

## BAKTERİLERDE ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİK VE KEMOTERAPÖTIKLERE KARŞI DİRENÇLİLİK MEKANİZMASI

Demet İŞCAN (\*)

Sülfonamid ve penisilinin bulunuşu klinik hekimlikte yeni bir çağ açmış ve infeksiyöz hastalıklarla savaşta iyimserliğe yol açmıştır. Bununla birlikte bu ilaçların kullanımlarında salgınların önlenmesi mümkün olmuşsa da infeksiyona neden olan etkenlerin yarattığı ciddi sorunlar halen güncelliğini korumaktadır(43).

Yeni bir ajanın antimikrobiyel aktivitesi ile kez test edilirken çoğunlukta "Duyarlılık" ve "Direncililik" sözcükleri ile tanımlanır. İlaçlara karşı direncililik, bir kemoterapötik ilacın etkisi altında benzer hücrelerin üremesinin durduğu, tahrib olduğu, inhibe olduğu koşullarda bir hücrenin yaşayabilme ve çoğalabilme bakımından geçici veya sürekli bir kapasiteye sahip olmasıdır. Diğer bir ifadeyle mikroorganizmaların bir kemoterapötik maddeye karşı duyarsızlaşmasına "Direncililik" adı verilir (40).

**Çapraz Direnc :** Belli bir ilaca dirençli olan mikroorganizmalar ortak bir mekanizmanın etkisiyle bir diğer ilaca da dirençli olabilirler. Böyle bir ilişki esasen kimyasal olarak çok yakın yapıda olan ilaçlar arasında vardır. Polimiksin B ile kolistin, eritromisin ile oleandomisin örneğinde olduğu gibi. Bu durum kimyasal yapı olarak benzemeyen ilaçlar arasında da bulunabilir. Örneğin, eritromisin ve linkomisin.

Mikroorganizmalar antibiyotiklerin varlığında yaşamlarını sürdürebilmek için ustaca değişiklikler geliştirirler. İlaç direncinin mekanizması, bir mikroorganizmadan diğerine, bir ilaçtan diğer ilaca da değişiklik göstermektedir. Örneğin, pensilin G'ye dirençli Staph. aureus suşları bu antibiyotiğin uygulamaya sokulmasından hemen sonra ortaya çıkmıştır. Nitekim bu direnc penisilin G'yi hidrolize ve inaktive eden bir enzim olan beta laktamazın bakteriler tarafından oluşturulmasının bir sonucudur. Son yıllarda Staph. aureusun suşlarının tüm-beta-laktam antibiyotiklere yüksek derecede dirençli oldukları saptanmıştır. Metisilline dirençli bilinen bu mikroorganizmalar hastahanelerde özellikle antibiyotik kullanımının çok olduğu yoğun bakım ünitelerinde göze çarpar hale gelmiştir (10).

---

(\*) Etlik Hay. Hast. Araşt. Enst. Vet. Hek.

Gonokoklar, özellikle penisilin G'nin yoğun olarak kullanıldığı alanlarda son 20 yılı aşkın bir sürede penisilin G'ye yüksek düzeyde direnç kazanmışlardır.

Bu durum muhtemelen ilacın hedef bölgeye girişini önleyen dış membran porin proteinlerdeki bir değişikliğe bağlı olarak şekillenmiştir. Bununla birlikte 1974'de ilacı inaktive eden bir penisilinaz oluşturan birçok gonokok suşları birden bire ortaya çıkmıştır. Bu suşlar penisilin G'ye oldukça dirençlidir ve bu etkenlerle oluşturulan infeksiyonlar, bu ilaç yüksek dozlarda kullanıldığında bile tedavi edilememektedir. Pneumokoklarda penisilin G'ye eskiden beri oldukça duyarlıdır.

Bununla birlikte 1978'de bu ilaca dirençli suşlar Kuzey Afrika'da meydana çıkmıştır. Benzer çeşitte suşlarda A.B.D.'de izole edilmiştir. Bu suşların penisilin G için hedef alanları olan penisilin bağlayan protein 1 ve 3'e değişiklik oluşturdukları ortaya konulmuştur(10).

Antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi, bakterinin genetik yapısındaki değişimlerle sonuçlanan mekanizmalardan herhangi birisinde etkili olabilir. Mutasyon sıklıkla bunun nedeni olurken, antimikrobiyel ajanlara direnç, genetik materyalin bir bakteriden diğerine "Transdüksiyon", "Transformasyon" veya "Konjugasyon" nakli yoluyla da kazanılabilir (17). Günümüzde eskiden kullanılan birçok antimikrobiyel madde artık etkisizdir. Antimikrobik ajanların dikkatsizce, gelişigüzel kullanımları dirençli mikroorganizma popülasyonunun etkili olması, gelecekteki yararları için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (43).

Klinik pratikte kullanılan antibiyotik ve diğer ilaçlara karşı kazanılmış dirençliliğin genellikle ya kromozomal mutasyon ya da ekstra kromozomal direnç (genetik değişim) sonucu ortaya çıkabileceği kabul edilmektedir. Ancak bazı mikroorganizmalarda genetik değişimlerebağlı olmaksızın da antimikrobik maddelere karşı direnç görülebilmektedir. Bu nedenle mikroorganizmalardaki direnç kazanma olgusu başlıca iki grup altında tanımlanabilir (8).

- 1- Genetiğe bağlı olmayan direnç,
- 2- Genetiğe bağlı olan direnç,
  - a- Kromozomal mutasyon
  - b- Ekstra kromozomal direnç

## GENETİĞE BAĞLI OLMAYAN DİRENÇ

Bir antimikrobiyel ajanın mikroorganizmayı etkilemesi için, o mikroorganizmanın metabolizmasının aktif durumda olması ve hedefin belirli olması gereklidir. Bunu bir örnekle açıklayabiliriz. Mycobakterium tuberculosis vücuda girdiği zaman vücut savunması ile virülens mikroorganizma karşılaşır ve mikroorganizmalar çoğunlukla savunma sistemlerinin baskısı altında kalır. Sonuçta tüberküloz etkenleri lenf bezlerine ulaşarak metabolizması yavaşlamış halde yıllarca canlı kalabilir. Bu durumda uygulanacak tedavi de sonuçsuz kalacaktır. Çünkü bir mikroorganizmaların metabolizmaları inaktiftir. Ancak vücudun zayıf düşmesi ile bu denge bozulursa ve mikroorganizmalar aktif duruma geçerse verilecek ilaca karşı duyarlılık başlayacaktır (8).

## GENETİĞE BAĞLI OLAN DİRENÇ

### a) Kromozomal mutasyon

Bakteri hücresinden protein yapımını kodlayan genetik bilgilerin DNA molekülleri üzerindeki dizilişlerindeki değişiklikler veya nükleotidlerdeki bazlarda oluşan kimyasal bozulmalar, kopmalar, zedelenmeler gibi nedenlerle oluşan herhangi bir değişiklik mutasyon olarak adlandırılmıştır (4).

Intrinsik direnç, doğal özelliklerinden dolayı oluşan direnç hücrenin daha önceki türlerinden miras kalan birçok bakteri türünün sahip olduğu antimikrobik maddelere karşı olan direnci adlandırılmada kullanılmaktadır (11). Bu direnç, organizmaya antimikrobik madde verildiğinde vardır veya bir bakteri bu direnci geliştirebilecek kapasiteye sahiptir. E.coli'nin Omp F porininin gözenek çapı daha az olan bazı antimikrobik maddeleri daha az geçiren Omp C porini ile değiştirilmesi doğal dirence bir örnektir (9).

Geçmişte mikroorganizmanın ilaca dirençli suşlarının orijini konusu tartışmalı olmuştur. Dirençli mikroorganizmaların, ilacın organizma ile karşılıklı etkileşimi sonucu oluşan fenotipik adaptasyon sonucu mu veya antibiyotik bağımsız mutanti sonucu mu oluştuğunu belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. İlaça karşı dirençliliğin ilaca karşı değişen duyarlılık sonucu oluşan tesadüfi mutasyon esasına dayanan bir mekanizma ile olduğu üzerinde görüş birliğine varılmıştır. İlaç sadece duyarlı mikroorganizmalar üzerinde dirençliliğin devam etmesini sağlayan seçici bir ajan olarak görev almaktadır.

Mutasyonlar,  $10^5$  -  $10^{10}$  hücre bölünmesinde bir sıklıkla şekillenmektedir. Spesifik bir ilacın hedefi kadar özel bir organizmanın mutasyon oranı da kemoterapideki rasyonel yaklaşım açısından önem taşır. Tüberkülozun kombine tedavisinin başarılı sonuç vermesi buna güzel bir örnektir. Tüberküloz lezyonları ile içindeki tüberküloz basilleri tek bir ilaç uygulandığında dirençli suşların ortaya çıkışı için imkan sağlar. Bununla birlikte kombine tedavinin kullanılması ile aynı anda uygulanmış iki ilaca karşı oluşan direnç çok düşüktür ( $10^{15}$  hücre bölünmesinde bir) (43).

Antibiyotiğe duyarlı bakteri populasyonu ilaca nisbeten dirençli bazı mutantları da içerir. Bu gibi mikroorganizmalar antibiyotik içeren vasatlarda üretildiklerinde izole edilebilir ve analizler bu suşların, ilacın yokluğunda kalıcı olan genetik bir değişmeye uğradığını gösterir. Özel bir mikrobiyel ajana direnç kazanan mikroorganizmalar bireysel bir ilacın kullanımını yaygın olduğunda klinik olarak önemli hale gelirler. Duyarlı suşlar baskılanmış ve dirençli suşlar eksilmemiş olarak ürerler. Zaman içinde dirençli mikroorganizmalar hakim hale gelirler. Bu prosese "seleksiyon" adı verilir (19, 43). Bir ilaca karşı direnç oluşturan mutasyonel değişiklikler aynı anda mikroorganizmanın patojenitesini etkileyen virülens faktörlerini de değiştirebilirler. Örneğin ; Rifampine kendiliğinden direnç oluşturan bazı Staph. aureus suşlarının aynı zamanda daha az katalaz pozitif reaksiyon verdiği ve hayvanlarda daha az virulent oldukları bildirilmiştir. Ancak, bu dirençli suşların çevrede fazla kalıcı olmadıkları da belirtilmiştir. Neisseriae gonorrhoeae suşları (penisilin G'ye karşı düşük düzeyde direnç kazanmış olanlar) daha az patojenik olup genital

sistemdeki primer infeksiyonlardan ender olarak yayılırlar. Fakat penisilinaz oluşturan Staph. aureuslarda olduğu gibi antibiyotiğe dirençli mutantların hepsi az virulent özellik taşımazlar (17).

RNA Mutasyon oluşması, tabanların sıralanmasındaki bir değişiklikle mRNA molekülleri üzerindeki taban ölçülerinin ve genetik şifrenin değişimine neden olarak, üretilmekte olan protein molekülünün yapısına yanlış amino asit girmesine yol açacaktır. Mutasyon, genin bir bölgesinde tek bir taban çiftini ilgilendirebilir. Bu da birincisi bir taban çiftinin yerinde başka bir taban çiftinin oluşması, diğeri genin bir bölgesinden bir taban çıkıp bu bölgeye fazladan bir taban çiftinin yerleşmesi şeklinde yani bir veya birkaç nükleotid çiftini kapsayabilir ki, buna "Nokta mutasyonu" adı verilir (41).

Mutasyonda genin bir bölgesinde birden fazla taban çifti DNA yapısına girer yada DNA yapısından ayrılabilir. Bu mutasyon (yapıdan çıkma ve yapıya girme) biçiminde geriye dönüş olasılığı düşüktür ve fenotipe yansıyan değişiklikler büyük orandadır. Mutasyonlar sonucu meydana gelen yeni nesile "Mutant" denir. Mutagen etki fiziksel ve kimyasal olabilir (4, 34, 36).

#### **Fiziksel Mutagenler :**

- UV ışınları
- düşük pH'lara maruz kalma
- nötral pH derecelerinde ısıtma
- X ışınları
- manyetik alanda tutma

#### **Kimyasal Mutagenler :**

Taban analogları (bir timin analogu olan 5-brom urasil-BU- ile adenin'e benzeyen 2-aminopurin, DNA'daki timin yerine geçebilirler ve A-T taban çiftlerinin bulunduğu yerlerde A-BU çiftleri oluşabilir.

- Tabanları değişikliklere uğratan maddeler
- DNA yapısındaki tabanları gideren maddeler
- Akridinler ve indirekt etkileyen mutagenler (ilaçlar, hormonlar, fazla oksijen...)

#### **B- Ekstra Kromozomal Direnç (Genetik değişim)**

Bakterilerde ilaç direncini kontrol eden genetik şifre hem bakteri kromozomunda hemde ekstrakromozomal plazmidlerin DNA' sında şekillenebilir. Direnç özelliği, dirençli bir hücreden duyarlı bir hücreye "transformasyon", "transdüksiyon", konjugasyon yolu ile nakledilebilir. Doğal koşullar altında bakteriler ender olarak kromozomal genlerini değiştirirler. Bununla birlikte plazmidler genetik bilginin yayılması ve tekrar düzenlenmesi için çok etkili ve güçlü yollar oluşturur. Plazmidler, bakteri yaşamı için gerekli olmayan özellikler ile ilgili genleri taşıyan ekstrakromozomal DNA molekülleridir. Plazmidler başlıca 3 yolla aktarılabilirler.

**Transdüksiyon :** Genetik bir materyalin verici bir bakteriden alıcı bir bakteriye fajlar aracılığı ile nakledilmesidir (4). Bu işlem protein kılıfı içinde birleşmiş halde bakteriyel DNA tanıyabilen bir bakteriyofajın müdahalesi ile şekillenir. Bu genetik materyal ilaç direnci için bir gen içeriyorsa, yeni infekte bir bakteri hücresi bu ajana dirençli hale gelebilir ve bu özelliği nesillerine geçirebilir. Transdüksiyon, penisilinaz için kodlanan plazmidleri taşıyan bazı



fajlara sahip *Staph.aureus*'un bazı suşları arasında antibiyotik direncinin transferinde özellikle önemlidir (2,4,17).

**Transformasyon :** Genetik şifrenin bu yöntemle nakli çevrede serbest bulunan DNA'nın bakteriler içine girişini kapsar (17). Bir mikroorganizma kendisine DNA kompozisyonu yönünden yakın olan diğer bir mikroorganizmaya ait DNA segmentlerini içeren bir ortamda üretilirse bazı kolonilerin değişik morfolojide olduğu ve bunların genetik materyali veren mikroorganizmanın orjinal kolonilerine benzediği görülür (*Pneumococ spp.*, *Neisseriae spp.*, *Haemophilus influenza*, *Streptococlar*, *Staphylococlar* ve *basilluslar* gibi).

**Konjugasyon :** Verici hücre DNA'sının tümünün veya bir segmentinin bu hücrede bulunan özel bir seks pilusu aracılığı ile alıcı hücreye direkt aktarılması olayıdır (4, 43). Bu olay şimdilerde birçok ilaca karşı direnci kodlayan DNA'nın nakledilebildiğinden dolayı antibiyotik direncinin yayılması için çok önemli bir mekanizma olarak görülmektedir. Konjugasyon ilk olarak 1959'da japonya'da 4 farklı antibiyotik sınıfına dirençli olan *Shigella flexnei* tarafından oluşturulan basiller dizanteri salgınından sonra tanınmıştır. Direnç hem *Shigella* hem de *Enterobacteriaceae*'nin duyarlı suşlarına kolaylıkla nakledilebilir. Nakledilebilen genetik materyal, plazmidlerde içeren iki farklı DNA dizisi setinden ibarettir(43). İlk dizi setinde R- determinantı hakiki direnci kodlar ve direnç determinant plazmid olarak adlandırılır. Örneğin; aminoglikozidlere veya kloramfenikole karşı direnç durumunda R-determinantı ilacı inaktive eden enzimlerin sentezini kodlar. İkinci plazmid ise RTF (Rezistant Transfer Faktör) olarak ifade edilir. Bakteriyel konjugasyon için gerekli şifreleri içerir. Bu plazmidlerin her ikisinde bağımsız olarak bulanabilir veya R-Faktörünü oluşturmak için birleşebilirler (17, 43, 10).

## BİLİLEN KROMOZOM DIŞI ELEMENTLER

### 1- Seks faktörü : (F faktörü, Fertilitate faktörü)

Kromozomu transfer ettirirler. Örneğin; *E. coli*'deki K12'de bulunan seks faktörü f'dir. Bu plazmidler kromozomal gen transferi ve kendi transferlerini de sağlayabilen plazmidlerdir.

### 2- Col- Faktörü : (Kolisinojenik faktörler, Col-faktörler)

Konakçı bakteri hücrelerinin kolisin yapımını sağlayan faktörlerdir. Kolisinler koliform bakterileri öldürücü etkiye sahip olan proteinlerdir.

**3- Resistans (R) faktörleri :** Bu faktörler konakçı hücrenin antibiyotikler gibi çeşitli antimikrobik maddelere dirençli hale gelmesini sağlayan genleri taşırlar. RTF ve R determinantları diye ayrılır.

### 4- *Stafilokoklar*'ın Penisilinaz Plazmidleri :

Bu plazmidler hücrenin kuvvetli penisilinaz yapmasını ve penisilin'e dirençli hale gelmesini sağlarlar. R faktörlerden farkı konjugasyon yolu ile transfer yapamazlar. Fajlar aracılığı ile oluşan transdüksiyonla taşınabilirler.

### 5- *Salmonella tyhphi*'nin F plazmidleri

### 6- Transpozonlar

### 7- Diğer ekstra kromozomal elemetler

### 1- Seks faktörü (F-faktörü, Fertilité faktörü) :

Enterobakteri'lerin antibiyotik dirençlilik plazmidleri öncelikle 2 sınıfa ayrılırlar.  $F_i^+$ ,  $F_i^-$ ,  $F_i^+$  özelliği fertilité inhibisyonunun belirtilmesinde kullanılır.

F- Plazmid taşıyıcısı ile F faktörünün aynı konakçı hücrede bulunduğu zaman plazmidi inhibe etme özelliği kazanmasına "Fertilité inhibisyonu" denilmektedir (10).  $F_i^+$  ve  $F_i^-$  sınıfının üyeleri bazı  $F_i^-$  plazmidlerle ve F ile aynı hücrede bir arada bulunabilirler. Plazmidler aynı grup içinde replike olmazlar ve aynı konakçı hücre içinde bir diğeri ile de uyumsuz olduğu söylenmektedir (31). Bu tür plazmidlerde bu işin baskılayıcı protein yapımından sorumlu iki fin geni tarafından organize edildiği bulunmuştur. F plazmidlerinde bu genlerden birinin olmayışı transfer sisteminin sürekli çalışmasına yol açmıştır. Bu genlerin fonksiyonel olduğu plazmidlerle F plazmidi birlikte ise F plazmidi fertilité inhibisyonuna uğrar. Pili fermentasyonundan sorumlu tra genleri de bulunmaktadır (tra A,B, C,E,F,G,K,...). Diğeri genler ise hücresel çiftlerin oluşumu, transferin başlatılması, transferin orjinalinde kesim, transfer, replikasyon gibi işlevlerden sorumludurlar (41, 10).

**F+ hücreler :** F faktörü kapsarlar ancak F faktörleri bakteriyel sitoplazmasında bağımsız olarak bulunurlar. Bir hücrede bir veya birden fazla kopyesi bulunabilir. Akridin boyaları F faktörlerinin replikasyonuna engel olduğu halde DNA replikasyonunu etkilemezler.  $F^+$  x  $F^-$  ve  $F^+$  x  $F^+$  konjugasyonları fertildir.

**F- hücreler :** İçlerinde F faktörü bulunmayan konjugasyonda alıcı özellik gösteren hücrelerdir.

**Hfr hücreler :** E. coli K 12 suşları arasında yüksek oranda rekombinasyon yapabilen bakterilere Hfr hücreleri denilmektedir. F- hücreler (F prime, ara-verici hücreler) Hfr ve  $f^+$  verici hücreler arasında yer alırlar (5). F faktörü taşıyan hücreler konjugasyon ve transdüksiyon ile başka hücreye aktarılabilirler.

**F tip transfer sistemi :** Donör hücrelerin taşıdığı konjugatif F tipi plazmidler, karakteristik saç benzeri piluslardan oluşurlar (34). Verici hücrenin protein yapısındaki pili adlı organelli sex pilisi diye adlandırılır. Deneysel çalışmalar F plazmid transferi için F pilisine gerek duyulduğunu bildirmiştir (41).

Enterobakteriler dizisindeki tüm konjugatif plazmidler, pilusları belirleme kapasitesine sahiptir. Bunlar iki temel formda bulunurlar. 1- Bükülebilir, 2- Sert form. Piluslar, kalınlık bakımından 6-11 nm. arasında bulunur. Uyumsuzluk gruplarının büyük bir çoğunluğu (8-9 nm'lik), kalın, bükülebilir pilusları belirler. Buna karşın 6 nm'lik ince bükülebilir piluslar az miktardaki gruplarca (B, 11, 12, 1y, k) belirlenir. Çeşitli gruplar katı pilusları kodlarlar (10).

F pilusunun yapısı hakkında yoğun çalışma yapılmamıştır. F pilusları tek bir komponent olan moleküler ağırlığı 7200 dalton olan F pilin'inden oluşmuştur. Piluslar iç tabakadan köken alırlar ve iç-dış membran yapışması ile ilgili zarlardan uzarlar. F piluslarının konjugasyonda alıcı verici hücreler arasındaki duvara teması tesis etmek için P pilin alt ünitelerinin ayrışmasıyla

geri çekildikleri düşünülmektedir. Daha sonra F plazmidi tek bir DNA ipliği şeklinde verici hücrelerinden alıcı hücrelerine transfer olur (10).

H 11 plazmid pH H 1508 a tarafından belirlenen H pilusları 8 nm. çapında olup, hücre başına ortalama miktarları 1-2 arasında değişir. Proteinlerin analizi H 11 plazmidleri içeren E. coli hücrelerinde ve H pilus özel antikoru kullanılarak müteakip immunoblotting ve polyakrilamid agar jel elektroforez ile pH H 1508 a'dan kısmen purifiye edilmiş H pilus preparasyonlarında gerçekleştirilmiştir.

F pili'sine karşı gelen hiç bir küçük alt ünite identifiye edilmemiştir. Bunun yerine H pilusa özel antikor ile reaksiyon veren yaklaşık 40.000 daltonluk yüksek moleküller ağırlıktaki polipeptit identifiye edilmiştir. Bu protein, transfer kusurlu mutantları içeren E. coli hücrelerinde mevcut değildir. Bu proteinin, H piluslarının yapısı ile F piluslarının yapısından tamamen farklı olduğu veya jel içinde görülür durumda olmayan düşük moleküller ağırlıklı H pilin moleküllerinin bir kümesi temsil edip etmediği kesin değildir. Muhtelif uyumsuzluk (Inc) gruplarının plazmidlerince kodlanan piluslar spesifik bakteriyofajlar için reseptör gibi davranabilirler. H- pilus spesifik RNA fajı (pil H) Güney Afrika'da lağımdan izole edilmiştir. Pil H fajı hem Inc HI 11 plazmidde kodlanmış piluslarının sap uzunluğunca absorbe edilen Inc H1 ve inc 11 plazmidlerini içeren konakçılarda plak oluşumunun ısıya duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu gibi konakçılarda hücrelerin 26 C'de inkübasyonundan sonra plaklar oluşmuştur. Fakat 37 C'de inkübasyondan sonra plakları oluşmamıştır. Inc H 1 plazmidlerinin transferi ısıya duyarlı Inc H 11 plazmidleri ise ısıya duyarlı değildir. Pilus, çift filament yapısında, iki paralel protein çubuğu görüntüsündedir (10, 34).

Konjugasyon oluşumunda, pili'nin yer almadığı durumlar da olabilir. Bazı streptokok suşlarında pili formasyonu yerine resipiyent hücre tarafından bir protein yapılmaktadır ve bu protein donör hücreyi kaplayarak hücreler arası transferi sağlamaktadır (34). Pilus'un hücrelerinde nakli için plazmid mutasyonuna uyum sağlaması transfer ve spesifik faj adsorbsiyonu veya her ikisi ile de engellenir. Çiftlerin birleşme formasyonu filamentöz DNA fajları ve zinc iyonları tarafından bloke edilir.

F plazmidleri replikasyon genleri mutasyon sonucu fonksiyonel olmaktan çıkmış, bir suşa sokuldukları zaman "integratif baskılama" adı verilen bir fenomene neden olabilmektedir. F plazmid replikasyon proteini kullansa da özellikle hücreler DNA replikasyonunda, başlamasından sorumlu DNA gen ürününe gerek duyar ve kendi replikasyonunu başlatabilir. Böylece kromozomal replikasyon olmadan plazmid kopyalanabilir.

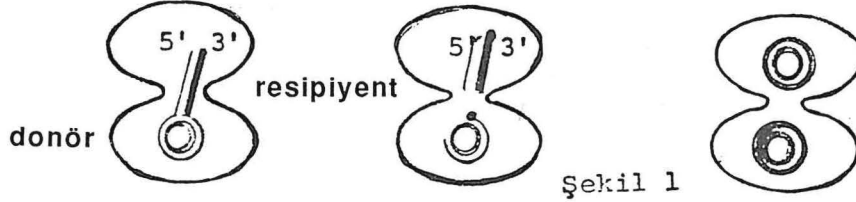
F plazmid transferi (Hfr suşlarının oluşumu) 4 basamakta oluşmaktadır.

- Verici-alıcı çiftlerin oluşumu,
- DNA transferi için hazırlık,
- DNA transferi,

- Fonksiyonel ve replike olabilen bir plazmidin resipiyent hücrede oluşumu.

Resipiyent (verici) çiftlerin oluşumunda ilk adım, donör ve resipiyent hücrelerden oluşan çiftlerin sağlanmasıdır. Verici hücrenin seks pilusu ile bu iş

gerçekleşir. Pili, tek bir proteinden meydana gelmiş tubular yapıdadır. Pili içinde DNA'ya rastlanmamıştır. Bazı araştırmacılar seks pilusunun sadece kasılmayı gerçekleştirerek hücrenin sıkı ilişkisini sağlama amacı taşıdığını bildirmişlerdir (Plazmid replikasyonu).



Şekil 1

DNA transferi için hazırlık, DNA transferi, F plazmidinde DNA mobilizasyonu, plazmidce sentezlenen bu proteinin plazmid genomunda bulunan transfer orijini (Drit) adlı genin bulunduğu noktadaki özel bir baz dizisini tanıyarak bir tek DNA üzerinde kesit oluşturması ile başlar. Burada tek bir DNA ipliği karşı hücreye geçmekte ve DNA kendi üzerinde kopyalanmaktadır.

## 2- Col Faktörü (Kolisinojenik faktörler, Col faktörleri)

Bakterilerde DNA'nın konjugasyonla alıcı hücrelere aktarılmasını sağlayan ekstrakromozomal genetik elementlerdir. Kolisin sözcük anlamı E. coli tarafından sentezlenen antibiyotik demektir. Kalıtsal olarak kolisin yapma yeteneğine sahip olan bakteriler kolisinojenik olarak adlandırılırlar. Bazı col-faktörleri kendini transfer edecek yetenekte değildir. F faktörü veya Col faktörü ile transfer edilirler. Kendi kendine transfer yapabilen hücrelere HFCT (High-Frequency-Colicinogenic-Transfer) denir (23).

Kolisini spesifiye eden plazmidler 2 grupta toplanabilirler ;

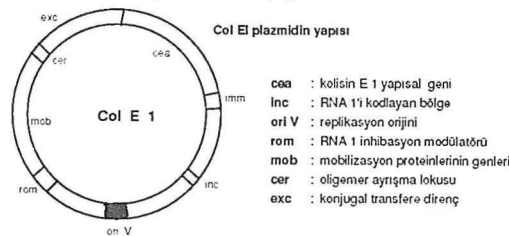
Grup I plazmidler, nonkonjugatif olup ağırlıkları  $5 \times 10^6$  dır.

Grup II plazmidler, konjugatif olup moleküller ağırlıkları  $50 \times 10^6$  dır (41).

Bazı col-plazmidleri birden fazla kolisin geni taşırlar. Kolisin V veya B'yi kodlayan plazmidler konjugatif olup F benzeri pilus oluştururlar. Col plazmidleri içinde en çok bilineni Col E 1 olup rekombinant DNA çalışmalarında kullanılır. Kolisinlerin kimyasal yapıları lipopolisakarid ve protein yapısındadır. Antibakteriyel etkilerinden dolayı antibiyotiklere benzetilen kolisinler, protein yapısında olmaları ve antibakteriyel etkilerinin sınırlı bulunması ile antibiyotiklerden ayrılırlar. Kolisinlerin A'dan V'ye kadar harflerle isimlendirilen 24 türü vardır (7,24).

Kolisinler kendilerine özel bakteri yüzeyindeki reseptörlere tutunarak hücreye girer ve etkilerler. Bazı bakteriosinler hücrenin DNA, RNA ve protein sentezini, bazıları oksidatif fosforilasyonu bloke ederler.

Şekil 2- Col E 1 plazmidinin yapısı



cea : kolisin E 1 yapısal geni  
inc: RNA 1'i kodlayan bölge  
oriV: replikasyon orijini  
rom : RNA 1 inhibisyon modülatörü  
mob : mobilizasyon proteinlerinin genleri  
cer : oligomer ayrışma lokusu  
exc : konjugal transfere direnç

### 3- Plazmidler (R faktörü)

Plazmidler (R faktörü) 2 önemli tipte sınıflandırılabilir.

A- Konjugatif plazmidler

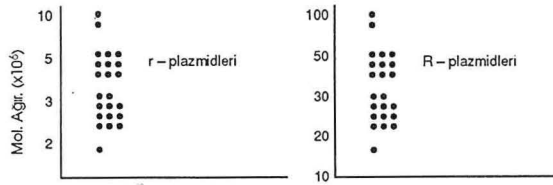
B- Nonkonjugatif plazmidler

#### A- Konjugatif Plazmidler :

Bir hücreden diğerine kendi kendine nakledilebilir ve konjugasyon ile ilgili bilgiler ve seks pilusu sentezi vardır. Konjugasyon sayesinde ilaca dirençli markerlerin transferi ile birlikte bulunan plazmidler R plazmidleri olarak bilinir ve 2 belirgin komponente sahiptir (43).

**1- RTF- Resistans transfer faktör :** Konjugasyon işlemi başlatır ve kontrol eder. Transfer işlemi sağlayan plazmidin tra bölgesidir.

R plazmidlerinin tra bölgesinde yapı geni bulunur ve aynı bakteride F faktörü de bulunduğu için F piluslarının oluşumunu ve F faktörünün transferini inhibe ederler. Bu nedenle R plazmidleri fi olarak anılır. Bazı R plazmidleri F piluslarından antijenik yapıları farklı, Col-1 plazmidinin oluşturduğu 1 piluslarına benzer pilus oluşturur.



Şekil 3: R ve r plazmid DNA'sının moleküler ağırlığı

**2- Resistans Determinat rD :** Spesifik antimikrobiyel ajanlara karşı direnç sağlayan bir veya birden fazla bağlı genler serisidir. determinantlarda, Resistans transfer faktörler bağımsız replikonlar olup her biri kendi bakteri hücresi içinde replike olurlar. Konjugatif plazmidlerde pilus oluşturmayı ve transferi sağlarlar. R determinantları, konjugasyonu başlatmak için mevcut olan RTF'nin varlığında direnç oluşturur. Bu şekildeki bir enfeksiyöz ilaç direnci özellikle gram negatif basillerde önemlidir. Enterik bakteriler dışında, Pseudomonas, Vibrio, Campylobacter, Bacteriodes fragilis Neisseria gonorrhoeae, Enterococcus faecalis, Cl. perfringens gibi bakterilerde değişik yapıları konjugatif plazmidler bulunmuştur.

Stafilokok'larda verici veya alıcı hücrenin profaj taşınmasına bağlı olarak bu profajın hücre yüzeyinde yaptığı değişikliklerle faj aracılığı ile konjugasyon denilen mekanizma ile plazmid transferi gerçekleştiği tarif edilmiştir.

İlk kez Japonya'da 1957'de görülen basiller dizanteri salgınından Shigella

dysentheria suşlarının aynı anda kloramfenikol, streptomisin, sülfonilamid ve tetrasiklin'e dirençli hale geldiğinde tanınmıştır. Çoklu ilaç direnci halen dünyada yaygındır. Bu olay birçok infeksiyonun başarıyla tedavisine engel olmaktadır (43). Böylece ilaca karşı direnç determinantları bu güne dek streptomisin, sülfanilamid, kloramfenikol, tetrasiklin, neomisin, kanamisin, ampisilin, furozolidona karşı bulunmuştur. Normal barsak florasının antibiyotiklerle çevrili bulunması R plazmidlerini taşıyan organizmaların gelişmelerini kolaylaştırır. Bu gibi organizmaları bağırsaklarında bulunduran bireyler patojenik türlerle infekte olduklarında ilaca dirençli saprofitler R plazmidlerini duyarlı patojenlere naklediler daha sonra antibiyotikler tedavi amacıyla kullanılırsa da başlangıçtaki ilaca duyarlı organizmanın yerini tamamen alırlar. Bu tip ilaca direnç naklinin insanların sindirim sisteminde şekillendiğine dair net klinik bulgular vardır (12).

**B- Nonkonjugatif Plazmidler :** Kendi aralarında nakletme işini başlatamaz ve seks pilusunu kodlayamazlar. Yoğunluk bakımından konjugatif plazmidlerden daha küçüktürler ve 2'den fazla antibiyotik direnç genini ender olarak kodlayabilirler. Nakilleri mobilizasyon işlemi yoluyla birlikte bulunan konjugatif plazmidlerin aracılığı ile oluşturulur. Bu mekanizma R plazmidlerinin gonokok'a nakledildiği *Neisseria gonorrhoeae*'de oluşmaktadır. Bu plazmidlerde tra bölgesi ve bunu taşıyan bakterilerde pilus oluşumu yoktur.

Tablo - 1 Nonkonjugatif ve konjugatif R plazmidlerinin özellikleri

	Nonkonjugatif	Konjugatif
Büyüklüğü	2-20 kb	30 kb
Taşıyabildiği direnç genleri	1-2	10 kadar veya fazla

Hem konjugatif hem konjugatif olmayan plazmidler de transdüksiyon ve transformasyon yoluyla nakledilebilir. Stafilokok'lardaki tüm plazmidler nonkonjugatiftir. Buna penisilinaz plazmidi de denir. Yayılma sadece transdüksiyon ile olur. Bu plazmidler hücrenin kuvvetli penisilinaz yapmasını ve penisiline dirençli hale gelmesini sağlarlar. Stafilokokal penisilinaz plazmidleri beta laktamase enzimi için determinantları içerir. Eritromisin ve bazı inorganik iyonlara karşı direnç gibi genetik işaretleyicilerde bu plazmidler üzerinde bulunabilirler. Fakat streptomisine, tetrasikline, kloramfenikol ve makrolitlere olan dirençte transdük'te olabilir ve farklı plazmidler üzerinde bulunabilir. İlaça karşı direnç genlerinin çoğu transpozonlar üzerinde mevcuttur. Plazmidler, bakteri hücreleri içinde, çift sarmallı bir DNA molekülünden yapılmış kovalent olarak kapalı, dairesel yapıda intrasitoplazmik elementlerdir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin bir çoğunda bulunurlar. Plazmidler, konakçı bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olurlar ve kendi replikasyonlarını yöneten genleri içerirler (10, 34).

Genelde prokaryotik hücrelerde bulunan plazmidler hücre için gerekli elementler olmadığı gibi hücre için zararlı etkileri de bulunmayabilir. Plazmidlerde



bakteriyel konakçılardan olumsuz çevre şartlarında bile, bulunup gelişmesini sağlayan birçok yararlı fonksiyonlar yürütülür. Bakteri hücresi içinde plazmid DNA'sı kovalan olarak kapalı (ccc = Covalently closed circle) bulunurlar. CCC plazmid moleküllerinin çoğu ayrıca kendi üzerlerinde kıvrılıp süper sarmal oluştururlar. CCC plazmid molekülünün nükleotid iplikciklerinden biri koptuğunda açık daire (open-circle) yapı oluşur. Eğer iki polinükleotid iplikçisi aynı-yakın bölgeden koparsa düz moleküler yapılar oluşur (41 10).

Plazmidlerle DNA replikasyonu başlangıçta kontrol edilirler, replikasyon başlamasının regüle edilmesinde asıl rol plazmide aittir. Replikasyon orjin (ori) noktasından başlayıp replikasyon çatalı boyunca devam eder ve tekrar "ori" noktasına gelince sona erer.

Aynı uyumsuzluk gruplarına ait plazmidler çoğunlukla aynı büyüklüktedir. Bu nedenle bilinmeyen bir plazmid ile diğer uyumsuzluk gruplarına ait plazmidlerin büyüklüklerinin karşılaştırılmasının yapılması her zaman uyumsuzluk testlerine başlamadan önce yararlı olmaktadır. Standart olarak bilinen büyüklüklerin moleküler ağırlık markerlarını kullanarak yapılan agar-jel elektroforez sıklıkla büyüklüğün saptanması için kullanılmaktadır.

Tüm H plazmidleri yüksek moleküler ağırlıkta olduklarından ve bunların agar jel elektroforez ile kısmi saptanması güç olduğundan Inc H 11 servisindeki plazmidlerin büyüklüğünü saptamada X bal ile birlikte endonülease sınırlaması kullanılmıştır.

Elektron mikroskopik olarak veya agar jel elektroforez ile önceden saptanan büyüklüklerin hesaplanması, her zaman X- bal sınırlama parçalarının toplanması ile elde edilenden daha küçük bir büyüklük vermiştir.

1 megadalton= 1,54 kilobaz formülü temelinde dayanarak R 27 (112 megadalton) un 172,5 kilobazlık bir büyüklüğe sahip olması beklenmiştir. Gerçekte X-bal tasnifinde saptanan R 27, 182 kilobaz uzunluğa sahiptir.

Benzer bir fenomen Inc H 11 plazmid pH H 1508 a ile gözlenmiştir. X bal ve X hol tasnifleri kullanılarak agar-jel elektroforez ile bu plazmidin 100 megadaltonluk bir moleküler ağırlığa sahip olduğu hesaplanmış ise de; pH H 1508 a'nın 208 kilobaz veya 135 megadalton'a eşdeğer bir moleküler büyüklükte olduğu saptanmıştır.

Genelde, plazmid büyüklüğünün saptanmasında kullanılan bağlama fragmanı ne kadar çok ise toplam büyüklük o denli fazla şekilde görülmektedir. Moleküller ağırlık ile göç uzaklığı arasındaki ilişki 10-100 megadalton arasında doğrusal olduğundan, bağlama fragmanları büyük plazmidler için moleküler büyüklük hesaplamasında daha çok kesin karar vermeye yol açar (10).

Tablo - 2 Bazı Plazmidlerin Büyüklükleri (10, 41)

Plazmid	k.b	Büyüklüğü (MD)	Organizma
PBR 322	4.362	2.9	E. coli
Col E 1	6.36	4.2	E. coli
F	95	63	E. coli
RP4	54	36	Pseudomonas

**Plazmidlerin Genel Özellikleri :** Antibiyotik dirençlilik determinantları plazmidler üzerinde bulunur.

Patojenik mikroorganizmaların virülens özelliklerini belirleyen toksin ve proteinler plazmidlerce kodlanabilir.

Kolisiner (antibakteriyel proteinler) plazmidlere kodlanabilir.

Doğada biriken sentetik kirleticileri parçalayan enzim genleri taşıyabilirler. Gen klonlamada vektör olarak kullanılabilirler.

Tablo - 3 Bakteri plazmidleri tarafından belirlenen özellikler

1- Dirençlilik Özellikleri	a) Antibiyotik dirençliliği b) Ağır metal-kasyon dirençliliği c) Anyon dirençliliği d) Diğer dirençlilikler (radyasyon, faj, bakteriyosun gibi)
2- Metabolik Özellikler	a) Antibiyotikve bakteriyosin üretim b) Karbonhidrat metabolizması c) Kompleks karbon bileşikleri ve halojenli bileşiklerin metabolizması d) Diğer özellikler (sitrat kullanımı, timin sentezi, pigmentasyon H S timi gibi.
3- Patojenite veya simbiyosis ile ilgili özellikler	a) Antibiyotik dirençliliği ve bakteriyosin üretimi b) Toksin üretimi (enterotoksin, ekfoliyatif toksin, ekzotoksin, deltaendoksin, nörotoksin gibi c) E. coli'de kolonizasyon antijenleri (K88, K89, CFA I, CFA II gibi) d) Bitkilerde kök uru oluşumu e) Baklagillerde infeksiyonu ve dölülasyonu g) Demir transportu
4- Konjugasyon özellikleri	a) F. Pilus ve spesifik fajlarına duyarlılık b) Primaz aktivitesi c) Konjugatif olmayan plazmidlerde mobilizasyon d)Ferremona tepki ve inhibasyonu
5- Replikasyon ve katılım ile ilgili özellikler	(inkompatibilite, konak çevresi, kop sayısı gibi )

Konjugatif plazmidler, konakçı hücreleri içinde çoğalmalarını sağlamak için belirlenen özel fonksiyonları kullandıkları gibi konjugatif transfer ve pilus üretimi gibi özel fonksiyonları da kodlarlar. Şekerlerin veya diğer bileşiklerin metabolizması kadar antibiyotiklere ve metallere karşı direnç de plazmidler tarafından belirlenir.

R plazmidlerinin sınıflandırılmasında uyumsuzluk grupları ile de ayırım yapılabilmektedir. İki veya fazla sayıda plazmidin aynı konakçı hücrede stabil kalıtımı mümkün değilse bu plazmidler inkompatibildir denir. Bir bakteri plazmidinin stabil katılımı demek her bir yeni hücrenin en az bir plazmid kazanması anlamındadır. Plazmidlerin konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon yoluyla plazmidlerden birinin içine girebilmesi ve seleksiyon sonrası plazmid çiftlerinin birlikte var olması için plazmidlerin inkompatibilite grupları belirlenir. Enterobacteriaceae plazmidleri için 30, stafilokok plazmidleri için (7- 13) farklı inkompatibilite grubu tanımlanmıştır (10). Bu sayılar yeni plazmidlerin bulunması ile artabilmektedir. Uyumsuzluk grupları plazmidin direnç genleri ile değil, replikasyon genleri ile ilgilidir.

**4- Stafilokok plazmidleri :** Bu plazmidler Staph. aureus suşlarında penisilini parçalayan, etkisiz hale getiren penisilinaz enzimini yapan genleri içerir. Bilinen stafilokok plazmidlerinden başlıcaları penisilin plazmidleri ve tetrasiklin plazmidleridir.

**Penisilin plazmidleri ;** bakterilerde penisilin parçalayan penisilinaz enziminin yapımını yöneten genleri içerir. Aynı plazmid üzerinde Eritromisin'e, arsenat tuzlarına direnç genleri birlikte bulunabilmektedir. Penisilinaz plazmid kolisin, F ve R faktörlerinden farklıdır. Bu plazmid de bağımsız replike olabilir. Bunların R faktörlerinden farkı, konjugasyon ile transfer yapamazlar. Fajlar aracılığı ile oluşan transdüksiyonla bir hücreden diğerine taşınabilir. Son zamanlarda çok yönlü antibiyotik dirençlilik taşıyan küçük boyutlarda (40-60 kb) plazmidler identifiye edilmiştir. Penisilin, ağır metaller, aminoglikozidler ve fusidik asit dirençliliğinin bazı kombinasyonları orta ölçüdeki plazmidlerce taşınır. I. sınıf Stafilokok Plazmidleri ; 1-5 kb arasında büyüklüğe sahiptirler. Tetrasiklin, Kloramfenikol, Streptomisin, Kanamisin, Eritromisin grubunda direnç oluştururlar. II. ve III. sınıf stafilokok plazmidleri; Gentamisin, Penisilin, Trimetoprim, Kadmiyum, Kurşun, Civa, Bizmut, ağır metallere direnç oluşmasında rol oynarlar (25, 36, 2).

**5- F<sup>0</sup> plazmidi :** Salmonella typhi suşunda doğal bulunan ve bakteriye laktozu fermente etme yeteneği kazandıran bir genetik element olduğu söylenmektedir. Bu elementin kromozom yapısına giremediği bildirilmiştir (5).

**6- Transpozonlar :** Bakterilerle plazmid DNA mükülllerinin herhangi bir yerinde yapılarına girebilmekte ve yerleşim bölgelerini değiştirebilmektedir. Bu elementler; Basit, yapıya girme elementleri ve Transpozonlar'dır (41).

Basit yapıya girme elementleri sadece DNA yapısına giriş fonksiyonunda rol oynayan genleri içerir. Transpozonlar ise daha uzun DNA segmentleri olup yapıları karmaşıktır ve DNA içine girmeyi sağlayan genlerden başka genleri de içerebilirler. Direnç genleri sağlayan genlerde başka genleri de içerebilirler. Direnç genleri Plazmiden plazmide, Plazmidten kromozoma ve Plazmidten

bakteriyofaja yer değiştirebilir. Ampisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, kanamisin, streptomisin, trimetoprim dahil olmak üzere en yararlı antibiyotiklerin bir kısmında direnci belirleyen genler transpozonlar üzerinde bulunur.

**7- Diğer ekstrakromozomal elementler :** Virulan E. coli suşlarından virulanstan sorumlu öldürücü etkili bir toksin ve bir faktörün üretimini yöneten plazmid yapısındaki ekstrakromozomal elementler bulunmuş ve Vir simgesi ile ifade edilmiştir. Bu plazmidler Salmonella, Shigella ve E.coli suşlarına aktarılabilmektedir (5). Pseudomonas aeruginosa' (FF) ve Vibrio cholera'da (P) de seks faktörlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Bundan başka E. coli'de hemolizin (HLY) ve Enteroksin (Ent) üretimini tayin eden ekstrakromozomal genetik elementler saptanmıştır.

### **PLAZMİD İDENTİFİKASYON VE SINIFLANDIRILMASI :**

Bu amaçla uygulanan farklı metodlarla, plazmidlerin identifiye edilmesi sağlanır. Genetik teknikler ve inkompatibilite (uyumsuzluk) özellikleri, biyoşimik ve kompozisyonları biyofizik tekniklerle de moleküller ağırlık, temel yapı ve kompozisyonları incelenir.

Plazmidlerin identifikasyonu ve sınıflandırılmasında çeşitli teknikler bildirilmiştir.

1- Genetik Teknikler :

a) Transfer

- Konjugasyon ve mobilizasyon

- Transdüksiyon

- Transformasyon

**b- İnkompabilite testi :** İnkompabilite, plazmid replikasyonu ve plazmidlerin kardeş hücrelere dağılımlarının kontrolü mekanizmaları ile ilgilidir. Eğer iki veya fazla sayıda plazmid aynı konak hücrede sabit kalarak kalıtımı mümkün değilse bu plazmidler inkompatibildir.

**2- Biyofiziksel ve Biyoşimiksel Teknikler :** Bu amaçla Agar-jel elektroforez, ultrasantrifügasyon ve elektron mikroskopik analizlerden yararlanılmaktadır.

**a- Agar-jel elektroforez :** Bu yöntemle DNA saflaştırılır. Suşlarda bulunan plazmidlerin varlığı ve sayıları, büyüklükleri belirlenir.

**b- Ultrasantrifügasyon :** Bu yöntemle sezyum klorid ve ethidyum bromid kullanılarak kromozomal DNA ve plazmidlerin üzerindeki DNA'ların dansiteleri belirlenir. Boyları ve sayılarının belirlenmesi için sakkaroz gradiend kullanılır. Santrifügasyon ile bakteriden plazmidik DNA izole edilmesi sağlanır.

**c- Elektron mikroskopi :** Elektron mikroskopla incelemede plazmidik DNA'nın ultrasantrifügasyon ile moleküler ağırlıkları ölçülür. DNA moleküllerinin suşlardaki plazmid varlığı, longitudinal ve sirküler formları incelendiği gibi plazmidlerin homolog veya hetero dubleks yapıları da incelenir.

## ANTİBİYOTİKLERE KARŞI OLUŞAN DİRENÇLİLİK TURLERİ

**1- Antibiyotiklerin tahribi :** Bazı organizmalar aktif ilacı yıkımlayan enzimler sentezlerler. Buna örnek olarak, penisilin G'ye dirençli stafilokoklar ilacı yıkımlayan bir beta laktamaz üretirler. Diğer beta laktamalar Gram negatif çomaklar tarafından üretilirler. Aminoglikozidlere dirençli gram negatif bakteriler (bir plazmidin etkisiyle), ilaçları yıkımlayan adenilasyon, forforilasyon veya asetilasyon enzimlerini üretirler. Gram negatif bakteriler eğer kloramfenikol asetiltransferaz üretiyorlarsa kloramfenikole karşı dirençli olabilirler.

**2- Permeabilite azalması :** Bakteri hücre duvarının yarı geçirgen özelliği birçok zararlı maddenin geçişine engel olur. Örneğin, Tetrasiklinler duyarlı bakteride birikim yaparlar ancak dirençli bakterilerde birikmezler. Polimiksinlere dirençlilik belki de ilaçlara geçirgenliğin değişimi ile yakından ilgilidir.

**3- Kompetatif inhibisyon :** Bu tip dirençlilik antibiyotikler kombine kullanıldıklarında ortaya çıkar. Antibiyotik konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Örneğin, kloramfenikol ile makrolid grubu antibiyotiklerin konsantrasyonunda makrolitler 50 S ribozomal alt ünite ile birleşince kloramfenikol birleşmez ve etkisiz kalır.

**4- Mutasyon :** Sağıtım sırasında antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkışı genellikle mutasyon sonucu olur.

**5- R- faktörü :** Mutant suşlarda birkaç antibiyotiğe karşı dirençlilik bulunabilir. Böyle bakteriler R faktörünü taşırlar. R faktörünün iki kısmı vardır. Biri ilaca karşı dirençliliği sağlayan faktör, ikincisi ise bu dirençliliği transfer eden faktör.

Çeşitli antibiyotiklere dirençli olan Shigella ve Salmonella suşları antibiyotiklere duyarlı E.coli ile aynı ortamda üretilirse R-faktörü E.coli 'ye geçebilir. Bu faktörü olan E.coli antibiyotikli ortamda ürer. Bu durumdan yararlanılarak bakterilerde çeşitli antibiyotiklere dirençli R faktörünün varlığı sağlanabilir.

**6- Ribozomal direnç :** Antibiyotiklere karşı dirençlilikte, ribozomlarda oluşan kimyasal değişmeler (asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon, adenilasyon gibi) antibiyotiklerin etkisini sınırlandırır.

**7- Antagonist madde sentezi :** Bakterilerde antimikrobiyel maddelerin etkisini giderecek antagonist madde sentezinde artmalar olabilir. Bunlarda antibiyotikleri etkisiz hale getirirler.

**8- Antagonist etki :** Bazı ilaçlar kombine edildiklerinde birbirlerine zıt etkisi bulunurlar.

Tablo- 4 Direnç mekanizması

ANTİBİYOTİKLER	ANTİBAKTERİYEL ETKİ	DİRENÇLİLİK MEKANİZMASI
Betalaktamlar Penisilin bağlayıcı protein	Hücre duvarı sentezinin inhibasyonu	B- laktam halkasının enzimatik hidrolizi
Aminoglikozidler 30 S Ribozomal alt ünite	Değişik sentezlerin inhibasyonu	Enzim sentezi Asetiltransferaz Fosfotransferaz Adeniltransferaz
Kloramfenikol 50 S Ribozomal alt ünite	Değişik sentezlerin inhibasyonu	Asetilaz enzimi sentezi
Tetrasiklin 30 B Ribozomal alt ünite	Değişik sentezlerin inhibasyonu	Antibiyotiklerin aktif atılımı
Makrolitler 50 B Ribozomal alt ünite	Değişik sentezlerin inhibasyonu	RNA 'nın enzimatik metilasyonu, enzimatik inaktivasyonu
Sulfonamidler Dihidropteroate sentetaz	Folik asit sentezinin inhibasyonu	Hedef enziminin yapılmasında değişim
Trimethoprime Dihidrofolat redüktaz	Folik asit sentezinin inhibasyonu	Hedef enziminin yapılmasında değişim

Kaynak : Levy ve ark. 1982



Tablo-5 Bakterilere karşı direnç mekanizması

MEKANİZMA	AJANLAR	MİKROORGANİZMALAR
<b>HÜCRE İÇİNE GİRİŞİN ENGELLENMESİ</b>	B- laktamlar	Ps. aeruginosa Enterobakteriler
	Aminoglikozidler	Ps. aeruginosa Serratia sp. Str. faecalis
	Kloramfenikol, Trimetoprim	Ps. aeruginosa
<b>HÜCRE DUVARI-HÜCRE MEMBRANI VE TRANSFER SİSTEMİNDE DEĞİŞİM</b>		
Alınımın azaltılması ve taşınımın artırılması	Tetrasiklin	Enterobakteriler
Membran enerjisinin inhibisyonu	Aminoglikozidler	Anaroblar
Enzimatik değişim sonucu ilacın zayıf transportu	Kloramfenikol	Pseudomonas sp.
Şekerlerin transport sisteminin değişim	Fosfomisin	Enterobakteriler
<b>İLAÇLARIN ENZİMATİK İNAKTİVASYONU</b>		
betalaktamaz	B - laktamlar	Staph. aureus Enterobakteriler Pseudomonas sp. H. influenza
Asetilasyon, fosforilasyon, nükleotidilasyon	Aminoglikozidler	Staph. aureus Streptococcus sp. Enterobakteriler Ps. aeruginosa
Kloramfenikol asetiltransferaz	Kloramfenikol	Staph. aureus Enterobakteriler
<b>HEDEFİN DEĞİŞMESİ</b>		
23 S RNA'nın metilasyonu	Eritromisin Klindamisin	Staph. aureus Staph. aureus
DNA gyraz	Nalidiksik asit	Enterobakteriler
RNA polimeraz	Rifampin	Enterobakteriler
Penisilin Bağlayıcı Proteinler	Penisilin	N. gonorrhoeae Str. Pneumoniae Staph. aureus Enterobakteriler
30 S ribozom	Streptomisin	Enterobakteriler
<b>DEĞİŞİK METABOLİK YOLLARLA DİRENÇ</b>		
	Trimetoprim	
Dihidrofolat redüktaz	Trimetoprim	Enterobakteriler
Dihidropteroat sentetaz	Sulfonamidler	Enterobakteriler Staph. aureus

Kaynak : Willet, P. H. (1988)

## İLAÇ DİRENCİNİN MEKANİZMALARI

Direnç, hücredeki ilacın etkisinden kurtulmayı sağlayan metabolizması veya yapısının genetik olarak kontrol edilmiş özelliklerine bağlıdır. Mikroorganizmaların, antimikrobiyel bir ajanın inhibitör etkisine direnç göstermelerinde etkili olan çeşitli biyokimyasal mekanizmalar vardır. Bunlar; Organizmanın ilaca geçirgenliğinin azaltılması, dirençli organizmalar tarafından üretilen enzimlerin inhibitör etkisi, ilacın reseptör kısmının özelliklerinde değişimler ve ilaç için antagonistik etkisi olan gerekli metabolit sentezinin artmasında olduğu gibi, kromozomal ilaç direnci çoğunlukta mikroorganizmanın antibiyotik içine geçişini engellemek için hücresel yapılarda değişikliklere neden olur. R plazmidleri ile oluşturan direnç, ya hücre permeabilitesindeki bir azalma ya da inhibitörün enzimatik inaktivasyonunu kapsar.

Hücre geçirgenliğinin azaltılması; Antimikrobiyel ajanlara karşı değiştirilmiş hücre geçirgenliği, ilaç için spesifik reseptörlerdeki değişimleri, hücre membranı vasıtası ile aktif transport kapasitesi kaybını veya nonspesifik bir şekilde permeabiliteyi etkileyen hücre zarının bir veya daha fazla komponentlerindeki yapısal değişimleri kapsar.

Gram negatif bakterilerin lipid içeren dış membranı, bir çok antibiyotiğin hücreye girişi için etkili bir engel oluşturur. Geçirgenlik engeli gram negatif mikroorganizmaların tüm türleri için sabit değildir. Örneğin; H. influenza ve N. gonorrhoeae genellikle birçok beta laktamaz enzimine duyarlıdır. Ps. aeruginosa spesifik antipseudomonal beta laktamlar dışındakilere dirençlidir. Bazı klinik izolatlarda dış membran geçirgenliğindeki değişiklikler bazı yeni beta laktam antibiyotiklere dirençten sorumlu görünmektedirler. Bu direnç beta laktamazın indüksiyonu ile birlikte bulunanlardan farklı olarak beta laktamlar ve aminoglikozidler arasındaki çapraz direnci kapsar ve dış membran porinindeki bir değişikliklerle birlikte bulunur.

Azalmış hücre geçirgenliği tetrasiklinlere dirençte en yaygın olarak karşılaşılan mekanizmadır ve bazı olgularda sülfonamid dirençliliğinin bir sebebidir. Tetrasikline karşı bakteriyel direnç, konakçı bakteri hücreindeki plazmidler üzerinde bulunan en az 4 farklı determinant tarafından oluşturulur. Gram negatif mikroorganizmalarda tetrasiklin direncini belirleyen genler çoğunlukla olmamakla beraber sıklıkla transpozon 10 üzerinde bulunur. Bu da çeşitli R plazmidlerinin bir komponentidir.

İlacın enzimatik inaktivasyonu tipindeki direnci, yaygın olarak dirençli organizmaların klinik izolatlarında gözlenmekte olup penisilin, kloramfenikol ve aminoglikozidli antibiyotiklere dirençteki primer mekanizmadır. Bu ajanlar için inaktive edici spesifik enzimler, R faktörlerini ve diğer plazmidleri taşıyan birçok bakteride şekillenir. Bakterilerde genel anlamda antibiyotiklere direnç mekanizması 4 gruba ayrılabilir (15).

- 1- Antibiyotiğin bakteride hedeflediği molekülün değişikliğe uğraması,
- 2- Antibiyotiğin hücre içine girişinin engellenmesi,
- 3- Değişik metabolik yollar geliştirilmesi,
- 4- Bakterinin antibiyotiği inaktive edici enzim sentezlemesidir

## 1- ANTİBİYOTİĞİN BAKTERİDE HEDEFLEDİĞİ MOLEKÜLÜN DEĞİŞİKLİĞE UĞRAMASI

Beta laktam antibiyotikler bilindiği gibi penisilinler, sefalosporinler ve diğer beta laktam antibiyotikler olarak sınıflandırılır. Penisilinlere dirençliliğin Transpeptidazların bakteri çeperindeki diğer penisilin bağlayan proteinlerin ilaca ilgisinin azalması, ilacın bakteri çeperindeki periplazmik boşluğa gimesinin zorlaşması ve periplazmik boşlukta toplanan ve hücre dışına salgılanan beta laktamazlarla penisilinlerin hidrolize olması ile gerçekleştiği bildirilmiştir (15, 9, 11).

Beta laktam antibiyotiklere olan direncin en önemli mekanizması, beta laktam halkalarının beta laktamazlar tarafından hidrolize edilmesidir. Yakın zamanlarda penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) arasındaki bağların kopmasından oluşan yeni direnç mekanizmaları tanımlanabilmektedir. Beta laktamazların sınıflandırılmasında Richmand ve Sykes'in önerdiği sistem en çok kullanılmıştır. Bu şema, enzimleri 5 ayrı alt gruba ayırır.

**1. Sınıf enzimler :** Sefalosporinaz'lar

**2. Sınıf enzimler :** Penisilinaz'lar

**3. Sınıf enzimler :** Geniş spektrum içindeki penisilin ve sefalosporinlere zıt etkilidirler. P- Chloromercuribenzoate'in inhibisyonuna dirençli ve cloxacillinin inhibisyonuna duyarlıdır.

**4. Sınıf enzimler :** 3'cü sınıf enzimlerle aynı yapıları gösterirler. Fakat onların tersine Klokasilin inhibisyonuna dirençli p-Chloramercuri benzoate inhibisyonuna duyarlıdır.

**5. Sınıf enzimler :** Bunların spektrumları 2. sınıf enzimlerinden daha dar olan penisilinaz'lardır ve Klokasillin ve Karbenisilin'e duyarlıdır.

Bu sınıflamadaki enzimler plazmid kromozomal genetik temele sahiptirler (9).

Sefalosporinler, bakterilerin salgıladığı beta-laktamazlara karşı ilacın dayanıksız olmasıyla, bakteri hücre çeperinin sefalosporinlere geçirgenliğinin az olması ve bakteri çeperinde sefalosporinlerin etkilediği, penisilin bağlayan proteinlerin ilaca affinitesinin az olması ile meydana geldiği bildirilmiştir (21). Sefalosporinler penisilinlere göre Staph. aureus'un salgıladığı beta-laktamazlara daha dayanıklıdır. Beta-laktamazlar sadece penisilinleri parçaladıkları için gerçek penisilinaz'lardır. Birinci kuşak sefalosporinlerin hepsi beta-laktamazlar tarafından yıkımlanır. İkinci kuşak sefalosporinler beta-laktamazlar tarafından daha az yıkımlanır. Üçüncü kuşak sefalosporinler ise birçoklarına dayanıklıdır.

Enterobakteri'lerdeki enzimler hücre içinde sentezlenir ve periplazmik boşlukta bulunurlar. Betalaktam'lar antibiyotiğin girişi ve hedefine yönelişi sırasında sitoplazmik membrana yerleşerek antibiyotik molekülünü bozabilirler. Enterobakteri'lerde aktif serine bağlanan iki çeşit betalaktamaz tanımlanmıştır. TEM (temoniere) beta-laktamaz için aktif serine yerleşme bölgesi 45 tir. Kromozomal kökenli ampisilin hidrolize eden ampc beta-laktamaz'ın bölgesi 80'dir (11).

Betalaktam halkasının bozulmasından başka bu enzimlerin direnç'teki

başka bir rolü'de, antibiyotik molekülünü hidrolize etmekten öte onları bağlayarak periplazmik boşluk içinde tutulması ve molekülün hedefi olan Penisilin bağlayıcı proteinlere yeteri kadar ulaştırılmamasıdır.

Gram negatif bakterilerin doğal duyarlılığı belirgin olarak dış zarının yapısından kaynaklanır. Bu konu yakın tarihlerde incelenmiş ve ilaç moleküllerinin hidrofobik doğası, büyüklüğü ve yüküne göre porin kanallarının geçirgenliğinin betalaktam antibiyotiklerinin etkinliklerine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Porinlerdeki değişiklikler yoluyla betalaktam antibiyotiklerine karşı geçirgenliğin düşürüldüğü görülmüştür. E.coli'nin Omp F kanalının dar olan OmpC ile yer değiştirmesi gibi (10).

Staphylococcus aureus'un methicillin'e dirençli suşları artan sıklıkla izole edilebilmiştir. Bu suşlar, yüksek moleküler ağırlıklı olan Penisilin bağlayıcı protein'lere sahiptirler ve yüksek methicillin konsantrasyonlarında doyarlar. Diğer PBP'ler ise methicillin düşük yoğunlaşmalarında dahi doyarlar (9,20). D grubu streptokok'lar arasındaki direncinde PBP'lerle bağlantılı olduğu söylenir. Genel olarak bu aile içindeki farklı türler, PBP'lerin bağlılığı ve onların penisilinden etkilenme düzeyleri arasında bir korelasyon gösterirler. Yapılan bir çalışmada Staph. aureus suşları methicillin ve oxacilline dirençli veya duyarlılığına göre gruplandırılmıştır. Methicillin direncinde, betalaktamazın rolü betalaktamaz inhibitörleri ile test edilmiş ve NaCl ilaveli besiyerleri kullanılmıştır. Methicillin ve oxacillin duyarlılığının belirlenmesi standart disk difüzyon ve agar dilüsyon ile yapılmıştır. Methicillin, oxacillin ve Penicillin G üzerinde 2 beta-laktamaz inhibitörün etkisi Staph. aureus suşları ile test edilmiştir (1-Clavulanic acid, 2-Sulbactam). Penicillin bağlayan proteinlerin saptanması için yapılan testlerle, methicillin dirençli Staph. aureus suşlarının PBP 2a üretmedikleri gösterilmiştir (35).

E. coli K 12 mutantlarının beta-laktam antibiyotiklere direncinin oluşumu ile ilgili yapılan bir çalışmada, E.coli'nin beta-laktam dirençli mutantları farklı beta-laktam derivatları kullanılarak seçilmiş ve betalaktam antibiyotiklere direnç oluşturan mekanizmalar ile ilgili çalışmaların tedavi sonrası meydana çıkabilecek dirençli mutantlarının önceden bilinmesi açısından önem taşıdığı açıklanmıştır (26).

## 2- ANTİBİYOTİĞİN HÜCRE İÇİNE GİRİŞİNİN ENGELLENMESİ

Aminoglycozide- aminocyclitol (AGAC) grubu antibiyotikler : Bu grup arasında; Streptomisin, neomisin, kanamisin, gentamisin, kasugamisin, spektinomisin gibi antibiyotikler yer almaktadır. Bakterilerde aminoglikozidlere karşı direnç kısaca 3 mekanizma ile özetlenebilir (11, 16).

1. Özel bir direnç plazmidinin bakteri hücresi içine girmesi sonucu belirli aminoglikozid türlerini inaktive eden enzim çeşitlerinin salgılandığı bildirilmiştir. Bu plazmidler ribozomlarda enzim sentezini sağlayan genetik kodu taşırlar. Salgılanan enzimler aminoglikozid'leri hidroksil veya amino grupları üzerinden ya adenillemek, asetillemek veya fosforile etmek suretiyle inaktive ederler. Gentamisin ve kanamisin kısmen farklı tipte 7 çeşit enzimle inaktive

edilir.

2. Kromozomal Mutasyon mikroorganizmaların 30 S ribozomal alt birimlerinde, aminoglikozid moleküllerini bağlayan noktanın ilaca karşı affinitesinin kaybolmasıdır. Bu mekanizma streptomisin'e karşı direnç meydana gelmesinde rol oynar.

3. Direnç, bakteri hücre çeperinde, aminoglikozid ilacın hücre içine taşınmasını sağlayan aktif transport mekanizmasının bozulmasına bağlı olabilir. Bu durumda ilaç molekülleri ribozomlara ulaşamazlar ve antibakteriyel etki azalır. *Ps. aeruginosa*'da aminoglikozidlere direnç oluşumu genelde bu mekanizma ile olur (27).

AGAC grubu antibiyotikleri değiştiren enzimler 3 sınıfa ayrılır. Bunlarda Acetyltransferases (AAC), Adenyltransferases (ADD) ve Phosphotransferase (APH)'dir. AGAC değiştiren enzimlerin bu antibiyotiklerde direnci nasıl geliştirdikleri tam olarak bilinmemektedir. Araştırmacılara göre, ilaca dirençli enzimsel inaktivasyon içeren mekanizmalardan farklı olarak yalnız küçük miktarda AGAC antibiyotiği değiştirilir. Bu da direncin hücreye girmesi sırasında antibiyotiğin değiştirilmesi yolu ile başarıldığı hipotezini öne sürer. Yani belirli bir AGAC antibiyotiğine direncin ilaç alım oranı ve değiştirilme oranı arasındaki rekabetten kaynaklandığı söylenmektedir. Eğer ilaç birikmesi ilaç değiştiriminden çok olursa etkin ilaç ribozomlara erişir ve protein sentezi durur. Tersini durumunda ise ilaç değişimi çok olacağı için antibiyotik protein sentezini engellemeyecek ve direnç oluşacaktır. Aminoglikozidlere sonradan kazanılmış direncin en yaygın biçimi plazmid kökenli aminoglikozid değiştiren enzimler yoluyla oluşur. Bu enzimlerin bir çoğu transpozonlar tarafından belirlenir. Doğasında kendiliğinden oluşan direncin en önemli mekanizması yetersiz ilaç taşınmasıdır ve bakteriler arasında yaygın olarak oluşur. Her zaman belirli bir enzimin, belirli bir aminoglikozidde direnç oluşturduğunu kesinlikle söylemek zordur. Çünkü bir mikrobun direncinin fenotipini birkaç etken birden belirler.

Anaerobik bakteriler, streptokoklar zayıf elektron taşınımına sahiptirler ve küçük membran potansiyelleri vardır veya her ikisine de sahiptir. Bu nedenle bu mikroorganizmalar genellikle aminoglikozidlere karşı doğal direnç gösterirler.

Taşınım yokluğu yoluyla kazanılan direnç genellikle *Ps. aeruginosa*'nın izolatlarında ve daha az olarak Enterobakteri izolatlarında görülür. Aminoglikozidler belli bir yoğunluğa gelen dek aminoglikozid biriktirmezler, düşük düzeydeki aminoglikozid direnci mutasyondan, transdüksiyondan kaynaklanır (9).

**Diğer bakteri türleri ;** aminoglikozid dirençlerini ya yetersiz elektron taşınımına ya da membranların geçirgenlik potansiyellerinin azlığına borçludurlar. Bu duruma genellikle, insanların veya hayvanların antibiyotik tedavileri sırasında rastlanır. Çok yavaş gelişirler ve küçük fenotip kolonileri vardır (9, 11 ). Invitro laboratuvar deneylerinde ve hayvan modellerinden edinilen bir deneyimle bu suşlar büyük olasılıkla aminoglikozid tedavisinin bütün aşamalarında ortaya çıkabilirler ve tedavinin başarısızlığa düşmesinin nedeni olabilirler. Gram negatif bakterinin dış membranındaki porinleri etkileyen mu-

tasyonlar aminoglikozidlere direnç oluşmasına neden olabilir, fakat bu lipopolisakarit değişikliğinden veya eşleşmemiş elektron taşınımından veya membran potansiyelinden kaynaklanan dirençten daha az yaygın olan bir mekanizmadır. Streptomisin'e olan ribozomal direnç, ribozom 30 S alt ünitenin S-12 proteinindeki bir veya iki aminoasit değişimini içerir. Bu mutasyonlar yüksek düzeyde tek aşamalı dirence neden olurlar. Özellikle *Ps. aeruginosa* ve *Streptococcus faecalis*'te olduğu gibi. Son yıllarda yapılan bir çalışmada; *Staph. aureus* ile *Staph. epidermidis* arasında aminoglikozid direncini belirleyen plazmidlerin konjugatif transferi araştırılmıştır. Bu çalışmada Stafilokok'lara gentamisin direncinin insidensinden artış olduğu, bakteriler arasında konjugatif plazmid transferini etkileyen faktörlerin olduğu bulunmuştur. Bunlar ısı, pH, hücre dansitesi ve donör-resipiyent hücre oranları gibi faktörlerdir (3).

**Kasugamisin direnci :** Kasugamisin 70 S ribozomunun 30 S alt ünitesini etkileyen aminoglikozid bir antibiyotiktir. Protein sentezini inhibe eder. Fakat fenotip baskılamaya veya yanlış dizilmeye neden olmaz. Direncin sebebi mutasyondur. Bu mutasyon ribozomal proteinde değil, 16 S ribozomal RNA' da şekillenir. Kasugamisin direnci 16 S RNA' nın 3' ucuna yakın AACCG sıralanışında 2 adenin rezidüsünün metile edilememesiyle birlikte bulunur. Bu değişme ilacın ribozoma bağlanmasını önler.

*E. coli* ile yapılan bir çalışmada *E. coli*' K 12 suşunun antibiyotik dirençliliği ve enterotoksijenitesinin transfer edilebilmesi ile ilgili çalışma yapılmıştır. Antibiyotik dirençlilik ve enterotoksin üretimi için kodlanan genetik bilgilerin çalışılan suşlarda aynı plazmidde lokalize olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik dirençlilikte streptomisin, tetrasiklin'e karşı ısıya duyarlı ve ısıya dirençli enterotoksin üretebilen *E.coli* 710 B 5 suşu ile bu çalışmanın yapıldığı bildirilmiştir (14). *E.coli* suşlarına karşı dirençliliğin tetrasiklin, klo-ramfenikol, kanamisin ve ampisillin'e karşı oldukça yüksek olduğu ve çoklu direnci gündemde olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada fotosentetik bir bakteri olan *Ectothiorhodospina* spp. streptomisin'e dirençli genleri taşıyan plazmidlerin saptanmasında santrifügasyon, agar-jel elektroforez kullanılması ile bu bakterilerin pDG 1 plazmidleri saptanmış, hetero dubleks analizinde restriksiyon enzimleri ile kesilip izole edilen parçalar saflaştırılıp kromatografik yöntemle saptanıp elektron mikroskopta incelendiği bildirilmiştir (13).

Hayvanlardaki klinik salmonellozis olgularında özellikle 3 salmonella serotipi önem taşır. *S. dublin*' in ilaç dirençliliği yüzünden güçlü komplikasyonlara neden olduğu bildirilmiştir. *S. chlorea suis* infeksiyonları ile ilgili yapılan bir çalışmada tetrasiklinlere direnç görülmüş, *S.typhimurium*'da ise hayvanlardaki komplikasyonları yanında insanlar için et ve et ürünleri tüketimi açısından tehlike oluşturduğu bildirilmiştir. Ayrıca tetrasiklin'lere karşı direnç *S.dublin* ve *S. typhimurium* suslarının yüzdesinde artış gözlenmiştir (19).

İngiltere'de yapılan bir çalışmada, Salmonellaların antimikrobiyel dirençliliği incelenmiş, kullanılan antibiyotiklerin düşük yoğunluklarında direncin arttığı, yüksek yoğunluklarında bu oranı yarıya yakın azaldığı bildirilmiştir. Dirençli suşların oranı 1986'da pik yaparak yükselmiş sonra da düşüş göstermiştir. Bu durumun streptomisin'e duyarlı olan DT 204 C faj tipinin yükselmesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (46).



Tetrasiklin'lerin direnci yavaş ve çok aşamalı olur. Bir tetrasiklin'e dirençli olan mikroorganizma diğer tetrasiklin'lere de dirençli olur. Ancak, diğer tetrasiklin'lere dirençli olan *Staph. aureus* suşlarının minosiklin'e duyarlı olması gibi istisnalar da bulunmaktadır. Tetrasiklin'lere direnç oluşumu 2 mekanizma ile gerçekleşir.

1. Bakterilerinin sitoplazma membranında bulunan ve hücre içine aktif transportu sağlayan proteinin yapısındaki bozulmaya bağlanır. Bu durumda minosiklin örneği gibi fazla lipofilik olanlar basit difüzyonla bakteri içine girebilen tetrasiklin'lere karşı direnç oluşmayabilir. Ancak diğer tetrasiklin'lere karşı belirgin direnç oluşur.

2. Tetrasiklin'leri inaktive eden enzimlerin salgılanması başlangıçta duyarlı olan bakteri, ilaçla karşılaştığı zaman, indüklenme sonucu enzim salgılanması nedeni ile dirençli duruma gelir. Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalarda tetrasiklin'e direnç plazmidlerce sağlanır. Transpozon Tn. 10 ile taşınan tetrasiklin direnci Gram negatif bakterilerdeki bir çok direnç plazmidlerinde bulunur (27). *E.coli* en az 5 farklı tetrasiklin geninin direncinin belirlenmesi ile hücre duvarında yer alan 3 yeni protein sentezlediği ve bu proteinlerin tetrasiklinin hücre içinde girişini engelleyen transport sistem oluşturdukları bildirilmiştir. Tetrasiklin'lere dirençli olan *Str. pneumoniae* ve bazı *Staph. aureus* suşları, minosiklin ve doksisisilin'e duyarlı olabilir. Doksisisilin bazı *Bacteriodes* türlerinde etkilidir. Son yıllarda DNA-DNA hibridasyonu temeline dayanarak Gram pozitif ve Gram negatif aerobik ve anaerobik bakteri türlerinde 12'den fazla sınıfa ait tetrasikline dirençli determinantlar identifiye edildiği bildirilmiştir (29). Bu determinantlar A dan E'ye kadar olan sınıflar *Enterobakteri* ailesi üyelerinde, L, M, N, sınıflarındakiler ise gram pozitif organizmalar tanımlanmış ve Tet A, Tet B, Tet C gibi adlar verilmiştir (29). Tetrasiklinlerin yem katkıları olarak kullanılması ile tetrasikline dirençli *E. coli* suşlarının izole edildiği bildirilmiştir. Geçen yıllarda patojenik *E.coli* suşları arasında *Streptomisin*, sulfonilamid, tetrasiklin ve kloramfenikol grubu antibiyotiklere direncin arttığı bildirilmiştir. İçinde tetrasiklin bulunan yemlerin kullanıldığı çiftliklerde yapılan incelemelerde *CI. perfringens*'e tetrasiklin direncinin yüksek olduğu bildirilmiştir(45). Genetik çalışmalarda dirençli suşların 3'ünde tetrasiklin direncini kodlayan R-plazmidleri saptanmıştır (16).

Yapılan bir çalışmada evcil hayvanlardan izole edilen *Campylobacter jejuni* izolatlarının antimikrobiyel duyarlılığı incelenmiştir. Bütün izolatlarının antimikrobiyel duyarlılığı incelenmiştir. Bütün izolatlar eritromisin, gentamisin, furazolidon ve kanamisine duyarlı bulunmuştur. Bu izolatlarda tetrasiklin direnci % 7, Nalidiksik asit direnci % 8, ampisilin direnci % 37 ve sülfometatoksol-trimetoprim ve sefalotin direnci % 100 bulunmuştur (1). Tetrasiklin direncinin mekanizması ile ilgili moleküler çalışmalar yapıldığı ve SDS-PAGE (sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid gel elektroforesis) ve otoradiografik yöntemleriyle polipeptitlerin ayrıldığı, ayrıca ribozomlardan tet-A, tet-B'lerin total proteinlerin HPLC yöntemiyle belirlendiği bildirilmiştir (17, 32). Aerobik Gram negatif bakteriler tarafından meydana getirilen infeksiyonların öncelikli tedavisinde aminoglikozid grubu ajanlar tercih edilir. Bu ilaçların fazla dozunda ototoksisite nefrotoksisite ve dirençli bakteriler meydana

na gelmektedir. Tetrasikline dirençlilik arttıkça aminoglikozidlerin duyarlılığında artış görülmüştür. Tetrasiklin dirençli izolatlarda aminoglikozidlerin düşük konsantrasyonlarında dahi etkili antimikrobiyel aktivite sağlandığı bildirilmiştir (33).

Kloramfenikol'e direnç, enzimlerle inaktive edilerek oluşur. Plazmid kökenli kloramfenikol direnci, kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) yoluyla inaktivasyon sonucu oluşmaktadır. Enterobakteriler'de plazmid kökenli birkaç çeşit CAT bulunmuştur ve bunlar katalitik özellikleri, elektroforetik hareketlilik ve antijenitelerine göre tanımlanırlar. Gram negatif bakterilerde plazmid'de kodlanan en az 3 tip kloramfenikol asetiltransferaz enzimi vardır. Tip I, Tip II ve Tip III olarak adlandırılır. Tip I enziminin *Proteus mirabilis*'te Tip II enzimlerine *Haemophilus influenzae* ve *Bacterioides fragilis*'te Tip III enziminin ise *Streptokok* ve diğer Gram pozitif bakterilerde kodlanan CAT enzimlerinden ibaret olduğu bildirilmiştir (10, 11). Enzimatik olmayan kloramfenikol direnci Gram negatif bakterilerde görülür. *E. coli*'de kloramfenikole direnç gösteren plazmidlerin çoğu CAT içinde olmasına rağmen en azından bir plazmid kökenli enzimsel olmayan direnç mekanizması tanımlanmıştır. Son yıllarda bu çeşit kloramfenikol direncininin molekül yapısını çözmeye yönelik çalışmalar yapılmakta olduğu bildirilmiştir (11, 16, 27). Kloramfenikol'e düşük düzeydeki direncin, hücre zarındaki ilacın periplazmik boşluğa ulaşmak için kullandığı porinlerin mutasyon yolu ile kaybolması sonucu meydana geldiği bildirilmiştir (5, 10).

**Makrolitler :** Bu grup içinde Eritromisin, Oleandomisin, Spiramisin gibi antibiyotikler bulunmaktadır. Makrolit grubu antibiyotikler, protein sentezinin inhibisyonuna ve duyarlı bakterilerin 50 S Ribozomal alt üniteyi bağlayan bakteriyostatik etkisi ile gruplandırılır. Makrolit grubu antibiyotiklere dirençlilik; doğal izolatlarda metilasyon ile oluşur. Birçok Gram negatif bakterilerde bu ilaçlara doğal direnç vardır. Çünkü bunların dış membranları geçirgen değildir. Fakat bu arada *Bacterioides Spp.*'ler Linkomisin ve Klindamisin'e duyarlı bulunmuştur. *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus Spp.* gibi Gram pozitif ve *Bacterioides Spp.* gibi Gram negatif bakterilerde bu grup antibiyotik dirençlilik R plazmidlerince oluşmaktadır. *Bacillus lincheniformis*, *Str. pneumoniae* gibi türlerde makrolitlere dirençlilikte kromozomal dirençlilik bulunduğu bildirilmiştir. *Str. pyogenes*'e makrolit direnç determinantı Eritromisin ve Linkomisin tarafından oluşturulmuştur (11, 16).

**Eritromisin direnci :** Eritromisine direnç 50 S ribozomal alt ünitesindeki değişimle birlikte şekillenir. *E.coli* ve diğer bazı türlerde bu değişim 50 S alt ünitesinin spesifik proteininden oluşur. Bununla birlikte *Staph. aureus*'un dirençli suşlarında ilacın bağlanması 23 S ribozomal RNA'daki spesifik adenin dizisinin dimetilasyonu ile bloke edilir. Plazmid aracılıklı ribozomal RNA metilasyonu *Staph. aureus*'teki bu tip eritromisin direncinden sorumludur. Eritromisin dirençliliği ile ilgili insanlarda ağız *Streptokokları* üzerinde yapılan bir çalışmada diş tedavisi yapılan amoxycillin ve eritromisin direncinin olması bu hastalarda infektif endokarditis riskinin varlığını ortaya koymuştur (31).

Fusidik asit steroid bir antibiyotiktir. G faktör protein'e bağlı fonksiyonları

inhibe ederek bakterilerin protein sentezini engelleyebilir. Fusidik asidin G faktöre bağlanması G-Faktör-GDP komplekse bağlanmasını sabitleştirdiği ve aminoacyl tRNA'nın ribozoma bağlanmasını engellediği söylenir. Enterobakterilerde fusidik asid'e karşı kazanılmışı direnç görülmüştür. Bu ya kromozomal mutasyonlardan veya plazmidlerden kaynaklanabilir. Kromozomal mutasyonlar çeşitli G faktörlere sahiptirler ki fusidik aside olan plazmid kökenli direncin yapısı tam olarak henüz anlaşılamamıştır. Birçok plazmidin fusidik aside direnç gösterebildiği ve fusidik aside direnç gösteren genin aynı zamanda tip I CAT (kloramfenikol asetiltransferase)'a da direnç gösterdiği söylenmektedir (11, 16).

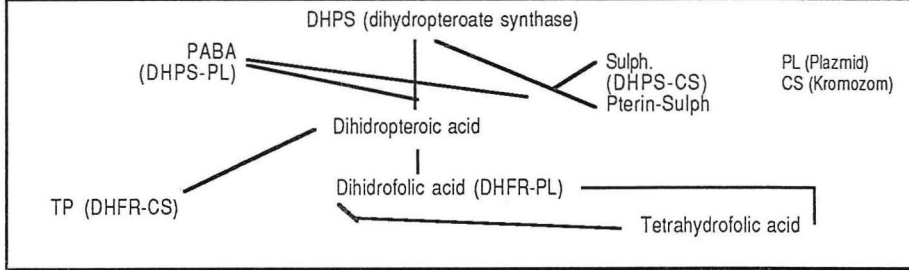
**Kinolon grubu ;** Antibiyotik etkinliği DNA fonksiyon ve sentezini engelleyen kinolon grubuna direnç ile ilgili yapılan bir çalışmada, Norfloxacin'e E. coli K 12 izolatlarının düşük düzeyde direnç oluşturduğu söylenmiştir. Nor A, Nor B ve Nor C olarak bildiren bu mutantlar 3 tipte sınıflandırılmıştır. Nor A DNA gyrase'in A subunitinde gyr. A lokusunda mutasyon ile sonuçlanır. Nor B kinolon ve diğer mikrobiyel ajanlara (cefoksitin, kloramfenikol, tetrasikline) düşük düzeyde direnç gösterir. Nor C ise, Norfloxacin ve ciprofloksacin'e düşük duyarlılık gösterir fakat hidrofobik kinolonlar gibi nalidiksik asit ve rosoxacin'in hidrofobik antibiyotikler, boya ve deterjanlara yüksek duyarlılık gösterdiği söylenmektedir (11, 22).

### 3. DEĞİŞİK METABOLİK YOLLAR GELİŞTİRİLME MEKANİZMASI :

Mikroorganizmalar, ilacın inhibisyon reaksiyonundan etkilenmeyen değişik bir metabolik yol geliştirebilirler. Örneğin bazı sülfonamid dirençli bakteriler ekstrasellüler PABA' e gerek duymazlar ancak memeli hücreleri gibi hücreler folik asit yapımında kullanabilirler. Sülfonamid ve Trimetoprim direnci bu mekanizma kapsamındadır.

**Sülfonamidler :** Bu ilaca karşı oluşan direnç, bir bakteride para amino benzoik asit (PABA) sentezinin artmasına, bakteri hücre membranının folik aside karşı permeabilitesinin artmasına bağlı olabileceği gibi, Dihidropteroate sentetaz (DHPS)'in sülfonamidlere affinitesinin azalmasına bağlı da olabilmektedir (16). Sülfonamidler' e direnç folik asit biyosentezinde gerekli olan dihidropteroat sentetaz enziminin sentezlenmesi ile sağlanır. Plazmid kontrolünde 2 farklı DHSP enzimi oluşturabilir. Sülfonamidler'le kromozomal direnç kontrolünde olan direnç ile oluşturulan enzimler ısıya dirençli iken, plazmid ısıya duyarlıdır. E.coli'de plazmidin kodladığı sülfonamid'e dirençli DHPS enziminin, normal enzimlere göre sülfonamidlere yaklaşık 1000 kez daha az bağlandığı söylenmektedir. Plazmid kontrolündeki sülfonamid direnci Gram negatiflerde yaygındır. Staph. aureus'a ise eritromisin ile birlikte sülfonamidlere direnç sağlayan bir R plazmidinin bulunduğu söylenmiştir (16,

Şekil- 4 Trimetoprim ve Sulfonamid dirençliliği



**Trimetoprim :** Bu gruba karşı oluşan dirençlilik Trimetoprime dirençli dihidrofolatreduktaz (DHFR) enziminin oluşması ile sağlanır. Bu enzim folik asit sentezi için gereklidir. Trimetoprime direncin plazmidlerce sağlandığı bilinmektedir. Plazmidlerin kodladığı trimetoprim direncinin en az 3 farklı DHFR enziminin etkisiyle oluştuğu bildirilmektedir. Bunların sağladığı direnç düzeylerinin farklı olduğu ve bazı suşlarda hem kromozomal hem de plazmid kontrolü ile dirençli DHFR enzimlerinin birlikte bulunduğu bildirilmiştir. Trimetoprim'in enterokok'lara karşı duyarlılığının belirlenmesi güçtür. Enterokok'ların sulfonamidlere doğal direnç gösterdiği söylenmektedir (11, 16)

#### 4 - BAKTERİLERİNİN ANTİBİYOTİĞİ İNAKTİVE EDEN ENZİMLER SENTEZLENMESİ :

Beta laktam antibiyotiklere ve Kloromfenikol'e direnç oluşumunda, bu antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin sentezlenmesi önemli mekanizmalardan biridir. Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasını hidrolize ederek penisilin ve sefalosporinleri inaktive ederler. Bakterilerin oluşturduğu beta-laktamaz, genetik olarak bakteri kromozomu veya bir plazmid tarafından kodlanabilir. Birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerle, mikobakteri cinsindeki bakteriler beta-laktamaz oluşturmaktadır. Gram pozitiflerinin sentezlediği beta-laktamazlar hücre dışı salgılanan, plazmidlerce kodlanan, indüklenebilen enzimlerdir. Penisilinlere etkili olup sefalosporinlere az etkilidir. Staph. aureus beta laktamazları, penisilin ve ampisilini yüksek derecede, meticillin, oksasilin, kloksasilinini az hidrolize ederler. Aerob, anaerob Gram negatif bakterilerin beta-laktamazları ise periplazmik boşlukta yer alır. Hücre duvarındaki porlardan geçen antibiyotiği inaktive ederek, sitoplazma membranındaki PBP'lerle birleşmelerini engellerler. Enterobacteriaceae serratia, citrobacter, providencia gibi bazı enterobakteri cinslerinde ve pseudomonas cinsinde indüklenebilen beta-laktamazlar bulunmuştur. Bu enzimler, penisilinleri, 1. ve 2. kuşak sefalosporinleri hidrolize ederler ve bakteride yüksek konsantrasyonlardaki antibiyotiğe karşı direnç oluştururlar.

Enterobakteri üyelerinde plazmidlerce kodlanan bir düzinenin üzerine beta-laktamaz saptanmıştır. Bunlar içinde sık görülen enterobakteri ailesindeki plazmidlerin % 75 - 80'ini oluşturan TEM-1 betalaktamazıdır ve Tn 4 transpozonda taşınır. Bu beta-laktamaz N. gonorrhoeae, H. influenza, Ps.

aeruginosa'da bulunabilir.

**Kadmiyum, Civa, Organik civa bileşikleri, arsenat, antiseptik ve dezenfektan maddeler :** Bu gruptaki dirence çoğunlukla Staph. aureus'ta rastlanır. Örneğin, kadmiyuma direnç sağlayan plazmidler yalnız Staph. aureus'a bulunur. Bu plazmidlerde Kadmiyum direnci ile ilgili en az 2 gen vardır (Cad A, Cad B). Bu genlerdeki direncin mekanizması kadmiyum ve çinkonun bakteri hücrelerinden dışarı atılımı şeklindedir. Plazmiddeki kadmiyum direnç genleri, birçok plazmiddeki beta-laktamaz genleri ile birlikte bulunur. Organik civa bileşiklerindeki dirençte organomerküryalliaz enzimi rol oynar. Bu enzim, karbon-civa bağıny ayırır. Oluşan (Hg++) civa redüktaz enzimi ile metalik civaya dönüştürülür. Arsenat direnci plazmide bağlıdır. Staph. aureus ve Gram negatif çomaklarda görülür. Akriflavin, ethidium bromür, dört değerli amonyum bileşikleri gibi maddelere direnç, bu maddelerin dışarı atılmaları ile sağlanır (16, 25).

## EPİDEMİYOLOJİK GÖRÜŞLER

Antibiyotiğe dirençlilik çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir. Bu nedenle antibiyotiklerin seçimi antibiyotiklere duyarlı veya dirençli bakterilerin ayrımları göz önünde tutularak yapılmalıdır. Transpozon ve kromozomal olarak plazmidlerce aracılığı ile mümkün olan direnç çeşitlerinin özellikler epidemiyoloji yönünden dikkate alınması gerekmektedir. Antibiyotiklere karşı dirençlilik farklı epidemiyolojik açılardan değerlendirilmektedir. Bunlar da; Tür epidemiyolojisi, Plazmid epidemiyolojisi ve Gen epidemiyolojisidir (18).

- **Tür epidemiyolojisi** (Anatomik ve fizyolojik özellikleri)
  - İdentifikasyon
  - Kimyasal tiplendirme
  - Serotiplendirme
  - Lizotiplendirme
- **Plazmid Epidemiyolojisi** (Plazmidlerin tranfer özellikleri)
- Genetik düzeyde :**
  - K 88, K 99 antijenleri gibi
  - Toksinler
  - Antibiyotik dirençlilik
  - Uyumsuzluk
- Biyofiziksel düzeyde :**
  - Moleküler ağırlık (boyut)
  - DNA kısmı (restriksiyon)
- Gen Epidemiyolojisi** (genlerin transpozisyon özellikleri)
- Genetik düzeyde :**
  - Antibiyotik dirençlilik
  - Toksinler
- **Biyofiziksel düzeyde :**
  - Heterodublex ve sekansların belirlenmesi

## KAYNAKLAR

- 1- Akhtar, S.Q. (1988) : Antimikrobiale Sensitivitat und Plasmid-Mediated Tetracycline Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated in Bangladesh. *Chemotherapy* 34, 326-331.
- 2- Akman, M. ve Gülmezoğlu, E. (1980) : Tıbbi Mikrobiyoloji. Hacettepe Üni. Yayın. No: A-15. Özbek Matbaası, Ankara.
- 3- Al-Masaudı, S.B., Russel, A.D. and Day, M.J. (1991) : Factors affecting conjugative transfer of plasmid pW G613, determining gentamicin resistance, in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 34, 103-107.
- 4- Arda, M. (1978) : Genel Bakteriyoloji A.Ü. Vet. Fak. Yayın No : 342. Ders kitapları, 242, Ankara Üni. Basımevi, Ankara.
- 5- Aydın, N. (1978) : Plazmidler, Epizomlar ve bunların kalıtsal olarak antimikrobiyel ajanlara dirençlilikteki rolleri. *Vet. Hek. Dern. Derg.* 48:6
- 6- Aydın, N., Istanbuluođlu, E. ve Aydın, N. (1984) : Yemlere katılan çeşitli antibiyotiklerin civciv ve piliçlerin barsak florasındaki koliform grubu bakterilerin direnç durumları üzerine etkisi. *Doğa Bilim Derg. seri D.* 8:5.
- 7- Ayhan, H. (1985) : İnsan ve hayvanlardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, antibiyotiklere duyarlılık ve kolisin plazmidini taşıma özellikleri üzerinde incelemeler. Yüksek Lisans Tezi. A.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Bilim dalı.
- 8- Bilgehan, H. (1981) : Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Ege Üniv. Ege Tıp Fak. Yay. No. 84, 126-165.
- 9- Bryan, L.E. (1988) : General mechanisms of resistance to antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 22. Suppl. A, 1-15.
- 10- Bryan, L.E. (1989) : *Microbial Resistance to Drug* : Springer-Verlag New York.
- 11- Chopra, I. (1988) : Mechanisms of resistance to antibiotics and other chemotherapeutic agents. *Journal of Applied Bacteriology. Symposium Supplement.* 1495-1665.
- 12- Cohen, S.N., Silver, R.P., Sharp, P.A. and Mc Coubrey, A.E. (1977) : Studies on the molecular nature of R Factors. *Ann. N.Y. Acad. of Sci.* 172-187.
- 13- Deragon, M.J., Corriueau, P. and Gings, G. (1990) : Plasmid from Photosynthetic Bacterium *Ectothiorhodospira* Sp. Carries a Transposable Streptomycin Resistance Gene. *Plasmid*, 23: 226-236.



- 14- Echeverria, P. and Murphy, J.R. (1980) : Enterotoxigenic Escherichia coli Carrying Plazmid Coding for Antibiotic Resistance and Enterotoxin Production. The Journal of Infectious Diseases.142(2), 273-278.
- 15- Eraksoy, H. (1988) : Antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Antibiyotikler, 12-14.
- 16- Foster, T.J. (1983) : Plazmid-Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and toxic metal Ions in Bacteria. Microbiological Rewiews. 47(3), 361-409.
- 17-Goodman and Gilman, S (1991) : The pharmacological Basis of Therapeutics. Pergaman Press member of Maxwell Mac Millian Pergaman Publishing Corporation. Newyork U.S.A., 49-83, 1018-1164.
- 18-Greenwood, D. (1989) : Antibiotic resistance in enterococci Journal of Antimicrobial Chemotherapy 24, 631-635.
- 19-Guillot, J.F. (1990) : Bases moleculaires et e'pide'miologiques de l'antibioresistance bacterienne Ann. Rech. Vet. 21,1-11
- 20-Guinee, P.A.M. (1971) : Bacterial drug resistance in Animals Ann. N. Y. Acad. Sci. 182, 40-51.
- 21-Herman, D.J. and Gerding, D.N. (1991) : Antimicrobial Resistance among Enterococci. Antimicrobial agents an Chemotherapy. 35 (1), 1-4.
- 22-Hirai, K., Aoyama, H., Suzue, S., Irikura, T., Iyobe, S. and Mitsuhashi, S. (1986) : Isolation and Characterization of Norfloxacin Resistant Mutants of Escherichia coli K-12 Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 30 (2), 248-253.
- 23-İstanbuluoğlu, E., İzgür, M. (1983) : Çiftlik hayvanlarından izole edilen E. coli suşlarının çeşitli metal bileşiklerinde direnç durumu ve R. plazmidleri üzerinde çalışmalar. A. Ü. Vet. Fak. Derg.. 30(2), 248-233.
- 24-İzgür, M. (1981) : Sağlıklı koyunlardan izole edilen E.coli suşlarının çeşitli özellikleri üzerinde incelemeler. Doktora tezi. A.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Bilim Dalı.
- 25-İzgür, M. (1983) : Kolisinler. A.Ü. Vet. Fak. Dergisi. 30 (2). 234-241.
- 26-Jaffe, A., Chabbert, Y.A. and Dercot,E . (1983) : Setection and Characterization of B-Lactam Resistant Escherichia coli K-12 Mutants Antimicrobial Agents and Chemotherapy 23(4), 622-625.
- 27-Kayaalp, O.S. (1984) : Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ulucan Matbaası, Ankara.

- 28-Lacey, R.W. (1975) : Antibiotic Resistance Plazmids of Staphylococcus aureus and Their Clinical Importance. Bacteriological Reviews, 30 (1), 1-32.
- 29-Levy, S. B., Mc Murry, L.M., Burdett, V., Courvalin.P., Hillen, W. Roberts, M.C. and Taylor, D.E. (1989) : Nomenclature for Tetracycline Resistance Determinants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33 (8), 1373-1374.
- 30-Livermore, D.M. (1991) : Mechanisms of resistance to B-lactam antibiotics. Scandinavian Journal of infectious Diseases. Suppl. 78(5) , 7-16.
- 31-Longman, L.P., Pearce, P.K., Mc Gowan, P., Hardy,P. and Martin, M.V. (1991): Antibiotic-resistant oral Streptococci in dental patients susceptible to infective endocarditis J. Med. Microbiol. 34, 33-37.
- 32-Manovathu, E.K., Fernandez, C.L., Cooperman, B. S. and Taylor, D. E. (1990) : Molecular Studies on the Mechanism of tetracycline Resistance Mediated by Tet (0) Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 34 (1), 71-77.
- 33-Merlin, T.L., Corvo, D.L., Gill, J.H. and Griffiths, J.K. (1989) : Enhanced Gentamicin killing of Escherchia coli by tet Gene Expression, Antimicrobial agents and Chemotherapy. 33 (2), 230-232
- 34-Mitsuhashi, S. (Edited by), (1977) : R. Factor Drug Resistance Plazmid University of Tokyo Press. Tokyo / Japon.
- 35-Montanari, M.P., Tonin, E., Biavasco, F. and Varaldo, P.E. (1990) : Further Characterization of Borderline Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Analysis of Penicillin-Binding Proteins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 34 (5), 911-913.
- 36-Novick, R. P (1989) : Staphylococcal plazmids and their replication. Annual Review Microbiology 43, 537-565.
- 37- Pechere, J.C. (1991) : Why are carbapenems active against Enterobacter cloacae resistant to third generation cephalosporins. Scand J. Infect. Dis. Suppl. 78 (5), 17-21.
- 38-Sookpranee, T.,Sookpranee. M., Melencamp, M.A. and Preheim L.C. (1991) : Pseudomonas pseudomallei, Common pathogen in Thailand Then is Resistant to the Bactericidal effects of many Antibiotics. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 35 (3) 484-489.
- 39-Şanlı, Y., Aydın, N., İzgür., Akman, A., Baydan.E. (1987) Sağıtıcı bazı antibiyotiklerin hayvan yetiştiriciliğinde verim arttırıcı ve koruyucu amaçlarla kullanılması sonucu bakterilerde gelişen direnç kazanma olgusunun invivo ve invitro olarak duyarlı mikroorganizmalarla araştırılması. Doğa Bilim Derg. Seri 11:1.
- 40-Şanlı, Y. (1988) : Vet. Farmakoloji. Kemoterapötik ilaçlar. Ankara Üniv. Vet. Fak.

Yay. No. 412.

41-Töreci, K. (1990) Bakteri Plazmidleri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları. N. 14.

42-Watanobe, T. (1971) : The origin of R Factors Annals NewYork Acedemy of Sciences. 182.

43- Willett, P.H. (1988) : Antimikrobiai Agents Bacteriel Physiology. 128-161.

44-Willson, P. J. (1990) : Haemophilus, Actinobacillus Pasteurella. Mechanisms of Resistance and Antibiotic Therapy. Can. J.Vet. Res. 54, 573-577.

45-Wray, C. (1988) : Some aspects of the accurence of resistant bacteria in the normal animal flora. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 18, Suppl. C. 141-147.

46-Wray, C., Beedell , Y. E. and McLaren, L.M. (1991) : A survey of Antimicrobial resistance in Salmonellae isolated from Animals in England and Wales During 1984-1987 Br. Vet. J. 147, 356-369.