

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* KLİNİK İZOLATLARINDA
PLAZMİT ARACILI KİNOLON DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
DR. YELİZ TANRIVERDİ ÇAYCI

SAMSUN - 2012

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* KLİNİK İZOLATLARINDA
PLAZMİT ARACILI KİNOLON DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. YELİZ TANRIVERDİ ÇAYCI

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. AHMET YILMAZ ÇOBAN

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından
PYO.TIP.1904.10.018 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN - 2012

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, eğitimime katkıda bulunan tez danışmanım Doç. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca uzmanlık eğitimim boyunca beni destekleyen ve eğitimime katkıda bulunan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat Günaydın'a, Prof. Dr. Belma Durupınar'a, Prof. Dr. Murat Hökelek'e, Prof. Dr. Cafer Eroğlu'na, Prof. Dr. Asuman Birinci'ye, Yrd. Doç. Dr. Çağatay Acuner'e, Yrd. Doç. Dr. Adil Karadağ'a ve Yrd. Doç. Dr. Keramettin Yanık'a teşekkür ederim. Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına, saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve mikrobiyoloji laboratuvar personeline teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam sırasında ihtiyaç duyduğumuz da deneyim ve bilgilerini bizimle paylaşan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Bülent Bozdoğan'a çok teşekkür ederim.

Çalışmamızda kullanılmak üzere bize gönderdikleri *qnr* pozitif suşlar dolayısıyla sayın George A. Jacoby, sayın Patrice Nordmann ve sayın Minggui Wang'a teşekkürlerimizi bildiririz.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman yanımda olan canım anne ve babama çok teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği zamandan bu yana sevgisini ve desteğini her zaman hissettiren ve beni hep destekleyen canım eşim Özgür Çaycı'ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1-GİRİŞ VE AMAÇ	1
2-GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.1.1.Morfoloji	3
2.1.2.Kültür ve Biyokimyasal özellikleri	4
2.1.3.Epidemiyoloji	4
2.1.4.Patogenez	5
2.1.5.Virulans Faktörleri	5
2.1.5.1.Alginat	5
2.1.5.2.Elastaz	6
2.1.5.3.Adhezinler	6
2.1.5.4.Pyosiyanin	6
2.1.5.5.Endotoksin	6
2.1.5.6.Ekzotoksin A	7
2.1.5.7.Ekzoenzim S	7
2.1.5.8.Alkalin proteaz	7
2.1.5.9.Fosfolipaz C	7
2.1.5.10.Rhamnolipit	8
2.1.6.Klinik	8
2.1.6.1.Akciğer enfeksiyonları	8

2.1.6.2.Endokardit	8
2.1.6.3.Bakteriyemi	9
2.1.6.4.Üriner sistem enfeksiyonları	9
2.1.6.5.Göz enfeksiyonları	9
2.1.6.6.Kulak enfeksiyonları	9
2.1.6.7.Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları	10
2.1.6.8.Kemik ve eklem enfeksiyonları	10
2.1.6.9.Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları	10
2.1.6.10.Gastrointestinal enfeksiyonlar	10
2.1.7. <i>P. aeruginosa</i> enfeksiyonları tedavisi	11
2.1.8.Antimikrobiyal direnç	11
2.1.8.1.İntrensek direnç	11
2.1.8.1.1.Enzimatik inaktivasyon	12
2.1.8.1.2.Efluks pompaları	12
2.1.8.1.3.Dış membran protein defektleri	13
2.1.8.1.4.Hedefte oluşan değişiklikler	13
2.2.Kinolonlar	14
2.2.1.Kimyasal yapı	14
2.2.2.Etki mekanizması	16
2.2.3.Antimikrobiyal aktivite	17
2.2.4.Farmakokinetik	19
2.2.5.Kinolonlara karşı direnç mekanizmaları	19
2.2.5.1.Hedefte meydana gelen değişiklikler	19
2.2.5.2.Azalmış birikim	20
2.2.5.3.Plazmite bağlı kinolon direnci	21
2.2.5.3.1.Qnr genleri	21
2.2.5.3.2.Aac(6')-Ib-cr geni	24

2.2.5.3.3.QepA geni	24
2.2.5.3.4.OqxAB geni	25
2.3.Plazmitler	25
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	27
3.1.Bakterilerin tanımlanması	27
3.2.Bakterilerin antimikrobiyal duyarlılığının tanımlanması	27
3.2.1.Vitek2 kompakt otomatize sistemi	27
3.2.2.Phoenix otomatize sistemi	27
3.2.3.Disk difüzyon yöntemi	28
3.3.Moleküler yöntemler	28
3.3.1. <i>P.aeruginosa</i> bakterilerinin DNA ekstraksiyonu	28
3.3.2.Qnr genlerinin multipleks PZR yöntemiyle araştırılması	29
3.3.2.1.Kullanılan primerler	29
3.3.2.2.PZR optimizasyonu	29
a.MgCl ₂ optimizasyonu	30
b.Primer bağlanma ısı optimizasyonu	30
c.DNA optimizasyonu	31
d.Qnr genlerinin multipleks PZR yöntemiyle amplifikasyonu	32
e.DNA elektroforezi	33
3.3.3.QepA gen bölgesinin PZR yöntemiyle araştırılması	33
a.QepA geninin PZR yöntemiyle amplifikasyonu	33
b.DNA elektroforezi	34
3.3.4.Aac(6')-Ib-cr gen bölgesinin PZR yöntemiyle araştırılması	35
a. Aac(6')-Ib geninin PZR yöntemiyle amplifikasyonu	35
b.DNA elektroforezi	36

c. Aac(6 ⁺)- Ib-cr gen bölgesi için sekans işlemi	36
4.BULGULAR	37
4.1. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildikleri örnek türleri ve klinik servisler	37
4.2. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığı	39
4.2.1.Kinolon duyarlılığı	39
4.2.2.Amikasin, gentamisin ve tobramisin duyarlılıkları	39
4.3.Qnr genlerinin multipleks PZR sonuçları	40
4.3.1.Magnezyum klorür optimizasyon sonuçları	40
4.3.2.Primer bağlanma ısı optimizasyon sonuçları	40
4.3.3.DNA optimizasyon sonuçları	41
4.3.4.Multipleks PZR sonuçları	41
4.4.QepA geni PZR işlemi	41
4.4.1.QepA PZR işlem sonuçları	42
4.5.Aac(6 ⁺)-Ib-cr gen bölgesinin PZR işlemi	42
4.5.1.PZR işlemi ve sekans sonuçları	43
5.TARTIŞMA	46
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	58

TABLO LİSTESİ

- Tablo I. Kinolonların sınıflandırılması.
- Tablo II. Çalışmada kullanılan primer çiftleri.
- Tablo III. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan suşlar.
- Tablo IV. Qnr magnezyun klorür optimizasyonu.
- Tablo V. Qnr primer bağlanma ısı optimizasyonu.
- Tablo VI. DNA optimizasyonu.
- Tablo VII. Qnr PZR reaksiyon karışımı.
- Tablo VIII. Qnr PZR amplifikasyon programı.
- Tablo IX. QepA geni primer dizisi.
- Tablo X. QepA PZR reaksiyon karışımı.
- Tablo XI. QepA amplifikasyon programı.
- Tablo XII. Aac(6')-Ib geni primer dizisi
- Tablo XIII. Aac(6')-Ib geni sekans için primer dizisi.
- Tablo XIV. Aac(6')-Ib PZR reaksiyon karışımı.
- Tablo XV. Aac(6')-Ib PZR amplifikasyon programı.
- Tablo XVI. *Pseudomonas aeruginosa* izolatalarının izole edildiği örnek türleri dağılımı.
- Tablo XVII. *Pseudomonas aeruginosa* örneklerinin izole edildiği kliniklerin dağılımı.
- Tablo XVIII. Türkiye'den bildirilen plazmit aracılı kinolon direnci çalışmaları.

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Pseudomonas aeruginosa'nın morfolojik yapısı.
- Şekil 2. Kinolonların kimyasal yapısı.
- Şekil 3. DNA ve topoizomerez IV ve kinolon kompleksi.
- Şekil 4. Konjugasyon ile gen aktarımı.
- Şekil 5. Örnek türlerinin dağılımını gösteren grafik.
- Şekil 6. Örneklerin gönderildiği servislerin dağılımını gösteren grafik.
- Şekil 7. Qnr PZR magnezyum klorür optimizasyon jel görüntüsü.
- Şekil 8. Qnr pozitif kontrol suşlarıyla multipleks PZR jel görüntüsü.
- Şekil 9. QepA pozitif kontrol suşuyla yapılan PZR jel görüntüsü.
- Şekil 10. Aac(6')-Ib pozitif kontrol suşuyla yapılan PZR jel görüntüsü.
- Şekil 11. Aac(6')-Ib pozitif suşların PZR jel görüntüsü.
- Şekil 12. P229 nolu izolatın aac(6')-Ib sekans görüntüsü.
- Şekil 13. P213 nolu izolatın aac(6')-Ib sekans görüntüsü.
- Şekil 14. P2 nolu izolatın aac(6')-Ib sekans görüntüsü.
- Şekil 15. P64 nolu izolatın aac(6')-Ib sekans görüntüsü.
- Şekil 16. P65 nolu izolatın aac(6')-Ib sekans görüntüsü.
- Şekil 17. P71 nolu izolatın aac(6')-Ib sekans görüntüsü.

SİMGE VE KISALTMALAR

AIDS: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu

BOS: Beyin omurilik sıvısı

Bp: Baz çifti

CLSI: Clinical and Laboratory Standarts Institute

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksinükleotid trifosfat

EF-2: Elongasyon faktör-2

EMB: Eosine-Methylen Blue

GSBL: Genislemis spektrumlu beta-laktamaz

MHA: Mueller hinton agar

MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon

PBP: Penisilin bağlayan protein

pH: Hidrojen iyonu

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

TBE: Tris-borik asit-EDTA

TE: Tris-EDTA

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa doğada yaygın olarak bulunmakta ve ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmaktadır. Birçok antibakteriyel ajana karşı intrensek dirence sahip olması nedeniyle *P. aeruginosa* tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır. Kinolonlar özellikle siprofloksasin tedavide kullanılan önemli ajanlardandır. Kinolonlar DNA sentezinde görev alan DNA giraz ve topoizomerez IV enzimlerine etki göstermektedir. Yıllar içerisinde genişleyen spektrumları nedeniyle tüm dünyada oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Yaygın kullanımları nedeniyle kinolonlara karşı direnç gelişmesi de önemli bir sorun olarak görülmektedir. Kinolonlara direnç sıklıkla kromozomal mutasyonla olmaktadır. Ancak son yıllarda *Enterobacteriaceae* ailesinde plazmit aracılı kinolon direnci de saptanmıştır. Bu genler *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qepA* ve *aac(6')-Ib-cr* genleri olarak bilinmektedir. *P. aeruginosa* izolatlarında plazmit aracılı kinolon direnci araştırılmış ancak henüz pozitif izolat bulunamamıştır. Çalışmamızda klinik örneklerden izole *P. aeruginosa* izolatlarında plazmit aracılı kinolon direncine neden olan genler polimeraz zincir yöntemiyle araştırıldı. Çalışmamız sonucunda *qnr* genleri ve *qepA* geni taşıyan *P. aeruginosa* izolatı saptanamamıştır. *Aac(6')-Ib* pozitif 6 izolat tespit edilmiş ve kinolon direncine neden olan *aac(6')-Ib-cr* varyantının tespiti amacıyla sekans işlemi uygulanmıştır. Sekans işlemi sonucunda izolatların hiçbirinin *aac(6')-Ib-cr* varyantı olmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda *qnr*, *qepA* ve *aac(6')-Ib-cr* genleri tespit edilmemiş olmasına rağmen, hayvan kökenli *P. putida* ve *P. fluorescens* izolatlarında *qnr* genleri izole edilmiş olması nedeniyle yıllar içerisinde bu genlerin önemli insan patojeni olan *P. aeruginosa* izolatlarından izole edilmesi şaşırtıcı olmayacaktır.

Anahtar kelimeler; *Pseudomonas aeruginosa*, kinolonlar, *qnr*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr*

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is found commonly in environment and causes serious nosocomial infections. *P. aeruginosa* has intrinsic resistant mechanisms to many antibacterial agents because of this its treatment has some difficulties. Quinolones, especially ciprofloxacin are the important agents that used in treatment of infections due to *Pseudomonas* infections. Quinolones have effects to the DNA gyrase and topoisomerase IV enzymes which have role in the DNA synthesis. They have been used worldwide due to their extended spectrum by years. And resistance to quinolones becomes an important problem for their worldwide use. Chromosomal mutation is the main mechanism of resistance to quinolones. But in recent years plasmid-mediated quinolone resistance was detected in *Enterobacteriaceae* family. These genes are known as qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qnrD, qepA and aac(6')-Ib-cr. Plasmid-mediated quinolones resistance was investigated in *P. aeruginosa* isolates but any positive isolate was not found. In our study, plasmid mediated quinolone resistance was investigated in clinical isolates of *P. aeruginosa* by polymerase chain reaction. We couldn't find any qnr and qepA in *P. aeruginosa* isolates. Six *P. aeruginosa* isolates were found positive for aac(6')-Ib and they were sequenced for the detection of aac(6')-Ib-cr variant.

In our study we could not detect any positive strain for qnr, qepA and aac(6')-Ib-cr genes but qnr genes was detected from a *P. putida* and *P. fluorescens* strains that isolated from animals therefore it will not be interesting if in time these genes are isolated from an important human pathogen *P. aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, quinolones, qnr, qepA, aac(6')-Ib-cr

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Pseudomonas aeruginosa doğada yaygın olarak bulunan gram negatif bir basildir. İmmun sistemi sağlam bireylerde nadiren hastalık etkeni olmakla birlikte, immün sistemi zayıflamış bireylerde, AIDS hastalarında, yanık hastalarında ve kistik fibroz hastalarında ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Erdem, 1999). Antibiyotiklerle ve dezenfektanlarla kontrolü oldukça zordur (Lambert, 2002). Ayrıca *P. aeruginosa*'nın bazı antibiyotiklere karşı intrensek dirence sahip olması tedavisinde güçlüklereden neden olmaktadır. İntrensek dirençli olduğu antibiyotikler; ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/ klavulanik asit, 1. kuşak sefalosporinler, 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, nalidiksik asit ve trimetoprimdir (Livermore, 2002). Antibiyotiklere yüksek oranda direnç göstermesinin nedenleri arasında; düşük hücre duvar geçirgenliği, efluks pompa sistemleri, direnci düzenleyen genlerde kromozomal mutasyonlar ve plazmid, transpozonlar ve bakteriyofajlarla direnç genlerinin aktarımı yer almaktadır (Lambert, 2002).

Kinolonlar klinik kullanımda betalaktam ajanlara rakip olan sentetik antibakteriyel ajanlardır. Yirmi yıllık bir süre içerisinde sadece üriner sistem enfeksiyonlarında endike olan bir grup olmaktan çıkıp yapılan kimyasal gelişmelerle tüm dünyada 1997 yılında 3.04 milyar dolar satışa ulaşan antibakteriyeller olmuşlardır (Appelbaum ve Hunter, 2000). Kinolonlar bugün hem gram pozitif hem gram negatif hem de anaerob etkenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadırlar (Hooper, 2005). Kinolonlardan siprofloksasin *P. aeruginosa*'ya karşı en etkili ajanlardandır (Arda, 2008). Kinolonlar DNA giraz ve topoizomera IV enzimini inhibe ederek bakterisidal etki göstermektedirler (Li ve Nikado, 2005). Kinolonlara karşı direnç gelişimi DNA giraz (gyr A ve gyr B) ve topoizomera IV (par C ve par E) da meydana gelen mutasyonlar ve efluks pompa sistemlerinde hiperaktivasyon ve hücre zarında geçirgenliğin azalmasına bağlı hücre içinde ilaç birikiminin azalması ve plazmitle aktarılan qnr, qepA ve aac(6')-Ib- cr genleri sonucu olmaktadır (Cattoir ve Nordmann, 2009). Diğer direnç mekanizmaları uzun yıllardır bilinmesine karşılık plazmitle meydana gelen direnç ilk olarak 1998 yılında bir *Klebsiella pneumoniae* izolatında bildirilmiş ve plazmitle aktarılan bu protein 'qnr' olarak adlandırılmıştır (Martinez ve ark., 1998). Zaman içerisinde *Enterobacteriaceae* ailesinde farklı qnr genleri de tespit edilmiş ve ilk olarak saptanan

gen qnrA olarak isimlendirilmiştir. Bugün için qnrA'ya ek olarak qnrB, qnrC, qnrS ve qnrD genleri de tespit edilmiştir (Stratilevitz ve ark., 2009). Qnr geni ile kodlanan proteinlerin DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerine bağlanarak onları kinolonların etkisinden koruduğu düşünülmektedir (Cattoir ve Nordmann, 2009). Yamane ve ark. 2007 yılında Japonya'da efluks pompası aktivasyonuna yola açan ve plazmitle aktarılan qepA genini tespit etmişlerdir (Yamane ve ark., 2007). Plazmitle aktarılan, kinolon direncine neden olan ve aslında aminoglikozit asetiltransferaz olan aac(6')-Ib enziminin varyantı olan aac(6')-Ib-cr proteini de ilk olarak qnrA pozitif bir *E. coli* izolatında tespit edilmiştir (Robiscek ve ark., 2006).

Plazmitle aktarılan kinolon direncine neden olan bu genler bugüne kadar *Enterobacteriaceae* ailesine ait birçok bakteride tespit edilmiş olmasına karşın *P. aeruginosa* izolatlarında bu genler henüz tespit edilememiştir (Cattoir ve Nordmann, 2009; Stratilevitz ve ark., 2009). Araştırmalarımıza göre de hem qnr genlerinin hem de qepA ve aac(6')-Ib-cr genlerinin *P. aeruginosa* klinik izolatlarında araştırıldığı bir çalışma yoktur. Bizim bu çalışmada amacımız klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında bu gen bölgelerini polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa Pseudomonadaceae ailesi içinde yer alan aerobik nonfermentatif gram negatif basildir (Pollack, 2005). İlk kez 1882’de Gessard tarafından yara enfeksiyonunda mavi irin etkeni olarak gösterilmiştir (Bilgehan, 2000). Önemli bir nozokomiyal patojendir ve nozokomiyal enfeksiyonların %9-10’nundan sorumlu tutulmaktadır. Birçok antimikrobiyal ajana doğal dirençli olması ve bazılarına da sonradan direnç kazanması nedeniyle tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır (Hancock ve Speert, 2000).

2.1.1. Morfoloji

Gram negatif nonfermentatif basildir (Erdem, 1999). 1.5-3 µm uzunluğunda, 0.5-0.8 µm genişliğinde, düz veya hafif kıvrık yapıda, sporsuzdur. Hücrenin dış yüzeyinde kapsüle benzeyen glikokaliks tabakası bulunur. Bu tabakanın D-mannuronik ve L- glukronik asitler başta olmak üzere poliüronik asitlerden oluşan aljinik asit yapısında polisakkaritten oluştuğu saptanmıştır (Pratt ve Kolter, 1999). Tek veya çoklu polar flajelleri ile genellikle hareketlidir. Rutinde kullanılan boyama yöntemleriyle kolay boyanır (Erdem, 1999).



<http://www.visualphotos.com/image/1x7466919>

Şekil 1. *P. aeruginosa*'nın morfolojik yapısı.

2.1.2. Kültür ve Biyokimyasal özellikler

Genel kullanım besiyerlerinde kolaylıkla 30-37°C'de ürer. 42°C'de üreyebilme *P. aeruginosa*'nın diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılmasını sağlar. Ancak 4°C'de üreyemez. Zorunlu aeroptur ancak nitratın son elektron alıcısı olmasının bağlı olarak anaerob olarak da üreyebilirler (Bilgehan, 2000; Pollack, 2005; Murray, 2010).

Sıvı besiyerinde yüzeyde zar yaparak ürer. Kanlı agarda beta hemoliz yapan, metalik renk oluşturan koloniler yapar. Kültürlerinde tatlımsı, aromatik meyve, üzüm ya da trimetil amin kokusuna benzer bir koku oluşur (Bilgehan, 2000).

P. aeruginosa kökenlerinin çoğu pigment oluşturur. Bunlardan en sık rastlananları yeşil renkli floresein ve başka hiçbir bakteri türünde bulunmayan, sadece *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu ve tanısında önemli olan ve bakteri hücrelerinin demir alımında da rolü olan mavi-yeşil renkli piyosiyenin pigmentidir. *P. aeruginosa* ayrıca pyorubin ve pyomelanin pigmentleri de yapabilir (Baron 1990; Pollack, 2005).

P. aeruginosa karbonhidratları fermente etmez. Glikoz ve ksiloz gibi şekerlere oksidatif yoldan etki gösterirken maltoz, laktoz ve sakkaroz etkisizdirler. Oksidaz olumlu olmaları ile *Enterobacteriaceae*'lerden ayrılırlar. İndol ve H₂S üretmez. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer olumsuzdurlar. Potasyum siyanüre dirençlidirler, nitratları nitritlere çevirirler. Katalaz ve L-arginin dihidrolaz oluştururlar, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturmazlar (Erdem, 1999; Bilgehan, 2000; Brooks 2001).

2.1.3. Epidemiyoloji

P. aeruginosa doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Çok az besin maddesine gereksinim duyması ve farklı çevresel koşullara dayanıklı olması fırsatçı patojen olarak enfeksiyon etkeni olmasında önemli rol oynamaktadır. Nemli ortamlarda üremeyi sevmesi hastane ortamında bulunan solunum cihazları, temizlik solüsyonları, dezenfektanlar, yataklar, çarşafklar, gazlı bezler gibi ortamlara yerleşmesini kolaylaştırmaktadır (Haris ve ark., 1999; Erdem, 1999).

P. aeruginosa nadiren sağlıklı insanları kolonize eder. Kolonizasyon sıklıkla deri, nazal mukoza, boğaz ve dışkıdadır. Hastanede yatan hastalarda ise taşıyıcılık oranı oldukça artmaktadır. Özellikle yanıklı hastaların derilerinde, solunum cihazına

bağlı hastaların alt solunum yollarında ve kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sistemlerinde yerleşirler. Geniş spektrumlu antibiyotik alan hastalarda taşıyıcılık % 50'lere ulaşmakta ve invaziv hastalık için zemin oluşturmaktadır (Blondel-Hill, 2008; Erdem, 1999).

P. aeruginosa hastane kaynaklı enfeksiyonlarda izole edilen en sık dördüncü nozokomiyal patojendir. Ayrıca nozokomiyal pnömonilerin en sık ikinci nedeni, üriner sistem enfeksiyonlarının en sık üçüncü nedeni ve cerrahi yara enfeksiyonlarının da en sık dördüncü nedendir (Pollack, 2005).

2.1.4. Patogenez

Doğada yaygın olarak bulunmasına rağmen sağlıklı bireylerde nadiren hastalık oluşturan fırsatçı bir patojendir. Deri ve mukoza bütünlüğünün bozulması, damar içi kateter veya üriner kateter varlığı, endotrakeal tüp varlığı, nötropeni, hipogammaglobülinemi, kompleman eksikliği gibi durumlar *P. aeruginosa* enfeksiyonları için zemin hazırlayıcı faktörler olarak görülmektedir. *P. aeruginosa* hem invaziv hem de toksinojeniktir. Enfeksiyonların oluşum aşamasında üç basamak olduğu düşünülmektedir; bunlar, bakteriyel tutunma ve kolonizasyon, lokal yerleşme ve sistemik hastalık tablosudur (Erdem, 1999; Pollack, 2005; Blondel-Hill, 2008; Salyers ve Witt, 1994).

2.1.5. Virulans Faktörleri

P. aeruginosa fırsatçı bir patojen olarak kabul edilmekte ve hastalık oluşumunda çeşitli yapıları ve hücre dışı enzimleri etkili olmaktadır. Hastalık oluşmasında konağa bağlı faktörler de enfeksiyon gelişimini etkilemektedir (Murray, 2010).

2.1.5.1. Alginat

Bakterinin akciğer epitelyal hücre yüzeyine tutunup biyofilm oluşturmasını bu sayede de hem immun sistem hem de antibiyotiklerin etkisinden kurtulmasını sağlayan kapsüler polisakkarittir. Alginat polisakkaritini kontrol eden genlerin kronik solunum yolları hastalığı olan veya kistik fibrozlu hastalarda aktive oldukları görülmüştür (Murray, 2010; Bergagne, 2004).

2.1.5.2. Elastaz

İmmunglobulin ve kompleman bileşiklerini parçalar ve nötrofil aktivitesini inhibe eder (Winn, 2006). LasA (serin proteaz) ve LasB (çinko metalloproteaz) olmak üzere iki enzim sinerjik olarak çalışarak elastini indirger ve elastin içeren dokularda akciğer parankiminde hasara ve hemorajik lezyonlara (ektima gangrenozum) neden olurlar. Kronik Pseudomonas enfeksiyonlarında LasA ve LasB enzimlerine karşı antikor oluşur (Murray, 2010).

2.1.5.3. Adhezinler

P. aeruginosa'da pili içeren ve içermeyen olmak üzere iki tip yüzey adezin proteini tanımlanmıştır. Pili içeren yüzey adezinleri epitelyal yüzeylere tutunmayı sağlarken, pili içermeyen adezinler ise musine bağlanmayı sağlarlar (Salyers ve Witt, 1994). *P. aeruginosa* ayrıca nöraminidaz üretir. Nöraminidaz, sialik asiti uzaklaştırarak GM-1 reseptörlerine tutunmayı kolaylaştırıcı etkiye sahiptir (Erdem, 1999; Bergagne, 2004).

2.1.5.4. Pyosiyanin

P. aeruginosa tarafından oluşturulan mavi renkli pigment olan pyosiyanin oksijenin toksik formları olan süperoksit ve hidrojen peroksit oluşmasını katalize eder (Murray, 2010). Solunum yolları epitelinin silyalı yapısını bozar ve akciğer dokusunda oksidatif hasara neden olur (Winn, 2006). Ayrıca antibiyotik etkisiyle *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Mycobacterium smegmatis*'e karşı bakterisidal, *Brucella* spp., *Shigella* spp., *Bacillus anthracis*, *Bordetella* spp. ve *Vibrio* spp.'ye karşı ise bakteriyostatik etki gösterir (Gillespie, 2006).

2.1.5.5. Endotoksin

P. aeruginosa'da bulunan endotoksin diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi önemli bir hücre duvar antijenidir. Endotoksinin lipit A komponenti sepsis tablosunda çeşitli biyolojik etkilerden sorumludur (Murray, 2010; Baron, 1990).

2.1.5.6. Ekzotosin A

P. aeruginosa'nın patojenik suşları tarafından oluşturulan en önemli virulans faktörlerinden biridir. Ekzotoksin A 613 aminoasitten oluşan tek bir polipeptit zincirdir (Erdem, 1999). Ökaryotik hücrelerde elongasyon faktör 2'yi (EF2) inhibe ederek protein sentezi sırasında peptit zincirinin uzamasını engelleyerek etki gösterir. Etkisi *Corynebacterium diphtheriae*'nin oluşturduğu toksine benzemekle beraber yapısal ve immunolojik olarak farklıdır. Yanık hastalarında dermatonekroz oluşumundan, oküler enfeksiyonlarda korneal hasardan ve kronik pulmoner hastalıklarda doku hasarından sorumludur (Murray, 2010; Pollack, 2005). Saflaştırılmış ekzotoksin A'nın küçük dozlarda dahi hayvanlar için letal olduğu görülmüştür (Erdem, 1999).

2.1.5.7. Ekzoenzim S

İki enzimde ekstrasellüler toksindir. Adenosin difosfat ribosiltransferaz aktivitesi gösterir. Hedef proteini henüz tanımlanamamıştır (Erdem, 1999). Bakterinin yayılmasını ve invazyonunu kolaylaştırır, nekroza neden olur (Murray, 2010). Tip III sekresyon sistemi ile transmembran proteinleri yoluyla ökaryotik hücrelerin içine girerek etki gösterir (Ohl, 2002; Murray, 2010). Ekzoenzim S salgılamayan mutant suşların deneysel yanık ve kronik akciğer enfeksiyonlu hastalarda daha az virulan oldukları görülmüştür (Erdem, 1999).

2.1.5.8. Alkalın proteaz

Elastaza benzer şekilde doku hasarına neden olur ve *P. aeruginosa*'nın yayılımını kolaylaştırır. Konağın bağışık yanıtına etki eder (Murray, 2010; Bergagne, 2004).

2.1.5.9. Fosfolipaz C

Isı labil bir hemolizin olup lipit ve lesitin yapısını bozarak doku hasarı yapar (Murray, 2010). Sitoplazmik membranda ve pulmoner surfaktanda hasara neden olur, opsonini inaktive eder (Winn, 2006).

2.1.5.10. Rhamnolipit

Isıya dayanıklı hemolizindir. Lesitin içeren dokularda hasara neden olur ve solunum yollarındaki mukosiliyer aktiviteyi bozar (Pier, 2005).

2.1.6. Klinik

P. aeruginosa, yüzeysel bir deri enfeksiyonundan fulminan sepsise kadar değişen çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir. Hastane enfeksiyonları arasında da ilk sıralarda yer almaktadır (Blondel-Hill, 2008).

2.1.6.1. Akciğer enfeksiyonları

P. aeruginosa'nın neden olduğu alt solunum yolları enfeksiyonları asemptomatik kolonizasyon veya benign trakeobronşitten ciddi nekrotizan bronkopnömoniye kadar değişkenlik göstermektedir (Pollack, 2005; Murray, 2010). *P. aeruginosa* sıklıkla lokal solunum yolları veya sistemik savunma sisteminde hasar olduğunda enfeksiyona neden olur. Nozokomiyal pnömonilerde mortalite oranı oldukça yüksektir (Pollack, 2005; Blondel-Hill, 2008).

Kistik fibrozlu hastalarda *P. aeruginosa*'ya bağlı solunum yolu enfeksiyonları sık görülmektedir (Murray, 2010). Çünkü bu hastalarda *P. aeruginosa* kistik fibroz epitel hücrelerine tutunmada özel bir yatkınlığa sahiptir ve konağa bir kez yerleştiğinde, kalıcı hale gelerek zaman içinde nonmukoid formdan mukoid forma dönüşerek kötüleşen prognoza neden olur (Blondel-Hill, 2008).

Bakteriyemik pnömoni ise sıklıkla nütropenik olan hemotopoetik sistem malignensisi olan hastalarda görülür ve sıklıkla pulmoner ve ekstrapulmoner ilk belirti ve semptomların görülmesinden sonra 3-4 gün içinde ölümle sonuçlanır (Pollack, 2005).

2.1.6.2. Endokardit

P. aeruginosa intravenöz ilaç kullananların doğal kalp kapaklarında ve prostetik kalp kapağı bulunan hastaların protez kalp kapaklarında infektif endokardite neden olurlar (Erdem, 1999). Sıklıkla triküspit kapakta enfeksiyona neden olur (Pollack, 2005).

2.1.6.3. Bakteriyemi

P. aeruginosa bakteriyemisi hastane kaynaklı primer gram negatif bakteriyemiler içinde dördüncü sırada yer almaktadır (Erdem, 1999). Ancak sıklıkla immun sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyona neden olması ve sahip olduğu virulans faktörleri nedeniyle mortalite oranı daha yüksektir. Primer enfeksiyon bölgeleri sıklıkla alt solunum yolları, üriner sistem, deri ve yumuşak dokular, kan damarı ve çevresi yapılarıdır. Karakteristik deri lezyonu olan ektima gangrenozumun saptanması anlamlıdır (Erdem, 1999; Murray, 2010; Pollack, 2005)

2.1.6.4. Üriner sistem enfeksiyonları

Sıklıkla hastane kaynaklı enfeksiyonlardır. *P. aeruginosa* hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonları içinde 3. sırada yer almaktadır. Üriner katerizasyon, cerrahi ve böbrek transplantasyonu enfeksiyon gelişimini kolaylaştırır. (Blondel-Hill, 2008; Erdem, 1999).

2.1.6.5. Göz enfeksiyonları

Korneada meydana gelen bir travma sonrası (kontakt lens sıyrıkları, göz yüzeyinde meydana gelen çizik) *P. aeruginosa* ile kontamine sularla temas sonrası göz enfeksiyonu oluşmaktadır (Murray, 2010). Korneal ülser oluşumu sonrası tedavi edilmezse görme kaybına kadar gidebilecek ciddi enfeksiyonlara neden olur (Pollack, 2005).

2.1.6.6. Kulak enfeksiyonları

P. aeruginosa sağlıklı bireylerin kulaklarında nadiren bulunmakla beraber zedelenme, maserasyon, inflamasyon ve nemlilik meydana getiren durumlarda kulağa yerleşebilir. Dış kulak yolu enfeksiyonlarının başlıca bakteriyel patojenlerindedir. Sıklıkla yüzücülerde 'yüzücü kulağı' olarak adlandırılan enfeksiyona neden olur (Pollack, 2005). Malign dış kulak yolu enfeksiyonu ise diabetli ve yaşlı hastalarda görülür. Yaşamın ilk 6 haftasında orta kulak enfeksiyonuna da neden olur (Blondel- Hill, 2008; Murray, 2010). Dış kulak ve orta kulak enfeksiyonunu takiben mastoidit gelişebilir (Erdem, 1999).

2.1.6.7. Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları

P. aeruginosa menenjit ve beyin absesine neden olur. Santral sinir sistemi enfeksiyonu; (1) kulak, mastoid ve paranasal sinüslardaki enfeksiyonu takiben, (2) kafa travması, cerrahi veya invaziv diagnostik işlemler sonucu beyine veya subaraknoid boşluğa direkt inokülasyon, (3) üriner sistem, akciğer veya endokardiyum gibi bir odaktan bakteriyemik yayılım sonucu meydana gelmektedir (Pollack, 2005; Erdem, 1999).

P. aeruginosa kanserli hastalarda *Listeria monocytogenes*'ten sonra en sık ikinci santral sinir sistemi enfeksiyonu etkenidir (Pollack, 2005).

2.1.6.8. Kemik ve eklem enfeksiyonları

P. aeruginosa'nın neden olduğu kemik ve eklem enfeksiyonları primer bir odaktan hematogen yayılım yoluyla veya komşu bir odaktan yayılım sonucu oluşmaktadır (Vahaboğlu, 2008). Hematojen yolla meydana gelen enfeksiyonlar sıklıkla intravenöz ilaç kullananlarda görülmektedir. Aynı zamanda penetran travma, cerrahi veya yumuşak doku enfeksiyonlarını takiben de oluşabilmektedir (Pier, 2005).

2.1.6.9. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

P. aeruginosa'nın neden olduğu deri ve yumuşak doku hastalıkları primer veya metastatik bir odaktan kaynaklanır. Bakteriyemi sırasında tipik olan ektima gangrenozum olarak adlandırılan deri lezyonları gelişebilir. Yine bakteriyemi sırasında subkutan nodüller, derin abseler, sellulit, veziküler ve püstüler lezyonlar da görülebilir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları lokalize veya yaygın olabilir. Predispozan faktörler olarak yanık, travma, dekübit ülserleri, dermatit ve vücuttaki nemli bölgeler (perineal bölge, yüzücü kulakları vb.) sayılabilir (Vahaboğlu, 2008; Pier, 2005).

2.1.6.10. Gastrointestinal enfeksiyonlar

P. aeruginosa gastrointestinal sistemin herhangi bir bölgesinde enfeksiyon meydana getirebilir. Çocuklarda orta şiddette diyareye neden olurken, infantlarda sıklıkla fatal nekrotizan enterokolitlere neden olabilmektedir. Benzer durum

nötropenik kanser hastalarında ileum, çekum ve kolonu içine alacak şekilde oluşmaktadır (Vahaboğlu, 2008).

2.1.7. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi

P. aeruginosa enfeksiyonlarının antimikrobiyal ajanlarla tedavisi güçlük göstermektedir. Çünkü; bakteri birçok antibiyotiğe, dış membran geçirgenliğinin azlığı, antimikrobiyal ajanları hücre dışına çıkaran aktif efluks pompa sistemlerine sahip olması ve kromozomal AmpC β -laktamaz enzimine sahip olması nedeniyle dirençlidir. Ayrıca sıklıkla immun sistemi baskılanmış konakta enfeksiyon meydana getirdiği için de konak antibiyotik aktivitesine yeterli yanıt oluşturamamaktadır (Lambert, 2002; Strateva ve Yordonov, 2009).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinde karboksipenisilinler (karbenisilin, tikarsilin), üreidopenisilinler (azlosilin, piperasilin), bazı 3.kuşak sefalosporinler (seftazidim, sefsulodin, sefaperozon), tüm 4. kuşak sefalosorinler, aztreonam, karbapenemler (imipenem, meropenem), kinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin), aminoglikozidler (gentamisin, tobramisin, amikasin), tetrasiklinler (tetrasiklin, doksisisiklin, minosiklin) kullanılmaktadır (Bilgehan, 2000; Erdem, 1999).

Antibiyotik tedavisi yanında enfeksiyon odağına göre infekte kalp kapaklarının ve vejetasyonların çıkarılması, absenin drenajı, yaranın debridmanı ve cerrahi işlemlerin de uygulanması gerekmektedir (Pollack, 2005).

2.1.8. Antimikrobiyal Direnç

2.1.8.1. İntrensek direnç

P. aeruginosa pek çok antibiyotiğe karşı intrensek dirence sahiptir. Bu antibiyotikler; ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/kluvulanik asit, 1.kuşak sefalosporinler, 2.kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, nalidiksik asit ve trimetoprimdir (Livermore, 2001). Bu dirençte rol oynayan başlıca mekanizmalar; betalaktamazlar, çeşitli efluks pompaları ve dış membran geçirgenliğinin azalmasıdır (Hancock, 2002; Blondel-Hill, 2008).

2.1.8.1.1. Enzimatik inaktivasyon

Betalaktam antibiyotiklere karşı kromozomal veya plazmit kaynaklı betalaktamazların üretimi sonucu direnç gelişmektedir. *P. aeruginosa*'da betalaktamazların kazanılması *Enterobacteriaceae*'da olduğu kadar sık değildir ancak giderek sıklığı artmakta ve çeşitlilik göstermektedir (Blondel-Hill, 2008; Livermore, 2002). En sık görülen betalaktamazlar PSE-1 ve PSE-4 enzimleridir (Hancock, 2000). Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar da *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır (Bonomo ve Szabo, 2006). OXA enzim ailesi (Ambler moleküler sınıf D) en sık *P. aeruginosa*'da saptanmaktadır. Ayrıca *P. aeruginosa*'da serinproteaz ve metalloenzimleri (Ambler moleküler sınıf B) aracılığıyla karbapenemlere direnç gelişmektedir (Livermore, 2002).

P. aeruginosa'da aminoglikozitlere karşı direnç sıklıkla enzimatik inaktivasyon yoluyla olmaktadır. Bu enzimler asetil, fosfat veya adenil gruplarının bu antibiyotiklerin amino ve hidroksil uçlarına eklenmesiyle inaktivasyona yol açmaktadırlar (Lambert, 2002). Aminoglikozit-modifiye edici enzimler *P. aeruginosa*'da 30 yılı aşkın süredir bilinmektedir ve gentamisin, tobramisin ve/veya amikasin'e karşı çeşitli kombinasyonlarda direnç meydana getirmektedirler (Bonomo ve Szabo, 2006; Miller ve ark., 1997). Bu enzimler sıklıkla diğer grup antimikrobiyallerde de dirence neden olan transpozon ve/veya integron tarafından kodlanmaktadırlar (Hancock, 1998).

2.1.8.1.2. Eflüks pompa sistemleri

Eflüks pompaları *P. aeruginosa*'da antibiyotiklere direnç gelişmesinde önemli mekanizmalardandır. Eflüks pompa sistemleri üç protein kısmından oluşmaktadır; sitoplazmik zar da yer alan enerji bağımlı bir pompa, dış membran porini ve her iki protein arasında ilişkiyi sağlayan bağlantılı bir proteindir (Lambert, 2002). *P. aeruginosa*'da farklı antibiyotik eflüks pompaları tanımlanmıştır. Bunlar MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexJK-OprM and MexEF-OprN eflüks pompalarıdır (Pool, 1996; Chuanchuen, 2002). MexAB-OprM tüm *P. aeruginosa* suşlarında yapısal olarak eksprese edilmektedir (Blondel-Hill, 2008). *nalB* (*mexR*), *nfxB* veya *nfxC* (*mexT*)'deki regülatuar mutasyonlar eflüks pompalarında aşırı ekspresyona neden olmaktadır (Hancock, 2000). MexAB-OprM

betalaktam antibiyotikler, kinolonlar ve bazı dezenfektanların dışarı atılmasında, MexXY-OprM aminoglikozitlerin, MexEF-OprN kinolonların ve karbapenemlerin, MexJK-OprM tetrasiklin ve eritromisin, MexCD-OprJ 4. kuşak sefalosporinlerin dışarı pompalanmasından sorumludur (Lambert, 2002; Chuanchuen ve ark., 2002). Siprofloksasinle önceden tedavi görmüş kistik fibroz hastalarının %80'inde efluks pompalarını aşırı üreten mutantlar saptanmıştır (Jalal ve ark., 2000).

2.1.8.1.3. Dış membran protein defektleri

P. aeruginosa'nın dış membranı birçok antibiyotiğin penetrasyonuna imkan vermemekte ancak betalaktam ve kinolonlar gibi küçük hidrofilik moleküllerin porin olarak adlandırılan aköz kanallar aracılığıyla geçişine imkan vermektedir. *P. aeruginosa*'da birçok farklı porin bulunmakta ve OprF tüm suşlarda bulunan başlıca porinlerden biridir. OprF bulunmayan mutantlar bildirilmiş olmasına rağmen antibiyotik direnciyle ilişkisi gösterilememiştir. OprD kaybı imipenem direncine neden olurken meropenem duyarlılığında azalmaya neden olmaktadır (Lambert, 2002; Bonomo ve Szabo, 2006).

Aminoglikozitler ve kolistin ise hücre içine porinler yoluyla değil membranın dış yüzündeki lipopolisakkarite bağlanarak girmektedirler. Lipopolisakkarit yapıyı bu antibiyotiklerin bağlanmasından koruyan OprH adlı dış membran proteininin aşırı ekspresyonu aminoglikozit ve kolistin direncine neden olmaktadır (Lambert 2002; Li ve ark., 2005; Poole, 2005).

Porinlerin azalmasına bağlı olarak kinolonların hücre içine alımında azalma meydana gelmekle beraber efluks pompalama sistemlerinin de bu mekanizma da etkili olduğu düşünülmektedir (Li ve Nikado, 2004).

2.1.8.1.4. Hedefte oluşan değişiklik

P. aeruginosa'da kinolonlara karşı oluşan direnç mekanizmalarından biri de topoizomeraz II (gyrA ve gyrB altüniteleri) ve topoizomeraz IV'de (parC ve parE) meydana gelen hedef mutasyonlardır (Hernandez ve ark., 2011).

Penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik olması sonucu betalaktamlara karşı direnç meydana geldiği belirtilmiştir. (Lambert, 2002).

2.2. Kinolonlar

Kinolonlar en sık kullanılan antibakteriyel ajanlar arasında yer almakta ve hem tıpta hem de veterinerlikte yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Cattoir ve ark., 2009). Bu grubun ilk üyesi 1962 yılında kullanıma giren nalidiksik asit olup 1,8-naphthyridine yapısındadır (Hooper, 2005). Nalidiksik asit antimalaryal bir ajan olan klorokinin sentez ve saflaştırma çalışması sırasında keşfedilmiştir (Ruiz, 2003). 1970'li yıllarda oksolinik asit ve sinoksasin kullanıma girmiştir (Hooper, 2005). Bu ajanların sadece gram negatif enterik basillerin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonlarında etkin olmaları kullanımlarını sınırlandırmıştır (Arda, 2008; Hooper, 2005). Ancak 1980'li yıllarda flor ve piperazinil deriveli kinolonların kullanıma girmesiyle etki spektrumu da genişlemiş ve kullanımları hızla yayılıp genişlemiştir (Hooper, 2005). Bu kinolonlar geniş etki spektrumu, iyi oral absorpsiyon ve iyi tolere edilmeleri nedeniyle klinikte tercih edilen ajanlar olmuşturlardır (Appelbaum ve Hunter, 2000).

2.2.1. Kimyasal yapı

Kinolonlar yapı olarak antibiyotik olmayıp tamamen sentetik olan saf kimyasal maddelerdir (Arda, 2008). Klinikte kullanılan bütün kinolonlar iki halkadan oluşmaktadır, ilk halkanın birinci pozisyonunda nitrojen, dördüncü pozisyonunda karbonil ve üçüncü pozisyonundaki karbon atomuna karboksil grubu eklidir. Birçok farklı iki halkalı yapısı mevcuttur. Ancak bunlardan en başarılı olanları ikinci halkada sekizinci pozisyonda karbon atomu içeren ve sekizinci pozisyonda nitrojen atomu içeren yapılardır (Wolfson ve Hooper, 1989)

Kinolon çekirdeğinde zaman içinde yapılan değişikliklerle antimikrobiyal aktivite ve farmakokinetik özelliklerde gelişmeler sağlanmıştır. Altıncı pozisyondaki karbon atomuna flor atomunun eklenmesiyle potens artırılmış, aynı zamanda yedinci pozisyondaki karbon atomuna piperazinil (siprofloksain, norfloksasin, enoksasin), metil-piperazinil (pefloksasin, ofloksasin, lomefloksasin, fleroksasin, temafloksasin, levofloksasin, grepafloksasin, gatifloksasin) veya dimetilpiperazinil (sparfloksasin) eklenmesiyle gram negatif etkinlik artırılmıştır (Hooper, 2005; Arda, 2008).

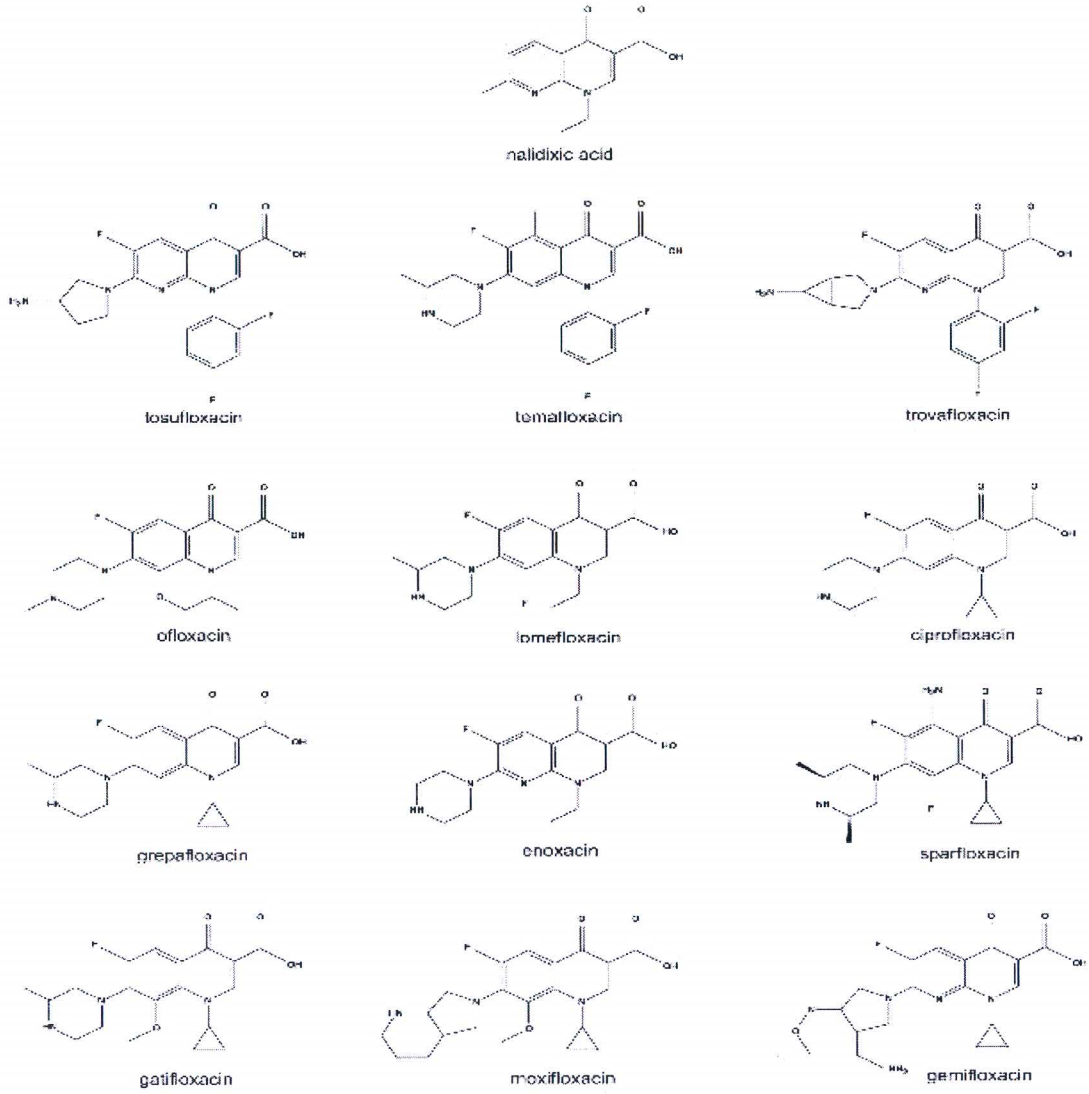
Yedinci pozisyondaki karbon atomuna pirolidinil eklenmesiyle (tosufloksasin, klinafloksasin, gemifloksasin) veya başka atomlar eklenmesiyle

(substituent) (trovafloksasin, moksifloksasin, sitafloksasin) gram pozitif bakterilere karşı etkinlik artmıştır. Sekizinci pozisyonundaki karbon atomuna ikinci flor atomunun eklenmesiyle emilim ve eliminasyon yarı ömrü ile birlikte fototoksisite riski de artmıştır (Hooper, 2005; Arda, 2008; Appelbaum ve Hunter, 2000).

Kinolonlar kimyasal yapı, antimikrobiyal aktivite ve klinik kullanım özelliklerine göre değişik şekilde sınıflandırılabilirler. Tablo I’de kinolonların sınıflandırılması belirtilmiştir. Şekil 2’de kinolonların kimyasal yapıları görülmektedir.

Tablo I. Kinolonların sınıflandırılması.

1.Kuşak	2.Kuşak	3.Kuşak	4.Kuşak
Nalidiksik asit	Siprofloksasin	Grepafloksasin	Klinofloksasin
Sinoksasin	Enoksasin	Levofloksasin	Gemifloksasin
Oksolinik asit	Floroksasin	Pozufloksasin	Moksifloksasin
Pipemidikasit	Nadifloksasin	Sparfloksasin	Gatifloksasin
Rosoksosin	Ofloksasin	Temafloksasin	Sitofloksasin
	Norfloksasin	Tosufloksasin	Travofloksasin
	Pefloksasin		Basifloksasin
	Rufloksasin		



<http://www.antimicrobe.org/d17tab.htm>

Şekil 2. Kinolonların kimyasal yapısı.

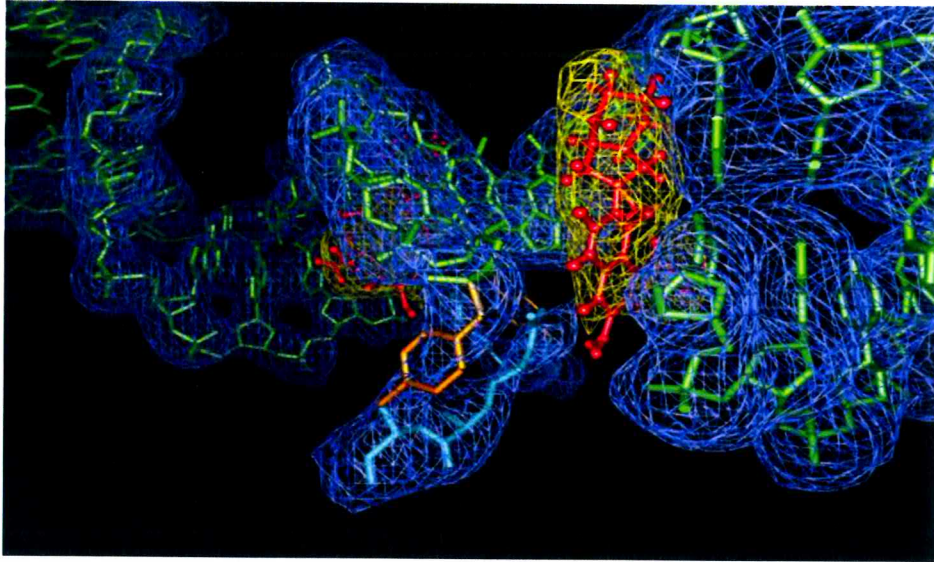
2.2.2. Etki mekanizması

Kinolonlar hızlı bir şekilde bakteriyel DNA sentezini inhibe ederek bakteri hücrelerinin de hızlı ölümüne neden olurlar (Andriole, 2005). Kinolonların hedefi tip II topoizomerazlar olan DNA giraz (topoizomeraz II) ve DNA topoizomeraz IV'tür. Tip II topoizomerazlar DNA segmentinin her iki ipliğini kesip aradan bir başka DNA segmentini geçiren ve sonrasında da onaran enzimlerdir. Bunlardan DNA giraz bu işlemleri DNA süper sarmalları oluşurken veya tam aksi şekilde süper sarmalları kaldırırken uygular. Bu sayede DNA replikasyonu sırasında, replikasyon çatalının önündeki süper sarmalları kaldırarak, DNA ipliklerinin kolayca birbirinden ayrılmasına olanak sağlamış olur. Topoizomeraz IV ise replikasyon sırasında birbirine

geçmiş durumda olan ipliklerinin birbirinden ayrılmasını ve hücre bölünmesi sırasında diğer hücrelere eşit şekilde dağılmasını sağlar (Wolfson ve Hooper, 1989; Drlica ve Zhao, 1997).

DNA giraz iki A ve iki B olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. Bu birimler *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından sentezlenmektedir. Topoizomeraz IV ise DNA giraz ile % 40 homoloji gösteren iki A alt birimi (*parC*) ve iki B alt biriminden (*parE*) oluşmaktadır (Cattoir ve ark., 2009; Drlica ve Zhao, 1997; Hooper, 2005).

Kinolonlar ilaç-enzim-DNA kompleksi oluşturarak topoizomerizasyonu engellerler böylece replikasyon çatalı, RNA polimeraz ve DNA helikazın önünde bariyer oluşturarak hücre ölümüyle sonuçlanacak olayların başlamasına neden olurlar. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki DNA giraz daha çok gram negatif bakterilerde direnç gelişimine neden olurken, topoizomeraz IV ise gram pozitif bakterilerde direnç gelişiminden sorumludur (Andriole, 2005; Hooper, 2000).



http://www.diamond.ac.uk/Home/Media/LatestNews/02_07_09a.html

Şekil 3. DNA ve topoizomeraz IV ve kinolon kompleksi.

2.2.3. Antimikrobiyal Aktivite

İlk kullanıma giren kinolon olan nalidiksik asit gram negatif enterik basillere karşı etkili ve bu patojenlerin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılmakta iken florokinolonlar nalidiksik asitin etki spektrumuna ek olarak gram pozitif koklar, atipik pnömoni etkeni olan bakteriler, *P. aeruginosa* ve

Mycobacterium türlerine karşı da etkinliğe sahiptirler (Ruiz, 2003; Hooper, 2005; Wolfson ve Hooper, 1989).

Toplum kaynaklı pnömoni etkeni olan *Streptococcus pneumoniae*'ya en etkili kinolonlar klinafloksasin, gemifloksasin ve sitafloksasindir. Yine gram pozitif bir kok olan *S. pyogenes*'e karşı da gemifloksasin ve sitafloksasin en etkili kinolonlardır. Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ve *S. epidermidis*'e karşı siprofloksasin ve ofloksasin orta derecede etkiliyken; klinafloksain, gatifloksasin, gemifloksasin, moksifloksasin, sitafloksasin ve travofloksasin daha etkili bulunmuştur (Appelbaum ve Hunter, 2000).

Atipik pnömoni etkeni olan *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamydia pneumoniae* ve genital patojenlar olan *C. trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* ve *M. hominis*'e karşı siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin, gatifloksasin, moxifloksasin ve gemifloksasin en etkili kinolonlardır (Hooper, 2005).

P. aeruginosa'ya karşı en etkili kinolon siprofloksasindir. Gatifloksasin, gemifloksasin, moksifloksasin ve travofloksasinin ise siprofloksasine yakın aktiviteye sahiptirler. *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Burkholderia* spp. ve *Stenotrophomonas* spp. türlerine karşı siprofloksasin, levofloksasin ve ofloksasin etkili olan kinolonlardır (Appelbaum ve Hunter, 2000).

Haemophilus spp, *Moraxella catarrhalis* ve *Neisseria* türlerine karşı neredeyse florokinolonların hepsi etkili olsa da siprofloksasin ve ofloksasin en etkili olan ajanlardır.

İlk florokinolonların anaerop antibakteriyel etkinliği az olsa da gatifloksasin, moksifloksasin, sitafloksasin ve travofloksasin anaeroblara en etkili kinolonlardır (Appelbaum ve Hunter, 2000; Wolfson ve Hooper, 1989; Hooper, 2005).

Kinolonların mikobakterilere karşı da etkinlikleri vardır. Siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin, gatifloksasin ve moksifloksasinin *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* ve *M. chelonae*'ye karşı etkilidirler. Ofloksasin ve pefloksasinin *M. leprae*'nin hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda etkili olduğu saptanmıştır (Hooper, 2005).

2.2.4. Farmokokinetik

Kinolonlar konsantrasyona bağımlı etkinlik gösterirler. Üst gastrointestinal sistemden oldukça iyi emilirler ve dozun alınımı takiben yaklaşık 1 ile 3 saat arasında serumda pik konsantrasyona ulaşırlar. Serum proteinlerine bağlanma oranı düşüktür ve %20 ile 50 arasındadır. Akciğer, prostat dokusu, safra, idrar, makrofaj ve nötrofillerde yüksek konsantrasyonlara ulaşırlar. Ancak tükürük, kemik ve inflamasyon varlığında dahi beyin omurilik sıvısına geçişleri iyi değildir. Kinolonların atılımı sıklıkla idrarla olmaktadır. Ancak sparfloksasin, moksifloksasin ve travofloksasinin atılımı karaciğerden olmaktadır (Turnidge, 1999; Andriole, 2005).

2.2.5. Kinolonlara karşı direnç mekanizmaları

Kinolonlar geniş spektrumlarına bağlı olarak yaygın kullanılmaktadırlar. Yapılan bir çalışmada siprofloksasinin dünya çapında en sık kullanılan antibakteriyel ajan olduğu belirtilmiştir (Acar ve Goldstein, 1997).

Kinolonlara direnç gelişimi üç ana mekanizma ile olmaktadır: i) kromozomal olarak kinolonların hedeflerinde meydana gelen değişiklikler, ii) membran geçirgenliğinde azalma ve/veya efluks pompa sistemlerinin aşırı çalışması nedeniyle azalmış birikim ve iii) plazmite bağlı direnç (Ruiz, 2003).

2.2.5.1. Hedefte meydana gelen değişiklik

Kinolonlar etkilerini DNA giraz ve topoizomeraz IV üzerinden yaparlar. DNA giraz tetramerik bir enzimdir ve gyrA ve gyrB tarafından kodlanan iki A alt ünitinden ve iki B alt ünitinden oluşmaktadır. Topoizomeraz IV'de parC ve parE genleri tarafından kodlanan iki A ve iki B alt ünitinden oluşmaktadır. Kinolonların hedefi gram pozitif bakterilerde topoizomeraz IV iken gram negatif bakterilerde ise hedef DNA giraz'dır (Ruiz, 2003). Ancak bazı çalışmalar göstermiştir ki sparfloksain ve nadifloksasin için gram pozitif bakterilerde etki DNA giraz üzerinden olabilmektedir (Pan ve Fisher, 1996; Takei ve ark., 2001). GryA'da meydana gelen değişiklikler daha sık olduğu için bu bölge kinolon direnci belirleyici bölge (QRDR-quinolone resistance determining region) olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge 67 ve 106 kodonları arasında yer almaktadır. Bu kodonların arasındaki bölgelerde oluşan

mutasyonlar kinolon direncine neden olmaktadır. QRDR'da meydana gelen tek bir mutasyon yüksek düzey nalidiksik asit direncine neden olurken, florokinolonlarda yüksek düzey dirence neden olmak için ek mutasyonlara ihtiyaç vardır. En sık mutasyon gryA geni 83. kodonunda olmaktadır. GryB geninde dirence neden olan mutasyonlar ise daha az sayıdadır. Topoizomerez IV'de mutasyonlar sıklıkla parC bölgesinde meydana gelmektedir. Gram negatif bakterilerde en sık mutasyonlar 80. ve 84. kodonlarda meydana gelmektedir. Gram pozitif bakterilerde de sıklıkla 79. ve 116. kodonlarda oluşmaktadır. Gram negatif bakterilerde parE geniyle ilişkili sadece 445. kodonda mutasyon saptanmış olup bu mutasyonunda ancak gryA bölgesindeki mutasyonlarla bir araya geldiğinde kinolon direncine neden olduğu saptanmıştır. Gram pozitif bakterilerde parE bölgesinde farklı kodonlarda mutasyonlar saptanmış ancak bu mutasyonların kinolon direncine katkı sağlamadığı bildirilmiştir (Oram ve Fisher, 1991; Ruiz, 2003; Yoshida ve ark., 1991; Yoshida ve ark., 1990).

2.2.5.2. Azalmış birikim

Kinolonların birikiminde azalmaya neden olabilecek olan iki mekanizma bulunmaktadır; bunlar, bakteriyel geçirgenlikte azalma ve efluks pompalarının aşırı üretimi (Ruiz, 2003). Kinolonların bakteri içinde etkili olabilmeleri için gram pozitif bakterilerde hücre zarı ve hücre duvarını, gram negatif bakterilerde ise bunlara ek olarak dış zarı da geçmeleri gerekmektedir. Gram negatif bakterilerde *E. coli*'de bulunan OmpF ve OmpC proteinlerinde olduğu gibi dış zarda bulunan porin proteinlerinin oluşturduğu kanallar vasıtasıyla zar geçirgenliği düzenlenmektedir. Bunlara ek olarak hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde spesifik olmayan enerji bağımlı efluks pompa sistemleri de bulunmaktadır (Jacoby, 2005). *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* gibi bazı bakterilerde ise dış membran yapısı nedeniyle kinolonların hücre içine girişi mümkün olmamaktadır. *P. aeruginosa*'nın dış zarının geçirgenliği *E. coli*'ye göre 10-100 kat daha azdır. *P. aeruginosa*'da dört farklı efluks pompa sistemi tanımlanmıştır. Bu sistemler; MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM'dir. Diğer gram negatif bakterilerde de kinolon direncine neden olan efluks pompa sistemleri mevcuttur. *E. coli*'de AcrAB, AcrEF, EmrAB, MdfA, Ydhe; *S. maltophilia*'da SmeDEF, *A. baumannii*'de AdeABC efluks pompa

sistemleri bulunmaktadır (Nikado, 1996; Poole ve ark., 1996; Ruiz, 2003; Vila ve ark., 1995; Yoshimura ve Nikado, 1982).

Gram pozitif bakterilerde de kinolon direnci oluşturan efluks pompaları mevcuttur. *S. aureus*'ta NorA, *S. pneumoniae*'da PmrA, *Bacillus subtilis*'te Blt, BmrA, Bmr3 tanımlanmış olan efluks pompa sistemleridir (Hooper, 2005; Jacoby, 2005; Ruiz, 2003).

2.2.5.3. Plazmite bağlı kinolon direnci

Plazmite bağlı nalidiksik asit direnci ilk olarak 1987 yılında *Shigella dysenteriae* klinik izolatında bildirilmiş ancak sonrasında doğrulanmamış ve direncin kromozomal mutasyona bağlı olduğu bildirilmiştir (Courvalin, 1990; Li ve ark., 2005; Munshi ve ark., 1987). Ancak 1998 yılında ABD'de, 1994 yılında bir hastanın idrar izolatından izole edilmiş olan *K. pneumoniae* klinik izolatında plazmitle aktarılmış olan kinolon direnci (PMQR- plasmid mediated quinolone resistance) ilk kez bildirilmiştir (Martinez ve ark., 1998). Plazmitte bulunan bu gen bölgesi 'Qnr' olarak adlandırılmıştır. Sonrasında farklı qnr genlerinin de saptanması nedeniyle qnrA1 olarak adlandırılmıştır. Yıllar içerisinde qnrB, qnrS, qnrC, qnrD ve plazmitle aktarılan efluks pompası aktivasyonuna yol açan qepA ve aminoglikozit asetiltransferazın varyantı olan ve siprofloksasin aktivitesini azaltan aac(6')-Ib-cr genleri de tanımlanmıştır (Jacoby, 2005; Strahilevitz ve ark., 2009; Yamane ve ark., 2007).

2.2.5.3.1. Qnr genleri

İlk olarak saptanan PMQR determinantı qnr'nın (sonra qnrA, sonrasında da qnrA1) 56-kb'lik bir plazmit, pMG252, tarafından kodlandığı ve kinolonlarla birlikte betalaktamlara, aminoglikozitlere, sulfonamitlere, trimetoprime ve kloramfenikole de dirence neden olduğu bulunmuştur (Cattoir ve ark., 2009; Jacoby, 2005; Strahilevitz ve ark., 2009). QnrA1 218 aa'lık protein olup 500'den fazla üyesi olan ökaryot ve prokaryotlarda bulunan tekrarlayan pentapeptid ailesine aittir. Bu proteinlerin biyokimyasal fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (Jacoby, 2005; Strahilevitz ve ark., 2009).

Daha sonra Çin'de *K. oxytoca* izolatında qnrA1'den dört aa farklı qnrA2, sonrasında *Shewanella algae* izolatında qnrA3, qnrA4, qnrA5 ve *Proteus mirabilis* izolatında qnrA6 genleri saptanmıştır (Jacoby, 2005; Strahilevitz ve ark., 2009).

Hindistan'dan izole edilmiş olan *K. pneumoniae* izolatlarında qnrA gen bölgesi araştırılırken düşük düzey kinolon direncine neden olan ancak qnrA içermediği saptanan bir suşta 214-226 aa'lık proteinden oluşan yeni bir gen saptanmış ve qnrB1 olarak adlandırılmıştır. QnrB1 ile qnrA arasında %43 aminoasit benzerliği olduğu görülmüştür. Sonrasında birçok farklı merkezden qnrB1'in birçok farklı varyantı *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakterilerden tespit edilmiştir. Günümüzde qnrB'nin 27 varyantı bulunmaktadır (Jacoby, 2005; Jacoby ve ark., 2006; Strahilevitz ve ark., 2009).

2003 yılında Japonya'da besin zehirlenmesine neden olan *S. flexneri* 2b klonunda sekiz suşta siprofloksasin direnci tespit edilmiş ve 218 aa'lık qnrA1 ile %59 aa benzerliği gösteren qnrS geni saptanmıştır (Hata ve ark., 2005). Günümüzde tanımlanmış dört qnrS alt tipi bulunmaktadır (Jacoby ve ark., 2008; Topdahl ve ark., 2009).

Çin'de Shanghai'den izole edilmiş olan *P. mirabilis* klinik izolatında düşük düzey kinolon direncine neden olan ve diğer qnr genlerini taşımadığı saptanan suşta 221 aa'lık protein saptanmış ve qnrC olarak adlandırılmıştır. QnrC ile qnrA arasında %64 aa'lık benzerlik bulunmaktadır (Wang ve ark., 2008).

Dört *Salmonella enterica* izolatında azalmış siprofloksasin duyarlılığına neden olan 214 aa'lık protein olan gen saptanmış ve qnrD olarak adlandırılmıştır. QnrD ile qnrA arasındaki benzerlik %48'dir (Cavaco ve ark., 2009).

Qnr genleriyle sekans benzerliği gösteren tekrarlayan pentapeptid protein genlerinin bazı gram pozitif bakterilerde de olduğu görülmüştür. Bazı *Enterococcus faecalis* suşlarında saptanmış olan 211 aa'lık protein olan Efsqnr, qnrA ile %40 benzerlik göstermektedir (Arsene ve Leclercq, 2007). Yine *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *B. cereus* ve *B. subtilis* gibi gram pozitif bakterilerde de kromozomal olarak qnr genleri saptanmıştır (Rodriguez- Martinez ve ark., 2008).

Birçok farklı qnr geninin bulunması bu genlerin 1998 yılında tespit edilinceye kadar doğada bulduklarını düşündürmektedir. 48 gram negatif bakteri türünün sekans incelenmesinde *Shewanella algae* kromozomunda qnrA varyantları (qnrA3-

qnrA5) tespit edilmiştir. Bu organizmanın kinolon MİK değerlerinin bu geni taşımayan *S. putrefaciens*'den dört ile sekiz kat daha yüksek olduğu görülmüştür. *Shewanella* spp. deniz ve taze su kaynaklarında bulunmaktadır. Yine deniz suyundan alınan örneklerde bulunan mikrobiyal populasyonda qnrB5 ve qnrB19 genleri saptanmıştır (Poirel ve ark., 2005). Seine nehrinden izole edilen *Aeromonas punctata* subsp. *punctata* ve *A. media* suşlarında qnrS2 geni bulunmuştur (Cattoir ve ark., 2008). Bu veriler qnr genlerinin su kaynaklı çevresel mikroorganizmaların kromozomlarında bulunduğunu göstermektedir. Kinolonların metabolize edilmeden insanlar ve hayvanlar tarafından atık sulara bırakılmaları ve fotodegradasyon, terrestrial mantarlar tarafından değişime uğramadan aktif olarak kalabilmeleri nedeniyle akuatik mikroorganizmalarda qnr genlerinin bulunması için olası mekanizmalar oldukları düşünülmektedir. (Stratilevitz ve ark., 2009).

Qnr proteinlerinin hücre içinde kinolon birikiminde, dış membran proteinlerinde değişikliğe veya ilaç inaktivasyonuna neden olmadığı bilinmektedir. Qnr proteinlerinin etki mekanizmasının anlaşılması için ona benzeyen iki tekrarlayan pentapeptit proteini olan McbG ve MfbA incelenmiştir. QnrA ile McbG %19.6 aa benzerliği göstermektedir. McbG DNA girazı bakterinin kendisinin ürettiği bir toksin olan ve kinolonlara benzer şekilde DNA girazı inhibe eden MicrocinB17'nin etkisinden korumaktadır. *E. coli* J53 hücresinde plazmite bağlı MCBG'nin siprofloksasin MİK değerlerinde yükselişe neden olduğu ancak siprofloksasin ve nalidiksik asit duyarlılığında değişiklik yapmadığı saptanmıştır (Jacoby, 2003). MfbA da qnrA ile %18.9 aa benzerliğine sahiptir. MfbA, *M. smegmatis* kromozomunda bulunur (Stratilevitz ve ark., 2009). Bu genin plazmitle çoklu kopyalarının bu mikroorganizmada siprofloksain MİK değerlerinde dört ile sekiz kat artışa neden olduğu ayrıca *M. smegmatis*'te bu genin inaktive edilmesi sonucunda siprofloksasin duyarlılığında artış olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda MfbA'nın DNA yerine DNA giraza bağlandığı bu yollarda kinolon-giraz-DNA kompleksinin oluşmasını engelleyerek kinolonların etki yolunu ortadan kaldırdığı saptanmıştır (Hedge ve ark., 2005; Stratilevitz ve ark., 2009). Qnr proteinlerinin de MfbA'ya benzer ancak aynı şekilde olmayan bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Qnr proteinleri DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü kinolonların etkisinden korumaktadır. DNA supercoiling deneyinde qnrA1'in, *E. coli* DNA girazının iki alt

ünitine (gryA ve gry B) ve topoizomeraz IV'ün alt ünitlerine (parC ve parE) kinolon-giraz-DNA kompleksine gerek olmadan bağlandığı gösterilmiştir (Tran ve Jacoby, 2005). Qnr proteinlerinin in vitro olarak giraz aktivitesini inhibe etmeden giraza bağlanmak için DNA ile yarıştığı düşünülmektedir (Stratilevitz ve ark., 2009).

2.2.5.3.2.Aac(6')- Ib- cr

Bir diğer PMQR determinantı olan aac(6')- Ib- cr ilk olarak Çin'de qnrA geni taşıyan *E. coli* suşundan izole edilmiştir. Bu suşun diğer qnr determinantı taşıyan suşlara göre daha yüksek siprofloksasin MİK değerlerine sahip olduğu görülmüş ve plazmit DNA'sının random transpozon mutagenesi sonucunda bir aminoglikozit asetiltransferaz olan aac(6')-Ib geni izole edilmiştir. Aac(6')- Ib tobramisin ve kanamisin direncine neden olmaktadır. Sekans sonucunda siprofloksasin direncine neden olan alelin aac(6')-Ib'den iki kodon (Trp102Arg ve Asp179Tyr) farklılık içerdiği görülmüştür. Bu gen siprofloksasin direncinden dolayı aac(6')- Ib- cr olarak adlandırılmıştır (Robiscek ve ark., 2006). Asetilizasyon piperazinil ekindeki amino azotunda meydana geldiği için bu genden sadece siprofloksasin ve norfloksasin etkilenmekte diğer kinolonlar etkilenmemektedir. QnrA ve aac(6')- Ib- cr sinerjik olarak etki ederek yüksek düzey siprofloksasin direncine neden olmaktadır (Robiscek ve ark., 2006; Stratilevitz ve ark., 2009).

2.2.5.3.3.QepA

Eflüks pompaları sıklıkla kromozom kaynaklıdır. Ancak Japonya'da idrar örneğinden izole edilmiş olan *E. coli* suşunda ilk olarak plazmitle aktarılan eflüks pompası olan qepA geni (quinolone efflux pump) tanımlanmıştır (Yamane ve ark., 2007). Bu gen 511 aa'lık protein kodlamaktadır. Bu protein proton bağımlı transport yapan major facilitator superfamily (MFS) içerisinde yer alan 14-transmembran segment (14-TMS) ile belirgin benzerlik göstermektedir (Perichon ve ark., 2007; Yamane ve ark., 2007). QepA genini içeren plazmitin kinolonlar, aminoglikozitler ve betalaktam grubu antimikrobialerde dirence neden olduğu görülmüştür. QepA belirgin şekilde kinolon duyarlılığında azalmaya neden olmaktadır. Özellikle siprofloksasin ve norfloksasin gibi hidrofilik kinolonların MİK değerlerinde vahşi suşlarla karşılaştırıldığında 8 ile 12 kat artışa neden olmaktadır (Yamane ve ark.,

2007). Efluks pompa inhibitörleri olan 1-1-naphtylmetthyl-piperazine (NMP) ve phenylalanine-arginine- β -naphthyl-amide (PA β N)'in eklemesi hidrofilik kinolonların direnç düzeylerinde belirgin azalmaya neden olmaktadır (Cattoir ve ark., 2009). QepA geninin doğal rezervuarı bilinmemekle beraber Actinomycetales ailesinin membran taşıyıcılarıyla benzerlik göstermesi ve yüksek guanin sitozin (%72) içeriğinden dolayı olası rezervuarların bu bakteriler olduğu düşünülmektedir (Perichon ve ark., 2007; Yamane ve ark., 2007).

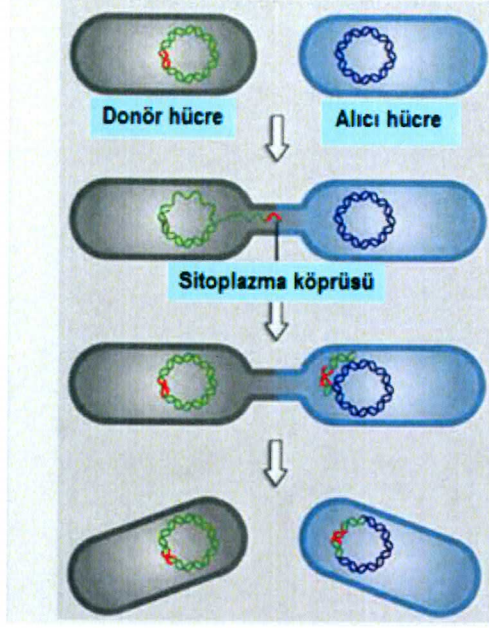
2.2.5.3.4. OqxAB

Olaquindoks (büyüme destekleyicisi olarak tarımsal yemlerde kullanılan kinoksaline derivativesi) antibiyotiğine dirence neden olan pOLA52 plazmiti domuz gübresinden izole edilen *E. coli* suşundan tanımlanmıştır (Sorensen ve ark., 2003). Bu dirence neden olarak RND (resistance nodulation cell division superfamily) ailesine ait çoklu ilaç efluks pompası olan OqxAB gösterilmiştir (Hansen ve ark., 2004). Yakın zamanda insandan izole edilmiş olan *E. coli* izolatında saptanmıştır. Aynı zamanda *K. pneumoniae* kromozumunda bulunduğu ve değişik ekspresyon derecelerine göre olaquindoksa karşı dirence neden olmaktadır (Kim ve ark., 2009). AcrA geni içermeyen *E. coli* suşunda pOLA52 plazmitinin nalidiksik asit ve siprofloksasin MİK değerlerinde 8-16 kat artışa neden olduğu saptanmıştır (Hansen ve ark., 2007).

2.3. Plazmitler

Plazmitler 4-400 kb büyüklüğünde, sirküler, çift sarmallı DNA içeren kromozom dışı genetik elementlerdir. Plazmitler bakterilere antibiyotik direnci yanında bakterinin virulansı ve metabolik özelliklerini etkileyebilecek fonksiyonlar kazandırabilirler (Thompson, 1986). Plazmitler, kendilerini diğer mikroorganizmalara aktarabilme yeteneklerine göre de sınıflandırılabilirler. Bir bakteri hücresinden diğerine kendini aktarabilenlere “konjugatif plazmitler” adı verilir. Non-konjugatif plazmitler genelde konjugatif olanlara oranla daha küçüktür. Bazı non-konjugatif plazmitler, aynı hücrede bulunan konjugatif bir plazmitin yardımı ile “mobilize” olarak diğer hücreye aktarılabilirler. Plazmitlerdeki direnç genleri transpozon ve integron gibi mobil genetik elementlere yerleşerek başka

direnç genleri ile bağlantılı plazmit veya kromozomlara geçebilirler. Bu şekilde birbiri ile ilişkisiz birden fazla ilaca karşı eş zamanlı direnç gelişebilir (Bilgehan, 1997).



[http:// www.androloji.org.tr/guvsbg/icerik.asp?lang](http://www.androloji.org.tr/guvsbg/icerik.asp?lang)

Şekil 4. Konjugasyon ile gen aktarımı.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıp Laboratuvarları Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Altdisiplin Laboratuvarı'na, Kasım 2009- Nisan 2010 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 300 *P. aeruginosa* izolatu çalışmaya dahil edildi.

3.1.Bakterilerin tanımlanması

Laboratuvara gelen klinik örnekler rutin olarak %5 koyun kanlı agar ve Eozin Metilen Blue (EMB) agara ekildi. 35°C'de, 20-22 saatlik inkübasyondan sonra üreyen koloniler değerlendirildi. Üreyen kolonilerden *P. aeruginosa* tanımlamasında; EMB agarda üreyen laktoz negatif koloniler hareket, oksidaz aktivitesi, koloni morfolojisi, pigment oluşturma, kanlı agarda hemoliz oluşturma özellikleri kullanıldı. Tür düzeyinde tanımlanmanın doğrulanması için suşlar bir kez de Vitek2 Compact (Biomeriux, Fransa) otomatize sisteminde GN kartı ve Phoinex (BD, USA) otomatize sisteminde GN ID kartı ile çalışıldı.

3.2.Bakterilerin antimikrobiyal direncinin belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen suşların kinolon direnci Vitek2 Compact (Biomeriux, Fransa) ve Phoinex (BD, ABD) otomatize sisteminlerinde belirlendi.

3.2.1.Vitek2 Compact (Biomeriux, Fransa)Otomatize sistemi

Antibiyotik duyarlılığı AST N90 kartları kullanarak üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. İzolatlar %5 koyun kanlı agarda üredikten sonra 0,5-0,6 McFarland standart bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak, kartlar ve süspansiyonlar cihaza yerleştirildi. Süspansiyonların kartlara inoküle edilmesi, okuma, değerlendirme ve raporlama otomatik olarak cihaz tarafından yapıldı.

3.2.2.Phoenix (BD, ABD) otomatize sistemi

Antibiyotik duyarlılığı NMIC kartlarında üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. Çalışma için bakteri süspansiyonu üretici firma tarafından sağlanan ID buyyon tüplerinde, %5 koyun kanlı agarda üremiş olan kolonilerden alınarak 0.5 McFarland standart bulanıklığında ayarlanarak hazırlandı. Bu süspansiyondan 25 µl

alınarak, 50 µl indikatör eklenmiş olan AST buyyon tüpüne inoküle edildi. Her iki süspansiyon kartlarda belirtilmiş olan yerlerden dökülerek cihaza yerleştirilmiştir. Okuma, değerlendirme ve sonuçlandırma otomatik olarak cihaz tarafından gerçekleştirildi.

3.2.3. Disk difüzyon yöntemi

Aac(6')-Ib taşıdığı saptanan 6 izolatın amikasin, gentamisin ve tobramisin duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Kanlı agar besiyerine pasajlanan izolatlar 37°C'de bir gece inkübe edildi. Üreyen kolonilerden birkaç tane alınıp 0.5 McFarland standart bulanıklığında ayarlandı. Steril eküvyon yardımıyla hazırlanan süspansiyondan alınıp Mueller-Hinton agara yayıldı. Yaklaşık 15 dk. Sonra amikasin, gentamisin ve tobramisin diskleri agar yüzeyine yerleştirildi. Plaklar etüve konularak 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra disk çevresindeki zon çapı ölçülerek duyarlılık değerlendirildi.

3.3. Moleküler Yöntemler

3.3.1. *P. aeruginosa* bakterisinden DNA ekstraksiyonu

P. aeruginosa bakterisinden kaynatma yoluyla DNA ekstraksiyonu yapıldı.

1. Mueller- Hinton agar besiyerine pasajlanan bakteriler 35°C'de 20-22 saat inkübe edildi.
2. Üreyen bakterilerden bir öze dolusu alınıp, 500 µl steril distile su içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
3. Homojenizasyon için vorteks işlemi yapıldı
4. Homojen bir süspansiyon elde edildikten sonra, mikrosantrifüj tüpleri 15 dk süresince 100°C'ye ayarlanmış olan kuru bloğa yerleştirildi.
5. Süre sonunda mikrosantrifüj tüpleri soğutmalı mikrosantrifüj cihazına yerleştirilerek 15000x g ve 4°C sıcaklıkta 20 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu.
6. Santrifüj işleminden sonra üste kalan kısım PZR işleminde kullanılacak template DNA olarak steril DNase ve RNase içermeyen mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

7. Elde edilen DNA'lar kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3.2.Qnr genlerinin Multipleks PZR yöntemi ile araştırılması

QnrA, qnrB, qnrC ve qnrS gen bölgeleri multipleks PZR ile test edildi.

3.3.2.1. Kullanılan Primerler

Çalışmada Kim ve ark.'nın tanımladığı primerler kullanılmıştır. Kullanılan primerler Tablo II'de sunuldu (Kim ve ark. 2009).

Tablo II. Çalışmada kullanılan primer çiftleri.

Gen	Primer adı	Primer dizisi
<i>qnrA</i>	Qnra-F	ATTCTCACGCCAGGATTG
	QbrA-R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA
<i>qnrB</i>	QnrB-F	GATCGTGAAAAGCCAGAAAGG
	QnrB-R	ATGAGCAACGATGCCTGGTA
<i>qnrC</i>	QnrC-F	GGGTTGTACATTTATTGAATCG
	QnrC-R	CACCTACCCATTTATTTCA
<i>qnrS</i>	QnrS-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT
	QnrS-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG

3.3.2.2.PZR optimizasyonu

PZR işleminde uygun DNA, magnezyum miktarı ve primer bağlanma ısılarının tespiti için PZR optimizasyon denemeleri yapıldı. Optimizasyon işlemlerinde qnr genlerini taşıdığı bilinen suşlardan DNA ekstraksiyonu yapılarak pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kullanılan suşlar Tablo III'de sunuldu.

Tablo III. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan suşlar.

Suş	Taşıdığı gen
<i>E. coli</i> J53 pMG252	qnrA ₁
<i>E. coli</i> J53 pMG252	qnrS ₁
<i>K. pneumoniae</i> ref:15	qnrB&aac(6')-Ib
<i>E. cloacae</i> ref:287	qnrS
<i>E. coli</i> ref: 20	qnrA
pHS11 plazmit	qnrC
<i>E. coli</i> KAM32	qepA

a. Magnezyum klorür (MgCl₂) optimizasyonu

PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda MgCl₂ kullanılarak yapılan optimizasyon çalışması Tablo IV’de özetlendi. Optimizasyon işlemi sırasında ilk aşamada bir tane pozitif kontrol suşuna ait DNA kullanıldı.

Tablo IV. Qnr MgCl₂ optimizasyonu.

Reaksiyon Karışımı (50 µl)	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	Tüp 4	Tüp 5	Tüp 6	Tüp 7
10X PZR tamponu (µl)	5	5	5	5	5	5	5
25 mM MgCl₂ (µl)	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
20 pmol Qnr A- F (µl)	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr A- R(µl)	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr B- F (µl)	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr B-R(µl)	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr C-F(µl)	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr C-R(µl)	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr S-F(µl)	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr S- R(µl)	1	1	1	1	1	1	1
Taq DNA polimeraz (µl)	1	1	1	1	1	1	1
10 mM dNTP (µl)	1	1	1	1	1	1	1
Steril saf su (µl)	31	30.5	30	29.5	29	28.5	28
Kalıp DNA (µl)	2	2	2	2	2	2	2
Toplam (µl)	50	50	50	50	50	50	50

b. Primer bağlanma ısı optimizasyonu

Belirlenen optimal magnezyum miktarı sabit tutularak qnrA, qnrB, qnrC ve qnrS gen bölgelerinin primer bağlanma ısılarının belirlenebilmesi amacıyla optimizasyon çalışması yapıldı. Uygulanan reaksiyon karışımı ve farklı bağlanma ısıları Tablo V’de sunuldu.

Tablo V. Qnr primer bağlanma ısısı optimizasyonu.

Reaksiyon Karışımı (50 µl)	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	Tüp 4	Tüp 5	Tüp 6	Tüp 7	Tüp 8	Tüp 9	Tüp 10
Anneling ısısı (°C)	52.0	53.0	53.6	54.3	55.3	56.4	58.8	60.0	61.5	62.3
10X PZR tamponu (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
25 mM MgCl ₂ (µl)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
20 pmol Qnr A- F (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr A- R (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr B- F (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr B- R (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr C- F (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr C- R (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr S- F (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20 pmol Qnr S- R (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Taq DNA polimeraz5u/ µl (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10 mM dNTP (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Steril saf su (µl)	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
Kalıp DNA (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Toplam (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

c. DNA optimizasyonu

MgCl₂ ve primer bağlanma ısısı optimizasyon çalışmalarından sonra daha iyi DNA görüntüsü elde edebilmek için DNA belli oranda steril saf su ile dilüe edilerek farklı konsantrasyonlarda çalışıldı.

Tablo VI. DNA optimizasyonu.

DNA (µl)	Saf su(µl)
1	99
2	198
3	297
4	396
5	495
6	594

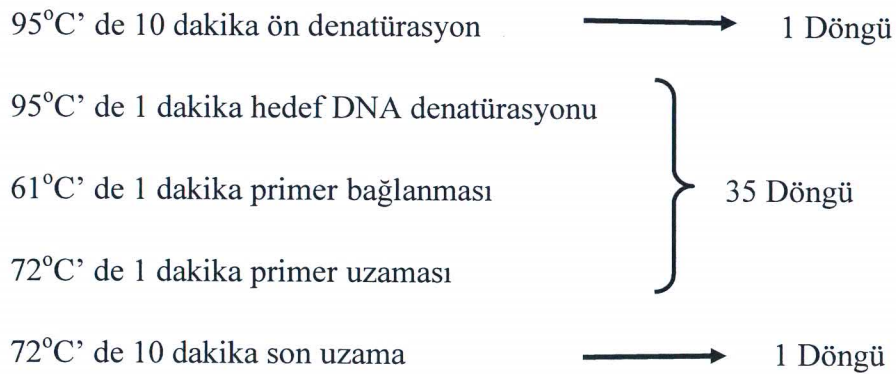
d. Qnr genlerinin multipleks PZR yöntemiyle amplifikasyonu:

QnrA, qnrB, qnrC ve qnrS genleri kendilerine özgü primerlerle *P. aeruginosa* suşlarından elde edilen DNA kalıp olarak kullanılarak eş zamanlı olarak multipleks PZR işlemi ile amplifiye edildi. Uygulama da kullanılan reaksiyon karışımı Tablo VII’de sunuldu. Amplifikasyon programı olarak Cattoir ve ark. kullanıldığı program referans alındı (Cattoir ve ark., 2007). Kullanılan amplifikasyon programı Tablo VIII’de sunuldu.

Tablo VII: Qnr PZR reaksiyon karışımı.

10X PZR tamponu	5 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	1 µl
Qnr A- F primeri (20 pmol)	1 µl
Qnr A- R primeri (20 pmol)	1 µl
Qnr B- F primeri (20 pmol)	1 µl
Qnr R- F primeri (20 pmol)	1 µl
Qnr C- F primeri (20 pmol)	1 µl
Qnr C- R primeri (20 pmol)	1 µl
Qnr S- F primeri (20 pmol)	1 µl
Qnr S- R primeri (20 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	2 µl
Saf su	29 µl
Toplam	50 µl

Tablo VIII. Qnr PZR amplifikasyon programı:



e. DNA elektroforezi:

PZR ürünü DNA'ların incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için konsantrasyonu %2 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile jel hazırlandı. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak uygulandı. Bir saat süresince 120 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dakika jel boyandı. Elektroforez işlemini takiben örnekler için DNA bantları "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus" belirteçleri ile karşılaştırılarak görüntüleme cihazında incelendi.

3.3.3. QepA gen bölgesinin PZR yöntemiyle çalışılması:

Kim ve ark.'nın çalışması referans alınarak QepA ve aac(6')-Ib- cr gen bölgeleri multipleks olarak çalışıldı (Kim ve ark., 2009). Ancak yapılan magnezyum klorür ve primer bağlanma ısısı optimizasyon çalışmalarına rağmen olumlu sonuç alınamadığı için qepA ve aac(6')-Ib- cr gen bölgelerinin ayrı ayrı çalışılmasına karar verildi. QepA'nın ayrı olarak çalışıldığı PZR işleminde tekrarlanabilir sonuçlar alınamaması üzerine Yamane ve ark. tarafından dizayn edilen farklı bir qepA primeri çalışmaya dahil edilerek çalışıldı (Yamane ve ark.,2007). Çalışmada kullanılan primer Tablo IX'de sunuldu. PZR işleminde pozitif kontrol olarak qepA geni taşıyan *E. coli KAM32* suşundan izole edilen DNA kullanıldı.

Tablo IX. QepA geni primer dizisi.

Gen	Primer adı	Primer dizisi
QepA	QepA-F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG
	QepA-R	CTTCTGCCCGAGTATCGTG

a.QepA geninin PZR yöntemiyle amplifikasyonu:

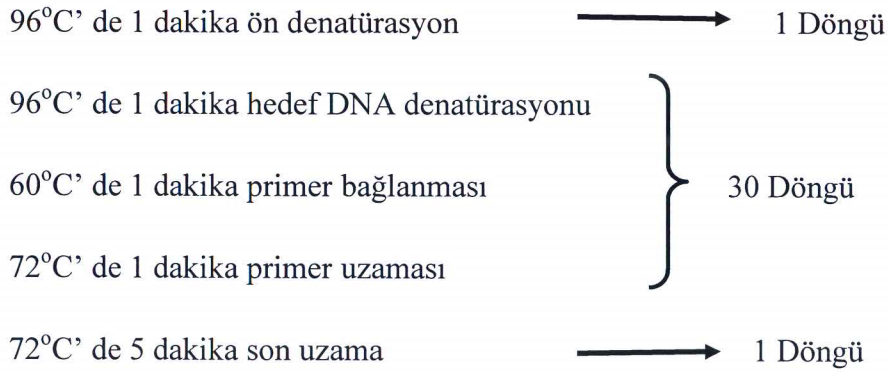
QepA geninin belirlenebilmesi için Yamane ve ark. tarafından tanımlanan 199 bp'lik ürün oluşturan QepA-F ve QepA-R primerleri kullanılarak amplifikasyon

programı uygulandı (Yamane ve ark.,2007). PZR işleminde kullanılan reaksiyon karışımı Tablo X’da, amplifikasyon programı da Tablo XI’de sunuldu.

Tablo X. QepA PZR reaksiyon karışımı.

10X PZR tamponu	5 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	1 µl
QepA-F primeri (10 pmol)	1 µl
QepA- R primeri (10pmol)	1 µl
Kalıp DNA	2 µl
Saf su	35 µl
Toplam	50 µl

Tablo XI. QepA PZR amplifikasyon programı



b. DNA elektroforezi:

PZR ürünü DNA’ların incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için konsantrasyonu %2 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile jel hazırlandı. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak uygulandı. Bir saat süresince 120 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dakika jel boyandı. Elektroforez işlemi takiben örneklere ait DNA bantları “GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus” belirteçleri ile karşılaştırılarak görüntüleme cihazında incelendi.

3.3.4.Aac(6')- Ib- cr gen bölgesinin PZR işlemi ile amplifikasyonu:

Aac(6')- Ib- cr gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonu Kim ve ark. tarafından tanımlandığı şekilde çalışıldı (Kim ve ark., 2009). Aac(6')- Ib gen bölgesi Tablo XII'de sunulan primerle amplifiye edildi. Amplifikasyon ürünleri Tablo XIII'de sunulmuş olan Park ve ark.'nın tanımladığı primerle aac(6')- Ib- cr geninin tespiti için sekans işlemine tabi tutuldu (Park ve ark., 2006).

Tablo XII. Aac(6')- Ib geni primer dizisi.

Gen	Primer adı	Primer dizisi
Aac(6')-Ib	Aac(6')-Ib- F Aac(6')-Ib- R	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGT

Tablo XIII. Aac(6')- Ib-cr gen bölgesinin sekansı için kullanılan primer dizisi.

Gen	Primer adı	Primer dizisi
Aac(6')-Ib-cr	Aac(6')-Ib-cr	CGTCACTCCATACATTGCAA

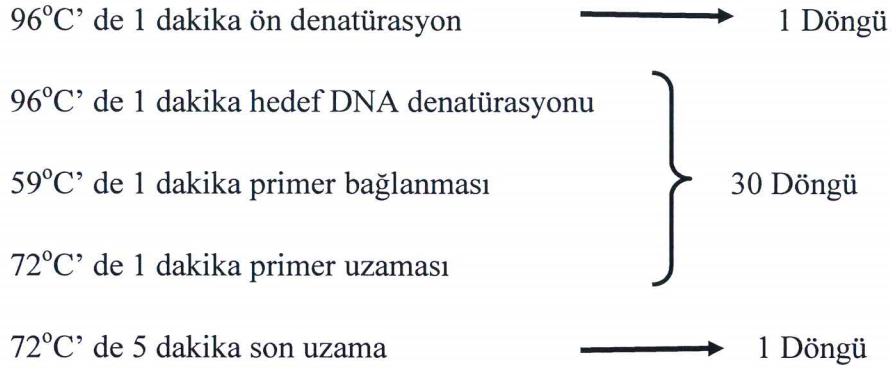
a.Aac(6')- Ib geninin PZR yöntemiyle amplifikasyonu:

Aac(6')- Ib geninin belirlenebilmesi için 482 bp'lik ürün oluşturan aac(6')- Ib -F ve aac(6')- Ib -R primerleri kullanılarak amplifikasyon programı uygulandı (Kim ve ark., 2009). PZR işleminde kullanılan reaksiyon karışımı Tablo XIV'de, amplifikasyon programı da Tablo XV'de sunuldu. PZR işleminde pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* ref:15 suşundan izole edilen DNA kullanıldı.

Tablo XIV.Aac(6')- Ib gen bölgesi için PZR reaksiyon karışımı.

10X PZR tamponu	5 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	1 µl
Aac(6')-Ib-Fprimeri(20 pmol)	1 µl
Aac(6')-Ib R primeri (20pmol)	1 µl
Kalıp DNA	2 µl
Saf su	35 µl
Toplam	50 µl

Tablo XV. Aac(6')-Ib gen bölgesi için amplifikasyon programı.



b. DNA elektroforezi:

PZR ürünü DNA'ların incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için konsantrasyonu %2 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile jel hazırlandı. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak uygulandı. Bir saat süresince 120 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dakika jel boyandı. Elektroforez işlemini takiben örneklere ait DNA bantları "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus" belirteçleri ile karşılaştırılarak görüntüleme cihazında incelendi.

c. Aac(6')-Ib-cr gen bölgesi için sekans işlemi:

Aac(6')-Ib taşıdığı tespit edilen suşların aac(6')-Ib-cr varyantı olduğunun belirlenmesi için suşlar sekans işlemine tabi tutuldu. Sekans işlemi MacroGen (Kore) tarafından yapıldı.

4.BULGULAR

4.1. *P. aeruginosa* izolatlarının İzole Edildikleri Örnek Türleri ve Klinik Servisler

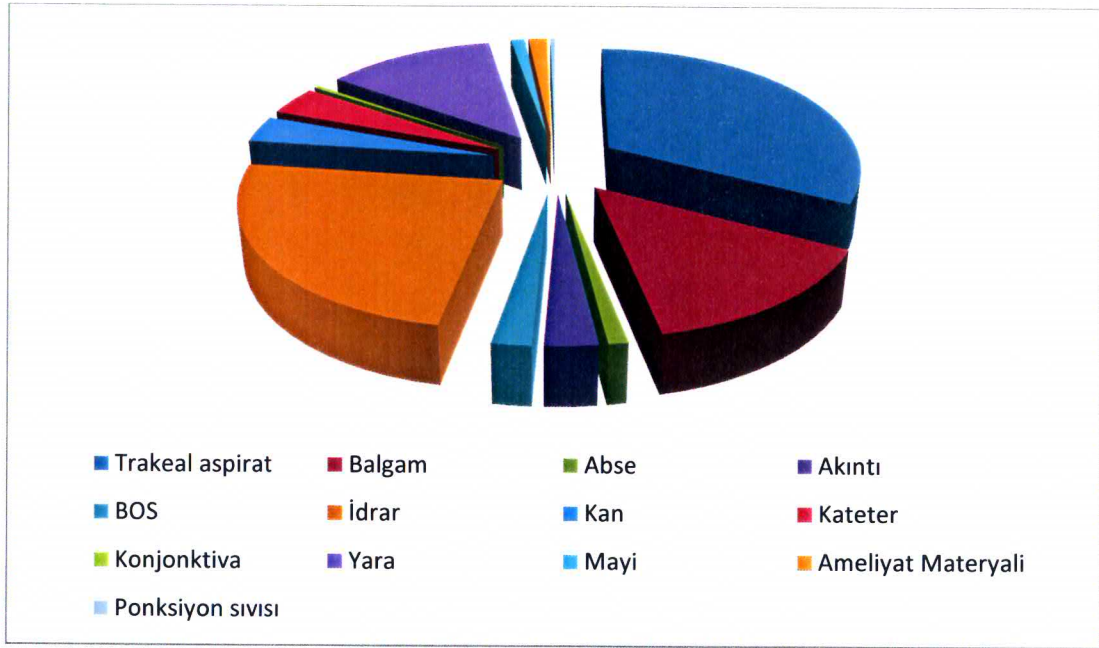
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıp Laboratuvarları Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Altdisiplin Laboratuvarı'na, Kasım 2009-Nisan 2010 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen örneklerden toplam 300 *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya dahil edildi.

Yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından laboratuvarımıza gönderilen materyallerden izole ettiğimiz *P. aeruginosa* izolatlarının materyal dağılımı Tablo XVI'da ve Şekil 5'de sunuldu.

Tablo XVI. *P. aeruginosa*'ların izole edildiği örnek türü dağılımı.

Örnek türü	sayı	%	Örnek türü	Sayı	%
Trakeal aspirat	94	31,4	Akıntı	8	2,7
İdrar	67	22,4	BOS	6	2
Balgam	40	13,3	Ameliyat Materyali	4	1,3
Yara	36	12	Abse	4	1,3
Eksuda	15	5	Mayi	3	1
Kateter	11	3,7	Konjunktiva	1	0,3
Kan	10	3,3	Ponksiyon sıvısı	1	0,3

P. aeruginosa izolatlarının en sık izole edildiği örnek türü %31,4 ile trakeal aspirat olup bunu %22,4 ile idrar ve % 13,3 ile balgam örnekleri takip etmektedir.



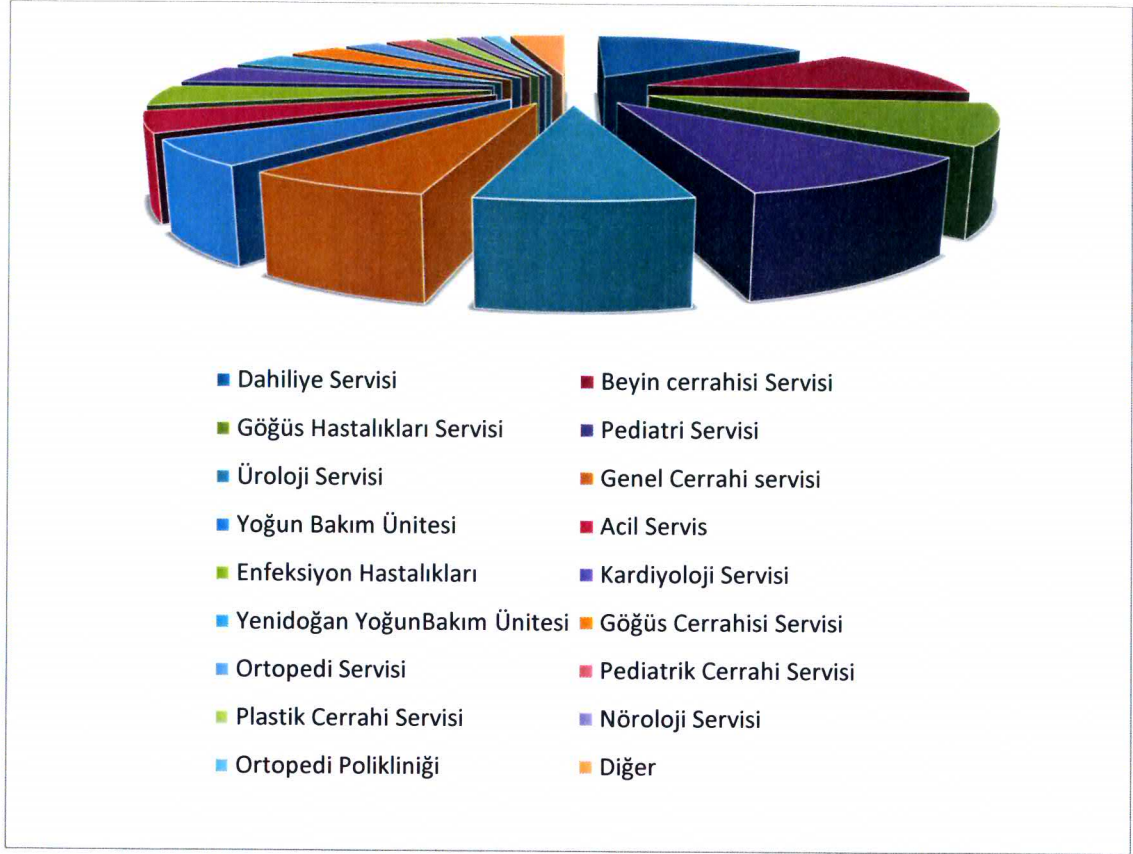
Şekil 5. Örnek türlerinin dağılımı.

Laboratuvarımıza gönderilen örneklerin kliniklere göre dağılımı Tablo XVII'de sunuldu. Laboratuvarımıza materyallerin en büyük bölümü dahiliye (%14) ve beyin ve sinir cerrahisi (12,3) servislerinden gönderilmiş ve bu servisleri göğüs hastalıkları servisi (%10) izlemiştir. Gönderilen materyallerin servislere ve polikliniklere göre dağılımı şekil 6'da sunuldu.

Tablo XVII. *P. aeruginosa* örneklerinin izole edildiği kliniklerin dağılımı.

Klinik	Sayı	%	Klinik	Sayı	%
Dahiliye Servisi	42	14	Kardiyoloji Servisi	14	4,6
Beyin Cerrahisi Servisi	37	12,3	Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi	11	3,6
Göğüs Hastalıkları Servisi	30	10	Göğüs Cerrahisi Servisi	10	3,3
Pediyatri Servisi	29	9,6	Ortopedi Servisi	7	2,3
Üroloji Servisi	22	7,3	Pediyatrik Cerrahi Servisi	7	2,3
Genel Cerrahi Servisi	20	6,6	Plastik cerrahi Servisi	5	1,6
Yoğun Bakım Ünitesi	17	5,6	Nöroloji Servisi	4	1,3
Acil Servis	15	5	Ortopedi Polikliniği	4	1,3
Enfeksiyon Hastalıkları servisi	15	5	Diğer*	11	3,6

*Diğer: Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniği, Göz Hastalıkları Servisi, Kulak Burun Boğaz Servisi, Kulak Burun Boğaz Polikliniği, Kalp ve Damar Cerrahisi Servisi, Üroloji Polikliniği, Pediyatri Polikliniği.



Şekil 6. Örneklerin gönderildiği servislere göre dağılımı.

*Diğer: Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniği, Göz Hastalıkları Servisi, Kulak Burun Boğaz Servisi, Kulak Burun Boğaz Polikliniği, Kalp ve Damar Cerrahisi Servisi, Üroloji Polikliniği, Pediatri Polikliniği.

4.2. *P. aeruginosa* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığı

4.2.1. Siprofloksasin duyarlılığı

Vitek2 Compact (Biomeriux, France) ve Phoenix (BD, USA) otomatize cihazlarında çalışılan antimikrobiyal duyarlılığı sonucunda 64 (%21,4) *P. aeruginosa* izolatının siprofloksasin dirençli, 8 (%2,6) izolatın orta duyarlı, 228 (%76) izolatın ise duyarlı olduğu saptandı.

4.2.2. Amikasin, gentamsin ve tobramisin duyarlılığı

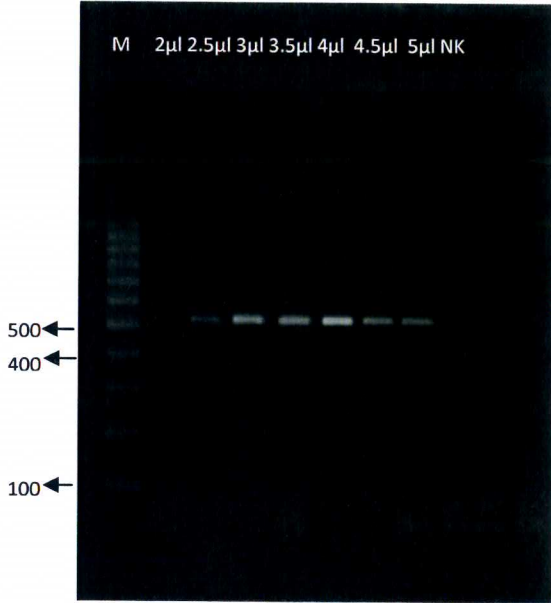
Aac(6')-Ib geni pozitif saptanan 6 izolatın (P2, P64, P65, P71, 213, P229) amikasin, gentamisin ve tobramisin duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle çalışıldı.

Tüm izolatlar gentamisin ve tobramisine dirençli saptanırken, bir izolat (P64) amikasinine duyarlı, diğer izolatlar ise orta duyarlı olarak saptandı.

4.3. Qnr genlerinin multipleks PZR optimizasyon sonuçları

4.3.1. MgCl₂ Optimizasyonu

PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla yapılan MgCl₂ optimizasyonunda 2-5 µl konsantrasyon aralığı çalışıldı. Optimizasyon işlemi tek bir pozitif kontrol suş DNA'sı (QnrA pozitif geni taşıyan *E. coli* J53 pMG252) kullanılarak yapıldı. Sonrasında bant görüntüsünün en iyi olduğu 4µl MgCl₂ konsantrasyonu kullanılarak tüm pozitif kontrol suş DNA'larının kullanıldığı multipleks PZR işlemi uygulandı.



Şekil 7. Qnr PZR magnezyum klorür optimizasyon jel görüntüsü (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol) (Miktarlar µl olarak verilmiştir).

4.3.2. Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu

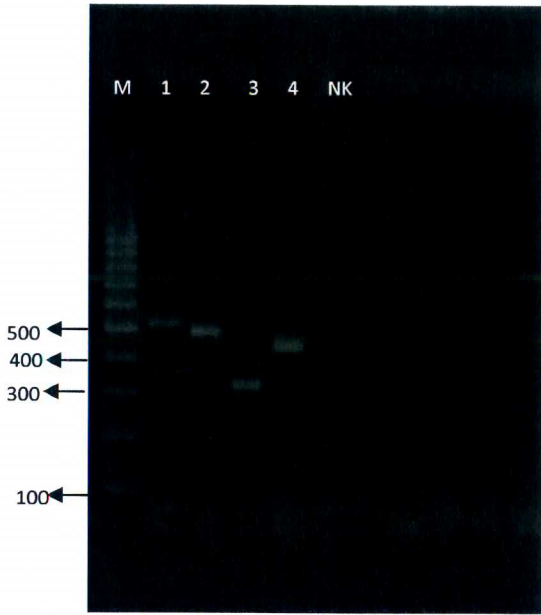
Qnr genlerinin primer bağlanma ısısı optimizasyonu için 50- 62°C ısı aralığında qnrA pozitif kontrol suşu DNA'sı kullanılarak PZR işlemi uygulandı. En iyi görüntünün 60°C'de olduğu saptandı. Uygun MgCl₂ konsantrasyonu ve ısı ile yapılan ve tüm pozitif kontrol suş DNA'larının kullanıldığı PZR işlemi ile optimal sonuçlar saptandı.

4.3.3. DNA optimizasyonu

MgCl₂ ve primer bağlanma ısısı optimizasyon işlemlerinden sonra daha iyi bant görüntüsü elde edebilmek için DNA'lar dilüe edilerek PZR işlemi uygulandı. 1 µl DNA/299 µl steril su dilüsyonunun en iyi konsantrasyon olduğu belirlendi.

4.3.4. Multipleks PZR sonuçları

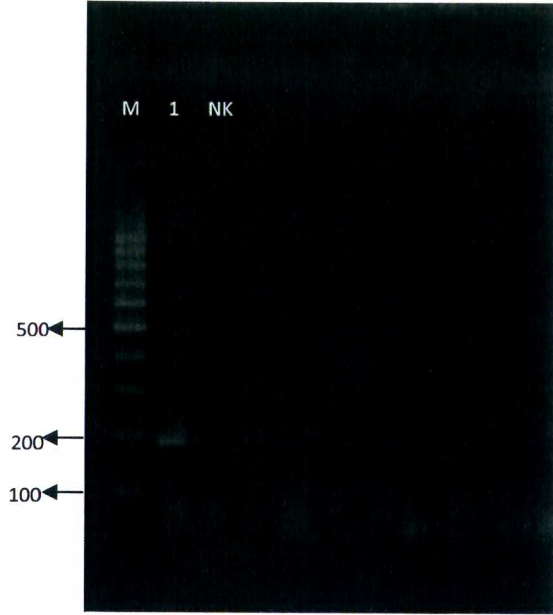
Optimizasyon işlemlerinden sonra 300 *P. aeruginosa* izolatu belirlenen optimizasyon koşullarında PZR işlemine tabi tutuldu. Multipleks PZR işlemleri sonucunda qnr geni taşıyan izolat saptanmadı.



Şekil 8. Qnr pozitif suşlarla yapılan multipleks PZR jel görüntüsü. (M; DNA ladder, 1; *qnrA* pozitif *E. coli* ref: 20, 2; *qnrB* pozitif *K. pneumoniae* ref:15, 3; *qnrC* pozitif pHS11 suşu, 4; *qnrS* pozitif *E. cloacae* ref: 287, NK; negatif kontrol)

4.4. QepA geni için PZR işlemi

QepA gen bölgesi Yamane ve ark tarafından önerildiği şekilde çalışıldı (Yamane ve ark., 2007). QepA geni taşıyan pozitif kontrol suşuyla yapılan PZR işlemi jel görüntüsü Şekil 9'da gösterildi.



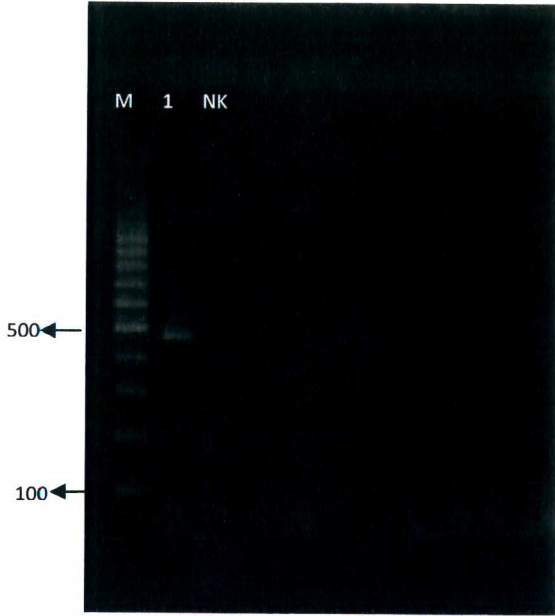
Şekil 9. QepA pozitif suşla yapılan PZR jel görüntüsü.(M; marker, 1; qepA pozitif suş *E. coli* KAM32, NK; negatif kontrol).

4.4.1. QepA gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

Yapılan PZR işlemi sonucunda 300 *P. aeruginosa* izolatından qepA geni taşıyan izolat saptanmadı.

4.5. Aac(6')-Ib-cr gen bölgesinin PZR işlemi

Kim ve ark tarafından önerildiği şekilde pozitif kontrol suşu kullanılarak PZR işlemi ile aac(6')-Ib gen bölgesi amplifiye edildi (Kim ve ark., 2009). Pozitif suş kullanılarak yapılan PZR işlemi jel görüntüsü şekil 10'da sunuldu.



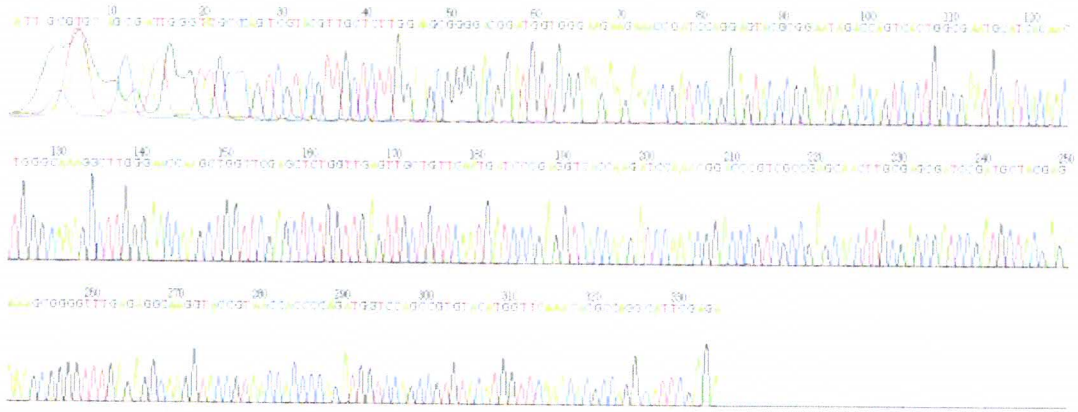
Şekil 10. Aac(6')-Ib pozitif suş PZR jel görüntüsü.(M; marker, 1; aac(6')-Ib pozitif suş *K. pneumoniae* ref:15, NK; negatif kontrol).

4.5.1. Aac(6')-Ib-cr gen bölgesinin PZR ve sekans işlemi sonuçları

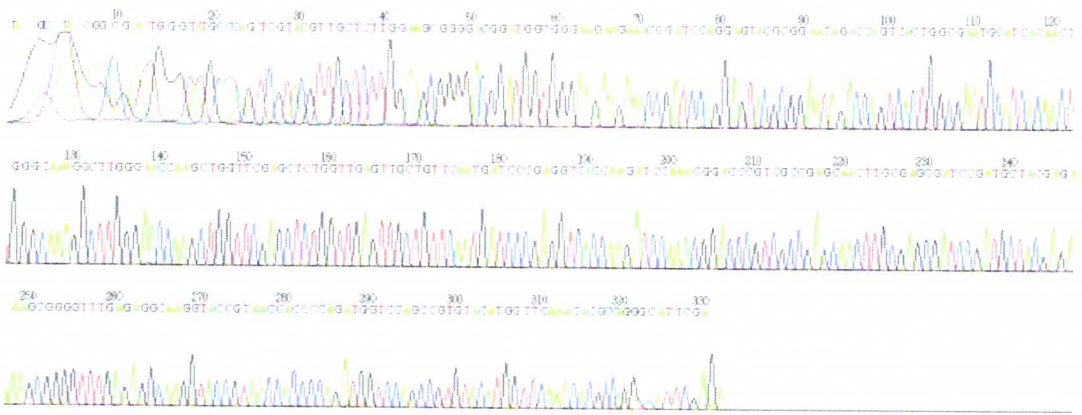
Yapılan PZR işlemi sonucunda 6 izolatta aac(6')-Ib geni saptandı. Aac(6')-Ib pozitif saptanan izolatları ieren PZR jel görüntüsü şekil 11'de sunuldu. Aac(6')-Ib geni taşıyan izolatlar aac(6')-Ib-cr primeri ile sekans (Macrogen, Korea) işlemine tabi tutuldu. Sekans sonucunda 6 suşun da aac(6')-Ib-cr varyantı taşımadığı tespit edildi.



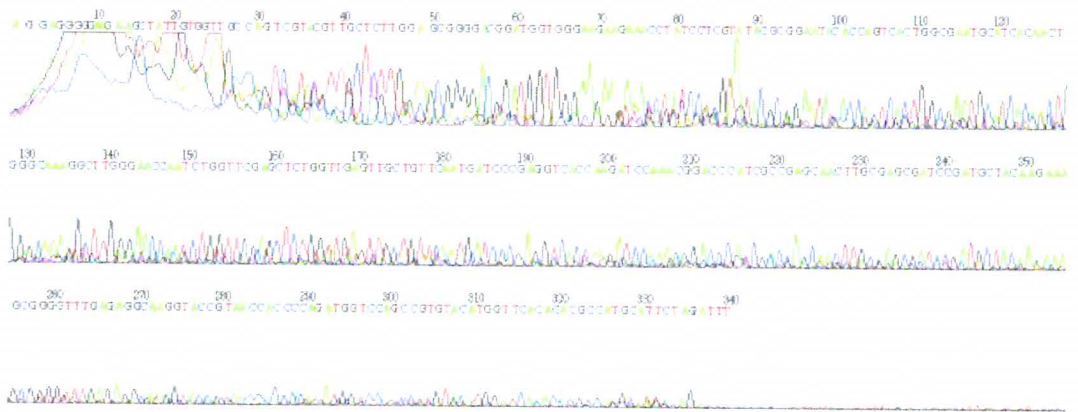
Şekil 11. Aac(6')-Ib saptanan *P. aeruginosa* suşlarının PZR jel görüntüsü. (M; marker, 1; pozitif kontrol suşu, 2;P213, 3;P2, 4;P229, 5;P65, 6;P64, 7;P71, NK; negatif kontrol)



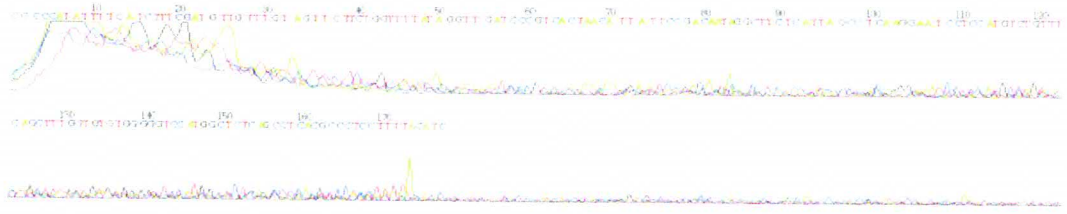
Şekil 12:P229 nolu izolataın aac(6')-Ib sekans görüntüsü.



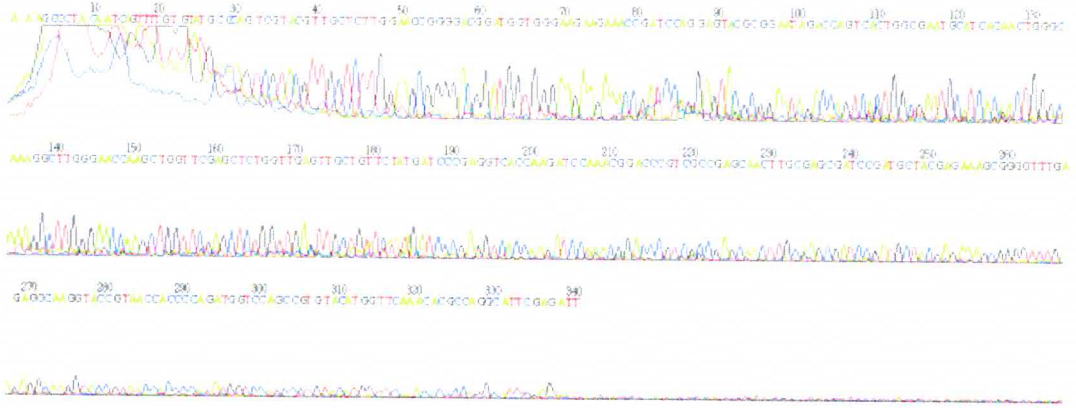
Şekil 13:P213 nolu izolataın aac(6')-Ib sekans görüntüsü.



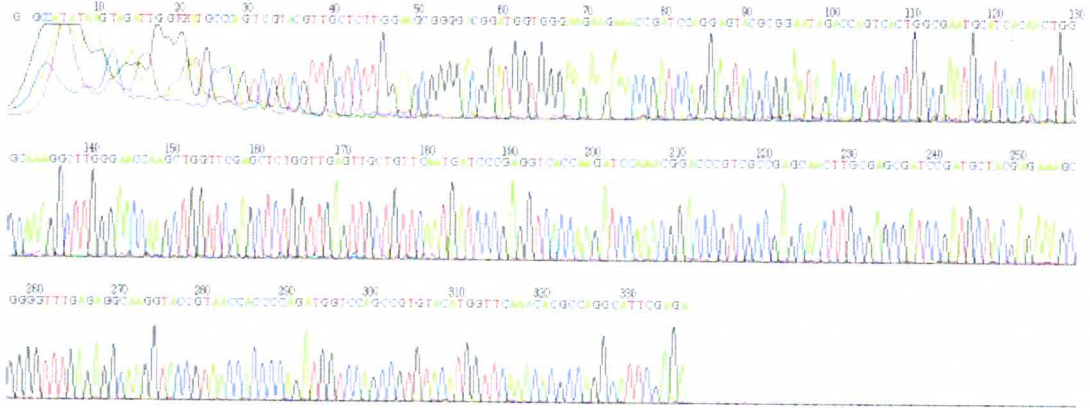
Şekil 14:P2 nolu izolataın aac(6')-Ib sekans görüntüsü.



Şekil 15:P64 nolu izolatin aac(6')-Ib sekans görüntüsü.



Şekil 16: P65 nolu izolatin aac(6')-Ib sekans görüntüsü.



Şekil 17:P71 nolu izolatin aac(6')-Ib sekans görüntüsü.

5. TARTIŞMA

P. aeruginosa çoğunlukla hastane enfeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkan önemli bir patojendir. Hastanede yatan ve özellikle immun sistemi çeşitli nedenlerle baskılanmış olan hastalarda pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, bakteriyemi, yara enfeksiyonları, malign otit, menenjit ve beyin apsisi, septik artrit ve osteomyelit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, endokardit gibi çeşitli klinik tablolara neden olmaktadır (Gayyurhan ve ark., 2008). *P. aeruginosa* neden olduğu enfeksiyonlar nedeniyle yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden sorumlu tutulmaktadır (Gül ve ark., 2004). Hastane enfeksiyonlarında bu derece önemli bir etken olan *Pseudomonas* suşları ile oluşan enfeksiyonların tedavisi her geçen gün biraz daha zorlaşmaktadır. Tedavisinde sıklıkla betalaktam grubu antibiyotikler kullanılmakla birlikte kinolonlar ve özellikle siprofloksasin de etkili ajanlar arasında yer almaktadır. *P. aeruginosa*'da kinolonlara karşı gelişen başlıca direnç mekanizmaları DNA giraz ve topoizomeraz IV enziminde meydana gelen mutasyonlar ve efluks pompalarındaki hiperaktivasyona bağlı olarak antimikrobiyallerin dışarı atılmasıdır (Ruiz, 2005; Strateva ve Yordonov, 2009).

Sıklıkla nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan *P. aeruginosa* izolatları birçok farklı örnek türünden izole edilebilmektedirler. *P. aeruginosa* izolatları Aydın ve ark. tarafından yapılan çalışmada; en sık idrardan (%33.8), ikinci sıklıkta püydenden (%23.8) ve üçüncü sıklıkta yanık örneklerinden (%20.6) tespit edilmiştir (Aydın ve ark., 2000). Turgut ve ark. yapmış oldukları çalışmada, *P. aeruginosa* izolatlarını; %39.5 ile en sık idrardan ve %37.2 ile ikinci sıklıkta trakeal aspirattan, %20.6 ile üçüncü sıklıkta yara örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir (Turgut ve ark., 2002). Akçay ve ark. çalışmalarında, *P. aeruginosa* izolatlarını %45 ile en sık trakeal aspirat örneklerinden, ikinci sıklıkta %23 ile idrar örneklerinden, üçüncü sıklıkta %21 ile yara örneklerinden elde etmişlerdir (Akçay ve ark., 2003). Yücel ve ark. yaptığı bir çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarını en sık trakeal aspirat ve idrardan (%22), ikinci sıklıkta yaradan (%15), üçüncü sıklıkta balgamdan (%14) izole etmişlerdir (Yücel ve ark., 2006). Çalışmamızda; klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatları, en sık trakeal aspirat örneklerinden (%31), ikinci sıklıkta idrar

örneklerinden (%22,3) ve üçüncü sıklıkta ise balgam örneklerinden (%13,3) izole edilmiştir.

P. aeruginosa izolatlarının servislere göre dağılımının incelendiği Bayramoğlu'nun çalışmasında; *P. aeruginosa* izolatları en sık pediatri servisinden (%32.4), ikinci sıklıkta yoğun bakım ünitesinden (YBÜ) (%9.9), üçüncü sıklıkta ise genel cerrahi servisinden (%7) elde edilmiştir (Bayramoğlu, 2004). Gündüz ve ark. *P. aeruginosa* izolatlarını en sık YBÜ'den (%43.3), ikinci sıklıkta kulak burun boğaz servisinden (%18), üçüncü sıklıkta cerrahi servisinden (%8.6) saptadıklarını bildirmişlerdir (Gündüz ve ark., 2003). Kalem ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise *P. aeruginosa* izolatları en sık YBÜ'den (%33), ikinci sıklıkta cerrahi kliniklerden (%22), üçüncü sıklıkta pediatri servisinden (%16) saptandığı bildirilmiştir (Kalem ve ark., 2008). Bizim çalışmamızdaki sonuçlara göre *P. aeruginosa* izolatları en sık dahiliye servisinden (%14), ikinci sıklıkta beyin cerrahisi servisinden (%12,3) ve üçüncü sıklıkta göğüs hastalıkları servisinden (%10) izole edilmiştir.

P.aeruginosa 5570 open reading frame ile prokaryot dünyasında en geniş genoma sahip bakteridir ve buna bağlı olarak çok yüksek oranda protein sentezi yapmaktadır. Ayrıca genomun protein kodlayan genlerinin %0.3'ü antimikrobiyal dirençle ilgilidir. Genom oldukça esnektir ve %10'u organize olarak patojenite adacıkları meydana getirmekte ve direnç genleri içeren büyük mobil elementleri kolayca alabilmektedirler. Bütün bunlar *P. aeruginosa'nın* yapısal olarak birbiriyle ilişkisiz birçok farklı antimikrobiyal ajana dirençli olmasına neden olmaktadır (Mesaros ve ark., 2007). *P. aeruginosa'daki* antimikrobiyal direncin başlıca nedenleri; düşük dış zar geçirgenliği (bu geçirgenlik *E. coli* bakterisinin dış zar geçirgenliğinin 1/100'ü kadardır), ilaç dışı atıma neden olan aktif efluks pompaları ve betalaktam direncine neden olan kromozomal AmpC betalaktamazıdır (Livermoore, 2001; Strateva ve ark, 2009). Kistik fibrozlu hastalarda enfeksiyon oluşturan *P. aeruginosa* suşlarında ince bir polisakkarit tabaka olan alginatın, aminoglikozitler gibi katyonik antibiyotiklere bağlanarak difüze olmalarına engel olduğu düşünülmektedir, ancak yine de bazı mukoid suşların tümüyle

aminoglikozitlere duyarlı oldukları da görülmüştür (Nichols ve ark., 1988; Ciofu ve ark., 2001).

Kinolonlar bakterisidal ajanlar olup, DNA sentezi inhibisyonu yoluyla etki gösterirler (Wolfson ve Hooper, 1989). Kinolonların DNA sentez inhibisyonu için iki hedef enzimleri bulunmaktadır. Bu enzimler; DNA giraz ve topoizomeraz IV'tür. DNA giraz enziminde gyrA ve gyrB; topoizomeraz IV enziminde parC ve parE olmak üzere iki alt ünite bulunmaktadır. Kinolonlar DNA-DNA giraz kompleksini veya DNA-topoizomeraz IV kompleksini stabilize ederek etki gösterirler (Hooper, 2000 ve Ruiz, 2003). İlk kullanıma giren kinolon nalidiksik asit olup 1,8-naphthyridine yapısındadır (Hooper, 2005). Nalidiksik asit antimalaryal bir ajan olan klorokinin sentez ve saflaştırma çalışması sırasında keşfedilmiştir (Ruiz, 2003). Sonrasında ilk kuşak kinolonlar olan pipedemik asit ve oksolinik asit kullanıma girmiş ancak kısıtlı endikasyondan dolayı yaygın kullanım alanı bulamamışlardır. İkinci kuşak kinolonlar ise florokinolonlar olup kinolon çekirdeğindeki 6. karbon atomuna flor atomu eklenmesiyle oluşmuşlardır. Florokinolonlar özellikle gram negatif bakterilere karşı daha güçlü olmakla beraber aynı zamanda gram pozitif bakterilere karşı da (*S. aureus* gibi) etkinliğe sahiptirler. Siprofloksasin *P. aeruginosa*'ya karşı en etkili kinolondur. Yeni kuşak kinolonlar olan levofloksasin, moksifloksasin ve sparfloksasinde gram pozitif etkinlik özellikle *S. pneumoniae*'ya karşı ve anaerobik bakterilere karşı artmıştır. Genişlemiş spektrumlarına bağlı olarak kinolonlar gerek oral yolla gerek intravenöz yolla birçok enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Cattoir ve Nordmann, 2009; Paton ve Reeves, 1988; Van Bambeke ve ark., 2005; Andriole, 2005). Bu yaygın kullanıma bağlı olarak kinolonlara direnç gelişimi de artmaktadır. Kinolonlara karşı direnç gelişiminde son yıllara kadar başlıca mekanizmalar DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerinde meydana gelen kromozomal mutasyonlar ile membran geçirgenliğinde azalma ve/veya efluks pompa sistemlerinin aşırı çalışması nedeniyle azalmış birikimdir (Ruiz, 2003; Hernandez ve ark., 2011). Ancak 1998 yılında plazmit aracılı kinolon direncine neden olan qnr geninin bulunmasıyla kinolon direnç mekanizmalarına yeni bir direnç mekanizması daha eklenmiştir (Martinez-Martinez ve ark., 1998). Qnr proteinlerinin DNA girazı ve topoizomeraz IV'ü kinolonların etkisinden koruduğu düşünülmektedir (Tran ve Jacoby, 2002). Qnr genlerinin ilk tespitinden bugüne kadar

farklı alt tiplerinde olduğu zaman içinde görülmüştür. İlk tespit edilen qnr geni qnrA olarak adlandırılmış ve zaman içinde qnrB, qnrS, qnrC ve qnrD genleri de tespit edilmiştir (Strahilevitz ve ark., 2009). Qnr genleri haricinde 2007 yılında plazmit aracılı efluks pompası olan qepA geni Japonya'dan tanımlanmıştır (Yamane ve ark., 2007). 2005 yılında qnrA geni taşıyan bir *E. coli* izolatında alışılmadık siprofloksasin MİK değerlerinin tespiti nedeniyle plazmit DNA'sının random transpozon mutagenesinde aac(6')-Ib geni tespit edilmiş, yapılan sekans işleminde bu allelin aac(6')-Ib'den iki kodon farklı olduğu anlaşılmış ve siprofloksasin direnci nedeniyle aac(6')-Ib-cr olarak adlandırılmıştır (Robiscek ve ark., 2006; Stratilevitz ve ark., 2009). Bugün için 7 tane qnrA, 27 tane qnrB, 1 tane qnrC, 2 tane qnrS ve 1 tane qnrD genleri tanımlanmıştır (Herrera-Leon ve ark., 2010; Fulguires ve ark., 2011). Qnr genlerinin su kökenli *Shewenella* spp. ve *Aeromonas* spp. izolatlarının kromozomlarında bulunması bu genlerinin kaynağının sular olabileceğini düşündürmektedir (Stratilevitz ve ark., 2009).

Kinolon direnci artan kullanıma bağlı olarak *P. aeruginosa* klinik izolatlarında giderek artmaktadır (Hooper, 2005). *P. aeruginosa* izolatlarında kinolon direncinin araştırıldığı bir çalışmada 1996 yılında 199 *P. aeruginosa* izolatında siprofloksasin direnç oranını %40 olarak saptamışlardır (Özgenç ve ark., 2002). Yapılan başka bir çalışmada ise siprofloksasin direnç oranı %13.8 olarak bulunmuştur (Mansuroğlu ve ark., 1998). Pullukçu ve ark. 2000-2003 yıllarını kapsayan çalışmalarında ise siprofloksasin direnç oranlarını 2000 yılında %27.5, 2001 yılında %33.9, 2002 yılında %15, 2003 yılında ise % 10 olarak bulmuşlardır (Pullukçu ve ark., 2006). Dündar ve ark.'nın 2005-2007 yıllarını kapsayan çalışmalarında 665 *P. aeruginosa* izolatında siprofloksasin direnç oranını %35 olarak saptamışlardır (Dündar ve ark., 2009). Özdemir ve ark. yaptıkları bir çalışmada 158 izolatta siprofloksasin direncini %44 olarak bulmuşlardır (Özdemir ve ark., 2008). Biz de altı aylık süre zarfında izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında siprofloksasin direnç oranı %21.3 olarak saptadık.

Ülkemizde farklı merkezlerde *Enterobacteriaceae* ailesinde qnr genleri araştırılmıştır (Tablo XVIII). Nazik ve ark. tarafından 2005'te yapılan bir çalışmada 49 izolatta qnr A gen bölgesi araştırılmış ve bir *E. cloacae*, bir de *C. freundii* izolatında qnrA geni tespit edilmiştir (Nazik ve ark, 2005). Daha sonra kan

kültürlerinden izole edilen 356 *Enterobacteriaceae* üyesinde *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genlerinin varlığı araştırılmış, 61 izolatta *qnrA*, 3 izolatta *qnrS* geni saptanmıştır (Öktem ve ark., 2008). Yoğun bakım hastalarından izole edilen toplam 460 gram negatif bakteride *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* genleri araştırılmış, üç (% 0.65) *E. cloacae* izolatında 1 *qnrB1* ve 2 *qnrS1* geni saptanmıştır (Nazik ve ark., 2008). Türkiye’de farklı hastanelerden izole edilen ve toplam 248 *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatında *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6’)-Ib-cr* genlerinin sıklığı araştırılmış ve 1 *K. pneumoniae* izolatında farklı plazmitler üzerinde *qnrB1* ve *aac(6’)-Ib-cr* genleri saptanmıştır (Poirel ve ark., 2008).

Tablo XVIII: Türkiye’den bildirilen plazmit aracılı kinolon direnci çalışmaları.
(Nazik ve Öngen, 2010).

Araştırmacılar	İzolasyon yılı	İncelenen Toplam suş sayısı	İncelenen Bakteriler	Araştırılan genler	Bulgular
Nazik ve ark.	2002-2004	49	<i>E. coli</i> (36) <i>K.pneumoniae</i> (7) <i>Enterobacter spp.</i> (4) <i>Citrobacter spp.</i> (2)	qnrA	<i>E.cloacae</i> qnrA(n:1) <i>C.freundii</i> qnrA(n:1)
Avşaroğlu ve ark.	2005-2006	9	<i>S.virchow</i> (9)	qnrA qnrB qnrS	<i>S.Virchow</i> qnrS1(n:3)
Nazik ve ark.	2000,2006	460	<i>E.coli</i> (117) <i>K.pneumoniae</i> (108) <i>Acinetobacter spp.</i> (81) <i>Pseudomonas spp.</i> (72) <i>Enterobacter spp.</i> (30) Non-fermentatif Gram negatif basil(22) <i>P.mirabilis</i> (9) <i>Serratia spp.</i> (8) <i>K.oxytoca</i> (6) <i>P.vulgaris</i> (5) <i>Citrobacter spp.</i> (2)	qnrA qnrB qnrS	<i>E.cloacae</i> qnrB1(n:1) qnrS1(n:2)
Öktem ve ark.	2004	78	<i>E.coli</i> (34) <i>K.pneumoniae</i> (44)	qnrA qnrB qnrS	<i>K.pneumoniae</i> qnrA(n:4) <i>E.coli</i> qnrA(n:1)
Poirel ve ark.	2006	248	<i>E.coli</i> (138) <i>K.pneumoniae</i> (110)	qnrA qnrB qnrS aac(6’)-Ib-cr	<i>K.pneumoniae</i> qnrB1(n:1) aac(6’)-Ib-cr (n:39)
Öktem ve ark.	2005-2006	356	<i>Enterobacteriaceae</i>	qnrA qnrB qnrS	qnrA(n:6) qnrB(n:3)
Öngen ve Nazik	2008	61	<i>Campylobacter spp.</i>	qnrA qnrB qnrS	saptanmadı saptanmadı saptanmadı
Nazik ve ark.	2006-2007	1044	<i>E.coli</i> (694) <i>K.pneumoniae</i> (243) <i>Acinetobacter spp.</i> (37) <i>Pseudomonas spp.</i> (29) <i>K.oxytoca</i> (18) <i>Enterobacter spp.</i> (15) <i>S.maltophilia</i> (7) <i>Salmonella spp.</i> (1)	qnrA qnrB qnrS aac(6’)-Ib-cr	<i>K.pneumoniae</i> qnrA(n:1) qnrB(n:2) qnrS(n:2) <i>E.coli</i> qnrA(n:3) qnrB(n:2) qnrS(n:1) <i>Enterobacterspp.</i> qnrA(n:4) qnrS(n:1)

Kaynak	İzolasyon yılı	İncelenen Toplam suş sayısı	İncelenen Bakteriler	Araştırılan genler	Bulgular
Özgümüş ve ark.	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)	qnrA qnrB qnrS	<i>E.coli</i> qnrS(n:1) <i>K.pneumoniae</i> qnrS(n:1)
Çoban ve ark.	2010	110	<i>P.aeruginosa</i>	qnrA qnrB qnrC qnrS aac(6')-Ib-cr	saptanmadı saptanmadı saptanmadı saptanmadı saptanmadı
Çoban ve ark.	2011	647	<i>Enterobacteriaceae</i>	qnrA qnrB qnrC qnrS aac(6')-Ib-cr	<i>E.cloacae</i> qnrA1(n:1) Salmonella serogrupB qnrA1(n:1) qnrB1(n:1) <i>E.coli</i> qnrB6(n:1) qnrB9(n:1) qnrS1(n:1) <i>C.freundii</i> qnrB1(n:1) qnrB27(n:1) <i>C.koseri</i> qnrB24(n:1)

Dünya’da da qnr genlerinin ilk tespitinden itibaren birçok çalışmada qnr genleri araştırılmıştır. Qnr genleri özellikle Enterobacteriaceae ailesinde araştırılmış ve bugüne kadar birçok farklı izolatta saptanmıştır. Bu izolatlar içinde *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *Providencia stuartii*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp. bulunmaktadır. Yapılan ilk çalışmalarda qnr genleri *E. coli* izolatlarında daha fazla tespit edilse de son yapılan geniş çaplı çalışmalarda *Enterobacter* spp. ve *Klebsiella* spp. izolatlarındaki sıklık *E. coli* izolatlarını geçmiştir. Yapılan çalışmalarda qnrA, qnrB, qnrS ve aac(6’)-Ib-cr sıklığı sırasıyla %1.5, %4.6, %2.4 ve % 10.8 olarak tespit edilmiştir. *Enterobacteriaceae* üyelerini içeren çalışmalarda aac(6’)-Ib-cr en sık *E. coli* izolatlarında tespit edilmiştir. QepA geni ilk olarak Japonya’da *E. coli* izolatında tespit edilmesinin ardından sonraki yıllarda yapılan

çalışmalarda İngiltere, Çin, Fransa, Kore'de saptanmıştır. Ayrıca qepA geni *E. coli* dışında *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii* ve *S. marcescens* izolatlarında da tespit edilmiştir (Strahilevitz ve ark., 2009).

P. aeruginosa'da aminoglikozitlere karşı direnç gelişimi plazmit aracılı veya kromozomal olan enzimlerle aminoglikozitlerin inaktivasyonu ve hücre içi alım veya birikimin azalması sonucu oluşmaktadır. Aminoglikozitleri inaktive eden enzimler fosforilasyon, asetilasyon ve adenilasyon sonucu inaktivasyon işlemini gerçekleştirmektedir. Aminoglikozit asetilasyonunda rol alan enzimler 'aac' olarak adlandırılmakta ve asetilasyon yaptıkları amino grubu sırasına göre de 1, 3, 6',2' olarak tanımlanmaktadır. *P. aeruginosa*'da aac(3) ve aac(6') aminoglikozit asetilasyonunda en sık karşılaşılan enzimlerdir. Aac(6') enzimi tobramisin, netilmisin, kanamisin ayrıca aac(6')-I enzimi amikasin, aac(6')-II enzimi de gentamisin antimikrobiyallerini inaktive etmektedir. Aac(6')-Ia, aac(6')-II'ye göre daha az sıklıkta görölmektedir. Aac(6')-Ia'nın varyantı olan aac(6')-Ib ise amikasin direncine neden olmamakta ve klinik izolatlarda tobramisin direncine neden olmaktadır (Galimand ve ark., 1993; Poole, 2005). Bizim alışmamızda aac(6')-Ib geni saptadığımız izolatlar beklendiği gibi tobramisine dirençli saptanmıştır. Amikasine ise 5 izolat duyarlı bir izolat ise orta duyarlı olarak bulunmuştur. Bizim izolatlarımızın hepsi gentamisine dirençli bulunmuştur. Ancak gentamisin direncine esas olarak aac(6')-II'nin neden olması nedeniyle bu izolatlarda ek bir aminoglikozit direnci olabileceğini düşünülmektedir. 2006 yılında aac(6')-Ib enziminden iki aminoasit farklılığı olan ve bu farklılık neticesinde piperazinil amino grubu içeren siprofloksain ve norfloksasini asetile ederek kinolon direncine neden olan aac(6')-Ib-cr enzimi bulunmuştur (Robiscek ve ark., 2006). Bu enzimi kodlayan gen bölgesinin qnr genleriyle birlikte bulunması yüksek düzey kinolon direncine neden olmaktadır (Stratilevitz ve ark., 2009). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Enterobacteriaceae*'da qnr genleri ile birlikte aac(6')-Ib-cr'de araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda aac(6')-Ib-cr determinantları sıklıkla qnr determinantlarından daha yüksek oranda saptanmıştır. Ayrıca aac(6')-Ib-cr genlerinin qnr genleriyle birlikte saptanma oranının qnr içermeyen izolatlara oranla daha fazla olduğu görölmüştür (Jiang ve ark., 2008; Karah ve ark., 2010). Poirel ve ark. tarafından yapılan ve ölkemizden izole edilen *K. pneumoniae* izolatında aac(6')-Ib saptanmıştır. Aktepe ve ark.

tarafından yapılan ve 112 *E. coli* izolatının çalışıldığı bir çalışmada 67 izolatta aac(6')-Ib-cr geni saptanmıştır (Aktepe ve ark., 2012). Ülkemizde daha önce Nazik ve ark. ayrıca Çoban ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa* klinik izolatlarında aac(6')-Ib-cr geni saptanmamıştır (Nazik ve ark., 2009; Çoban ve ark., 2011).

Qnr determinantları bugüne kadar *Enterobacteriaceae* ailesine ait birçok bakteriden izole edilmekle beraber sıklıkla *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *E. coli* ve *Salmonella enterica* izolatlarından izole edilmiştir. Bu determinantların prevalansı %0.2 ile %94 arasında değişmektedir. Bu kadar değişken oranların alınmasının nedeni çalışmalardaki suş seçim kriterleri nedeniyle (GSBL taşıyan bakteriler, seftazidim, nalidiksik asit direnci gibi) olduğu düşünülmektedir (Cattoir ve Nordmann, 2009). Plazmitle aktarılan kinolon direncine neden olan genler bugüne kadar *Enterobacteriaceae* üyeleri dışında *P. aeruginosa* izolatlarında da araştırılmış ancak saptanamamıştır (Çoban ve ark., 2011; Nazik ve ark. 2008; Nazik ve ark. 2009; Ahmed ve ark., 2007). Martinez ve ark. deneysel olarak qnr geni taşıyan pMG252 plazmitini *P. aeruginosa* PU21 suşuna aktarmışlardır. Plazmit aktarımından sonra PU21 suşunun siprofloksasin MİK değerinin 0.125 µg/ml'den 0.5 µg/ml'ye, levofloksasin MİK değerinin 0.5 µg/ml'den 2 µg/ml'ye, norfloksasin MİK değerinin 0.5 µg/ml'den 2 µg/ml'ye çıktığı görülmüştür (Martinez ve ark., 1998). Bu sonuçlara göre henüz *P. aeruginosa* klinik izolatlarında plazmit aracılı kinolon direnci tespit edilememiş olsa dahi deneysel olarak bu plazmitin aktarılabilmesi qnr genlerinin *P. aeruginosa* izolatlarına da geçebileceğini göstermektedir. Bu sonuç gelecekte qnr genlerinin *P. aeruginosa* izolatları arasında da yayılarak diğer direnç mekanizmaları ile birlikte tedavide kinolonların kullanımını sınırlandırabilecek olarak görülmektedir. Bunlara ilave olarak 2007 yılında bir hayvanat bahçesindeki çeşitli hayvanlara ait örneklerden izole edilen gram negatif bakterilerde yapılan bir çalışmada 10 izolatta qnr genleri tespit edilmiştir. Bu izolatlardan biri de kaplumbağadan izole edilen ve qnrB geni taşıyan *P. fluorescens* izolatıdır. Bu izolatın nalidiksik asit ve trimetoprim-sulfometaksazole dirençli olduğu saptanmıştır. Bu çalışma ilk kez bir *Pseudomonas* izolatından qnr geninin izole edildiği çalışmadır (Ahmad ve ark., 2007). Ardından Tran ve ark.'ı 2010 yılında ticari olarak satılan dondurulmuş çiğ karideslerden izole ettikleri *P. putida* izolatlarının ikisinde qnrA ve

qnrB genlerini izole etmişlerdir. Bu çalışmada, *P. putida* izolatlarından ekstrakte edilen plazmitler *E. coli* J53 suşuna aktarılmış ve bu suşta nalidiksik asit MİK değerinin 8 µg/ml'den 32 µg/ml'ye yükseldiği, siprofloksasin MİK değerinin de 0.06 µg/ml'den 0.25 µg/ml'ye yükseldiği görülmüştür (Tran ve ark.,2010). Qnr genlerinin kaynağının sular olabileceği düşünülmektedir bu bağlamda qnr saptanan *Pseudomonas* izolatlarının su kökenli hayvanlardan izole edilmiş olması da dikkat çekmektedir.

QnrA Enterobacteriaceae dışı bakterilerden tespit edilmemiş olmasına karşın, qnrS ise su kökenli *Aeromonas* spp. izolatlarında tanımlanmıştır (Ahmed ve ark., 2007; Cattoir ve ark., 2008; Sanchez-Cespedes ve ark.,2008).

Çalışmamızda 300 *P. aeruginosa* klinik izolatında qnr, qepA ve aac(6')-Ib-cr genlerini PZR yöntemiyle araştırıldı. Qnr ve qepA pozitif izolat saptanamadı. Ancak aac(6')-Ib genini altı izolatta (P2, P64, P65, P71, P213, P229) saptandı. Bu izolatlardan P2, P64 ve P65 siprofloksasin duyarlı iken; P71, P213 ve P229 ise dirençli idi. Aac(6')-Ib-cr varyantının araştırılması için aac(6')-Ib taşıdığı tespit edilen 6 izolat sekans işlemine tabi tutuldu. Sekans sonucunda genlerin aac(6')-Ib-cr varyantı olmadığı tespit edildi. Çalışmamız *P. aeruginosa* klinik izolatlarında qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qepA ve aac(6')-Ib-cr determinantlarının araştırıldığı ülkemizdeki ilk çalışma olmaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıp Laboratuvarları Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Altdisiplin Laboratuvarı'na, Kasım 2009-Nisan 2010 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 300 *P. aeruginosa* izolatu test edildi.
- *P. aeruginosa* izolatlarının en sık izole edildiği örnek türü %31,4 ile trakeal aspirat olup bunu %22,4 ile idrar ve % 13,3 balgam örnekleri takip etti.
- *P. aeruginosa* örneklerinin büyük bölümü dahiliye (%14) ve beyin ve sinir cerrahisi servislerinden (%12,3) gönderilmiş ve bu servisleri göğüs hastalıkları servisi (%10) izlemiştir.
- *P. aeruginosa* izolatlarının %21,4'nün (n=64) siprofloksasin dirençli, %2,6'sının (n=8) orta duyarlı, %76'sının (n=228) ise duyarlı olduğu saptandı.
- Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* izolatlarında multipleks PZR yöntemiyle araştırılan qnrA, qnrB, qnrS ve qnrC genleri saptanmadı.
- Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* izolatlarında PZR yöntemiyle araştırılan qepA geni saptanamadı.
- Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* izolatlarının 6'sında PZR yöntemiyle araştırılan aac(6')-Ib geni saptandı. Sekans işlemi sonucunda aac(6')-Ib-cr varyantı 6 izolatta da saptanmadı.
- Aac(6')-Ib geni taşıyan izolatların hepsi gentamisin ve tobramisin dirençli, 6 izolattan 5'i amikasin duyarlı iken 1 izolat orta duyarlı olarak saptandı.
- Çalışmamızda plazmit aracılı kinolon direnci saptanmamıştır. Ancak yakın zamanda *P. fluorescens* ve *P. putida* izolatlarında qnrB'nin saptanmış olması bu genlerin önümüzdeki yıllarda *P. aeruginosa* izolatlarında da

saptanabileceğine dair dikkatli olunması gerektiğini ve surveyans çalışmalarıyla direnç takiplerinin devam ettirilmesi gerektiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Acar JF, Goldstein FW. 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. Clin Infect Dis, 24, 67-73.
- Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watarabe H, Fukumoto Y, Shimomoto T. 2007. Zoo animals as reservoirs of gram negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. Appl Environ Microbiol, 73, 6686- 6690.
- Akçay SS, Topkaya A, Oğuzoğlu N. 2003. Hastane enfeksiyon etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında imipenem ve meropenem duyarlılığı. İnfek Derg, 17, 465-469.
- Aktepe OC, Aşık G, Çetinkol Y, Biçmen M, Gülay Z. 2012. Escherichia coli suşlarında plazmide bağlı kinolon direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bult, 46(1):9-16.
- Andriole VT. 2005. The quinolones: past, present and future. Clin Infect Dis, 41, 113-119.
- Appelbaum PC, Hunter PA. 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. Int J Antimic Agents, 16, 5-15.
- Arı Ş. 2008. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması. Temizkan G, Arda H. Editörler, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 2. Baskı, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevi, 101-120.
- Arda M. 2008. Kinolonlar, Leblebicioğlu H, Usluer G. Güncel bilgiler ışığı altında antibiyotikler, 497-512, Güneş Kitabevi.
- Arsene S, Leclercq R. 2007. Role of a qnr-like gene in the resistance of Enterococcus faecalis to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother, 51, 3254-3258.
- Aydın K, Çaylan R, Köksal İ, Volkan S, Öksüz R. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı. Hastane İnfek Derg, 4, 92-96.
- Azap Ö, Timurkaynak F. 2004. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen nonfermentatif gram negatif bakterilerde siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasinin in vitro etkinliğinin karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi Mecmuası, 57(4):189-194.
- Baron EJ, Finegold SM. 1990. Diagnostic Microbiology. St. Louis CV Mosby, 148-386.
- Bayramoğlu G. 2004. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin meropenem duyarlılıklarının değişik yöntemlerle araştırılması. Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD, Uzmanlık tezi.

- Bergagne E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram negative bacilli. 2006. In: Infectious Diseases, Colman J, Powerduly GW. 2nd Ed., Toronto, 1733-1748.
- Bilgehan H. 2000. Non fermentatif gram olumsuz basiller. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. Barış yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 10. Basım, 175-197.
- Blondel- Hill M, Henry DA, Speert PD. 2007. *Pseudomonas*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed. Volume 1, ASM press Washington, DC, 734-748.
- Boromo RA, Szobo D. 2006. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis.43, 49-56.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA.2001. Javetz, Melnick &Adelsberg's Medical Microbiology, Appleton &Lange, 22nd Ed.pp. 229-234.
- Cattior V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. Emerg Infect Dis, 14, 231- 237.
- Cattoir V, Nordmann P. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram negative bacterial species: An update. Curr Med Chem,16, 1028-1046.
- Cattoir V,Nordmann P. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram negative bacterial species: An update. Curr Med Chem, 51, 1109- 1117.
- Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestine FM.2009. qnr D, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Kentucky and Bovismorbificans of human origin. Antimicrob Agents Chemother, 53, 603-608.
- Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP.2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. J Bact, 184, 5036-5044.
- Ciofu O, Fusing V, Bagge N, Koch C, Hoiby N. 2001. Characterization of paired mucoid/nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from danish cystic fibrosis patients: antibiotic resistance, β -lactamase activity and ribotyping. J Antimicrob Chemother, 48, 391-396.
- Courvalin P. 1990. Plasmid- mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence? Antimicrob Agents Chemother, 34, 681-684.
- Çoban AY, Tanrıverdi Çaycı Y, Yıldırım T, Erturan Z, Bozdoğan B, Durupınar B. 2011. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas*

aeruginosa strains isolated from cystic fibrosis patients. Mikrobiyol Bul, 45(4),602-608.

Çoban AY, Nohut OK, Tanrıverdi Çaycı Y, Bayramoğlu G, Pirinçcioğlu M, Çetinkaya E, Çekiç Cihan Ç, Bozdoğan B, Durupınar B. 2012. Enterobacteriaceae üyelerinde plazmit aracılı kinolon direncinin araştırılması; çok merkezli bir çalışma. Mikrobiyol Bul, publishahead.

Dolapçı İ. 2006. In vitro nükleik asitlerin amplifikasyon teknikleri. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar(çeviri)'de. Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Ankara, Palme yayıncılık, 43-69.

Drlica K, Zhao X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV and the 4- Quinolones. Microb Mole Bio Rev, 61, 377-392.

Dündar D, Tamer GS. 2009. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: üç yıllık değerlendirme. Ankem Derg, 23(1); 17-221.

Erdem B. 1999. Pseudomonaslar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Mutlu G, Emir T, Cengiz AT, Ustaçelebi S, Tümbay E, Mete Ö. Editörler. Ankara, Güneş Kitabevi, 733-738.

Gayyurhan E, Zer Y, Mehli M, Akgün S. 2008. Yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallobetalaktamaz oranlarının belirlenmesi. İnfeksiyon Derg, 22, 49-52.

Gillespie SH, Hawkey PM. 2006. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. John WY, Sars LY, 2nd Ed., 427-435.

Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seben E. 2004. Türk Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidim duyarlılığının E-test ve disk difüzyon yöntemleri ile araştırılması. 2004. Mikrobiyol Cem Derg, 54, 33-36.

Hancock REW, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resis Up.3, 247- 255.

Hancock REW. 1998. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative Bacteria. Clin Infect Dis, 27, 93-99.

Hansen LH, Jensen LB, Sorensen JH. 2007. Substrate specificity of the OqxAB-multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. J Antimicrob Chemother, 60, 145-147.

Hansen LH, Johannesen E, Burmolle M, Sorensen AH, Sorensen JH.2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 3332-3337.

Haris A, Viera CT, Venkatamon L, DeGiroloni P, Samore M, Carmelli Y.1999. Epidemiology and Clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*, 28, 1128-1133.

Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K. 2005. Cloning of novel gene for plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 801-803.

Hedge SS, Vetting MW, Rederick SL, Mitcherall LA, Maxwell A, Takiff HE, Blanchard JS. 2009. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science*, 308, 1480-1483.

Hernandez A, Sanchez MB, Martinez JL. 2011. Quinolone resistance: much more than predicted. *Front in Microb*, 2, 1-6.

Hooper D. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*, 31, 24-28.

Hooper D. 2005. Quinolones. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed., 451-470, Churchill Livingstone, Elsevier.

http://www.visualphotos.com/image/1x7466919/negatively_stained_pseudomonas_aeruginosa

http://www.diamond.ac.uk/Home/Media/LatestNews/02_07_09a.html

<http://www.androloji.org.tr/guvsbg/icerik.asp?lang>

Jacoby GA, Cattoir V, Hooper D, Martinez-Martinez L, Nordmann P et al. 2008. Qnr gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2297-2298.

Jacoby GA, Chow N, Woites KB. 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone-resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 559-562.

Jacoby GA, Wolsh KE, Mills DM, Waller VJ, Robiscek A, Hooper D. 2006. Qnr B another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 2522-2524.

Jacoby GA.2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, 41, 120-126.

Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh H, Wretlich N. 2000. Molecular mechanisms of flouoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 710-715.

Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, Li L. 2008. Plasmid mediated quinolone resistance determinants qnr qnd aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*, 61; 1003-1006.

Kalem F, Gündem NS, Feyzioğlu B, Arslan U, Tuncer İ. 2008. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnci. *Ankem Derg*, 22, 123- 126.

Karah N, Poirel L, Bengtsson S, Sundqvist M, Kahlmeter G, Nordmann P, Sundsfjord A et al. 2010. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Norway and Sweden. *Diag Microbiol Infect Dis*, 66; 425-431.

Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper D. 2009. Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance determinants over a 9- year period. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(29, 639-645.

Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA et al.2009. OqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 3582-3584.

Kılıç A. 2009. Mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle tespit edilmesi ve tanımlanması. *Klinik Mikrobiyoloji (çeviri)*, Başustaoğlu A, Kuba A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M, 9. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık, 1762- 1788.

Köksal K. 2001. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, Durmaz R, 2. Baskı, Ankara, Nobel tıp kitabevi, 15-34.

Lambert PA. 2002. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*, 41, 22-26.

Li J, Nation RU, Milne RW, Tumidge JD, Coulthard K. 2005. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 25, 11-25.

Li XZ, Nikaido H. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64, 159-204.

Li XZ. 2005. Quinolone resistance in bacteria. Emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents*, 25, 453-463.

- Livermore DM, 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis, 34, 634-640.
- Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. 2001. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanism from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001; 48, Suppl, S 1: 87- 102.
- Mansuroğlu H, Toysı B. 1998. eşitli klinik örneklere izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının florokinolonlara in vitro duyarlılıkları. Mikrobiyol Bult, 32: 301-307.
- Martinez- Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet, 14, 797-799.
- Mesaros N, Nordmann P, Pleisat P, Roussel- Delvallez M, Eldere VJ et al. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and threupatic options at the turn of the new millenium. Clin Microbiol Infect, 13, 560- 578.
- Miller GH, Sabotelli FJ, Hare RS. 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms-changes with time and geographic area: a reflction of aminoglucoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. Clin Infect Dis, 24,46-62.
- Murray P, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2008. Medical Microbiology. Elsevier-Mosby 7th Ed.358-367.
- Murshi MH, Haider K, Rahaman MM, Sack DA, Ahmed ZU, Maershed MG. 1987. Plasmid-mediated resistnace to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. Lancet,ii, 854-855.
- Nazik H, ngen B.2011. Türkiye’de plazmit aracılı kinolon direnci. Klimik Derg, 22, 45-56.
- Nazik H, ngen B, Kuvat N. 2008. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance among isolates obtained in a Turkish intensive care unit. Jpn Infect Dis, 61, 310-312.
- Nazik H, Poirel L, Nordmann P. 2005. Further identification of plasmi mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. Antimicrob Agents Chemother, 49(5), 2146-2147.
- Nazik H, İlhta M, ngen B. 2009. Prevalence of qnrA, qnrB, qnrS and aac(6’)-Ib-cr (in qnr-positive isolaates) among the ESBL-positive and/or ciprofloxacin-resistant isolates in Turkey, J Chemother, 21(2):219-21.

- Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL.1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother*, 32, 518- 523.
- Nikado H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram negative bacteria. *J Bact*, 178, 5833- 5839.
- Ohl CA, Pollack M. 2007. Infections due to *Pseudomonas* species and Related organisms. In: Harrison's principles of Internal Medicine,16th Ed., 1222-1246.
- Oram M, Fisher LM. 1991. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemo*,35, 387-389.
- Öktem İMA, Gulay Z, Bicmen M, Gur D, HITIT Project study Group. 2008. Qnr A prevalence in extended-spectrum beta-lactamase positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis*, 61, 13-17.
- Ökten İMA, Biçmen M, Gülay Z. 2008. Kan kültürlerinden soyutlanan *Enterobacteriaceae* izolatlarında plazmit ilişkili kinolon direnci genlerinin saptanması, 8.Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, Program ve Özet Kitabı, P28, Türk Mikrobiyoloji Cem. Yayını, İstanbul.
- Özdemir M, Erayman İ, Türk Dağı H, Baykan M, Baysal B. 2009. Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Ankem Derg*, 23(3):122-126.
- Özgenç O, Urbarlı A. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antimikrobiyallere direnç oranlarının araştırılması. *İnf Derg*, 16(2):179- 184.
- Özkalay H, Ağuş N. 2006. *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılığındaki değişim. *Ankem Derg*, 20(3): 159-163.
- Pan XS, Fisher LM. 1996. Targeting of DNA gyrase in streptococcus pneumoniae by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 471-474.
- Park CH, Robiscek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper D. 2006. Prevalence of *aac(6')Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme in the United States. *Antimicrob Agents Chemo*, 50, 11, 3953-3955.
- Paton JH, Reeves DS. 1988. Fluoroquinolone antibiotics. *Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. Drugs*, 36, 193- 228.

- Perichon B, Courvalin M. 2007. Transferable resistance to aminoglycoside by methylation of 61405 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by qepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 2464-2469.
- Pier G. 2005. Application of vaccine technology to prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Vaccine*, 54, 645-656.
- Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Hammeri H, Liard A, Nordmann P. 2005. Orgine of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnrA. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 3091-3094.
- Poirel L, Gur Di Minarini L, Arslan U, Nordmann P. 2008. Molecular epidemiology of plasmid mediated quinolone resistance determinants in extended spectrum betalactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates from Turkey, 18th European Congress of Clinical Microbiology and infectious Diseases, P1527, Barcelona.
- Pollack M. 2005. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practises of Infectious Diseases*, 7th ed. Pp.1673-1690, Elsevier Chirchill Livingstone Philadelphia.
- Poole K, Tetra K, Zhao Q, Neshat S.1996. Expression of the multidrug resistance operon MexA- Mex B operon expression. *Antimicrob Agents Chemother*,40, 2021-2028.
- Poole K. 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*,49, 479- 487.
- Pratt L, Kolter R. Genetic analyses of Bacterial Biofilm Formation. *Curr Opin Microbiol*.2, 598-603.
- Pullukçu H, Aydemir Ş, Turhan A, Tunger A, Özinel MA, Ulusoy S. 2006. Normalde steril örneklerden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları: beş yıllık sonuçlarının değerlendirilmesi. *İnf Derg*, 20(2): 111- 116.
- Robiscek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macirelog M, Abbanot D. Hooper D. 2006. Fluoroquinolone modifying enzyme: a new adaptation of common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*,12, 83- 88.
- Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Briales A, Garcia I, Conejom C et al. 2008. Qnr like pentapeptide repeat proteins in grampositive bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 61, 1240-1243.

- Sanchez-Cespedes J, biasco MD, Manti S, Alba V, Alcaide E. 2008. Plasmid mediated qnrS2 determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2990-2992.
- Salyers AA, Witt DD. 1994. *Pseudomonas aeruginosa*, Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington DC, 26-270.
- Sorensen AH, Hansen LH, Johannesen E, Sorensen JH. 2003. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 798-799.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper D, Robiscek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microb Rev*, 22, 664-689.
- Strateva T, Yordonov D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*- a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Mic*, 58, 1133-1148.
- Takei M, Fukudo H, Kishii R, Hosaka M. 2001. Target preference of 15 quinolones agents on *Staphylococcus aureus*, based on antimicrobial activities and target inhibition. *Antimicrob Agents Chem*, 45, 3544- 3547.
- Topdahl M, Hammerum AM, Zachariassen C, Nielsen EM. 2009. Detection of qnr genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. *J antimicrob Chemother*, 63, 406-408.
- Tran JH, Jacoby GA, Hooper D. 2005. Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 118-125.
- Tran QT, Nawaz MS, Deck J, Nguyen NT, Cerniglia CE. 2010. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Pseudomonas putida* Isolates from Imported Shrimp. *Appl Environ Microbiol*, 77, 5, 1885-1887.
- Turgut H, Turhanoglu M, Çetin ÇB, Yalçın AH. 2002. Hastane enfeksiyon etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının bazı antibiyotiklere direnci. *İnfek Derg*, 16, 63-66.
- Turnidge J. 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs*, 58, 29-36.
- Vahaboğlu H, Akhan SÇ. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Cilt 2. Editörler: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, pp. 1008- 1024.
- Vila J, Ruiz J, Goni P, Angeles M. 1995. Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, pp.1201-1203.

- Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Hooper D. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC1, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 1892-1897.
- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Sixth Ed., Lippincott Williams & Wilkins. 2006.
- Wolfson JS, Hooper D. 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microb Rev*, 2, 378-424.
- Yamane K, Wochino J, Suzuki S, Kimura K, Shibato N et al. 2007. New plasmid-mediated quinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Chemother*, 51, 3354-3360.
- Yoshida H, Bagaki M, Nakamura M, Nakamura S. 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyr A gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 1271-1273.
- Yoshido H, Bagaki M, Nakamura M. 1991. Quinolone resistance- determining region in the DNA gyrase gyrB gene of *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35, 1647-1650.
- Yoshimura F, Nikaido H. 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic isolates. *J Bact*, 152, 636-643.
- Yücel M, Yavuz T, Kaya D, Behçet M, Öztürk E, Şahin İP. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnç oranlarının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi. *Ankem Derg*, 20, 152-155.

