

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAYVAN KÖKENLİ SALMONELLA VE SHIGELLA SUŞLARINDA ÇOKLU
ANTİBİYOTİK DİRENCİ VE İNTEGRON SIKLIĞI

Yasemin Ezgi ERTÜRK

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr.K.Serdar DİKER

ANKARA

2010

Hayvan kökenli salmonella ve shigella suşlarında çoklu antibiyotik direnci ve integron sıklığı.

ÖZET

Bu çalışmada, Ankara ve çevresinde yaşayan kanatlı çiftlik hayvanlarından ve barınaklarda yaşayan köpeklerden izole edilen, Enterobacteriaceae familyasından olan salmonella ve shigella'nın temel antibiyotik gruplarına dirençlilik özellikleri belirlendi. Hedef bölgeye uygun olarak tasarlanan primerler ile integron yapıları incelendi. Çalışmada yüksek oranda streptomisine ve sulfonamide direnç saptandı. Salmonella suşlarının %47.1'i streptomisine ve %50'sinin sulfonamide dirençli olduğu ortaya konuldu. Shigellaların ise %53.6'sının streptomisine %46.4'ü sulfonamide dirençli olduğu saptandı. Salmonellalarda çoklu direnç oranı %32.35, shigellalarda ise %32.14 olarak bulundu. Salmonella suşlarının %35.29'unda ve Shigella suşlarının %35.71'inde sınıf 1 integrin geninin varlığı bulunmuştur. Çalışma sonucunda integron varlığı ile çoklu antibiyotik direnci arasında ilişki saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: çoklu antibiyotik direnci, integron, hayvan, salmonella, shigella

Multiple antibiotic resistance and integrons of salmonella and shigella from animals

ABSTRACT

In this study, resistance profiles of Salmonella and Shigella strains, isolated from chickens and dogs around Ankara region, multiple antibiotic resistance to particular antibiotic groups has investigated. With the primers which are designed for the specific regions, class I and class II integron structures has been studied.

High resistance to streptomycin and sulfonamid has been detected. 47.1% of salmonella strains has been resistant to streptomycin and %50 to sulfonamid, and 53.6% of shigella strains has been resistant to streptomycin and 46.4% to sulfonamid. %32.35 of salmonella and 32.14 of shigella has multiple antibiotic resistance. 35.29% of salmonella and 35.71% of shigella strains contains class 1 integrase gene.

It was concluded that, there is a relation between integron presence and multiple antibiotic resistance.

Key words: multiple antibiotic resistance, integron , salmonella, shigella, animal

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitiminin boyunca bana her türlü araştırma olanağı sağlayan, çalışmaların yürütülmesinde yardımını ve katkısını esirgemeyen, her zaman bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. K.Serdar DİKER'e, araştırmalarım boyunca desteğini gördüğüm hocam Sayın Prof. Dr.Hakan YARDIMCI'ya, fikirlerini aldığım ve değerli önerilerini benimle paylaşan, teşviklerini eksik etmeyen Sayın hocam Prof.Dr.Cumhur ÇÖKMÜŐ'e başta olmak üzere Veteriner fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine,doktora ve yüksek lisans yapan arkadaşlarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca benim bugünlere gelmemde ellerinden gelen maddi ve manevi yardımı esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim çok değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1, Çalışmada Kullanılan Antibiyotiklerin Etki Ve Direnç Mekanizmaları	11
Çizelge 2, Antibiyotik Direncinde Rol Oynayan Genetik Elemanların Özellikleri	15
Çizelge 3, Salmonella ve Shigellada Dirençli Suş Sayısı.....	31
Çizelge 4, İncelenen Salmonella Suşlarının Antibiyotik Direnç ve İntegron Profili	33
Çizelge 5, İncelenen Shigella Suşlarının Antibiyotik Direnç ve İntegron Profili	35
Çizelge 6, Salmonella ve Shigella Suşlarında Çoklu Direnç ve İntegron Sayıları.....	36

SİMGELER DİZİNİ

Amp;	Ampisilin
Str;	Streptomisin
Gen;	Gentamisin
Kan;	Kanamisin
Eri;	Eritromisin
Cip;	Siprofloksasin
Nal;	Nalidiksik Asit
Tet;	Tetrasiklin
Sul;	Sulfametaksazol
XLD agar;	Xylose lysine desoxycholate Agar
DCA agar;	Deoxycholate Citrate Agar
CLED Agar;	Cystine Lactose Electrolyte Deficient Agar
TSB;	Tryptone Soya Broth
TBE;	Tris Boric Acid EDTA
EtBr;	Ethidium Bromide
IntI1;	Sınıf 1 İntegron
IntI2;	Sınıf 2 İntegron
dNTP;	Deoxynucleotide Triphosphate
cfu;	Colony Forming Unit
MBK;	Minimum Bakterisid Konsantrasyon
MİK;	Minimum İnhibitör Konsantrasyon

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
SİMGELER DİZİNİ	v
İÇİNDEKİLER	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Salmonella.....	2
2.2. Shigella.....	4
2.3. Antibiyotik	4
2.4. Antibiyotiklerin sınıflandırılması.....	5
2.4.1. Etki güçlerine göre	5
2.4.2. Etki mekanizmalarına göre	6
2.5. Temel Antibiyotik Grupları	7
2.5.1. Beta laktamlar	7
2.5.2. Makrolidler.....	7
2.5.3. Tetrasiklinler	7
2.5.4. Amfenikoller	8
2.5.5. Aminoglikozidler	8
2.5.6. Trimetoprim - Sulfametoksazol (tmp-smx)	8
2.5.7. Kinolonlar :Florokinolon	9
2.6. Antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları.....	9
2.7. Antibiyotik duyarlılık testleri(Antibiyogramlar)	10
2.8. Antibiyotik direncinin moleküler genetiği	12
2.8.1. Plazmidler	13
2.8.2. Transpoze edilebilir genetik elementler	13
2.8.3. Integronlar ve mobil gen kasetleri	14
2.9. Antibiyotik direncinin sınıflandırılması.....	15
2.9.1. Doğal direnç	16
2.9.2. Kazanılmış direnç	16
2.9.2.1. Kazanılmış direncin ortaya çıkmasındaki fenotipik mekanizmalar	17
2.9.2.2. Hücre çeperinin ilaca permeabilitesinin ve ilaç alımının azalması.....	19

2.9.2.3. Efluks pompaları	19
2.9.2.4. İlacın hücre içindeki hedefine bağlanmasının azalması ve enzim substitüsüonu.....	20
2.10. Çoklu Antibiyotik Direnci	22
2.10.1. Çoklu İlaç Direnci Gösteren Mikroorganizmalara Örnekler.....	22
2.10.2. Çoklu Dirençte Efluks Sistemleri	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Shigella İzolasyonu ve İdentifikasyonu	27
3.2.2. Salmonella İzolasyonu ve İdentifikasyonu	28
3.2.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	29
3.2.4. İntegronların Saptanması	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
6. KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	44

1.GİRİŞ

Gerek hayvan ve gerekse insanların Enterobacteriaceae familyasından olan, Salmonella ve Shigella infeksiyonlarına karşı etkili aşıların bulunmaması, bu etkenlerden ileri gelen infeksiyonların farklı yollarla tedavi edilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu şekildeki infeksiyonların tedavisinde başta florokinolonlar olmak üzere aminoglikozidler, makrolidler ve beta laktamlar kullanılmaktadır. Son yıllarda bu antibiyotiklerin kullanımında büyük bir artış görülmektedir. Yoğun antibiyotik kullanımı, bakteri popülasyonları üzerinde selektif baskı oluşturarak insan ve hayvanlarda dirençli bakteri oranının artmasına neden olmaktadır. Bugün için, bakteriyel infeksiyonlarda karşılaşılan en önemli sorun antibiyotik direncidir. Direnç genlerinin kazanılmasında ve yayılmasında etkili mekanizmalardan birisi hareketli genetik elemanlarla taşınmadır. Bu genetik elemanlardan plazmidler, konjugatif transpozonlar ve konjugatif plazmidlerde taşınan transpozonlar, direnç genlerinin bakteriler arasındaki horizontal yayılımından sorumludurlar.

Son zamanlarda, hareketli elemanlarca taşınan direnç genlerinin kazanılmasını sağlayan ve çoklu antibiyotik dirençliliğinden sorumlu doğal gen ekspresyon elemanları olan integronlar ve gen kasetleri tanımlanmıştır. Gen kasetlerinin bir integrondan ayrılarak aynı veya farklı bir türden bakterinin integronuna veya bakteriler arasında transfer olmak üzere bir transpozona girme yeteneğini bilmek önemlidir. Böyle bir genetik transfer, eğer yeni konak patojenik bir bakteriyse ve giren gen antibiyotik dirençliliği taşıyorsa özellikle önem taşımaktadır.

Çalışmadaki amaç, Enterik bakterilerden olan salmonella ve shigellanın uygulamadaki antimikrobiyal maddelere karşı moleküler düzeydeki direnç mekanizmalarının, dirençlilik epidemiyolojilerinin belirlenmesi ve yeni antimikrobiyal stratejilerin geliştirilmesi için gerekli temel bilgilerin sağlanmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Salmonella: Salmonellalar genel olarak 2.0-5.0 µm boyunda 0.7-1.5 µm eninde basil şeklinde peritrik kirpikleri aracılığı ile hareketli, sporsuz, kapsülsüz, gram negatif aerob ve ya fakültatif anaerob ve 20-40°C ler arasında üreyebilen bir bakteridir. Genellikle S tipi koloniler yaparlar. M koloni oluşturan türleride vardır (*Salmonella schottmuelleri*). Bunların M antijenlerinin bulunduğu ve anti O ayrıca anti H serumları ile aglutinasyonu engelledikleri bilinmektedir. Uygunsuz ortamlarda üreyen salmonellalar R koloniler de yaparlar.

Karbonhidratlardan,laktoz,sakkaroz,adenitol ve salisine etki etmezler ve bu şekilde diğer bakterilerden ayırt edilirler. H₂S yaparlar (*Salmonella parathypi A* hariç). IMVIC testi, üre negatif, ONPG deneyi negatif, lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri gruplara göre değişik özellikler gösterir. Isı, kuruluk, gün ışığı ve antiseptiklere duyarlı fakat soğuk ortamlara, bazı boyalara(malaşit yeşili gibi) ve nemli ortamlara çok dirençlidirler. Ayrıca Sodium deoxycholate koliform bakterilerin üremesini azaltmasına rağmen salmonella ve shigellaların üremesini etkilemez.Antijenik yapı olarak somatik (O),kirpik (H),ve yüzeysel (Vi,M,Fimbria) antijenleri bulunur.

Atlarda ve koyunlarda salmonellalardan ileri gelen yavru atmalar, domuz paratifosu ve kanatlıların pullorum-tifo hastalıkları olarak özetlenebilir. Atlarda salmonella abortusu, atlarda yavru atma ile karakterize olan bu enfeksiyon genellikle sporadik özelliktedir. Domuz paratifosu; akut, subakut ve kronik seyredabilen oldukça önemli bir enfeksiyondur. Kanatlıların pullorum-tifo hastalığı; *Salmonella pullorum*'dan ileri gelen enfeksiyonlar civcivlerin beyaz ishali diye adlandırılmaktadırlar. *Salmonella gallinarum*'dan ileri gelen enfeksiyon ise kanatlı tifosu olarak bilinen septisemik seyirli enfeksiyöz bir hastalıktır.

Somatik (O)Antijeni:Bütün salmonellalarda bulunur.Bu antijen protein ve lipidlere bağlı olan bir polisakkarit olup haptan özelliğindedir.Bu,polisakkarite bağlı 3-4 monosakkaritin oluşturduğu oligosakkarit grupları özgül antijeniklik özelliğini oluşturur. Isıya, alkole ve asitlere dirençlidir.Formol etkisiyle aktivitesini kaybeder.Bu özellikleri serolojik testler için özgül antijenlerin hazırlanabilmesini sağlar.

Kirpik (H) Antijeni: Hareketli olan bakterilerde bulunur. Protein yapısında ısı, alkol, asit ve proteolitik fermentlerin etkisiyle parçalanır. Formole dirençlidir. Bu özelliği ile serolojik testlere antijen süspansiyonu hazırlanır. H antijeni spesifik faz veya faz 1 antijeni ve nonspesifik ve ya faz 2 antijeni adı verilen 2 antijenik özellik gösterir. Faz 1 antijenleri a, b, c diye adlandırılırken faz 2 antijenler 1, 2, 3 diye adlandırılır.

Vi Antijeni: Somatik antijenin yapısında glikolipid yapısında bir antijendir. Bütün salmonellalarda bulunmaz. Vi antijeni O antiserumu ile aglütinasyonu engellediği için 60 derecede 1 saat ısıtılan bakteri Vi antijenini kaybederek O antiserumu ile aglütinasyon verebilir.

M Antijeni: Mukoid koloni yapan bakterilerde bulunur. O antiserumu ile aglütinasyonu engellediği için 100°C'de 2.5 saat ısıtılarak etkisi giderilebilir.

Fimbria(Pilus) Antijeni: Formole dayanıklı fakat 100°C'de 30 dakikada kaybolan bir antijendir. Kendi spesifik antiserumu ile aglütinasyon yapar.

Salmonellalarda çeşitli antijenik değişiklikler görülebilir. Bunlar; OH 'dan O değişikliği, faz değişikliği, vi antijen varyasyonu, S-R değişikliği, O antijen değişikliği gibidir.

Enterobacteriaceae ailesindeki Salmonelleae kabilesinde bulunan salmonella cinsinin sınıflandırımı çok karmaşıktır. Salmonella cinsinde iki tür yer alır: *Salmonella entérica* ve *Salmonella bongori*. Salmonella entérica türü ise 6 alttüre ayrılır: entérica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae ve indica. Salmonella cinsindeki bakterilerde bugüne kadar yaklaşık 2400 serotip tanımlanmıştır. *S. entérica* subsp enterica'nın 1300 kadar serotipi vardır. İnsan ve sıcakkanlı hayvanlardan izole edilen serotipler bu alttüre aittir. *S. enterica*'nın diğer alttüreleri ve *S. bongori*'de bulunan serotipler ise soğukkanlı hayvanlarda ve çevrede bulunan serotiplerdir (Old 1998). Bu cinsin sınıflandırma ve adlandırılması defalarca değiştirilmiştir.

Karışıklığı önlemek için CDC' nin de önerisi ile *S. entérica* subspecies entérica içinde yer alan serotiplerin tür adları gibi adlandırılma alışkanlığı sürmektedir. Örneğin, *S.entérica*, entérica serotip Typhi yerine Salmonella serotip Typhi veya *Salmonella Typhi* ,

hatta kısaca Typhi şeklinde kullanılması, bu arada serotip isminin büyük harfle başlaması ama italik yazılmaması kabul edilmektedir.

2.2.Shigella: Enterobacteriaceae familyası üyesidir. Gram (-), hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif anaerop, oksidatif ve fermentatif metabolizmaları bulunan, insanlar için patojen özellik gösteren bir basildir. Bu bakterinin bulunması ve ilk defa tanımlanması Japon bilim adamı Kiyoshi Shiga tarafından yapılmıştır. Shigella cinsi bakteriler (O) somatik antijen yapıları ve mannitol üzerine etkilerine göre A, B, C, D diye gruplara ayrılır. Bu gruplar; *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* ve *Shigella sonnei* 'dir. Shigella'lar hareketsiz olmakla beraber sadece Tip -1 fimbria bulunan *S. flexneri* 'de hareket görülür. Shigella'lar hareketsiz olmaları ile salmonella'lar dan ayrılırlar. Diğer bağırsak bakterilerine etki gösteren bacteriosin yaparlar. Bakteri parçalandığı zaman lipoprotein yapısında ve endotoksin özelliği gösteren (O) somatik antijeni açığa çıkar. Shigellalar dan sadece *S. dysenteriae* bulunduğu ortama ekzotoksin salgılar. Shigellalar kalın barsak mukoza epitelinde ödem, bol mukus salgınması, abseler ve ülserasyonlar meydana getirirler. Bu bakteriler, sulu, nemli ve gün ışığından uzak ortamlarda uzun süre canlı kalabilirken yüksek ısı, gün ışığı ve antiseptiklere dirençsizdir. Shigella etkenleri özellikle insanlar ve bazı maymunlar için hastalık etkenidirler. Bu canlılarda genellikle ishal ve dizanteri oluştururlar. Hayvanlarda nadiren infeksiyon yapan bu etkenlerden özellikle köpek, kedi ve sığırlarda bazı olgularda *S.flexneri*'ye rastlanmıştır. Shigella enfeksiyonları dünyada ve ülkemizde bakteriyel ishalin en sık görülen nedenidir. Kramp tarzında karın ağrıları, tenesmus ve kanlı mukuslu ishale kendini gösteren klasik basilli dizanteri hastalığını oluştururlar. Shigella'lar oldukça virülan enterik patojenlerdir, özellikle epidemi durumlarında yüksek ölüm oranlarına neden olurlar. Hastalık özellikle yaz aylarında daha fazla görülmektedir. En çok 1-5 yaşları arasındaki çocuklar etkilenmektedir. Shigella enfeksiyonları fekal-oral yolla bulaşmaktadır. Mide asidine dirençli olduğundan hızla ince barsak boşluğuna geçerek çoğalmaya başlamakta daha sonra kolon duvarına invaze olmaktadır. Mukozal ülserasyonlar, hemorajik inflamatuvar eksuda, ateş, kramp tarzında karın ağrıları ve kanlı ishal meydana getirmektedirler.

2.3.Antibiyotik: Bakterilerin çoğalmasını engelleyen(bakteriyostatik) ya da bakterileri öldüren(bakteriyosidal) biyolojik kaynaklı veya sentetik olarak elde edilen maddelerdir (Corvalin 1994).

İnfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotikler son 50 yılda önemli faydalar sağlamışlar ve eskiden ölümcül olduğu bilinen çoğu hastalığın tedavisi için vazgeçilmez unsurlar haline gelmişlerdir. Ancak antibiyotiklerin uzun zaman ve bazen gereksiz yere kullanılmaları sonunda mikroorganizmaların ilaçlara karşı direnç kazanmaları son yıllarda çağdaş tıbbın en önemli problemi olarak ortaya çıkmıştır.

2.4. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

2.4.1. Etki güçlerine göre:

Vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılır.

Bakteriyostatikler: Bunlar bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önlerler. Gelişmesi ve üremesi duran bakteriler, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilirler. Bakteriyostatik etki gücünün göstergesi “Minimum İnhibitör Konsantrasyon = MİK”dır.

- Tetrasiklinler
- Makrolitler
- Sülfonamidler
- Amfenikoller

Bakterisidler: Bunlar bakteri hücrelerini dolaysız olarak yok ederler. Bakterisid etki gücünün göstergesi “Minimum Bakterisid Konsantrasyon = MBK”dir.

- Beta-Laktamlar:
- Florokinolonlar
- Vankomisin

2.4.2.Etki mekanizmalarına göre;

Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive edenler:

- Beta-Laktamlar
- Vankomisin

Ribozomlarda protein sentezini bozanlar:

- Makrolidler
- Tetrasiklinler
- Aminoglikozidler
- Amfenikoller

Bakteri genetik materyali üzerine etki yapanlar (DNA ve RNA sentezini bozanlar):

- Florokinolonlar (Akkan 1997)

2.5.Temel Antibiyotik Grupları

2.5.1.Beta laktamlar

Molekülünün antibakteriyel etkisinden sorumlu çekirdek kısmında betalaktam halkası içeren antibiyotiklere betalaktam antibiyotikler veya kısaca betalaktamlar adı verilir. Betalaktam halkası biri azot, üçü karbon olan 4 üyeli doymuş bir halkadır. Penisilin ve Ampisilin beta-laktam grubunda en bilinen örnektir, duyarlı bakterilerin murain'den oluşan hücre duvarını etkileyerek bakterisid etki gösterir.

2.5.2.Makrolidler

Bakterilerde RNA bağımlı protein sentezini geri dönüşmlü olarak inhibe ederek bakteriyostatik etki ederler.Bu etkinliklerini 70S ribozomun 50S altünitesine bağlayarak aynı yere tRNA bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını önleyerek sağlarlar. Eritromisin en bilinen örneği olup, gram (+) kok ve basillere karşı güçlü etkinlik gösterir.

2.5.3.Tetrasiklinler

Tetrasiklinler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakteriyostatik etki oluştururlar. Bakteri hücresi içine girdikten sonra ribozomların 30 S alt birimine bağlanırlar ve böylece 50S alt birimlerinin akseptör noktasına aminoasil transfer RNA'nın bağlanmasını bloke ederler ve peptid zincirine aminoasid eklenmesini olanaksız duruma getirirler. Tetrasiklinler oldukça fazla sayıda ve çeşitli gruplardan bakterilere ve ayrıca riketsiyalara, klamidyalara, spiroketlere, mikoplazmalara, leptospiralara ve bazı protozoonlara karşı etkilidirler.

2.5.4. Amfenikoller

En bilindik örneği kloramfenikoldür. Kloramfenikol, gram (+) kok, aerob ve anaerob gram (+) basiller, gram (-) bakterilerin çoğuna karşı duyarlıdır. Enterik bakteri grubuna karşı etkinliği değişkendir. Kloramfenikol, bakteri ribozomlarının 50S alt birimine bağlanarak peptidil transferaz enzimini bloke eder ve böylece protein sentezini tersinir şekilde inhibe ederler.

2.5.5. Aminoglikozidler

Bakteri ribozomlarının 30S alt birimine bağlanarak, ribozomlarda protein sentezini inhibe eder ve m-RNA'nın taşıdığı genetik kodun yanlış okunmasına neden olurlar. Bunlara en duyarlı olan bakteri grubu gram (-) aerobik basillerdir. Aminoglikozidler, penisilinler ve sefalosporinler ile geğimsizlik gösterirler, kimyasal olarak birleşip birbirlerini inaktive ederler. Streptomisin, gentamisin ve kanamisin aminoglikozid grubu antibiyotiklerdendir.

2.5.6. Trimetoprim - Sulfametoksazol (tmp-smx)

Ko-trimoksazol olarak da bilinir. Sulfametoksazol (SMX), bir sulfonamiddir. Sulfonamidler para-animo-benzoatın folik aside modifikasyonunu kompetitif olarak inhibe ederler. Trimetoprim (TMP), bakteriyel dihidrofolat redüktazı kompetitif olarak inhibe eden bir diaminopirimidin'dir. Her iki ilaç tek başlarına kullanıldığında görülmeyebilecek olan sinerjistik bakterisid etkiye yol açarak birçok gram (+) ve (-) bakterileri etkiler.

Genel bir kural olarak, TMP-SMX'un içindeki iki antibakteriyel ilacın maksimum sinerjistik etkinliği, her iki ilaca da duyarlı olan bakteri türleri üzerinde meydana gelir. Etkinliğin belirlenmesinde TMP'e duyarlılık daha önemlidir.

2.5.7.Kinolonlar

Florokinolon en bilinen örneği olup tamamen sentetik olan bu grubun ilk üyesi nalidiksik asiddir. Kinolonlar, DNA-giraz enzimini inhibe ederek bakterisid etki gösterirler. Kinolonların etkisine maruz kalan bakteriler bölünemezler, anormal şekilde uzayıp ölürlür. Daha çok gram (-)' ler olmak üzere gram (+) bakterilerde de etkilidirler (Anonim 2009, <http://kbb.uludag.edu.tr/antibiyotik05.htm>).

2.6.Antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları

Direnç (Rezistans): Patojen mikroorganizma veya suşun, ilacın kullanıldığı doz aralığında, serumda meydana getirdiği konsantrasyon düzeyinde ilaç tarafından etkilenmemesi demektir.

Tarihteki ilk direnç mekanizması 1940' lı yılların ortalarında penisilinin yaygın biçimde kullanıma girmesi sonucu *Staphylococcus aureus* suşlarında penisilinazların varlığıyla saptanmıştır. 1946 yılı öncesi hastanede izole edilen *S. aureus* suşlarının %90' ından fazlası penisiline duyarlı iken, 1952 yılında suşların %75' i dirençli olarak saptanmıştır. 1960' lı yılların sonunda penisiline dirençli suşların topluma yayılması ve tüm izolatların %90'ından fazlasının penisiline direnç kazanması hayal kırıklığına neden olmuştur. Sonraki yıllarda bulunan her yeni antibiyotiğin kullanıma girmesinin ardından, belirli bir süre sonra bakterilerin direnç geliştirmesi değişmez bir kural haline gelmiştir. 1980' lerde geniş spektrumlu sefalosporinler ve 1990'larda ise florokinolonlar geliştirlmiştir, ancak günümüzde *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Enterococcus faecium* gibi bakteriler bu antibiyotiklere de direnç geliştirmişlerdir (Derzef 2005).

2.7. Antibiyotik duyarlılık testleri (Antibiogramlar)

Günümüzde halen dirençli organizmaların saptanmasında antibiyotik duyarlılık testleri kullanılmaktadır. In vitro antibiyotik duyarlılık testleri, bir bakteriyel patojenin bir antibiyotiğin tedavi sırasında ulaşılan in vivo düzeylerine duyarlı olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla uygulanmaktadır.

Antimikrobik ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda uygulanan testlerle genellikle ilaçların inhibitör (bakteriyostatik) aktivitesi değerlendirilir. Bu amaçla uygulanan yöntemler;

Katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme (dilüsyon) yöntemleri

Disk difüzyon yöntemi

(Jorgensen 1997, Gülay 1999)

Seyreltme yöntemlerinde standart bakteri topluluğu, iki katlı dilüsyonlar şeklinde değişen yoğunluklarda antimikrobik ajan ile karşılaştırılır. İnkübasyon süresi sonunda gözle görünür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobik ilaç yoğunluğu saptanır. Buna Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) denir ve (mg/L) şeklinde ifade edilir. MİK değerinin duyarlılığı mı yoksa direnci mi temsil ettiğini belirlemek için, bulunan konsantrasyon duyarlılık sınırı adı verilen bir değer ile karşılaştırılır. MİK, bu sınırdan düşük ise mikroorganizma söz konusu ajana “duyarlı” olarak değerlendirilir. Bunun dışında “orta” ve “dirençli” kategorileri de bulunur.

Duyarlılık sınırları, sağaltım sırasında ulaşılan serum ve doku düzeyleri ile, duyarlılık özelliği kesin olarak bilinen bakterilerin MİK değerleri göz önüne alınarak belirlenmektedir. Her antimikrobik ajan için bakteri türüne göre de değişen ayrı bir sınır değer söz konusudur. Genel olarak sağaltımın başarısı için MİK değerinin serum düzeyine (Cmax) kıyasla 4-16 kez düşük olması istenmektedir (Craig 1998). Seyreltme temeline dayanan testler kantitatif sonuç verdiği için yeğlenmektedir. Sıvı besiyerindeki seyreltme yöntemleri, tüpte uygulanıyorsa makro (tüp) dilüsyon, mikrodilüsyon plaklarında uygulanıyorsa mikrodilüsyon olarak adlandırılır (Jorgensen 1997).

Diğer bir yöntem olan disk difüzyon yönteminde ise; belirli bir miktar antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylece diskteki antibiyotik agarın içerisine gittikçe azalan miktarlarda yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur (inhibisyon zonu). İnhibisyon zonunun çapı, bakterinin duyarlılığı ile direkt olarak ilişkilidir. Her antibakteriyel için standart değerler vardır. Disk etrafında inhibisyonun görülmemesi, bakterinin o antibakteriyele karşı dirençli olduğunu gösterir. Bu alanın çapı ölçülerek duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) olacak şekilde duyarlılık dereceleri belirlenir.

Çizelge 1: Çalışmada Kullanılan Antibiyotiklerin Etki Ve Direnç Mekanizmaları;

ANTİBİYOTİK	HEDEF YERİ	ETKİ MEKANİZMASI	DİRENÇ MEKANİZMASI
HÜCRE DUVARI			
BETA LAKTAMLAR	Transpeptidaz/Transglikozidaz	Peptidoglikandaki çapraz enzimlerin blokajı	Beta laktamazlar ve PBP mutantları
VANKOMİSİN	Peptidoglikan ve Lipid II'nin D-Ala-D-Ala Ucu	Çapraz bağlanma için gerekli substratın ayrılması	D-Ala_D-Ala'nın tekrar programlanması
PROTEİN SENTEZİ			
MAKROLİDLER	Peptidiltransferaz,Ribozom	Protein sentezi blokajı	RNA metilasyonu,efluks
TETRASİKLINLER	Peptidiltransferaz	Protein sentezi blokajı	Efluks
AMİNOGLİKOZİDLER	Peptidiltransferaz	Protein sentezi blokajı	İlacın enzimatik modifikasyonu
DNA REP./TAMİRİ			
FLOROKİNOLONLAR	DNA Giraz	DNA replikasyonu blokajı	İlaç direncine giraz mutasyonları.

(Walsh 2000)

2.8. Antibiyotik direncinin moleküler genetiği

Genetik değişim mikrobiyal evrimin olabilmesi için gereklidir. Bir mikroorganizmanın yaşamı çevresel şartlardaki değişikliklere adapte olabilme kapasitesine bağlıdır. Antimikrobiyal ajanlar kendilerine direnç geliştirme yeteneği olan bakteri toplulukları üzerinde kuvvetli seçici bir baskı uygularlar.

Genetik değişkenlik çeşitli mekanizmalarla meydana gelebilir. Küçük evrimsel değişiklik olarak tanımlanan nokta mutasyonları bir nükleotid baz çiftinde meydana gelebilir. Bu mutasyonlar antimikrobiyal ajanın aktivitesini engelleyecek hedef bağlanma yerlerini değiştirebilir. Mesela eskibeta laktamaz genlerinin (TEM-1, SHV-1) kritik bölgelerindeki nokta mutasyonları yeni ve geniş spektrumlu beta laktamazların gelişiminden sorumlu olabilir (Medeiros 1997). Bakterilerde görülebilen diğer bir genetik değişiklik ise büyük bir DNA segmentinin yeniden düzenlenmesidir. Bakteri genomundaki büyük bir segmentde gerçekleşen bu yeniden düzenlenme, genomun kalan kısmından bağımsız olarak hareket edebilen transposon'lar veya insersiyon dizilimleri olarak bilinen spesifik genetik elementler aracılığı ile gerçekleştirilebilir (Gold 1996).

Bakteri kromozomunun veya plazmidinin bir bölgesinden büyük bir DNA segmentinin bir diğer yere inversiyon, duplikasyon, insersion, delesyon veya transpozisyon ile taşınarak yerleştirebilir. Bakterilerdeki diğer bir değişiklik ise plazmidler, bakteriofajlar, yalın DNA dizilimleri veya transpoze edilebilir genetik elementler aracılığı ile gerçekleşen yabancı bir DNA segmentinin kazanılmasıdır. Ekstrakromozomal elementlerden yabancı DNA'nın kazanılması antimikrobiyal ajanlara maruz kalma sonucu ortaya çıkan seçici baskının üstesinden gelmede organizmanın yeteneğine katkıda bulunur. Bu mekanizmalarla her hangi bir antimikrobiyal ajana direnç gelişebilir.

Örneğin, vankomisine dirençli *S.aureus* yada çok ilaca dirençli *Yersinia pestis* gibi. Antibiyotik direnç (R) geni bir kez geliştikten sonra bu direnç transformasyon, transduksiyon, konjugasyon veya transpozisyon ile bakteriler arasında yayılır (Lupski 1987).

2.8.1.Plazmidler

Plazmidler, 4-400 kilobazlık sirküler , çift sarmallı DNA içeren ekstrakromozomal genetik elementlerdir. Bağımsız ve kendi kendilerine çoğalabilirler. Replikasyon için bir orijine ve konakçı bakteri içinde sürekliliğini sağlayacak genlere ihtiyaçları vardır. Bazı plazmidler özellikle büyük olanlar konjugatifdir (R plazmidler). Konjugatif plazmidlerin ayrıca kendilerinin transferini sağlayacak ilave genlere de ihtiyaçları vardır. Bazı küçük plazmidler birlikte var olduğu konjugatif plazmidin konjugasyon aparatını kullanarak kendi transferlerini gerçekleştirebilirler. Bir bakteride belirli bir plazmidin birden fazla kopyası olabileceği gibi farklı birden fazla plazmid de aynı bakteride olabilir. Ancak bir biri ile yakın ilişkisi olan plazmidler genellikle aynı bakteride olmazlar. Plazmidler bakterilere antibiyotik direnci yanında bakterinin virülansını ve metabolik kapasitesini değiştirebilecek özelliklerde kazandırabilirler (Thompson1986).

Plazmidler antibiyotik direncinin hızla yayılmasına yol açabilirler. Bu yayılımı birkaç yolla yapabilirler. Belirli bir organizmanın tek bir klonunun mutasyon geçirmesi veya bir plazmidi kazanması ile dirençli hale gelebilir. Meydana gelen bu dirençli organizma belirli yerlere özellikle iyi adapte olabilmelerini sağlayan genlere sahiptir ve böylece genişçe yayılabilme yeteneği bulunur. Plazmidlerdeki direnç genleri küçük mobil genetik elementler (transposonlar, integronlar, gen kasetleri gibi) içine yerleşebilir ve bazen direnç topluluğundaki diğer direnç genleri ile bağlantılı plazmidlere veya kromozomlara geçebilirler. Bu şekilde bir biri ile ilişkisiz birden fazla ilaca karşı eş zamanlı direnç gelişebilir (çoklu ilaç direnci) (Courvalin 1994).

2.8.2.Transpoze edilebilir genetik elementler

Mobil genetik elemanlar ,aynı veya farklı kromozom veya plazmid de kromozomun bir yerinden diğer bir yere hareket edebilen elementlerdir. Transposon'lar (2-20 kb büyüklüğünde) ve insersiyon sekansları (araya girebilen dizilimler 0.2-6 kb büyüklüğünde) olarak adlandırılan iki tip transpoze edilebilir genetik eleman vardır.

Bu elemanlar kendi kendilerine replike olamazlar, ancak kromozomla veya plasmidle beraber replike olabilirler. Her ikisi de bağımsız bir ünite olarak yer değiştirebilirler.

Hem insersiyon sekansları hem de transposonlar kendi sınırlarında ters dönmüş kısa DNA tekrarları içerirler. Tersine dönmüş tekrarlar, kromozom veya plasmidin transpozisyonu için gereklidir. Transpozisyon genellikle replikatiftir ve hedefin duplikasyonuna neden olur. Bazı transposonlar bir bakterideki kromozomdan bir diğerine direkt olarak geçebilir (konjugatif transposon). Konjugatif transposonlar gram pozitif bakterilerdeki kromozomal direncin transferinden sorumludur (Georgopapadakou 2003).

2.8.3.İntegronlar ve mobil gen kasetleri

İntegronlar belirli bir yere lokalize bir veya daha fazla direnç geni ve mobil elementlerdeki (gen kasetleri) direnç genlerini yakalayabilen, yere spesifik rekombinasyon sistemleri için bir gen içeren mobil genetik elementlerdir. İntegronlar farklı yapıya sahiptir. Plasmid veya transposonun bir parçası olabilir. Bir integron'un gerekli bileşenleri yere spesifik rekombinasyon için gerekli enzimleri kodlayan 5'korunmuş zincirde bir integron geni, bitişiğinde gen kasetleri için reseptör yeri ve gen kasetlerinin ekspresyonu için uygunca yönlendirilmiş bir promotordan oluşur. En iyi bilinen integron familyasına örnek olarak sulfonamid direncinden sorumlu dihidropteroate sentetazı kodlayan sull geni verilebilir.

Gen kasetleri bir veya daha fazla gen ve her bir genin 3' ucunda 57-141 baz çiftlik integraz spesifik rekombinasyon bölgesi bulundurur. Tanımlanmış olan en az 50 gen kaseti vardır. Gen kasetleri transposonların bir parçası olmalarına rağmen transposon değildirler.

Tersinir tekrarları veya transpozisyon fonksiyonları yoktur. İntegronlar içindeki korunmuş kaset dizilimleri farklı plasmidlerdeki integronlar arasında kaset değişimine sebep olabilir. Böylece direnç genlerinin yayılmasında etkilidirler (Georgopapadakou 2003, Collis 1995).

Çizelge 2: Antibiyotik Direncinde Rol Oynayan Genetik Elemanların Özellikleri

GENETİK ELEMAN	GENEL KARAKTERLER	DİRENÇ ETKENLERİ(ÖRNEKLER)
PLAZMİD	(1->100kb)arasında değişen,konjugatif,hareket yeteneği olan	R Faktoru,Çoklu direnç
İNSERSİYON SEKANSLARI	Küçük(<2.5kb)ters tekrarlar içerir.(Transpozon)	IS1,IS3,IS4...
BİRLEŞİK TRANSPOZON	İnsersiyon sekanslarıyla ve/veya ters tekrarlarla çevrilidir.	Tn 5:Kan,Bleo,Str
KOMPLEKS TRANSPOZON	Büyük(>5kb)küçük ters tekrarlarla çevrili(transpozon,rekombinaz)	Tn1 ve Tn3 :B-Laktamaz
KONJUGATİF TRANSPOZON	Kendi kendine transfer olabilir.	Tn 916:Tet ve Mino
TRANSPOZE BAKTERİYOFAJ	Kromozoma eklenebilen bakteriyel virus.	Mu
İNTEGRON	Gen kasetlerinin edilmesini ve yayılmasını kolaylaştırır.Çoklu direnç geninin ekspresyonu için;integraz, bağlanma bölgeleri ve transkripsiyon elementlerini tanımlar.	Sınıf 1:MDR efluks pompaları(Qac)b Sınıf 2:Tmp,Strp,Str Sınıf 3:Karbanapen Sınıf 4:Vibrio spp.Süper-integron

(Alexhun 2007)

2.9.Antibiyotik direncinin sınıflandırılması

- Doğal direnç
 - Kazanılmış direnç
- a) Mutasyona bağlı kazanılmış direnç
 - b) Direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direnç (Plazmid veya transpozon).

2.9.1.Doğal direnç:Temelinde mikroorganizmaların metabolik olarak inaktif fazda bulunması veya ilacın etki mekanizmasına uygun hedef yapıların bulunmaması vardır. Örneğin; *Mycobacterium tuberculosis*'in kalsifiye odaklarda metabolizması yavaşlamış olarak uzun süre canlı kalabilmesi ve bunun sonucunda antitüberküloz ilaçlara dirençli olması verilebilir. Bir diğer örnek hücre duvarı olmayan mikoplazmaların betalaktam antibiyotiklere olan direncidir.

2.9.2. Kazanılmış direnç

- a) Mutasyona bağlı kazanılmış direnç; Bu şekilde rezistansa yol ačan mutasyon olayı bakterinin ilaç ile temasına bağlı değildir. (İlacın nadiren mutajenik özelliği olması hali hariç) ve arada bir neden sonuç ilişkisi bulunmaz. Mutasyon bakteride genellikle spontan olarak oluşmaktadır. İlaçla temasta olan ve olmayan iki bakteri popülasyonunda mutasyon sıklığının genellikle aynı olduğunu gösteren gözlemler vardır. Spontan mutasyonun bakteride bir kuşak boyunca hücre başına sıklığı 10-5-10-10 oranındadır. Kromozomal mutasyonla oluşan kazanılmış direnç tek veya çok aşamada oluşabilir.
- Bir aşamalı mutasyon (one step mutation): Antibakteriyel ilaçla bir veya birkaç temastan sonra birden ve ileri derecede bir rezistans oluşur. Mesela,Streptomisin ile tedaviye başlandıktan 3-4 gün gibi kısa bir süre sonra, üriner kanalda iltihaba neden olan bazı bakterilerin, bu arada *Haemophilus influenzae*'nin streptomisine karşı ileri derecede rezistans hale geldiği saptanmıştır. Rifampin'e karşı *E.coli* ve *S.aureus*'ta bu tipte bir rezistans oluşur.
 - Çok aşamalı mutasyon (multiple step mutation): Rezistans yavaş olarak, derecesi gittikçe artan bir biçimde oluşur. Buna penisilin tipi rezistans da denir. Bu tipteki rezistansın gelişmesi için DNA molekülünde farklı yerlerdeki genlerde birbirini izleyen bir dizi mutasyon olayının meydana gelmesi gerekmektedir. Penisilinlere ve tetrasiklinlere karşı bu tip rezistans oluşabilir.

Sadece kromozomal mutasyonla meydana gelen rezistansın terapötik sorun oluşturan başlıca örnekleri şunlardır: Rifampisin, izoniazid veya nalidiksik aside rezistans ve *S.aureus*'ta metisiline karşı rezistans.

b) Direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direnç (Plazmid veya transpozon aracılığıyla) çeşitli şekillerde meydana gelebilir.

Plazmidlerin başka hücreden veya ortamdan hücreye transferinde rol oynayan mekanizmalar;

Transdüksiyon: Bakteriyofajlar (bakteri virüsleri) rezistans plazmidinin taşıyıcılığını (vektörlüğünü) yapar. Bakteri içine giren bakteriyofaj onun R plazmidini, kendisinin viral protein kılıfı içine alır ve bölünerek plazmidin kopyasını içeren çok sayıda yavru bakteriyofaj oluşturur. Sonuçta bakteri hücresi patlar ve ortama R plazmidi içeren yüzlerce yeni bakteriyofaj saçılır. Bunlarda aynı veya farklı türden diğer bakterileri infekte ederler ve onları rezistan duruma getirirler.

Konjugasyon: Rezistan bakteri, duyarlı bakteriyle sitoplazma köprüsü oluşturur ,R plazmidlerinden biri duyarlı hücreye geçer ve onu rezistan yapar.

Transformasyon: Bakterinin lizisi sonucu ortama dökülmüş R plazmidleri veya DNA kırıntıları duyarlı bakteri tarafından alınır, rezistan duruma geçer.

2.9.2.1.Kazanılmış direncin ortaya çıkmasındaki fenotipik mekanizmalar

Enzimatik inhibisyon:

- Betalaktamazlar: betalaktam antibiyotiklere karşı oluşan direncin önemli kısmından sorumlu olan enzimlerdir. Betalaktam halkasındaki amid bağına parçalayarak antibiyotiği inaktive ederler. Kromozomal veya nonkromozomal genler tarafından kodlanan çok sayıda betalaktamaz bulunmaktadır. Gram(-) bakteriler, gram(+) bakterilere oranla daha fazla çeşitte betalaktamaz üretebilirler. Bu bakterilerde çoğu

betalaktamazın üretimi plazmidlerle kontrol edilir. Gram(+) bakteriler arasında stafilokoklar betalaktamaz oluşturan majör patojenlerdir. Stafilokokal betalaktamazlar başlıca penisilinleri hidrolize ederler. Yapımını sağlayan genler küçük plazmid ve transpozonlar üzerinde bulunurlar.

- Aminoglikozid direncini düzenleyen enzimler: Aerob bakterilerin kromozomlarında, plazmidlerinin üzerinde veya transpozonlarının üzerinde bulunan genler tarafından sentezlenen bazı enzimler aracılığı ile aminoglikozid direnci oluşmaktadır. Bu enzimler N-asetilasyon, O-nükleotidilasyon ve O-fosforilasyon reaksiyonlarını katalize ederek direnç oluştururlar. Aminoglikozidin enzimatik değişimi sitoplazmik membranda transport sırasında meydana gelir. Örneğin, enterik bakterilerde aminoglikozid direncinin yayılmasında en önemli rolü plazmid üzerinde aminoglikozid direnç geni taşıyan *K.pneumoniae* oynamaktadır. Bu genellikle *Ant2* genidir ve hem diğer suşlara hem de diğer enterik bakteri türlerine iletilir. Yakın zamanda enterokoklarda da plazmide bağımlı aminoglikozid direncinde artma saptanmıştır. Bu durumun klinik önemi ise bu direncin betalaktamaz direnci ile birlikte aktarılması ve bu durumun da iki grup antibiyotiğin ciddi enterokok infeksiyonlarında kombine kullanımı sonucu elde edilen sinerjik etkinin ortadan kalkmasıdır.
- Kloramfenikol asetiltransferaz: Gram(+) ve gram(-) bakterilerin kloramfenikol direncinden sorumludur. O-asetilasyon yaparak antibiyotiği inaktive eder. Enzim plazmid veya kromozomlar üzerinde olabilen genler tarafından sentezlenir.
- Eritromisin esteraz: Eritromisin ve diğer makrolidlere direnç genellikle ribozomal hedef bölge değişiklikleri ile meydana gelmesine rağmen yakın zamanlarda birkaç tane substrat inaktive edici enzim tanımlanmıştır. Eritromisin esterazlar *E.coli*'den izole edilmiştir. Antibiyotiğin lakton halkasını hidrolize ederek etki gösterirler. Bu direnç plazmidle aktarılabilir.

2. 9.2.2.Hücre çeperinin ilaca permeabilitesinin ve ilaç alımının azalması

Penisinlere ve kloramfenikole direnç oluşmasının bazı şekilleri bu mekanizma ile olur ve gram(-) bakterilerde önemli bir permeabilite bariyeri dış duvardaki poruslardır. Porusları taşıyan porin proteinlerinin sentezinin bozulması ve membranda sayısının azalması permeabilite azalması mekanizmalarından birisi olabilir.

Özgün porin kaybına neden olan mutasyonlar betalaktam antibiyotiklere olan direncin artmasından sorumludur. Porin yapımının kaybı tedavi sırasında gelişen aminoglikozid ve karbapenem direncine de neden olabilir. Mesela *E.coli*'de plazmidle aktarılan dış membran protein değişikliği sonucu ortaya çıkan kloramfenikol direnci gösterilmiştir.

Aminoglikozidler ve tetrasiklinler gibi primer etki yeri ribozomlar olan ilaçların sitoplazmaya girebilmeleri için sitoplazmik membranı aktif transpotla aşmaları gerekir. Bazı mutantlarda gereken enerji üretiminde oluşan değişiklik nedeniyle bu aktif transportta blokaj meydana gelir.

(Anonim 2009, <http://www.infeksiyon.org/Detail.asp?ctg=10&Article=188,2009>)

2.9.2.3.Efluks pompaları: Efluks pompası, dirençte önemi giderek anlaşılan bir düzenektir.Efluks pompaları, alışveriş tipi bir tepkimeyle içeri proton alarak, antibiyotikler dahil, çok sayıda yabancı ,gerekli olmayan, sitotoksik ve metabolizma ürününü hücreden uzaklaştırır. Efluks taşıyıcıları bütün hücrelerde yoğun miktarlarda bulunur.

Mesela, *E. coli* genomunun %10'u 250'den çok efluks pompası geninden oluşmaktadır. Fark edebildikleri moleküllerin çok sayıda olması nedeniyle, efluks pompaları dizgesinin yapısal ve edinilmiş dirençte oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Çoğul efluks pompaları, yapısal olarak birbirine benzemeyen, birçok molekülü fark eder.

Bu 'çoğul özgül' özellik pompalar arasında örtüşmeler yaratır. Böylece, bir bakteri hücresinde aynı antibiyotiği dışarı atabilen çok sayıda pompa bulunabilir. Efluks pompaları, diğer direnç düzenekleriyle sinerji içinde çalışır. Örneğin, gram(-) basillerde,

betalaktamazlar ve efluks pompaları, peri-plazmik aralıktaki betalaktam derişimini birlikte azaltır.

Efluks pompaları normalde denetim altındadır. Pompaların düzenleyici genlerinde oluşan mutasyonlar, efluks pompalarının aşırı yapımıyla sonuçlanabilir. Ayrıca, pompaları ‘tanıdıkları’ moleküllerin yanı sıra, antibiyotikleri de dışarı atabilir duruma getirir . Etkenin bir antibiyotikle karşılaşması, pompaların denetim dizgelerinde mutasyon gelişmiş bakterilerin seçilimine yol açabilir. Gelecekte dirençli bakteri enfeksiyonlarında tedavi, bu pompaların engellenebilmesiyle oldukça ilişkili olacaktır (Anonim 2009, <http://www.guncelpediatri.com/eng/sayilar/17/18p7-190.df>).

2.9.2.4.İlacın hücre içindeki hedefine bağlanmasının azalması ve enzim substitüsyonu:

-Ribozomal hedef yerinde değişiklik

Tetrasiklin, makrolid, linkozamid, aminoglikozid ve streptograminler gibi bazı antibiyotiklere karşı gelişen dirençte ribozomal bağlanma yerlerinde meydana gelen değişikliğin rolü vardır. Streptograminler için en az sekiz metilaz enzimi tarafından 50S ribozomal alt ünitenin 23S parçacığında bulunan adeninlerin dimetillenmesi ile bu değişiklik ortaya çıkar. Sonuçta antibiyotik ribozom üzerinde hedef bölgeye bağlanamaz. Gram (+) bakterilerde ve ureaplasma, mycoplasma, campylobacter ve neisseria'larda bulunan *tetM* gen ürünleri tetrasiklinlerin ribozoma bağlanmasını önlerler. 30S alt ünite de bulunan S12 proteininde oluşan mutasyon aminoglikozidlere direnç gelişiminde rol oynar.

-Hücre duvarı prekürsörlerinde değişiklik

Glikopeptid antibiyotikler peptidoglikan prokürsörlerinin ucunda yer alan D-alanil_D-alanin'e bağlanarak hücre duvarı prokürsörlerinin hücre duvarına katılmasını engeller. Enterokoklarda görülen vankomisin direnci, vankomisine olan direnç ve teikoplanine olan duyarlılık veya dirence göre A, B ve C olmak üzere üçe ayrılır. *E.faecium* ve *E.faecalis*'te görülen yüksek seviyedeki vankomisin ve teikoplanin direnci sınıf A direnç olarak

adlandırılır. Dirençten sorumlu olan *vanA* geni plazmidler üzerinde yer alır ve *E.faecium* tarafından diğer gram (+) bakterilere aktarılabilir. Bu genin ürünü olan indüklenebilir bir protein olan D-alanil_D-alanin ligaz benzeri fonksiyona sahiptir ve D-alanil_D-laktat yapısında hücre duvarı prokürsörlerinin sentezini sağlar. Bu prokürsörlerin glikopeptid antibiyotiklere ilgisi daha azdır. Sınıf B vankomisin direnci olan *E.faecium* ve *E.faecalis* suşları vankomisine dirençli, teikoplanine ise duyarlıdır. Bu direnç geni yine plazmid üzerinde bulunan *vanB* geni tarafından oluşturulur ve diğer enterokok türlerine aktarılır. *E.gallinarum* ve *E.casseliflavus* izolatlarında görülen sınıf C vankomisin direncinde ise düşük seviyede vankomisin direnci ile birlikte teikoplanine duyarlılık vardır. Bu direnç kromozomal genler tarafından meydana getirilir.

Hedef enzim değişikliği

-Betalaktamlar: Betalaktam antibiyotikler kovalent olarak sitoplazmik membranda bulunan PBP'lere (Penicillin Binding Proteins) bağlanırlar. Böylece peptidoglikan sentezini engellerler. Bu nedenle PBP'lerde meydana gelen değişiklikler betalaktam direnci meydana getirir. Betalaktam direnci olan gram(+) lere, ya PBP nin antibiyotiğe ilgisi azalmış ya da az miktarda PBP yapılmaktadır. *S.aureus* ve *E.faecium* suşlarında ortamda bulunan antibiyotikle indüklenebilen ve betalaktamlara daha az ilgi gösteren PBP'ler bulunmaktadır. *S.pneumonia*'da PBP değişikliği ile direnç geliştirir. Penisiline dirençli oldukları halde sefalosporinlere duyarlıdırlar. Betalaktamaz oluşturmayan penisiline dirençli *N.meningitidis*, *N.gonorrhoeae* ve *H.influenza* suşları penisilin bağlama yetenekleri düşük PBP'ler sentezlemektedir. *P.aeruginosa* hem geçirgenliği azaltarak hem de düşük afineteli PBP'ler sentezleyerek betalaktam direnci oluşturabilmektedir.

- Sulfonamidler ve trimetoprim: Sulfonamidin bağlanmasına dirençli dihidropteroat, trimetoprimin bağlanmasına dirençli dihidrofolat redüktaz enzimi yapımı ile direnç geliştirilir. Bu direnç plazmid veya kromozoma bağımlı olarak meydana gelebilir.
- Kinolonlar: DNA giraz enziminin ilaca düşük afineteli mutantlarının oluşturulması ile direnç gelişimi sağlanır. Enzimin *gryA* geni tarafından sentezlenen iki A subuniti ve *gryB* geni tarafından sentezlenen iki B subuniti bulunmaktadır. Bu iki

gen lokusunda meydana gelebilen mutasyonlara bağlı olarak kinolonlara direğli enzim sentezi olmaktadır (Anonim 2009, <http://www.infeksiyon.org/Detail.asp?ctg=10&Article=188>).

2.10.Çoklu Antibiyotik Direnci

Enfeksiyonları önleyebilmek adına mikroorganizmalara karşı yıllar boyunca mücadeleler verildi. Ancak, her ne kadar pek çok başarı elde edildiyse de mücadele henüz tam anlamıyla bitmiş değildir. Çünkü ne zaman yeni bir antibiyotik geliştirilse, o antibiyotiğe karşı neredeyse aynı hızda direnç gelişmektedir.Tüm bu gelişmeler çoğul ilaca direğli mikroorganizmalar kavramını ortaya çıkarmıştır.

Betalaktam, aminoglikozid, makrolid, florokinolon, tetrasiklin, kloramfenikol veya sulfonamid gruplarından 3 veya daha fazlasına karşı direnç saptanan suşlar çoğul ilaca dirençli olarak kabul edilir.

Çoğul direnç sorununun ortaya çıkmasıyla birlikte, gelişen hastane enfeksiyonu hızlarında, maliyette, mortalite ve morbiditede artış olmaktadır

2.10.1. Çoğul İlaç Direnci (ÇİD) Gösteren Mikroorganizmalara Örnekler;

- Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus* (MRSA)
- Vankomisine Dirençli Enterokok (VRE)
- Gram(-) Basiller , *Esherichia Coli*, *Klebsiella Spp.*, *Enterobacter Spp.*, *Pseudomonas Spp.*, *Acinetobacter Spp.* (Anonim 2006, <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroguideline2006.pdf>).

Bakterilerde çoklu direnç iki mekanizmadan birinin gerçekleşmesiyle ortaya çıkmaktadır; Birincisi,bu bakteriler her hücrede her biri farklı ilaca dayanıklı olmasını kodlayan belli genleri kazanmışlardır. İkinci olarakta efluks pompalarını kodlayan genlerin ifadelerinin artmasıyla gerçekleşir.

Bakteriyel antibiyotik direnci, kendi kendine ya da sonradan edilinen mekanizmalarla kazanılabilmektedir. İçsel mekanizmalar , konakçının kromozomunda doğal olarak oluşan genlerde tanımlanmıştır.Örneğin, gram (-) bakterideki *AmpC* betalaktamaz ve bir çok MDR efluks sistemleri gibi.

Edilinen mekanizmalar ise plazmidlerde, bakteriyofajlarda, transpozonlarda ve diğer hareketli genetik materyallerde taşınan antibiyotik direnç transfer belirteçleri ile hedeflenen genlerdeki mutasyonları içerir. Genellikle bu değişim transdüksiyon (bakteriyofajlarla), konjugasyon(plasmid ve konjugatif transpozonlarla) ve transformasyon (kromozomal DNA nın kromozomunun kaynaşması, plazmidler ve ya diğer ölü organizmaların DNA ları şeklindedir. Her ne kadar organizmalardaki gen transferleri aynı cins içinde yaygın olsada bu işlem çok farklı cinslerde gözlenmektedir Farklı mekanizmalara dayanan çok fazla direnç genleri vardır (Collis 1995).

Üreten Organizmalar, buradaki direnç birkaç enzimin üretimini gerektirmektedir,ve bu enzimleri kodlayan genler vancomisin ortaya çıktıktan sonra evrimleşmişlerdir. Hakikattande vancomisine dirençli genlerde enterokokların klinik izolatları vancomisin üreten streptomycetlerle homolog oldukları saptanmıştır.

Çevredeki mikroorganizmalar ve toprak, bazı direnç genleri çevredeki bakterilerin kromozomlarında bulunmuştur. Çok klasik bir durum olaran Enterik bakterilerdeki *ampC* geni.Bu genler yakın zamanda kazanıldıklarına dair hiçbir işaret göstermemektedirler ve buda bize *E.Coli* deki *ampC* geninde induksiyon mekanizması yok ve patojen salmonellalarda *ampC* geni tamamen bulunmamaktadır.

Bu bağlamda toprakta yaşayan rastgele bir streptomycetes ve akraba suşlarının araştırılmasında %60-%100'ü test edilen bir kaç antibiyotiğe dirençli çıktılar araştırma sonucunda ortamda yüksek miktarda antibiyotik varlığı saptandı.Buna rağmen bazen toprakta antibiyotik miktarı çok az olabilmektedir. Son çalışmalar antibiyotikleri besin olarak kullanan mikroorganizmaların varlığını saptamışlardır.

R plazmidleri genellikle çok fazla direnç genleri içerir;bakterinin konakçı suşlarında stabil şekilde muhafaza edilir ve etkin bir şekilde komşu ilaca duyarlı hücrelere transfer edilir.

İlaç dirençli genler plazmidlerden eksprese olursa etkili olduğu gözlemlenmiştir. Dikkat edilmelidir ki bu tip birçok gen genelde tek R plasmidi üzerinde görülür. Böylelikle çoklu ilaç dirençleri tek bir duyarlı bakteriye transfer edilir ve bu şekilde kullanılabilir. 1950 lerde R plazmidleri Japonya’da keşfedildiğinde, bunların birçoğu uzun zaman öncede beri zaten tetrasiklin, kloramfenikol, ve sulfonamidler için direnç genleri içermektedir.

Plazmidlerin sekanslanması artık bu oluşumun nasıl meydana geldiğini göstermektedir. Önceki jenerasyon R plazmidlerinde görüldüğü üzere genlerinin çoğu transpozon parçalarıdır. Bu parçalar genleri DNA nın her bölgesine kolaylıkla ulaştırabilmektedir. Örneğin; R100 plazmidinde Tn21’ler özellikle transpozonların dikkate değer, büyük, kompleks ve çoklu örnekleridir. R plazmidlerindeki çoğu direnç genlerinin hepsinde tek olan 59 baz 3-sekans dizi etiketinin bulunması integronun keşfine imkan vermiştir. Son yıllarda, klinik materyallerdeki Enterobacteriaceae familyası ve pseudomonaslar’da gösterilmiştir. Bağımsız olarak plazmidlerde veya transpozon (Tn21) ailesinin bir bölümü olarak karşımıza çıkmaktadır. Temperate fajlarınkine benzeyen integrasyon geni (int) ve bağlanmada rol oynayan site specific rekombinasyon sistemleri bulunmaktadır. İntegrondaki integrasyon enzimi için kodlanan gen, direnç genlerinin güçlü bir promotordan entegresini katalizlemektedir. Bir kere entegre olunca direnç geni etiketlenir böylece başka integrona kolaylıkla geçebilir, belkide direnç genlerinden oluşan farklı setler içerir. Yüksek hareketli olmalarına ek olarak direnç genleri integrona geçtiklerinde tek bir operonda organize olurlar.

Tn21 örneğinde bulunan entegrasyon, çoktan sulfonamid direnç geni *sulI* ve çoklu ilaç efflux geni *gaCE* ‘nin kesik (ucu) versiyonunu içermektedir. Bu iki gen veya *gaCE* geni aminoglikozid direnç geni *aadA1*’ i özel bir entegrasyon alanı olan *attI*’de entegre etmiştir. Bir entegrasyonun içerebileceği maksimum direnç geni sayısı sekizdir. Ayrıca bu bileşimlerin bir çoğu tüm entegrasyon yapısının yerini değiştirmek için enzimatik sistem taşır. Bunlara ilaveten entegrasyon genelde Tn21 gibi daha büyük bir transposon’a konulur. Tn21 direnç genlerinin tüm dizilerin farklı plazmidler aralarında gezmesine ve plazmidler ile kromozomlar arasında gezmelerine olanak sağlar. Modern entegrasyonların evrimleri net olmamakla beraber buna benzer bir mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizma *Vibrio Cholerae*’nin içindeki birçok genin montajını inşa eder.

Günümüzde birçok entegrasyonun yapılarının ISCR elementi adı verilen bir downstream yapısı ile ilgili oldukları bulunmuştur. Bu element transposaz enzimi geni içermektedir. Görünen odur ki alışılmadık, açık uçlu bir yer değiştirme işlevinde fonksiyon göstermekte, çeşitli direnç genlerini güçlendirmekte ve bunları entegrasyon yapısına yakın bir yere ulaştırıp görevini bitirmektedir (Nikaido2009).

2.10.2. Çoklu Dirençte Effluks Sistemleri

Effluks pompa sistemleri transport proteinlerinden oluşur. Duyarlı ve dirençli tüm bakterilerde, hatta mantar ve protozoonlarda da bulunur. Özellikle metabolik artık ya da gereksiz ve zararlı maddeleri dışarı atar. Pompa geni bir operonun parçasıdır, antibiyotiği ya da hedefini modifiye etmez. Bu gen kromozomal, indüklenebilir veya plazmidik olabilir. Pompa sistemi, ekspresyon düzenleyici bir gen kontrolunda çalışır. Pompa substratı spesifik tek bir antibiyotik, farklı sınıflardan bir çok antibiyotik veya biyosidler (dezenfektan, antiseptik ve koruyucular) olabilir. Antibiyotik dışarı pompalanınca bakteride hücre içi antibiyotik düzeyi düşer, ribozom antibiyotik etkisinden korunur ve protein yapımı yani bakteri üremesi devam eder. Substratlardan herhangi biri ile karşılaşma sonucu pompa sistemi indüklenirse, düzenleyici gende mutasyon ile pompa proteinlerinin aşırı üretimi başlayabilir. Sonuç bir ya da birden çok substrata direnç şeklindedir (MDR/mar fenotipi).

Gelişen direnç düşük düzeylidir fakat bir mutasyon başka mutasyonları tetikleyebildiği için, genellikle düzenleyici gen mutasyonunun ardından hedef molekül değişikliği, permeabilite azalması gibi diğer bir mutasyon daha gelişir ve direnç düzeyi katlanarak artar. En önemli pompa sistemleri beş grup'da toplanabilir: MFS(Major Facilitator Superfamily), ABC(ATP Binding Casette Superfamily), SMR(Small multidrug resistance family),MATE(Multidrug and Toxin Extrusion) ve Gram negatif bakterilerde yaygın olan RND (resistance-nodulation-division) (Bal 2006).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal: Çalışmada kullanılan materyaller Ankara ili ve çevresindeki tavukçuluk işletmelerinde ve küçük hayvan barınaklarında yaşayan kanatlı çiftlik hayvanlarından ve köpeklerden alındı. Ayrıca, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına ve Kliniklerine getirilen hayvan materyallerinde yararlanıldı.Çalışma kapsamındaki hayvanlardan taze dışkı toplandı veya eküvyonlar vasıtasıyla rektal sürüntü örnekleri alındı.Toplanan materyaller en geç 3 saat içinde işlendi.

Besi yerleri:

XLD agar (Xylose lysine desoxycholate agar)Merck

DCA agar (Deoxycholate Citrate Agar)Merck

CLED Agar (Cystine Lactose Electrolyte Deficient Agar) Merck

TSB(Tryptone Soya Broth) Merck

Mueller-Hinton Broth, Merck

Antibiyotikler:

Ampisilin (Oxoid), Streptomisin (Oxoid), Gentamisin (Oxoid), Kanamisin (Oxoid), Eritromisin (Oxoid), Ciprofloksasin (Oxoid), Nalidiksik asit (Oxoid), Kloramfenikol (Oxoid), Tetrasiklin (Oxoid), Sulfonamid (Oxoid).

Solüsyonlar:

10X TBE (Tris, Borik asit, EDTA)

21,6 g Tris(ammescio) , 11 g Borik asit(merck), 1,86 g EDTA(Merck) 200 mL distile suda çözülmüş ve pH 8,3'e ayarlanmıştır

Agaroz Jel (%1.5) (Sigma)

Plazmid DNA'nın yürütülmesi için kullanılmıştır

Örnek Yükleme Tamponu (Loading Buffer)

%0,25 Brom fenol mavisi(amresco) ve %10 gliserol(amresco) ile hazırlanan stoktan uygun hacime distile su ilavesiyle hazırlanmıştır

Yürütme Tamponu (Running Buffer)

10X TBE'den 20 kat sulandırılarak hazırlanmıştır

Boyama Solüsyonu (Staining, Ethidium Bromür)

1 g EtBr(Sigma) 100 mL distile suda çözülerek hazırlanan stok çözeltiliden son hacim 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanır

Boyayı Geri Alma solüsyonu (Destaining)

Boyama sonrası EtBr'nin fazlası uygun hacimdeki 1 mM MgSO₄ ile gerçekleştirilmiştir

3.2.Yöntem:

3.2.1.Shigella İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Toplanan hayvan dışkılarının kanlı agar,XDL agar ve DCA agara ekimleri yapıldı.37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra; kanlı agarda: 2-3 mm çapında nemli koloniler ,XLD agarda: kırmızı renkte koloniler, DCA agarda: renksiz görünümde olan, en baskın koloniler seçildi ve toplandı.

Toplanan kolonilere ayrıca biyokimyasal olarak TSI, H₂S, Hareket, Üreaz, Lizin dekarboksilasyonu testleri yapıldı. İzole edilen suşlar Brain-Heart infüzyon buyyon içinde -20°C’de saklandı.

Biyokimyasal testler sonucu shigella identifikasyonu aşağıdaki gibidir.

TSI	Dip sarı, yüzey kırmızı (Asit/Alkali); glukozdan gaz oluşturmazlar.
H ₂ S	Negatif
Hareket	Negatif
Üreaz aktivitesi	Negatif
Lizin dekarboksilasyonu	Negatif

3.2.2.Salmonella İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Toplanan hayvan dışkılarından kanlı agara, CLED agara,XDL agara ve DCA agar besiyerlerine ekimler yapıldı. Besiyerleri aerobik ortamda 35-37⁰ C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreme görülen indikatörlü besiyerlerindeki koloni özellikleri incelenerek,kanlı agarda nemli 2-3 diyametre çapında, CLED laktozu fermente edemeyen, XLD’de kırmızı, DCA’da ise renksiz koloniler seçildi.Polivalent O ve H antiserumu ile aglutinasyonu ile salmonella türlerinin polivalent O ile aglutine oldu.

Biyokimyasal olarak aşağıdaki testler yapılmıştır.

TSI glukoz (asit oluşumu)	Pozitif
TSI laktoz	Negatif
TSI sukroz	Negatif
Üre hidrolizi	Negatif
Beta galaktozidaz reaksiyonu	Negatif
İndol reaksiyonu	Negatif

3.2.3 Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Enterobacteriaceae familyasından olan salmonella ve shigella suslarının antimikrobiyal duyarlılıkları, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006, M31-A2) prosedürüne uygun olarak, küçük modifikasyonla agar-dilüsyon yöntemi ile incelendi.

Özetle; incelenen susa ait birkaç koloni Mueller-Hinton buyyona ekilerek aerobik ortamda 2-6 saat üretildi. Süre sonunda bakteri yoğunluğu steril tuzlu su ile McFarland bulanıklık standartı 0.5'e ayarlandı (yaklaşık 1.5×10^8 cfu/ml). Bakteri süspansiyonu steril tuzlu su ile 1/10 oranında dilue edildi (yaklaşık 10^7 cfu/ml).

Antibiyotiklerin iki katlı sulandırmalarını içeren Mueller-Hinton agara, hazırlanan bakteri süspansiyonundan replikatör vasıtasıyla 2 µl miktarında ekimler yapıldı. İnokulumun kuruması için oda ısısında 10 dakika bekletildi. Kùltürler aerobik ortamda 16-20 saat inkube edildi. Besiyerinde üremenin görülmediği en düşük dilüsyon MİK olarak belirlendi. Tüm testlerde Escherichia coli ATCC 25922 ve Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 susları kontrol olarak kullanıldı.

Çalışmada; Ampisilin, streptomisin, gentamisin, kanamisin, eritromisin, siprofloksasin, nalidiksik asit, tetrasiklin ve kloramfenikol'ün 0.125-512 µg/ml, sulfametoksazolün 1-1024 µg/ml arasındaki iki katlı dilüsyonları incelenmiştir. Suşların duyarlı ve dirençli olarak belirlenmelerinde aşağıdaki eşik değerleri temel alınmıştır. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006, M100-S16).

Beta-laktam Grubu: Ampisilin dirençli $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ duyarlı $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ orta duyarlı $16 \mu\text{g/ml}$.

Aminoglikozid Grubu: Streptomisin dirençli $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ duyarlı $\leq 32 \mu\text{g/ml}$.
Gentamisin dirençli $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, duyarlı $4 \mu\text{g/ml}$ orta duyarlı $8 \mu\text{g/ml}$. Kanamisin dirençli $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ duyarlı $\leq 8 \mu\text{g/ml}$.

Makrolid Grubu: Eritromisin dirençli $\geq 8\mu\text{g/ml}$, duyarlı $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı 1-2 $\mu\text{g/ml}$.

Florokinolon Grubu: Siprofloksasin dirençli $\geq 4\mu\text{g/ml}$ duyarlı $\leq 1\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı 2 $\mu\text{g/ml}$.

Nalidiksik asit: dirençli $\geq 32\mu\text{g/ml}$ duyarlı $\leq 8\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı 16 $\mu\text{g/ml}$.

Tetrasiklin Grubu: dirençli $\geq 16\mu\text{g/ml}$ duyarlı $\leq 4\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı 8 $\mu\text{g/ml}$.

Kloramfenikol : dirençli $\geq 32\mu\text{g/ml}$ duyarlı $\leq 8\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı 16 $\mu\text{g/ml}$.

Sülfonamid Grubu: Sülfametoksazol dirençli $\geq 512\mu\text{g/ml}$ duyarlı $\leq 256\mu\text{g/ml}$.

3.2.4.İntegronların Saptanması:

Enterobacteriaceae familyasından olan salmonella ve shigella izolatlarından integronların ve gen kasetlerinin saptanması için, sınıf 1 integraz geni *intI1* ve sınıf 2 integraz geni *intI2*'yi hedef alan PCR uygulamaları yapıldı.

İntI1 pozitif suşları saptamak için kullanılan HS463a ve HS464 primerleri ile intI2 pozitif suşları saptamak için kullanılan RB201 ve RB202 primerleri aşağıda gösterilmiştir.

HS463a 5'-CTGGATTTCGATCACGGCACG-3'

HS464 5'-ACATGCGTGTAATCATCGTCG-3'

RB201 5'-GCAAACGCAAGCATTCATTA-3'

RB202 5'-ACGGATATGCGACAAAAGG-3'

PCR 2 μl örnek DNA, 1.0 μM her bir primer, 200 μM dNTP'ler, 10mM Tris HCl, 1.5mM MgCl₂ 50mM KCl ve 1U Taq polimeraz içeren 25 μl reaksiyon karışımında, 94⁰C 30 sn, 65⁰C (*intI1*) veya 62⁰C (*intI2*) 30 sn ve 72⁰C 45 sn 30 sikluluk koşullarda uygulanmıştır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezden sonra ethidium bromid ile boyandı (Barlow 2004).

4.ARAŞTIRMA BULGULARI:

Ankara ili ve çevresindeki tavukçuluk işletmelerinden ve küçük hayvan barınaklarında yaşayan köpeklerden; ayrıca, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına ve Kliniklerine getirilen hayvanlardan toplanan dışkı ve rektal sürüntü örneklerinden 34 salmonella ve 28 shigella suşu izole edildi.

İzole edilen suşlar fenotipik özelliklerine göre identifiye edildi. Ampisilin, siprofloksasin, nalidiksik asit, eritromisin, gentamisin, kanamisin, tetrasiklin, streptomisin ve kloramfenikolün 0.125-512 µg/mL, sulfametoksazolün 1-1024 µg/ml arasındaki iki katlı konsantrasyonlarının izole edilen salmonella ve shigella suşları için MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi ile incelendi. Materyal ve Yöntem bölümünde verilen eşik değerleri temel alınarak, duyarlı ve dirençli suş sayıları belirlendi. Çalışmada kullanılan antibiyotiklere dirençli salmonella ve shigella suşlarının sayıları Çizelge 3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3: Çalışmada Kullanılan Antibiyotiklere Dirençli Salmonella Ve Shigella Suş Sayıları

DİRENÇLİ SUŞ SAYISI(%)		SALMONELLA(34)	SHIGELLA(28)
	AMP	11(32,4)	10(35,7)
	STR	16(47,1)	15(53,6)
	GEN	0	0
	KAN	8(23,5)	7(25,0)
	ERİ	14(41,2)	13(46,4)
	CİP	6(17,69)	6(21,4)
	NAL	8(23,5)	8(28,6)
	KLO	0	0
	TET	14(41,2)	15(53,6)
	SUL	17(50)	13(46,4)

amp, ampisilin; str, streptomisin; gen, gentamisin; kan, kanamisin; eri, eritromisin; cip, siprofloksasin; nal, nalidiksik asit; tet, tetrasiklin; sul, sulfametaksazol

Salmonella suşlarında; sulfametaksazol,streptomisin,eritromisin ve tetrasikline yüksek düzeyde,ampisilin,kanamisin, siprofloksasin ve nalidiksik asite orta düzeyde direnç saptandı. Kloramfenikol ve gentamisine dirençli Salmonella suşu bulunmadı.

Shigella suşlarında; streptomisin, tetrasiklin, eritromisin, sulfametaksazole yüksek düzeyde, ampisilin, kanamisin,nalidiksik asit ve siprofloksasine orta düzeyde direnç saptandı. Kloramfenikol ve gentamisine dirençli Shigella suşu bulunamadı.

Salmonella suşlarının dirençli olduğu antibiyotikler ve çoklu dirençlilik özellikleri Çizelge 4 de gösterilmiştir.

Çizelge 4 Salmonella Suşlarının Dirençlilik Profilleri

TÜR	AMP	STR	GEN	KAN	ERI	ÇİP	NAL	KLO	TET	SUL	Ç.D	INT1
Salmonella(34)												
1	r	r		r	r		r		r	r	6(7)	+
2	r	r		r	r				r	r	5(6)	+
3	r	r			r				r	r	5	+
4	r	r			r				r	r	5	+
5		r				r	r			r	4	+
6	r	r				r	r			r	4(5)	+
7		r			r				r	r	4	+
8		r			r				r	r	4	+
9	r				r				r		3	
10	r			r						r	3	+
11		r			r					r	3	+
12				r					r	r	3	+
13	r			r							2	
14	r				r						2	
15	r				r						2	
16	r									r	2	
17		r		r						r	2(3)	+
18		r					r				2	
19		r		r					r		2(3)	
20		r			r						2	
21		r								r	2	
22		r		r					r	r	2(3)	
23		r									2	
24					r	r	r				2(3)	
25					r				r		2	
26					r				r		2	
27						r	r		r		2(3)	
28						r	r			r	2(3)	
29						r	r				2	
30									r		1	
31										r	1	
32												
33												
34												
TOPLAM	11	16	0	8	14	6	8	0	14	17		

İncelenen 34 salmonella suşunun 12si (%35.29) 3 veya daha fazla antibiyotik grubuna dirençli bulundu.

Bir salmonella suşu toplamda 6 antibiyotik grubuna (incelenen 7 antibiyotiğe)dirençlilik gösterdi. Salmonella suşlarının 3'ü 5 antibiyotik grubuna,4'ü 4 antibiyotik grubuna dirençli bulundu. Suşlarda 4'ü ise 3 antibiyotik grubuna dirençli bulundu.

Çoklu direnç profiller arasında en çok yer alan antibiyotikler sırasıyla sulfametoksazol, tetrasiklin, eritromisin, streptomisin oldu.

Shigella suşlarının dirençli olduğu antibiyotikler ve çoklu dirençlilik özellikleri Çizelge 5 de gösterilmiştir.İncelenen 28 shigella suşunun 9'u (%32.14) 3 veya daha fazla antibiyotik grubuna dirençli bulundu.

Çizelge 5 Shigella Suşlarının Dirençlilik Profilleri

TÜR	AMP	STR	GEN	KAN	ERI	ÇİP	NAL	KLO	TET	SUL	Ç.D.	INT1
Shigella(28)												
1	r	r		r	r	r	r		r	r	6(8)	+
2	r	r			r				r	r	5	+
3	r	r					r		r	r	5	+
4	r	r		r	r				r	r	5(6)	+
5	r	r			r				r	r	5	+
6	r				r	r	r		r	r	5(6)	+
7		r		r	r				r	r	4(5)	+
8		r			r				r	r	4	+
9		r		r	r				r	r	4(5)	+
10		r		r		r	r				2(4)	
11	r										2(3)	
12	r										2	
13	r										2	
14	r										2	
15		r		r							2(3)	+
16		r			r						2	
17		r			r						2	
18		r									2	
19		r									2	
20					r	r	r				2(3)	
21					r						2	
22											2	
23						r	r				2(3)	
24						r	r				1(2)	
25							r				1	
26											1	
27												
28												
TOPLAM	10	15	0	7	13	6	8	0	15	13		

İntegron Sıklıkları:

İncelenen 34 Salmonella suşundan 12'sinde 28 Shigella suşundan 10 tanesinde Sınıf 1 integron varlığı saptamıştır.

Salmonella 'da 4 ve üzeri antibiyotik grubuna direnç gösteren suşların tümünde sınıf 1 integron saptandı. Ayrıca 3 antibiyotik grubuna direnç gösteren 3 salmonella suşundada sınıf 1 integron saptandı.

Shigella'da 4 ve üzeri antibiyotik grubuna direnç gösteren suşların tümünde sınıf 1 integron saptandı. İntegron saptanan salmonella suslarının tümünde sulfametoksazol, 9unda streptomisin,7sinde eritromisin ve tetrasiklin,6sında ampisilin direnci görüldü.

İntegron saptanan shigella suşlarının tümünde sulfametoksazol,9'unda tetrasiklin ve streptomisin, 8'inde eritromisin , 6'sında ampisilin direnci bulundu.

Çizelge 6 Salmonella Ve Shigella Suşlarında Çoklu Direnç ve İntegron Sayıları

	Çoklu Dirençli	İntegron
Salmonella(34)	11	12
Shigella(28)	9	10

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotikler son 50 yılda önemli faydalar sağlamışlar ve eskiden ölümcül olduğu bilinen çoğu hastalığın tedavisi için vazgeçilmez unsurlar haline gelmişlerdir. Günümüzde tüberkuloza yol açanlar da dahil olmak üzere bakterilerin çoğunda yaygın bir ilaç direnci söz konusudur ve bazı bakteriler mevcut hiç bir antibiyotikle ortadan kaldırılamamakta, dolayısıyla bu bakterilerle ortaya çıkan hastalıklar da etkin tedavi edilememektedir. Bakterilerde ilaç direnci, bakteri genetiği ve doğal seleksiyona bağlı olarak gelişebilen bir süreçtir, ancak yaygın ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı bu süreci gereğinden fazla hızlandırmaktadır.

Bu çalışma , Ankara ili ve çevresindeki tavukçuluk işletmelerinden ve küçük hayvan barınaklarında yaşayan köpeklerden, ayrıca Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına ve Kliniklerine getirilen hayvanlardan toplanan dışkı ve rektal sürüntü örneklerinden 34 salmonella ve 28 shigella suşu izole edilerek, suşların antibiyotik direnç mekanizmalarının moleküler açıdan tanımlanması ve literatüre temel bilgi sağlanması açısından önemli olduğu düşünülerek yapıldı.

Bu çalışmada Salmonella ve Shigella suşlarında streptomisin ve sulfonamide yüksek direnç gelişimi gözlemlendi. Nikaido (2009) yaptığı çalışmada da, benzer sonuçlar elde etmiştir, kullandığı izolatlarda en çok sulfadiazin, tetrasiklin, streptomisin ve ampisiline direnç geliştiğinden bahsetmiştir.

Tavuk dışkılarından izole ve identifiye edilen salmonella suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları ile ilgili bir çalışmada, Boynukara ve Aydın (1990), 33 Salmonella suşunun ampisiline %42.4, tetrasikline %39.3, streptomisine %30.3 duyarlı; eritromisine ise %100 dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada farklı olarak 34 salmonella suşunun ampisiline ,tetrasikline ve streptomisine duyarlılıklarında artış,eritromisin direncinde ise yüksek oranda düşüş gözlemlenmiştir.

Araştırma bulgularına yakın olarak Ellerbroek (2009) tavuk dışkılarından yaptığı çalışmalarında tavuklardan izole edilen salmonella suşlarının %57.3ü sulfametoksazol,

%40.7 si ampisilin, %27.0 si kanamisin, %36.0 sı streptomisin, ve %28 to nalidiksik aside direncli bulunmustur.

Çalışmada incelenen tüm suşlarda gentamisin ve kloramfenikole direnç saptanmamıştır. Bununla birlikte 34 Salmonella suşunun 3'ünde (%8.8) ve 28 Shigella suşunun 2'sinde (%7.1) uygulanan tüm antibiyotiklere karşı duyarlılık gözlenmiştir.

Bundan farklı olarak Rodriguez (2008) yaptığı çalışmada Salmonella serotiplerinde incelenen tüm suşlar siprofloksasine duyarlıdır. %31'i ise denenen tüm antibiyotiklere duyarlıdır. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında, suşlardaki duyarlılığın bilinçsiz antibiyotik kullanımına bağlı olarak zamanla ciddi bir biçimde azaldığı sonucuna varılmıştır.

Rodriguez (2008)'in çalışmasında Salmonella suşların %13'lük kısmı ise bu 6 ilacın hepsine dirençliydi. Buda direnç genlerinin kolaylıkla yayılabilmesi açısından tehdit oluşturmaktadır.

Betalaktam, aminoglikozid, makrolid, florokinolon, tetrasiklin, kloramfenikol veya sulfonamid gruplarından 3 veya daha fazlasına karşı direnç saptanan suşlar çoklu ilaca dirençli olarak kabul edilir. Çalışmada incelenen 34 Salmonella suşundan 12 sinde ,28 Shigella suşundan 9 unda çoklu antibiyotik direnci bulunmuştur. Kullanılan tüm antibiyotiklere dirençli olan suş saptanmamıştır. Bu çalışmaya paralel olarak, Dione (2009) yaptığı araştırmada salmonella izolatların büyük kısmını iki ve ya daha fazla antibiyotiğe dirençli bulunmuştur.

Ayrıca bu çalışmada çoklu antibiyotik direncinin sınıf 1 integron varlığı ile doğru orantılı olduğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde daha öncede bir kaç laboratuvar antibiyotik direnç genlerinin kromozomal kodlandığından ve integronlar içerdiğinden bahsetmişlerdir. (Briggs 1999).

İntegronlar özellikle çoklu direnç oluşturmada başarılıdırlar çünkü bir kaç direnç geninin doğru oryantasyonda birleştirip, ekspresyonları için güçlü promotor sağlayabilmektedirler (Nikaido 2009).

Bu çalışmadaki 34 salmonella suşunun 12 sinde (%35.3) ve, 28 Shigella suşunun 10'unda (%35.7) sınıf 1 integronların varlığı saptanmıştır. Sınıf 2 integrona rastlanmamıştır. Rodriguez (2008)'de insanlardan izole edilen salmonellalarla yapılan çalışmada aynı şekilde sınıf 2 integron saptanmamıştır.

Bu çalışma neticesinde, bakteriyel izolatların antibiyotiklerden kurtulma amaçlı farklı stratejileri birleştirerek yüksek oranlarda direnç geliştirebildikleri düşünülmektedir. Bu mekanizmalar, intrinsik, mutasyonel ve ya fizyolojik olabilmektedirler. Bu nedenle, ilaç dizaynında temel bilgi sağlayacak olan moleküler araştırma bazlı çalışmalarda, bakteride bulunan tüm intrinsik, mutasyonel ve fizyolojik direnç mekanizmaları göz önünde bulundurulmalıdır (Kolter 2002).

Bakterilerdeki çoklu direnç genellikle R plazmidleri üzerinde, herbiri farklı ilaca dirençli genlerin akümüasyonu ile oluşur (Nikaido 2009).

Bu çalışmada benzer şekilde çoklu antibiyotik direncinin kazanılmış olması, direnç genlerinin akümüasyonu ile doğru orantılı olarak meydana gelen integronların olduğunu konusunda şüphe uyandırmaktadır.

R plazmidleri çok iyi muhafaza edilir ve genellikle bir hücreden diğerine etkin bir biçimde transfer edilebilir (Nikaido 2009). Bu kanı mikroorganizmaların çok çabuk ve etkin biçimde direnç geliştirdiğini doğrulamaktadır. Genellikle, patojenik mikroorganizmaların bulunması antibiyotik tedavili hastalarda oluşabilir çünkü onlar herhangi bir genetik değişim olmadan fizyolojik olarak dirençli hale gelebilirler.

Rezistans mekanizmalarının moleküler detaylarını tanımlamaya devam edilmesi gerekmektedir. Bu da ilaç dizaynında, örneğin; çoklu ilaç direncindeki efluks pompalarının ya da R plazmid transferindeki inhibitörlerinin kullanımına ve tasarımına olanak sağlayabilir.

6.KAYNAKLAR

- Alexhun,MN., Levy,SB. 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Cell. Vol. 128, p.1037-1050
- Akkan, G. 1997. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu. p.53-56
- Anonim 2009, <http://kbb.uludag.edu.tr/antibiyotik05.htm>
- Anonim 2006, Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings, (CDC-Infection Control Guidelines)
<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroguideline2006.pdf>
- Anonim 2009, <http://www.infeksiyon.org/Detail.asp?ctg=10&Article=188>
- Anonim 2009, <http://www.guncelpediyatri.com/eng/sayilar/17/187-190.pdf>
- Bal, Ç. 2006. Toplum kökenli infeksiyonlarda gram (-) çomak direnci. ANKEM Dergisi Vol.20, p.273-288.
- Barlow, RS., Pemberton, JM.,Desmarchelier, PM., Gobius, KS., 2004.Isolation and Characterization of integron containing bacteria without antibiotic selection.Antimicrob Agent Chemother. Vol.48, p.838-842.
- Briggs, CE., Fratamico, PM. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of Salmonella typhimurium DT104. Antimicrob Agents Chemother. Vol.43, p.846-849.
- Boynukara, B. , Aydın, F. 1990. Tavuklardan izole edilen Salmonella suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları üzerinde bir araştırma. Türk Veteriner Hekimliği Dergisi. Vol.90 , p. 21-23.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Informational supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pennsylvania.
- Collis, CM., Hall, RM. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* Vol.39, p.155–162.
- Corvalin, P. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* Vol.38 p. 1447–1451.
- Craig, WA. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 26:1
- Derzef, B. 2005. Çeşitli klinik materyallerden izole edilen enterokok suşlarında antibiyotik direnci, yüksek düzey aminoglikozid direnci ve E test ile vankomisin MİK değerlerinin değerlendirilmesi.
- Dione, MM., Ieven, M., Garin, B., Marcotty, T., Geerts, S. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from broiler farms, chicken carcasses, and street-vended restaurants in Casamance, Senegal. *J Food Prot.* Vol. 72, p.2423-2427.
- Ellerbroek, L. 2010. Antibiotic Resistance in *Salmonella* Isolates from Imported Chicken Carcasses in Bhutan and from Pig Carcasses in Vietnam. *Journal of Food Protection*, Vol. 73, p. 376–379

- Georgopapadakou, N. 2003. Mechanisms of antibiotic resistance. Principles and Practice of Pediatrics Infectious Diseases, 2nd ed, p.1432-1442.
- Gold, HS., Moellering, RC. 1996. Antimicrobial-drug resistance. N Engl J Med. Vol:335,p.1445-1453.
- Gülay, Z. 1999. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara. Güneş Kitabevi. s.91-108.
- Higgings, CF. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature. Vol.446, p. 749–757.
- Jorgensen, JH., 1997. Laboratory issues in the detection and reporting of antibacterial resistance. Infect Dis Clin North Am. Vol.11, p. 785-802
- Kolter ,R., Hogan, D. 2002. Why are bacteria refractory to antimicrobials? Curr Opin Microbiol. Vol.5, p.472-477.
- Lupski, JR. 1987. Molecular mechanisms for transposition of drug-resistance genes and other movable genetic elements. Rev Infect Dis. Vol.9, p.357-368.
- Medeiros, AA. 1997. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clin Infect Dis. Vol.24,p.19-45.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved standard M31-A2, Wayne, Pennsylvania.
- Nikaido, H. 2009. Multidrug Resistance in Bacteria. Annual Review of Biochemistry. Vol.78, p.119-146
- Old, DJ., Threlfall, EJ. 1998. Salmonella in Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Vol.2 ,p.969-997 Oxford University Press, London.

Öztürk, R. 2007, Antibiyotiklere karşı direnç:küresel bir sorun. <http://www.sdplatform.com/KoseYazisi.aspx?KID=38>

Rodríguez, I., Rodicio, MR. 2008. Class 1 integrons in multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated in Spain between 2002 and 2004. *Int J Antimicrob Agents*. Vol.32, p.158-164

Thompson, R. 1986. R plasmid transfer. *J Antimicrob Chemother*. Vol.18 p.13-23

Walsh, C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*.Vol.406, p.775-781

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yasemin Ezgi ERTÜRK

Doğum yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 18/11/1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu :

Lise: 75.Yıl Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi, 2000-2003.

Lisans: Abant İzzet Baysal Üniversitesi,Biyoloji (İngilizce) , 2004-2008.

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi,Biyoteknoloji Enstitüsü , 2008-2010.

Çalıştığı Kurum: Centro de Biologia Molecular ‘‘Severo Ochoa’’ Madrid-İspanya,
2009-2010.

Seminerler: Çoklu Antibiyotik Direncinde Moleküler Mekanizmalar, 2009.