektedir (16, 18).

1. Hücre duvarı sentezinin durdurulması,
2. Protein üretiminin durdurulması,
3. Nükleik asit sentezinin durdurulması.
4. Hücre zar faaliyetlerinin durdurulması,

1. Hücre duvarı üretimini durduran antibiyotikler

- Beta-laktam Antibiyotikler: Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler, Monobaktamlar, Beta-laktamaz enzim sentezini durdurucular.
- Glikopeptid antibiyotikler: Vankomisin, teikoplanin, sikloserin, basitrasin

2. Protein üretimini durduran antibiyotikler

- 30S ribozomal alt üniteyi etkileyenler: Aminoglikozidler, tetrasiklinler.

- 50S ribozomal alt üniteyi etkileyenler: Kloramfenikol, makrolidler, linkozaminler.
3. Nükleik asit üretimini durduran enzim kökenli antibiyotikler
 - Öncül madde sentezini durduranlar: Sulfonamidler ve trimetoprim,
 - DNA'nın üretimini durduranlar: kinolonlar
 - RNA'nın transkripsiyonunu durduranlar. Rifampin
 4. Hücre zar faaliyetlerini değiştiren antibiyotikler: Polimiksinler
 5. Etki mekanizması bilinmeyen antimikrobiyal ilaçlar: İzoniazid, metronidazol

2.5.1. Beta-Laktam Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotiklerinin hepsi moleküler yapılarında ortak beta-laktam halkası içerir (17). Bu halka bakteri duvarı sentezinde kullanılan disakkarit peptidlerin karboksil grupları ile yapısal benzerlik gösterir. Bu benzerlik nedeniyle duvar sentezini sağlayan enzimler olan penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bu substrat yerine beta-laktam antibiyotikler bağlanır (15). Enzimler bloke olur, duvar sentezi duran bakteriler ölür (15).

Ünal'a (15) göre Beta laktam antibiyotiklere karşı direnç üç değişik şekilde olabilir. Bunlar;

1. **Antibiyotiklerin Hücre içine Girişinin Azalması:** Beta-laktam antibiyotikler için az rastlanan bir direnç mekanizmasıdır. Gram pozitif bakteriler için bildirilmemiştir (15).
2. **Beta-laktamaz Yapımı:** Bakteri tarafından salgılanan enzim beta-laktam halkasını parçalar. Stafilokoklarda çok sıktır. Son yıllarda enterokoklarda da giderek artmaktadır fakat pnömokoklarda henüz bildirilmemiştir (15).
3. **Penisilin Bağlanma Proteinlerindeki (PBP) Değişiklik:** Mutasyonlar veya bakterilerden yeni genlerin transferi ile mevcut PBP'lerin beta-laktam ilgisinin (afinitesinin) azalması yada afinitesi düşük yeni bir PBP sentezlenmesi şeklinde olur (15).

2.5.2. Aminoglikozit Antibiyotikler

Aminoglikozit antibiyotikler bakteri ribozomunun 30S alt ünitesine bağlanıp protein sentezini engelleyerek etkili olur (18). Direnç, zar geçirgenliğinin azalması ribozomlarda antibiyotik bağlanma bölgesinin değişerek antibiyotiğin bağlanmaz hale gelmesi ve aminoglikozitleri yıkan enzimlerin sentezi ile gelişir (15).

Glikopeptid antibiyotiklere yüksek düzeyde direnç, *Lactobacillus* (12, 13), *Leuconostoc* (13), *Pediococcus* (13) ve *Erysipelothrix* gibi bazı bakterilerde doğal (intrinsic) bir özellik olarak tespit edilmiştir (35). Bu bakteriler zaman zaman ciddi enfeksiyonlara yol açabilseler de bu tür enfeksiyonların sayıca çok az olması ve bu bakterilerin daha başka pek çok antibiyotiğe duyarlı olmaları nedeniyle glikopeptid antibiyotiklere dirençleri bu yönden önemli bir klinik zorluk oluşturmamaktadır (35).

2.5.3.1. Vankomisinler

Vankomisine direncin bakterinin yeni bir D-ala-D-ala ligaz enzimi aracılığıyla D-ala-D-ala ucunu değiştirerek, ilacın artık buraya bağlanmaması ile meydana gelmektedir (36). Yeni enzim sentezini sağlayan gen bir grup bakteride plazmid üzerinde (*vanA*), diğer bir grup bakteride ise hücre kromozomu üzerinde (*vanB*, *vanC*) gösterilmiştir (20). Bu üç fenotipe ek olarak son yıllarda *vanD* ve *vanE* fenotipleri bildirilmiştir (36).

VanA Tipi Direnç: *E. faecium* ve *E. faecalis*'te gösterilmiştir (20). Dirençten 39 kDa ağırlığında *vanA* adı verilen bir hücre zar proteini sorumludur (20,36). Bu protein sentezini *vanA* geni sağlar (35). *vanA* geni ile birlikte vankomisin direncinin ifadesinde (ekspresyonunda) ve gen ifadesinin düzenlenmesinde (regülasyonunda) rol oynayan diğer genler (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX* ve *vanZ*) 10581 baz çifti uzunluğunda bir transpozon (Tn1546) üzerinde yer almaktadır (Şekil-3) (35). Tn1546 plazmid üzerinde taşınmakta ve bu nedenle diğer bakterilere kolaylıkla transfer edilebilmektedir (35). Yukarıda belirtilen genlerin ifadesi sonucunda D-ala-D-ala yerine D-ala-D-lac ile sonlanan farklı bir peptidoglikan molekülü sentezlenir (36). Vankomisinin bu yeni peptidoglikan molekülüne ilgisi oldukça düşüktür (36). Bu yeni peptidoglikanın sentezinde rol oynayan proteinlerin görevlerini şu şekilde sıralayabiliriz; *vanA* proteini D-ala-D-ala yerine D-ala-D-lac sentezinden sorumlu olan substrata özgünlüğü değişmiş bir ligaz enzimidir, *vanH* proteini yukarıda belirtilen reaksiyon için gerekli D-laktat havuzunun oluşmasını sağlayan bir D-hidroksiasit dehidrogenazdır, *vanX* proteini D-ala-D-lac ucuna karşı aktivitesi olmayan bir D,D-dipeptidazdır (35,36). Bu enzim orijinal enterokokal ligaz enziminin oluşturduğu D-ala-D-ala havuzunun tüketilmesini ve normal pentapeptid sentezinin asgari düzeyde tutulmasını sağlar (35, 36).

Sadece *vanA* proteinin varlığı vankomisine direncin ortaya çıkmasında yeterli değildir (35). D-lac ve benzer D-hidroasiitler enterokoklar tarafından sentezlenmez ve doğal ortamlarında bulunmaz (35). D-lac sentezi yapabilmek için enterokokların *vanA* operonunda bulunan genleri kazanması ve *vanA* için substrat oluşturması gerekir (20, 36, 36). *VanH* D-lac sentezinden sorumludur(35).

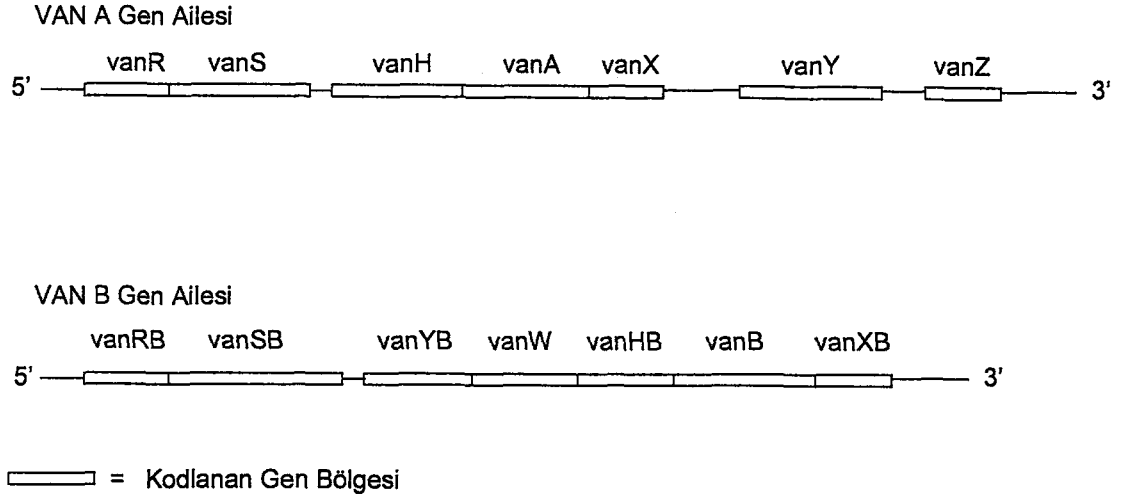
VanR ve *vanS* proteinleri *vanHAX* gen kümesinin transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev alır (35). *VanS* muhtemelen ortamda vankomisinin varlığının yada vankomisinin hücre duvarı üzerindeki erken etkilerinin belirlenmesinden sorumludur (35). *VanS*'den gelen işaret üzerine *vanR* proteini devreye girer ve *vanH* *vanA* ve *vanX* proteinlerinin üretimi başlatılır (35). *VanY* ve *vanZ* proteinleri de dirence katkıda bulunmasına rağmen mutlak gerekli faktörler değildir(23, 35, 36).

***VanB* Tipi Direnç:** Bu tür direnç *E. faecium* ve *E. faecalis*'te gösterilmiştir. Direnç muhtemelen *vanB* adı verilen gen tarafından kodlanan 39,5 kDa moleküler ağırlıktaki *vanB* zar proteini tarafından oluşturulmaktadır (35). *vanA* ve *vanB* proteinleri arasında aminoasit yapısı yönünden % 76 benzerlik bulunmaktadır (20, 35, 36). *vanA* tipi dirence benzer olarak *vanHB*, *vanYB*, *vanXB*, *vanRB*, ve *vanSB* genleri direnç oluşturmakta rol oynar (Şekil-3) (36). Bugüne kadar *vanB* tipi direnci bakteriden bakteriye transfer etmek mümkün olmamıştır (35). Bu nedenle direnç geninin kromozom üzerinde olma olasılığı mümkündür. Dirençli bakteriler vankomisine dirençli fakat teikoplanine duyarlıdır(23, 35, 36).

***VanC* Tipi Direnç:** *VanC* tipi direnç D-ala-D-ala yerine D-ala-D-ser ile sonlanan bir pentapeptit sentezlenmesi sonucunda oluşur. *VanC* sorumlu direnç genidir. *VanC* tipi direncin geni kromozom üzerinde bulunur ve bir bakteriden diğerine aktarılamaz (35, 36).

VanA tipi glikopeptit direncinde vankomisine karşı olan direnç *vanB* ve *vanC* tipi dirençten daha şiddetlidir (MIC > 512 mg/l) (36). *VanA* tipi glikopeptid direncinde aynı zamanda teikoplanine karşıda dirençlidir (MIC >8 mg/l) (36). *VanA* tipi direnç geni bir transpozon üzerindedir ve hem plazmid hem de kromozom tarafından taşınabilir (20, 35, 36). Bu özelliğinden dolayı bu direnç bir bakteriden diğer bir bakteriye plazmid aracılığıyla aktarılabilir (35). Bu genin transpozon üzerinde bulunmasından dolayı bazı plazmid içermeyen bakterilerde de *vanB* tipi direncin aktarılabildiği gösterilmiştir (23). Bu sonuç bu genin konjugatif bir transpozon tarafından taşındığını göstermiştir (35). *vanB* tipi direnç gösteren bakteriler vankomisine dirençli (MIC < 128 mg/l) teikoplanine karşı duyarlıdır (MIC < 4 mg/l).

vanC tipi direnç kromozom üzerinde bulunur ve bir bakteriden diğer bir bakteriye aktarılamaz (36).



Şekil 3. Vankomisin direnç geni (36).

2.5.4. Tetrasiklinler

Tetrasiklinler ilk kez 1940'lı yıllarda keşfedilmiş protein sentezini inhibe ederek etkili olan (37) geniş etki yelpazesine sahip düşük toksik etkili (54) bir antibiyotiktir.

Tetrasiklinler aminoacyl-tRNA'ların bakteri ribozomlarında bulunan peptid kabul edici A bölgesine (acceptor A site) bağlanmasını engelleyerek protein sentezini durduran antibiyotiklerdir (37). Tetrasiklinler hem gram pozitif hem gram negatif bakteriler, özellikle klamidy (chlamydiae), mikoplazma (mycoplasmas), riketsiya (rickettsiae) protozoalara (protozoan) karşı olmak üzere geniş bir etki yelpazesine sahiptir (37). Bu antibiyotikler insan ve hayvan enfeksiyon hastalıklarında geniş bir kullanım alanına sahiptirler (37). Ayrıca bazı ülkelerde bu antibiyotik hayvan yemlerine koruyucu ve büyümeyi teşvik edici ajan olarak katkı maddesi şeklinde katılmaktadır. Hem tetrasiklinleri hem de diğer antibiyotiklerin hayvan yemlerine büyümeyi düzenleyici katkı maddesi olarak katılması son yıllarda önüne geçilmez bir hal alan antibiyotik direnç sorunu yüzünden üzerinde ciddi bir şekilde düşünülmesi gereken bir durum haline gelmiştir (14, 17, 21, 37).

Klorotetrasiklin (Chlortetracycline) ve oksitetrasiklin (oxytetracycline) 1940'lı yıllarda keşfedilen tetrasiklin ailesinin ilk elemanlarıdır (37). Bu moleküller *Streptomyces aureofaciens* ve *S. rimosus* tarafından üretilmektedir (21). Diğer tetrasiklinler (doğal olarak bulunanlar, tetrasiklinler) *S. aureofaciens*, *S. rimosus* ve *viridofaciens*'dan, demethylchlortetracycline *S. aureofaciens*'dan elde edilmiştir. Suni olarak üretilen tetrasiklinler ise metasilin (methacycline), deoksisilin (doxycycline) ve minosilin (minocycline) dir (37).

1950'li yıllardan önce birlikte yaşayan (kommensal) ve patojenik bakterilerin büyük çoğunluğu tetrasiklinlere karşı duyarlıydılar (37). Chopra ve Robets (2001) bildirdiğine göre 1954 yılları arasında toplanan 433 *Enterobacteriaceae* örneğinden yalnızca % 2'si tetrasiklinlere karşı dirençliydi (37). Ama daha sonra bu antibiyotiklerin tıp, veterinerlik ve tarımda daha geniş bir şekilde kullanılmasıyla direnç sorunu da daha büyük bir yayılım göstermiştir (37). Aslında tetrasiklinlere karşı dirençliliğin kommensal ve patojenik bakterilerde sıklığının artmasında tet geninin yayılımı etkili olmuştur (37).

Mendez ve arkadaşları (1980) ilk kez *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonadaceae* bakterilerinde plazmid kökenli tetrasiklin direncini göstermiştir (37). Chopra ve Robets (2001)'e göre şu ana kadar 29 tane tetrasiklin direnç geni (*tet*) ve 3 tanede oksitetrasiklin direnç geni (*otr*) tanımlanmıştır.

Chopra ve Robets (2001)'e göre tetrasiklin direnci dört şekilde ortaya çıkabilir.

1. Antibiyotiğin bakteri hücresi içinden dışarıya pompalanarak hücre içi konsantrasyonu düşürülür böylece etkili olacağı konsantrasyona hiçbir zaman ulaşamaz. Bu tip dirençten sorumlu genler *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(J)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(31)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *otr(B)*, *tcr3c*, *tetP(A)*, *tet(V)* ve *tet(Y)*d genleridir. Bu genlerin ürünleri olan bu proteinler devamlı bir şekilde antibiyotiğin bakteri hücresi içinden dış ortama pompalayarak ilacın hücre içi konsantrasyonunu düşürür (37).

2. Antibiyotiğin ribozoma bağlanma bölgesinde değişiklik meydana getirerek bir taraftan antibiyotiğin ribozoma bağlanması önlenirken diğer taraftan protein sentezi devam eder. Ribozom bağlanma bölgesindeki değişiklikten sorumlu genler *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(T)*, *otr(A)*, *tetP(B)* ve *tet'* dir (37).

3. Antibiyotik enzimatik yolla yıkılarak etkisiz hale getirilir. Bu grup dirençten sorumlu gen *tet(X)*' dir (37).

4. Mekanizması tam olarak açıklanamamakla beraber *tet(U)* ve *otr(C)* genleri de tetrasikline karşı direnç gelişiminde etkili gen bölgeleridir (37).

LAB'lerinden; *Lactobacillus* cinsinde *tet(O)* ve *tet(Q)*, *Enterococcus* cinsinde *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)* ve *tet(U)*, *Streptococcus* cinsinde *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)* ve *tet(T)* tipi tetrasiklin direnci gözlenir. Genel olarak tetrasiklin direnç faktörü plazmidler ve traspozonlarla aktarılır (37, 54). Transpozonlarla aktarılan direnç faktörü kromozom üzerinde yerleşim gösterebilir (37).

2.5.5. Makrolidler

Makrolid, linkozamid ve streptogramin türevi antibiyotikler makrosiklik lakton halkasından ibaret ortak bir yapıya ve benzer antibakteriyel etkiye sahip olmaları nedeniyle büyük bir antibiyotik ailesi oluştururlar. Başlıca makrolid antibiyotikler; eritromisin ve türevleri ile klaritromisin ve azitromisindir (14).

Eritromisin bakteri ribozomlarının 50S alt birimlerine geri dönüşümlü bir şekilde bağlanarak kabul edici bölgedeki (A bölgesi) aminoasit-tRNA molekülünün peptidil (P) noktasındaki yeni sentez edilen polipeptid zincirine transferini engelleyerek peptid zincirinin uzamasını engeller (Şekil-4) (14, 48). Böylece bakteri hücresinde protein sentezi engellenir. Eritromisin ve diğer makrolidlerin bağlandığı yerin yanına kloramfenikol ve linkozamidlerinde bağlanma bölgesi vardır (38, 48). Etki yerleri ortaktır (38). Bu nedenle bu üç antibiyotik türü birbirlerinin bakteri ribozomlarındaki hedef noktalarına bağlanmasını yarışmalı biçimde önlerler (38). Birbirlerinin antibakteriyel etkilerini bozduklarından birlikte kullanılmamalıdır. Bu üç antibiyotik grubundan birine dirençli olan bir bakteri suşu diğerlerine çapraz direnç gösterir (14).

Eritromisinin antibakteriyel yelpazesi Penisilin G'ninkine benzer (38). Penisiline dirençli (beta-laktamaz üreten) *S. aureus* suşlarının çoğu dahil gram pozitif koklara ve basillere karşı güçlü etkinlik gösterir (48). Gram negatif koklar üzerinde de güçlü bir etkiye sahiptir (14). Eritromisin direnci üç mekanizma ile gelişir; hedef bölge değişikliği, antimikrobiyal inaktivasyon, aktif olarak ilacın dışarı atılması. Eritromisine doğal direnç nedenlerinden biri de bakteri hücre çeperinin ilacın pasif difüzyonuna elverişli olmamasıdır. Eritromisinin etki yeri ribozomlar olduğu için bakteri hücre sitoplazmasına girmesi gerekir. Ortamın pH'sının yükselmesi eritromisinin iyonizasyonunu azaltarak geçirgenliği ve ilacın etkisini artırır (38). Eritromisin ve benzer antibiyotiklere karşı kazanılmış direncin en sık görülen şekli adenin-N6-metiltransferaz/metilaz (adenine-N6-methyltransferase) salgılanması sonucu

ribozomların 50S alt biriminin bir ögesi olan 23S rRNA'nın adenin rezidülerinin metillenmesidir (38). Bu olay sonucunda makrolidlerin bakteri ribozomu 50S alt ünitesi üzerindeki bağlanma bölgelerine ilgileri azalır . Metilaz geni genelde plazmid üzerinde bulunur ve normal şartlarda ifade edilmez (48). Ne zaman bakteri makrolidlere maruz kalırsa gen ifadesi sentezlenmeye başlar (38). Bazı bakterilerde ise metilaz enzimi sürekli üretilir. Bu bakteriler makrolidlere karşı yüksek direnç gösteren mikroorganizmalardır (38).

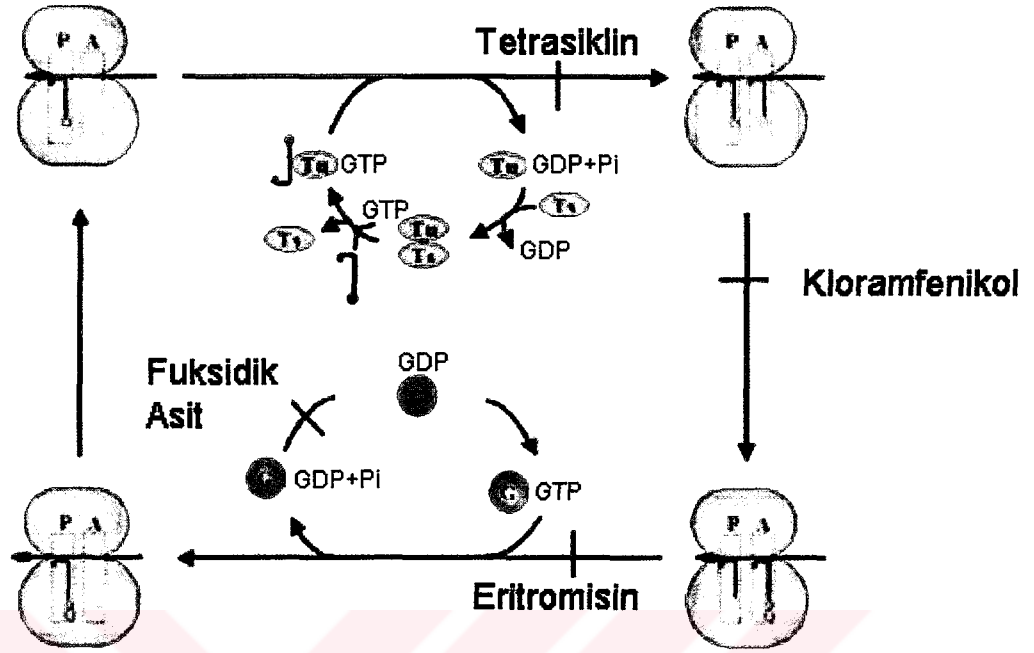
Jensen ve arkadaşları'na (1999) göre eritromisin direnç genlerini 6 sınıfa ayırmak mümkündür (41). Bu sınıflar *ermE*, *ermDK*, *ermF*, *ermA2*, *ermB*, *ermG* ve *ermC* gruplarıdır. LAB'lerinde görülen erm direnci *ermB* ve *ermG* grubuna dahildir (41). *Lactobacillus* türü bakterilerde *ermG*, *Streptococcus* türlerinde *ermG*, *Enterococcus* türlerinde ise hem *ermB* hem de *ermG* grubu eritromisin direnç genleri bulunmaktadır (41).

2.5.6. Kloramfenikol

Kloramfenikol bakteri ribozomunun 50S alt ünitesine bağlanır ve protein sentezini peptidiltransferaz (peptidyltransferase) aşamasında engelleyerek etkili olur (Şekil-4) (14). Kloramfenikol direncinde genellikle antibiyotik Kloramfenikol asetiltransferaz enzimi tarafından parçalanarak etkisiz hale getirilir. Kloramfenikol direnç geni (*cat*) gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasında çok az bir benzerlik gösterir. Bu genin farklı tip farklı bakteri gruplarında tanımlanmıştır. Bu gen (*cat*) sıklıkla plazmid aracılığıyla taşınır. Bu gene karşı bazı gram negatif bakterilerde dış zar geçirgenliğinde azalma ve ilacın hücre dışına pompalanması şeklinde direnç gözükse de bu o kadar yaygın değildir (14).

Antimikrobiyal ajanlara karşı direnç antimikrobiyal ajanların kullanımıyla gittikçe artan bir problem olmuştur. Bunun çözümlerini bulabilmek için bir çok ülkede çok değişik çalışmalar yürütülmektedir. Bilindiği gibi antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirme mekanizmasının temelini genetik elemanlar oluşturmaktadır. Bu genetik materyalin bir bakteriden diğer bir bakteriye aktarılabilirdiği gösterilmiştir (16). Patojen olmayan (hastalık etkeni olmayan) bazı bakteriler söz konusu bu direnç genlerini taşıyabilirler ve bu taşıdıkları direnç genlerini patojen bakterilere aktararak o bakteriyi söz konusu antimikrobiyal ajana karşı dirençli hale getirebilirler. Bu şekildeki direnç aktarımına en uygun örnek plazmidler tarafından taşınan direnç genlerinin bir

bakteri türünde veya bir bakteri türünden diğer farklı bir bakteri türüne yatay olarak aktarılabilir direncin yayılımıdır (9, 10, 14,49).



Şekil 4. Eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotiklerin etki mekanizması (42).

2.6. Antibiyotik Direncinin Genetik Temeli

Mutlu ve arkadaşlarına (1999)'na göre antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ve yayılımı ile ilgili bir çok faktör arasında üçü ön plana gelmektedir;

1. Sık rastlanan direnç genlerinde, direnç yayılımını genişletecek mutasyonların olması,
2. Mikroorganizmalar arasında genetik bilgi aktarımıyla direnç genlerinin yeni konaklara geçişinin kolaylaşması,
3. Hastaneler gibi dirençli mikroorganizmaların çoğalabileceği ortamlarda antibiyotik veya dezenfektanların özellikle direnç gelişimi üzerinde seçici baskısı.

Bakteride genom kromozomal DNA ve plazmid adı verilen halka yapılı daha küçük ve kromozomdan bağımsız bir epigenetik molekülden oluşmaktadır (49). Kromozom DNA'sı metabolizma, çoğalma, ve hücre yapısı ile ilgili hayati bilgileri taşıırken plazmidler bu mikroorganizmalara bulaşmayı sağlayan (virulans) faktörleri ve direnç genleri gibi ek özellikler kazandırır. Konaktan konağa aktarılabilmelerini sağlayan genleri taşıyan plazmidlere **konjugatif plazmidler** denir (57). Direnç

genlerinin çoğu plazmid kökenlidir (49). Plazmid üzerinde taşınan genlerin kromozom üzerindeki genlerle yer değiştirmesi yada bu genler arasına yerleştirilmesi de söz konusudur. Genlerin plazmidden kromozoma aktarılması yeniden düzenlenme (rekombinasyon) mekanizmasıyla yada transpozonlar aracılığıyla gerçekleştirilebilir (18).

Transpozonlar (sıçrayıcı genler) kromozom veya plazmide girebilme ve ayrılabilme yeteneğinde olan böylelikle bu iki yapı arasında DNA dizileri aktarımını sağlayan küçük DNA parçalarıdır (57). Plazmid kökenli Beta(β)-laktamazlar, tetrasiklin direnç genleri ve aminoglikozid yapısını değiştiren enzimler gibi bir çok direnç geni aslında transpozonlar içinde bulunmaktadır (57). Transpozonlar, geniş konak yelpazeleri sebebiyle direnç genlerinin değişik türler arasında aktarımında çok önemlidirler.

Direnç genleri ile ilgili bir diğer genetik yapı da **integron**dur. Kromozom veya plazmid üzerindeki antibiyotik direnç genlerinin birbirleri ile bağlantılı olduğu ve özendirici (promoter) bölgesinin yakınında özel integrasyon birimleri (üniteleri) olduğu gösterilmiştir (49). Bu yerleşim işareti şeklindeki elemanlara **integron** adı verilir. İntegronlar rekombinasyonun sık olduğu (hot spots) yerlerde yer alır.

Kromozom veya plazmid üzerindeki direnç genleri, bakterinin bölünmesi ile yavru hücrelere aktarılır (vertikal= dikey geçiş) (49). Bu yeni hücrelerin çoğalması ile de direncin yayılımı gerçekleşir (klonal yayılım) (57). Plazmidler bunun yanı sıra konjugasyon ile yatay (horizontal) olarak da aktarılabilir. İki bakteri hücresinin teması sonucunda genetik eleman aktarımına konjugasyon denilmektedir. Türler arası aktarım vücut içinde (in vivo) daha kolay olur. Bu özellikle gastrointestinal sistemde flora bakterileri ile patojen Enterokoklar arasında direnç genlerinin aktarılması açısından önemlidir (14). Direnç genlerine sahip plazmidler gram pozitif ve negatif bakteri türleri arasında da aktarılabilir (14, 49, 57). Plazmid transferi gerçekleştiğinde transpozonlar üzerindeki direnç genleri bir plazmidden diğerine veya yeni konağın kromozomuna atlayabilir (14, 23, 52, 53). Plazmidler direnç genlerinin aktarılmasında gereken tek eleman değildir. Özellikle gram pozitif mikroorganizmalarda bulunan konjugatif transpozonlar plazmid olmaksızın gen aktarımını sağlayabilir. Burada vurgulanması gereken esas nokta aktarımın düşük yoğunluklardaki antibiyotik konsantrasyonunda hızlanmasıdır (14).

Direnç genleri tabiatta antibiyotiklerin farkına varılmadan milyonlarca yıl evvelinden beridir vardır zira bunlar mikroorganizmaların kendi hayatlarının idamesi için gereken bir savunma silahıdır. Bunların varlığı olasılıkla *Actinomycetes*'ler gibi

saprofit mikroorganizmaların ürettiği doğal antimikrobiyal bileşikler ile ilgilidir. Bu doğal bileşikler, günümüzde klinik olarak kullanılan antibiyotiklerin %70'ini oluşturmaktadır. Bakteri ve mantarlar kendilerini kendi ürettikleri antibakteriyellerden korumaları gerekir. Bu cins antibiyotik üreten organizmalarda kendilerini bu zararlı etkidenden korumak için direnç genlerini taşırlar. Bu organizmalarda kromozom kökenli direnç genlerinin yanı sıra plazmid kökenli direnç genleri de yaygın olarak bulunmaktadır (14, 30, 23, 52, 53).

2.7. Bakterilerde Antibiyotik Dirençliliği ve Yansımaları

Gram pozitif bakteriler uzun yıllar toplumda kazanılmış enfeksiyon hastalıklarının en sık sebepleri olmalarının yanı sıra ilerleyen yıllarda giderek artan oranlarda olmak üzere özellikle son yıllarda gram negatif bakterilerle beraber hastane enfeksiyonlarının önemli etkenleri haline gelmişlerdir (15). Gram pozitif bakteriler de diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi tedavi yada korunma amacı ile kullanılan antibiyotiklere karşı sistematik bir şekilde direnç gelişmektedir. Penisilinin aktif kullanıma girdiği 1940'lı yıllarda stafilokok ve pnömokok gibi tedavisi çok zor sağlanan gram pozitif bakterilerin bu antibiyotiğe çok duyarlı oldukları (MIC=1-10 ng/ml) tespit edilmiştir. Penisilin tedavisiyle daha önce hemen hemen % 100 ölümcül seyreden *Staphylococcus* sepsisleri ve % 40 ölümcül seyreden pnömokok enfeksiyonlarından kaynaklanan ölüm kısa sürede önlenabilir hale gelmiş ancak bu başarıyla beraber 20. yüzyılda bile tıbbın önemli sorunlarından biri olan antibiyotiklere direnç meselesi de başlamıştır (14, 15).

Penisilinin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra stafilokoklarda penisilin direnci (MIC $\geq$ 100 μ g/ml) tespit edilmiş ve bu direnç hızla yayılmıştır. Direncin sebebi penisilini parçalayan beta-laktamaz enzimidir. Stafilokoklarda penisilin direncinin hızla yayılmasında kuşkusuz beta-laktamaz enzim sentezini sağlayan genin bir plazmid üzerinde olması ve bu nedenle de genetik bilginin yatay (horizontal) olarak çok hızlı bir şekilde yayılabilmesinin rolü büyüktür. Bilim bakterilerin bu meydan okumasına 1960 yılında bu enzime dayanıklı penisilinlerin keşfiyle cevap vermiştir. Metisilin, nafsilin, oxazolyl penisilinler gibi beta-laktamaz enzimine dirençli antibiyotiklerin keşfi ise bu bakterilerin neden olduğu hastalıkların kontrolü bir süre mümkün olmuş, ancak 1961 yılında metisiline dirençli ilk stafilokok İngiltere'de izole edilmiştir. Bu problem İngiltere'ye özgü kalmamış, 1960'ların sonuna doğru Metisiline Dirençli ilk *S. aureus* (Meticillin Resistance *S. aureus*) (MRSA) tüm dünyada tanı ve

tedavi güçlükleri sebebiyle problem haline gelmiştir. MRSA yalnız metisiline değil, karbapenem grubu antibiyotikler de dahil tüm beta-laktam antibiyotiklere karşıda dirençlidir. Bugün MRSA ve diğer metisiline dirençli stafilocokların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek kısıtlı sayıda antibiyotik mevcuttur ve bu antibiyotiklerin önemli yan etkileri vardır (15).

Stafilokokların aksine pnömokoklarda penisilin direnci yavaş gelişmiştir. İlk kez 1967 yılında Avusturya'dan penisilin MIC değeri 100 kez daha yüksek suşlar bildirilmiştir. Daha sonraları MIC değerleri 1000 kez daha yüksek (MIC=6-20 µg/ml), çok daha dirençli suşlar dünyanın değişik bölgelerinde tespit edilmiştir (15).

Enterokoklarda ise beta-laktam antibiyotiklere karşı oldukça yüksek direnç değerine sahiptirler.

Birbirine yakın özellikleri olan bu üç gram pozitif bakteri grubunda aynı tür antibiyotiklere karşı direnç gelişimi değişik süreçlerde ve muhtemelen değişik mekanizmalarla olmaktadır (15).

2.8. Laktik Asit Bakterilerinde Antibiyotik Direnci

Çok eski tarihlerden beri LAB çeşitli gıdaların (özellikle süt ürünlerinde) mayalanmasından kullanılmaktadır (62). Bu bakteriler gıda ürünlerinde ya başlangıç kültürü olarak bulunur yada çeşitli sebeplerden dolayı gıda ürünlerinin bu bakterilerle bulaştırılması (contamination) sonucunda çoğalarak ortama hakim duruma geçerler. Sonuç olarak hemen hemen bütün süt ve süt ürünlerinden LAB türleri elde edilebilir ve bu ürünlerde bulunan bakterilerin insan florasını etkilemesi doğal bir sonuçtur. LAB'nin birçok türü doğal olarak çok çeşitli plazmidleri taşırlar. Bu plazmidler çoğunlukla bakteri metabolik aktivitesi için gerekli enzimleri kodlayan genleri taşırlar (14, 16). Ancak bunun yanı sıra bazı türler bu genlerin yanı sıra çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeyi sağlayan genleri barındıran plazmidleri de taşırlar (23, 51, 55). İşte bu bakteriler çeşitli gıda ürünlerinde değişik amaçlar için kullanıldığında potansiyel direnç taşıyıcı ve aktarıcı olarak iş görülebilir (16).

Bakterilerde penisilinin keşfinden bu yana antibiyotik dirençli türler gözlenmeye başlanmıştır (34). LAB maruz bırakıldıkları farklı antibiyotiklere karşı farklı duyarlılık seviyeleri gösterirler (Tablo.3). Bunun sebebi tür seviyesinde bu bakterilerin farklılık göstermeleridir (12, 35). Farklı türler arasında aynı antibiyotiğe karşı duyarlılık birkaç kat değişmektedir (12, 13, 17).

LAB'nin antibiyotiklere karşı dirençlerini tespit etmek için kullanılan yöntemler mikrobiyolojik yöntemler [e-test, agar seyreltme (agar dilution), disk difüzyon (disk diffusion), mikrobrot (microbroth)] ve moleküler yöntemlerdir (12, 14).

Vescova ve arkadaşları (1982)'de yaptıkları çalışmada *L. acidophilus* ve *L. reuteri*'de antibiyotik direnci taşıyan plazmidleri tespit etmişlerdir. Bu türlerin direnç/duyarlılık durumlarını mikrobiyolojik yöntemlerle elde etmişler, direnç profillerini belirlemek amacıyla plazmid eldesi yapmışlar ve daha sonra etidyum bromid, akriflavin ve yüksek sıcaklıkta gelişime maruz bırakarak bakteri hücrelerini plazmidlerden arındırmışlardır. Bu işlemten sonra tekrar mikrobiyolojik yöntemleri kullanarak direnç/duyarlılık tespiti yapmışlardır. *L. reuteri* türünün bazı suşlarının β -laktamaz gurubu antibiyotiklerden penisilin, ampisilin ve sefaloridine, bazı suşların kloramfenikole karşı ve tüm suşların novobiyosine karşı dirençli olduğunu bulmuşlardır (34). Buna karşılık dirençli olanların bazıları da rifampisine karşı duyarlı olduklarını gözlemlediler (34). Bu çalışmaları sonucunda bu türlerdeki plazmidlerin uzaklaştırılmasından sonra mikrobiyolojik yöntemlerle direnç/duyarlılık çalışmaları bu direncin plazmidler aracılığıyla aktarıldığını göstermiştir (34). 1970'li yıllardan önce konjugasyon işleminin yalnızca gram negatif bakterilerde olduğu, gram pozitif bakterilerde böyle bir olayın gerçekleşmediği dolayısıyla plazmid kökenli antibiyotik direnç kazanımının gram pozitiflerde söz konusu olmadığı sanılıyordu. Gram pozitif bakteriler arasında konjugasyon olabileceği ilk kez 1964 yılında Raycroft ve Zimmerman tarafından öne sürülmüştür. 10 yıl sonra Jacob ve Hobbs (1974) gram pozitif bakteriler arasında plazmid aracılığıyla gen aktarımının yapılabileceğini ispatlamıştır. Evlenyn ve arkadaşları (1979) hem eritromisin hem linkozamin direnç geni taşıyan *Streptococcus* kökenli pAM β 1 plazmidini *Streptococcus*'tan *Lactobacillus* türlerine aktarmışlardır. West ve Warner (1985) yaptıkları çalışmada Evlenyn ve arkadaşlarının (1979) sonuçlarını destekler veriler elde ettiler. West ve Warner (1985) *L. plantarum*'un çeşitli suşlarında *Streptococcus lactis* NCDO türüne özgü pAM β 1 plazmidini ve *Streptococcus faecalis* JH2-2 türüne özgü pIP501 plazmidlerinin *Lactobacillus plantarum* türüne aktarılabildiğini göstermiştir. Shrago ve arkadaşlarının (1986) pAM β 1 plazmidi ile ilgili diğer çalışmaları da bu iddiayı desteklemektedir (52). Yamamoto ve Takano (1996) *L. helveticus* CP53 suşunda tetrasiklin direnç geni taşıyan pCP53 plazmidini tanımladılar (51). Daha sonraki yıllarda araştırmacılar LAB özellikle *Lactobacillus* cinsi ile ilgili antibiyotik direnç problemini moleküler yöntemlerle

çalışmaya devam etmişlerdir. Fons ve arkadaşları (1997) Axelsson ve arkadaşlarının (1988) ortaya koyduğu *Streptococcus agalactis* türünden elde edilen *ermB* tipi direnç taşıyan pIP501 plazmidi ve *Staphylococcus aureus*'dan izole edilen *ermC* direnç geni taşıyan pE194 plazmidinin laktobasillerden izole edilenlerle uyum gösterdiğini ortaya koydular. Fons ve arkadaşları (1997) *L. fermentum*'dan da *erm* geni taşıyan pLEM3 plazmidini izole ederek tanımlamışlardır. SchwarzF ve arkadaşları (2001) *Enterococcus faecalis* RE25 suşunda vankomisin direnç geni taşıyan pRE25 plazmidini tanımlayarak gen haritasını çıkarttılar. Schwarz ve arkadaşlarının (2001) makalelerinde kaynak olarak gösterdikleri Vogle ve arkadaşları (1992) sucuk-sosis fermantasyonunda kullanılan *E. faecalis* ile *L. curvatus* arasında plazmid aracılığıyla direnç geninin aktarıldığını gösterdiler. Danielson (2002) *L. plantarum* 5057 suşunda tetrasiklin direnç geni taşıyan pMD5057 plazmidini tanımlamış ve bu plazmidten tanımladığı *tetM* direnç geninin *Clostridium perfringens* ve *Staphylococcus aureus* tan izole edilen *tetM* direnç geni ile büyük benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

LAB'nde antibiyotik direnç/duyarlılık belirlemek amacıyla bu moleküler çalışmaların yanı sıra mikrobiyolojik yöntemle dayalı bir çok çalışma da yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları Tablo 3'de verilmiştir. Danielsen ve Wide (2002) e-test yöntemini kullanarak *Lactobacillus* türlerinin çeşitli antibiyotiklere karşı olan davranışlarını incelemiş ve Tablo 3'de verilen sonuçları destekler veriler elde etmiştir.

Laktik asit bakterilerinin antibiyotiklere karşı olan MIC değerleri tür seviyesinde bile çok değişiklik göstermektedir. Ayrıca farklı coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalar arasında farklar mevcuttur. Danielsen ve Anette (2002) ile Zarazaga ve arkadaşlarının (1999) çalışmaları karşılaştırılınca bu fark daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Bu fark direnç/duyarlılığı belirlemek için kullanılan yöntemlerin farklılığından ve farklı coğrafik bölgelerden elde edilen bakteri örneklemeinden kaynaklanmaktadır.

Tablo 3. LAB'lerinin çeşitli antibiyotiklere karşı MIC (işlevsizliği sağlayan en düşük yoğunluk) değerleri (17).

Mikroorganizma	Antimikrobiyal ajan	MIC (µg/ml)		
		MIC aralıkları	%50	%90
<i>Lactobacillus</i>	Eritromisin A	0,03-256	0,06	0,125
	Klaritromisin	0,0015-128	0,015	0,03
	Roksitromisin	0,007-128	0,06	0,125
	Azitromisin	0,0035-128	0,06	0,125
	HMR3647	0,0007-0,5	0,007	0,015
	Spiramisin	0,06-16	0,25	0,5
	Pristinamisin I	0,25-16	2	8
	Vankomisin	4->4096	≥4096	≥4096
	Teikoplanin	2->4096	≥2,048	≥2,048
	Penisilin	0,25-c128	2	128
	Siprofloksasin	0,5-64	8	32
	Levofloksasin	0,125-16	4	8
<i>Leuconostoc</i>	Eritromisin A	0,03-0,125	0,06	0,125
	Klaritromisin	0,007-0,03	0,03	0,03
	Roksitromisin	0,03-0,5	0,125	0,5
	Azitromisin	0,03-0,125	0,125	0,125
	HMR3647	≤0,0007-0,015	0,007	0,015
	Spiramisin	0,25-0,5	0,25	0,5
	Pristinamisin I	≤0,25-8	2	8
	Vankomisin	512->4096	1,024	≥4096
	Teikoplanin	512->4096	1,024	≥4096
	Penisilin	0,25-2	0,5	2
	Siprofloksasin	1,32	4	16
	Levofloksasin	1-8	4	8
<i>Pediococcus</i>	Eritromisin A	0,06-≥1,024	0,125	0,25
	Klaritromisin	0,007-128	0,06	0,06
	Roksitromisin	0,007-1,024	0,06	0,5
	Azitromisin	0,06-128	0,125	0,25
	HMR3647	≤0,0007-4	0,007	0,015
	Spiramisin	0,25-≥64	0,5	1
	Pristinamisin I	1,128	4	8
	Vankomisin	512-2048	1024	1024
	Teikoplanin	512-≥4096	2048	≥4096
	Penisilin	0,5-2	1	2
	Siprofloksasin	32-64	32	64
	Levofloksasin	4-16	8	16
Tüm LAB	Eritromisin A	0,03-≥1,024	0,06	0,125
	Klaritromisin	0,0015-128	0,015	0,06
	Roksitromisin	0,007-≥1,024	0,06	0,25
	Azitromisin	0,0035-128	0,06	0,125
	HMR3647	≤0,0007-4	0,007	0,015
	Spiramisin	0,06-≥64	0,5	0,5
	Pristinamisin I	≤0,25-128	4	8
	Vankomisin	4-≤4096	2048	≥4096
	Teikoplanin	2-≥4096	2048	≥4096
	Penisilin	0,25-≥128	1	64
	Siprofloksasin	0,5-64	8	32
	Levofloksasin	0,125-16	4	8

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.1. Örneklerin Kökeni ve Sayısı

Bu çalışmada Gaziantep'te satılan ticari süt ürünlerinden; 20 ticari peynir, 50 yöresel yöntemlerle imal edilmiş otantik peynir, 10 yoğurt, 1 ağız sütü, 15 çökelek ve 15 tereyağı olmak üzere toplam 111 örnek kullanılmıştır.

Ayrıca 36 vajinal, 14 ağız, 32 dışkı kökenli toplam 82 tane insan kökenli örnek kullanıldı.

Yapılan deneylerin doğruluğunu sınamak için kromozomal genetik yapısı ve plazmid içeriği bilinen standard *Lactococcus lactis* IL1403 ve *Lactococcus lactis* MG1363 türleri de kıyaslama için kullanıldı (Dr. Osman Çataloluk'a Dr. Margarita Medina'nın hediyesidir).

3.1.2. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma deneysel bir çalışma olup, örnekler esasen Gaziantep'te satılan ticari süt ürünleri, Gaziantep ve çevre bölgelerinde yöresel yöntemlerle yapılan süt ürünlerinden alınan numunelerden ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Servisine müracaat eden hastalardan vajina ve ağızlarından pamuklu çubuk (eküvyon çubuk) vasıtasıyla alınan sürüntülerden elde edildi.

Gaziantep'te satılan ticari süt ürünleri, Gaziantep ve çevre bölgelerde yöresel yöntemlerle yapılan süt ürünlerinden alınan numuneler 15 ml'lik tüpler içerisinde bulunan 2 ml'lik MRS sıvı (Broth) Taşıma besiyerine alındı. Karşılaştırma yapabilmek için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Servisine müracaat eden hastalardan pamuklu çubuk (eküvyon çubuk) vasıtasıyla, vajina ve ağız bölgelerinden alınan sürüntü 15 ml'lik tüpler içerisinde bulunan 2 ml'lik MRS Broth taşıma besiyerine alındı.

3.2. GEREÇLER

3.2.1. Kimyasal Maddeler

M.R.S. Broth (Oxoid), M.R.S. Agar (Oxoid), DL-Threonin (Merck), proteinaz K (Sigma), kloroform (Merck), 2-propanol (Merck), sodyum asetat (Merck), etil alkol (Merck), kristalize fenol (Merck), EDTA (Merck), NaCl (Merck), Tris-base (Merck), borik asit (Merck), agaroz (Prona), primerler (MWG Biotech, Almanya), Taq DNA polimeraz (Fermentas), dNTP (Fermentas), lauril sülfat (SDS) (Merck), etidyum bromid (Sigma), lizozim (Sigma), kristal viyoleto (Merck), amonyum oksalat (Carlo Erba), iyot (Carlo Erba), potasyum iyodür, aseton (Merck), bazik fuksin (Merck).

3.2.2. Çözeltiler

Kristal Viyoleto Çözeltilisi

Çözeltili-A 10 ml,
Çözeltili -B 40 ml karıştırılır.

Çözeltili -A
Kristal viyoleto 2 gr,
%95'lik Etil alkol 20 ml

Çözeltili -B
Amonyum oksalat 0,8 gr,
Distile su 80 ml içinde çözödürölür.

Lugol (İyot) Çözeltilisi

İyot 1 gr
Potasyum iyodür 2 gr,
Distile su 300 ml içinde çözödürölür

Renksizleştirme Çözeltilisi

Etil alkol 25 ml,
Aseton 25 ml karıştırılır.

Zıt Boya

Bazik fuksin	3 gr,
%95'lik Etil alkol	100 ml içinde çözdürülür.

Bakteri Hücresi Parçalama Çözeltisi (BHPÇ)

Sukroz	%20,
Tris-HCl (pH 8,1)	10 mM,
EDTA	10 mM,
NaCl	50 mM (hazırlanır kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanır.)
Lizozim	5 mg/ml (kullanmadan hemen önce taze eklenir)

TBE çözeltisi

Tris-base	121g,
Borik asit	61.7g,
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7.44g tartıldı. Distile su ile 1 litreye tamamlanır.

3.3. CİHAZLAR

Distile su cihazı (Human RO ve UP), otoklav (Nüve OT4060), etüv (Selecta), dairesel karıştırıcı (Selecta), pH metre (Mettler Toledo MP220), santrifüj (Eppendorf 5810 R, Almanya), santrifüj (Eppendorf 5417 R, Almanya), santrifüj (Eppendorf 5415 D, Almanya), termal-cycler (Eppendorf Mastercycler Gradient, Almanya), elektroforez tankı (E-C Apparatus Corporation, NewYork), güç kaynağı (Bio-Rad Power Pac 3000, California), inkübatör (UniEquip D-82152 Martinsried, Almanya), video printer (Sony, Japonya), görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Torcy), mikropipet takımı (Eppendorf), hassas terazi (Shimadzu, Kyoto), mikrodalga fırın (Arçelik, İstanbul), manyetik karıştırıcı (VELP, Scientifica, İtalya), vorteks (Velp Scientifica), derin dondurucu (Vestel).

3.4. YÖNTEM

Toplanan örnekler laboratuara MRS sıvı besiyeri içinde ulaştırıldı. Örnekler sıvı MRS besiyerinde çoğaltıldı. MRS sıvı besiyerinde büyütülen örnekler gram boyamaya tabi tutuldu. Örnekler daha sonra kullanılmak amacıyla uygun şartlarda saklandı. Sıvı besiyerinde büyütülen örnekler MRS Agar katı besiyerine ekimi yapılarak tek koloni bakteri eldesi gerçekleştirildi. Her bir örnekten kaç tane tek koloni alınacağına gram boyama sonucunda örnekler incelenmesi neticesinde karar verildi. Her örnekten ortalama 4 tek koloni alındı. Elde edilen tek koloni bakteri örnekleri sıvı MRS besiyerinde tekrar çoğaltıldı. Çoğaltılan örneklerden ve ilk sıvı besiyerinden elde edilen örneklerden bütün DNA eldesi (hem kromozomal hem de plazmid DNA) yapıldı. Elde edilen DNA örnekleri PZT yöntemiyle türe has primerler kullanılarak *Lactobacillus* cinsi için tür seviyesinde tiplendirildi. Tiplendirme işlemini takiben aynı DNA örneklerinde eritromisin, vankomisin, tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotik direnç genlerinin varlığı uygun primer takımları kullanılarak PZT yöntemi ile araştırıldı. Hangi türlerde direnç geni yoğunluğu daha fazla olduğu araştırıldı.

3.4.1. M.R.S. (de Man, Rogose, Sharpe) Broth Besiyerinin Hazırlanması

5,2 gram M.R.S. Broth, steril 100 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Çözelti 250 ml'lik otoklavlanabilir şişelere alınarak 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika otoklavlandı. Otoklavlanan besiyeri kullanılıncaya dek +4 °C'lik buzdolabında saklandı. Hazırlanmış M.R.S. Broth Besiyeri kullanılmadan hemen önce biyolojik emniyet kabini içerisinde, aseptik şartlara dikkat edilerek, her bir tüpe 10 ml olacak şekilde dağıtıldı. DNA eldesi yapılacak örnekler için besiyeri hazırlanırken M.R.S. Broth Besiyeri tüplere dağıtılmadan önce son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde DL-Trionin (DL-Threonin) eklendi.

3.4.2. M.R.S. (de Man, Rogose, Sharpe) Agar Besiyerinin Hazırlanması

6,2 gram M.R.S. Agar, steril 100 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Çözelti 250 ml'lik otoklavlanabilir şişelere alınarak 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika otoklavlandı. Steril hale getirilmiş besiyeri HEPA filtreli biyolojik emniyet kabini içinde petri kaplarına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Besiyerinin donması için 1 saat bekletildi. Besiyeri içeren petri kapları kullanılıncaya kadar +4 °C'lik buzdolabında bekletildi.

3.4.3. Örneklerin Çoğaltılması

Taşıma besiyeriyle laboratuara ulaştırılan örnekler ilk önce anaerob kavanozlara yerleştirildi ve 37°C'lik %10 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda etüvden çıkartılan örnekler aseptik şartlara dikkat edilerek hazırlanmış 10 ml'lik M.R.S. Broth Besiyeri içeren tüplere 100 µl olacak şekilde ekim yapıldı. Tüpler örnek içeriklerine göre etiketlendi ve 37°C'de % 10 CO₂'li ortamda 24 saat üremeye bırakıldı. -20°C yada -40 °C'de saklanan birincil, ikinci yada daha alt seviyelerdeki bakteri kültürleri çoğaltılırken sıcaklık değerleri aşamalı olarak (sırasıyla -40°C, -20°C, +4°C ve oda ısısı) arttırıldı. Daha sonra yukarıdaki yöntem uygun olarak ekimi yapıldı (17).

3.3.4. Örneklerden Tek Koloni Bakteri Eldesi

Sıvı MRS besiyerinde çoğaltılmış örneklerden öze yardımıyla alınan numune MRS Agar besiyerine seyreltme yöntemiyle ekim yapıldı. 37°C'de %10 CO₂ içeren ortamda 24 saat üremeye bırakıldı. Süre sonunda MRS Agar besiyeri üzerinde düzgün koloni morfolojisine sahip tek koloni örnekleri iğne uçlu öze yardımıyla alınarak MRS sıvı besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de %10'luk CO₂ ortamında 24 saat üremeye bırakıldı.

3.4.5. Örneklerin Saklanması

Orijinal bakteri içeriğinin korunması için, taşıma besiyeriyle laboratuara ulaştırılıp anaerob şartlarda 37°C'lik etüvde 24 saat inkübasyona tabi tutulan örneklerden 700 µl alınarak içinde 300 µl gliserol bulunan 2 ml'lik tüplere konuldu. Nazikçe karıştırıldı. Tüpler örnek içeriklerine göre etiketlendi ve sırasıyla +4 °C 1 saat, -10 °C'de 2 saat bekletildikten sonra -20 °C'lik derin dondurucuda saklandı. Daha uzun süreli saklamalar için -20°C'de bir gün bekletilen tüple -40°C'lik derin donduruculara alındı. İkincil yada daha alt seviyedeki kültür örneklerinin saklanması da aynı yöntem izlendi (17).

3.4.6. Gram Boyama

M.R.S. sıvı besiyerinde üretilmiş örneklerden pipetle 15 µl alınarak etiketlenmiş lam üzerine yayıldı. Lamalar ultra viyole (UV) ışık altında 1 gece bırakıldı. Lamalar bek ocağının alevinden geçirilerek tespit edildi. Lamalar boyama kabı üzerine yerleştirilmiş cam çubukların üzerine dizildi ve üzerlerini kaplayacak şekilde taze

hazırlanmış kristal viyoleto çözeltisi döküldü. Bu şekilde 30-60 saniye beklendi. Süre sonunda lamaların üst yüzeyleri direkt olarak su akıntısına maruz kalmayacak şekilde musluk suyuyla yıkandı. Lamalar üzerine lugol çözeltisi ilave edildi ve 1-2 dakika beklendi. Bekleme süresi boyunca 3 defa lugol solüsyonu ilave edildi. Süre sonunda tekrar lamaların üst yüzeyleri direkt olarak su akıntısına maruz kalmayacak şekilde musluk suyuyla yıkandı. Yıkamadan sonra renksizleştirme (dekolarizasyon) çözeltisi lamaların üzerine eklendi ve 30-45 saniyelik zaman aralığında bu işlem tekrarlandı. Bu aşamadan hemen sonra lamalar üzerine zıt boya (bazik fuksin) eklendi ve 30-60 saniye beklendi. Süre sonunda tekrar lamaların üst yüzeyleri direkt olarak su akıntısına maruz kalmayacak şekilde musluk suyuyla yıkandı ve kurumaya bırakıldı (17).

3.4.7. DNA Eldesi

20 mM'lık DL-Trionin (DL-Threonin) içeren 10 ml'lik MRS sıvı besiyerine aseptik şartlara uygun şekilde stok kültür numunelerinden 100 µl eklenerek ekim yapıldı ve 37°C'de %10 CO₂ içeren ortamda bir gecelik inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda örnekler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktüldü. Üst faz döküldü, çöktürülen üzerine 5 ml distile su (dH₂O) eklenerek hücreler karıştırıldı. Tekrar 3000 rpm'de döndürülerek hücreler çöktüldü. Üst faz döküldü. Çöktürülen üzerine 3 ml Bakteri Hücresi Parçalama Çözeltisi (BHPÇ) eklendi ve çöktürülen nazikçe karıştırıldı. 10 dakika 55°C'de 12 devir/dakika (dev/dk) döndürülerek inkübasyon fırınında bekletildi. 10 dakikanın sonunda 10 mg/ml'lik 200 µl proteinaz-K eklendi. Tüpler nazikçe alt üst edildi. Üzerine %10'luk SDS'den 170 µl eklendi ve örnekler 60 °C'de 1 saat 12 dev/dk döndürülerek inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda 1600 µl dH₂O ilave edildi ve nazikçe karıştırıldı. 2 ml fenol, ve 2 ml kloroform ilave edilerek 5 dakika karıştırıcıda karıştırıldı. Sürenin sonunda 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi, üst faz yeni bir tüpe alındı. Fenol-kloroform aşaması tekrarlandı. Üzerine eşit hacimde 2-propanol ve hacimce 1/10 oranında 3 M'lık sodyum asetat eklendi ve karıştırıldı. -20 °C'de 1 saat bekletildi. -20 °C'den çıkarılan örnekler 4000 rpm +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst faz döküldü, tüpün dibindeki DNA çöktürülmesi pipet yardımıyla 1,5 ml'lik tüplere alındı. Örnekler 2 defa %70'lik Etil alkol ile yıkandı. Alkol kabaca uzaklaştırıldı. DNA'nın kurumasına müsaade edilmeden 1 ml ddH₂O (iki defa distile edilmiş su) eklendi ve 1 saat oda ısısında DNA'ların çözünmesi beklendi. Sürenin sonunda DNA örnekleri kullanıma kadar -20 °C'de bekletildi (24).

3.4.8. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

Polimeraz zincir tepkimesi (Polymerase Chain Reaction –PCR-) yöntemi temelinde çoğaltılmak istenen hedef DNA bölgesinin iki ucuna özgün bu bölgedeki baz dizisini tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-30 baz uzunluğunda) kullanılarak bu iki primer arasında kalan hedef bölgenin enzim yardımıyla sentezlenmesi ve çoğaltılmasına dayanır. Bu reaksiyon çift zincirin sıralarının birbirinden ayrılması (denatürasyon) için 90-95°C’de, eşleşme-yapışma (annealing) için 37-65°C’de ve zincir uzatılması (extension) için (genelde) 72°C’de bekletilme safhalarından meydana gelir. Farklı kademelerde uygulanan sıcaklıkların farklı farklı olması hedef DNA’nın baz içeriğine, araştırmacının kullandığı tekniğe ve kullanılan malzemeye göre değişiklik arz eder (44).

3.4.8.1. PZT ile *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Tür Seviyesinde Tiplendirilmesi

Bu çalışmada LAB gurubunun üyesi olan *Lactobacillus* cinsi bakterileri PZT yöntemi ile tür seviyesinde tiplendirmek için Tablo 4.’de verilen primerler, Primer yapışma sıcaklıkları ve MgCl₂ yoğunlukları kullanıldı.

Tablo 4. *Lactobacillus* tür seviyesinde tiplendirmek için kullanılan primerler, baz dizileri, hedef bölgeleri, primerlerin yapışma (annealing) sıcaklıkları ve PZT reaksiyonu için MgCl₂ konsantrasyonları (7).

Tür adı	Primer adı	Primerin hedef bölgesi	Primer baz dizisi	Primer yapışma sıcaklığı (°C)	MgCl ₂ yoğunluğu (mM)
<i>L. acidophilus</i>	Aci 16SI 16SII	16S gen	5'-AGCTGAACCAACAGATTAC-3' 5'-ACTACCAGGGTATCTAATCC -3'	62	1.5
<i>L. crispatus</i>	Cri 16SI 16SII	16S gen	5'-GTAATGACGTTAGGAAAGCG-3' 5'-ACTACCAGGGTATCTAATCC -3'	60	1.5
<i>L. gasseri</i>	GasI GasII	16S-23S ISR	5'-GAGTGCGAGAGCACTAAAG-3' 5'-CTATTCAAGTTGAGTTTCTCT-3'	55	2.5
<i>L. johnsonii</i>	Joh 16SI 16SII	16S gen	5'-GAGCTTGCTTAGATGATTTTA-3' 5'-ACTACCAGGGTATCTAATCC -3'	57	1.5
<i>L. plantarum</i>	Lfpr PlanII	16S-23S ISR	5'-GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT-3' 5'-TTACCTAACGGTAAATGCGA -3'	55	2.0
<i>L. casei</i>	PrI CasII	16S-23S ISR	5'-CAGACTGAAAGTCTGACGG-3' 5'-GCGATGCGAATTTCTTTTC -3'	55	2.0
<i>L. zeae</i>	Zeal ZealII	16S-23S ISR	5'-TGTTTAGTTTTGAGGGGACG-3' 5'-ATGCGATGCGAATTTCTAAATT -3'	58	2.0
<i>L. rhamnosus</i>	PrI RhaII	16S-23S ISR	5'-CAGACTGAAAGTCTGACGG-3' 5'-GCGATGCGAATTTCTATTATT -3'	58	2.0
<i>L. reuteri</i>	Lfpr Reu	16S-23S ISR	5'-GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT-3' 5'-AACACTCAAGGATTGTCTGA -3'	55	2.0
<i>L. fermentum</i>	Lfpr FermII	16S-23S ISR	5'-GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT-3' 5'-CTGATCGTAGATCAGTCAAG -3'	55	3.0
<i>L. sharpeae</i>	Shal ShalI	16S-23S ISR	5'-GATAATCATGTAAGAAACCGC-3' 5'-ATATTGTTGGTCGCGATTTCG-3'	58	1.5

3.4.8.2. PZT ile Antibiyotik Direnç Genlerinin Çoğaltılması

Bu çalışmada LAB'lernin vankomisin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol antibiyotiklerine karşı olan dirençlerinin genetik temelini araştırmak için Tablo 5'te verilen primerler kullanılmıştır.

Bu çalışmada *vanA* tipi direnci araştırmak için *Enterococcus faecium* BM4147 türünden izole edilen *vanA* gen ailesinin baz dizisi, *vanB* tipi direnci araştırmak için *Enterococcus faecalis* V583 türünden izole edilen *vanB* gen ailesinin baz dizisi kaynak alınarak tasarlanan primerler kullanıldı. Primerler ile ilgili tüm bilgiler Tablo.5 ve Tablo.6'te verilmiştir. (23, 36).

VanA ve *vanB* tipi vankomisin direncinde esas olan bölgeler *vanA* ve *vanB* gen bölgeleridir (Şekil.2) (36). Vankomisin direncini PZT gibi moleküler biyolojik yöntemlerle araştırıldığında *vanA* veya *vanB*'ye özgü primerler ile yapılan PZT sonucunda hangi primer ile ürün elde edilirse bakteri o genin ifade ettiği direnç grubuna ait geni taşıyordur. Ürün elde edilemiyorsa bakteri bu antibiyotiğe karşı dirençli değildir denir. Bu durumda bu iki gen ailesinin diğer fertlerini incelemek sonucu değiştirmez. Çünkü daha önce bulunan sonuçla tam örtüşen sonuç bulunur.

VanA ve *vanB* öbeklerinin tümüne özgü primer takımları temin edilerek (23, 36) örneklerde muhtemel bir Vankomisin direnç geni bulunursa tüm gen ailesi PZT tekniğini kullanarak araştırılmış olacaktır.

ErmB tipi direnci belirlemek için kullanılan primerler *E. faecalis*'den izole edilen Tn917 tranpozonu (M11180) kaynak alınarak tasarlanmış primerlerdir (41). Bu primerlerden *ermB*-1 (ileri primeri) Tn917 tranpozonunun 836-855. nükleotidleri arasında bulunmaktadır ve *ermB*-2 (geri primeri) Tn917 tranpozonunun 1260-1241. nükleotidleri arasında yerleşim göstermektedir. Tn917 transpozonundan elde edilen *ermB*-1 ve *ermB*-2 primerleri *Lactobacillus fermentum*'un taşıdığı plazmid kökenli *erm* gen bölgesini de özgün olarak çoğaltmaktadır (U48430). *Lactobacillus fermentum* plazmid kökenli *erm* geni *ermB*-1 ve *ermB*-2 primerleri ile 424 bazlık ürün vermektedir (41). Bu dizisi de *ermB*-1 529-549. nükleotidler, *ermB*-2 primeri ise 934-954. nükleotidler arasına yerleşmektedir (U48430). *ermA* direncini araştırmak için *S. aureus*'ta izole edilen Tn554 transpozonu esas alınmıştır (41, 45).

LAB'nde tetrasiklin direnç faktörlerini araştırmak için *Lactobacillus plantarum* 5057'dan izole edilmiş ilk plazmid olan pMD5057'nin (7) nükleik asit dizisi

kaynak alınarak *tetM* genine özgü primerler tasarlandı. Bu plazmid 10877 baz uzunluğunda, tetrasiklin direnç geni taşıyan (AF440277) bir plazmiddir (21). Bu plazmid üzerinde tetrasiklin direnç geni 7327-9246 nükleotidleri arasında yerleşen 1919 bazlık bir DNA bölgesidir. Bu genin ürünü Tetrasiklin direnç proteini *tetM* (tetracycline resistance protein *TetM*)'dir. *tetM* genini PZT tekniği ile çoğaltmak için tasarladığımız primerler pMD5057 plazmidi (AF440277) orijin alındığında *tetM*-F 7341-7363 nükleotidleri arasında *tetM*-R ise 7956-7976 nükleotidleri arasında yerleşir. Bu primerleri kullanılarak yapılan PZT'ın ürünü 635 bazlık bir DNA parçasıdır (bu çalışma).

Kloramfenikol direncini araştırmak için *Lactobacillus reuter* G4 türünden elde edilen pTC82 plazmidinin taşıdığı kloramfenikol asetiltransferaz-TC (chloramphenicol acetyltransferase-TC) gen dizilimini (U75299) kaynak olarak *cat* genine özgü pTC82f ve pTC82r primer takımının tasarımı yapıldı. pTC82f primeri 649-670 nükleotidleri arasında pTC82r primeri ise 1373-1393 nükleotidleri arasında denk gelmektedir. Bu primerleri kullanarak yapılan PZT sonucunda 744 bazlık bir DNA parçası elde edilmektedir (bu çalışma).

Kullanılan tüm primerlerde yapışma sıcaklığı üretici firmanın hesapladığı değer esas alınarak tespit edilmiştir.

3.4.9. Agaroz Jelin Hazırlanması ve PZT Ürünlerinin Görüntülenmesi

PZT sonunda elde edilen ürünlerin gözle görünür hale gelebilmesi için içerisinde etidyum bromid bulunan % 2'lik agaroz jeller kullanıldı. Hassas terazide tartılan 2 g agaroz ısıya dayanıklı bir beher içerisine alındı. Üzerine 100 ml 1xTBE tampon çözeltisi ilave edildi. Agaroz tampon çözeltisi içerisinde iyice çözülene kadar mikrodalga fırında kaynatıldı. Mikrodalga fırından alınan beher içerisindeki sıvıya soğumasına yakın (takriben 55°C sıcaklıkta) EtBr ilave edildi ve daha önceden hazırlanmış jel-döküm havuzuna döküldü. Uygun tarak yerleştirildikten sonra jel donmaya bırakıldı. Jelin donmasını takiben jel havuzunun tıkaçları çıkartılıp elektroforez tankına yerleştirilip üzerine 1xTBE tampon çözeltisi ilave edildikten sonra tarak dikkatlice çıkartıldı ve üzerlerine yükleme boyası eklenen PZT ürünleri her bir kuyucuğa ayrı ayrı konuldu.

Tablo 5. Direnç gen bölgelerinin primerlerin listesi ve baz dizileri

Primer Adı	Baz Dizisi	Kaynaklar
VANA-36F	5'-TTG CTC AGA GGA GCA TGA CG-3'	36
VANA-992R	5'-TCG GGA AGT GCA ATA CCT GC-3'	
VANH-10F	5'-ATC GGC ATT ACT GTT TAT GGA T-3'	
VANH-952R	5'-TCC TTT CAA AAT CCA AAC AGT TT-3'	
VANR-4F	5'-AGC GAT AAA ATA CTT ATT GTG GA-3'	
VANR-648R	5'-CGG ATT ATC AAT GGT GTC GTT-3'	
VANS-28F	5'-AAC GAC TAT TCC AAA CTA GAA C-3'	
VANS-1121R	5'-GCT GGA AGC TCT ACC CTA AA-3'	
VANX-49F	5'-TGG GAC GCT AAA TAT GCC AC-3'	
VANX-559R	5'-ATA CAT AGT GCC ACC ATT CG-3'	
VANY-44F	5'-ACT TAG GTT ATG ACT ACG TTA AT-3'	
VANY-909R	5'-CCT CCT TGA ATT AGT ATG TGT T-3'	
VANZ-13F	5'-TTA TCT AGA GGA TTG CTA GC-3'	
VANZ-466R	5'-AAT GGG TAC GGT AAA CGA GC-3'	
VANB-23F	5'-TTA TCT TCG GCG GTT GCT CG-3'	
VANB-1016R	5'-GCC AAT GTA ATC AGG CTG TC-3'	
vanX Fw	5'-GCG TTA AAG GGG TGA TAA GC-3'	23
vanX Rw	5'-GTC CGT GCA ACG GTT AAA AG-3'	
vanZ Fw	5'-CAC GTT AAC TAG GAC ATT GC-3'	
vanZ Rw	5'-TGT ATG AAA GAT CAG ATT GC-3'	
vanB Fw	5'-ACC CTG TCT TTG TGA AGC CGG CAC-3'	
vanB Rw	5'-CAA AAA AAG ATC AAC ACG AGC AAG CCC-3'	
vanA-F	5'-GCA AGT CAG GTG AAG ATG G-3'	
vanA-R	5'-ACC TCG CCA ACA ACT AAC GC-3'	
A1	5'-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3'	
A2	5'-GTA CAA TGC GGC CGT TA-3'	
VANA	5'-ATG AAT AGA ATA AAA GTT GCA ATA C-3'	Bu çalışma
VANA1	5'-CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT-3'	
cat-TC pTC82 Fw	5'-CAT ATC AAA TGA ACT TTA ATA -3'	Bu çalışma
cat-TC pTC82 Rw	5'-CGT TTT GTG AAG TAG TAC ACT-3'	
Tn554-2	5'-TCA AAG CCT GTC GGA ATT GG-3'	41
Tn554-1	5'-AAG CGG TAA ACC CCT CTG AG-3'	
ermB-1	5'-CAT TTA ACG ACG AAA CTG GC-3'	
ermB-2	5'-GGA ACA TCT GTG GTA TGG CG-3'	
ermC-1	5'-ATC TTT GAA ATC GGC TCA GG-3'	
ermC-2	5'-CAA ACC CGT ATT CCA CGA TT-3'	
TetM-F	5'-TAT TGG AGT TTT AGC TCA TGT TG-3'	Bu çalışma
TetM-R	5'-TAA ACA GGG AAC AGG GAA CAA-3'	
erm pTG-Fw	5'-CGA TAC CGT TTA CGA AAT TGG-3'	
erm pTG-Rw	5'-TCC TCC CGT TAA ATA ATA GAT AAC-3'	
ermGT(T) Fw	5'-CAT AGG AGT GGG TTA TAA TGA A-3'	
ermGT(T) Rw	5'-CAG TTT ATG CAC CCC TTA AC-3'	

Tablo 6. Antibiyotiklere ait direnç gen bölgeleri, bu bölgelere özgü primerler, PZT ürün büyüklüğü ve şartları

Antibiyotikler	gen	Primer türü	Primer Adı	PZT Ürün Büyüklüğü	PZT Karışımı ve şartları
Vankomisin	VanA	İleri Primer Geri Primer	VANA-36F VANA-992R	957	Tablo 7
	VanH	İleri Primer Geri Primer	VANH-10F VANH-952R	943	Tablo 7
	VanR	İleri Primer Geri Primer	VANR-4F VANR-648R	645	Tablo 7
	VanS	İleri Primer Geri Primer	VANS-28F VANS-1121R	1094	Tablo 7
	VanX	İleri Primer Geri Primer	VANX-49F VANX-559R	511	Tablo 7
	VanY	İleri Primer Geri Primer	VANY-44F VANY-909R	866	Tablo 7
	VanZ	İleri Primer Geri Primer	VANZ-13F VANZ-466R	454	Tablo 7
	VanB	İleri Primer Geri Primer	VANB-23F VANB-1016R	994	Tablo 6
	VanX	İleri Primer Geri Primer	vanX Fw vanX Rw	649	Tablo 7
	VanZ	İleri Primer Geri Primer	vanZ Fw vanZ Rw	586	Tablo 7
	VanB	İleri Primer Geri Primer	vanB Fw vanB Rw	390	Tablo 7
	VanA	İleri Primer Geri Primer	vanA-F vanA-R	393	Tablo 7
	VanA	İleri Primer Geri Primer	A1 A2	732	Tablo 7
	VanA	İleri Primer Geri Primer	VANA VANA1	1028	Tablo 7
Eritromisin	ermA	İleri Primer Geri Primer	Tn554-2 Tn554-1	440	Tablo 11
	ermB	İleri Primer Geri Primer	ermB-1 ermB-2	424	Tablo 8
	ermC	İleri Primer Geri Primer	ermC-1 ermC-2	294	Tablo 8
	erm	İleri Primer Geri Primer	erm pTG-Fw erm pTG-Rw	644	Tablo 7
	ermGT	İleri Primer Geri Primer	ermGT(T) Fw ermGT(T) Rw	761 veya 772	Tablo 7
Tetrasiklin	tetM	İleri Primer Geri Primer	TetM-F TetM-R	635	Tablo 9
Kloramfenikol	cat-TC	İleri Primer Geri Primer	cat-TC pTC82 Fw cat-TC pTC82 Rw	744	Tablo 8

Tablo 7. VANA, VANH, VANR, VANS, VANX, VANY, VANZ, VANB, vanX, vanZ, vanB, vanA, ,VANA gen bölgeleri için PZT karışımı ve şartları (36)

PZT Karışımı		PZT şartları
Distile Su	35,4 µl	94 C° → 3 dakika
10XTampon	5,0 µl	94 C° → 1 dakika
MgCl ₂	3,0 µl	56 C° → 1 dakika
dNTPs	1,5 µl	72 C° → 1 dakika
Primer (F)	1,0 µl	72 C° → 6 dakika
Primer (R)	1,0 µl	
Taq DNA polimeraz	0,1 µl	
DNA (stok)	3,0 µl	

Tablo 8. *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *ermGT* gen bölgeleri için PZT karışımı ve şartları (41)

PZT Karışımı		PZT şartları
Distile Su	30,5 µl	94 C° → 2 dakika
10XTampon	5,0 µl	94 C° → 1 dakika
MgCl ₂	3,0 µl	56 C° → 40 saniye
dNTPs	8,0 µl	72 C° → 2 dakika
Primer (F)	1,0 µl	72 C° → 10 dakika
Primer (R)	1,0 µl	
Taq DNA polimeraz	0,5 µl	
DNA (stok)	1,5 µl	

3.4.10. Elektroforez Koşulları

İçerisinde 1xTBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilen jele örneklerin yüklenmesi yapıldıktan sonra aşağıdaki şartlar uygulandı: Elektroforez güç kaynağının 80 volta sabitlendikten sonra, 1 saat yürütüldü. Elektroforez sonlandırıldıktan sonra jel görüntüleme sisteminde elde edilen resimler değerlendirildiler.

Y.C. YITKİLERİ
BİLGİLERİ
BİLGİLERİ

Tablo 9. *cat*-TC gen bölgesi için PZT karışımı ve şartları (bu çalışma)

PZT Karışımı		PZT şartları
Distile Su	32,6 µl	94 C ^o → 2 dakika
10XTampon	5,0 µl	94 C ^o → 1 dakika
MgCl ₂	4,0 µl	52 C ^o → 45 saniye
dNTPs	5,0 µl	72 C ^o → 1 dakika
Primer (F)	1,0 µl	72 C ^o → 10 dakika
Primer (R)	1,0 µl	
Taq DNA polimeraz	0,4 µl	
DNA (stok)	1,0 µl	

Tablo 10. *tetM* gen bölgesi için PZT karışımı ve şartları (bu çalışma)

PZT Karışımı		PZT şartları
Distile Su	32,4 µl	94 C ^o → 3 dakika
10XTampon	5,0 µl	94 C ^o → 1 dakika
MgCl ₂	4,0 µl	56 C ^o → 1 dakika
dNTPs	4,0 µl	72 C ^o → 1 dakika
Primer (F)	1,0 µl	72 C ^o → 6 dakika
Primer (R)	1,0 µl	
Taq DNA polimeraz	0,4 µl	
DNA (stok)	1,0 µl	

Tablo 11. *ermA*, *ermB*, *ermC* gen bölgeleri için PZT karışımı ve şartları

PZT Karışımı		PZT şartları
Distile Su	34,6 µl	94 C ^o → 2 dakika
10XTampon	5,0 µl	94 C ^o → 1 dakika
MgCl ₂	2,0 µl	58 C ^o → 45 saniye
dNTPs	4,0 µl	72 C ^o → 1 dakika
Primer (F)	1,0 µl	72 C ^o → 10 dakika
Primer (R)	1,0 µl	
Taq DNA polimeraz	0,4 µl	
DNA (stok)	1,0 µl	

4. BULGULAR

4.1. Bakterilerin Üretilmesi

LAB'lerinin vankomisin, eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol olmak üzere toplam dört antibiyotiğe karşı olan direnç davranışlarını araştırmak için toplanan 197 örnek M.R.S. (de Man Rogosa Sharpe) sıvı besiyerinde (Broth) üretildi. Örnekten 2 tanesinde normal inkübasyon sürelerinin dışına çıkılmasına rağmen üreme gözlenmedi. Bu iki örnek ağız kökenliydi ve çalışmadan çıkarıldı.

4.2. Morfolojik Analiz

Morfolojik analiz için tüm örnekler Gram Boyamaya tabi tutulduktan sonra mikroskop ile 10 X 100 büyütmede incelendi. Sahanın mor renkli ikili, üçlü kısmen zincir şeklindeki basiller ve koklardan oluştuğu gözlemlendi.

4.3. Örneklerde *Lactobacillus* Türlerinin Dağılımı

Bu çalışmada kullanılan 193 örnekten elde edilmiş tek koloni bakteri örnekleri ve 2 tane kıyas için kullanılan tür Tablo 4.'de verilen *Lactobacillus* türlerine has primerler kullanılarak tiplendirme yapıldı. Sonuçlar Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. İnsan ve süt ürünü kökenli örneklerde *Lactobacillus* türlerinin dağılımı.

Bakteri türleri	İnsan kökenli			Süt ürünü			
	Ağız	Dışkı	Vajina	Peynir (ticari)	Peynir (otantik)	Yoğurt	Diğer süt ürünleri
<i>Lb. crispatus</i>	5	17	18	0	8	0	0
<i>Lb. gasseri</i>	4	15	14	0	8	0	0
<i>Lb. plantarum</i>	8	11	10	1	5	1	0
<i>Lb. johnsonii</i>	4	5	4	0	0	0	0
<i>Lb. fermentum</i>	4	11	11	0	0	0	0
<i>Lb. acidophilus</i>	9	0	4	0	5	0	0
<i>Lb. rhamnosus</i>	0	13	20	0	0	0	0
<i>Lb. casei</i>	1	0	0	1	3	1	0
<i>Lb. bulgaricus</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lb. sharpeae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lb. zeae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lb. reuteri</i>	0	0	0	0	0	0	0

4.4. Vankomisin Direnci

Örneklerde vankomisin antibiyotiğine karşı direnç geliştirilmesinden sorumlu Vankomisin A (*vanA*) ve Vankomisin B (*vanB*) gen ailesine ait gen bölgeleri PZT tekniği ile tarandı.

4.4.1. *vanA* Tipi Direnç

vanA tipi direnç için *vanA* gen ailesinden *vanA*, *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX* ve *vanZ* genlerinin varlığı PZT ile araştırıldı. 111 örnekten hiç birinde *vanA*, *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX* ve *vanZ* genlerinin varlığına rastlanamadı (Tablo.12)

4.4.2. *vanB* Tipi Direnç

vanB tipi direnç için *vanB* gen ailesi genlerinin varlığı PZT ile araştırıldı. 111 örnekten hiç birinde *vanB* gen ailesine ait her hangi bir genin varlığına rastlanamadı (Tablo.12).

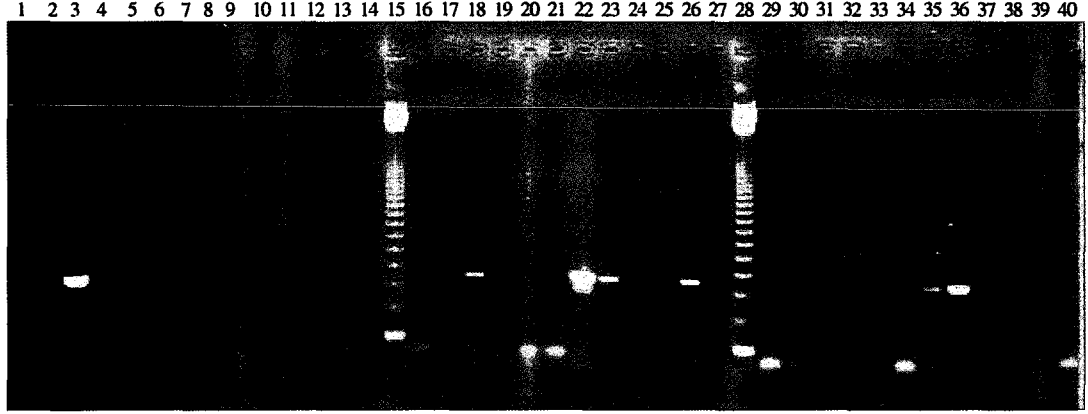
4.5. Eritromisin Direnci

4.5.1. *ermA* Transpozon Geninin Araştırılması

111 örnekte Tn554-1 Tn554-2 primer takımı kullanılarak *ermA* transpozon geni PZT ile araştırıldı. Örneklerin hiçbirinde bu gen bölgesi çoğaltılamadı (Tablo.12).

4.5.2. *ermB* Geninin Araştırılması

ermB gen bölgesinin varlığı *ermB*-1 *ermB*-2 primer takımı kullanılarak PZT ile 111 örnekte araştırıldı. Toplam 87 örnekte *ermB* gen bölgesi varlığı saptandı. *ermB* geni taşıyan örneklerden 21'i vajinal kökenli, 32'si dışkı kökenli, 8'i ağız kökenli olmak üzere toplam 61 tanesi insan kökenli örneklerdir. 13 otantik peynir, 2 ticari peynir, 1 yoğurt toplam 16 süt ürünü kökenli örnekte *ermB* gen bölgesi saptandı. tereyağı, çökelek, kıyma gibi örneğinde ve referans türlerde *ermB* genine rastlanamamıştır (Tablo. 12). *ermB* direnç faktörü araştırılan örneklerde direncin dağılım oranı; ağız kökenli örneklerde % 57, dışkı kökenli örneklerde % 100, vajinal örneklerde % 58, otantik peynir % 26, ticari peynir % 10, yoğurt % 10, toplam 111 süt ürünü kökenli örnekten 16'sında (% 14) *ermB* gen bölgesi saptandı (Tablo. 13).



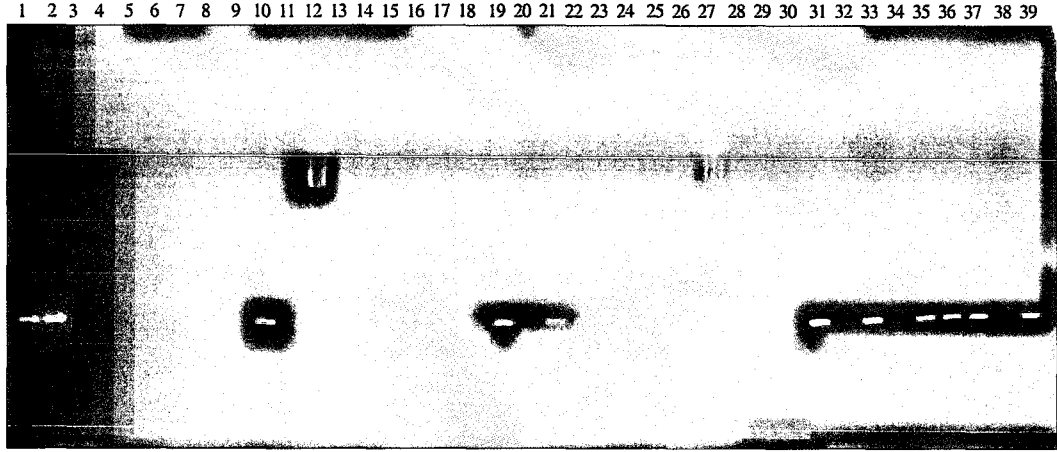
Şekil 5. *ermB*-1 ve *ermB*-2 primerleri kullanılarak yapılan PZT sonucu. 3, 18, 22, 23, 26, 31, 35, 36 numaralı örnekler 424 bazlık PZT ürünleri 15, 38 numaralı örnekler de ise 123 bazlık DNA baz cetveli yer almaktadır.

4.5.3. *ermC* Geninin Araştırılması

Örneklerin tamamı *ermC* geni *ermC*-1 *ermC*-2 primer takımı kullanılarak PZT ile araştırıldı ve hiçbirinde bu gene rastlanılmadı (Tablo.12)

4.6. Tetrasiklin Direnç Geninin Araştırılması

tetM gen bölgesi bu bölgeye özgün primer takımı kullanılarak PZT tekniği ile araştırıldı. Numunelerin 72 tanesinde TetM gen bölgesine rastlandı (Şekil-6). *tetM* geni çoğaltılan örneklerden 23 (% 64) tanesi vajinal, 30 (% 94) tanesi dışkı, 9 (% 64) tanesi ağız kökenli olmak üzere toplam 62 (% 75) tanesi insan kaynaklı örneklerdir. Süt ürünü kökenli örneklerden 1 (% 5) ticari peynir, 8 (% 16) otantik peynir, 1 (% 1) yoğurt, toplam 10 (% 9) örnekte *tetM* direnç gen bölgesi çoğaltıldı. Referans türlerde, ham süt, tereyağı, çökelek ve kıymız örneklerinde bu gen bölgesi çoğaltılamadı. Toplamda örneklerin 55'inde (% 28) *tetM* genine rastlanıldı (Tablo.12 ve 13).



Şekil 6. *tetM*-F ve *tetM*-R primerleri kullanılarak yapılan PZT sonuçları. 1, 2, 10, 19, 21, 22, 25, 31, 33, 35, 36, 37, 39 numaralı örneklerde 635 bazlık *tetM* geni gözlemlenmektedir; 12 ve 27 numaralı örnekler 123 bazlık DNA parça cetvelidir.

4.7. Kloramfenikol Direnç Geninin Araştırılması

Kloramfenikol asetiltransferaz-TC (chloramphenicol acetyltransferase-TC) geni cat-TC pTC82f ve cat-TC pTC82r primer takımı kullanılarak PZT tekniğiyle araştırıldı. 111 örneğin hiçbirinde bu gen bölgesine rastlanmadı (Tablo.12).

Tablo 13. Direnç faktörü araştırılan antibiyotikler ve örneklerle dağılımı.

Direnç tipi	İnsan kökenli			Süt ürünü				
	Ağız	Dışkı	Vajina	Peynir (ticari)	Peynir (otantik)	Yoğurt	Tereyağı	Diğer süt ürünleri
Örnek sayısı	14	32	36	20	50	10	15	16
<i>ermA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ermB</i>	8	32	21	2	13	1	0	0
<i>ermC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>tetM</i>	9	30	23	1	8	1	0	0
<i>vanAH</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>vanB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
cat-TC	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ermB/tetM</i>	6	30	15	1	5	1	0	0

Tablo 14. Direnç faktörü araştırılan antibiyotiklerin örneklere dağılım yüzdesi.

Direnç tipi	İnsan kökenli			Süt ürünü				
	Ağız	Dışkı	Vajina	Peynir (ticari)	Peynir (otantik)	Yoğurt	Tereyağı	Diğer süt ürünleri
Örnek sayısı	14	32	36	20	50	10	15	16
<i>ermA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ermB</i>	57	100	58	10	26	10	0	0
<i>ermC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>tetM</i>	64	94	64	5	16	1	0	0
<i>vanAH</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>vanB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>cat-TC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ermB/tetM</i>	42	94	41	5	10	1	0	0

5. TARTIŞMA

Penisilinin ilk keşfinden bu yana antibiyotiklerin tıp ve veterinerlik alanındaki yaygın kullanımı beraberinde giderek artan bir “antibiyotiğe karşı direnç” gelişimine de sebep olmuştur. Antibiyotiklere direncin boyutları, insan sağlığı açısından zararlı olan hastalık etkenlerinin (patojen) zararsız bakterilerle aynı ortamı paylaştıklarından artık zararsız bakterileri de kapsamaktadır, zira paylaşılan ortam ister istemez direnç geni aktarımı için uygun hale gelmiştir. Bu sebeple gıdalarımızla aldığımız sindirim ve ürogenital sisteminin zararsız hatta yararlı bütün bakteri gruplarının da ciddi bir şekilde izlenmesi, gözlenmesi, ve gerektiğinde önlem alınması için üzerinde çalışılması göz ardı edilmemesi gereken bir durumdur. Gıdalarla aldığımız ve sindirim sistemi bakteri topluluğunun % 1’ini oluşturan ve sağlığınıza sağladığı yararlardan dolayı en fazla kullanılan bakteri ailesi (genera) olan laktik asit bakterileri ve bunların içinde en fazla çalışılan *Lactobacillus* cinsi bakterilerin antibiyotik direnç/duyarlılık davranışlarının incelenmesi bu bakımdan önemlidir. LAB’in antibiyotik duyarlılık/direnç davranışları cins, tür ve alt tür seviyelerinde yapı ve genetik içerik (plazmid) açısından farklılık olduğundan farklı farklıdır (Tablo.3) (12,35) ve farklı türler arasında aynı antibiyotiğe karşı duyarlılık da birkaç kat farklılık gösterir (12,13,17). LAB’in antibiyotiklere karşı dirençlerini tespit etmek için mikrobiyolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (12, 14). Moleküler yöntemler aynı zamanda direnç yaygınlığının ve aktarımın genetik altyapısını da ortaya koyması bakımından son yıllarda giderek sık kullanılmakta ve gerek ilaç endüstrisi, gerek bakteri gelişimi (bacterial evolution) ve genetik potansiyeli (microbial genetics), gerek bu değişimdeki çevre etkisi (microbial ecology), ve gerekse de hekimlik yönünden oldukça büyük önem taşımaktadır.

Süt ürünlerinde ve insanda bulunan LAB’nin antibiyotik direnç kökeni iki şekilde düşünülebilir. Antibiyotikler bulunuşunu takiben bütün dünyada insanlarda giderek artan bir yoğunlukta kullanılmaya başlanması ile eş zamanlı olarak süt üreten hayvanların yemlerine de koruyucu olarak katılmaktadır (16). Bu şekilde bir antibiyotik kullanımı hayvan ve insanlarda bulunan bakterilerin özellikle de zoonotik olarak adlandırılan hayvandan insana yada insandan hayvana bulaşabilen bakteriler üzerinde iki yönlü bir baskıya sebep olmuştur (double pressure). Bu çift yönlü baskı bakteriler üzerinde çift yönlü elemeye (double selection) sebep olarak antibiyotiklere çok fazla dirençli bakterilerin gelişimi ile sonuçlanmıştır. Son yıllarda tüberkülozun artışı ve tedavi edilemeyen vakaların sıklığı buna en güzel örnektir. Bu

bakımdan bir taraftan insan florasındaki dirençli bakteriler araştırılırken diğer taraftan hayvanların bakteri florasının da araştırılması gerekir. Süt üretiminde kullanılan bu hayvanlarda gelişen dirençli bakterilerin insana geçişi süt ürünleri ve et gibi hayvan kökenli yiyeceklerin üretimi esnasında yada hazırlama esnasında temiz olan sütün, personelde bulunan dirençli bakterilerle bulaştırılması ile olur (16). İkinci şekilde bulaşmaya en çarpıcı örnek Gaziantep ve yöresinde üretilen bazı peynirlerin yapımında LAB maya kültürlerinin kullanılmayıp, enzimatik yöntemler kullanılmasına rağmen üründe LAB'ın bulunmasıdır. Sonradan meydana gelen bu bulaşma sonucunda süt ürünlerine geçen LAB yukarda izah edilen direnç genini taşıyorlarsa insana bulaştırması da bu direnç genini insanda bulunduğu ortamda bir başka bakteri türüne aktarabilmesi de potansiyel olarak muhtemeldir.

Bu çalışmada süt ürünlerinde mayalanmayı sağlayan laktik asit bakterilerinden olan ve insan mide-bağırsak ve ürogenital sisteminin de doğal bir elemanı olan *Lactobacillus* grubu bakterilerinin *van*, *tet-M*, *cat-TC*, ve *erm* direnç genlerini taşıyıp taşımadıkları ve hangi direnç geninin hangi bakteride daha sık görüldüğü ve bunun yaygınlığının genetik alt yapısının ne olduğu ve ne manaya geldiği araştırılmıştır. Süt ürünlerindeki laktobasillerin insandaki yolculuğu sırasında direnç aktarımı yada kazanımı geçiriyorlar mı sorusuna aynı bakteri alt türlerine yönelik primer takımları kullanılarak farklı örneklerde aynı bakteri alt türleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre aynı tip bakterilere hem süt ürünlerinde, hem ağız, hem dışkı, hem de vajina da rastlanması ve bu tiplerin süt ve ağızda bulunanları çoğunluğunun aynı direnç genini taşımasına rağmen dışkı ve vajinada bulunanların çoğunluğunun bu geni taşıması aynı tip bakterilerin bu gene sahip olduklarını yada olabileceklerini göstermektedir. Her ne kadar bu tiplerin aynı primerle belirlenmesine rağmen bunların aynı bakteri tipleri olduğu söylenemezse de aynı grup içinde yer aldıklarını rahatlıkla söylenebilir. Bu durumda bile ilgili genlerin birden fazla türde bulunma yada aktarılabilme potansiyelinin olduğu ispatlanmış olur.

Van gen öbeğine özgü primerle yapılan PZT sonucunda hiçbir örnekte ürün elde edilememesi hem süt ürünlerinde hem insan kökenli örneklerde hem de standartlarda *Enterococcus*'lara özgü vankomisin direnç geni bulunmadığını göstermektedir. Hayvan ve insan kökenli LAB'den elde edilen ve konjugasyonla aktarılabilen genetik elemanlarla patojenik *Streptococcus* ve *Enterococcus* türlerinden elde edilen genetik elemanlar arasında yapı olarak büyük benzerlik

bulunmaktadır (16). Bu benzerlik LAB'in antibiyotik direnç genlerini patojen bakterilerden alabileceğini ve diğer bakterilere de aktarabilme potansiyeline sahip olduğunu gösterir. Bu durumu destekleyen diğer bir örnek ise bir peynir çeşidinden (yumuşak peynir) izole edilmiş *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* türünden elde edilen bir plazmidin direnç genleri taşıdığının belirlenmesidir. Bu plazmidde daha önce *Listeria monocytogenes* türünde tespit edilen *tetS* direnç genine, *Staphylococcus aureus* türünde bulunan *cat* ve *str* direnç genlerine raslanmıştır (16). Vankomisin direnci özellikle *Enterococcus* kökenlidir (35). Her ne kadar Leclercq ve ark. (1988) (59) yaptığı çalışmalarda *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'un normal olarak vankomisine karşı duyarlı olduklarını gösterecek de vankomisine dirençli tipleri 1986 yılından itibaren ortaya çıkmaya başlamıştır (61).

Lactobacillus cinsi üzerinde yapılan PZT çalışmaları bu bakterilerin *Enterococcus* kökenli van direnç genine sahip olmadıklarını (20,36) buna karşılık bu antibiyotiğin bulunduğu ortamda büyüebilmeleri ise bu bakterilerin bu antibiyotiğe karşı doğal olarak (intrinsic) yapıdan dolayı bir dirence sahip olduklarını göstermektedir. Şu ana kadar *Enterococcus* kökenli vankomisin direncinin *Lactobacillus* cinsi bakterilerine aktarılabildiğine dair herhangi bir çalışma da yoktur. Aktarılma söz konusu olmadığına göre bu iki bakteri cinsindeki direnç mekanizması da farklı olmalıdır.

Katla ve arkadaşları (2001) *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus*'larda vankomisin direncini e-test yöntemiyle araştırarak bu türlerin tamamının vankomisine karşı doğal bir dirence sahip olduğunu göstermiştir. Zarazaga ve ark. (1999)'da *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, ve *Pediococcus* cinsleri üzerinde agarda seyreltme (agar dilution) yöntemiyle yaptıkları çalışmada Katla ve arkadaşlarınıninkine benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bizim çalışmalarımızın sonuçları da bu iki araştırmacının bulgularını desteklemektedir. Şu ana kadar moleküler yöntemler (PZT yada DNA-DNA hibridizasyonu) kullanarak *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinslerinde *Enterococcus* kökenli vankomisin direnç geninin varlığını ortaya koyan herhangi bir çalışma yoktur. Vankomisin direncinin tespiti uygun antibiyotik seçimi ve etkin tedavi için çok önemlidir. Bu aynı zamanda, vankomisin direncinin yaygınlığının belirlenmesi ve yayılmasının önlenmesi için direnç sağlayan genleri taşıyan bakterilerin ve bu genleri aktarabilme yeteneklerinin belirlenmesi anlamına gelir. Vankomisin klinik tıpta kullanılan en etkili antibiyotiklerden biri olmasına karşılık son yıllarda artan

ciddi bir direnç gelişimiyle karşı karşıyadır (15). Bu yayılımın en önemli sebebi direnç genlerinin bakteriler arasında yatay yada dikey olarak plazmid veya transpozonlarla aktarılmasıdır. İnsan sağlığı için vazgeçilmez önemi olan ve gündelik hayatta çok sık olarak tükettiğimiz süt ve süt ürünleri içerisinde bulunan bakteriler insan florasının vazgeçilmez elemanlarıdır. *Enterococcus* cinsi bakteriler LAB ailesi içinde yer almasından dolayı bu cins içinde yer alan türlerin taşıdığı direnç faktörlerini yakın filogenetik akrabalığı olan LAB'ne aktarabilme imkanına sahiptirler. Bu durumda süt ve süt ürünü kökenli LAB'nin vankomisin direnç genini taşıyor olma ihtimali ciddi olarak üzerinde durulması gereken bir durum olarak ortaya çıkar. Çünkü vankomisin direnç genleri taşıyan *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* türleri nadir de olsa hijyenik şartlara dikkat edilmeden üretilen süt ürünlerine bulaşmaktadır (16). Enterokoklardan diğer LAB türlerine (özellikle *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus*) plazmid aracılığıyla direnç geninin aktarılabilirdiği deneylerle gösterilmiş (16) olmasına rağmen mikrobiyal-genetik yöntemlerle doğal ortamlardan yapılan direnç araştırmalarında henüz *van* geninin aktarıldığına dair bir belge bulunmamaktadır. Aktarılma olsa dahi LAB'nin yapı olarak zaten vankomisine dirençli olduğundan evolüsyon açısından ihtiyaç duyulmayan genin varlığının pratik bir değeri de bulunmaz (12, 13). Bu sonuç en azından çalıştığımız *Lactobacillus* gurubunun *van* geni açısından potansiyel bir nakil aracı olmayacağını gösterir.

ErmA tipi direnç Tn554 transpozonuyla taşınan ve *S. aureus*'ta gözlenen dirençtir. Tn554-1 ve Tn554-2 primerleri kullanılarak yapılan PZT sonucunda 195 örneğin hiçbirinde bu gen bölgesine rastlanılmaması söz konusu örneklerde *ermA* geninin bulunmadığını göstermektedir. Önceki yapılan çalışmalar da laktobasillerde bu genin bulunmadığını göstermektedir (12).

ErmB tipi direnç geni plazmidlerde bulunmakta ve transpozonlar tarafından taşınmaktadır (39). *ermB* geni bu ailenin II gurubunu (*ermB* grubu) meydana getirir. *Lactobacillus* türlerinde ve diğer LAB'nde gözlemlenen *erm* direnci genellikle *ermB* tipindedir (41). *Lactobacillus fermentum*'dan izole edilen pLEM3 plazmidi (U48430), *S. lentis*'den izole edilen pSES20 plazmidi (U35228), *E. faecalis*'ten elde edilen bir kriptik plasmid (U86375), *E. faecalis*'den izole edilen Tn917 transpozonu (M11180) ve pAD2 plazmidi (M36722) *ermB* direnç geni taşırlar ve II grubun üyeleridirler (12).

Bu çalışmada *ermB* tipi direnci belirlemek için kullanılan primerler *E. faecalis*'den izole edilen Tn917 tranpozonu (M11180) kaynak alınarak tasarlanmıştır. *ermB*-1 primeri tranpozonunun 836-855. nükleotidleri arasında, *ermB*-2 primeri ise 1260-1241 nükleotidleri arasında yerleşir. Bu primerler aynı zamanda *Lactobacillus fermentum*'un taşıdığı plazmidde yer alan *erm* gen bölgesini de özgün olarak çoğaltabilmekte ve 424 bazlık bir ürün vermektedirler (U48430). Bu primerler diğer LAB türlerinin taşıdığı *ermB* genlerinin tespit edilmesinde de kullanılmıştır (41). Bu çalışmada 195 örneğin 76'sında 424 bazlık bandların elde edilmesi (Tablo. 11) ve standart olarak kullanılan iki suşun PZT'lerinin ürün vermemesi kullanılan primerlerin özgünlüğünü ortaya koyması bakımından yararlı olmuştur.

ErmC geni *erm* gen ailesi içinde VI. sınıf (*ermC* grubu) dahildir. Bu tip direnç *Staphylococcus* ve *Bacillus* cinslerinin bazı türlerinde bulunur ve plazmid üzerinde taşınır. *ermC* tipi direnç faktörü taşıyan bakterilerden hiçbiri normal şartlarda süt ürünlerinde bulunmazlar (12). *ermC*-1 ve *ermC*-2 primerleri pE194 plazmidi (J01755, J01756, J01757, J01758) kaynak alınarak tasarlanmıştır (8). *ermC*-1 2639-2620 nükleotidleri arasında *ermC*-2 ise 2345-2364 nükleotidleri arasında yerleşir. Bu primerler kullanılarak yapılan PZT'lar sonucunda beklenen 294 bazlık ürün hiçbir örnekten elde edilememiştir.

Katla ve arkadaşları (2001) çalıştıkları 189 LAB örneğinin çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını e-test yöntemiyle araştırmışlar ve MIC ($\mu\text{g/ml}$) değerlerini tespit etmişlerdir (13). Bu çalışmaya göre eritromisinin *Lactobacillus*'larda 0,125-1 $\mu\text{g/ml}$ MIC aralığına göre % 50 MIC değeri 0,25 $\mu\text{g/ml}$ ve % 90 MIC değeri 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. *Lactococcus*'larda 0,016-0,5 $\mu\text{g/ml}$ MIC aralığına göre % 50 MIC değeri 0,094 $\mu\text{g/ml}$ ve % 90 MIC değeri 0,25 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. *Leuconostoc*'lar 0,016-0,75 $\mu\text{g/ml}$ MIC aralığına göre % 50 MIC değeri 0,094 $\mu\text{g/ml}$ ve % 90 MIC değeri 0,19 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. *Streptococcus*'da 0,016-0,5 $\mu\text{g/ml}$ MIC aralığına göre % 50 MIC değeri 0,016 $\mu\text{g/ml}$ ve % 90 MIC değeri 0,023 $\mu\text{g/ml}$ 'dir (13). Zarazaga ve arkadaşları da (1999) agarda seyreltme tekniğiyle *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türlerinde eritromisin MIC değerini araştırmış 0,03-1,024 $\mu\text{g/ml}$ MIC aralığına göre % 50 MIC değeri 0,06 $\mu\text{g/ml}$ % 90 MIC değeri 0,125 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Bu iki çalışmaya ait MIC değerlerindeki farklılık araştırmacıların yöntem farklılığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca Zarazaga ve arkadaşları (1999) *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis*'in çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdiği MIC

değerlerini de araştırmış ve bu türlerin hepsinde Eritromisin MIC değerlerini normal sınırlar içinde olduğunu göstermişlerdir. Buna karşılık Danielsen ve Wind (2003) e-test yöntemiyle bazı *Lactobacillus* türlerinde yaptıkları çalışmada bu türlerin (hatta aynı türün bireylerinin) bazılarının eritromisine karşı dirençli, bazılarının duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmaların yanı sıra süt ürünlerinde başlangıç kültürü olarak kullanılan birçok LAB türünde moleküler yöntemler kullanarak eritromisin direnci araştırılmış ve özellikle *Lactobacillus*'larda eritromisin direncinden sorumlu plazmidler tanımlanmıştır. Buna Fons ve arkadaşlarının (1997) *Lactobacillus fermentum*'da eritromisin direnç genini taşıyan pLEM3 plazmidini tanımlamaları iyi bir örnektir. *Lactobacillus fermentum* bir çok süt ürününde başlangıç kültürü olarak kullanılan bir bakteridir. Çalışmamızda ticari peynirlerde % 10'nun, yöresel peynirlerin % 26'sının, yoğurt örneklerinin % 10'unun *ermB* geni taşıdığını belirledik. Bu sonuçlar Katla ve arkadaşları (2001) ile Zarazaga ve arkadaşlarının (1999) sonuçları ile kısmen uyum içerisinde iken Danielsen ve Wind (2003)'ün çalışması ile aynı doğrultudadır. Bu çalışılan yöntemin farklı olduğundan kaynaklanmaktadır. Genin ifadesi temel alınması yerine genom içinde genin var olması temel alınır ise bu üç araştırmacının da sonuçlarının bizim sonuçlarımızla uyumlu olduğu görülmektedir. Ülkemizde LAB'nin antibiyotik direnç/duyarlılık davranışlarıyla ilgili henüz bir çalışma yoktur. Bu bakımdan bu çalışma bu açığı kapatmayı hedeflemektedir.

Bu çalışma örnek toplam sayısının % 40'ında *ermB* direnç geninin bulunduğunu göstermektedir (Tablo.12). Fakat bu oran süt ürünlerinde % 16'dır. Bu oran günlük hayatımızda çok sık olarak tükettiğimiz süt ürünlerinin çeşidi ve miktarı düşünüldüğünde antibiyotik direnç geni yayılımı açısından oldukça yüksektir. Süt ürünü kökenli örnekler incelendiğinde, örnek sayısı istatistiki olarak önem arz etmeyecek derecede az olmasına rağmen ticari peynirlerin % 10'u, yöresel peynirlerin % 26'sı, yoğurt örneklerinin % 10'u *ermB* geni taşıdığını göstermektedir ki bu da bu konuda önlem alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Çiğ süt ve diğer süt ürünlerinde *ermB* direnç genine hiç rastlanılmaması bu araştırmanın esas önemini gösteren ilginç bir noktadır. Bu sonuç söz konusu peynir örneklerinin ya yapımında kullanılan starter kültür örneklerinin bulaşık olmadığını ama süttten yapılan peynir, yoğurt, çökelek gibi ürünlerin yapılış aşamasında bulaşmanın gerçekleşebileceğini göstermektedir. Ticari peynir üretimi yapan firmaların süt temin ettikleri hayvanların sahiplerinin hayvanlarını antibiyotik katkılı yemlerle beslemiş olabilecekleri ihtimali

Türkiye şartlarında uzak bir ihtimaldir zira bu tür bir besleme ek maliyet getirir ki bu da çiftçilerin bu ekonomik şartlarda bu tür katkı maddesine kolaylıkla erişemeyeceği sonucunu doğurmaktadır. Bu durumda esas bulaşma yada kirlenme işlenme sırasında gerçekleşmektedir denilebilir. *ermB* direncinin insan kökenli örneklerdeki dağılımının süt ürünlerindeki dağılıma göre çok daha fazla ve tehlikeli boyutlarda olması da bu görüşümüzü doğrular mahiyettedir. Ağız örneklerinin % 57'sinde, dışkı örneklerinin tamamında ve vajinal örneklerin % 58'inde *ermB* direnç geni bulunmuştur (Tablo.13). Dikkat edileceği gibi direnç oranı süt ürünlerinden insana gidildikçe artmaktadır. Burada ağız örneklerinin direnç oranları yanıltıcı olabilir. Çünkü ağız florası, alınan gıdalara ve sosyal alışkanlıklara bağlı olarak anlık değişim gösterebilen bir yapıya sahiptir. Fakat dışkı ve vajina örneklerinde bu sayının fazla oluşu hem köken itibarı ile bu genin dışkıdan geldiğini yada bulaşabileceğini hem de bakteriler arasında direnç geni aktarımının yani başka bir deyişle LAB'nin direnç geni kazanmasının en açık ispatı süt ürünleri, dışkı ve vajina kökenli örneklerdeki direnç oranındaki bu açık farklılıktır. Süt ürünlerinde *ermB* dirençlilik oranı % 16 iken bu oran vajina örneklerinde % 58, dışkı örneklerinde % 100'dür (Tablo.13). Örnek sayısının azlığından dolayı bu değerler yanıltıcı olarak kabul edilse dahi oranların farklılığı bunun süt bakterilerinin bu genleri mide-bağırsak sistemi içinde edindiğini açık olarak göstermektedir. Zira aynı 16S-23S genler arası (intergenic region) bölgeye özgün primerler hem süt ürünlerinde hem de insan kökenli örneklerde kullanıldığından elde edilen sonuçlar bu bakterilerin aynı yada çok yakın akraba bakteriler olabileceğini göstermektedir. Bu da bulaşmayı kendi başına doğrular mahiyette bir sonuçtur. Çalışma sonuçlarına göre elde edilen diğer bir ilginç nokta da *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* gibi genel olarak sindirim sisteminde yerleşim gösteren ve *erm* geni taşıyan plazmidleri taşıdığı çalışmalarla gösterilmiş bir bakteri olmasına rağmen (40) dışkı örneklerinde *Lactobacillus reuteri* türüne hiç rastlanamamasıdır.

ErmA ve *ermC* tipi direncin süt ürünlerinde bulunan LAB'nde varlığı şimdiye kadar yayımlanmamıştır. Şu ana kadar LAB'nde sadece *ermB* tipi direnç bulunduğu dair yayınlar mevcuttur (41). *ermA* tipi direnci belirlemek için *S. aureus*'un Tn554 transpozonu üzerinde bulunan *ermA* direnç genine özgün primerler kullanılmıştır (41). *ermC* tip direnç *Staphylococcus* ve *Bacillus* cinslerinin bazı türlerinde bulunmaktadır (12, 41). *ermC* tipi direnci belirlemek için kullanılan primerler pE194 plazmidi (J01755 J01756 J01757 J01758) kaynak alınarak

tasarlanmış primerlerdir (8). Yapılan PZT sonuçları hiçbir örnekte bu gen bölgelerine rastlanılmaması sebebiyle hem süt ürünlerinin *ermA* ve *C* açısından temiz olduğunu hem de insan örneklerinin bu geni taşımadığını göstermiştir.

Tetrasiklinler aminoasil-tRNA'ların bakteri ribozomlarında bulunan ve peptidlerin ilk yerleştiği bölgeye (acceptor A site) bağlanmasını engelleyerek protein sentezini durduran antibiyotiklerdir (6). Chopra ve Roberts (2001) yaptıkları çalışma sonucunda 29 tetrasiklin direnç geni (*tet*) ve 3 oksitetrasiklin direnç geni (*otr*) tanımlanmıştır. *Lactobacillus* cinsinde *tet* (O) ve *tet* (Q) tipi tetrasiklin direnci gözlemlenmiştir (54). Tetrasiklin direnci genel olarak plazmidler ve transpozonlarla aktarılmaktadır (54). Transpozonlarla aktarılan direnç faktörü kromozom üzerinde de yerleşim gösterebilir (37, 54).

195 örnekte *tetM-F*, *tetM-R* primerleri kullanılarak yapılan PZT'ler sonucunda 72 örnekte bu genin varlığı ortaya çıkarılmıştır (Tablo.12). *tet M* geni tespit edilen örneklerin 1'i ticari peynir, 8'i yöresel peynir ve 1'i yoğurt 62'si insan kökenlidir. Ağız örneklerinin % 64'ünde, dışkı örneklerinin % 94'ünde ve vajina örneklerinin % 64'ünde bu gene rastlanılmıştır. Süt ürünlerinden ticari peynirlerin % 5'inde, yöresel peynirlerin % 16'sında ve yoğurt örneklerinin % 1'inde *tetM* direnç geni bulunmuştur (Tablo.13).

Katla ve arkadaşlarının (2001) e-test yöntemiyle süt ürünlerinden elde edilmiş *Lactobacillus*'larda tetrasiklin direncini araştırmış ve bu örneklerin tetrasiklin MIC değerlerini normal sınırlar içinde bulmuştur. Danielsen ve Wind (2003) e-test yöntemiyle *L. plantarum/pentosus*, *L. paracasei/rhamnosus*, *L. acidophilus* gurubu ve *L. sake/curvatus* türlerinde tetrasiklin direncini araştırmış ve *L. plantarum/pentosus* için 18 örneğin tamamında değişik seviyelerde, *L. paracasei/rhamnosus* için 22 örnekten 18'inde değişik seviyelerde, *L. acidophilus* gurubu için 16 örnekten 1 tanesi yüksek seviyede olmak üzere toplam 14'ünde ayrıca *L. sake/curvatus* için tüm örneklerde tetrasikline karşı direnç gözlemlemişlerdir. Danielsen ve Wind (2003) ile Katla ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları çalışmaların sonuçları birbirinden farklıdır. Yamamoto ve arkadaşları da (1996) *Lactobacillus helveticus* CP53 suşundan tetrasiklin direnç geni taşıyan pCP53 plazmidini tanımlamıştır. Danielsen (2002) *L. plantarum* 5057'de tetrasiklin direnci taşıyan pMD5057 plazmidini araştırmıştır. Daha önceden yapılmış olan hem mikrobiyolojik hem moleküler yöntemler aralarında kısmi farklar bulunmasına rağmen sonuç olarak bu genin laktik asit bakterilerinde genel olarak bulunduğu ve laktik asit bakterilerinin

bu antibiyotiğe karşı aşırı bir direnç kazandığını göstermektedir ki moleküler bir teknik olan PZT ile elde ettiğimiz sonuçlara göre bu gen ülkemiz süt ürünlerinde bulunduğu gibi insanların da yerleşik olarak bulunmaktadır (Tablo 12). Tablo.13'te de görüldüğü gibi ağız, dışkı, vajina, peynir ve yoğurt örneklerinde *tetM* direnç genine rastlanılmıştır. Bu çalışmada *tetM* direnç geni için kullanılan primer takımını *L. plantarum*'dan elde edilen pMD5057 plazmidinin (AF440277) taşıdığı *tetM* gen bölgesine göre tasarlanıp çoğaltılmıştır. Danielsen'in (2002) yapmış olduğu çalışma dışında *Lactobacillus* cinsi bakterilerde *tetM* tipi direnç bildirilmemiştir. Chopra ve Roberts (2001)'e de göre *tetM* tipi direnç *Bacterionema*, *Gemella*, *Bifidobacterium*, *Listeria*, *Mycoplasma*, *Gardnerella*, *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* cinsi mikroorganizmalarda yaygın olarak görülmektedir. Anlaşılacağı üzere sayılan bu bakteriler yoğunlukla mide-bağırsak ve ürogenital sistemde yerleşim gösteren bakterilerdir. *tetM* tipi direncin bu kadar yaygın bir şekilde bu kadar fazla sayıda bakteri cinsinde bulunması akla bu tip direncin bakteriler arasında taşınabileceği fikrini getirmektedir. Nitekim Tablo.14'de görüldüğü gibi *tetM* direnç geni sıklığı süt ürünlerinden ziyade insanda artış göstermektedir. Süt ürünleriyle alınan bakterilerin insan florasının belirlenmesinde etkili olduğu düşünülürse, *Lactobacillus* örneklerinin insan mide-bağırsak ve ürogenital sisteminde diğer bakterilerle ilişkileri sonucu bu geni kazanabileceği düşüncesini de destekler. Şayet bu farklı numunelerdeki dirençlerin kökeni birbirinden bağımsız olmuş olsaydı bu iki örnek grup içindeki *tetM* direnç geni sıklığı biri birinden bağımsız olarak birbirine yakın bulunması gerekirdi. Ayrıca temelde insan *Lactobacillus* florasını süt ve süt ürünleri ile alınan bakterilerin oluşturduğu düşünülürse süt ürünlerindeki bu düşük *tetM* gen sıklığı örnek sayısının az olmasına rağmen bu genin *Lactobacillus*'ların insan mide-bağırsak ve ürogenital sistemindeki yerleşimi sırasında kazandığını göstermektedir. Tetrasiklin geniş bir etki yelpazesine sahip, düşük toksisiteli, etkili ve çok değişik hastalıkların tedavisinde kullanılan genel bir antibiyotiktir (54). Mide-bağırsak ve ürogenital sistemde yerleşen bakterilerin bu kadar dirençli olduğu düşünülürse bu antibiyotiğin etkisi ve bu sistemlerdeki ilgili diğer bakterilerin de bu direnç genlerini taşıyıp taşımadığına dair daha geniş kapsamlı çalışmaların gerekli olduğu ortaya çıkar. Bu da klinik hekimliğin ve bu ilacın üreticilerinin bu antibiyotik üzerinde daha geniş kapsamlı araştırmalar yapmasını gerektirmektedir.

Kloramfenikol bakteri ribozomunun 50S alt ünitesine bağlanır ve protein sentezini peptidiltransferaz (peptidyltransferase) aşamasında engelleyerek etkili olur (18). Kloramfenikol direncinde genellikle antibiyotik kloramfenikol asetiltransferaz enzimi tarafından parçalanarak etkisiz hale getirilir. Kloramfenikol direnç geni (*cat*) gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasında çok az bir benzerlik gösterir (14). *cat*-TC geni plazmid kökenli bir kloramfenikol direnç genidir.

Cat-TC ye özgün pTC82f ve pTC82r primerleri kullanılarak yapılan PZT çalışmaları sonucunda çalışılan örneklerin hiç birinde *cat*-TC geni çoğaltılamamıştır (Tablo.11). Katla ve arkadaşları (2001) süt ve süt ürününden elde ettikleri 189 LAB örneklerinin çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını e-test yöntemiyle araştırmışlar ve MIC ($\mu\text{g/ml}$) değerlerini tespit etmişlerdir (Tablo.3). Bu çalışmaya göre kloramfenikol için 0,5-6 $\mu\text{g/ml}$ MIC aralığında *Lactobacillus*'da % 50 MIC değeri 2 $\mu\text{g/ml}$ ve % 90 MIC değeri 4 $\mu\text{g/ml}$ 'dır. *Lactococcus*'da 1-64 $\mu\text{g/ml}$ MIC aralığında % 50 MIC değeri 3 $\mu\text{g/ml}$ ve % 90 MIC değeri 24 $\mu\text{g/ml}$ 'dır (20). Danielsen ve arkadaşları (2002) *L. plantarum/pentosus*, *L. paracasei/rhamnosus*, *L. acidophilus* gurubu ile *L. sakei/curvatus* türlerinde e-test yöntemini kullanarak yaptıkları kloramfenikol direnç çalışmalarında toplam 62 örnekten 61 tanesinin MIC aralığı 1-8 $\mu\text{g/ml}$ arasında 1 örnekte ise 64 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar bu genin bu bakterilerde yerleşik olarak var olduğunu göstermesine rağmen bizim örneklerimizde bulunmayışı her hangi bir yorum yapabilmenin daha kapsamlı bir çalışma yapmadan evvel erken olacağı şeklindedir (Tablo. 11). *Lactobacillus*'lar vajina florasını ürettikleri laktik asit ile ortamın pH'sını düşürmeleri, H_2O_2 ve salgıladıkları bakteriyosinler ile kontrol altında tutarlar. *Lactobacillus*'lar katalaz enziminden yoksundurlar (24, 25). Metabolik faaliyetleri sonucunda ürettikleri H_2O_2 'yi yaşadıkları ortama salarlar. H_2O_2 diğer bakteriler üzerinde öldürücü etki yaparak florayı düzenler. Ancak *Lactobacillus*'ların vajinal florayı düzenlerken bu özelliği diğer özellikleri kadar ön plana çıkmaz. *Lactobacillus*'lar metabolik aktiviteleri sonucu karbon hidratlardan laktik asit, asetik asit gibi güçlü asitler üretirler (24,25). Son ürün olarak ortaya çıkan bu asitler ortamın pH'sını 2'ye kadar düşürürler (9). *Lactobacillus*'lar düşük pH'ya dayanıklı oldukları için canlı kalırken diğer bakterilerin bu yüksek asit yoğunluğunda yaşamaları mümkün değildir. Bakteriosinlerde *Lactobacillus*'ların bazı türlerinin salgıladıkları protein tabiatlı antimikrobiyal ajanlardır (46) ve diğer bakterilerin üremelerine etkili olarak vajinal florayı düzenlerler (9, 16, 47). Bu bakımdan insan LAB florasının sağlıklı olması

insanın kendi sağlığı açısından çok önemlidir. Bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucunda normal floranın hızlı bir şekilde dirençli flora ile yer değiştirmesine yol açarak sindirim ve ürogenital sistemi hastalık etkeni taşıyan bakterilere karşı etkisiz antibiyotiklerle korumak mümkün değildir. Son yıllarda insan sağlığı için tartışmasıız önemi olduğu anlaşılan laktik asit bakterilerinin uygunsuz ve bilinçsiz antibiyotik tedavileri ile direnç kazanmalarını ve bu direnci diğer bakteri, mantar, maya, ve parazitlere aktarabilme ihtimalinin dahi engellenmesi lazımdır. Bunun en güzel yöntemi ise laktik asit bakterileri ile birlikte bu sistemlerde yer alan diğer bakterilerin de antibiyotik davranışlarının belirlenmesi ve uygun antibiyotiklerin kullanılmasıyla olur. Bu alışma sonuçlarından da anlaşılaçağı üzere antibiyotik direnç geninin varlığı ve sıklığı (epidemiolojisi) lkelere, kültürlere, coğrafik farklılıklara ve yemek yeme alışkanlıklarına göre değişim göstermektedir. şu ana kadar lkemiz *Lactobacillus* koleksiyonunun antibiyotik direnç/duyarlılık davranışıyla ilgili hiç bir çalışma yapılmamıştır. Bu alışma kısmen de olsa bu eksikliği gidereceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada süt ve süt ürünlerinde bulunan *Lactobacillus*'ların vankomisin, eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol direnç profilleri çıkartılmış konumuzla direkt ilişkisi olmamakla birlikte bu bakterilerin insan vücudu boyunca seyahatleri sırasında antibiyotik direnç geni yönünden davranışları incelenmiştir. Çalışma sonunda bu dört antibiyotik ile ilgili elde edilen verilerin teker teker değerlendirilmeleri yukarıda verilmiştir. Tüm verileri bir arada değerlendirecek olursak; çalışma sonucunda örneklerde *ermB* ve *tetM* direnç geni bulunmuş, *van* ve *cat* genlerine rastlanılmamıştır. Ağız, dışkı, vajina, ticari peynir, yöresel peynir ve yoğurt örneklerinde hem *ermB* hem *tetM* genine rastlanılmıştır. *ermB* ve *tetM* direnç geni bulunan örneklerin süt ürünü, dışkı ve vajinal örneklerde bulunma sıklığı karşılaştırıldığında süt ürünlerinden insan örneklerine doğru belirgin bir artış söz konusudur. Bu durum bu bakterilerin vücut içinde yolculuğu esnasında diğer bakterilerle ilişkileri sonucunda direnç faktörü kazandıklarını göstermektedir. *Van* ve *cat* direnç genleri düşünüldüğünde laktik asit bakterilerinin vankomisine karşı doğal dirençli olmasından dolayı bulunmaması da genel kabul gören bir sonuçtur (35).

Sonuç olarak, antibiyotik direnç mşklnn giderek daha ciddi boyutlara ulaştığı şu günlerde direnç araştırmalarını yalnızca mikrobiyolojik yöntemlerle yapmak yeterli değildir. Antibiyotik direnç/duyarlılık çalışmalarının klinik anlamda üstün ve vazgeçilmez yönleri olmasına rağmen hem organizmanın

direnç profili çıkaracak hem de direncin genetik kökeni hakkında bilgi verecek yöntemler bu gün artık geçerlilik kazanmıştır. Bu yöntemler ayrıca çalışılan bakterilerin potansiyel taşıyıcı olup olmadığı hakkında da bilgi vermelidir. Direnç genlerinin bulunması ve genetik yapısının belirlenmesi antibiyotik direnç yayılımının belirlenmesi, direncin kökeninin tespiti ve buna karşı önlemlerin daha önceden alınması için de önemlidir. Moleküler yöntemleri kullanarak antibiyotik direnç faktörü araştırmalarında hem direncin var olup olmadığı hem de direncin kökeni belirlenebilir. Böylelikle direncin kaynağı hakkında fikir edinebilir ve önlem alınabilir. Çalışmamıza konu olan ve laktik asit bakterileri ailesinin bir üyesi olan *Lactobacillus* cinslerinin eritromisine direnç geliştirmeden sorumlu *ermB* ve tetrasikline karşı direnç geliştirmeden sorumlu *tetM* genlerini taşıdığını buna karşılık eritromisin direnç geliştirmeden sorumlu *ermA* ve *ermC*, vankomisin direncinden sorumlu *vanA* ve *vanB* ve kloramfenikol direncinden sorumlu *cat-TC* genlerini taşımadığı anlaşılmıştır. İnsan örnekleri ile yapılan çalışmalar neticesinde de aynı sonuç elde edilmiştir. Bu direnç genlerinin süt ürünleri ve insan kökenli örneklerdeki bulunma sıklıklarına bakıldığında, sıklığın süt ürününden insana doğru arttığı görülmektedir. Bulunan bu direnç sıklıklarını ve süt ürünlerinde bulunan *Lactobacillus*'ların insan florasını nasıl etkilediğini, dirençli bulunan bakterilerin aynı cins olup olmadığını belirlemek amacıyla tek koloni eldesinden sonra örnekler *Lactobacillus* cinsi için tür seviyesinde PTZ yöntemi ile tiplendirildi. Dirençli bulunan *Lactobacillus*'lar daha önceden bu konuyla ilgili yapılmış moleküler çalışmalarla uyum içersindedir. Bu sonuçlar *Lactobacillus*'ların süt ürünlerinden insana doğru yolculuğu esnasında direnç faktörleri kazanabileceğini eğer olursa bunun ham süt aşamasında olmadığını sütün işlenmesi sırasında olduğunu ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. TANNOCK, G. W., TILSALA-TIMISJARVI, A., RODTONG, S., NG, J., MUNRO, K., ALATOSSAVA, T.: Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Sep; 65 (9) 4264-7.
2. TANNOCK, G.W., MUNRO, K., HARMSSEN, H.J., WELLING, G.W., SMART, J., GOPAL, P.K.: Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Jun;66(6):2578-88.
3. SHINODA, T., KUSUDA, D., ISHIDA, Y., IKEDA, N., KANEKO, K., MASUDA, O.: Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract, *Letters in Applied Microbiology* 2001, 32, 108-113
4. TURANTAŞ, F.: Fermantasyonda Rol Oynayan Mikroorganizmalar. İçinde Gıda Mikrobiyolojisi (ÜNLÜTÜRK, A., TURANTAŞ, F. ed.) . İkinci Baskı. İzmir 1999 425-473
5. KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., REUTER, G.: Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 1998 May 26;41(2):103-25.
6. REID, G., MCGROARTY, J.A., TOMECZEK, L., BRUCE, A.W.: Identification and plasmid profiles of *Lactobacillus* species from the vagina of 100 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996 Aug;15(1):23-6.
7. WALTER, J., TANNOCK, G.W., TILSALA-TIMISJARVI, A., RODTONG, S., LOACH, D.M., MUNRO, K., ALATOSSAVA, T.: Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol.* 2000, Jan 66(1):297-303

8. WALTER, J., HERTEL, C., TANNOCK, G.W., LIS, C.M., MUNRO, K., HAMMES, W.P.: Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2001, Jun 67(6):2578-85.
9. SONG, Y.L., KATO, N., MATSUMIYA, Y., LIU, C.X., KATO, H., WATANABE, K.: Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J Clin Microbiol.* 1999 Sep 37(9) 3062-4.
10. KİŞLA, D., AND ÜNLÜTÜRK, A.: A new type of fermented milk product manufactured by *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Bifidobacterium longum*. *Adv. Food Sci. (CMTL)* Vol. 20 No 1/234-39 (1998)
11. HEYMAN, M.: Effect of Lactic Acid Bacteria on Diarrheal Diseases, National Institute of Health and Medical Research, INSERM E9925, Faculte' Necker, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris, FRANCE
12. DANIELSEN, M., WIND, A.: Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol.* 2003 Jan 26;82(1):1-11.
13. KATLA, A., K., KRUSE, H., JONSEN, G., HERIKSTAD, H.: Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 67 (2001) 147-152
14. FLUIT, A.C., VISSER, M.R.: Schmitz, F.J. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):836-71.
15. ÜNAL, S.: Gram pozitif bakterilerde değişik antibiyotiklere karşı direnç sorunu. *Bakteriyel Direnç Sorunu: Önlemler.* Sayfa 1-12
16. TEUBER, A., MEILE, L.: Schwarz, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999, 76: 115-137,

17. ZARAZAGA, M., SA'ENZ, Y., PORTILLO, A., TENORIO, C., RUIZ-LARREA, F., DEL CAMPO, R., BAQUERO, F., AND TORRES, C.: In Vitro Activities of Ketolide HMR3647, Macrolides, and Other Antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec. 1999, p. 3039–3041
18. MUTLU, G., İMİR, T., CENGİZ, T., USTAÇELEBİ, S., TUMBAY, E. METE, O.: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara, Güneş Kitapevi-1999, sayfa: 91-108
19. SCHWARZ, F. V., PERRETEN, V., AND TEUBER, M.: Sequence of the 50-kb Conjugative Multiresistance Plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid*, 2001, 46, 170–187
20. TYNKKYNNEN, S., SINGH K.V., VARMANEN, P.: Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 41 195–204
21. DANIELSEN, M.: Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid*, 2002 48 98–103
22. STEFANI, S., AGODI, A.: Molecular epidemiology of antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000 13 143–153
23. WEST, C. A., WARNER, P. J.: Plasmid Profiles and Transfer of Plasmid-Encoded Antibiotic Resistance in *Lactobacillus plantarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, Nov. 1985, p. 1319-1321
24. ÇATALOLUK, O.: PhD Thesis PCR Amplifications, Cloning and Sequencing of the Gene Coding for Salivaricin B and Partial Characterisations of the Bacteriocin Produced by *Lactobacillus salivarius* M7, METU, Ankara, October 1998

25. SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., HOLD, J. G.: Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Volume 2, Williams & Wilkins, Baltimor U.S.A 1986, 1208-1234
26. FELTEN, A., BARREAU, C., BIZET, C., LAGRANGE, P.H., PHILIPPON, A.: Lactobacillus species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. J Clin Microbiol. 1999 Mar;37(3):729-33
27. BAELE, M, VANEECHOUTTE, M, VERHELST, R, VANCANNEYT, M, DEVRIESE, LA, HAESEBROUCK, F.: Identification of Lactobacillus species using tDNA-PCR. J Microbiol Methods. 2002 Aug;50(3):263-71.
28. CHAGNAUD, P, MACHINIS, K, COUTTE, LA, MARECAT, A, MERCENIER, A.: Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common Lactobacillus species. J Microbiol Methods. 2001 Mar 1;44(2):139-48
29. MENDEZ, B., TACHIBANA, C., LEVY, S. B.: Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. Plasmid. 1980, 3(2):99-108.
30. MOREA, M., BARUZZI, F., CAPPA, F., COCCONCELLI, P.S.: Molecular characterization of the Lactobacillus community in traditional processing of Mozzarella cheese. International Journal of Food Microbiology 1998 43 53-60
31. GEVERS, D., HUYS, G., SWINGS, J.: Applicability of rep-PCR Fingerprinting for identification of Lactobacillus species, FEMS Microbiology Letters, 205, 2001, 31-36
32. McCARTNEY, A. L., WENZHI, W., TANNOCK, G. F.: Molecular Analysis of the Bifidobacterial and Lactobacillus Microflora of Humman, Applied and Environmental Microbiology, Dec. 1996, p. 4608-4613

33. MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKRE, J.: Brock Biology of Microorganisms, 4. Edition, New Jersey, USA, 1984,
34. VESKOVO, M., MORELLI, L., BOTTAZZI, V.: Durg Resistance Plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 1992 p. 50-56
35. ÇETİNKAYA, Y., ÜNAL S.: Glikopeptid Antibiyotikler, Vankomisin ve Teikoplanin. *Flora*, 1997, cilt 2, sayı 1
36. KELEİN, G., HALLMANN, C., CASAS, I. A., ABAD, J., LOUWERS J. AND REUTER, G.: Excision of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotic by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal of Applied Microbiology* 2000, 89, 815-824
37. CHOPRA, I., AND ROBERTS M.: Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, June 2001, p. 232-260
38. WEISBLUM, B.: Eritromycin Resistance by Ribosome Modification, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 1995, p. 577-585
39. LIN, C. F., CHUNG T. C.: Cloning of erythromycin-resistance determinants and replication origins from indigenous plasmids of *Lactobacillus reuteri* for potential use in construction of cloning vectors. *Plasmid*. 1999 Jul;42(1):31-41.
40. FONS, M., HÉGÉ, T., LADIRÉ, M., RAIBUAD, P., DUCLUZEAU, R., AND MAGUIN, E.: Isolation and characterization of a Plasmid from *Lactobacillus helveticus* Conferring Erythromycin Resistance. *Plasmid*, 1997 37 199-203
41. JENSEN, L., B., FRIMODT-MØLLAR, N., AARESTRUP F.M.: Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*, 1999 170 151-158

42. <http://www.med.sc.edu:85/mayer/antibiot.htm>
43. GERHRD, F., MURRAY, R. G. E., COSTILOW, R. N., NESTER, E. W., WOOD, W. A., KRIEG, N. B., PHILLIPS, G. B.: Manual of Methods for General Bacteriology. 1981 26-28
44. TAYLOR, G. R.: Polimerase chain reaction: basic principles and automation. In PCR A Practical approach, (MCPHERSON, M. J., QUIREHE, P., TAYLOR, G. R. ed.) London, Oxford University-1991, 1-14
45. WHITEHEAT, T. R., COTTA, M. A.: Sequence Analyses of a Broad Host-Range Plasmid Containing *ermT* from Tylosin-Resistance *Lactobacillus* sp. Isolated from Swine Feces. Current Microbiology, 2001, Vol. 43 pp. 17-20
46. ÇATALOLUK, O.: Molecular characterization of the Gene Encoding for the Salivaricin B Activity and Its Flanking Sequences, Turk J Biol, 2001 25: 379-386
47. GEVERS, D., DANIELSEN, M., HUYS, G., SWINGS, J.: Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. Appl Environ Microbiol. 2003, 69(2):1270-5.
48. DAVYDOVA, N., STRELTSOV, V., WILCE, M., LILJAS, A., GARBER, M.: L22 Ribosomal Protein and Effect of Its Mutation on Ribosome Resistance to Erythromycin, J. Mol. Biol., 2002, 322, 635-644
49. GROHMANN, E., MUTH, G., AND MANUEL ESPINOSA, M.: Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. Microbiology And Molecular Biology Reviews, June 2003, p. 277-301
50. DEASY, B. M., REA, M. C., FITZGERALD, G. F., COGAN, T. M., BERESFORD, T. P.: A Rapid PCR Based Method to Distinguish between *Lactobacillus* and *Enterococcus*, System. Appl. Microbiol., 2000, 23, 510-522

51. YAMAMOTA, N., TAKANO, T.: Isolation and Charecterization of a Plasmid from *Lactobacillus helveticus* CP53, Biosci. Biotech. Biochem., 1996, 60(12) 2069-2070
52. SHRAGO, A. W., CHASSY, B. M., DOBROGOSZ, W. J.: Conjugal Plasmid Transfer (pAM β 1) in *Lactobacillus plantarum*, Applied and Environmental Microbiology, Sept. 1986, 574-576
53. GIBSON, E. M., CHACE, N. M., LONDON, S. B., LONDON, J.: Transfer of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance from *Streptococcus* to *Lactobacillus*, Journal of Bacteriology, Jan. 1979, p. 614-619
54. ROBERTS, M. C., HILLIER, S. L.: Genetic Basis of Tetracycline resistance in Urogenital Bacteria, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Feb. 1990, p. 261-264
55. CAMBORUN, W. M., TANNOCK, G. W., YU, P., PEARCE, L. E., PILLIDGE, C. J.: Plasmid with Homology to pFX3 and pCI2240 in Starter *Lactococcus* and *Lactobacillus* and Electroporation of Selected Strains with these Vectors, Int. Dairy Journal, 6, 1998, 251-254
56. ANDRIGHETTO, C., DEA, P. D., LOMBARDI, A., NEVIANI, E., ROSSETTI, L., GIRAFFA, G.: Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products, Res. Microbiol. 1998, 149, 631-643
57. WATERS, V. L.: Conjugative Transfer In The Dissemination Of Beta-Lactam And Aminoglycoside Resistance. Frontiers in Bioscience 4, 1999, 416-439
58. CHARTERIS, W., KELLY, P. M., MORELLI, L., COLLINS, J. K.: Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. Journal of Food Protection. 1998, Vol 61, 1636-1643

59. LECLERCQ, R., DERLOT, E., DUVAL, J., COURVALIN, P.: Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*. 1988, 21, 319(3):157-61
60. MATSUMIYA, Y., KATO, N., WATANABE, K.: Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Infect Chemother*. 2002, 8: 43-49
61. DUTKA-MALEN, S., LECLERCQ, R., COUTANT, V., DUVAL, J., COURVALIN, P.: Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990, 34(10):1875-9
62. STILES, M. E., HOLZAPFEL, W.H.: Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, 36, 1-29

7. ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Gaziantep'te doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini aynı şehirde tamamladı. 1999 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden Lisans derecesi aldı. 2000 yılında Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Bekardır.

Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM
BÖLÜMÜ