

T.C.
ZONGULDAK KARAEELMAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KİNOLON DİRENÇLİ
***ESCHERICHIA COLI* VE *KLEBSİELLA* SPP. SUŞLARINDA**
DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Oya PAZARLI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Füsun CÖMERT

ZONGULDAK
2010

T.C.
ZONGULDAK KARAEELMAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KİNOLON DİRENÇLİ
***ESCHERICHIA COLI* VE *KLEBSİELLA* SPP. SUŞLARINDA**
DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Oya PAZARLI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Füsun CÖMERT

ZONGULDAK
2010

TEZ ONAY TUTANAĞI

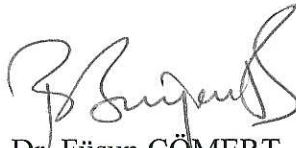
Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Kinolon Dirençli Escherichia Coli ve Klebsiella SPP. Suşlarında Direnç Genlerinin Araştırılması

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Oya PAZARLI

Tez Savunma Tarihi: 22/10/2010

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Füsun CÖMERT


Doç. Dr. Füsun CÖMERT
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Barış OTLU
Üye

Doç. Dr. Canan KÜLAH
Üye

Doç. Dr. İshak Özel TEKİN
Üye

Yrd. Doç. Dr. Elif AKTAŞ
Üye

UYGUNDUR
22/10/2010


Prof. Dr. N. Aydın MUNCAN
Dekan

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında bilgisi ve sevgisini esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında sonsuz katkıları olan, yanında her zaman kendimi güvende hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Füsun CÖMERT'e, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, hoşgörülerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Canan KÜLAH ile Yrd. Doç. Dr. Elif AKTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Sayın Prof. Dr. Vildan SÜMBÜLOĞLU ve Öğr. Gör. Füzulan KÖKTÜRK'e tezimin istatistiksel analizi için katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim sürecince beraber çalışmaktan ve onları tanımış olmaktan mutluluk duyduğum asistan ve laborant arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Sayın Prof. Dr. Zeynep GÜLAY'a *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* pozitif kontrol suşlarını bize temin ettiği için çok teşekkür ederim.

Bugünleri görebilmemi sağlayan sevgili anneme ve babama, değerli eşime, ayrıca önce TUS'u kazanmak, sonra da uzman olabilmek için çoğu zaman az ilgi gösterebildiğim, ben anlayamadan büyüyen oğlum Cankat'a çok teşekkür ederim.

Dr. Oya PAZARLI
ZONGULDAK, 2010

ÖZET

Pazarlı O., Kinolon dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında direnç genlerinin araştırılması, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi. Zonguldak, 2010.

Bu çalışmada, bölgemizdeki *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında kinolon direnç sıklığının belirlenmesi, bu izolatlarda kinolon direnç mekanizmalarından en sık görülen topoizomeras gen (*gyrA* ve *parC*) mutasyonlarının ve plazmid kaynaklı direnç genleri olan *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib* varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Şubat-Ağustos 2009 tarihleri arasında laboratuvarımıza gelen 347'si (55.3) yatan, 281'i (44.7) poliklinik hastası toplam 628 hastaya ait çeşitli klinik örneklerden elde edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu izolatlar arasından kinolon grubu antibiyotiklerden nalidiksik asite disk difüzyon yöntemi ile dirençli/orta duyarlı olarak bulunan 265 *E. coli* ve 35 *Klebsiella spp.*'e ait *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *gyrA* ve *parC* gen bölgelerinin araştırılması polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle yapılmıştır. *gyrA* ve *parC* gen bölgelerindeki mutasyonların saptanması için dizi analizi yapılmıştır

628 izolatın 300'ünde nalidiksik asit direnci (*E. coli* %52, *Klebsiella spp.* %27.5) belirlenmiştir. Nalidiksik aside dirençli/orta duyarlı olan izolatların, diğer izolatlara göre, ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, sefalotin, sefepim, sefotaksim, sefuroksim, sefoksitin, gentamisin, tobramisin, amikasin, trimetoprim-sülfometoksazol antibiyotiklerine karşı istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha dirençli oldukları saptanmıştır. Nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda GSBL üretimi (%83.3), duyarlı olanlara göre (%16.7) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

gyrA genini kodlayan 64 ve *parC* genini kodlayan 77 izolatın TÜBİTAK MAM GMBE'de dizi analizi yapılmıştır. *gyrA* için 59 izolatın aminoasit dizisi elde edilebilmiştir. Bu örneklerle ait, QRDR olarak tanımlanan Ala67-Gln106 arasında aminoasit dizilimleri incelendiğinde 59 izolatın tümünde çift mutasyon olduğu gözlenmiştir. Bu izolatlarda 83. kodonda serin yerine lösin (Ser83Leu), bir izolat dışında 87. kodonda aspartat yerine asparajin (Asp87Asn) ve tek izolatta 87. kodonda aspartat yerine tirozin (Asp87Tyr) bulunduğu belirlenmiştir. *parC* için 77 izolatın tümünün aminoasit dizisi elde edilmiştir. Bu izolatların ikisinde mutasyon

bulunmamıştır. Geri kalan 75 izolatın hepsinde 80. kodonda serin yerine izolösin (Ser80Ile) geçişi olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 43'ünde (% 57.3) ilave bir mutasyon olarak, 84. kodonda glutamat yerine 35 izolatta valin (Glu84Val), beş izolatta glisin (Glu84Gly), üç izolatta ise alanin (Glu84Ala) geçişi belirlenmiştir.

E. coli izolatlarının 99'unda (%37.4), *K. pneumoniae* izolatlarının dördünde (%12.1) *aac(6')-Ib* geni belirlenmiştir. *K. oxytoca* izolatlarında bu gen bölgesi bulunmamıştır. *aac(6')-Ib* geni saptanan *E. coli* izolatlarında tobramisin ve gentamisin direnci istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu izolatlarda belirlenen trimetoprim-sulfametoksazole azalmış duyarlılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *aac(6')-Ib* geni saptanan izolatlarda GSBL üretimi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

İncelenen izolatların hiçbirinde *qnr* geni bulunmamıştır

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, kinolon direnci, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *gyrA* mutasyonu, *parC* mutasyonu

ABSTRACT

Pazarlı O., The evaluation of resistance genes in quinolone resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* strains. Zonguldak Karaelmas University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Thesis. Zonguldak, 2010.

The aim of this study was to determine the prevalence of the quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* isolates in our region, to investigate the topoisomerase gene (*gyrA* ve *parC*) mutations which are the most frequently seen among the quinolon resistance mechanisms in these isolates and also plasmid-based genes of resistance, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*. *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* isolates obtained from various clinical samples of 628 patients (347 (55.3%) inpatient and 281 (44.7%) outpatient), which were isolated in the laboratory between February and August 2009 were included in the study. A total of 265 *Escherichia coli* and 35 *Klebsiella spp.* isolates which were resistant/semi-sensitive to nalidixic acid by disk diffusion method were analyzed for *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *gyrA* and *parC* gene mutations with polymerase chain reaction method. Sequence analyses was performed to determine the mutations on *gyrA* and *parC* gene regions.

Nalidixic acid resistance was determined in 300 of the total 628 isolates (52% in *E. coli*, and 27.5% in *Klebsiella spp.*). Compared to the other isolates, the isolates that are resistant / semi-sensitive to nalidixic acid were statistically more resistant to the antibiotics like ampicilline, amoxycilline/clavulanic acid, cephalotine, sephelim, cephotaxim, cephuroxime, cefoxitin, gentamicin, tobramycine, amicasin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. GSBL producers was higher in the nalidixic acid resistant isolates (83.3%) than the nalidixic acid sensitive isolates (16.7%).

gyrA coding 64 isolates and *parC* coding 77 isolates were sequenced by DNA sequence analyses in TUBITAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey) MAM GMBE. Aminoacid coding could be performed in 59 of the *gyrA* coding isolates. When aminoacid sequence were examined among Ala67-Gln106, which has been defined as QRDR, all of the 59 isolates had double mutation. In all these isolates, it's been found that there was leucine instead of serine on codon 83 (Ser83Leu) and all the isolates had asparagine instead of aspartate on codon 87 (Asp87Asn), except for one isolate which had tyrosine instead of aspartate on codon

87 (Asp87Tyr). Aminoacid coding could be performed in the *parC* coding 77 isolates. Two of these isolates had no mutation and 75 isolates were detected to have isoleucine transition instead of serine on codon 80. It was also observed that 43 of these isolates (57.3%) had an additional mutation; 35 isolates had valin (Glu84Val), 5 isolates had glycine (Glu84Gly) and 3 isolates had alanine (Glu84Ala) transition instead of glutamate on codon 84.

The *aac(6')-Ib* gene were detected in 99 (37.4%) of the *E. coli* isolates, in four (12.1%) of the *K. pneumoniae* isolates and in none of the *K. oxytoca* isolates. In *E. coli* isolates which are proved to have *aac(6')-Ib* gene, tobramycine and gentamicin resistance were statistically determined at a high level. Decreased sensitivity to trimethoprim-sulfamethoxazole were seen in these isolates which was not statistically significant. The isolates which had *aac(6')-Ib* gene, were determined as highly GSBL producers.

The *gmr* gene was not detected in any of the isolates.

Keywords: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, quinolone resistance, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *gyrA* mutation, *parC* mutation

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİL DİZİNİ.....	xii
TABLO DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kinolon Grubu Antibiyotikler	3
2.2. Kimyasal Yapı	3
2.3. Etki Mekanizması.....	4
2.4. Sınıflandırma ve Klinik Kullanım.....	6
2.5. Kinolon Direnç Mekanizmaları	8
2.5.1. İlaç Hedefinde Değişikliğe Yol Açan Mutasyonlar.....	8
2.5.2. İlaç Birikimini Azaltan Mutasyonlar	12
2.5.3. Hücreyi İlacın Letal Etkilerinden Koruyan Plazmidler	13
2.6. Dünyada Kinolon Direnci.....	17
2.7. Türkiye’de Kinolon Direnci	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. İzolatların Toplanması.....	26
3.2. Kültür ve Bakteri Tanımlaması.....	26
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	26
3.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi.....	26
3.3.2. Agar Dilüsyon Yöntemi	27
3.4. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Varlığının Gösterilmesi.....	28
3.5. DNA Eldesi.....	28
3.5.1. Kaynatma ile DNA Eldesi.....	28
3.5.2. Ticari Kit Kullanılarak DNA Eldesi	28
3.6. DNA Çoğaltılması (Amplifikasyon)	29
3.7. Amplifikasyon Ürünlerinin Görüntülenmesi.....	30

3.8. Nükleik Asit Dizileme.....	31
3.9. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR	33
4.1. İzolat Özellikleri	33
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	35
4.3. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Varlığının Gösterilmesi.....	38
4.4. Kinolon Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	39
5. TARTIŞMA.....	44
5.1. <i>gyrA</i> ve <i>parC</i> Mutasyonları	45
5.2. Plazmit Geçişli Kinolon Direnci.....	47
6. SONUÇLAR.....	52
7. KAYNAKLAR	53
8. EKLER.....	69
Ek 1: Etik Kurul Onayı	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AK	: Amikasin
Ala	: Alanin
AMK	: Amoksisilin-klavulonat
ark.	: Arkadaşları
Asn	: Asparagin
Asp	: Aspartat
BAL	: Bronkoalveoler Lavaj
bç	: Baz çifti
C	: Santigrad
CAZ	: Seftazidim
CİP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	: Gentamisin
CRO	: Seftriakson
CTX	: Sefotaksim
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetat
EMB	: Eozin metilen mavisi
FEP	: Sefepim
Glu	: Glutamat
Gly	: Glisin
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
gr	: Gram
Ile	: İsolösin
Leu	: Lösin
LEV	: Levofloksasin
Lys	: Lizin
M	: Molar

mg	: Miligram
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
NA	: Nalidiksik asit
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
pmol	: Picomolar
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
QRDR	: Quinolone Resistance Determining Region (Kinolon Direnci Belirleyici Bölge)
Ser	: Serin
SXT	: Trimetoprim-sülfametoksazol
TBE	: Tris- Borik asit –EDTA
TE	: Tris –EDTA
TMP	: Trimetoprim-sülfametoksazol
TOB	: Tobramisin
TRIS	: Tris (hidroksimetil) aminometan
Tyr	: Tirozin
U	: Unite
UV	: Ultraviyole
Val	: Valin

ŞEKİL DİZİNİ

Sekil

Sayfa

Şekil 1: Kinolonların temel yapısı .	3
Şekil 2: Kinolon halkası	4
Şekil 3: a) Bakteriyel DNA’da negatif süpersarmalin oluşumu	
b) Topoizomerazlar ve DNA replikasyonu	5
Şekil 4: GyrA’da kinolon direnci belirleyici bölge-QRDR	9
Şekil 5: EARSS verilerine göre 2003-2008 yıllarında katılımcı ülkelerde	
florokinolon dirençli <i>E.coli</i> izolatlarının oranı .	18
Şekil 6: EARSS verilerine göre 2006-2008 yıllarında katılımcı ülkelerde	
florokinolon dirençli	19
Şekil 7: PCR sonrası <i>gyrA</i> ve <i>parC</i> bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	39
Şekil 8: PCR sonrası <i>aac(6’)-Ib</i> bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	42
Şekil 9: PCR sonrası <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> bölgelerinin agaroz jel elektroforez	
görüntüsü	43

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Kinolon grubu antibiyotiklerin sınıflandırılması	7
Tablo 2. <i>E. coli</i> 'nin DNA giraz ve topoizomera IV genlerinde saptanmış mutasyonlar.....	11
Tablo 3. Bakterilerde kinolon direncinden sorumlu tutulan efluks pompaları.	13
Tablo 4. Günümüze kadar bildirilmiş olan <i>qnr</i> genleri ve varyantları.	15
Tablo 5. 2005-2009 yılları arasında Türkiye’de <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının florokinolonlara direnç oranları.....	20
Tablo 6. Kandan izole <i>E.coli</i> suşlarında florokinolon direnç oranları.....	20
Tablo 7. 2001-2009 yılları arasında ülkemizde yapılmış çalışmalarda <i>E.coli</i> izolatlarında belirlenen siprofloksasin direnç oranları	21
Tablo 8. 2004-2009 yılları arasında ülkemizde yapılan çalışmalarda <i>Klebsiella spp.</i> izolatlarında belirlenen siprofloksasin direnç oranları	22
Tablo 9. Plazmit aracılı kinolon direnci ile ilgili Türkiye’de yapılmış çalışmalar.....	24
Tablo 10. Nalidiksik asit ve siprofloksasin için MİK yorumlama standartları	27
Tablo 11. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri	29
Tablo 12. İzolatların elde edildikleri klinik örneklerle göre ve hasta özelliklerine göre dağılımı	33
Tablo 13. İzolatların elde edildikleri hastaların başvurdıkları kliniklerin dağılımı...	34
Tablo 14. Çalışmaya alınan 628 izolatın antibiyotik duyarlılıkları	35
Tablo 15. Nalidiksik asite dirençli/orta duyarlı olan 300 izolatın antibiyotik duyarlılıkları.....	36
Tablo 16. Nalidiksik asite duyarlılık durumuna göre ayaktan ve yatan hastalarının dağılımı.....	37
Tablo 17. İzolatların nalidiksik asit MİK değerleri	37
Tablo 18. İzolatların siprofloksasin MİK değerleri	38
Tablo 19. Tüm izolatların ve nalidiksik asit dirençli/orta duyarlı olarak tespit edilen izolatların GSBL oranları	38
Tablo 20. <i>gyrA</i> ve <i>parC</i> gen bölgelerinde belirlenmiş mutasyonlar.....	40
Tablo 21. İzolatlarda <i>aac(6’)-Ib</i> geni varlığının GSBL üretimi ile ilişkisi.....	43

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kinolonlar sentetik olarak üretilen kimyasal maddelerdir. Antimalaryal ajan klorokinin sentezi sırasında bir yan ürün olarak 1962’de bulunan nalidiksik asit kinolon sınıfının ana üyesidir. 1980’li yıllarda florlanmış kinolonlar denilen yeni kinolon türevleri kinik kullanıma girmiş ve çeşitli enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan 1986 yılında kullanıma giren norfloksasin ilk florokinolon, 1987 yılında kullanıma giren siprofloksasin ise en önemli, belki de en fazla kullanılan kinolon özelliği göstermektedir. Eski kinolonların etkinliği çoğunlukla Gram-negatif bakteriler üzerine iken, yeni kinolonların etkinliği daha geniş spektrumlu olup Gram-pozitif bakterilere etkileri daha yüksektir (1). Kinolonların dünyada ve ülkemizdeki yaygın olarak kullanımları nedeniyle hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen suşların yanısıra toplum kaynaklı suşlarda da direnç oranlarında belirgin artış olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle kinolon grubu antibiyotiklerin artık ülkemiz için ampirik tedavide güvenilirliklerini yitirmek üzere oldukları bildirilmektedir (2).

Kinolonlar, bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan iki tip topoizomeras (DNA giraz ve topoizomeras IV) ile etkileşime girerek DNA sentezini durdurmaktadır. Kinolon tipi antibiyotiklere karşı direnç doğal ve kazanılmış olabilmektedir. Doğal direnç endojen ‘multidrug efluks pompalarının’ üretimi ile tanımlanmıştır. Kazanılmış direnç, hedefteki (topoizomeras *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* mutasyonları) kromozomal mutasyonlar, ‘multidrug efluks pompalarının’ aşırı üretimini aktive eden mutasyonlar ve porin azalmasına bağlı gerçekleşmektedir. Porin azalmasına bağlı direnç genellikle diğer direnç mekanizmaları ile sinerjik rol oynamaktadır (3).

Son zamanlarda plazmid aracılı kinolon direnci gündeme gelmiştir. Plazmid ilişkili kinolon direncinde üç mekanizma tanımlanmıştır;

1. Qnr proteinleri; topoizomeras II’yi kinolon inhibisyonundan koruyan proteinler olup *qnr* geni tarafından kodlanmaktadır.
2. AAC(6’)-Ib-cr proteinleri; genel aminoglikozid asetiltransferaz enzimleri olup *aac(6’)-Ib-cr* geni ile kodlanan varyant protein norfloksasin ve siprofloksasini asetilleme ve etkisini azaltma yeteneğine sahiptir.

3. QepA proteini; çok yeni tanımlanmış olan kinolon efluks pompa proteinleridir (4, 5).

Kinolon direncinin aktarımında rol oynayan plazmidin üzerinde kinolon direnç genleri dışında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), kloramfenikol asetiltransferaz ve bazı dezenfektan direnç genlerinin de bulunduğu bildirilmiştir (4).

E. coli ve *Klebsiella spp.* başta idrar yolu infeksiyonları olmak üzere en sık rastlanan infeksiyon etkenlerinin başında gelmektedir (6). Bu özellikleri ve özellikle toplum kökenli idrar yolu infeksiyonlarında kinolon grubu antibiyotiklerin ampirik olarak yaygın kullanımı nedeni ile bu antibiyotik grubuna karşı artan direnç oranları bildirilmektedir (2). Aynı zamanda bu iki cins bakteri genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakterilerin başında yer almakta ve özellikle *K. pneumoniae* için ülkemizden yüksek düzeyde GSBL üretim oranları bildirilmektedir (7, 8).

Bu çalışmada, hastanemize başvuran hastalardan etken olarak izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, izolatlarının,

1. Başta nalidiksik asit olmak üzere çeşitli antibiyotiklere duyarlılık durumlarının belirlenmesi,
2. GSBL üretiminin araştırılması,
3. *gyrA* ve *parC* genlerinde görülen mutasyonların belirlenmesi,
4. Plazmid geçişli kinolon direnç genlerinden *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib* varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

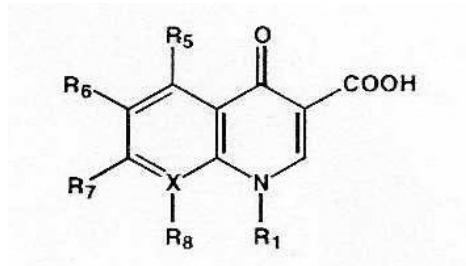
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kinolon Grubu Antibiyotikler

Kinolon grubu antibiyotiklerin gelişimi 1962’de Leshner ve arkadaşlarının (9), antimalaryal bir ilaç olan klorokin sentezlenmesi sırasında rastlantısal olarak nalidiksik asidi keşfetmesiyle başlamıştır. Bu buluş, kinolon bileşiklerinin klinik olarak kullanımlarının geliştirilmesi için başlangıç olmuştur. Yıllar içinde nalidiksik asidin kimyasal yapısındaki modifikasyonlarla oksolinik asit ve sinoksasin gibi yeni türevler sentezlenmiş ancak, bunların klinik kullanımı genellikle idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi ile sınırlı kalmıştır. 1980’li yıllarda florlanmış kinolonlar olarak adlandırılan yeni kinolon türevleri klinik kullanıma girmiştir. Nalidiksik aside benzer şekilde bakterisidal, oral alındığında iyi absorbe olan bu ilaçlar, nalidiksik asitten farklı olarak invitro olarak daha etkin, daha geniş antibakteriyel etki spektrumuna ve daha üstün farmakokinetik özelliklere sahip olup, direnç gelişimine de daha az neden olmaktadır. Yeni kinolonların çok sayıda türevi elde edilmiş olmasına rağmen bunların ancak bir kısmı insan enfeksiyonlarında kullanılır durumdadır. Bazıları uygulamaya girdikten kısa bir süre sonra yan etkileri nedeniyle piyasadan toplatılmış, kullanımlarından vazgeçilmek zorunda kalınmıştır (10, 11).

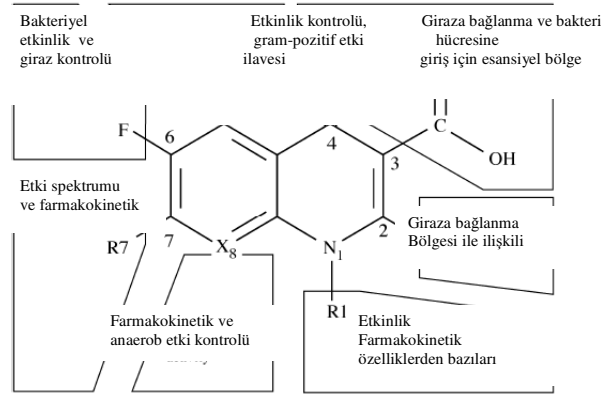
2.2. Kimyasal Yapı

Kinolonlar tümüyle sentetik olarak elde edilen antibakteriyel ilaçlardır (1, 12). Esas yapılarını 1. pozisyonda nitrojen, 3. pozisyonda karboksilik asit ve 4. karbona çift bağla bağlı oksijen içeren ikili halka oluşturmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1: Kinolonların temel yapısı (12).

Bu ikili halka yapısının 6. karbonuna bazı türevlerde flor ilavesi yapılarak antibakteriyel etkinlikte artış sağlanmıştır. Bu türevlerde 7. karbona eklenen piperazinil, metil piperazinil ya da dimetil piperazinil halkası gram negatif bakterilere karşı etkinlik artışı sağlamıştır. Yeni kinolonların çoğunda bulunan piperazinil halkasına bağlı olan metil grubu oral biyoyararlanımın artmasını sağlamıştır. Gemifloksasin, klinofloksasin, moksifloksasin ve travofloksasin gibi yeni kinolonlarda, 7. pozisyona pirolidinil ya da ikili halka eklenmesi ile gram pozitif bakterilere karşı etkinlik arttırılmış, 8. pozisyonlarına halid ya da metoksi gurubunun bağlanması ile anaerob bakterilere karşı antibakteriyel etkinlik sağlanmıştır. Birinci azota değişik türevlerde değişik gruplar bağlanarak gram negatif bakterilere etkinlik güçlendirilmiştir (11, 12) (Şekil 2).

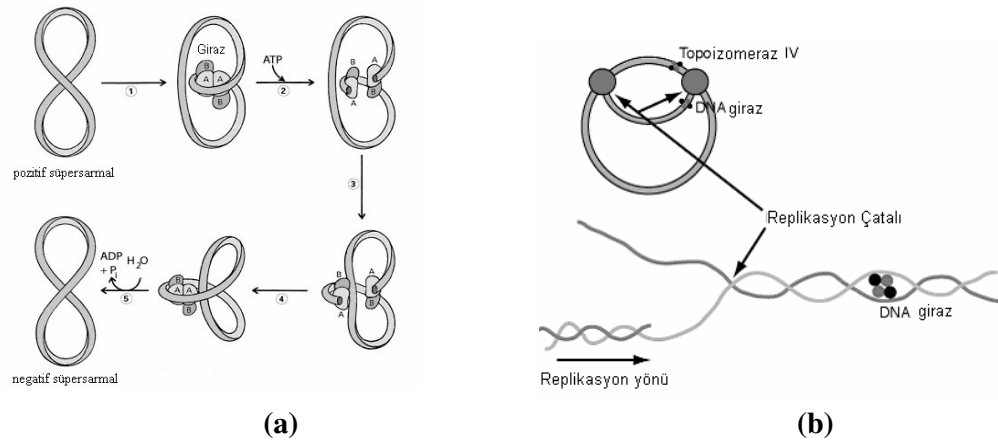


Şekil 2: Kinolon halkası (13 no.lu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

2.3. Etki Mekanizması

Bir bakteri, hücresi yaklaşık bir milimetre uzunluğunda olan DNA molekülünü, 2 µm. gibi oldukça küçük olan hücresel bir boyut içine sığdırmak zorundadır. Bu işlem, bakteride ATP yardımıyla DNA giraz (topoizomerez II) aracılığı ile yapılmaktadır. DNA giraz, çift sarmallı bakteri DNA'sında geri dönüşümlü kesme ve tekrar bağlama fonksiyonu ile DNA'da negatif kıvrımlara (negative supercoil) neden olarak DNA molekülünün boyunu küçültmekte, böylelikle hücre içine sığmasını (supercoiling) sağlamaktadır (Şekil 3a). DNA'nın bu şekilde negatif super kıvrımlar oluşturmaları, DNA replikasyonunun ve bazı genlerin transkripsiyonunun başlamasına

yol açmaktadır. DNA giraz aynı zamanda, DNA replikasyon çatallı (replication fork) boyunca yığılan süper helikslerin ilerlemesinden de sorumludur (14) (Şekil 3b). DNA giraz ilk kez 1976'da Gellert ve ark.ları tarafından tanımlanmıştır (15). DNA giraz enzimi iki A (GyrA) alt birimi ve iki B (GyrB) alt biriminden oluşmaktadır. A alt birimleri *gyrA* ve B alt birimleri *gyrB* geni tarafından kodlanmaktadır. DNA replikasyonunun terminal döneminde, ana DNA'ya bağlı yavru DNA'nın kopmasından topoizomeraz IV sorumludur. Topoizomeraz IV, iki ParC ve iki ParE alt birimlerinden oluşmaktadır. ParC alt birimlerini *parC* geni, ParE alt birimlerini ise *parE* geni kodlamaktadır. ParC'nin GyrA ve ParE'nin GyrB ile yapısal benzerliği bulunmaktadır (11). DNA replikasyonundaki esansiyel görevlerinden dolayı, DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimleri bakteride yaşamsal öneme sahiptir (14).



Şekil 3: a) Bakteriyel DNA'da negatif süpersarmalın oluşumu (16).
b) Topoizomerazlar ve DNA replikasyonu (17).

Kinolonların bakteri hücresindeki temel iki hedefi, DNA giraz ve topoizomeraz IV dür. Çift sarmallı DNA'nın replikasyonu sırasında DNA ipçikleri birbirinden ayrıldıktan sonra oluşan enzim-DNA kompleksine bağlanarak bu kompleksi stabilize eden kinolonlar, hücrenin onaramayacağı kırılmaların oluşmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda bakterisidal etki sağlanmaktadır (4). Aslında DNA sentezinin inhibisyonu tek başına bakteri ölümü için yeterli olmamakta, olasılıkla bir takım yeni sentezlenen gen ürünleri de hücre ölümünde rol oynamaktadır. Ancak bu gen ürünleri henüz gösterilememiştir. Bu konudaki diğer bir

düşünce ise; kinolonların bakterisidal etki göstermeleri için bakteri otolizinlerini indüklenmesidir. Dolayısıyla kinolonların bakterisidal etkinliğinde eşlik eden mekanizmaların da rol oynadığı bildirilmektedir (11).

Gram negatif bakterilerde DNA giraz tüm kinolonların primer hedefiyken, Gram pozitif bakterilerde ise kinolonun yapısına da bağlı olarak primer hedef DNA giraz veya topoizomera IV olarak değişebilmektedir (3). İnsan hücrelerinde DNA giraz bulunmayıp aynı işlevi bu enzime benzeyen başka bir topoizomera II türü yerine getirmektedir. Klinik kullanımda olan kinolonların bu enzimlere etkinliği, bakteri DNA girazı üzerindeki göre 54-2460 kez daha düşüktür. Bu durum, kinolonların bakterisidal etkilerini seçici olarak bakteride oluşturmalarını ve insan hücresinde belirgin bir toksik etki yapmamalarını açıklamaktadır. Bununla birlikte özellikle 7 hidroksifenil içerenler veya 2.ve 3. pozisyonda izotiazol halkası bağlı olanların memeli enzimlerine daha fazla etkisi mevcuttur (18).

2.4. Sınıflandırma ve Klinik Kullanım

Florokinolonların invitro aktivite farklılıkları sınıflandırılmalarının temelini oluşturmaktadır (Tablo1). İlk jenerasyon kinolonların (nalidiksik asid, oksolinik asid, sinoksasin, piromidik asid, pipedimik asid ve flumekin) aerobik gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri mükemmel olmasına rağmen aerobik gram pozitif veya anaerobik bakterilere karşı etkili olamamıştır. 1980 yılında C-6 ya florin ve C-7'ye siklik diamin piperazin ekleyerek norfloksasin sentezlenmesi ile 2. kuşak kinolonlar oluşturulmuştur. Bu değişimler aerobik gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı aktivite artışı sağlarken 2. kuşak kinolonlar (norfloksasin, siprofloksasin, ofloksasin levofloksasin, enoksasin, fleroksasin, lomefloksasin, pefloksasin ve rufloksasin) başlangıçta anaerobik bakterilere etkisiz kalmıştır Daha sonra geliştirilen 3. kuşak kinolonlar (levofloksasin, grepafloksasin, gatifloksasin, sparfloksasin, temafloksasin, tosufloksasin ve pazufloksasin) ile özellikle pnömokoklara karşı olmak üzere artmış Gram pozitif etkinlik ve anaeroplara karşı orta derecede etkinlik. sağlanmıştır. Ancak, bu moleküllerin büyük kısmı klinik kullanıma girmeden veya girdikten bir süre sonra yan etkileri nedeniyle kullanımdan kaldırılmışlardır. Bu gruptan olan levofloksasin, uzun yıllardır sorunsuz ve yaygın

olarak kullanılmaktadır. Dördüncü kuşak kinolonlar (trovafloksasin klinofloksasin, sitafloksasin, moksifloksasin ve gemifloksasin) pnömokoklara karşı daha da artmış etkinlik yanında anaerob bakterilere karşı çok güçlü etkinliğe sahip moleküllerdir. Bu gruptan da günümüzde sadece moksifloksasin ve gemifloksasin kullanılmakta olup, diğerleri yan etkileri nedeniyle kulanımdan kaldırılmışlardır (11, 19).

Tablo 1. Kinolon grubu antibiyotiklerin sınıflandırılması (11).

	1.Kuşak	2. Kuşak		3.Kuşak	4. Kuşak		5.Kuşak
		Alt grup 1	Alt grup 2		Alt grup 1	Alt grup 2	
Kinolon	Nalidiksik asid	Lomefloksasin	Siprofloksasin	Levofloksasin	Moksifloksasin	Gemifloksasin	Garenoksasin
	Oksolinik asid	Norfloksasin	Ofloksasin	Sparfloksasin	Gatifloksasin		
	Sinoksasin	Enoksasin	Pefloksasin	Grepafloksasin	Sitafloksasin		
	Flumequin		Fleroksasin		Klinofloksasin		
					Travofloksasin		
Mikrobiyolojik etkinlik	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
			Atipikler	Atipikler	Atipikler	Atipikler	
				MSSA	MSSA	MSSA	
				Streptokoklar	Streptokoklar	Streptokoklar	
					Anaeoropl	Anaeoropl	
Kullanım	Yalnızca Üriner Enfeksiyonlar	Yalnızca Üriner Enfeksiyonlar	Sistemik + Üriner Enfeksiyonlar	Sistemik + Üriner Enfeksiyonlar	Sistemik + Üriner Enfeksiyonlar	Sistemik + Üriner Enfeksiyonlar	

Birinci kuşak kinolonlar hemen daima üriner enfeksiyonların tedavisinde, nalidiksik asit basilli dizanteri tedavisinde 1960'lı yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Ülkemizde ilk kez 1986'da ofloksasin ruhsat almış, bunu diğerleri izlemiştir (11). Minimum bakterisidal konsantrasyonları genellikle minimal inhibitör konsantrasyon (MİK)'larının 2-4 katı kadar olan kinolonların, öldürme hızları ilaç konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Ancak MİK değerlerinin 30 mislinden fazla olan konsantrasyonlarda kinolonlar protein sentezini inhibe ederek etkilemekte dolayısıyla bakteriyostatik etki oluşturmaktadır (18). Yeni kinolon türevleri, genitoüriner, gastrointestinal, solunum sistemi enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları ve yanı sıra deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, menenjit, endokardit, oftalmik enfeksiyonlar v.b. pek çok enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (19).

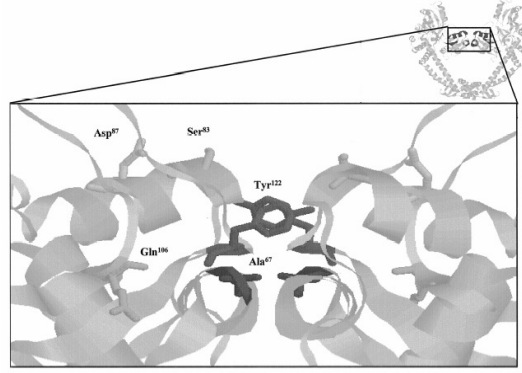
2.5. Kinolon Direnç Mekanizmaları

Günümüzde kinolonlara karşı bilinen üç tür direnç mekanizması bulunmaktadır.

1. İlaç hedefinde değişikliğe yol açan mutasyonlar
2. Hücrede ilaç birikimini azaltan mutasyonlar
 - a. Membran permeabilitesinde azalma
 - b. Aktif pompalama ile antibiyotiğin hücre dışına atılması
3. Hücreyi ilacın letal etkilerinden koruyan plazmidler

2.5.1. İlaç Hedefinde Değişikliğe Yol Açan Mutasyonlar

Bakterilerin çoğu DNA giraz ve topoizomera IV esansiyel enzimlerinin her ikisine de sahip olmakla birlikte, çok az sayıda bakteride sadece DNA giraz enzimi bulunmaktadır. Gram negatif bakterilerde giraz enzimi, topoizomera IV'e göre kinolon inhibisyonuna daha fazla duyarlıdır. Kinolon direncine neden olan mutasyonların çoğu giraz enzimini kodlayan genlerde görülmektedir. Günümüzde en iyi tanımlanan kromozomal mutasyonlar GyrA alt ünitesinde ortaya çıkan mutasyonlardır. Dirençli bakterilerinde GyrA'daki aminoasit değişikliklerinin genellikle enzimin amino ucundaki aktif bölgesinde bulunan tirozin molekülünün (Tyr-122) çevresinde yer aldığı görülmektedir. *gyrA*'da Ala67-Gln106, *gyrB*'de ise Asp426-Lys447 aminoasitleri "kinolon direnci belirleyici bölge" (QRDR) olarak bilinmektedir. *E. coli*'de DNA girazın, DNA'ya bağlandığı aktif bölgede bulunan ve topoizomera reaksiyonunda kesik DNA ipliğiyle ilişki kuran tirozin kalıntısının (Tyr122) yanında yer alan 83 ve 87'inci kodonlar, *gyrA* mutasyonunun en sık olduğu yerlerdir (Şekil 4). Aktif bölgede gerçekleşen mutasyonlar enzimin hedef bölgeye bağlanmasını etkileyerek kinolonlara duyarlılıkta azalmaya ya da dirence neden olmaktadır (3, 20, 21, 22).



Şekil 4: GyrA’da kinolon direnci belirleyici bölge-QRDR (20).

Gram negatif bakterilerde *gyrA*’da ortaya çıkan tek basamaklı mutasyonlar DNA girazın duyarlılığını azaltmaktadır. Bu durum, nalidiksik asit için yüksek düzeyde dirence neden olabilirse de, florokinolonlarda yüksek düzeyde direnç için *gyrA* ve/veya diğer topoizomerez genlerinde ek mutasyonlar gerekmektedir. Nalidiksik aside yüksek düzeyde dirençli ve florokinolonlara azalmış duyarlılıkta bulunan *E. coli* kökenlerinde sıklıkla 83’üncü kodondaki serin (polar amino asit) kalıntısının yerine lösinin (polar olamayan amino asit) geçtiği görülmektedir. Mutasyon, bu alanın hidrofobik yapısının değişimine ve GyrA alt ünitesinde lokal farklılığa neden olmaktadır (23). Florokinolonlara yüksek düzeyde dirençli izolatlarda, *gyrA*’da 83’ncü kodondaki mutasyonla birlikte bir diğer mutasyon da 87’inci kodondaki aspartatta gözlenmektedir. Bununla birlikte, Ser83’te tek mutasyon taşıyan izolatlar, Asp87’de tek mutasyon taşıyanlara göre florokinolonlara daha yüksek direnç göstermektedir (20). QRDR dışında *gyrA*’da saptanmış diğer mutasyonlar arasında Ala196Glu (in vivo) ve Ala51Val (in vitro) değişimleri sayılabilir (24). *gyrA*’da gözlenen mutasyonlara oranla, *gyrB* geni mutasyonları daha seyrek oluşmaktadır. Bu gen bölgesinde, Asp426 ve Lys447 kodonları QRDR olarak tanımlanmıştır. Asp426’da gerçekleşen mutasyonların tüm kinolonlara direnç sağladığı, buna karşılık Lys 447 mutasyonlarının, nalidiksik asit gibi asidik kinolonlara direnç oluşturduğu, siprofloksasin gibi amfoterik kinolonlara karşı ise duyarlılıkta artışa neden olduğu saptanmıştır (23).

Kinolonların ikinci hedef enzimi olan topoizomerez IV’ün *parC* ve *parE* genlerinde de mutasyonlar görülmektedir. *parC* genindeki mutasyonların, *parE* genindeki mutasyonlardan daha yüksek düzeyde kinolon direncine sebep olduğu

bilinmektedir (24). Gram negatif bakterilerden farklı olarak *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae*'da başlangıç hedef mutasyonlar daha sıklıkla *parC* de oluşmakta, çok dirençli izolatlarda *gyrA* ve *parE* de görülen ek mutasyonlar eşlik etmektedir. Bunun yanında *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* ve *Treponema pallidum*'da topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerin bulunmaması nedeniyle sadece giraz enziminde gelişen mutasyonlar bu bakterilerde yeni kinolonlara karşı dirence neden olmaktadır (3). *E. coli*'de *parC* ve *parE* mutasyonları her zaman *gyrA* mutasyonlarıyla birlikte bulunmuştur. Topoizomeraz IV, kinolonlara duyarlı giraz bulunmadığında seçilen ikinci hedef olup *parC* ve *parE* mutasyonları yüksek düzeyde kinolon direncine neden olmaktadır. Çoğunlukla *parC* mutasyonları 80'inci kodondaki serinin yerine izolösin, 84'üncü kodondaki glutamatın yerine glisin, lizin ya da valin geçişiyle oluşmaktadır (25, 26). *parE* geninin nükleotid dizisi *gyrB* ile yüksek benzerlik göstermekle birlikte *E. coli*'nin *parE* geninde, *gyrB* geninin “kinolon direnci belirleyici bölgesi” (Asp426-Lys447) ile homoloji gösteren alanda (Asp420 ve Lys441) gerçekleşen mutasyonların kinolon direnciyle ilişkisi bulunmadığı, kinolon direnciyle ilişkili mutasyonların bu bölgenin dışında olduğu saptanmıştır (23).

Topoizomeraz IV enzimlerindeki değişiklikler gram negatif bakterilerde genellikle DNA giraz enziminde oluşan değişikliklere eşlik etmektedir. Kinolonlara dirençli *Shigella flexneri*, *Haemophilus influenzae* ve *E. coli* kökenlerinde *parC* mutasyonları gösterilmiştir. Gram negatif bakterilerde *parE*'deki aminoasit değişikliklerinin kinolon direncine katkısının önemli olmadığı gösterilmiştir (27). *E. coli*'nin, DNA giraz ve topoizomeraz IV genlerinde saptanmış olan mutasyonlar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *E. coli*'nin DNA giraz ve topoizomerez IV genlerinde saptanmış mutasyonlar (23).

Kodon	Aminoasit	Mutasyonlar
GyrA		
51	Ala	Val
67	Ala	Ser
81	Gly	Cys,Asp
82	Asp	Gly
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
106	Gln	His,Arg
196	Ala	Glu
GyrB		
426	Asp	Asn
447	Lys	Glu
ParC		
56	Ala	Thr
57	Ser	Thr
78	Gly	Asp, Lys
80	Ser	Ile, Arg
83	Ser	Leu
84	Glu	Lys, Val, Gly
108	Ala	Val
ParE		
416	Leu	Phe
444	Ile	Phe
445	Leu	His
458	Ser	Thr
460	Glu	Asp
464	Ile	Phe
529	Ile	Leu

2.5.2. İlaç Birikimini Azaltan Mutasyonlar

a. Membran Permeabilitesinde Azalma

DNA giraz ve topoizomerez IV bakteri hücresinin sitoplazmasına yerleşmişlerdir. Kinolonlar, sitoplazmadaki hedeflerine ulaşabilmek için, gram pozitif bakterilerde hücre duvarı ve sitoplazmik membranı, gram negatif bakterilerde ise ek olarak dış membran engelini aşmak zorundadır. Gram negatif bakterilerde kinolonların hücre içine girmesi, dış membrandaki porinler aracılığı ile olmakta, porin proteinlerinde değişikliğe yol açan mutasyonlar kinolonların dış membrandan girişini azaltarak hedef enzimlere daha az miktarda ulaşmalarına yol açmaktadır. *E. coli*'de OmpF ve OmpC gibi dış membran porin proteinlerin ekspresyonundaki değişiklikler membran geçirgenliği azaltmaktadır. Bu tip direnç, kinolon grubu antibiyotiklerin yanı sıra, beta-laktamlar, tetrasiklinler ve kloramfenikol gibi diğer antibiyotikler için de geçerlidir (23).

b. Aktif Pompalama ile Antibiyotiğin Dışarı Atılması

Hem gram pozitif, hem de gram negatif bakteriler özgül olmayan, enerjiye bağımlı aktif pompa (efluks) sistemlerine sahiptir. Aktif pompa sistemlerinden bazıları yapısal olarak ifade edilirken, bazıları mutasyonla indüklenebilir özellik taşımaktadır. *E. coli*'de AcrAB-TolC pompa sistemleri kinolonların dışarı atılmasında temel rol oynamaktadır. *acrAB* baskılayıcı bir gen olan *acrR* geninde ortaya çıkan mutasyonlar pompa aktivitesini artırmaktadır. Düzenleyici diğer bir gen olan *marA*'nın baskılayıcısı olan *marR*'yi inaktive eden mutasyonlar MarA'nın *acrAB*, *tolC* ve *ompF*'nin translasyonunu azaltan bir geni aktive etmesine yol açmakta, böylelikle kinolonların hücre içine girişi azalırken, hücre dışına atılışı artmaktadır (23).

Gram pozitif bakterilerde de aktif pompalar tanımlanmıştır. En güzel örnek *S. aureus*'da NorA ifadesidir. NorA enoksasin, norfloksasin gibi hidrofilik kinolonları dışarıya atan ATP'ye bağımlı bir aktif pompadır (28). Tablo 3'te gram pozitif ve gram negatif bakterilerde kinolon direncinden sorumlu aktif pompalar gösterilmiştir (27).

E. coli'de dirençli klinik izolatlarda hedef değişikliği ile birlikte aktif pompa aktivasyonu genellikle birarada bulunmaktadır. Ancak fonksiyonel bir pompa sistemi

bulunsa bile, *gyrA*'da gelişen tek mutasyon orta derecede direnç neden olmakta, hatta bu izolatlar klinik olarak duyarlı kabul edilebilmektedirler ($MİK \leq 1 \mu\text{g/ml}$). *gyrA*'da ikinci bir mutasyon veya eşlik eden *parC* mutasyonu ise klinik direnç yol açmaktadır ($MİK \geq 4 \mu\text{g/ml}$) Genellikle daha dirençli izolatlar daha fazla mutasyon içermektedir (3, 24, 25, 29).

Tablo 3. Bakterilerde kinolon direncinden sorumlu tutulan eflüks pompaları (27).

Bakteri	Eflüks pompaları
Gram negatif	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AdeABC
<i>Campylobacter jejuni</i>	CmeABC
	AcrAB
	AcrEF
<i>Escherichia coli</i>	EmrAB
	MdfA
	YdhE
	MexAB-OprM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MexCD-OprJ
	MexEF-OprN
	MexXY-OprM
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SmeDEF
<i>Vibrio cholerae</i>	VceAB
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NorM
Gram pozitif	
<i>Bacillus subtilis</i>	Blt
	Bmr3
	BmrA
<i>Staphylococcus aureus</i>	NorA
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PmrA

2.5.3. Hücreyi İlacın Letal Etkilerinden Koruyan Plazmidler

Plazmid ilişkili kinolon direncinin varlığı ilk olarak 1998 yılında Martinez-Martinez ve ark. tarafından, Alabama Üniversitesi'ndeki bir hastanın idrar örneğinden 1994 yılında izole edilen siprofloksasine dirençli bir *K. pneumoniae* izolatında keşfedilmiştir. Daha sonra bu plazmidle *E. coli* ve diğer gram negatif bakterilere, kinolonlara karşı düşük seviyeli direnç transferi yapılabildiği gösterilmiştir (30). Test edilen tüm kinolonların $MİK$ değerini yükselttiği, kinolonların intrasellüler

konsantrasyonlarına etki etmediği, dış membran porininin baskısını ve *E. coli* türlerinde *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *ompF*, *ompC* ya da *marR* mutasyonlarıyla birlikte direnci arttırdığı için bunun yeni bir direnç mekanizması olarak isimlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür (31). Plazmid aracılığıyla aktarılan bu direnç genine *qnr* (*qnrA1*) ismi verilmiştir, *qnr* geni, 219 aminoasitten oluşan tekrarlayan pentapeptid ailesine ait bir Qnr proteinini kodlamaktadır. İn vitro çalışmalarla, saflaştırılmış Qnr proteinin DNA giraz veya topoizomerez IV'e bağlanarak siprofloksasinin inhibisyonundan koruduğu gösterilmiştir (32, 33, 34). Bunları takiben, yüksek düzeyde siprofloksasin direnci gözlenen bir bölge olan Shanghai'de yapılan bir çalışmada *E. coli* klinik izolatlarında *qnr* geni bulunmuştur (35). Alabama ve Shanghai'deki *qnr* geni taşıyan plazmidlerin birbirlerinden çok farklı olmalarına rağmen, *qnr* gen aminoasit dizilimlerinde tek bir nükleotid değişikliği olduğu belirlenmiştir. Daha sonra *qnr* geni Amerika Birleşik Devletleri'nde, *K. pneumoniae* (36, 37) ve *E. cloacae* (38) izolatlarında tespit edilmiştir. Ardından Mısır (39), Kore (40) ve Hollanda'dan (41) yapılan bildirimlerle *qnr*'nin geniş bir coğrafi alana yayıldığı gözlenmiştir. Genellikle *qnr* geni taşıyan plazmidlerin AmpC tipi bir enzim olan FOX-5 veya CTX-M-9 ya da SHV-7 gibi bir genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz kodlamakta olduğu görülmüştür (3, 42).

Qnr proteini tek başına düşük düzey kinolon direncine neden olmasına rağmen, kromozomal mutasyonların birlikteliği ile yüksek düzey kinolon direncine yol açabilmektedir. (43, 44). *qnrA*'nın ardından 2005 yılında *qnrS*, 2006 yılında *qnrB*, 2008 yılında *qnrC*, 2009 yılında da *qnrD* genlerinin varlığı bildirilmiştir (Tablo 4). Bugüne kadar bildirilmiş yedi *qnrA*, 24 *qnrB* ve dört *qnrS* varyantı bulunmaktadır.

QnrS proteini, QnrA gibi 218 aminoasitten oluşmakta ve onunla %58 aminoasit benzerliği göstermektedir. İlk kez, Japonya'da 2003 yılında bir besin zehirlenmesi sırasında izole edilen *Shigella flexneri* suşunda saptanmıştır (46). *QnrB*, *QnrA* ile %40, *QnrS* ile %37 oranında aminoasit benzerliği göstermekte ve 226 aminoasitten oluşmaktadır. İlk olarak 2002 yılında Güney Hindistan (Coimbatore)'da CTX-M-15 beta-laktamazını üreten bir *K. pneumoniae* suşunda tanımlanmıştır (47). *qnrC*, Çin'de (Shanghai) üriner sistemden 2008 yılında izole edilen bir *Proteus mirabilis* suşunda bildirilmiştir (48). *qnrC*'nin kodladığı 221 aminoasitlik proteinin

qnrA1, *qnrB1*, *qnrS1* ve *qnrD* tarafından kodlanan proteinlerle sırasıyla %64, %42, %59, %43 oranında aminoasit benzerliği taşıdığı saptanmıştır. *qnrD* ise 2009 yılında Çin’de (Henan) 2006-2007 yıllarında insandan izole edilen *Salmonella enterica* serovar *Biovismorbificans* (n:3) ve *Kentucky* (n:1) suşlarında saptanmıştır (49). Genel olarak Qnr proteinleri nalidiksik aside dirence ve norfloksasin, siprofloksasin, levofloksasin gibi florokinolonların duyarlılığında azalmaya neden olmasına rağmen, *qnrD* pozitif suşların siprofloksasine azalmış duyarlılık gösterdikleri, nalidiksik asite ise duyarlı oldukları bildirilmiştir (44, 49). *qnr* genleri, SHV, CTX-M, FOX, KPC, VEB, OXA, DHA gibi birçok farklı tipte beta-laktamazla birlikte bulunmaları yanında, *aadA1*, *aadA2*, *dfrA1*, *dfrA12*, *cmlA1*, *catB2*, *aac(6’)-Ib-cr*, *sull* gibi birçok farklı antimikrobiyal direnç geni ile de ilişkilendirilmiştir (44, 50, 51).

Tablo 4. Günümüze kadar bildirilmiş olan *qnr* genleri ve varyantları (45).

<i>Qnr</i> Tipi	Bakteri Türü	İzole Edildiği Yer	Kaynak
<i>qnrA1</i>	<i>K. pneumoniae</i>	ABD	Martinez-Martinez ve ark. 1998 Tran & Jacoby. 2002
<i>qnrA2</i>	<i>K. oxytoca</i>	Çin	Li ve ark.
<i>qnrA3</i>	<i>S. algae</i>	Fransa	Poirel ve ark. 2005
<i>qnrA4</i>	<i>S. algae</i>	Fransa	Poirel ve ark. 2005
<i>qnrA5</i>	<i>S. algae</i>	Fransa	Poirel ve ark. 2005
<i>qnrA6</i>	<i>P. mirabilis</i>	Fransa	Cambau ve ark. 2006
<i>qnrB1</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Hindistan/ABD	Jacoby ve ark.2006
<i>qnrB2</i>	<i>C. koseri</i>	ABD	Jacoby ve ark. 2006
<i>qnrB3</i>	<i>E. coli</i>	ABD	Robicsek ve ark. 2006
<i>qnrB4</i>	<i>E. coli</i>	ABD	Robicsek ve ark. 2006
<i>qnrB5</i>	<i>S. enterica</i> serotip Berta	ABD	Gay ve ark. 2006
<i>qnrB6</i>	<i>E. aerogenes</i>	Çin	Ma ve ark.
<i>qnrB7</i>	<i>E. cloacae</i>	Fransa	Cattoir ve ark. 2007
<i>qnrB8</i>	<i>C. freundii</i>	Fransa	Cattoir ve ark. 2007
<i>qnrB9</i>	<i>C. freundii</i>	Fransa	Rodriguez-Zulueta ve ark.
<i>qnrB10</i>	<i>C. freundii</i>	Arjantin	Quiroga ve ark.2007
<i>qnrB11</i>	<i>C. freundii</i>	İspanya	Sanchez-Cespedes ve ark
<i>qnrB12</i>	<i>C. werkmani</i>	Almanya	Kehrenberg ve ark
<i>qnrB13</i>	<i>C. freundii</i>	Kore	Tamang ve ark
<i>qnrB14</i>	<i>C. freundii</i>	Çin	Wang ve ark
<i>qnrB15</i>	<i>C. freundii</i>	Kore	Tamang ve ark
<i>qnrB16</i>			J. Sanchez-Cespedes et al., unpublished
<i>qnrB17</i>	<i>C. freundii</i>	İspanya	Gonzalez-Lopez et al.
<i>qnrB18</i>			J. Gonzalez-Lopez et al., unpublished
<i>qnrB19</i>	<i>E. coli</i>		V. Cattoir et al., unpublished
<i>qnrB20</i>			Yamane K, unpublished

Tablo 4: Günümüze kadar bildirilmiş olan *qnr* genleri ve varyantları (45)(devam)

<i>Qnr Tipi</i>	<i>Bakteri Türü</i>	<i>İzole Edildiği Yer</i>	<i>Kaynak</i>
<i>qnrB21</i>			Galvin ve ark.2009
<i>qnrB22</i>			Lee ve ark,2009
<i>qnrB23</i>			Lee ve ark,2009
<i>qnrB24</i>			Zishong Xiong,2010
<i>qnrC</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	Çin	Wang ve ark.2009
<i>qnrD</i>	<i>Salmonella enterica serovar Biovismorbificans</i>	Çin	Cavaco ve ark.2009
<i>qnrS1</i>	<i>S. flexneri</i>	Japonya	Hata ve ark. 2005
<i>qnrS2</i>	<i>S. enterica</i>	ABD	Gay ve ark. 2006
<i>qnrS3</i>	<i>Escherichia coli</i>	Çin	Yue ve ark.2008
<i>qnrS4</i>	<i>Salmonella spp</i>	Danimarka	Torpdahl ve ark.2009

2006 yılında *qnrA* pozitif *E. coli* izolatında farklı tipte plazmid ilişkili bir direnç determinantı olan *aac(6')-Ib-cr* geni keşfedilmiştir. *aac(6')-Ib* geni kanamisin, tobramisin ve amikasin direncine neden olan bir aminoglikozit asetiltransferazı kodlamaktadır. Bu genin bir varyantı olan *aac(6')-Ib-cr* geni ise norfloksasin ve siprofloksasin gibi bazı kinolonların enzimatik inaktivasyonuna ve sonuçta duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır (44). *AAC(6')-Ib*'nin *-cr* varyantında 102. (Trp→Arg) ve 179. (Asp→Tyr) kodonlarda iki aminoasit değişimi bulunmaktadır. Bu değişiklikler, enzimin siprofloksasini asetilleme yeteneği için gereklidir. Bu enzim, siprofloksasinin piperazinil bölgesindeki aminonitrojeni N-asetilleyerek aktivitesini azaltmaktadır. Florokinolonlar içinde yalnızca siprofloksasin ve norfloksasin değişmeyen piperazinil grubu içerdiklerinden, bu antibiyotiklerle *aac(6')-Ib-cr* varlığında, iki-dört kat daha yüksek MİK değerleri elde edilmektedir (44). *AAC(6')-Ib-cr* ile oluşan direnç derecesi düşük olmasına rağmen *qnr* ile birlikte bulunduğu direnç seviyesi, duyarlılığın klinik kırılma noktasına kadar yükselmektedir. *AAC(6')-Ib-cr*'nin varlığı siprofloksasine maruz kalan kromozomal mutantların seçilme sıklığını da büyük oranda arttırmaktadır (44). Enterobakterlerle yapılan birkaç çalışma bu enzimin Qnr determinantlarına göre daha yaygın ve toplumdan kazanılmış enterobakter izolatlarında CTX-M-15 gibi GSBL ile sıklıkla ilişkili olduğunu göstermektedir (52, 53).

Plazmid ilişkili kinolon direnci mekanizmalarından bir diğeri *qepA* geniyle kodlanan bir efluks pompasından oluşmaktadır. Çok yakın zamanda Japonya ve Belçika'da iki *E. coli* klinik izolatında tanımlanan *qepA* (quinolon efflux pump) geni proton-bağımlı taşıyıcıların süper ailesini yöneten ana gruba ait olduğu varsayılan

14-transmembran segment efluks pompasına benzeyen bir proteini kodlamaktadır (5,54). Bu protein norfloksasin, siprofloksasin ve enrofloksasin gibi hidrofilik kinolonların MİK değerlerini 32-64 kat arttırarak direnç oluşturmaktadır (54). Bundan bir yıl kadar sonra Fransa'dan *qepA*'nın bir varyantı olan *qepA2*'nin varlığı bildirilmiştir (55). *qepA* ile ilgili kesin olmayan epidemiyolojik tek bilgi prevalansının düşük (%0,3) olmasıdır (56). *qepA* geni ile *rmtB* geni (bir aminoglikozid ribozom metiltransferaz) arasında bir bağlantı bulunduğu ve bu iki geninin büyük olasılıkla IS26'nın iki kopyası tarafından çevrelenen bir aktarılabılır elemanın bir parçası olduğu gösterilmiştir. Bu da, aminoglikozidlerin kullanımıyla *qepA* determinantının seleksiyonu ve kinolon kullanımıyla da aminoglikozid direnci gelişimi için bir potansiyel bulunduğunu göstermektedir (57).

Çok yakın zamanda Velasco ve ark.(58) *Serratia marcescens* suşlarında kromozom kaynaklı *smaqnr* genini bulmuşlar, bu genin kinolon ve florokinolonlarda azalmış duyarlılığa neden olduğunu göstermişlerdir. *S. marcescens* Db11 suşunda bulunan *Smaqnr* proteinin *QnrB1* proteini ile %80 oranında aminoasit benzerliği gösterdiği saptanmıştır.

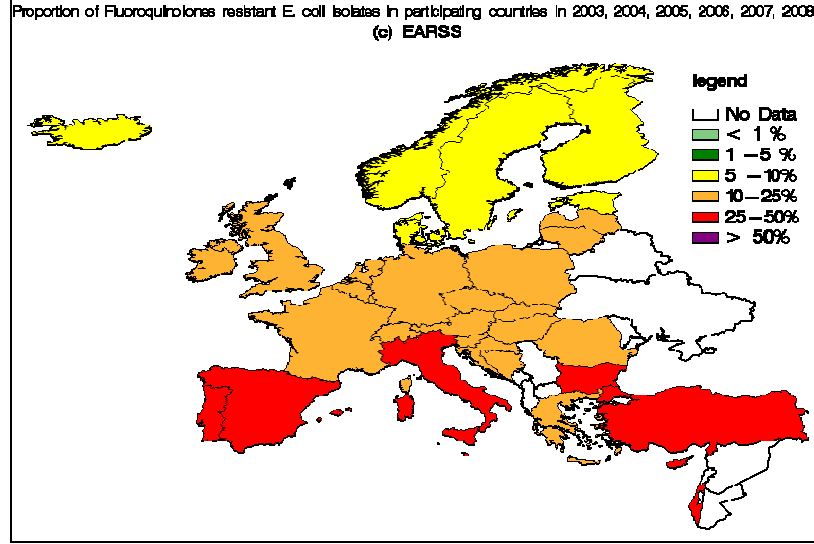
Düşük düzey kinolon direncine neden olan plazmid ilişkili olan bu mekanizmaların tedavi dozlarındaki kinolon varlığında yüksek düzey direncin ortaya çıkmasını kolaylaştırdığı bildirilmektedir (44).

2.6. Dünyada Kinolon Direnci

Kinolonlara direnç farklı hasta gruplarında yaygın olarak kullanımlarına bağlı olarak kullanıma girdikleri 1980'li yıllardan beri belirgin şekilde artmaktadır (59). 1990-97 yıllarında İngiltere ve İrlanda'da *E. coli* türlerinde %0.8'den % 3.7'ye ve *Klebsiella* türlerinde de %3.5'den %7.1'e çıkmıştır (60). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) verilerine göre de 1992-2004 tarihleri arasında yoğun bakımlarda *E. coli* florokinolon direnci %7.3'den %19'a kadar yükselmiştir (61).

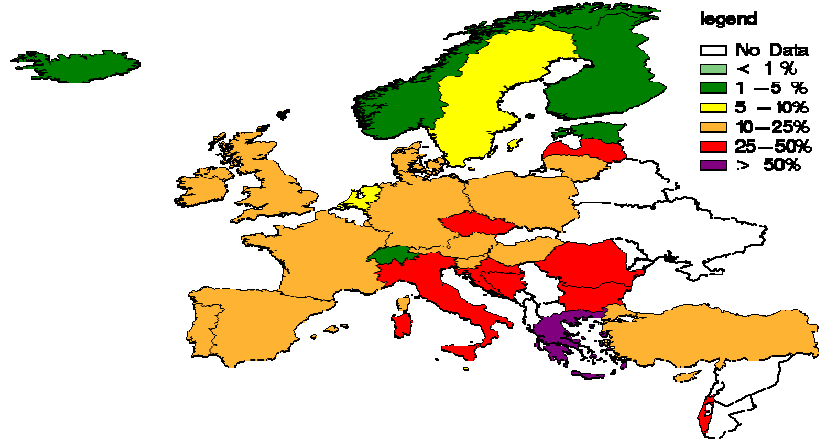
E. coli izolatlarında florokinolon direnci Avrupa'da son yedi yılda sürekli ve ciddi anlamda artış göstermiştir. 2005 yılında direncin %5 ve altında olduğu dört ülke varken, 2008'de sadece dört ülke; İzlanda %6 (n=115), Estonya %7 (n=252), Norveç %7 (n=1719) ve Finlandiya %9 (n=2109) %10 un altında oranlar

bildirmiştir. Avrupa’da 10 ülkede *E. coli* izolatlarında %25 i aşan florokinolon direnci mevcuttur. İtalya %38 (n=907), Kıbrıs %45 (n=116) ve Türkiye %52 (n=1372) gibi yüksek oranlar bildirmiştir. Son dört yılda florokinolon direnci 19 ülkede belirgin şekilde artmıştır (Şekil 5)(62).



Şekil 5: EARSS verilerine göre 2003-2008 yıllarında katılımcı ülkelerde florokinolon dirençli *E.coli* izolatlarının oranı (62).

Avrupa’da 2008 yılında *K. pneumoniae* izolatlarında florokinolon direncinin oldukça heterojen olduğu gözlenmiştir. İsviçre %3 (n=448) , Finlandiya %2 (n=287) ve Norveç %4 (n=340) gibi düşük direnci bildirirken, diğer ülkeler (Çek Cumhuriyeti %52 (n=1492), Bulgaristan %52 (n=48) ve Yunanistan %64 (n=1067) %50 den yüksek direnç oranları ile mücadele etmek zorundadır. Son dört yılda yüksek oranda direnç bildirimi yapan ülkelerde dikkat çekici artışlar gözlenirken, İngiltere’de direnç oranı belirgin şekilde düşmüştür (Şekil 6) (62).



Şekil 6: EARSS verilerine göre 2006-2008 yıllarında katılımcı ülkelerde florokinolon dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının oranı (62).

2.7. Türkiye’de Kinolon Direnci

Ülkemizde florokinolon direncinin, GSBL artışına paralel olarak gittiği gözlenmektedir. Bu durum, CTX-M-15 üreten ST131 klonunun yayılımı ile ilişkili bulunmuştur. Dünyanın çeşitli ülkelerinde salgınlar oluşturan ST131:025b klonunun ülkemizde de yayılmış olduğu HİTİT çalışmaları sonucunda görülmüştür (63). Bu klon toplum kökenli üriner sistem infeksiyonlarından ve üriner sistem kaynaklı bakteriyemilerden sorumlu bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. ST131:025b klonunun bir diğer özelliği çoklu dirençli olmasıdır. Dirençli olduğu ajanlar arasında florokinolonlar, trimetoprim-sulfametoksazol ve bazen de aminoglikozidler sayılabilir (64). Dünyanın birçok bölgesinden, bu arada ülkemizden de bildirilmiş olan plazmid kökenli kinolon direncinin de CTX-M enzim üretimi ile yakın ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (64, 65, 66). European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) verilerine göre 2005-2009 yılları arasında Türkiye’de *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının florokinolonlara direnç oranları Tablo 5’te belirtilmiştir (62).

Tablo 5. 2005-2009 yılları arasında Türkiye’de *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının florokinolonlara direnç oranları (62).

	2005		2006		2007		2008		2009	
	<i>E. coli</i>	<i>Kpn</i>	<i>E. coli</i>	<i>Kpn</i>	<i>E. coli</i>	<i>Kpn</i>	<i>E. coli</i>	<i>Kpn</i>	<i>E. coli</i>	<i>Kpn</i>
Lab. Sayısı	3	10	14	14	16	16	16	16		
İzolat Sayısı	13	776	454	884	638	1063	709	1373	148	329
Florokinolon Direnci (%)	46	44	23	48	23	53	26	52	36	55

Başka bir çok merkezli çalışma olan ARMED’de, kandan elde edilen *E. coli* izolatları için yüksek florokinolon direnç oranları belirlendiği dikkati çekmektedir (Tablo 6).

Tablo 6. Kandan izole *E.coli* suşlarında florokinolon direnç oranları (66).

Yıl	İzolat Sayısı	Direnç (%)
2003	708	38.8
2004	761	43.7
2005	776	44.2
2006	617	48.8

Ülkemizde *E. coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında kinolon direncine ait geçtiğimiz on yıl içinde yapılmış olan bölgesel bildirimlere bakıldığında ise oldukça farklı rakamlarla karşılaşılmaktadır (Tablo 7). GSBL pozitif izolatlarda direnç oranlarının %80’lere dayandığı gözlenmektedir. Bu durum ülkemizde gelecek yıllarda bu antibiyotik grubunun etkisiz kalacağını göstermektedir.

Tablo 7. 2001-2009 yılları arasında ülkemizde yapılmış çalışmalarda *E.coli* izolatlarında belirlenen siprofloksasin direnç oranları

Çalışmanın Yapıldığı İl veya Bölge	İzolat Sayısı	Siprofloksasin Direnci	Tarih	Kaynak
İstanbul	194	10.8	2009	Yıldırım ve ark.(68)
İstanbul	706	59 (GSBL pozitif) 9 (GSBL negatif)	2009	Köksal ve ark.(69)
Malatya	401	61(GSBL pozitif) 8 (GSBL negatif)	2008-2009	Iraz (70)
İzmir	300	86 (GSBL pozitif)	2008	Yılmaz ve ark.(71)
Çankırı	460	35.6 (GSBL pozitif) 13.1 (GSBL negatif)	2007-2008	Albayrak ve
İstanbul	353	40.2 (Ayaktan) 15.4 (Yatan)	2005-2008	Rifaioğlu ve
Düzce	174	29	2007	Öztürk ve ark.(74)
Afyonkarahisar	169	34.9	2007	Köken ve ark.(75)
Konya	178	37.6	2007	Kalem ve ark.(76)
Diyarbakır	632	53.8 (Servis) 38.1 (Poliklinik)	2006	Temiz ve ark.(77)
Düzce	131	23	2006	Küçükbayrak ve
Erzurum	91	42	2005-2006	Güler ve ark.(79)
Van	672	77 (GSBL pozitif) 28 (GSBL negatif)	2005-2006	Güdücüoğlu ve
Ankara	677	29.2	2005-2006	Rad ve ark.(81)
Ankara	1664	18	2004-2006	Özyurt ve ark.(82)
Bolu	267	16.8	2003-2005	Koçoğlu ve ark.(83)
İstanbul	601	38	2005	Gönüllü ve ark.(84)
İzmir	236	37	2005	Afşar ve ark.(85)
Çok merkezli	480	8.3	2005	Sümer ve ark.(86)
İzmir	2564	47 (Servis) 30.2 (Poliklinik)	2004	Pullukçu ve ark.(87)
Düzce	151	17	2004	Şahin ve ark.(88)
İstanbul	684	33	2002-2003	Bayraktar ve
Zonguldak	288	26	2001-2003	Beğendik ve
Ankara	1380	26.1 (2001) 33.1(2002)	2001-2002	Akan ve ark.(91)
Adana	1471	35 (Servis) 25 (Poliklinik)	1999-2000	Kibar ve ark.(92)

Tablo 8. 2004-2009 yılları arasında ülkemizde yapılan çalışmalarda *Klebsiella spp.* izolatlarında belirlenen siprofloksasin direnç oranları

Çalışmanın Yapıldığı İlveya Bölge	İzolat Sayısı	Siprofloksasin Direnci	Tarih	Kaynak
İstanbul	382	33 (GSBL pozitif) 5 (GSBL negatif)	2009	Köksal ve ark.(69)
Malatya	65	27 (GSBL pozitif) 4 (GSBL negatif)	2008-2009	Iraz (70)
Diyarbakır	118	31.5 (Servis) 26.2 (Poliklinik)	2006	Temiz ve ark.(77)
Van	154	16 (GSBL pozitif) 12 (GSBL negatif)	2005-2006	Güdücioğlu ve ark.(80)
İzmir	596	22.4 (Servis) 18.8 (Poliklinik)	2004	Pullukçu ve ark.(87)

Ülkemizde *E. coli* izolatlarında kinolon direnci ile ilgili kromozomal mutasyonların araştırıldığı sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. Eraç ve ark.ları *E. coli* suşlarında *gyrA* mutasyonlarını araştırmışlar dizi analizi yapılan sekiz suşun hepsinde Ser83Leu mutasyonu saptamışlar, siprofloksasin duyarlı nalidiksik asit dirençli olan bir suş hariç diğer suşlarda ek olarak Asp87Tyr veya Asp87Asn mutasyonları olduğunu tespit etmişlerdir (93). Güven sağlıklı çocukların dışkılarında kinolon dirençli *E. coli* taşıyıcılığı ve direnç mekanizmalarını saptamak amacıyla yaptığı çalışmada nalidiksik asit ve siprofloksasin dirençli altı suşta *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonları araştırmış suşların hepsinde *gyrA*'da 83'üncü kodondaki serinin yerine lösin (Ser83Leu) ve 87'inci kodondaki aspartik asidin yerine asparagin (Asp87Asn) geçişi saptanmış, *parC*'de ise yine suşların hepsinde 80'inci kodondaki serinin yerine izolösin (Ser80Ile) ve 83'üncü kodondaki serinin yerine ise tirozin (Ser83Tyr) geçişi saptanmıştır. Bu mutasyonlara ek olarak kökenlerin birinde *parC*'de 84'üncü kodonda glutamik asidin yerine glisin (Glu84Gly), bir diğerinde ise valin (Glu84Val) geçişi belirlenmiştir (94).

Ülkemizde plazmit aracılı kinolon direnci araştırmacıların daha fazla ilgisini çekmiş, bu konuda biraz daha fazla araştırma yapılmıştır. Yine de bu araştırmalar sınırlı sayıdadır ve özellikle incelenen suş sayısının kısıtlı olmasından dolayı *qnr* genlerinin sıklığı hakkında yeterli veriye sahip olunamamaktadır. Bu araştırmalar

Tablo 9’da özetlenmiştir. Kinolonlara dirençten sorumlu genlerin plazmitle aktarılabiliyor olmasının, direnç oranlarının artması ile birlikte, bu antibiyotiklerin klinikte kullanımını yakın zamanda sınırlayacağından endişe edilmektedir. Kinolonlara invitro duyarlı bu genleri taşıyan şuşların bulunabilmesi ve bu nedenle rutinde kullanılan tekniklerle kolayca saptanamaması, antibiyotik kullanım politikaların düzenlenmesi ve infeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasını güçleştirecek gibi gözükmemektedir.

Tablo 9. Plazmit aracılı kinolon direnci ile ilgili Türkiye’de yapılmış çalışmalar (95).

Kaynak	Bölge	Yıl	İzolasyon sayısı	İzolasyon türü (sayı)	Araştırılan genler	Bulgular	İlişkili beta-laktamaz
Nazik ve ark(96).	İstanbul	2002-2004	49	<i>E.coli</i> (36) <i>K.pneumoniae</i> (7) <i>Enterobacter</i> spp. (4) <i>Citrobacter</i> spp. (2)	<i>qnrA</i>	<i>E.cloacae</i> [<i>qnrA</i> (n:1)] <i>C.freundii</i> [<i>qnrA</i> (n:1)]	SHV-7 OXA-48 VEB-1
Avşaroğlu ve ark(97).	Ankara	2005-2006	9	<i>S.Virchow</i> (9)	<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	<i>S.Virchow</i> [<i>qnrSI</i> (n:3)]	TEM-1
Nazik ve ark(98).	İstanbul	2000,2001	460	<i>E.coli</i> (117) <i>K.pneumoniae</i> (108) <i>Acinetobacter</i> spp. (81) <i>Pseudomonas</i> spp. (72) <i>Enterobacter</i> spp. (30) Non-fermentatif Gram negatif çomak (22) <i>P.mirabilis</i> (9) <i>Serratia</i> spp. (8) <i>K.oxytoca</i> (6) <i>P.vulgaris</i> (5) <i>Citrobacter</i> spp. (2)	<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	<i>E.cloacae</i> [<i>qnrBI</i> (n:1)] [<i>qnrSI</i> (n:2)]	CTX-M-3 CTX-M-15
Öktem ve ark(99).	İstanbul	2004	78	<i>E.coli</i> (34) <i>K.pneumoniae</i> (44)	<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	<i>K.pneumoniae</i> [<i>qnrA</i> (n:4)] <i>E.coli</i> [<i>qnrA</i> (n:1)]	CTX-M SHV TEM
Poirel ve ark(57).	Ankara	2006	248	<i>E.coli</i> (138) <i>K.pneumoniae</i> (110)	<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	<i>K.pneumoniae</i> [<i>qnrBI</i> (n:1)] GSBL (+) suş (n:50) [<i>aac(6')-lb-cr</i> (suşların % 78'i +)]	CTX-M-15 SHV-12 OXA-48

Tablo 9. Plazmit aracılı kinolon direnci ile ilgili Türkiye’de yapılmış çalışmalar (95). (devam)

Kaynak	Bölge	Yıl	İzolat sayısı	İzolat türü (sayı)	Araştırılanlar	Bulgular	İlişkili beta-laktamaz
Öktem ve ark(100).	Antalya	2005-2006	356	Enterobacteriaceae	<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	<i>qnrA</i> (n:6) <i>qnrS</i> (n:3)	
Öngen ve Nazik(101).	İzmir	2008	61	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	<i>qnrA</i> (saptanmadı) <i>qnrB</i> (saptanmadı) <i>qnrS</i> (saptanmadı)	
Nazik ve ark(102).	Belirtilmemiş	2006-2007	1044	<i>E.coli</i> (694) <i>K.pneumoniae</i> (243) <i>Acinetobacter</i> spp. (37) <i>Pseudomonas</i> spp. (29) <i>K.oxytoca</i> (18) <i>Enterobacter</i> spp. (15) <i>S.maltophilia</i> (7) <i>Salmonella</i> spp. (1)	<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>K.pneumoniae</i> [<i>qnrA</i> (n:1) <i>qnrB</i> (n:6) <i>qnrS</i> (n:2)] <i>E.coli</i> [<i>qnrA</i> (n:3) <i>qnrB</i> (n:2) <i>qnrS</i> (n:1)] <i>Enterobacter</i> spp. [<i>qnrA</i> (n:4) <i>qnrS</i> (n:1)] <i>E.coli</i> [<i>qnrS</i> (n:1)] <i>K.pneumoniae</i> [<i>qnrS</i> (n:1)]	CTX-M SHV TEM
Özgümiş ve ark(103).	İzmir	2003-2004	183	<i>E.coli</i> (88), <i>K.pneumoniae</i> (35), <i>K.oxytoca</i> (12), <i>Enterobacter</i> spp.(23), <i>C.koseri</i> (20), <i>C.freundii</i> (3), <i>P.vulgaris</i> (2)	<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	<i>E.coli</i> [<i>qnrS</i> (n:1)] <i>K.pneumoniae</i> [<i>qnrS</i> (n:1)]	

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzolatların Toplanması

Şubat-Ağustos 2009 tarihleri arasında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden (idrar, kan, yara ve yumuşak doku, solunum yolu, steril vücut sıvısı, vb) elde edilen 508 *Escherichia coli* ve 120 *Klebsiella spp.* olmak üzere toplam 628 izolat çalışmaya dahil edildi. Bu izolatlar arasından nalidiksik asite dirençli/orta duyarlı olan 300 izolat ileri çalışmalar için skim milk besiyeri (Oxoid, İngiltere) içinde -20°C'de saklandı.

3.2. Kültür ve Bakteri Tanımlaması

Belirtilen tarihler arasında laboratuvara rutin olarak gönderilen tüm klinik örneklerin kanlı agar (Oxoid, İngiltere) ve Eozin Metilen Blue (EMB) agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine ekimleri yapıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, gram negatif, basil veya kokobasil morfolojisinde ve oksidaz negatif olan bakterilerin tanımlamaları biyokimyasal özelliklerine (glikoz, laktoz, sükroz fermentasyonu, indol/üre hidrolizi, sitrat kullanımı, hareket, lizin dekarboksilaz aktiviteleri) göre (104) ve gerektiğinde BBL Crystal Identification Systems E/NF (Becton, Dickinson, ABD) tanımlama kiti kullanılarak yapıldı.

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

3.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

Elde edilen tüm izolatların antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda yapıldı (105). Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı (2). Ampisilin (AMP, 10µg), amoksisilin/klavulonik asit (AMC, 20/10 µg), sefalotin (KF, 30µg), sefepim (FEP, 30µg), sefotaksim (CTX, 30µg), sefoksitin

(FOX, 30µg), sefuroksim (CXM, 30µg), imipenem (IPM, 10µg), gentamisin (CN, 10µg), tobramisin (TOB, 10µg), amikasin (AK, 30µg), siprofloksasin (CIP, 5µg), levofloksasin (LEV, 5µg), nalidiksik asit (NA, 30µg), trimetoprim-sülfometoksazol (SXT, 1.25/23.75µg) antibiyotik diskleri (Becton Dickinson, ABD) kullanıldı

3.3.2. Agar Dilüsyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi ile nalidiksik aside orta duyarlı/dirençli olarak tespit edilen 300 izolatın nalidiksik asit ve siprofloksasin için minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi (106). Nalidiksik asit (Sigma-Aldrich, Almanya) ve siprofloksasin (Sigma-Aldrich, Almanya) çözeltilerinin uygun dilüsyonları (nalidiksik asit için 256-8 µg/ml arası altı dilüsyon, siprofloksasin için 32-0.5 µg/ml arası yedi dilüsyon), 50°C'ye kadar soğutulmuş Mueller Hinton agara (Oxoid, İngiltere) ilave edildikten sonra karıştırılarak, kalınlığı 4 mm olacak şekilde petri plaklarına döküldü. Besiyeri katılaştıktan sonra McFarland 0.5 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu 1/10 oranında dilüe edildi. Bu dilüsyondan 2 µl alınarak agar yüzeyinde 5-8 mm çapında bir alana yayılarak 10⁴ CFU'luk son inokulum elde edildi. On sekiz saat 35°C'de inkübasyondan sonra bakteriyel üremenin gözlenmediği en düşük dilüsyon MİK olarak belirlendi. Kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. CLSI kriterlerine göre tablo 10'da belirtilen break-point değerlerine göre değerlendirme yapıldı.

Tablo 10. Nalidiksik asit ve siprofloksasin için MİK yorumlama standartları (105).

Antibiyotik	MİK Yorumlama Standardı (µg/ml)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Nalidiksik asit	≤16	–	≥32
Siprofloksasin	≤1	2	≥4

3.4. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Varlığının Gösterilmesi

Çift disk sinerji yöntemi kullanıldı. 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer hazırlanan bakteri süspansiyonları 4 mm. kalınlığındaki Mueller Hinton agar yüzeyine ekildi. Amoksisilin/klavulonik asit (AMC, 20/10 µg) antibiyotik diskinin etrafına merkezden merkeze uzaklık 25 mm. olacak şekilde aztreonam (30 µg), seftriakson (30 µg), seftazidim (30 µg) ve sefotaksim (30 µg) (Becton Dickinson, ABD) antibiyotik diskleri yerleştirildi. Plaklar bir gece 35°C’de inkübe edildi. Antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının amoksisilin/klavulonik asit yönünde genişleme göstermesi veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi GSBL pozitif olarak kabul edildi (107).

3.5. DNA Eldesi

Nalidiksik aside orta duyarlı/dirençli olan izolatların direnç gen bölgelerinin tespiti için öncelikle DNA eldesi işlemi gerçekleştirildi. İki farklı yöntem uygulandı

3.5.1. Kaynatma ile DNA Eldesi

1. Ependorf tüplere 500 µl steril distile su konuldu.
2. Kanlı agar besiyerinde üreyen bakteri kolonilerinden 5-6 koloni alınarak, 500 µl steril distile su içeren ependorf tüpün içinde homojenize edildikten sonra, 100 °C’lik ısı bloğunda 10 dakika tutuldu.
3. 13.000 g’de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatan kısmı alınarak ependorf tüplere konuldu.
4. 20°C’de saklandı (108).

3.5.2. Ticari Kit Kullanılarak DNA Eldesi

Ticari DNA ekstraksiyon kiti (EZ-10 Spin Column Genomic DNA MiniPreps Kit, Bio Basic, Kanada) dizi analizi yapılacak izolatlar için kullanıldı. DNA eldesi firmanın nerileri doğrultusunda aşağıda belirtilen şekilde yapıldı:

1. Hazırlanan 1,5 ml'lik bakteri süspansiyonu 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
 2. Solüsyon I'den 100 mikrolitre pelletin üzerine eklendi, 1 dk. bekletildi, sonrasında Solüsyon II'den 200 mikrolitre eklendi ve yine 1 dk. bekletildi.
 3. Solüsyon III'den 350 mikrolitre eklenerek 1 dk. oda ısısında bekletildi ve 12.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
 4. Süpernatant kısım EZ-10 tüpüne aktarıldı ve 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi.
 5. Pellet atıldı ve EZ-10 tüpüne 750 mikrolitre yıkama solüsyonu eklenerek 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıldı.
 6. Yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi ve pellet atıldı, tekrar 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıldı.
 7. EZ-10 tüpü 1,5 ml'lik temiz bir santrifüj tüpüne alınarak üzerine 50 mikrolitre Elüsyon Tamponu (Elution Buffer) eklendi ve oda ısısında 2 dk. inkübe edildi, sonrasında 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıldı.
- Elde edilen DNA çözeltisi -20°C 'de saklandı.

3.6. DNA Çoğaltılması (Amplifikasyon)

qnrA, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *gyrA*, *parC* gen bölgelerinin çoğaltılması için tablo 11'de belirtilen primerler kullanıldı.

Tablo 11. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri

Gen Bölgesi	Forward Primer	Reverse Primer	Bant Büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>qnrA</i>	5'-attctcacgccaggatttg-3'	5'-gatcgccaaggttaggtca-3'	516	Robicsek ve ark.(109)
<i>qnrB</i>	5'-gatcgtgaaagccagaagg-3'	5'-acgatgcctgtagttgtcc-3'	469	Robicsek ve ark.(109)
<i>qnrS</i>	5'-acgacattcgtaactgcaa-3'	5'-taaattggcacccgttaggc-3'	417	Robicsek ve ark.(109)
<i>aa-Ib</i>	5'-ttgcgatgctctatgagtgcta-3'	5'-ctcgaatgcctggcgtgtt-3'	482	Park ve ark.(110)
<i>gyrA</i>	5'-tacaccggtcaacattgagg-3'	5'-ttaattatgccgccgtcgg-3'	648	Saenz ve ark.(111)
<i>parC</i>	5'-aacctgttcagcgcgcatt-3'	5'-gtggtgccgttaagcaaa-3'	395	Vila ve ark.(112)

PCR reaksiyonu için; 1X PZR tamponu (200µM dNTP, 1.25mM MgCl₂, 100µg bovin serum albumin/ml) kullanıldı (pH 8.4). Her reaksiyon için 20 pmol/µl primer, 2.5U Taq DNA polimeraz (Bioron, İngiltere), 5 µl DNA konularak son reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su ile tamamlandı (113).

Amplifikasyon koşulları:

qnrA, *qnrB* ve *qnrS* için; 95°C’de 5 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 30 siklus olarak 95 °C/15 sn. denaturasyon, 55°C/15 sn. bağlanma ve 72°C/40 sn. uzama, 72°C/4 dk. son uzama olarak uygulandı

aac(6’)-Ib için; 95°C’de 5 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 30 siklus olarak 95°C/15 sn. denaturasyon, 58°C/15 sn. bağlanma ve 72°C/40 sn uzama, 72°C/4 dk son uzama olarak uygulandı.

gyrA için; 94 °C’de 3 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 44 döngü şeklinde 94°C/1 dk, 56 °C’de 2,5 dk, 72 °C’de 2,5 dk. uygulandı. 72°C’de 15 dakika son uzama fazı uygulanarak işlem tamamlandı.

parC için, 94°C ’de 3 dk, 44 döngü şeklinde 94 °C’de 1dk, 56°C’de 1,5 dk, 72°C’de 2,5 dk uygulandı. PZR sonrasında 72°C’de 15 dk uzama fazı uygulanarak işlem tamamlandı.

Amplifikasyon için Gene Amp PCR System 9700 Termal Cycler kullanıldı.

3.7. Amplifikasyon Ürünlerinin Görüntülenmesi

Amplifikasyon ürünleri, 1X TBE tamponu içindeki % 2’lik agaroz jelde (Sigma, Almanya) 120 V akımla 60 dakika elektroforez sonrası Gel Doc UV görüntüleme sistemi (BioRad, Italy) ile görüntüleme yapıldı. Belirleyici (marker) olarak 100-bç’lik DNA ladder (Sigma, Almanya) kullanıldı. Jelde, 516 baz çifti içeren *qnrA*, 469 baz çifti içeren *qnrB*, 417 baz çifti içeren *qnrS*, 482 baz çifti içeren *aac(6’)-Ib*, 648 baz çifti içeren *gyrA* ve 395 baz çifti içeren *parC* bantları görüntülendi.

Amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesinde kullanılan tampon ve çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı:

TBE (Tris-borik asit-EDTA) tamponu

Stok solüsyon (10 X, p H 8.0)

121.1 gr Tris (Sigma, Almanya)

61.83 gr Borik asit (Riedel de Haen, Almanya)

5.84 gr EDTA (pH:8) (Amresco, A.B.D)

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlandı. pH 8.0'e ayarlanarak +4°C'de saklandı (114).

Etidyum Bromür (5 mg/ml stok)

10 mg etidyum bromür 2 ml distile suda, manyetik çalkalayıcı üzerinde birkaç saat karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Renkli şişeye kondu ve şişenin etrafı alüminyum kağıt ile kapatılarak oda sıcaklığında saklandı. Hazırlanan bu çözeltiden her 100 ml agaroz içine 10 µl eklendi. (114).

Agaroz jel

2 gr agaroz (Sigma, Almanya) 100 ml 1X TBE tamponu içerisinde iyice eritildi. Jelin sıcaklığı 60°C'ye gelince stok etidyum bromür çözeltisinden 10 µl eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra jel kabına döküldü (114).

3.8. Nükleik Asit Dizileme

Proje kapsamında hizmet alımı yapılarak Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde (TÜBİTAK MAM GMBE) yapıldı. Projenin maddi imkanları doğrultusunda 158 adet PCR ürünü (79 adet *gyrA* ve 79 adet *parC*) TÜBİTAK MAM GMBE'ye gönderildi. İlgili merkezde PCR ürünlerinin tamamı agaroz jelde yürütüldükten sonra Agaroz Gel DNA Ekstraksiyon kiti (Roche, Kat.No. 11696505001) kullanılarak agaroz jelden saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA örneklerinin dizi analizi ilgili genlere özgün forward ve reverse primerler (Tablo 9) kullanılarak gerçekleştirildi. Beckman Coulter Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (DTCS) kullanılarak kurulan dizi reaksiyonlarında özgün forward veya reverse primerler 3.2 pmol ve kalıp PCR ürünleri 50 fmol konsantrasyonlarda kullanıldı. Forward ve reverse primerlerle dizi analizi başarılı olan tüm örneklerle ait sonuçlar 'fasta ve 'scf' olmak üzere iki farklı formatta elektronik olarak kayıt edilerek tarafımıza gönderildi.

Elde edilen protein dizileri, National Center for Biotechnology Information (NCBI) web sayfasında bulunan protein BLAST programıyla gen bankasındaki protein dizileriyle karşılaştırıldı (115). Suşlarımıza ait GyrA ve ParC protein dizileri, CLUSTAL W. programı yardımıyla edinilmiş olan standart dizilerle hizalandı ve numaralandırıldı. İlgili kodonlarda mutasyonların varlığı, standart dizilerle karşılaştırılmak suretiyle saptandı (116).

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS (Versiyon 13.0) programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Kategorik yapıdaki değişkenler bakımından gruplar arası farklılıklar Ki-kare testi ile incelendi. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İzolat Özellikleri

İzolatların elde edildikleri klinik örneklerle ve hasta özelliklerine (polikliniğe gelen/yatan hasta) göre dağılımları Tablo 12’de gösterilmiştir. İzolatların elde edildikleri hastaların başvurdıkları kliniklerin dağılımı Tablo 13’de gösterilmiştir.

İzolatların elde edildiği hastaların 400’ü (%63.7) kadın, 228’i (%36.3) erkek olup, yaş ortalaması 50.4 (± 25.6) olarak bulundu. Klinik örneklerin 347’sinin (%55) yatan hastalara, 281’inin (%45) poliklinik hastalarına ait olduğu belirlendi.

Çalışmaya dahil edilen izolatların 300’ü (%47.8) nalidiksik aside dirençli/orta duyarlı olarak tespit edildi. Bu izolatların 265’inin (%51) *E. coli* ve 35’inin (%29.1) *Klebsiella spp.* olduğu belirlendi.

Tablo 12. İzolatların elde edildikleri klinik örneklerle göre ve hasta özelliklerine göre dağılımı

Örnek	<i>E.coli</i>		<i>K.pneumoniae</i>		<i>K.oxytoca</i>		Toplam
	Ayaktan	Yatan	Ayaktan	Yatan	Ayaktan	Yatan	
İdrar	219	173	30	32	2	2	458
Trakeal Aspirat	1	12	1	11	0	0	25
Yara	8	27	1	4	0	0	40
Kan	6	30	3	14	0	1	54
Periton	1	7	0	0	0	0	8
Vagen	1	0	1	1	0	0	3
Balgam	1	5	4	6	0	0	16
Doku	0	11	0	3	0	1	15
Plevra	0	1	1	1	0	0	3
BAL	1	2	0	1	0	0	4
Kateter	0	2	0	0	0	0	2
Toplam	238	270	41	73	2	4	628

Tablo 13. İzolatların elde edildikleri hastaların başvurdukları kliniklerin dağılımı

Hasta Örneklerinin Gönderildiği Klinikler	<i>E.coli</i>		<i>K.pneumoniae</i>		<i>K.oxytoca</i>		Toplam
	Ayaktan	Yatan	Ayaktan	Yatan	Ayaktan	Yatan	
Göğüs	3	19	2	8	0	0	32
K.Doğum	13	20	2	4	0	0	39
Üroloji	67	16	10	4	0	1	98
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	8	19	0	6	0	0	33
Genel cerrahi	4	29	0	2	0	0	35
Psikiyatri	0	0	0	2	0	0	2
Çocuk	42	10	8	5	1	0	66
Yenidoğan	0	5	1	4	0	1	11
Nöroloji	5	16	1	5	0	0	27
Nefroloji	32	16	6	5	0	0	59
Enfeksiyon	11	11	5	4	0	0	31
Ortopedi	1	6	1	1	0	0	9
Dahiliye	14	7	2	0	0	0	24
Hematoloji	2	4	0	0	0	0	6
Erişkin Acil	15	1	0	1	0	0	17
Gastroenteroloji	8	26	0	4	0	1	39
P.Cerrahi	0	10	0	3	0	1	14
Onkoloji	6	15	1	2	0	0	24
Cildiye	1	2	0	1	0	0	4
Anestezi	0	1	0	2	0	0	3
Kalp Damar Cerrahisi	0	0	0	1	0	0	1
Beyin cerrahisi	2	7	1	2	0	0	12
Kardiyoloji	1	6	0	1	0	0	8
Göğüs.Cerrahisi	2	2	0	0	0	0	4
Yoğun Bakım	0	21	0	6	0	0	27
Kulak Burun Boğaz	0	0	0	1	0	0	1
Göz	1	0	0	0	0	0	1
Aile Hekimliği	1	0	0	0	0	0	1
Toplam	238	270	41	73	2	4	628

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya alınan 628 izolatin disk diffüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılıkları Tablo 14’de gösterilmiştir. İzolatlarda karbapenem direncine rastlanmamıştır.

Tablo 14. Çalışmaya alınan 628 izolatin antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	<i>E. coli</i>						<i>K. pneumoniae</i>						<i>K. oxytoca</i>		
	D		OD		DİR		D		OD		DİR		D	OD	DİR
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
Levofloksasin	266	52.4	6	1.2	236	46.5	87	76.3	4	3.5	23	20.2	4	1	1
Siprofloksasin	266	52.4	5	1.2	237	46.7	86	75.4	4	3.5	24	21.1	4	1	1
Nalidiksik asit	243	47.8	1	0.2	264	52.0	81	71.1	1	0.9	32	28.1	4	1	1
Ampisilin	103	20.3	12	2.4	393	77.4	12	10.5	0	0	102	89.5	1	0	5
AMK	241	47.4	102	20.1	165	32.5	60	52.6	19	16.7	35	30.7	4	1	1
Sefalotin	172	33.9	45	8.9	291	57.3	64	56.1	6	5.3	44	38.6	3	1	2
Sefepim	337	66.3	10	2.0	161	31.7	82	71.9	4	3.5	28	24.6	5	0	1
Sefotaksim	326	64.2	4	0.8	178	35.0	80	70.2	0	0	34	29.8	5	0	1
Sefoksitin	493	97.0	7	1.4	8	1.6	111	97.4	1	0.9	2	1.8	6	0	0
Sefuroksim	250	49.2	56	11.0	202	39.8	63	55.3	9	7.9	42	36.8	4	1	1
İmipenem	508	100	0	0	0	0	114	100	0	0	0	0	6	0	0
Gentamisin	360	70.9	17	3.3	131	25.8	100	87.7	0	0	14	12.3	6	0	0
Tobramisin	315	62	11	2.2	182	35.8	89	78.1	0	0	25	21.9	5	0	1
Amikasin	462	90.9	30	5.9	16	3.1	108	94.7	1	0.9	5	4.4	6	0	0
TMP	266	52.4	3	0.6	239	47.0	70	61.4	4	3.5	40	35.1	4	0	2
Toplam	508						114						6		

D; Duyarlı OD; Orta duyarlı DİR; Dirençli AMK; Amoksisilin-klavulonat TMP; Trimetoprim-sülfametoksazol

Nalidiksik asite dirençli/orta duyarlı olan belirlenerek ileri çalışmalar için ayrılan 300 izolatin diğer antibiyotiklere duyarlılıkları Tablo 15’de belirtilmiştir.

Tablo 15. Nalidiksik asite dirençli/orta duyarlı olan 300 izolatın antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	<i>E. coli</i>												<i>K. pneumoniae</i>												<i>K. oxytoca</i>					
	Ayaktan						Yatan						Ayaktan						Yatan						Ayaktan			Yatan		
	D	OD	DİR	D	OD	DİR	D	OD	DİR	D	OD	DİR	D	OD	DİR	D	OD	DİR	D	OD	DİR	D	OD	DİR	D	OD	DİR	D	OD	DİR
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%						
Levofloksasin	10	9.3	3	2.8	94	87.9	13	8.2	3	1.9	142	89.9	1	7.1	1	7.1	12	85.7	5	26.3	3	18.8	11	57.9	0	0	1	0	1	0
Siprofloksasin	10	9.3	3	2.8	94	87.9	13	8.2	2	1.3	143	90.5	1	7.1	1	7.1	12	85.7	5	26.3	3	15.8	11	57.9	0	0	1	0	1	0
Nalidiksik asit	0	0	1	0.9	106	99.1	0	0	0	0	158	100	0	0	1	7.1	13	92.9	0	0	0	0	19	100	0	0	1	0	1	0
Ampisilin	5	4.7	0	0	102	95.3	2	1.3	2	1.5	154	97.5	0	0	0	0	14	100	1	5.3	0	0	18	94.7	1	0	0	0	0	1
AMK	32	29.9	37	34.6	38	35.5	35	22.2	34	21.5	89	56.3	1	7.1	5	35.7	8	57.1	6	31.6	6	31.6	7	36.8	1	0	0	0	1	0
Sefalotin	14	13.1	9	8.4	84	84	18	11.4	6	3.8	134	84.8	1	7.1	0	0	13	92.9	7	36.8	0	0	12	63.2	1	0	0	0	0	1
Sefepim	54	50.5	5	4.7	48	44.9	59	37.3	5	3.2	94	59.5	3	21.4	2	14.3	9	64.3	8	42.1	2	10.5	9	47.4	1	0	0	0	0	1
Sefotaksim	49	45.8	1	0.9	57	53.3	54	34.2	3	1.9	101	63.9	2	14.3	0	0	12	85.7	8	42.1	0	0	11	57.9	1	0	0	0	0	1
Sefoksitin	104	97.2	1	0.9	2	1.9	148	93.7	5	3.2	5	3.2	14	100	0	0	0	0	17	89.5	1	5.5	1	5.3	1	0	0	1	0	0
Sefuroksim	35	32.7	11	10.3	61	57.0	40	25.3	9	5.7	109	69.0	0	0	2	14.3	12	85.2	7	36.8	0	0	12	3.2	1	0	0	1	0	0
İmipenem	107	100	0	0	0	0	158	100	0	0	0	0	14	100	0	0	0	0	19	100	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Gentamisin	55	51.4	8	7.5	44	41.1	79	50.0	4	2.5	75	47.5	9	64.3	0	0	14	35.7	14	73.7	0	0	5	26.3	1	0	0	1	0	0
Tobramisin	38	35.5	6	5.6	63	58.9	53	33.5	1	0.6	104	65.8	4	28.6	0	0	10	71.4	10	52.6	0	0	9	42.4	0	0	1	1	0	0
Amikasin	88	82.2	13	12.1	6	5.6	137	86.7	14	8.9	7	4.4	12	85.7	1	7.1	1	7.1	17	89.5	0	0	2	10.5	1	0	0	1	0	0
TMP	29	27.1	0	0	78	72.9	70	44.3	0	0	88	55.7	2	14.3	1	7.1	11	78.6	8	42.1	0	0	11	57.9	1	0	0	0	0	1
Toplam							265									33														2

D; Duyarlı OD; Orta duyarlı DİR; Dirençli AMK; Amoksisilin-klavulonat TMP; Trimetoprim-sülfametoksazol

İleri çalışmalar için ayrılan 300 izolatın %59.3'ü yatan hastalardan, %40.7'si polikliniğe başvuran hastalardan elde edilmiştir. Yatan hastalardan izole edilen izolatlarda nalidiksik asit direnci (Tablo 16) istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.049$). Nalidiksik aside dirençli/orta duyarlı olan izolatların, diğer izolatlara göre, ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, sefalotin, sefepim, sefotaksim, sefuroksim, sefoksitin, gentamisin, tobramisin, amikasin, trimetoprim-sülfometoksazol antibiyotiklerine karşı istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha dirençli oldukları saptanmıştır ($p<0.001$).

Tablo 16. Nalidiksik asite duyarlılık durumuna göre ayakta ve yatan hastalarının dağılımı

Nalidiksik asite Duyarlılık	Ayaktan		Yatan		Toplam
	n	%	n	%	
Nalidiksik asite dirençli/orta duyarlı	122	43.4	178	51.3	300
Nalidiksik asite duyarlı	159	56.6	169	48.7	328
Toplam	281		347		628

Disk difüzyon test sonuçlarına göre nalidiksik aside dirençli/orta duyarlı tespit edilen 300 izolata, nalidiksik asit ve siprofloksasin ile yapılan agar dilüsyon testi sonuçları Tablo 17 ve Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 17. İzolatların nalidiksik asit MİK değerleri

Bakteri	Nalidiksik asit MİK (µg/ml)																Toplam
	>256		256		128		64		32		16		8		<8		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
<i>E. coli</i>	253	95.5	2	0.8	3	1.5	4	1.5	1	0.4	1	0.4	0	1	0.4		265
<i>K. pneumoniae</i>	27	81.8	0		2	6.1	2	6.1	1	3.0	1	3.0	0	0	0		33
<i>K. oxytoca</i>	1		0		0		0		0		1		0	0	0		2
Toplam	281		2		5		6		2		3		0	1			300

Tablo 18. İzolatların siprofloksasin MİK değerleri

Bakteri	Siprofloksasin MİK (µg/ml)																Toplam		
	>32		32		16		8		4		2		1		0.5			<0.5	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		n	%
<i>E.coli</i>	201	75.8	37	14	20	7.5	5	1.9	0		0		0	0	2	0.8	0		265
<i>K.pneumoniae</i>	23	69.7	4	12.1	1	3.0	3	9.1	0		0		0	0	2	6.1	0		33
<i>K.oxytoca</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0		0		1	0	0	0	0		2
Toplam	225		41		21		8		0		0		1		4		0		300

4.3. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Varlığının Gösterilmesi

Tüm izolatların ve nalidiksik asit dirençli/orta duyarlı olarak tespit edilen izolatların GSBL oranları Tablo 19’da gösterilmiştir.

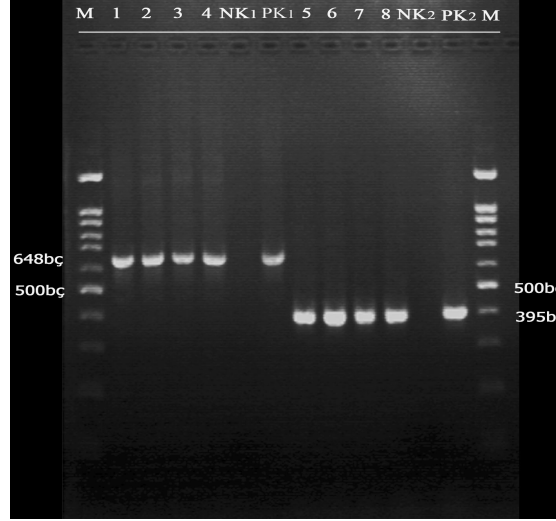
Tablo 19. Tüm izolatların ve nalidiksik asit dirençli/orta duyarlı olarak tespit edilen izolatların GSBL oranları

GSBL	Tüm Bakteriler						Nalidiksik Asit Dirençli/Orta Duyarlı					
	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>K.oxytoca</i>		<i>E. coli</i>		<i>K.pneumoniae</i>		<i>K.oxytoca</i>	
	n	%	n	%			n	%	n	%		
Pozitif	190	37.4	36	31.6	1		165	62.3	23	69.7	1	
Negatif	318	62.6	78	68.4	5		100	37.7	10	30.3	1	
Toplam	508		114		6		265		33		2	

Nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda GSBL üretimi (%83.3), duyarlı olanlara göre (%16.7) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.001).

4.4. Kinolon Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda nalidiksik asit dirençli/orta duyarlı saptanan 300 izolatta; kinolon direncini tanımlayan bölgede *gyrA* ve *parC* bölgeleri Tablo 11’de belirtilen primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Amplifikasyon ürünleri Şekil 7’de gösterilmiştir.



1-4: İzolatlarda çoğaltılan *gyrA* (648bp), NK1: *gyrA* negatif kontrol, PK1: *gyrA* pozitif kontrol, 5-8: İzolatlarda çoğaltılan *parC* (395 bp), NK2: *parC* negatif kontrol, PK2: *parC* pozitif kontrol, M: Marker (belirleyici) 100 bp+1,5kb DNA ladder

Şekil 7: PCR sonrası *gyrA* ve *parC* bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

TÜBİTAK MAM GMBE’ye gönderilen 79 *gyrA* PCR ürününden 64’ünün ‘consensus’ dizisi oluşturulmuş, bu dizilerden beşinin kısa okuma bilgisi olduğundan amino asit dizisine çevrimi yapılamamıştır. Sonuç olarak 59 örneğin *gyrA* bölgesine ait aminoasit dizisi elde edilebilmiştir. Bu örneklerle ait QRDR olarak tanımlanan Ala67-Gln106 arasında belirlenen mutasyonlar Tablo 20’de gösterilmiştir. QRDR dışında olmasına rağmen *gyrA*’da belirlenen diğer mutasyonlar da aynı tabloda belirtilmiştir. Tam dizileme yapılabilen izolatların yedisinde 162. kodonda lizin yerine glutamin yer aldığı gözlenmiştir.

parC genine özgü primerlerle 77 örneğe ait dizi okuması gerçekleştirilebilmiştir. Bunların tümü aminoasit dizisine çevrilmiştir. Bu bölgede belirlenen mutasyonlar Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20. *gyrA* ve *parC* gen bölgelerinde belirlenmiş mutasyonlar

İzolat No	Bakteri	CIP MİK µg/ml	Gyr A		ParC	
			QRDR	Diğer	QRDR	Diğer
1	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile	-
3	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
9	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
14	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Val	-
16	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile	-
20	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Ala	-
24	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Lys162Gln	Ser80Ile,Glu84Val	-
37	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Lys162Gln	Ser80Ile,Glu84Val	-
40	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
45	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	DNA dizisi oluşturulamadı	-
46	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Lys162Gln	DNA dizisi oluşturulamadı	-
47	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
48	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Lys162Gln	Ser80Ile,Glu84Gly	-
50	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Val	-
51	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Val	-
52	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
53	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
54	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
55	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
56	<i>K. oxytoca</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
57	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
61	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
63	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Lys162Gln	Ser80Ile	-
68	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
70	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Gly	-
71	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Tyr	-	Ser80Ile,Glu84Gly	-
72	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
73	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Lys162Gln	Ser80Ile,Glu84Val	-
74	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
75	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Ala	-
78	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
80	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile,Glu84Ala	-
81	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
82	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
83	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile	-
84	<i>E. coli</i>	>32	Kısa okuma bilgisi	-	Ser80Ile	-
97	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
98	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-

Tablo 20. *gyrA* ve *parC* gen bölgelerinde belirlenmiş mutasyonlar (devam)

İzolot No	Bakteri	CIP MİK µg/ml	Gyr A		ParC	
			QRDR	Diğer	QRDR	Diğer
99	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
100	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
101	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
102	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Val	-
104	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Lys162Gln	Ser80Ile	-
107	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile	-
111	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
113	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Val	-
116	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Lys162Gln	Ser80Ile,Glu84Val	-
119	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile	-
121	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
122	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
124	<i>E. coli</i>	>32	Kısa okuma bilgisi	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
125	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile	-
128	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
134	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile, Glu84Gly	-
136	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
139	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
141	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
151	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
157	<i>K. pneumoniae</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Val	-
158	<i>E. coli</i>	>32	Kısa okuma bilgisi	Kısa okuma bilgisi	-	-
159	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile, Glu84Gly	-
166	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
167	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı		Ser80Ile	-
168	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı		Ser80Ile	-
169	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
170	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
171	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-
172	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Lys162Gln	Ser80Ile	-
173	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Val	-
174	<i>E. coli</i>	>32	Kısa okuma bilgisi	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Val	-
175	<i>E. coli</i>	>32	Kısa okuma bilgisi	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile,Glu84Val	-
176	<i>E. coli</i>	>32	Kısa okuma bilgisi	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile	-
179	<i>E. coli</i>	>32	Kısa okuma bilgisi	Kısa okuma bilgisi	-	-

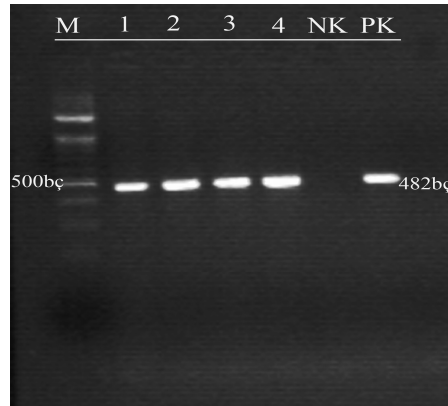
Tablo 20. *gyrA* ve *parC* gen bölgelerinde belirlenmiş mutasyonlar (devam)

İzolat numarası	Bakteri	CIP MIK µg/ml	Gyr A		ParC	
			QRDR	Diğer	QRDR	Diğer
180	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	
182	<i>E. coli</i>	>32	DNA dizisi oluşturulamadı		Ser80Ile,Glu84Val	-
183	<i>E. coli</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
214	<i>K. pneumoniae</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	Kısa okuma bilgisi	Ser80Ile	-
228	<i>K. pneumoniae</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile	-
269	<i>K. pneumoniae</i>	>32	Ser83Leu,Asp87Asn	-	Ser80Ile,Glu84Val	-

Ala: Alanin, Asn: Asparajin, Asp: Aspartat, CIP: Siprofloksasin, Gln: Glutamin, Glu: Glutamat, Gly: Glisin, , Ile: İsolösin, Leu: Lösin, Lys: Lizin, Ser: Serin, Val: Valin, Tyr: Tirozin,

aac(6')-Ib geni varlığı

E. coli izolatlarının 99'unda (%37.4), *K. pneumoniae* izolatlarının dördünde (%12.1) *aac(6')-Ib* geni belirlenmiştir. *K. oxytoca* izolatlarında bu gen bölgesi bulunmamıştır. *aac(6')-Ib* genine ait elde edilen amplifikasyon ürünleri Şekil 8'de gösterilmiştir.



1-4: İzolatlarda çoğaltılan *aac(6')-Ib* (882 bç),NK: *gyrA* negatif kontrol,PK: pozitif kontrol., M: Marker (belirleyici) 100 bç+1,5kb DNA ladder

Şekil 8: PCR sonrası *aac(6')-Ib* bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

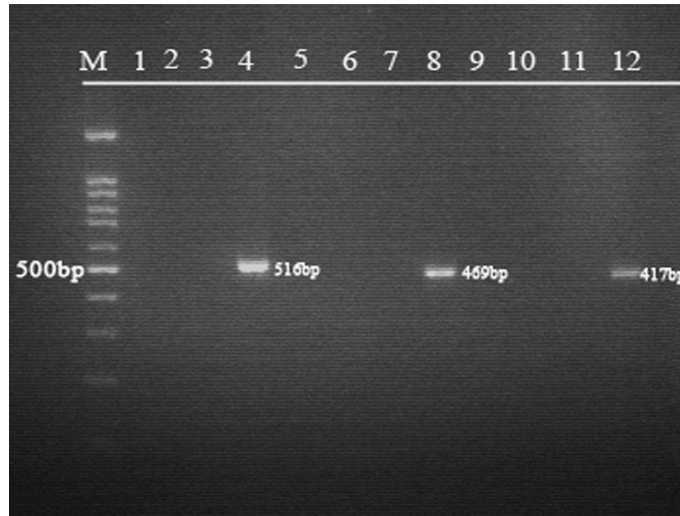
aac(6')-Ib geni saptanan *E. coli* izolatlarında tobramisin ve gentamisin direnci istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Bu izolatlarda trimetoprim-sulfametoksazole azalmış duyarlılık tespit edilmiş, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,485$).

aac(6')-Ib geni saptanan izolatlarda GSBL üretimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 21).

Tablo 21. İzolatlarda *aac(6')-Ib* geni varlığının GSBL üretimi ile ilişkisi

<i>aac(6')-Ib</i>	<i>E. coli</i>				<i>K. pneumoniae</i>				<i>K. oxytoca</i>	
	GSBL		GSBL		GSBL		GSBL		GSBL	GSBL
	Pozitif		Negatif		Pozitif		Negatif		Pozitif	Negatif
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	n
<i>aac(6')-Ib</i> Pozitif	90	90.9	9	9.1	4	100	0	0	0	0
<i>aac(6')-Ib</i> Negatif	75	45.2	91	54.8	19	65.5	10	35.5	1	1
TOPLAM	165		100		23		10		1	1

qnrA, *qnrB* ve *qnrS* varlığı PCR yöntemi kullanılarak araştırılmış kökenlerin hiçbirinde *qnr* geni bulunmamıştır (Şekil 9).



1 ,2, 5, 6, 9, 10: Sırasıyla *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* negatif izolatlar
4, 8, 12: Sırasıyla *qnrA* (516 bç), *qnrB* (469 bç), *qnrS* (417 bç) pozitif kontroller
3, 7, 11: Negatif kontroller
M: Marker (belirleyici) 100 bç+1,5kb DNA ladder

Şekil 9: PCR sonrası *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

5. TARTIŞMA

Kinolonlar, çeşitli bakteriyel infeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan geniş spekturumlu antibiyotiklerdir. GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonların tedavisinde kullanılabilmeleri nedeniyle GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu üriner infeksiyonlarında oldukça sık reçete edildikleri gibi bakteriyemi ve nozokomiyal pnömoni de de karbapenemlerin kullanılamayacağı durumlarda tercih edilebilmektedirler (117). Son yıllarda yapılan bildirimler kinolon direncinin dünyada ve ülkemizde oldukça yüksek düzeylere ulaştığını göstermektedir. 2009 yılı EARSS verilerine bakıldığında *E. coli* izolatlarında florokinolon direncinin %36, *K. pneumoniae* izolatlarında %55 olarak belirlendiği görülmektedir. Çalışmamızda izolatların tümü değerlendirildiğinde siprofloksasin direnç oranları *E. coli* için %46.7, *K. pneumoniae* için %21.1 olarak bulunmuştur. Yapılan bildirimlerdeki direnç oranları incelenen izolatların özelliklerine oldukça değişkenlik göstermektedir. GSBL üreten izolatlarda %80'leri aşan direnç oranları gözlenmektedir (71). GSBL üretimi ile florokinolon direnci arasında yakın ilişki olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (42,118,119). Çalışmamızda nalidiksik aside dirençli izolatlarda GSBL üretimi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

GSBL oranları özellikle *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında olmak üzere tüm dünyada giderek yükselmektedir (120, 121). Ülkemizdeki çok merkezli bir çalışma olan MYSTIC çalışmasının 2007 verilerine göre *K. pneumoniae* suşlarının %40.5'i ve *E. coli* suşlarının %15.3'ü GSBL pozitif bulunmuştur (122). EARSS veri tabanına göre ise ülkemizde 2009 yılında toplanan invazif *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında GSBL oranları sırasıyla % 45.6 ve %58.9 olarak bildirilmektedir (62). Çalışmamızda GSBL oranı *E. coli* izolatlarında %37.4 ve *K. pneumoniae* izolatlarında %31.6 olarak saptanmıştır. Toplam altı *K. oxytoca* izolatından birinde GSBL saptanmıştır. Ülkemizde bu konu ile ilgili olarak çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda farklı oranlar elde edilmiştir. Çalışmaların sonuçları arasındaki bu farklılık, merkezler arasındaki antibiyotik kullanım politikalarının farklı olması sebebine dayandırılabilir. Ayrıca çalışmada yer alan numune sayısının farklılığı ile de ilişkilendirilebilir.

Kinolon grubu antibiyotiklere direnç genellikle temel hedef olan DNA giraz ve topoizomerez IV'de görülen mutasyonlar veya efluks pompalarının aşırı üretimi ile gerçekleşmektedir. En sık görülen mutasyonlar DNA girazda *gyrA* ve topoizomerez IV'de *parC* gen bölgelerinde oluşmaktadır. Ancak, son yıllarda plazmid ilişkili kinolon direncinin *Enterobacteriaceae* üyelerinde önemli bir direnç mekanizması olduğu bildirilmektedir.

5.1. *gyrA* ve *parC* Mutasyonları

Plazmid geçişli kinolon direnç determinantları nalidiksik asid ve florokinolonlara sadece düşük seviyede direnç veya azalmış duyarlılık sağlamaktadır (44). Yüksek düzeyde kinolon direncinin oluşması için hedef genlerin QRDR'lerinde (özellikle *gyrA* ve *parC*) nokta mutasyonların oluşması gerekmektedir. Genellikle *gyrA* genindeki çift mutasyonlar yüksek düzeyde kinolon direncinin sebebi olarak bildirilmiştir. Buna ilave olarak *parC* geninde oluşan tek veya çift mutasyonların artan kinolon direncinde tamamlayıcı bir rol oynadığı düşünülmektedir (123).

Ülkemizde bu konuda yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, nalidiksik aside orta duyarlı/dirençli olan 300 izolat bulunmasına rağmen, mevcut kaynaklar doğrultusunda 79 adet izolat için dizileme yapılması mümkün olmuştur. Bu amaçla TÜBİTAK MAM GMBE'ye gönderilen 79 *gyrA* PCR ürününden 64'ünün 'consensus' dizisi oluşturulmuş, bu dizilerden beşinin kısa okuma bilgisi olduğundan amino asit dizisine çevrimi yapılamamıştır. Sonuç olarak 59 örneğin *gyrA* bölgesine ait aminoasit dizisi elde edilebilmiştir. Bu örneklerle ait, QRDR olarak tanımlanan Ala67-Gln106 arasında aminoasit dizilimleri incelendiğinde 59 izolatın tümünde çift mutasyon olduğu gözlenmiştir. Bu izolatlarda 83. kodonda serin yerine lösin (Ser83Leu), bir izolat dışında 87. kodonda aspartat yerine asparajin (Asp87Asn) ve tek izolatta 87. kodonda aspartat yerine tirozin (Asp87Tyr) bulunduğu belirlenmiştir.

parC genine özgü primerlerle 77 örneğe ait dizi okuması gerçekleştirilebilmiş ve bunların tümü aminoasit dizisine çevrilmiştir. Bu izolatların ikisinde mutasyon bulunmamıştır. Geri kalan 75 izolatın hepsinde 80. kodonda serin yerine izolösin (Ser80Ile) geçişi olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 43'ünde ilave bir mutasyon

gözlenmiştir. Bu mutasyonların, 84. kodonda glutamat yerine 35 izolatta valin (Glu84Val), beş izolatta glisin (Glu84Gly) üç izolatta ise alanin (Glu84Ala) geçişi şeklinde olduğu belirlenmiştir.

Bu konuda daha önce ülkemizden yapılmış iki bildirimde ulaşılabilmektedir. Bunlardan birinde Eraç ve ark.ları sekiz *E. coli* izolatında *gyrA* bölgesinde Ser-83-Leu mutasyonu saptamışlar, siprofloksasin duyarlı nalidiksik asit dirençli olan bir izolat hariç diğer izolatlarda ek olarak Asp-87-Tyr veya Asp-87-Asn mutasyonları olduğunu tespit etmişlerdir (93).

Diğer çalışmada ise Güven, sağlıklı çocukların dışkılarında kinolon dirençli *E. coli* taşıyıcılığı ve direnç mekanizmalarını araştırmış, nalidiksik asit ve siprofloksasin dirençli altı izolatta *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonları değerlendirmiş, suşların hepsinde *gyrA*'da 83'üncü kodondaki serinin yerine lösin ve 87'inci kodondaki aspartik asidin yerine asparagin geçişi saptamıştır. *parC* bölgesinde ise yine suşların hepsinde 80'inci kodondaki serinin yerine izolösin (Ser80Ile) ve 83'üncü kodondaki serinin yerine ise tirozin geçişi (Ser83Tyr) saptanmıştır. Bu mutasyonlara ek olarak kökenlerin birinde *parC*'de 84'üncü kodonda glutamik asidin yerine glisin (Glu84Gly), bir diğerinde ise valin (Glu84Val) geçişi belirlenmiştir (94).

Çalışmamızda, daha önceki bildirimlerden farklı olarak *parC*'de Glu84Ala değişimi belirlenmiştir. Ayrıca izolatlarımızda ikinci en sık rastlanan mutasyon olarak Glu84Val değişimi gözlenmiş, Güven'in bildirdiği Ser83Tyr değişimi bulunmamıştır.

Çalışmamızda tam dizileme yapılabilen izolatların yedisinde *gyrA* bölgesinde QRDR bölgesi dışında 162. kodonda lizin yerine glutamin (Lys162Gln) yer aldığı gözlenmiştir. Literatüre bakıldığında *gyrA*'da QRDR dışında saptanmış diğer mutasyonlar arasında Ala196Glu (invivo) ve Ala51Val (in vitro) değişimlerinin bildirildiği gözlenmiştir (24). Dolayısıyla bizim belirlemiş olduğumuz 162. kodondaki bu değişiklik daha önce bildirilmemiştir.

5.2. Plazmit Geçişli Kinolon Direnci

Qnr geni

1998 yılında çoğul dirençli bir *K. pneumoniae* izolatında *qnrA* geninin gösterilmesi ile birlikte kinolon direncinin plazmitle ilişkili olabildiği gündeme gelmiş ve büyük ilgi uyandırmıştır (30). Qnr proteinleri pentapeptid tekrar ailesinin bir üyesi olup, DNA giraz ve topoizomeraz IV'de bağlanarak bu hedef bölgeleri kinolonların inhibitör etkisinden korumaktadır. Tanımlanmış olan ilk protein 218 aminoasit içeren QnrA'dır. Bundan sonra iki protein daha tanımlanmıştır. Bunlar QnrA ile sırasıyla %40 ve %59 aminoasit benzerliği gösteren QnrB ve QnrS proteinleridir. Qnr proteinleri başta *K. pneumoniae* ve *Enterobacter spp.* başta olmak üzere *Enterobacteriaceae* üyelerinde değişik üyelerden bildirilmektedir. Qnr taşıyan plazmidler aynı zamanda GSBL de taşımaktadır (124)

Dünya genelinde bu konuyla ilgili yapılmış çalışmalara bakıldığında, Norveç ve İsveç'ten elde edilen *E. coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında *qnr* genlerinin prevalansının sırasıyla %0,7 ve %7,7 olduğu gözlenmektedir (125). Danimarka'daki nalidiksik aside dirençli *E. coli* izolatlarında bu oran %1,63 olarak bulunmuştur (126). Fransa ve Kanada'dan da düşük *qnr* gen prevalansları bildirilmiştir. Fransa'da GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında *qnr* gen prevalansı %1,6 iken (124, 127), Kanada'da siprofloksasin ve/veya tobramisine dirençli *E. coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında bu oran %1 bulunmuştur (121). Yine de İspanya (%5) (128), Çin (%8) (129) ve Amerika (%15) (109) gibi bazı ülkelerde daha yüksek prevalanslar tespit edilmiştir. Çalışmamızda kinolon direnci saptanan 265 *E. coli* ve 35 *Klebsiella spp.* izolatında plazmid kaynaklı kinolon direnç genlerinden *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* genlerinin varlığı araştırılmış ve hiçbirinde saptanmamıştır.

Klebsiellae spp. izolatlarında *qnr* gen prevalansının *E. coli*'ye göre daha yüksek olduğu yapılan bazı çalışmalarda dikkat çekmektedir. Örneğin Fransa'da *E. coli* izolatlarının %0,63'ünde, *Klebsiellae spp.* izolatlarının %7'sinde *qnr* genleri bulunmuştur (124). Yine benzer şekilde Karah ve ark. *E. coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında *qnr* genlerinin prevalansını sırasıyla %0,7 ve %7,7 olarak bulmuştur (125). Bu durum Amerikada'ki (109), İspanya'daki (128) ve yakın zamanda Çin'deki (129) çalışmalarda da dikkat çekmiştir. Bu çalışmada değerlendirilen 300 izolatın sadece

35'inin *Klebsiella spp.* olmasının *qnr* tespitini olumsuz etkilemiş olabileceği düşünülmüştür.

Ülkemizde bu konuyla ilgili olarak az sayıda çalışma yapılmış olması ve yapılan bu çalışmalarda incelenen izolat sayısının kısıtlı olması nedeniyle *qnr* genlerinin sıklığı hakkında kısıtlı veri bulunmaktadır. Türkiye'de *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşları ile yapılmış çalışmalara bakıldığında *qnr* genlerinin, ya bu çalışmada olduğu gibi hiç bulunamadığını ya da düşük bildirim oranlarının bulunduğu görülmektedir (94, 96, 98). Türkiye'de ilk plazmit aracılı kinolon direnci geni, Nazik ve ark. tarafından 2005 yılında, nalidiksik asit dirençli ve GSBL pozitif olan 49 *Enterobacteriaceae* üyesinde araştırılmış, bir *Enterobacter cloacae* ve bir *C. freundii* suşunda bulunmuştur (96). Daha sonra İstanbul, Ankara, İzmir, Kuzey Doğu Anadolu gibi değişik merkezlerden yapılan çalışmalarda plazmitte kodlanan çeşitli direnç genleri bildirilmiştir (97, 100, 102, 103). Nazik ve ark. tarafından 2008 yılında yapılan diğer bir çalışmada, yoğun bakım hastalarından izole edilen 460 Gram negatif bakteride *qnr* genleri araştırılmış, üçü de GSBL pozitif ve siprofloksasine duyarlı olan üç (% 0.65) *E. cloacae* izolatında bir *qnrB1* ve iki *qnrS1* geni saptanmıştır (98). Poirel ve ark. Türkiye'de farklı hastanelerde izole edilen ve GSBL oluşturan 138 *E. coli* ve 110 *K. pneumoniae* izolatından sadece birinde *qnrB1* geni saptamışlardır (57). Öktem ve ark.ları kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* üyesi olan ve nalidiksik asite dirençli/orta duyarlı bulunan 356 izolatın altısında *qnrA*, üçünde *qnrS* geni saptamışlardır. *qnrA* saptanan suşların ikisinin ve *qnrS* saptanan suşların birinin GSBL pozitif belirlendiği bu çalışmada literatürle uyumsuz olarak GSBL negatif kökenlerdeki sıklık daha yüksek bulunmuştur (100). Yine Öktem ve ark.ları yakın zamanda yaptıkları bir başka çalışmada, hepsi kinolon dirençli ve GSBL pozitif kan kültürü izolatı olan 34 *E. coli*'nin birinde ve 44 *K. pneumoniae*'nin dördünde *qnrA* saptamışlar, *qnrA* pozitiflik oranını % 6.4 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada *qnrB* ve *qnrS* genleri bulunmamıştır (99). Aynı araştırmacılar diğer bir çalışma ile, diz protezi ameliyatı nedeniyle ortopedi ve travmatoloji kliniğinde yatmakta olan bir bayan hastanın doku örneğinden izole edilen bir *K. pneumoniae* kökeninde Türkiye'de ilk *qnrB* genini bildirmişlerdir (130). Nazik ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada 971'i *Enterobacteriaceae* üyesi, 73'ü non-fermentatif Gram negatif çomak olmak üzere

toplam 1044 izolatta üç *qnrA*, iki *qnrB*, bir *qnrS* geni bildirmiş, *qnr* genlerinin GSBL üreten izolatlarda daha sık olduğunu gözlemişlerdir (102).

Özgümüş ve ark.ları Türkiye'nin kuzeydoğu bölgesindeki on nehirden aldıkları su örneklerinden izole ettikleri 88 *E.coli* ve 35 *K.pneumoniae*'da birer *qnrS* geni bulmuşlardır. Araştırmacılar nehirler gibi çevresel kaynakların çoğul dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri için bir rezervuar rolü oynayabileceğini vurgulamışlardır (103).

Güven, sağlıklı çocukların dışkılarında kinolon dirençli *E. coli* taşıyıcılığı ve direnç mekanizmalarını saptamak amacıyla yaptığı araştırmada kinolon direnci saptadığı 15 *E. coli* izolatında *qnr* geni saptamamıştır (94).

Günümüzde direnç genlerini taşıyan plazmidlerin bakteriler arasında yayılmasıyla, direnç oranlarının artması ve yakın zamanda kinolonların klinikte sınırlı kullanım alanlarının kalmasından korkulmaktadır. Ayrıca invitro olarak kinolonlara duyarlı suşların da bu genleri taşıyabilmesi ve rutinde kullanılan tekniklerle kolayca saptanamaması, infeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasında güçlükler neden olabilecektir. Plazmit aracılı kinolon direnç genlerinin prevalansının takibi için çok merkezli çalışmaların yapılması, gelecekte kinolon grubu antibiyotiklerin tedavi protokollerinde yer alıyor olabilmesi açısından önemlidir. Avrupa'daki çalışmalarda genellikle *qnrS* ve *qnrB* genleri baskın görülmekle birlikte (124, 125, 131) İngiltere'de yapılmış olan bir çalışmada *qnrA* geni (132) İspanya'da yapılmış olan bir çalışmada ise *qnrA* geni yüksek oranda tespit edilmiştir (128).

Türkiye'de *E. coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarıyla yapılan çalışmalara bakıldığında *qnrA*'nın, *qnrS* ve *qnrB* genlerine göre daha yüksek oranda görüldüğü, *qnrS* ve *qnrB* genlerininse birbirine yakın oranlarda görüldüğü gözlenmektedir.

***Aac(6')-Ib-cr* Geni**

Plazmid geçişli direnç genlerinden diğeri, siprofloksasin ve norfloksasin gibi piperazinil grubu taşıyan kinolonların enzimatik inaktivasyonudur. *aac(6')-Ib* geni kanamisin, tobramisin ve amikasin direncine neden olan bir aminoglikozit asetiltransferazı kodlamaktadır. Bu genin bir varyantı olan *aac(6')-Ib-cr* geni ise,

aac(6')-Ib' den Trp102Arg ve Asp179Tyr farklılığı göstermektedir. Enzim bu şekilde siprofloksasini asetilleme yetisi kazanmaktadır *Qnr* ve *aac(6')-Ib-cr* aynı hücrede birlikte bulunduklarında *qnr*'nin yalnız başına yaptığından dört kat daha fazla MİK artışı oluşmakta, duyarlılık bakımından klinik breakpoint değerlerine (1 µg/ml) yaklaşılmaktadır. Bunun yanı sıra *aac(6')-Ib-cr*'nin yalnız bulunması, siprofloksasine maruz kalma durumunda oluşacak kromozomal mutasyon sıklığını arttırmaktadır (133).

Yapılan çalışmalarda *aac(6')-Ib-cr* varyantının *qnr* pozitif izolatlarda *qnr* negatiflere göre daha çok bulunduğu gösterilmiştir. Çin'de Jiang ve ark. *qnr* pozitiflerde *aac(6')-Ib-cr* oranını %55,2, *qnr* negatiflerde ise %6 olarak bulmuşlar ve bu durumun *aac(6')-Ib-cr* ve *qnr* genlerinin aynı plazmid üzerinde birlikte aktarılmalarıyla açıklanabileceğini söylemişlerdir. (129) Yine aynı şekilde Karah ve ark. da *aac(6')-Ib-cr* oranını *qnr* pozitif türlerde (%50) *qnr* negatiflere (%14,8) göre yüksek olarak bulmuşlardır (125).

Türkiye'de *aac(6')-Ib-cr* geninin araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Poirel ve ark. Türkiye'de GSBL oluşturan 138 *E. coli* ve 110 *K. pneumoniae* suşuyla yaptığı bir çalışmada *aac(6')-Ib-cr* genlerinin sıklığını araştırmışlar GSBL oluşturan izolatların (n:50) % 78'inde bulunduğunu göstermişlerdir (57) Nazik ve ark. ikisi *qnrB*-pozitif *K. pneumoniae*, biri *qnrA* pozitif *E. coli* olmak üzere üç suşta *aac(6')-Ib-cr* geni saptamışlardır (124). Bizim çalışmamızda *E. coli* izolatlarının 99'unda (%37.4), *K. pneumoniae* izolatlarının dördünde (%12.1) *aac(6')-Ib* geni belirlenmiştir. *K. oxytoca* izolatlarında bu gen bölgesi bulunmamıştır.

Karah ve ark.ları saptadıkları *aac(6')-Ib*'lerin %92'sini, Jiang ve ark.ları %58'ini, Robicsek ve ark.ları % 84'ünü, Samuelsen ve ark. ise hepsini *aac(6')-Ib-cr* varyantı olarak bulmuşlardır (129, 133, 134). İlginç olarak bazı suşlarda hem vahşi tip *aac(6')-Ib* hem de *-cr* varyantının bir arada bulunabildiğini gösteren çalışmalar vardır (117,133). Çalışmamızda öncelikle *aac(6')-Ib* genine bakılmıştır. *E. coli* izolatlarının 99'unda (%37.4), *K. pneumoniae* izolatlarının dördünde (%12.1) *aac(6')-Ib* geni belirlenmiştir. *K. oxytoca* izolatlarında ise bu gen bölgesi bulunmamıştır. *aac(6')-Ib* pozitif olan suşlar arasında *aac(6')-Ib-cr* varyantların olup olmadığının *BtsCI* restriksiyon enzimi ile daha sonra araştırılması planlanmıştır.

Çalışmamızda GSBL üretimi ile *aac(6')-Ib* gen varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). *aac(6')-Ib* geni saptanan izolatlar incelendiğinde tobramisin ve gentamisin direnci istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Bu izolatlarda trimetoprim-sulfametoksazole azalmış duyarlılık tespit edilmiş, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,485$). *aac(6')-Ib* pozitif türlerin ek olarak trimetoprim-sulfamethoxazol'e de azalmış duyarlılık göstermesi *aac(6')-Ib-cr* nin genellikle kompleks integronlarda bulunması (35) ve bu integronların 3'-CS bölgelerinin *sul1* geni kodlaması (135) ile açıklanmaktadır.

Geniş spektrum ve iyi biyoyararlanım özelliklerine sahip olan kinolon grubu antibiyotikler yoğun olarak kullanılmaya devam edildikçe, direnç artışı önemli bir sorun olmayı sürdürecektir ve gelecekteki çalışmalar için önemini koruyacaktır. Topoizomeraaz genlerinde kinolon direncini tanımlayan bölgelerdeki aminoasit değişiklikleri ve bunun dirence olan etkisi üzerine oldukça ilerleme kaydedilmiş olsa da, özellikle aktif pompa sistemlerinin bakteri hücreindeki önemi üzerine ilgi gösterilmesi, farklı ve üretken çalışmalar yapılmasını sağlayacaktır. Güçlü kinolon pompa inhibitörlerinin geliştirilmesi ve kinolon ile tedavi gören hastalarda güvenle kullanımının sağlanabilmesi önemli avantajlar sunabilecektir. Plazmid aktarımlı kinolon direnci henüz düşük düzeylerde bildiriliyor olsa da, plazmid ile aktarılan diğer direnç mekanizmalarından edinilen tecrübeler, bunun gelecekte bizim için baş edilmesi güç bir sorun oluşturacağını göstermektedir.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamızda nalidiksik aside direnç oranları *E. coli* için %52, *Klebsiella spp.* için %27.5 olarak bulunmuştur.
2. Nalidiksik aside dirençli/orta duyarlı olan izolatların, diğer izolatlara göre, ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, sefalotin, sefepim, sefotaksim, sefuroksim, sefoksitin, gentamisin, tobramisin, amikasin, trimetoprim-sülfometoksazol antibiyotiklerine karşı istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha dirençli oldukları saptanmıştır.
3. İzolatların tümünde %36.1 GSBL üretimi (*E.coli* %37.4, *Klebsiella spp* % 30.8) belirlenmiştir. Nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda GSBL üretimi (%83.3), duyarlı olanlara göre (%16.7) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
4. GyrA aminoasit dizisi belirlenen izolatların hepsinde QRDR olarak tanımlanan Ala67-Gly106 arasında çift mutasyon (Ser83Leu ile birlikte Asp87Asn veya Asp87Tyr) gözlenmiştir. Yedi izolatta *gyrA* bölgesinde QRDR bölgesi dışında 162. kodonda lizin yerine glutamin (Lys162Gln) değişimi belirlenmiştir. ParC aminoasit dizisi belirlenen izolatların ikisinde (%1.3) mutasyon bulunmamıştır. Geri kalan 75 izolatın hepsinde 80. kodonda serin yerine izolösin (Ser80Ile) geçişi olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 43'ünde (%57.3) ilave bir mutasyon olarak, 84. kodonda glutamat yerine 35 izolatta valin (Glu84Val), beş izolatta glisin (Glu84Gly), üç izolatta ise alanin (Glu84Ala) geçişi şeklinde olduğu belirlenmiştir.
5. *E. coli* izolatlarının 99'unda (%37.4), *K. pneumoniae* izolatlarının dördünde (%12.1) *aac(6')-Ib* geni belirlenmiştir. *K. oxytoca* izolatlarında bu gen bölgesi bulunmamıştır *aac(6')-Ib* geni saptanan *E. coli* izolatlarında tobramisin ve gentamisin direnci istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur Bu izolatlarda belirlenen trimetoprim-sulfametoksazole azalmış duyarlılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *aac(6')-Ib* geni saptanan izolatlarda GSBL üretimi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
6. İzolatlarda *qnr* geni bulunmamıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? J Antimicrob Chemother, 46: 11-24, 2000.
2. Dündar D, Willke A, Sonmez G. İdrar yolu infeksiyonu etkenleri ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Klimik Derg, 21(1): 7-11, 2008.
3. Jacoby GA. Mechanisms of Resistance to Quinolones CID, 41: 120-126, 2005
4. Li XZ. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. Int J Antimicrob Agents, 25: 453-463, 2005.
5. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother, 51: 3354-60, 2007.
6. Eisenstein BI, Zaleznik DF. Enterobacteriaceae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Churchill Livingstone Philadelphia, 2294-2310, 2000.
7. Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yulu N. Extended spectrum beta-lactamase saptanmasında E testi ile çift disk sinerji yöntemlerinin karşılaştırılması. İnfek Derg, 9:93, 1995.
8. Özkan C, Oldacay M, Erdem G. Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu β -laktamaz sıklığı. ANKEM Derg, 16: 65-8, 2002.
9. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, et al. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. J Med Pharm Chem, 5: 1063-8, 1962.
10. Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. J Antimicrob Chemother, 51(Suppl 1):13-20, 2003.

11. Topçu AW, Koç MM. Kinolonlar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Kitabevi; 341-353, 2008
12. Bambeke FV, Michot JM, Eldere JV, Tulkens PM. Quinolones in 2005: *m* update. Clin Microbiol Infect, 11: 256, 2005.
13. Anderson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. J Antimicrob Chemother, 51:S1-11, 2003.
14. Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. J Antimicrob Chemother, 51 Suppl S1: S29–35, 2003.
15. Gellert M, Mizuuchi K, O’Dea MH, Nash HA. DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci.,USA, 73:3872-76, 1976.
16. (www.epfl.ch/.../course_files/stasiak)
17. Ball P. The quinolones, history and review. In: Andriole VT, ed. The quinolones, 2nd ed. Boston: Academic Press, 1-28, 1998.
18. Hooper DC. Quinolones. In: Gl, JE, Dolin R (eds) Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone; 451, 2005.
19. Andriole V.T. The Quinolones: Past, Present, and Future. Clinical Infectious Diseases, 41:S113–9, 2005.
20. Barnard FY, Maxwell A. Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser83 and Asp87. Antimicrob Agents Chemother, 45: 1994-2000, 2001.
21. Vila J. Fluoroquinolone resistance. In: White DG, Alekshun MN, McDermott PF, Eds. Frontiers in Antimicrobial Resistance: a Tribute to Stuart B. Levy. ASM Press, Washington, D.C; 39: pp.41-52, 2005.
22. Hooper DC. Mechanisms of quinolone resistance. In: Hooper DC, Rubinstein E, eds. Quinolone antimicrobial agents. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, Press: 41–67, 2003.

23. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents*; 25: 358-373, 2005.
24. Lindgren KP, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 3222-32, 2003.
25. Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40: 879-85, 1996.
26. Chaniotaki, S., P. Giakouppi, L. S. Tzouveleakis, D. Panagiotakos, M. Kozanitou, G. Petrikos, A. Avlami, the WHONET Study Group, and A. C. Vatopoulos. 2004. Quinolone resistance among *Escherichia coli* strains from community-acquired urinary tract infections in Greece. *Clin. Microbiol. Infect*, 10: 75-78.
27. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother*; 51: 1109-17, 2003.
28. Kaatz, GW, Moudgal VV, Seo SM. Identification and characterization of a novel efflux-related multidrug resistance phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 833-838, 2002.
29. Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, et al. Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolonereliant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 699–701, 1997.
30. Martí'nez-Martí'nez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351:797–9, 1998.
31. Martí'nez-Martí'nez L, Pascual A, Garcí'a I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother*, 51: 1037–9, 2003.

32. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 5638–42, 2002.
33. Tran J, Jacoby GA, Hooper DC. The plasmid-mediated protein Qnr protects topoisomerase IV from ciprofloxacin inhibition and interacts with the ParE subunit [abstract C1-604]. In: Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Chicago). Washington, DC: American Society for Microbiology, 71, 2003
34. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 118–25, 2005.
35. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 2242–8, 2003.
36. Rodríguez-Martínez JM, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC type β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*, 52: 703–6, 2003.
37. Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:1295-9, 2004.
38. Robicsek A, Sahm DF, Jacoby G, Hooper DC. Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 3001-3, 2005.
39. Wiegand I, Khalaf N, Al-Agamy MHM, Wiedemann B. First detection of the transferable quinolone resistance determinant in clinical *Providencia stuartii* strains in Egypt. *Clin Microbiol Infect*, 10s3:64, 2004.

40. Kim SH, Kwak Y, Lee M, Kim N, Jeong J, Kim Y. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *E. coli* from Korea [abstract C2-1711]. In: Program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Washington, DC). Washington, DC: American Society for Microbiology, 119, 2004.
41. Paauw A, Fluit AC, Verhoef J, Leverstein-VanHall MA. A major outbreak with plasmid-mediated, qnr encoded, quinolone resistance [abstract C2-1898]. In: Program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Washington, DC). Washington, DC: American Society for Microbiology, 125, 2004.
42. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum b-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis, 30:473–8, 2000.
43. Martinez-Martinez L, Eliecer Cano M, Manuel Rodriguez-Martinez J, Calvo J, Pascual A: Plasmid-mediated quinolone resistance, Expert Rev Anti Infect, 6(5):685-711, 2008.
44. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC: The world-wide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance, Lancet Infect Dis, 6(10):629-40, 2006
45. <http://www.lahey.org/qnrstudies/>
46. Hata M, Suzuki M, Matsumoto M et al: Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b, Antimicrob Agents Chemother, 49(2):801-3, 2005.
47. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D et al: qnr gene nomenclature, Antimicrob Agents Chemother, 52(7):2297-9, 2006.
48. Wang M, Guo Q, Xu X, et al: New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*, Antimicrob Agents Chemother, 53(5):1892-7, 2009.

49. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM: qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin, *Antimicrob Agents Chemother*, 53(2): 603-8, 2009.
50. Fonseca EL, Dos Santos Freitas F, Vieira VV, Vicente AC. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1129-31, 2008.
51. Lapierre L, Cornejo J, Borie C, Toro C, San Martin B. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons incommensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. *Microbial Drug Resistance*, 14,265–272, 2008.
52. Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Warren RE, Livermore DM, Woodford N. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 β -lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*, 58: 665–668, 2006.
53. Coque TM, Novais A, Carattoli A. Dissemination of clonally-related *Escherichia coli* strains expressing the extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*, 14: 195-200, 2008.
54. Perichon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 2464-69, 2007.
55. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(10):3801-4, 2008.
56. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 2007.

57. Poirel L, Gür D, Minarini L, Arslan U, Nordmann P: Molecular epidemiology of plasmid mediated quinolone resistance determinants in extended spectrum beta-lactamase producing *E.coli* and *K.pneumoniae* isolates from Turkey, 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, P1527, Barcelona, 2008.
58. Velasco C, Rodriguez-Martinez JM, Briaies A, DiazdeAlba P, Calvo J, Pascual A. Smaqnr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother*, (doi: 10.1093/jac/dkp424):1-4, 2009.
59. Garau J, Xercavins M, Rodriguez-Carballeira M, Gomez-Vera JR, Coll I, Vidal D, Llovet T, Ruiz-Bremon A: Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 2736-41, 1999.
60. Livermore DM, James D, Reacher M et al: Trends in the fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in Enterobacteriaceae from bacteremias, England and Wales, 1990-1999, *Emerg Infect Dis*, 8(5):473-8, 2002.
61. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report: Data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004, *Am J Infect Control*, 32: 470-85, 2004.
62. <http://www.rivm.nl/earss/database>
63. Gür D, Hascelik G, Aydin N, Telli M, Gültekin M, Ogülnç D ve ark. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007, *J.Chemother*, 2009.
64. Manges AR, Tabor H, Tellis P, et al. Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that causes urinary tract infections. *Emerg infect Dis*, 14: 1575-83, 2008.
65. Jones GL, Warren RE, Skidmore SJ, Davies VA, Gibreel T, Upton M. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 62: 1245-51, 2008.

66. Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP. Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15.J Antimicrob Chemother, 62(2):284-8, 2008.
67. <http://www.rivm.nl/earss/armed/below.html>
68. Yıldırım M, İdris Şahin İ, ÖKSÜZ Ş, Özdemir D, Güçlü E, Acar S, Şencan İ. Üropatojen *Escherichia coli* suşlarında bazı oral antibiyotiklere direnç ve dirençle ilişkili risk faktörleri. ANKEM Derg, 23(1):1-7, 2009.
69. Köksal F, Sirekbasan S, Ak K, Küçükbaşmacı Ö, Samastı M. Kan kültürlerinden izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-Laktamaz oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin prevalansı ve antimikrobiyal direnç patternleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 39 (1-2): 31-35, 2009.
70. Iraz M. Malatya Devlet Hastanesi'nde klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitifliği ile antibiyotik duyarlılığı. ANKEM Derg, 23(4):161-165, 2009.
71. Yılmaz N, Ağuş N, Köse Ş, Yurtsever SG.,Öner Ö. Geniş spektrumlu beta-laktamaz Salgılayan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının ertapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 39 (3-4): 80-84, 2009
72. Albayrak N, Kaya Ş. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimleri ve antibiyotik direnç oranları. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 39 (1-2): 16-21, 2009.
73. Rifaioğlu MM, Yıldırım A, Başok EK, Keskin SK, Özgüneş N, Tokuç R. Son dört yıl içerisinde idrar kültürlerinden izole edilen bakterilere karşı gelişen antibiyotik direncindeki değişim. Türk Üroloji Dergisi, 35(3):201-209, 2009.
74. Öztürk E, Kaya A.D, Göçmen F, Arslan E. Toplum kaynaklı idrar yolu infeksiyonu etkeni olan *Escherichia coli* izolatlarının fosfomisin ile idrar yolu infeksiyonlarında sık kullanılan antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg, 22(2): 81-84, 2008.

75. Köken G, Aşık G, Çiftçi İH, Çetinkaya Z, Aktepe O.C, Yılmaz M. Toplum kökenli üriner sistem infeksiyonu etkeni *Escherichia coli* suşlarında fosfomisin trometamol etkinliği. ANKEM Derg, 22(1):23-27, 2008.
76. Kalem F, Gündem NS, Arslan U, Tuncer İ. İdrar örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında antimikrobiyal duyarlılığı. ANKEM Derg, 22(4):193-197, 2008.
77. Temiz H, Akkoç H, Gül K. Laboratuvarımızda İdrar Kültürlerinden İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerde Antibiyotiklere Direnç. Dicle Tıp Dergisi; 35(4): 234-239, 2008.
78. Küçükbayrak A, Behçet M, Güler S, Özdemir D. Üriner semptomu olan poliklinik hastalarının idrarında üreyen *E.coli* suşlarının antibiyotik duyarlılığı. Tıp Araştırmaları Dergisi, 4(1):18-21, 2006.
79. Güler Ö, Aktaş O, Uslu H. Klinik örneklerden izole edilen bakterilerde beta-laktamaz varlığının ve çeşitli antibiyotik gruplarına karşı duyarlılıklarının araştırılması. ANKEM Derg, 22(2):72-80, 2008
80. Güdücüoğlu H, Baykal S, İzci H, Berktaş M. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının antibiyotiklere direnci. ANKEM Derg, 21(3):155-160, 2007.
81. Rad AY, Bilge S, Fidan A. Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının siprofloksasin ve diğer antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının karşılaştırılması. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 65 (3): 115-119, 2008.
82. Özyurt M, Haznedaroğlu T, Şahiner F, Öncül O, Ceylan S, Ardiç N, Erdemoğlu A. İstanbul'da bir araştırma hastanesinde 2004-2006 yılları arasında izole edilen toplumdan kazanılmış üropatojen *Escherichia coli* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri. Mikrobiyol Bul, 42(3):537, 2008.

83. Koçoğlu E, Karabay O, Koç İnce N, Özkardeş F, Yıldırım R. Toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve bazı antibiyotiklere direnç sıklığının araştırılması. ANKEM Derg, 21(1):5-9, 2007.
84. Gönüllü N, Canberk MB, Filiz Ö, Altınkum S, Küçükbasmacı Ö, Aygün G, Altaş K. Çeşitli klinik örneklerden üretilen *Escherichia coli* kökenlerinde antibiyotik duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri. ANKEM Derg, 22(2):64-68, 2008.
85. Afşar İ, Gönül B, Şener AG, Türker M. *Escherichia coli*'nin Klinik İzolatlarının Fosfomisin trometamol ve diğer Antibiyotiklere in-vitro Duyarlılığı. ANKEM Derg, 19(2):77-79, 2005
86. Sumer Z, Coşkun F, Vahaboglu H, Bakir M. The resistance of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections. Adv Ther, 22: 419-423, 2005
87. Pullukçu H, Işıkgöz Taşbakan M, Aydemir Ş, Sipahi OR, Turhan A, Özinel MA, Ulusoy S. İdrar kültürlerinden soyutlanan bakteriler ve çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıklarının değerlendirilmesi. ANKEM Derg, 20(1): 26-30, 2006.
88. Şahin İ, Şencan İ, Kaya D, Aynur Gülcan A, Şükrü Öksüz Ş. Hastane infeksiyonu etkeni üropatojen *Escherichia coli* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumu. ANKEM Derg 18 (4):193-195, 2004.
89. Bayraktar B, Özcan N, Borahan, Ba arı F, Bulut E: Yatan ve ayakta hastalardan izole edilen üriner sistem infeksiyonu etkeni Gram negatif çomaklarda antibiyotiklere direnç. ANKEM Derg, 18: 137, 2004.
90. Beğendik F, Külah C, Tayşi B N, Eroğlu Ö, Özlü N. İdrar kültürlerinden izole edilen gram negatif bakterilerde antibiyotik duyarlılığı ve GSBL oranları. P13-09, XI. KLİMİK Kongresi, 2003.
91. Akan Ö.A. İbn-i Sina Hastanesinde poliklinik idrar örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* izolatlarının ilk seçenек antibiyotiklere direnç durumu. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası; 56(3):147-150, 2003.

92. Kibar F, Yaman A, Dünder İH. İdrar Örneklerinden İzole Edilen Bakteriler ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 34: 162-170, 2004.
93. Eraç B, Gill A, Amyes SGB, Gülay Z. Siprofloksasine dirençli *Escherichia coli* suşlarında Gyr A mutasyonlarının incelenmesi. Mikrobiyoloji Bülteni, 37: 125-130, 2003.
94. Güven Ö. Sağlıklı çocuklarda dışkıda kinolon dirençli *Escherichia coli* taşıyıcılığının ve direnç mekanizmalarının saptanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi, 2007.
95. Nazik H, Öngen B. Türkiye’de plazmit aracılı kinolon direnci. ANKEM Derg, 24(1):46-54, 2010.
96. Nazik H, Poirel L, Nordmann P: Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in Enterobacteriaceae in Turkey, Antimicrob Agents Chemother, 49(5):2146-7, 2005.
97. Avsaroglu MD, Helmuth R, Junker E et al: Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by qnrS1 in Salmonella enterica serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin, J Antimicrob Chemother, 60(5):1146-50, 2007.
98. Nazik H, Öngen B, Kuvat N: Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance among isolates obtained in a Turkish intensive care unit. Jpn J Infect Dis, 61(4):310-2, 2008.
99. Oktem IM, Gulay Z, Bicmen M, Gur D, HITIT Project Study Group: qnrA prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive Enterobacteriaceae isolates from Turkey. Jpn J Infect Dis, 61(1):13-7, 2008.
100. Öktem MA, Biçmen M, Gülay Z: Kan kültürlerinden soyutlanan Enterobacteriaceae izolatlarında plazmit ile ilişkili kinolon direnci genlerinin saptanması, 8. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, Program ve Özet Kitabı, P.28, Türk Mikrobiyoloji Cem. yayını No.57, İstanbul, 2008.

101. Öngen B, Nazik H. Investigation of plasmid mediated quinolone resistance among *Campylobacter* strains. *Farmaci e Terapia*, 25(3-4):37-39, 2008.
102. Nazik H, İlktaç M, Öngen B: Prevalence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* (in *qnr*-positive isolates) among the ESBL-positive and/or ciprofloxacin-resistant isolates in Turkey. *J Chemother*, 21(2):219-21, 2009.
103. Özgumus OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N: Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in Northern Turkey. *J Microbiol*, 47(1):19-27, 2009.
104. Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol. 1, 8th ed. ASM Press, Washington, DC, 2003.
105. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
106. CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard 7th ed*. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
107. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A: Extended-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*; hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Inf Dis*, 10: 867, 1988.
108. Touati A, Said Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, Champs C. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27: 397–402, 2006.

109. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm D.F, Jacoby G.A, Hooper D.C. *Qnr* Prevalence in Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates From the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 2872–74, 2006.
110. Park C.H, Robicsek A, Jacoby G.A, Sahm D, and Hooper D.C. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 3953-3955, 2006.
111. Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother*, 51: 1001-1005, 2003.
112. Vila J, Ruiz J, Goni P, Jimenez de Anta MT. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 40: 491-493,1996.
113. Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ Moleküler mikrobiyoloji tanı prensipleri ve uygulamalar, (Ed'ler) Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Palme yayıncılık. Ankara, 2006.
114. Durmaz R. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler. In: Uygulamalı Molekül Mikrobiyoloji. R Durmaz (ed).p. 229-235, 2001.
115. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp*, 41: 95-98, 1999.
116. BLAST. National Center for Biotechnology Information. (İnternette) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
117. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae, *Am J Infect Control*,34(5 Suppl 1):S20-8, 2006.

118. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, et al. Risk factors for fluoroquinolone resistance in nosocomial *E.coli* and *K. pneumoniae* infections. Arch Intern Med, 2469-77, 2002.
119. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC et al. Clinical epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to broad-spectrum cephalosporin resistance in bloodstream infections caused by Enterobacter species. Infect Control Hosp Epidemiol, 26:88-92, 2005.
120. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect, 14: 144-53, 2008.
121. Pitout JD, Wei Y, Church DL, Gregson DB. Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')-Ib-cr*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 61(5): 999-1002, 2008.
122. Eraksoy H, Basustaoglu A, Korten V, et al. Susceptibility of bacterial isolates from Turkey-a report from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program. J Chemother, 19(6):650-7, 2007.
123. Fendukly F, Karlsson I, Hanson H. S, Kronvall G, and Dornbusch K. Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin, Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavia, 111: 857-866, 2003.
124. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital. Antimicrob Agents Chemother, 50: 3992-7, 2006.

125. Karah N. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in Norwegian and Swedish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Department of Microbiology and Virology Institute of Medical Biology University of Tromsø. Master's thesis in medical microbiology, 2008.
126. Cavaco L.M, Hansen D.S, Friis-Møller A, Aarestrup F.M, Hasman H, and Frimodt-Møller N. First detection of plasmid-mediated quinolone resistance (*qnrA* and *qnrS*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans in Scandinavia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59: 804–805, 2007.
127. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrB4 in France from an *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate Coexpressing a QnrS1 Determinant. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51:2652-2653, 2007.
128. Lavilla S, González-López J.J, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa M.N, Bartolomé R.M, Carattoli A, and Prats G. 2008. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum β -lactamase producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61(2): 291-295, 2008.
129. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, and Li L. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-ib-cr* in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Advance Access, doi:10.1093/jac/dkn063, 2008.
130. Öktem MA, Biçmen M, Gülay Z: Türkiye'den ilk *qnrB* olgusu, 8. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, Program ve Özet Kitabı, P.29, Türk Mikrobiyoloji Cem. yayını No.57, İstanbul (2008).
131. Chen YT, Shu HY, Li LH, Liao TL, Wu KM, Shiau YR, Yan JJ, Su IJ, Tsai SF, and Lauderdale TL. Complete Nucleotide Sequence of pK245, a 98-Kilobase Plasmid Conferring Quinolone Resistance and Extended-Spectrum- β -Lactamase

Activity in a Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 50: 3861–3866, 2006.

132. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures in Liverpool, UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 56: 1115–17, 2005.

133. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G.A, Macielag M, Abbanat D, Bush K, and Hooper D.C. Fluoroquinolone modifying enzyme: a novel adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nature Medicine. 12: 83-88, 2006.

134. Samuelsen O, Vorobieva V, Naseer U, Poirer L, Walsh TR, Nordmann P, Bazhukova, Semenova, Haldorsen B, Aasnas B, Karah N, Sundsfjord A. Identification of *aac(6')-Ib-cr* in Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* From Russia. 17th ASM General Meeting, Toronto, Canada, 2007.

135. Bennett PM. Integrins and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43:1-4, 1999.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
ZONGULDAK KARAELMAS ÜNİVERSİTESİ
Uygulama ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu

TOPLANTI TARİHİ : 26.02.2009
TOPLANTI NO : 2009/03

KARARLAR :

13- Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığının “Kinolon dirençli Escherichia Coli ve Klebsiella spp. Şuşlarında Direnç Genlerinin Araştırılması” konulu başvurusunun Etik kurallara uygun olduğuna,

Oy Birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R


Doç.Dr. Banu D. GÜN
Hastane Etik Kurulu Başkanı