

# Salmonella Suşunda (S.typhimurium No.966) Tobramycin'e Direnç Özelliğini Veren 'R' Plazmidin İn-Vivo Aktarımı

THE IN-VIVO TRANSFER OF R-PLASMID SHOWING  
RESISTANCE PROPERTIES TOBRAMYCIN IN  
SALMONELLA STRAIN (S.typhimurium No.966)

Gülsen ÖKTEN

Ondokuz Mayıs Üniv. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji-Genetik A.B.D. SAMSUN

Geliş Tarihi: 10 Aralık 1988  
Kabul Tarihi: 1 Ağustos 1989

## ÖZET

*Bu çalışmada, Tobramycin'e ve diğer bazı antibiyotiklere dirençli fakat nalidixic acid'e duyarlı olan bir S.typhimurium susunu kullanarak, direnç özelliğinin nalidixic acid'e dirençli, Tobramycin ve tüm antibiyotiklere duyarlı E.coli K-12 susuna in-vivo aktarılması ve bu özelliğin R-plazmidine bağlı olup olmadığını araştırmak amacıyla bazı deneyler yapıldı. Deneylerde kobaylar, alıcı olarak kullanılan nalidixic acid'e dirençli E.coli ve nalidixic acid'e duyarlı S.typhimurium susunun sıvı kültürleriyle beslendi ve Mac.Conkey+Nalidixic acid+Tobramycin yapısındaki besi yerlerini içeren plaklara dışkıdan yapılan ekimler sonucunda, E.coli K-12'nin bol miktarda ürediği gözlemlendi. Elde edilen verilere göre, Nalidixic acid'e dirençli 1. alıcı E.coli'lerin S.typhimurium'dan direnç genlerini alarak Tobramycin yanısıra bir çok antibiyotiğe dirençli hale geldiği, bu direnç özelliğinin çoklu dirençli hale gelen 2. alıcı (ara alıcı) E.coli susuna geçtiği saptandı. Bu sonuçlar, deneye sokulan bakterilerin çoklu dirençli duruma geldiğini ve direnç özelliklerinin bulaşıcı tipte R-plazmidlerine bağlı olduğunu gösterdi.*

Anahtar Kelimeler: Tobramycin, Salmonella typhimurium No.966, E.coli K-12, Rplazmid.

## SUMMARY

*In this study some experiments have been made by using a S.typhimurium N.966 strain which is resistant to Tobramycin and some other antibiotics but sensitive to Nalidixic acid. In-vivo, in order to transfer of this property of resistance to the E.coli K-12 strain which is resistant to Nalidixic acid and sensitive to Tobramycin and all antibiotics, it was also researched whether this property depends upon R-plasmid or not. The Guinea-pigs have been fed with fluid cultures containing E.coli K-12 (used as donor which is sensitive to Nalidixic acid.*

*After cultivation on the media (which is taken from their stools and resembles to Mac.conkey + Nalidixic acid + Tobramycin) it was observed that E.coli K-12 had been propagated considerably.*

*According to data that is obtained E.coli K-12 as the first recipient which is resistant to Nalidixic acid has become resistant to all antibiotics along with Tobramycin by getting the genes of resistance from S.typhimurium. it was also determined that this property of resistance was transferred to the second recipient E.coli K-12 strain which is resistant to streptomycin and sensitive to other antibiotics from the first recipient E.coli K-12.*

*The results of these experiments showed that the resistance properties of multiple resistant bacteria depend on contagious type Rplasmid.*

Key Words: Tobramycin, Salmonella typhimurium No. 966, E.Coli K-12, R-plasmid.

T Kİ Tıp Bil Araş Dergisi C.8, S.4,1990,408-418

T J Research Med Sci V.8, N.4,1990,408-418

Çalışma, XIX, Türk Mikrobiyoloji Kongresinde tebliğ edilmiştir. Ekim 1980, ANKARA.

## GİRİŞ

Enterik bakterilerde R-plazmidlerine bağlı ve bir bakteri susundan diğerine kolayca bulaşabilen "Bulaşıcı tipte Antibiyotik-Direnç" varlığı 1959 yılından beri bilinmektedir (1,2). Son yıllarda enterikbakterilerin arasında "Çoklu-Direnç" (Multiple Resistant) suşların arasında en büyük rolü oynayan bu plazmidlerin bulunuş oranları ve özellikleri konusunda çok sayıda yayın yapılmış ve yapılmaktadır (3,4,5). Ülkemizde de R-Plazmidin in-vitro olarak aktarımı yapılmış ve R-Plazmidlerine bağlı antibiyotik direncin izole edilen enterik bakteri suşlarında yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir (6,7).

Son 10 yıl içinde sık kullanılmalarına bağlı olarak Kanamycin ve Streptomycin gibi "Aminoglikozid" grubu antibiyotiklere dirençli suşların oranlarında, hızlı bir artış olmuş ve bu antibiyotikler enfeksiyonların tedavisinde değerlerini büyük ölçüde yitirmişlerdir (8). Direnç olgularının bir çoğunda bu özelliğin R-plazmidlerine bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu gruptaki en yeni antibiyotiklerden biri olan Tobramycin, Streptomyces tenebrarius'tan elde edilen, suda iyi eriyen ve kimyasal yapısı Kanamycin'e benzeyen bir antimikrobik maddedir (9).

Dünyanın çeşitli ülkelerinde Tobramycin'e dirençli bakteri suşları izole edilmiştir. Bunların bir bölümünde spontan mutasyon sonucu oluşan kromozomal direnç söz konusu olmakla birlikte, olguların bir çoğunda direncin R-plazmidleri tarafından yöneltildiği ve direnç özelliğinin bu antibiyotiğe duyarlı suşlara, deneysel olarak geçirildiği bildirilmiştir (10,11).

Ülkemizde yapılan çeşitli deneysel araştırmalar, yaygın kullanılmamasına karşın Tobramycin'in enterikbakterilerin büyük bir bölümüne karşı dirençli olduğunu göstermiştir (12).

Bu araştırma, S.typhimurium No.966 susunu kullanarak bu susun direnç özelliğini araştırmak amacı ile R-Plazmidin in-vitro aktarımının tekrarı, Tobramycin'e ve diğer birçok antibiyotiklere direnç genlerini taşıyan R-Plazmidlerin in-vivo aktarım olanağının olup olmadığını belirlemek amacıyla yapıldığından yönetilip yönetilmediğini göstermek böyle ise Tobramycin'e ve diğer antibiyotiklere direnç genlerini taşıyan R-Plazmidlerinin in-vivo

aktarım olanağının olup olmadığını belirlemek amacıyla yapıldı.

## MATERYAL VE METOD

Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrop Genetiği Biriminde yapılmıştır.

Araştırmada, yem sanayinin tavşan yemi (pelet) de beslenen, ortalama 600 gr. ağırlığında, 4 aylık 6 adet normal ve sağlıklı kobay kullanıldı.

### Bakteri suşları

Orjinal, erkek (male) verici (donör) S.typhimurium No.966 suşu: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında, 1977-1978 yıllarında, bir çocuktaki Gastroenterik olgusundan izole edilmiş olan laktoz (-) nalidixic acid'e duyarlı, Streptomycin'e dirençli bir sustur. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrop Genetiği Birimi standart koUeksiyon suşlarından alındı.

Orjinal dişi (female) alıcı (recipient) E.coli K-12 suşu:

a) 1.alıcı E.coli suşu; laktoz (-), nalidixic acid'e dirençli, Streptomycin'e ve deneylerimizde kullandığımız antibiyotiklere duyarlı, prototrof hussustur. Aynı birim kodeksiyondan alındı.

b) 2. alıcı (ara alıcı) E.coli suşu; Laktoz (-), nalidixic acid'e duyarlı, Streptomycin'e dirençli mutant bir sustur, aynı birim kodeksiyondan alındı.

### Antibiyotik Diskleri

Oxoid firmasının Multodiscs Code UI diskleri, Difco Diskleri Tip BI(Scientific Hospital Supplies LTD.) multidiskleri kullanıldı. Bu diskler, 50 mcg Chloramphenicol (CM), 500 mcg Sulphafura zole (G), 25 mcg Ampicillin (AL), 50 mcg Tetracyclin (TE), 25 mcg Streptomycin (S), 30 mcg Nalidixic acid (NA), 5 mcg Oxacillin (OX), 10 mcg Gentamycin (GT), 5 mcg Rifambicin (RN), 30 mcg Cephaloridine (CPS) 300 mcg Nitrofurantoin (NPH), 30 mcg Kanamycin (KN), 30 mcg Cephalothin (CR), 30 mcg Gantrisin (G), 30 mcg Chloramphenicol (CM), 30 mcg Tetracylin (TE) içermektedir.

Topramycin (TM) diskleri herbiri 10 mcg içerecek şekilde Eli Lilly firmasının Nebcin (Tobramycin sulphate) preparatmdan hazırlandı.

Deneylerimizde zengin bir et suyu besiyeri olan NB-NO: 2(Nutrient-Bruth), Mac.Conkey Agar, DST Agar ve Adi Agar besiyeri kullanıldı. Verici, dirençli bakterilerden direnç özelliğini almış olan "alıcı" E.coli suşlarının seçilebmesi için, eritilip 46°C'ye soğutulmuş olan Mac.Conkey Ağarlara ayrı ayrı 10 mcg/cc hesabıyla Strep-tomycin konuldu ve petri kutularına döküldü. Besiyerlerinin, antibiyotik çözeltilerinin ve deneylerimizde kullandığımız seleksiyon plaklarının hazırlanması konusundaki ayrıntılar (13) sayılı kaynakta verilmiştir.

#### **Direnç Durumunun Ölçülmesi ve Direnç Kriterleri:**

Bakterilerin, deneylerimizde kullandığımız antibiyotiklere dirençlilik durumları, belirtilen yoğunluklarda antibiyotik içeren Mac.Conkey Agar plaklarına ekim ve klasik Bauer-Kirby disk yöntemlerine göre, disk diffüzyon yöntemi kullanılarak D.S.T Agar plaklarında deneme yolu ile yapıldı (14).

#### **Direnç Kriterleri**

Bakterilerin antibiyotiklere dirençli olduklarını kabul edebilmek için, disklerin içerdiği miktarlarda antibiyotik bulunan Mac.Conkey plaklarında 18-24 saatte üreyerek normal büyüklük ve görünümde koloni oluşturabilmeleri yada disk yöntemi de denendiklerinde Ampisillin için 11 mm. veya daha küçük çapta olması göz önünde tutuldu. Diğer antibiyotiklerin önlenim bölgesinin çaplarının değerlendirilmesinde Bacto Sensitivity Discs için verilen ölçülere uyuldu (15).

#### **Direnç aktarım Deneyleri**

Araştırmamızda kullanılan yöntemlerden bilinen ve herhangi bir kaynakta bulunabilecek olanlarının ayrıntılarını vermedik.

#### **Suşların Özelliklerinin incelenmesi**

Verici ve alıcı bakteri suşlarının antibiyotiklere dirençlilik durumları kontrol edilerek alınan sonuçlar kaydedildi.

#### **İn-vitro Direnç Aktarımı**

İn-vivo direnç aktarımı deneylerine başlamadan önce Tobramycin ve birçok antibiyotiğe karşı oluşan direnç özelliğinin in-vitro direnç aktarımı ile duyarlı suşumuza geçirilebdiğini kontrol etmek istedik.

Kullandığımız yöntem, esas itibarı ile Datta tarafından kullanılan kalitatif direnç aktarımı yöntemine benzemektedir (16). Bu deney, bir bakteri suşundaki dirençlilik özelliğinin bulaşıcı olup olmadığını, bakteride R-plazmidi bulunup bulunmadığını meydana çıkarmak için yapılır. Hangi bakteri incelenirse incelenirse deneyin temel prensipleri aynıdır. Ancak, değişik antibiyotiklere karşı dirençli duruma gelmiş olan bakterilerin izolasyon sayısını arttırmak için, bir antibiyotikli plak yerine üç ayrı antibiyotiği içeren seleksiyon plaklarının kullanılması gerekir. Deneylerde alıcı (duyarlı) bakteri olarak genellikle E.coli K-12 ve verici (dirençli) bakteri olarak S.typhimurium'un uygun suşları kullanılır. Araştırmacılar tarafından E.coli K-12 suşlarının eniyi alıcılar, Salmonellaların ise iyi vericiler olduğu saptanmıştır (17,18). Bizde deneylerimizde, alıcı suş olarak E.coli K-12 ve verici suş olarak S.typhimurium 966'yı kullandık.

a) İnci alıcı ve verici bakteri suşlarının ayrı ayrı ekildikleri seleksiyon plaklarında üreme durumlarının kontrolü:

Antibiyotik dirençlilik durumları kontrol edilmiş olan verici ve İnci alıcı bakteri suşları stok kültürlerinden öze ile alınıp, ayrı ayrı et suyu besiyeri tüplerine ekilerek bir gece boyu 37°C enkübe edildi üretildiler, ertesi gün her kültürden 0.1 ml'lik pipetlerle 0.1 ml. miktarda alınıp MacConkey + Nal.acid + K ve MacConkey + Nal.acid + TM yapısındaki seleksiyon plaklarına yayma sureti ile ekimler yapıp bir gece boyu 37°C de enkübe edildi, ertesi gün plaklar üreyen koloniler bakımından incelendi.

b) İnci direnç transfer dönemi:

İnci alıcı olarak kullandığımız E.coli K-12 ve verici olarak kullandığımız S.typhimurium 966 suşları stok kültürlerinden öze ile alınıp et suyu besiyeri tüplerine ekilerek bir gece boyu 37°C de üretildiler, ertesi gün bu kültürlerden 5 ml.lik et suyu besiyeri tüplerine 0.5 ml. E.coli K-12 ve 0.1 ml S.typhimurium 966 kültüründen ilave edilerek-

karıştırıldı ve bir bir gece boyu 37°C de enkübe edildi (Direnç transferi geçiş dönemi): Bu sürenin sonunda, bu karışımdan Salmonellaların dirençli olduğu antibiyotikleri ayrı ayrı içeren MacConkey+Nal.acid + K ve MacConkey+ Nal.acid ve TM yapısındaki seleksiyon plaklarına üçer öze ekilip çizgiler halinde plak yüzeylerine yayılarak 37°C de bir gece boyu enkübe edildi, ertesi gün plaklar koloniler bakımından incelendi.

Plaklarda oluşan kırmızı, laktoz (+) koloniler büyük bir olasılıkla çoklu dirençli bakterilerden dirençlilik özelliğini almış olan alıcı E.coli K-12 bakteri hücrelerinden oluşmuştur. Çünkü Nal.acid'e duyarlı olan Salmonellalar bu besiyerinde üreyemezler. üreseler bile renksiz koloniler yapacaklardır. Antibiyotiklere dirençli olmayan E.coli'ler de antibiyotik bulunan ortamda üreyemeyeceklerdir. Deneyimizin bundan sonraki bölümünde bu durumu kanıtlamak amacıyla her plakta oluşan laktoz (+) kolonilerden (tek koloniden almamaya dikkat ederek) Mac.Conkey + K ve MacConkey + TM yapısındaki seleksiyon plaklarına azaltma yöntemi ile (tek koloni düşürme) ekimleri yapıldı. Ancak bu plaklara Nal.acid konmadı. Çünkü bu pasajın amacı kolonilerde bulunabilecek olan orijinal çoklu dirençli bakterilere de üreme şansı verip alıcı E.coli K-12 leri saflaştırabilmektir. Bu plaklarda üreyen kolonilerden (bu defa tek tek kolonilerden alınarak) et suyu besiyeri tüplerine ekilip bir gece boyu 37°C'de enkübe edildi, ertesi gün bu kültürden antibiyotik direnç testi uygulandı ve direnç kriterlerine göre direnç durumları kaydedildi.

İn-vitro deneyin sonucunda E.coli K-12 çoklu dirençli ya da tek bir antibiyotiğe dirençli duruma gelmişse bu bakterideki direncinde R-plazmidlerine bağlı olduğunu böylece direnç özelliğinin bulaşıcılığını koruduğunu kanıtlamak gerekir. Bunun için H'inci direnç transferi yapıldı.

c) H'inci direnç transferi dönemi:

IFnci direnç transferine geçmeden önce bu deneyde kullanacağımız suşlarımızın deney için uygun olup olmadığını kontrol amacıyla doğrulama deneyi yapıldı.

### Doğrulama deneyi

Fnci alıcı E.coli K-12 suşu (şimdi çoklu dirençli) ve IFnci (ara alıcı) E.coli K-12 suşlarının

stok kültürlerinden bir öze alınıp ayrı ayrı et suyu besiyeri tüplerine ekimleri yapılarak 37°C de bir gece boyu üretildi. Bu iki suşumuzun hazırlanan sıvı kültürlerinden bir öze alınıp (suşlarda gözlemek istediğimiz özellikler dikkate alınarak) MacConkey + TM + S ve MacConkey + K + S yapısındaki seleksiyon plaklarının yüzeylerine çizgiler halinde yayılarak ayrı ayrı ekimleri yapıldı. 37°C de bir gece boyu üretildi. Ertesi gün plaklar koloniler bakımından incelendi.

Yukarıda kontrolleri yapılmış olan Fnci E.coli K-12 suşu verici olarak, ara alıcı E.coli K-12 mutant suşumuzu ise alıcı olarak kullanıp IFnci transfer deneyine geçildi. Bu deneyin yönteminde Fnci direnç transfer deneyinin aynısıdır. Ancak seleksiyon plakları deneydeki greksinime göre suşlarda gözlemek isteğimiz özellikler dikkate alınarak seçildi. Bu deneyde kullandığımız bakteri suşlarımızın (b) basamağında tarif edildiği şekilde karışımları hazırlanıp bu karışımlardan MacConkey + K + S ve MacConkey + TM + S yapısındaki seleksiyon plaklarına aynı şekilde ekimleri yapıldı, ertesi gün plaklar koloniler bakımından incelendi. Plaklarda üreyen koloniler büyük bir olasılıkla Fnci K-12 suşları (bu deneyde verici) olmayıp bu suşdan dirençlilik özelliğini almış olan ara alıcı E.coli K-12 mutant bakteri suşlarına aittir.

Bunu kanıtlamak amacıyla her plakta oluşan laktoz (+) kolonilerden (tüek koloniden almamaya dikkat ederek) MacConkey+K ve MacConkey + TM yapısındaki seleksiyon plaklarına tek koloni düşecek şekilde ekimleri yapıldı. Kolonilerde bulunabilecek orijinal çoklu dirençli bakteri suşlarına da üreme şansı verip alıcı E.coli K-12 leri saflaştırabilmek için bu tip seleksiyon plaklarına Streptomycin konmadı. Bu plaklarda üreyen kolonilerden bu defa (tek tek kolonilerden alarak) et suyu besiyeri tüplerine ekim yapıldı bir gece boyu 37°C de üretildi. Ertesi gün bu kültürden antibiyotik direnç testi yapıldı direnç kriterlerine göre direnç durumları kaydedildi.

### İn-Vivo Direnç Aktarımı

İn-Vitro direnç aktarımı olumlu sonuç verdikten sonra Tobramycin yanısıra diğer birçok antibiyotiğe de direnç sağlayan R-plazmidin hayvan bağırsaklarında da duyarlı bakterilere aktarılıp aktarılamayacağını araştırdık. Bu deneyde kul-

landığımız yöntem (19) sayılı kaynaktaki yöntemde bazı değişiklikler yapılarak tarafımızdan geliştirildi. Bu deneyde de in-vitro aktarım deneyinden kullanılan 1'nci abci E.coli K-12 ve verici S.typhimurium 966 koöksiyon suşları kullanıldı. Çünkü in-vitro deneyde alınan sonuçlar bu suşların R-plazmidini aktarım deneyleri için uygun olduğunu gösterdi.

İn-Vivo deneylere başlamadan önce, deneye sokulacak 6 erkek kobay zorunlu olarak kobayların normal dışkı florasında hangi bakterilerin bulunduğu, dışkılarında ve barsaklarında deneylerde kullanılacak E.coli'ye benzer bir bakteri olup olmadığı ve dışkıdan dirençli bakterilerin seçilerek üretilmesinde kuşanacağımız TM, KN ve NAL.acid'e dirençli bakterilerin varlığı konularında incelendi.

a) Kobayların normal dışkı florasının kontrolü:

Bu sorulara yanıt verebilmek için kobaylar ayrı kafeslerde fabrikasyon yemi ile beslendi, kafeslerine her akşam üstü steril bir filtre kâğıdı konularak bu kâğıt her sabah dışkı örnekleri alındıktan sonra değiştirildi. Toplanan dışkılar 3 ml sterid serum fizyolojik bulunan şişe içine steril pens de alınıp homojen hale getirildi ve Mac.Conkey + Nal.acid seleksiyon plaklarına her gün tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı ve 37°C'de bir gece boyu enkübe edildi. Ertesi gün plaklar koloniler bakımından incelendi.

c) Kobayların 1.alıcı e.coli K-12 suşu ile beslenme deneyleri: 10 gün süren bu kontrol ekimlerinden sonra her gün sabahları 1'nci E.coli susunun içinde yaklaşık 1 mlx~108/ml (Petroff-Houser sayma camının her küçük karesi başına ortalama 5 bakteri içeren taze sıvı kültüründen 1 ml miktarda deney hayvanlarına ağız yoluyla ve pipetle verildi. Ertesi günden itibaren her gün toplanan ve homojen hale getirilen dışkılarından Mac.Conkey + Nal.acid seçici plaklarına 20 gün süre ile 0.1 ml ekilip paget ile yayıldı 37°C de bir gece boyu enkübe edildi, ertesi gün plaklar, koloniler bakımından incelendi. 20.günün sonunda kobayların dışkılarıyla verdiğimiz orijinal 1.alıcı E.coli K-12 susunu çıkartmaya başladığı saptandı.

d) İn-Vivo aktarım:

21. günden itibaren her gün sabahları deney hayvanlarına ağızdan pipet ile içinde 0.5x~0.8/ml miktarda bakteri bulunan S.typhimurium'un taze sıvı kültüründen 0.5 ml verilmeye başlandı. Ertesi

günden itibaren her gün sabahları toplanan ve çalkalayıcıda homojen hale getirilen dışkı kültüründen bir öze dolusu alınarak tek koloni düşecek şekilde ve ayrıca pipet ile 0.1 ml miktarlarda alınarak Mac.Conkey + Nal.acid + K, Mac.Conkey + Nal.acid + TM içeren plaklara yayma suretiyle ekim yapılarak bir gece boyu 37°C C'de enkübe edildi, ertesi gün plaklar E.coli kolonileri bakımından incelendi. İlk 6 gün kobayların dışkısından yapılan ekimlerde laktoz (+) E.coli'lerin üremediği, S.typhimurium'a benzer laktoz (-) kolonilerin ürediği görüldü. Ancak 7.günden itibaren direnç transfer olduğu üreyen laktoz (+) E.coli kolonilerinden anlaşıldı. Kontrol amacıyla antibiyotik direnç testi uygulanarak sonuçlar değerlendirildi ve laktoz (-), laktoz (+). kolonileri içeren plakların resimleri çekildi.

e) Direnç transferi kontrol deneyi:

Bir cross-feeding (karşılıklı beslenme) nedeniyle üreme olup olmadığını saptayabilmek amacıyla (d) basamağında hf pükda oluşan laktoz (+) kolonilerden, tek koloniden almamaya dikkat edilerek Mac.Conkey + K, Mac.Conkey + TM plaklarına tek koloni düşecek şekilde ekildi. Ancak bu plaklara Nal.acid konmadı. Çünkü bu pasajın amacı kolonilerde bulunabilecek olan, orjinal çoklu dirençli bakterilere üreme şansı verip, ahcı E.coli'leri saflaştırabilmektir. Ekilen plaklar bir gece boyu 37°C'de enkübe edildi ve ertesi gün koloniler bakımından incelendi. Bu ekimlerin kontrolünde, çoklu dirençli S.typhimurium'un üremediği, kolonilerin tamamen E.coli bakterilerinden oluştuğu gözlemlendi. Direnç transferinin kontrolü beklenen neticeyi verdiği için deneye devam edildi. Seçici plaklarda üreyen 1'nci alıcı E.coli kolonilerinin Mac.Conkey + Nal.acid 4- K plaklarından 90 koloni Mac.Conkey + Nal.acid + TM plaklarından 80 Koloni yatık agar tüplerine öze de çekilerek bakterilerin stok kültürleri hazırlandı ve tüpler numaralanarak +4°C de muhafaza edildi. (Bu çalışmayı takip edecek araştırmalar için). Bu incelemeden sonra kobayların verici bakterilerle beslenmesi kesildi. 3 ay süre ile haftada bir defa dışkılarından, Mac.Conkey + Nal.acid + TM, Mac. Conkey + Nal.acid + K seleksiyon plakalarına ekim yapıldı ve bir gece boyu 37°C'de enkübe edildi. Ertesi gün plaklar E.coli K-12 kolonileri bakımından incelendi. 3 ay

Tablo 1. Verici S.typhimurium ve Alıcı E.coli Suşlarının Antibiyotiklere Dirençlilik Durumu.

SUŞLAR	ANTİBİYOTİKLER												
	NAL	S	TM	KN	AL	G	TE	GT	NFH	CPS	CM	RN	OX
Verici S.typhimurium.966	s	r	r	r	r	r	s	s	s	s	s	r	r
1.alıcı E.coli K-12	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
2.alıcı (ara alıcı) Exoli K-12	s	r	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s

NAL (Nalidixic acid); S(Streptomycin); TM (Tobramycin); KN (Kanamycin); AL (Ampycillin); G (Gastrisin); TE(Tetracyclin); GM (Gentamycin); NFH (Nitrofurantoin); CPS (Cephaloridine); CM (Chloramphenicol); RN (Rifambicin); OX (Oxacillin); (s) Duyarlı, (r) dirençli.

süreyle bu plaklarda laktoz (+) E.coli'lerin ürediği görüldü. Ancak bu sürenin sonunda aynı yapıdaki seleksiyon plaklarında hiç bir laktoz (+) E.coli kolonilerinin üremediği saptandı. 3 ay içinde üreyen kolonilerden dirençli hale gelen E.coli'lerin de halen bulaşıcı (R-plazmidlerine bağlı) olduğunu kanıtlayabilmek için Fnci alıcı E.coli suşu verici, H'nci alıcı (ara alıcı) E.coli mutant suşu alıcı olarak kullanılıp, in-vitro olarak H'nci direnç aktarımı tekrarlandı.

f) H'nci direnç transferinde kullanılacak suşların kontrolü amacıyla yapılan ekimler:

Fnci alıcı E.coli K-12 suşu ile II'nci alıcı (ara alıcı) E.coli K-12 suşumuzun bir gecelik taze sıvı kültürlerinden MacConkey + TM +S, MacConkey + K + S plaklarına ayrı ayrı tek koloni düşecek şekilde ekimleri yapıp bir gece boyu 37°C de enkübe edildi. Ertesi gün plaklar koloniler bakımından incelendi. Her iki bakterimizin seleksiyon plaklarında ürememesi beklendi ve bu kontrol ekimi sonuçları beklenen neticeyi verdiği için in-vitro II'nci direnç transferine geçildi.

g) İn-Vitro II'nci direnç transfer deneyi:

Deney tüm ayrıntıları ile (d) basamağındaki direnç transferinin aynısıdır ancak kullandığımız bakteri suşları ve dolayısıyla seleksiyon plaklarının yapısı farklıdır. Çoklu dirençli duruma gelen I'nci alıcı E.coli K-12 suşu verici olarak II'nci alıcı (ara alıcı) E.coli K-12 mutant bakteri suşu ise alıcı olarak kullanıldığından seleksiyon plakları bakteri suşlarının gözlemek istediğimiz özelliklerine göre MacConkey + TM + S, MacConkey + K + S yapısında seçildi. Bu plaklara yapılan ekimlerin ertesi gün kontrollerinde plaklarda bol miktarda laktoz (+)

kolonilerin ürediği görüldü. Plaklarda üreyen koloniler büyük bir olasılıkla Fnci alıcı E.coli K-12 suşları olmayıp, bundan dirençlilik özelliğini almış olan ara alıcı E.coli K-12 mutant bakteri suslarına aittir. Bunu kanıtlamak için her plakta oluşan laktoz (+) kolonilerden (tek koloni düşecek şekilde ekimleri yapıldı ve bir gece boyu 37°C'de enkübe edildi. Kolonilerde bulunulabilecek orijinal çoklu dirençli bakterilerde üreme şansı verip alıcı E.coli K-12'leri saflaştırmak için seleksiyon plaklarına streptomycin konmadı. Ertesi gün plaklar koloniler bakımından incelendi ve sonuçlar kaydedildi.

## BULGULAR

Suşların antibiyotiklere dirençlilik durumu saptanarak, alınan sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Verici bakterinin Nal<sup>s</sup>, S<sup>s</sup>, TM ve bazı antibiyotiklere dirençli 1.alıcı E.coli susunun NaT<sup>s</sup>, S<sup>s</sup> ve diğer antibiyotiklere duyarlı, 2.alıcı E.coli susunun ise NAL<sup>s</sup>, S<sup>s</sup> olduğu saptandı. Deney sonuçlarımıza göre bu suşların R-Plazmidi aktarım deneyleri için uygun olduğu görüldü (Tablo 1). İn-vitro direnç aktarımının I.direnç transferi aşamasında alıcı ve verici suşların karışımının ekildiği MacConkey + Nal.acid + KN, MacConkey + Nal.acid + TM plaklarında çoklu dirençli S.typhimurium 966'nın üremediği saptandı. Üreyen koloniler ancak S.typhimuriumdan direnç özelliği alan E.coli'lere ait laktoz (+) kolonilerdir. Üreyen kolonilerden yapılan antibiyotik direnç testinin sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Fnci alıcı E.coli susunun in-vitro direnç transferinden sonra verici susun dirençli olduğu bazı an-

**Salmonella Susunda (S.typhimurium No.966) Tobramycin'e Direnç Özelliğini Veren "R" Plazmidin İn-Vivo Aktartımı/ÖKTEN**

**Tablo 2. 1.Direnç Transferi Döneminden Sonra 1.Alıcı E.coli Susunun Antibiyotiklere Dirençlilik Durumu**

SUŞLAR	ANTİBİYOTİKLER													
	NAL	S	TM	KN	AL	G	TE	GT	NFH	CPS	CM	RN	OX	
Verici S.typhimurium .966	S	r	r	r	r	r	r	r	s	S	S	r	r	
.1 alıcı E.coli (K-12) (deneyden önce)	r	S	S	s	s	s	S	S	S	S	S	s	S	
Lahcı E.coli K-12 (deneyden sonra)	r	S	r	r	r	r	S	S	S	s	s	r	r	

**Tablo 3. Verici E.coli Nal' S' Susundan direnç Genlerini Alarak Çoklu Dirençli Druma Gelen Ara Alıcı E.coli Nal' S' Susunun Antibiyotiklere Dirençlilik Durumu.**

SUŞLAR	ANTİBİYOTİKLER													
	NAL	S	TM	KN	AL	G	TE	GT	NFH	CPS	CM	RN	OX	
Verici E.coli K-12	r	s	r	r	r	s	s	r	s	s	s	r	r	
.Ara alıcı E.coli (K-12)	s	r	r	r	s	s	s	r	s	s	s	r	r	

tibiyotiklere dirençli duruma geldiği yani çoklu dirençlilik kazandığı ve 2.direnç transferi için uygunluğu gözlemlendi (Tablo 2).

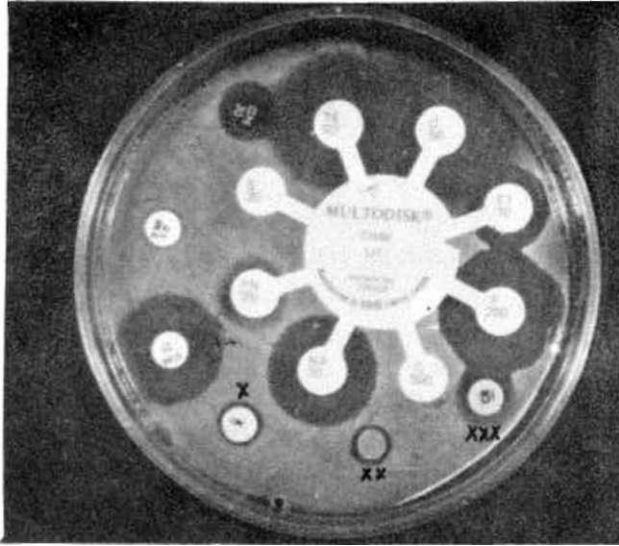
2.direnç transferinde, Finci alıcı E.coli suşu verici, ara alıcı E.coli susunda alıcı olarak kullanılıp karışımlarının ekildiği Mac.Conkey-I-TM, Mac.Conkey+K plaklarındaki kolonilerden yapılan direnç testi sonuçları Tablo 3'de gösterilmiştir.

S' alıcı E.coli suşu direnç genlerini alarak TM yamsıra diğer 4 antibiyotikçe dirençli hale geldi (Tablo III). Böylece bu direnç özelliğinin R-plazmidlerine bağlı olduğu ve başka bakterilere de bulaştırdabdeceği gösterildi. Aynı bakteri suşları, kontrol edmiş suşlar olarak in-vivo aktarım deneylerinde kullanıldı.

Kobayların normal dışkı florasının kontrolünde Mac.conkey plaklarında gram (-) koklar, Klebsiella benzeri bakterilerin ürettiği görüldü. Mac.Conkey Nal.acid, Macconkey-I-Nal.acid-I-K ve Macconkey+Nal.acid-I-TM seçici plaklarında ise laktoz (+) ve laktoz (-) hiçbir bakterinin ümediği saptandı. 10 gün süre ile yapılan ekimlerde hep aynı sonuçlar alındı. Bu sonuçlar,

kobayların barsaklarında Nal.acid'e dirençü bakteri bulunmadığını ve dirençsiz de olsa hiçbir E.coli'nin ümediğini gösterdi. Dışkı alıcı ve verici bakterilerin ayrı ayrı ekildikleri Mac.Conkey -I- Nal .acid + K,Mac.Conkey -I- NaLacid+TM plaklarında ümediği görüldü. 10 gün süre de yapılan ekimlerde hep aynı sonuçlar alındı.

Kobayların Lahcı E.coli suşu ile beslenmesini takiben 20 gün süre de dışkılarında Mac.Conkey+Nal.acid seçici plaklarına yapılan ekimlerde bir hafta süreyle laktoz (+) E.colililerin ümediği ancak 20'nci günün sonunda aynı plaklarda bol miktarda laktoz (+) E.coli'lerin üredikleri görüldü. Bu üreyen bakterilerin Na.acid'e dirençü ve tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu antibiyotik direnç testi ile saptandı. Daha önce belirlediği gibi MacCokey+Nal.acid plaklarından steril kaldığının saptanması, üreyen bakterilerin çalışmamızdaki alıcı E.coli laktoz (+) susuna özgü olduğunu gösterdi. Kobayların 21.günden itibaren 0.5 ml verici S.typhimurium suşu ile beslenmesinden sonra dışkılarında Mac.Conkey-I-Nal.acid KN,

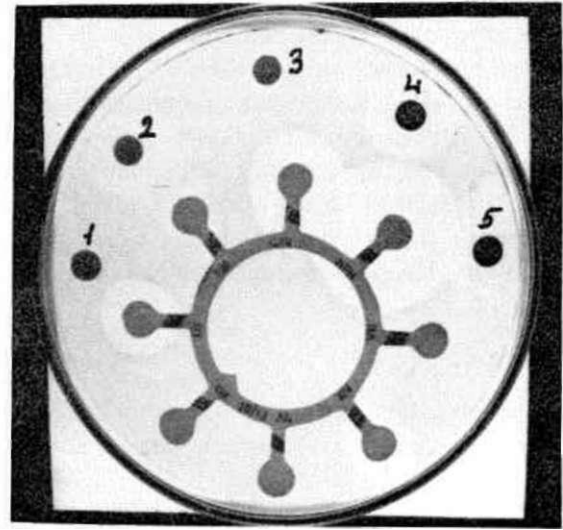


Şekil 1. l'nci direnç transferinin ilk haftasında henüz direnç transferleri olmamış bir seleksiyon plağındaki üreyen kolonilerden yapılan antibiyotik direnç testi sonucunda bir D.St.T. plağındaki laktoz (-) orjinal S.typhimurium 966 susunun antibiyotiklere direnç durumu.

30 mcg Kanamycin (Kx),  
300 mcg Gantrisin (Gxx),  
30 mcg Cephalothin (CRxxx)

Mac.Conkey + NaI.acid + TM plaklarına yapılan ekimlerin kontrolünde, ilk 6 gün laktoz (+) E.coli kolonilerinin üremediği ve henüz direnç transferinin olmadığı, ancak 7.günden itibaren aynı yapıdaki seçici plaklarda laktoz (+) E.coli kolonilerinin üremesi ile direnç transferinin olduğu anlaşıldı. Plaklarda oluşan laktoz (+) koloniler büyük bir olasılıkla çoklu dirençli S.typhimuriumdan dirençlilik özelliğini almış olan alıcı E.coli'lere aittir. Çünkü tek bir antibiyotik içeren plaklardan üreyen koloniler bir bakteri toplumu içinde normalde bulunabilen tek bir antibiyotiğe dirençli doğal mutantlarda olabilirler. Yapılan antibiyotik direnç testi sonuçları Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

S.typhimurium susunun TM yanısıra diğer 6 antibiyotiğe dirençli, NaI.acid ve diğer 6 antibiyotiğe duyarlı olduğu görülüyor (Şekil 1). Şayet üreyen suş orjinal l'nci alıcı E.coli suşu olsaydı, NaI.acid dışı çevresinde önlenim bölgesinin oluşmaması, streptomycin diski çevresinde ise önlenim bölgesinin oluşması gerekirdi.



Şekil 2. l'nci direnç transferi kontrol deneyini takiben ilk birinci hafta sonunda direnç transferi olmuş bir seleksiyon plağındaki üreyen kolonilerden yapılan antibiyotik direnç testi sonucunda bir D.S.T. plağındaki laktoz (+), çoklu dirençli hale gelen orjinal l'nci alıcı E.coli susunun antibiyotiklere dirençlilik durumu.

İn-vivo deneyde verici suşlardan R-plazmidini alan E.coli NaI.acid + Ss suşun TM yanısıra diğer 4 antibiyotiğe dirençli hale geldiği görüldü (Şekil 2). Bu deneylerde bakterilerin antibiyotiklere direnci iki kriterle belirlendi; Belirli oranda antibiyotik içeren besiyerlerinde üreyebilme ve koloni oluşturabilme ve D.S.T agar plaklarında antibiyotik diskleri etrafında oluşan önlenim bölgesinin çapı ölçülerek, örneğin; Bir bakterinin dirençli sayılabilmesi için 10 mcg TM disk çerçevesinde önlenim bölgesinin çapının 14 mm yada daha küçük olması kriter olarak kabul edildi (15). Bizim oluşturduğumuz bakterilerde ise TM için önlenim zonu hiç olmadı.

İn-vivo deneyin sonunda, bu sonuçları doğrulamak amacı ile tekrar edilen in-vitro direnç aktarımında kobayların verici bakteri ile beslenmesi kesilip, 3 ay süre ile dışkılarından Mac.Conkey + TM + S, Mac.Conkey + K-1-S + seleksiyon plaklarında laktoz (+) E.coli'lerin ürettiği saptandı. Bu kolonilerden ayrı ayrı Mac.Conkey + K, Mac.Conkey + TM besiyerini içeren fakat NaI.acid bulunmayan plaklara yapılan ekimlerde, yine orjinal çoklu dirençli bakterilerin üremediği, yine laktoz (+) E.coli'lerin ürettiği saptandı, l.alıcı susun



Streptomycin'e duyarlı, ara alıcı susun ise Streptomycin'e dirençli olması nedeni ile bu kolonilerin İnci alıcı E.coli suşları olmayıp bundan dirençlilik özelliği almış ara alıcı E.coli suşları olduğu anlaşıldı. Bu çahşma sonucu elde edilen veriler in-vivo deneylerde direnç özelliğini almış E.coli susunun R-plazmidlerine bağılı olarak 2.alıcı E.coli'ye bulaşıcı direnç özelliğini geçirdiğini gösterdi.

## TARTIŞMA

R-plmazmidleri ilk kez Japonya'da keşfedilmiş ve o tarihten sonra dünyanın birçok ülkesinde birçok araştırmacı, inceledikleri bakteri hücrelerinde, bu plazmidlerin bulunduğunu ve konjugasyon yolu de duyarlı bakterilere bulaşabildiklerini kanıtlamıştır (20,21).

Bu güne kadar Eschericia coli, Shigella, Vibrio cholerae, Salmonella, Pasteurella, Serratia, Enterobakter, Provediencia, Hafnia, Envinia, Yersinia suşlarında bu R-plazmidlerinin varlığı gösterilmiş vebunlardaki direncin büyük bir bölümünün bulaşıcı olduğu kanıtlanmıştır (2,3,21,22,23). Bulaşıcı özelliği birçok antibiyotige birden direnç sağlaması ve bu direncin çoğu kez blok halinde duyarlı bakteri toplumlarına bulaşması nedeniyle, R-plazmidlerine bağılı olan direnç bakteri kromozomu üzerindeki direnç genlerinin sağladığı dirence göre daha büyük bir önem taşımakta ve son ydlarda gram (-) bakteri toplumlarının daha büyük bir çoğunluğunu dirençli hale getirmektedir. Bu ise bu etkenlerle oluşan hastalıkların tedavisi bakımından gittikçe büyüyen bir tehlike oluşturmaktadır (24).

Enterik bakterlerde R-plazmidlerin varlığı yurdumuzda da birçok araştırmacı tarafından kanıtlanmıştır (7,12,25,26). Son yıllarda ülkemizde izole edilen Salmonella suşlarının önemli bir bölümünün yaygın olarak kullanılmaya başlanmış yeni bir aminoglikozid antibiyotik olan Tabromycin'e bde dirençli oldukları gösterilmiştir. Bu direnç R-plazmidlerine bağılı olup, in-vitro olarak dirençli Salmonella suşlarının önemli bir bölümünün yaygın olarak kullanılmaya başlanmamış yeni bir aminoglikozid antibiyotik olan Tobramycin'e bde dirençli oldukları gösterilmiştir. Bu direnç R-plazmidlerine bağılı olup, in-vitro olarak dirençli SalmoneUa suşlarından (diğer bazı

antibiyotiklere direnç özeliği de birlikte) duyarlı E.coli suşlarına geçirilebilmiştir (7,26). R-plazmidin in-vivo olarak insan ve hayvan barsaklarından duyarlı bakterilere aktarımına ilişkin dünyada çok az sayıda yayın vardır (19,23,27-31). Elde var olan kaynaklar, ülkemizde bu konuda yapılmış bir çalışma olmadığını göstermektedir.

Çalışmanın ilk deneyinde verici ve alıcı suşların antibiyotiklere dirençlilik durumunun kontrolünden sonra, ikinci deneyde diğeri araştırmacılara (3,13,25) ek olarak bu plazmidin in-vitro aktardabildiği gösterildi. Bu deneyde Tobramycin'e direnç özeliğinin diğeri bazı direnç özellikleri ile birlikte orjinal alıcı E.coü susuna geçirdiği görüldü.

Bu deney sonucu antibiyotiklere dirençli duruma gelmiş olan orjinal alıcı sustan dirençlilik özelliğini başka bir duyarlı alıcı E.coli susuna geçirilebmesi, akman ve BaykaPın (26) bulgularım desteklemekte, direnç özeliğinin bulaşıcı olduğunu ve bu nedenle R-plazmidlerine bağılı olduğu şeklindeki düşüncelerine uyumluluk göstermektedir.

Bu deneyde başarılı sonuç alındıktan sonra, başlatılan in-vivo aktarım deneylerinde sağlıklı kobaylar kullanıldı. Bunların önce barsak florası incelendi. Çalışmalarımızda germ-free hayvan kullanılmadı. Barsak florasındaki bazı bakterilerin ve barsak enzimlerinin R-plazmidin aktarımını etkileyebilecekleri düşünülebilir. R-plazmidi aktarımının barsak florasındaki bakterilerce oluşturulan metabolitler tarafından inhibe edildiğine özgü görüşler vardır (32). Ancak, doğada barsaklarda bakteriler arasında bir direnç bulaşması söz konusu ise tehlikeye konu teşkd eden insan ve hayvan barsaklarının bizim deneylerimizde kullandığımız kobayları gibi çok karmaşık bir mikroorganizma florası ve enzimleri içerdiği gerçektir. Bu suretle deneylerimizde bu normal koşulları taklit etmiş olduğumuzu var sayıyoruz. Ancak in-vivo aktarım deneylerimizde başarısızlık durumunda bu etkiler düşünülebilirdi. Halbuki, deneylerimizde doğal koşullarda ve bakteriler içeren kobay barsaklarında da antibiyotik direncinin, dirençli Salmonella susundan duyarlı E.coli susuna geçirilebildiği gösterilmiştir. Kullandığımız kobayların dışkılarından dirençli yada duyarlı hiç bir E.coli suşu saptanamamıştır, I.ahcı E.coli suşu ile beslenen kobaylar beslenme

süresince dışkıları ile orjinal E.coli (duyarlı) susunu çıkartmaya devam etmişlerdir. Beslenme kesildikten sonra 3 ay süre ile aynı suşu dışkıları ile çıkartmaya devam etmişlerdir, bu hayvanlara R-plazmidi içeren Tobramycin'e dirençli S.typhimurium kültürü verilmeye başlanmasından 1 hafta sonra dışkılarından Tobramycin ve diğer antibiyotiklere dirençli E.coli susunun çıkmaya başladığı görülmüş ve dirençli Salmonella'ların verilmesi kesildikten sonra da bu dirençli suşu çıkartmaya devam etmişlerdir. Bu olay, Tobramycin ve diğer antibiyotiklere direnç özelliğinin bu suşlara hayvanların barsaklarından geçtiğini göstermektedir.

Bu deney sonuçlarına dayanılarak, Tobramycin'e direnç sağlayan R-plazmidin, insanların ve diğer canlıların barsaklarında da aynı şekilde geçebileceğini düşünmek olasıdır. Esasen insanları kullanarak bu şekilde deney yapılması, yasal ve bilimsel olarak doğru değildir. Bu bakımdan, kobaylarda alınan sonuçları değerlendirmemiz gerekmektedir. Kobay barsağında R-plazmidin dirençli bakterilerden, duyarlı bakterilere geçebilmesi kanımızca önemli bir bulgudur ve R-plazmidlerinin oluşturduğu büyük tehlikeyi göstermektedir.

Bugüne kadar elde edilebilen dış kaynaklı yayınlarda insan ve hayvan barsaklarında in-vivo direnç aktarımı konusundaki deneysel çalışmaların yeterli olmadığı bildirilmiştir (29, 30). Genelde bu araştırma verilerine göre hayvan ve insan barsaklarında in-vivo direnç transferinin verici ve alıcı bakteri suşlarının özelliğinden, çevre ve konakçı ilişkisinden ayrıca Plazmid ve antimikrobiyal tedaviden etkilendiği vurgulanmaktadır (28,29, 30).

Daha önceden gastro intestinal enfeksiyonu olduğu bilinmeyen hastaların dışkı ve rektal olarak eküvyon ile alınan örneklerinden çoğunluğunu E.coli suşlarının oluşturduğu 287 koliform bakteri izole edilmiş. Bu enterik florada plazmid analizi ve direnç transferinin (R transferi) R transfer potansiyeli ve transfer oranı bakımından E.coli suşlarında diğer enterik bakterilerden daha fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca antibiyotiklere dirençli suşların daha fazlasını E.coli'lerin oluşturduğu

gözlenmiştir. E.coli ve diğer enterobakterilerin daha çok tetracyclin, trimethoprim, sulphanamid'e, daha az olarak da tobramycin, streptomycin ve ampicilline dirençli olduğu bulunmuştur. Bu bulgular E.coli suşlarının diğer enterik bakterilerden daha iyi bir plazmid alıcısı olduklarını ve bir kere kazanılmış direnç plazmidlerini muhafaza etmekte daha güçlü olduklarını göstermiştir (31). Netice olarak enterik bakteriler arasındaki plazmid dağılımındaki farklılık E.coli suşları ile mukayese edilen diğer enterik bakteriler arasındaki antibiyotiklere karşı oluşan direnç özelliğine bağlanmıştır.

Bir başka çalışmada barsak enfeksiyonu olan ve dışkı örneklerinden S.typhi izole edilen ve ilk önce chloramphenicol ve daha sonra Cotrimoxazole ile tedavi edilen hasta da daha sonra bu antibiyotiklere karşı direnç oluşmuştur. Chloramphenicol ve sulphonamide direnç bir plazmid ile, trimethoprim direnç ise bir transpozon ile tayin edilmiştir. Aynı direnç genleri hastadan izole edilen klebsiella suşlarında da gözlenmiştir. Ayrıca S.typhi ve Kaerogenes'lerin en fazla ampicillin, sulphanamid, trimethoprim, cloramfenicol'e ve daha az olarak streptomycin ve spectinomycin'e dirençli olduğu bulunmuştur (30). Sonuç olarak değişik bakteriler arasında direnç genlerini transfer eden R-plazmidlerin bu direnç genlerini değişik R-plazmidleri arasında yayabileceği düşünülmektedir. Araştırma verilerimize göre bulgularımız genellikle diğer araştırmacıların bulgularına uymaktadır. Bu bulgular, doğada insan ve hayvan barsaklarında R-plazmidlerin dirençli bakterilerden duyarlı bakteri topluma buluşabileceğini göstermektedir (27-32).

Tobramycin tedavide yaygın olarak kullanılmamasına karşın ülkemizde çoğu bakterinin Tobramycin'e direnç sağlayan genleri taşıyan R-plazmidlerini taşıdıkları ve bunların duyarlı bakteri toplamları arasında yayılarak her geçen gün daha fazla bakteriyi bu antibiyotiğe dirençli hale getirdikleri anlaşılmaktadır, in-vitro ve in-vivo aktarım deneylerimiz bunu kanıtlamaktadır. Verilerimize göre, bu olayın tedavi edici hekimlik ve halk sağlığı bakımından doğurabileceği tehlikenin belirgin olduğu kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Anderson ES, Datta N: Resistance to penicillins and its transfer in Enterobacteriaceae, Lancet, 1.407-409,1965.
2. Watanabe T, Fukasawa T: Episommediated transfer of drug resistance factors by conjugation, J.Bacteriol, 81:669, 1961.
3. Hinshaw V: Frequency of Factor mediated multiple drug resistance in Klebsiella and Aerobacter. App. Microbial, 17.214,1969.
4. Ling J, Chau PY: Incidence of plasmids in multiply-resistant Salmonella isolates from diarrhoeal patients in Hong Kong from 1973-82, Epidemiol Infect. 99 (2): 307-321,1987.
5. Threlfall EJ, Ward LR, Rowe B: R-Plasmids in Salmonella typhimurium in the United Kingdom. J.Antimicrob. Chemother. 18.Suppl. C175,1986.
6. Günalp A: Türkiye'de İzole Edilen Bazı Shigella Suşlarında Antibiyotik Resistans Transfer Faktörlerinin Gösterilişi, Çocuk Sağ. Hast. Derg. 14:163,1971.
7. Akman M: Yurdumuzda enterik bakterilerin antibiyotik durumları ve genetik nedenleri. Mikrobiyol. Bült. 9:59, 1975.
8. Nikolnikow S: Characterization of R-Plasmids coding for ampicillin resistance in Salmonella typhimurium, Acta Microbiol ung. 32 (4): 15-20,1985.
9. Neu HC: Tobramycin, an overview, J.Infect. Dis.Suppl. 134, Supp. 3,1976.
10. Falkiner FR, Keane CT: Cross infection in a surgical ward caused by Pseudomonas aeruginosa with transferable resistance to Gentamycin and Tobramycin, J.Clin. Path. 30:731,1977.
11. Moellering RC, Wennersten C: Resistance to Gentamycin, Tobramycin and Amikacin among clinical isolates of bacteria, Am.J. Med. 62:873,1977.
12. Akalın E, Baykal M: Gram-Negatif Bakterilerde Gentamycin, Tobramycin ve Amikacin'e Dirençlilik, XIX. Türk Mikrobiyoloji kongresi. Bilimsel bildiri özetleri. 47, 14-16, Ekim Ankara.
13. Akman M: Bakteri Genetiği Teorik Pratik. Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, No:1, Ayyıldız Basımevi, Ankara. 1977.
14. Bauer AW, Kirby MN, Sherris JC, Turck MM: Technical section antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. The Am.J.of.Clin. Path. 45 (4): 493, 1970.
15. Bacto-Sensitivity Discs for use the antimicrobik susceptibility, test. Difco Technical Information May, 1980.
16. Datta N: Drug resistance and R-factors in the bowel bacteria of London patients before and after admission to hospital. Br. Med. J.2:407,1969.
17. Watanabe T: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev.27:87-109,1963.
18. Watanabe T, Fukasawa T: Episomic Resistance factors in Enterobacteriaceae. I.Transfer of resistance factors by Conjugation Among Enterobacteriaceae. Med. Biol. 56:56-59,1960.
19. Jorolmen H, Kemp G: R-Factor transmission in-vivo.J.Bacteriol, 99 (2): 487-90,1969.
20. Datta N: Transmissible drug resistance in a epidemic strain of Salmonella typhimurium, J.Hyg.60:301,1962.
21. Datta N: Infectious drug resistance. Brit. Med. Bull. 21:254-259,1965.
22. Anderson ES, Lewis MJ: Drug resistance and its transfer in Salmonella typhimurium. Nature. 206:579,1965.
23. Watanabe T: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev 27:87-109,1963.
24. Tompkins LS, Folkow S: The growing problem of bacterial resistance Drug ther. 9(5):3946,1979.
25. Akman M: Türkiye'de izole edilmiş olan Shigella suşlarında bulaşıcı tipte antibiyotik-direnç (R faktörü) varlığı. Mikrobiyol. Bült.6:21,1972.
26. Akman M, Baykal M: Ankarada izole edilen enterik bakterilerde R-plazmidlerine bağlı Tobramycin'e Direnç. Tubitak VII.Bilim Kongresi. Tıp Araştırma Grubu Tebliği Özetleri Kitabı, 48:29 Eylül-3 Ekim. Ankara. 1980.
27. Kasuya M: Transfer of drug resistance between enteric bacteria induced in the mouse intestine. J.Bacteriol. 88:322-328,1964.
28. Smith HW: Observations on the in vivo transfer of R factors. Annals of the New York. Academy of Sciences 182:80-90,1971.
29. Richmond MH, Petrocheilou V: R factor transfer in vivo in humans. In: Se'i's's'nger D (ed). Microbiology. American Society of Microbiology. Washington DC. 273-276,1978.
30. Datta N, Richards II, Datta C: Salmonella typhi in vivo acquires resistance to both chloramphenicol and co-trimoxazole. Lancet 1:1181-1183,1981.
31. Plat DJ, Chesham JS, Kristinsson KG: R-plasmid transfer in vivo: a prospective study. J.Med. Microbiol. 21:325-330, 1986.
32. Panhotra BR, Mahanta J, Garg RK, Agarwal KC: Transferable drug resistance in Salmonella typhimurium, Indian J Med Res. 73:489-493, 1981.