

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLMİŞ
KİNOLON DİRENÇLİ *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İZOLATLARINDA
PLAZMİD ARACILI KİNOLON DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Hikmet ÖZTEL OCAK

Trabzon – 2014

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLMİŞ
KİNOLON DİRENÇLİ *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İZOLATLARINDA
PLAZMİD ARACILI KİNOLON DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Dr. Hikmet ÖZTEL OCAK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Faruk AYDIN

Trabzon – 2014

Çok kıymetli
babam Hüseyin ÖZTEL'e

ÖNSÖZ

En zor anlarımda kapısını çaldığım, yapıcı eleştirileri ile yardımını hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Faruk AYDIN'a anlayışı ve desteği için teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında sıcak ilgisini, desteğini ve bilgilerini benden esirgemeyen, tez çalışmalarımın büyük bir titizlikle yürütülmesini sağlayan, beni sabırla ve anlayışlı yaklaşımıyla yönlendiren, daima teşvikte ve özveride bulunan değerli hocam Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK'a sonsuz teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince her kapısını çaldığımda bilgi, yardım ve deneyimlerini benden esirgemeyen hocam Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU' na motive edici desteği, hoşgörüsü ve beni önemseydiği için; yaptığı her iş gibi bizleri ve eğitimimizi de önemseyen Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya iyi niyeti, güler yüzlülüğü, nezaketi ve özverisi için; eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım öğrencisi olmaktan mutluluk ve gurur duyduğum Prof. Dr. İlknur TOSUN'a desteği ve samimiyeti için; eğitimim süresince hoşgörü, tecrübesi ve sevgisiyle varlığını hep yanımda hissettiğim Prof. Dr. Murat ERTÜRK'e bana en zor günlerimde destek olduğu için; tanıma şerefine sonradan nail olabildiğim Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a her gördüğünde halimi hatırlamı sorduğu için; teşekkürü bir borç bilirim.

Destek, samimiyet ve yardımlarından dolayı anabilim dalımızda yüksek lisans, doktora, uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma ve Tıbbi Mikrobiyoloji Rutin Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Eğitimim süresince maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan değerli dostlarım Uzm.Dr. Uğur DİNÇ'e, Uzm.Dr. Yeşim BEŞLİ'ye, Uzm. Dr. Esra ÖZKAYA'ya, Arş. Gör. Dr. Çiğdem GENÇOĞLU ÖZGÜR'e var oldukları için; tez çalışmalarımızın her aşamasını birlikte ve uyum içinde yaptığımız ve kızım gibi gördüğüm Dilek KOCABAŞ'a tatlılığı, güleryüzlülüğü ve yardımseverliği için; tavsiye ve fikirlerine saygı duyduğum sevgili Nejla CEBECİ GÜLER'e, Gülşen ULUÇAM'a, Ahu

KAMBUROĞLU REİS'e bilgi, deneyimlerini paylaştığı ve arkadaşlıkları için tüm samimiyetimle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* pozitif kontrol suşlarını çalışmamızda kullanmak üzere gönderen Doç. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a ve Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e teşekkür ederim.

Desteğini, sevgisini sürekli hissettiğim, hayatımın vazgeçilmez parçaları olan değerli anneme, sevgili kardeşlerime, kayınvalideme, görümcelerime, değerli dostlarıma ve sevgili ablamız Ayşe ASLAN'a tüm samimiyetimle canı gönülden teşekkür ederim.

Evliliğim boyunca bana daima destek olan ve her zaman sabrederek yardımlarını esirgemeyen değerli eşim Ali Murat OCAK'a ve doğduğu andan itibaren ailemize mutluluk katan, neşe kaynağımız biricik kızım Simay OCAK'a bundan sonra daha fazla zaman ayıracağımı ümit ederek teşekkür ediyorum.

Hikmet ÖZTEL OCAK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri	4
2.1.3. Virulans faktörleri	5
2.1.4. <i>Escherichia coli</i> Enfeksiyonları ve Klinik Önemi	6
2.2. <i>Klebsiella</i> spp.	9
2.2.1. Tarihçe	9
2.2.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri	9
2.2.3. Virülans Faktörleri	10
2.2.4. <i>Klebsiella</i> spp. Enfeksiyonları ve Klinik Önemi	11
2.3. Tedavi	13
2.4. Kinolonlar	14
2.4.1. Kimyasal Yapısı	15
2.4.2. Etki Mekanizması	16
2.4.3. Kinolonların Sınıflandırılması ve Antimikrobiyal Aktivitesi	18
2.4.4. Kinolonlara Karşı Direnç Mekanizması	20
2.4.4.1. Hedef Enzimlerde Meydana Gelen Değişiklikler	20
2.4.4.2. Hücrede Kinolon Birikiminde Azalma	22

2.4.4.3. Plazmid Aracılı Kinolon Direnci	22
2.4.4.3.1. <i>qnr</i> Genleri	23
2.4.4.3.1.1. <i>qnrA</i>	23
2.4.4.3.1.2. <i>qnrS</i>	23
2.4.4.3.1.3. <i>qnrB</i>	24
2.4.4.3.1.4. <i>qnrC</i>	24
2.4.4.3.1.5. <i>qnrD</i>	24
2.4.4.3.1.6. <i>qnr</i> Genlerinin Kökenleri	24
2.4.4.3.1.7. Qnr Proteinlerinin Etki Mekanizması	25
2.4.4.3.1.8. Qnr Proteinlerinin MİK Üzerine Etkisi	26
2.4.4.3.1.9. Qnr Plazmidleri	27
2.4.4.3.2. <i>aaa(6')-Ib-cr</i> Geni	27
2.4.4.3.3. Plazmid Aracılı Eflüks Pompa Genleri	28
2.4.4.3.3.1. <i>qepA</i> Geni	28
2.4.4.3.3.2. <i>oqxAB</i> Geni	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Çalışma Grubu	30
3.1.2. Araç ve Gereçler	30
3.1.3. Kimyasallar	31
3.1.4. Besiyerleri	31
3.1.5. Solüsyonlar	32
3.1.5.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar	32
3.1.5.2. Master Mix İçin Kullanılan Solüsyonlar	33
3.1.5.3. Agaroz Jel Elektrofrezisi İçin Kullanılan Solüsyonlar	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri	34
3.2.2. Moleküler Yöntemler	35
3.2.2.1. DNA İzolasyonu	35
3.2.2.2. PMQR Genlerinin Varlığını Araştırmak İçin Kullanılan Primerler	36
3.2.2.3. Master Mix Solüsyonunun Hazırlanması	37
3.2.2.4. PCR ile Amplifikasyon	38
3.2.2.5. Agaroz Jel Elektrofrezisi ve Görüntüleme	38

4. BULGULAR	39
4.1. İzolatların Genel Özellikleri	39
4.2. İzolatların Antibiyotik Direnç Durumu	41
4.2.1. <i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella</i> spp. İzolatlarının Antibiyotik Direnç Oranları	46
4.3. PCR Yöntemiyle PMQR Genlerinin Araştırılması	47
4.3.1. <i>qnrA</i> Geninin Araştırılması	47
4.3.2. <i>qnrB</i> Geninin Araştırılması	47
4.3.3. <i>qnrC</i> Geninin Araştırılması	47
4.3.4. <i>qnrD</i> Geninin Araştırılması	48
4.3.5. <i>qnrS</i> Geninin Araştırılması	48
4.3.6. <i>qepA</i> Geninin Araştırılması	48
4.3.7. <i>aac(6')-Ib</i> Geninin Araştırılması	48
4.3.8. <i>oqxAB</i> Eflüks Pompa Genlerinin Araştırılması	49
4.3.8.1. <i>oqxA</i> Geninin Araştırılması	49
4.3.8.2. <i>oqxB</i> Geninin Araştırılması	49
4.4. Çalışma Grubuna Ait PCR Sonuçları	50
4.5. PMQR Genlerinin Dağılımı	53
4.6. Direnç Genlerin Birlikte Bulunma Durumları	53
4.7. <i>qnr</i> ve <i>aac(6')-Ib</i> Genlerinin GSBL Varlığına Göre Dağılımı	53
4.8. <i>qnr</i> ve <i>aac(6')-Ib</i> Genlerinin Birlikteliği	54
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
7. ÖZET	74
8. SUMMARY	76
9. KAYNAKLAR	78

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. CLSI'nin <i>Enterobacteriaceae</i> tedavisinde kullanılan antimikrobiyaller tablosu	14
Tablo 2. Kinolonların farmakodinamik özelliklerine göre sınıflandırılması	19
Tablo 3. PMQR genlerinin araştırılmasında kullanılan primerler	36
Tablo 4. PCR için master mix bileşenleri ve miktarları	37
Tablo 5. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan suşlar	38
Tablo 6. Çalışma izolatlarının klinik birimlere göre dağılımı	39
Tablo 7. Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin dirençli suşların izole edildiği hastaların klinik birimlere göre dağılımı	40
Tablo 8. Tüm izolatlarda GSBL ile kinolon direnç durumu	41
Tablo 9. Kinolon dirençli çalışma izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları	43
Tablo 10. Kinolon dirençli izolatlarda tespit edilen plazmid aracılı kinolon direnç genlerinin dağılımı	51
Tablo 11. İzolatlara göre PMQR genlerinin dağılımı	53
Tablo 12. İzolatlardaki PMQR genlerinin birlikte bulunma durumları	53
Tablo 13. İzolatlardaki <i>qnr</i> ve <i>aac(6)-Ib</i> genlerinin GSBL varlığına göre dağılımı	54
Tablo 14. Türkiye'de invaziv <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının florokinolonlara direnç oranları	57
Tablo 15. 2009-2013 yılları arasında ülkemizde yapılmış çeşitli çalışmalarda <i>E. coli</i> izolatlarında belirlenen florokinolon direnç oranları	58
Tablo 16. 2009-2013 yılları arasında ülkemizde yapılmış çeşitli çalışmalarda <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında belirlenen florokinolon direnç oranları	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Bakteriyemi ile ilişkili <i>Enterobacteriaceae</i> insidansı	7
Şekil 2.	<i>Klebsiella</i> spp. virülans faktörlerin şematik gösterimi	11
Şekil 3.	Kinolonların temel yapısı	15
Şekil 4.	Kinolon ve naftiridon molekülünün yapısı	16
Şekil 5.	Tip II topoizomerazların domein yapıları	17
Şekil 6.	Kinolon direnç mekanizmaları	20
Şekil 7.	İzolatların gönderildiği birimlere göre dağılımı	41
Şekil 8.	Çalışma izolatlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları	46

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	49
Resim 2	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>qepA</i> , <i>oqxA</i> ve <i>oqxB</i> genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	50

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ**Kısaltmalar**

Bp	Base pair (baz çifti)
°C	<i>Celcius</i> derecesi
CAZ	Seftazidim
CFU/mL	<i>Colony Forming Unit</i> / Mililitre
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX	Sefotaksim
dATP	Deoksiadenintrifosfat
dCTP	Deoksisitozintrifosfat
dGTP	Deoksiguanozintrifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Dideoksinükleotidtrifosfat
dTTP	Deoksitimidintrifosfat
EDTA	Etilendiamin-tetra-asetik asit
EMB	Eozin Metilen Blue
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
HCl	Hidroklorik asit
İYE	İdrar Yolu Enfeksiyonu
kb	Kilo baz çifti
L	Litre
MHA	Mueller Hinton Agar
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
mM	Milimolar
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
NaCl	Sodyum Klorür

NaOH	Sodyum Hidroksit
pmol	Pikomol
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (dakikadaki devir sayısı)
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris, Borik aist, EDTA
TE	Tris, EDTA
YBÜ	Yoğun Bakım Ünitesi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan, erken tanı konup tedavi edildiğinde mortalite oranlarının azaldığı sistemik bir enfeksiyondur (1-2). Sepsis insidansı, yaşlanan nüfus dolayısıyla giderek artmaktadır (3-4). Dünya çapında her yıl 13 milyon kişide sepsis gelişmekte ve bunların yaklaşık 4 milyonu mortal seyretmektedir (2). Sepsiste Gram pozitif etkenlerden stafilokok türleri ve Gram negatif etkenlerden *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. en sık izole edilen bakterilerdir (5-6). Toplum kaynaklı, hastane kaynaklı ve fırsatçı enfeksiyonlarda en sık etken olan organizmalardan *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp.; septisemi, pnömoni, menenjit, üriner sistem enfeksiyonu, yara yeri enfeksiyonu, intestinal enfeksiyonlar, yumuşak doku enfeksiyonu gibi ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır (7-8). Sık görülen bu etiyolojik ajanlarda özellikle ampirik kullanımda antibiyotiklere direncin artması tedaviyi her geçen gün biraz daha zorlaştırmaktadır (2). Bu dirençli patojenlere karşı tedavi başarısızlıkları artan morbidite, mortalite ve maliyetle sonuçlanmaktadır (9). *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine karşı etkinliği yüksek olan ve tedavide sıklıkla kullanılan kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç artışı da önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (10).

Kinolonlar, tamamen sentetik olan saf kimyasal maddelerdir. DNA sentezini bozarak bakterisidal etki gösterirler. Temel hedefleri Gram negatif bakterilerde DNA giraz iken Gram pozitif bakterilerde ise topoizomeraz IV'tür (11). Genişlemiş spektrumlarına bağlı olarak kinolonlar gerek oral yolla gerek intravenöz yolla birçok enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (12). GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonlarında oldukça sık reçete edildikleri gibi bakteriyemi ve hastane kaynaklı pnömonide de karbapenemlerin kullanılamayacağı durumlarda tercih edilebilmektedirler (12-15). Bu yaygın kullanıma bağlı olarak kinolonlara direnç gelişimi giderek artmaktadır (12)

İki kromozomal mekanizma klinik florokinolon direncinden sorumludur. Bunlar DNA girazı ve/veya topoizomeraz IV'ü kodlayan ya da efluks pompaları ekspresyonunu

düzenleyen ve zar geçirgenliğini azaltan gen içi mutasyon birikimidir (16-17). Üçüncü bir direnç mekanizması ise florokinolon duyarlılığında azalmaya yol açan plazmid kaynaklı kinolon direnç (PMQR) genlerinin varlığıdır (11, 18). Hedef enzim değişiminde olduğu gibi kromozomal direnç, kuşaktan kuşağa vertikal geçerken; PMQR bakteriden bakteriye konjugasyon yoluyla horizontal geçiş göstererek acil bir klinik problem olmuştur (17). PMQR genlerinin aktarılabirliğinin yanısıra bir diğer önemi, florokinolon terapötik seviyelerinin varlığında dahi klinik olarak dirençli suşların ortaya çıkması olasılığını artırmasıdır (11, 18).

Kinolonlara direncin plazmidle ilişkili olabildiği *qnr* genlerinin gösterilmesiyle gündeme gelmiştir (11). Plazmidle aktarılan *qnr* genlerinin ilk tespitinden bugüne kadar farklı alt tipler (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS* ve *qnrD*) tanımlanmıştır (11, 19). Qnr proteinleri, DNA giraz ve topoizomerez IV'e bağlanarak bu enzimleri kinolonun inhibisyonundan korur (20). Ayrıca plazmidle aktarılan kinolon atım pompa geni *qepA*, çoklu ilaç direnci atım pompa geni *oqxAB* ve modifiye aminoglikozid asetil transferaz geni *aac(6')-Ib-cr*'nin tanımlanması ile PMQR genlerinin önemi daha da artmıştır (11, 21).

GSBL salgılayan *Enterobacteriaceae* türleri tüm dünyada giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalar hem GSBL üreten hem de kinolona dirençli suşların hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda artan oranda tespit edildiğini göstermiştir (22, 23). GSBL üreten bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kinolonlar dahil birçok antibiyotiğin etkisiz kalabilmesi, hastanede yatış süresinin uzaması, artan morbidite ve mortalite oranları ve ciddi ekonomik kayıplar nedeniyle etkenin GSBL oluşturup oluşturmadığı da önemlidir (24-25).

GSBL üretimi ile florokinolon direnci arasında yakın ilişki olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (26-29). 1998 yılında GSBL üretimini kodlayan genleri taşıyan ve türler arası aktarılabir plazmidlerde kinolon direncinden sorumlu genlerin de taşındığının gösterilmesi gelecekte önemli sorunlarla karşılaşılacağına habercisi olmuştur (18, 30-32).

Plazmid aracılı kinolon direnç genlerinin prevalansının takibi, hastanelerde direnç aktarımının önlenmesi ve kinolon grubu antibiyotiklerin tedavi protokollerindeki yerine ışık tutması açısından önemlidir. Bununla birlikte PMQR genlerini taşıyan suşların in-vitro olarak kinolonlara duyarlı bulunabilmesi, fenotipik testlerle saptanamaması, tedavi protokollerinin uygulanmasında ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasında güçlüklerle neden olmaktadır. PMQR genlerinin prevalansı ile ilgili dünya genelinde birçok çalışma

yapılmış olmakla birlikte bu konu ile ilgili olarak ÷lkemize ait veriler oldukça sınırlıdır (18). Ayrıca hastanemizde izole edilen suşlarda direnç oranlarının bilinmesi, klinisyenlerin infeksiyon kontrolünde uygun yaklaşımlara yönelmelerini sağlayacaktır.

Bu çalışmada Ocak 2012 - Ağustos 2013 tarihleri arasında kan örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında kinolon direnç oranlarının belirlenmesi, aktarılabılır kinolon direnç mekanizmalarından PMQR genleri olan *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')-Ib*, *qepA* ve *oqxAB* varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia coli*

2.1.1. Tarihçe

Escherichia coli, ilk kez 1855 yılında Alman pediatrist Theodor Escherich adında bir araştırmacı tarafından ishalleri infantların dışkılarından izole edilmiş ve *Bacterium coli commune* olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 1919'da Castellani ve Chamer tarafından izole eden kişinin adı verilerek *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır (33). 1945 yılında bir çocuk bakım evindeki ishal salgınından barsak patojeni olan enteropatojenik *E. coli* (EPEC) suşu tanımlanmıştır (34). 1969'da Orta Doğu'daki İngiliz askerlerindeki ishal olgularında enterotoksijenik *E.coli* (ETEC) suşları ve aynı yıllarda enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) suşları izole edilmiştir. Shiga toksin oluşturan enterohematojenik *E. coli* (EHEC) suşları ilk kez 1977 yılında Konowalchuk ve ark. tarafından farklı bir patojenik tür olarak tanımlanmıştır (35). Ancak 1982'de A.B.D'de pişmemiş kıymadan kaynaklanan zehirlenme olayıyla gıdalar aracılığı ile salgınlara yol açtığı bildirilmiştir (36-37). Enteroagregatif *E.coli* (EAaggEC)'nin ilk kez 1987'de ishale sebep olduğu anlaşılmış ve doku kültürlerinde kümeler oluşturmaları ile tanımlanmışlardır (38).

2.1.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler

Escherichia coli, Enterobacteriaceae familyası içerisinde yer alan, *Escherichia* cinsi içinde en önemli tür ve insan için önemli bir fırsatçı patojendir (39). İnsan ve hayvanların barsaklarında yaygın olarak bulunur ve barsaktaki en baskın fakültatif anaerob türdür (40-41).

Escherichia coli, ortalama 2-6 µm boyunda, 1-1,5 µm eninde Gram negatif bir basil peritriş kirpikleri sayesinde hareketlidir. Hareketsiz suşları da vardır. Bazı suşlarda kapsül veya mikrokapsül bulunmaktadır. Spor oluşturmazlar ve fakültatif anaeropturlar (38).

Üremek için zengin besiyerlerine ihtiyaç duymazlar. Aerobik şartlarda 37°C'de genel kullanım besiyerlerinde 18-24 saatte, türe özgü genellikle 2-3 mm çapında parlak, gri-beyaz renkte S tipi koloniler oluşturarak ürerler. Kanlı agarda hafif nemli görümlü 2-3 mm çapında gri koloniler yaparlar. Bazı kökenler kanlı agarda beta hemolitiklerdir. Kapsüllü suşlar ise mukoid koloniler oluşturabilirler. *E. coli* MacConkey agarda laktozu fermente ettiğinden pembe-kırmızı renkte koloniler, eozin metilen blue (EMB) agarda da laktoz pozitif mavi-siyah yeşilimsi parlaklık veren koloniler oluştururlar (40-41).

Escherichia coli glikozdan asit ve gaz oluşturur. Laktoz ve sakkarozu fermente eder. H₂S, üreaz oluşturmaz. İndol oluşturur. Metil kırmızısı, lizin dekarboksilaz reaksiyonları pozitifdir. Voges-Proskauer, fenilalanin deaminaz ve DNaz aktiviteleri negatiftir. Tek karbon kaynağı olarak sitratta üremez. Ayrıca oksidaz negatif olup katalaz pozitifdir (42).

Escherichia coli'nin ısıya dayanıklı lipopolisakkarit yapıda O, protein yapıda H (kirpik) ve polisakkarit yapısında K (kapsül) antijenleri bulunmaktadır. Serotiplendirmede genellikle O ve H antijenleri kullanılır. *E. coli*'nin oluşturduğu çeşitli hastalık tabloları ile özel antijen tipleri arasında ilişkiler vardır (41, 43).

2.1.3. Virülans Faktörleri

Escherichia coli, farklı dokuları enfekte edebilmek için yapısal faktörler veya hücre dışına salgılanan toksinler, enzimler gibi pek çok virülans faktörü taşımaktadır.

Değişik dokulara tutunma için *E. coli*'nin çeşitli adezyon molekülleri vardır. Tip II (mannoz resistant) fimbrialardan olan kolonizasyon faktör antijenleri, P fimbria ve X-faktör üropatojen *E. coli* kökenlerinde önemli virülans faktörlerindedir (41). Sistite neden olan çoğu *E. coli* suşları Tip I (mannoz sensitif) fimbriaya sahiptirler (44). Kolonizasyon faktör antijenleri (CFA I ve CFA II) ve Tip I (Mannoz sensitif) fimbrialar ile *E. coli* gastrointestinal sistem hücrelerine tutunarak, intestinal sistem hareketi esnasında elimine edilmekten kurtulur (45). S fimbria ise sepsis ve menenjitli yenidoğanlardaki *E. coli* suşları ile ilişkilidir. N-asetil nöraminik asit polimeri olan K1 kapsülü yenidoğan menenjitli, bakteriyemi ve üriner infeksiyonda rol oynar (8). O somatik antijenleri de *E. coli*'nin çeşitli dokulardaki reseptörlere bağlanmasına katkı sağlayabilirler (41).

Gastroenterit etkeni olan kökenlerde Shiga toksinler (Stx-1, Stx-2), ısıya duyarlı (LT-1 ve LT-2) veya ısıya dirençli (Sta, Stb) enterotoksinler gibi virülans faktörleri bulunmaktadır (40).

Endotoksin, hücre duvarının lipopolisakkaritinin lipid A kısmıdır ve toksik aktiviteye sahiptir. Bakteriyemili hastalarda ölümlere yol açmaktadır (41).

Escherichia coli suşlarının salgıladığı penetrasyonu sağlayan faktörler, hemolizinler, demir bağlamakta rol oynayan enterobaktin ve aerobaktin tip sideroforlar virülans faktörleridir (8). Hemolizin aktivasyonu ile eritrositlerden bol miktarda hemoglobin açığa çıkardığı için bakteriyemi yapan *E. coli* suşlarında siderofora ihtiyaç yoktur (41). Sitotoksik nekrotizan faktör (CNF 1, CNF 2) denilen toksinler de virülans faktörleridir (46).

2.1.4. *Escherichia coli* Enfeksiyonları ve Klinik Önemi

Escherichia coli günümüzde toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenleri arasında yer almaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında en sık izole edilen ve hemen her organ ve dokuda enfeksiyon oluşturabilen patojen *E. coli* 'lerin enfeksiyonları mukozal yüzeylerde sınırlı kalabildikleri gibi tüm vücuda da yayılabilir (38). İmmün sistem bozuklukları, sindirim sistemi savunma mekanizmasındaki bozukluklar gibi durumlarda nonpatojen *E. coli* 'ler de enfeksiyon etkeni olabilir (47-48).

Enteropatojenik suşlarla oluşan ishaller, üropatojenik suşlarla oluşan idrar yolu enfeksiyonları (İYE), neonatal menenjit, sepsis, karın içi enfeksiyonları, yara yeri ve akciğer enfeksiyonları *E. coli* 'lerin oluşturduğu başlıca hastalıklardır (41, 47).

Ekstraintestinal sistem enfeksiyonları içinde *E. coli* 'lerin en sık rastlandığı enfeksiyon İYE'dir (38). Toplum kökenli İYE'nin %64,5-82'inden, hastane kaynaklı İYE'nin ise % 50'sinden *E. coli* sorumlu tutulmaktadır (49-50). Üropatojenik suşlar virülans faktörleri ile önce üriner sistem mukoza hücrelerine tutunarak kolonize olmakta, daha sonra invazyon göstererek asemptomatik bakteriüri, akut semptomatik İYE, tekrarlayan İYE gibi hastalık tabloları oluşturmaktadırlar (38).

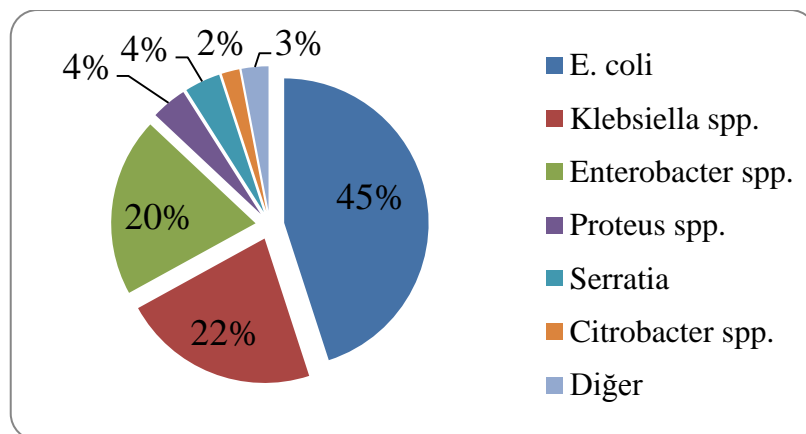
Toplum kaynaklı İYE genellikle assendan enfeksiyon şeklinde başlar ve önce uretrit sonra sistit gelişebilir. İnfeksiyonun yukarıya ilerlemesiyle böbrekte pyelonefrit ve ciddi doku hasarı yapabilir. Ayrıca pyelonefrit sonrası ürosepsis riski yüksektir (51) .

Hastane kaynaklı infeksiyonlar çoğunlukla kateterizasyon veya üriner sisteme yapılan diğer girişimleri takiben gelişir ve ürosepsise neden olabilir. Ürosepsiste mortalite riski yüksektir (51-52).

Sepsis, komplikasyonlara ve ölüme yol açabilen sistemik bir enfeksiyondur (2, 53). Dünya çapında her yıl 13 milyon kişide sepsis gelişmekte ve bunların yaklaşık 4 milyonu mortal seyretmektedir (2). Sepsiste Gram pozitif etkenlerden stafilokok türleri ve Gram negatif etkenlerden *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) en sık izole edilen bakterilerdir (5-6). Yapılan bir çalışmada Gram negatif bakteri septisemilerinde etken olarak en sık *E. coli* (%13-18.6), takiben *Pseudomonas aeruginosa* (%8-11.4) ve *K. pneumoniae* (%6-8.6) tespit edilmiştir (54). *E. coli*, Laupland'ın derlemesinde halen toplum tabanlı çalışmalarda sepsisin en sık nedeni olmuştur (55).

Escherichia coli septisemisi tüm yaşların problemidir. Üriner sistem başta olmak üzere sindirim sistemi perforasyonu, apandisit, cerrahi girişimler sonrası ve diğer fırsatçı patojenlerde olduğu gibi ilk enfeksiyon bölgesinden kana karışarak bakteriyemi yapabilir (38).

Enterobacteriaceae ailesinin bakteriyemi oluşturma sıklıkları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Bakteriyemi ile ilişkili *Enterobacteriaceae* insidansı (47).

Hastanelerde her zaman hastane kaynaklı patojen olarak bulunan *E. coli* hastane kaynaklı pnömoniye neden olan başlıca mikroorganizmalar arasında bildirilmektedir (41). Ancak kronik akciğer hastalığı olanlar, yaşlılar, diyabetikler gibi vücut direnci düşük

olanlarda ağız sekresyonlarının aspirasyonu ile toplum kaynaklı da görülebilir. Daha çok alt lobları tutan bronkopnömoni şeklinde görülür. Hastalarda ampiyem ve bakteriyemi de gelişebilir (38).

Escherichia coli özellikle hastane ortamında cerrahi yara infeksiyonları, çeşitli organlarda apse, septik artrit, osteomyelit, endokardit, tromboflebit, prostatit, endoftalmit, sinüzite kadar pek çok klinik tabloya yol açabilir (41).

Yenidoğan *E. coli* menenjitleri dünyada mortalite ve morbiditenin önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir (8). *E. coli*, sık görülmemesine rağmen yenidoğan akut bakteriyel menenjitlerinde, *Streptococcus agalactia*'dan sonra en sık karşılaşılan etkidir (56). Bakteriyemi seviyeleri menenjit gelişimi ile koreledir (8). *E. coli* ile menenjit oluşmasında K1 antijeni önemli bir faktördür. Bu antijen, bakteriyi fagositoza ve serumun bakterisidal etkisine dirençli hale getirir. Etken olan suşların %80 kadarında kapsüler K1 antijeni bulunur (8).

Enteropatojenik *E. coli*, hafif diyareden ağır sıvı kayıpları ile seyreden kolera benzeri tabloya, hemorajik kolite sebep olabilir. *E. coli*'nin barsakta infeksiyon oluşturan türleri; *Enterohemorajik E. coli* (EHEC), *Enterotoksijenik E. coli* (ETEC), *Enteroinvaziv E. coli* (EIEC), *Enteropatojenik E. coli* (EPEC), *Enteroağregatif E. coli* (EAggEC), *Diffüz aderent E. coli* (DAEC)'dir (57).

Enterohemorajik E. coli suşları ile, özellikle O157:H7 suşu ile oluşan infeksiyonlar önemlidir. Çoğu az pişmiş et ürünleri, kontamine su ve yiyecekler, pastörize olmamış süt ile bulaşır. İnsandan insana bulaş bir diğer bulaş yoludur. 100'den az bakterinin alınması enfeksiyon için yeterlidir (8). Bu infeksiyonlarda sulu ishali takiben hemorajik kolit ve %5-10'unda hemolitik üremik sendrom (HÜS) veya trombotik trombositopenik purpura gelişebilir. Virülans faktörleri olarak shiga benzeri toksin 1 ve shiga benzeri toksin 2 (STL 1, STL 2) ve bunların varyantları saptanmıştır. HÜS, özellikle 10 yaşın altındaki çocuklarda akut böbrek yetmezliği, hemolitik anemi, trombositopeni ve merkezi sinir sistemi belirtileri ile seyreden çok ciddi bir komplikasyondur. HÜS'lü hastaların %12 ölüm, %30 sekel riski vardır (38, 47).

Enterotoksijenik E. coli özellikle gelişmekte olan ülkelerde infant diyaresinin önemli bir nedenidir. Aynı zamanda erişkinlerde de turist diyaresine neden olmaktadır. Sulu diyare ile belirti veren hastalıkta, ısıya duyarlı labil toksin (LT) ve ısıya dirençli stabil toksin (ST) olmak üzere iki tip enterotoksin su ve elektrolit kaybına neden olmaktadır. Toksinlerle kolera benzeri ağır tablolar gelişebilir (38, 57).

Enteroinvaziv E. coli 'nin özellikleri shigella suşları ile çok benzerdir. Kolon hücrelerini istila eder. İshali sulu fakat arasına kanlıdır (41).

Enteropatojenik E. coli infantil diyare etkeni olan ancak enterotoksin veya shiga toksin üretmeyen ve invaziv olmayan bazı *E.coli* serotipleri olarak sınıflandırılmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde ishalin önemli bir sebebidir. Normal mikrovilus yapısının bozulması ile gelişen malabsorbsiyon ve kansız diyareye sebep olur (57).

Enterogregativ E. coli Hep-2 hücre kültürlerinde gösterdiği spesifik agregatif aderens paterni ile tanımlanır. Dünyanın birçok yerinde ve her yaşta görülür. Gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklarda kronik diyarelere, gelişmiş ülkelerde akut ishallere, seyahat ishallerine neden olmaktadır. AIDS enfeksiyonu olan hastalarda ise kalıcı diyareye neden olmaktadır (58).

Diffüz aderent E. coli çocuklarda süreklilik gösteren diyarelere neden olur. Hücreye adezyon yolu ile yapıştıkları gibi diffüze olurlar. Hep-2 hücrelerine diffüz aderens paterni sadece bu grupta gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda, DAEC enfeksiyonları ile 1-5 yaş arasındaki çocuklardaki sulu ishalin önemli oranda birlikteliği saptanmıştır (57).

2.2. Klebsiella spp.

2.2.1. Tarihçe

Klebsiella pneumoniae (*K. Pneumoniae*) 1882 yılında Carl Friedlander tarafından tanımlanmış olması nedeniyle uzun yıllar “Friedlander basili” olarak anılmıştır (41, 59). *Klebsiella* cinsi 1900'lerin sonlarında yaşamış Alman mikrobiyolog Edwin Klebs anısına isimlendirilmiştir (60).

2.2.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler

Klebsiella türleri doğada yaygın olarak bulunur. *Klebsiella* insan nazofarinks ve kalın barsağında bulunur ve dışkı muhtemelen enfeksiyonların en önemli kaynağıdır (61). Genellikle bu bölgelerde floranın geçici üyeleri olarak kabul edilirler (62). Bu cinsin en sık izole edilen türleri toplum ve hastane kaynaklı lobar pnömoniye sebep olan *K. pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*)'dır (47).

Klebsiella cinsi bakteriler hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsüllü, 0,7-1,5 x 2,0- 5,0 µm boyutlarında aerop ve fakültatif anaerop Gram negatif ve *Enterobacteriaceae* ailesinin genel özelliklerini gösteren basillerdir (43).

Klebsiella spp. genel kullanım besiyerlerinde kolayca ürer. Ortalama pH:7 ve 37°C'üremeleri için en iyi ortamdır. Katı besiyerlerindeki kolonileri büyük, sarımtırak gri renkte ve tipik mukoid M tipi kolonilerdir. Kapsülsüz suşlar S koloniler oluşturmaktadır. *Klebsiella* spp. MacConkey agarda laktozu fermente ettiğinden pembe-kırmızı, 3-4 mm ve mukoid koloniler yapar (40). Hekton agar'da sarı turuncu, ksiloz lizin deoksikolat (XLD) agar'da sarı koloni oluştururlar (43).

Başta glikoz olmak üzere gaz oluşturmak suretiyle birçok şekeri parçalarlar (42). Nişastadan gaz oluşturmaları önemli bir özellikleridir (43). H₂S oluşturmazlar. *Klebsiella* spp. fenilalanini deamine etmezler, ornitin dekarboksilaz oluşturmazlar (42). İndol oluşturmazlar. *K. oxytoca* indol yapabilmesi ile *K. pneumoniae*'dan ayrılır. Metil kırmızısı reaksiyonu negatiftir. Voges-Proskauer ve lizin dekarboksilaz aktiviteleri pozitifdir ve tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanırlar. Üreaz pozitifler (43).

Geniş kapsülü, *Klebsiella* spp.'lerin K antijenleriyle serotiplendirilmesini sağlar. *Klebsiella* spp.'lerin K antijenleri, O antiserumlarıyla aglütinasyonu önler. O antijenleri serotiplendirmede kullanılmaz (41).

2.2.3. Virülans Faktörleri

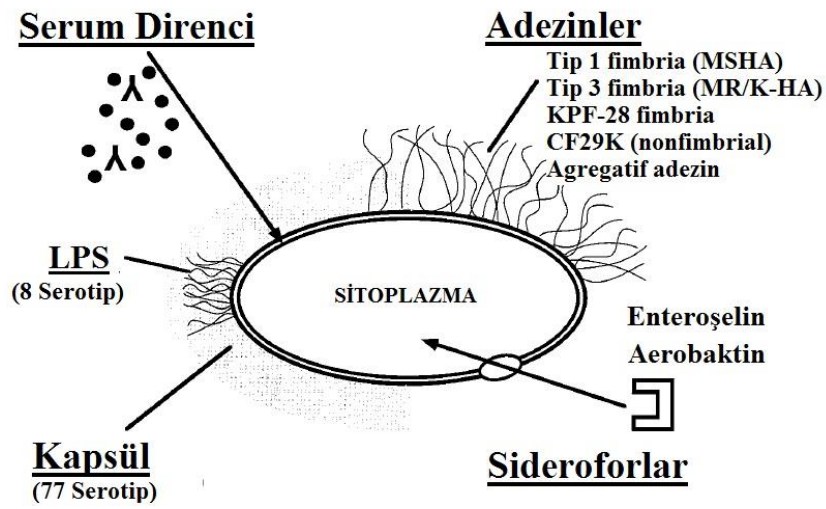
Kapsüler antijenler *Klebsiella* spp.'nin virülansında temeldir. *Klebsiella* spp. kapsül polisakkaritleri fagositozu ve infeksiyon bölgesine fagositlerin göçünü engelleyen virülans faktörüdür (41). K2 suşu dünya çapında klinik izolatlar arasında en çok görülen izolattır (62). Alkolizmle ilişkili pnömonide *K. pneumoniae*'nın K1-K6 kapsül türleri en sık izole edilen türlerdir (42).

Tip I (Mannoz sensitif) fimbriaların bakterinin ürogenital ve solunum sistemine kolonizasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (63).

Tip 3 fimbria, *K. pneumoniae* suşlarının endotelial hücrelere, solunum sisteminin epiteline ve üroepitelial hücrelere yapışmasında rol alır (64). Tip 3 fimbrianın *K. pneumoniae*'nin canlı ve cansız yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturmaya aracılık ettiği tespit edilmiştir (65).

Serum direncinden TraT lipoproteini veya porini gibi dış membranın çeşitli proteinlerinin asitleri, kapsüler polisakkarit (CPS) ve O antijenlerinin (lipopolisakkaritler) sorumlu olduğu ortaya konmuştur (63). *Klebsiella* spp. hücre duvarındaki LPS molekülleri, diğer Gram negatif bakterilerdeki gibi, bakterinin virülans faktörlerinden olan endotoksinini oluşturmaktadırlar (41).

Sideroforlar ile alınan demir, bakterinin üremesi için redoks katalizörü olarak görev yapan temel faktördür. İnfeksiyonların patogeneğinde konak hücresinden sağlanan demirin belirgin etkisi *Klebsiella* spp. için gösterilmiştir (62).



Şekil 2. *Klebsiella* spp. virülans faktörlerinin şematik gösterimi (63)

2.2.4. *Klebsiella* spp. Enfeksiyonları ve Klinik Önemi

Üst solunum yolu ve barsak florasında bulunan *Klebsiella* spp.'ler, buldukları yerde uygun koşulların oluşması veya yer değiştirerek diğer organ ve sistemlere geçmeleri halinde birçok hastalığa neden olurlar (66).

Klebsiella türlerinden özellikle *K.pneumoniae*, insan sağlığı açısından çok önemli olan hastane kaynaklı enfeksiyonlar, üst solunum yolu enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları oluşmasında rol alan fırsatçı patojendir (41, 59).

Son 10 yılda *Klebsiella* spp. insidansının artışı hem antibiyotik direnci gelişen immün düşkün hastaların artışı hem de immün düşkün hastalardaki hastane kaynaklı enfeksiyonların artışının sonucudur (60). Bu bakteriler hastane ortamında hızlı yayılabilme özelliğinden dolayı, hastane kaynaklı salgınlara yol açmaya yatkındırlar (62). Hastane

salgınlarına yol açan *Klebsiella* türleri özellikle genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten çoklu ilaç dirençli türlerdir (62-63, 67). Son zamanlarda özellikle antibiyotiklere karşı direnç kazanmış suşların hastane enfeksiyonlarına neden olmaları bu bakterilerin önemini arttırmıştır.

Hastane kaynaklı *Klebsiella* enfeksiyonlarının çoğu, cinsin en önemli türleri olan *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* kaynaklıdır (62). *K. pneumoniae*'nin hastanede yatan hastalarda prevalansı %20'lere kadar çıkmaktadır (48). Bu prevalans artışı alkolik, diyabetik, kronik obstruktif akciğer hastalığı gibi immün düşkün hastalardaki akciğer enfeksiyonunun kaynağının hastanede yatış sırasında oluşan kolonizasyon olabileceğini göstermektedir (48).

Hem hastane ortamından hem de toplumdan kazanılan tipik lobar pnömoni oluştururlar. *Klebsiella* türleri hastane kaynaklı pnömonilerden %6-8 oranlarında sorumludur (68). Sıklıkla alveolar boşlukların nekrotik yıkımı, kavite ve kanlı balgam oluşumuyla seyreden ağır bir pnömoniye neden olurlar (47). Bazı hastalarda akciğer absesi, internal hemoraji, çoğunlukla plevrit gelişebilir (60). Pnömoni olgularından K1, K3, K4 ve K5 antijenine sahip *Klebsiella* türleri sıklıkla izole edilmektedirler (41).

Hastane kaynaklı gram negatif bakteriyemilerde *Klebsiella* türleri 3-4. sıralarda yer alır (63, 69-70). *K. pneumoniae* gram pozitif organizmalardan 4-5 kat daha az sıklıkla sepsise yol açmasına rağmen, iki kat daha fazla mortaliteye neden olur (71). Rekürrent bakteriyemi üzerine yapılan bir çalışmada, relaps veya reenfeksiyonda *Klebsiella* ve *Enterobater* türleri en yaygın organizmalardır (72).

Klebsiella enfeksiyonları Amerika'da tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların %3-%7'sinden sorumludur ve *Klebsiella* spp. en önemli 8 hastane enfeksiyonu patojeninden biridir (60, 62-63).

Klebsiella spp. hastaneden kazanılmış İYE'nin en yaygın 2-4. etkeni iken, toplumdan kazanılmış İYE'nin 3-4. en yaygın etkenidir (73-74). Bir çalışmada toplum kökenli İYE'de *E. coli* (%74,5) ve *Klebsiella* spp (%8,7) tüm yaş grupları ve cinsiyet için en sık izole edilen mikroorganizmalar olmuştur (75). *Klebsiella* spp, üriner sistemdeki tek enfeksiyonda bile böbrek sekeline neden olabilmektedir (62).

Klebsiella pneumoniae dünya çapında toplumdan kazanılmış piyojenik karaciğer abselerinin önemli bir etkenidir. Bakteriyemi *Klebsiella* piyojenik karaciğer abselerinde yaygındır ve bir retrospektif incelemede % 83 olarak bildirilmiştir (76).

Gastrointestinal, prostat, periton, meninksler, kulak ve sinüs boşlukları gibi organlara yerleşerek ve kana yayılarak çeşitli tipte ve önemde enfeksiyonlara neden olurlar (66).

Klebsiella spp. fırsatçı enfeksiyon etkeni olup sepsisemi, pnömoni, üriner sistem ve yumuşak doku enfeksiyonu gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *Klebsiella* enfeksiyonları tipik olarak hastane kaynaklı enfeksiyonlardır. Bu bakterilerin hedefleri hastanede yatan ve altta yatan başka bir hastalığı olan immün yetmezlikli hastalardır. *Klebsiella* enfeksiyonları, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde sepsisemi ve menenjitlere neden olabilmektedir. Bu salgınların çoğunun nedeni çoklu antibiyotiğe dirençli suşlar olduğundan, yenidoğan *Klebsiella* enfeksiyonları büyük sorun haline gelmiştir. Çoklu dirençli *Klebsiella* suşlarının hastane salgınlarından GSBL suşları sorumlu tutulmaktadır. GSBL oluşturan suşlar, başlıca β -laktam antibiyotiklerle beraber aminoglikozidlere ve florokinolonlara da direnç gösteren çoklu dirençli bakterilerdir (63).

2.3. Tedavi

Escherichia coli ve *Klebsiella* spp tedavisinde betalaktamlar, kinolonlar, aminoglikozidler, trimetoprim/sülfametoksazol, fosfomisin ve nitrofurantoin antimikrobialleri kullanılmaktadır. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) *Enterobacteriaceae* ailesine etkili olan antimikrobiallerin duyarlılıklarının bildiriminde ve tedavide kullanımını düzenlemek için dört gruptan oluşan bir sınıflandırma yapmıştır. Bu sınıflandırmaya göre Grup A, tedavide birinci seçenek olan antimikrobialleri içermektedir. Bu gruptaki antimikrobiallere karşı direnç saptanmış ise Grup B'deki antimikrobialler tedavide kullanılabilir. Eğer bu gruptaki antimikrobiallere de direnç saptanmış ise o zaman Grup C'deki antimikrobialler tedavi seçenekleri olabilir. Grup U'daki antimikrobialler ise sadece üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılabilir (Tablo 1) (77).

Tablo 1. CLSI'nin *Enterobacteriaceae* tedavisinde kullanılan antimikrobiyaller tablosu (77)

Grup A	Grup B	Grup C	Grup U
Ampisilin*	Piperasilin	Aztreonam	Lomefloksasin veya Ofloksasin Norfloksasin
Sefazolin	Amoksisilin/Klavulanik asit Ampisilin/Sulbaktam Piperasilin/Tazobaktam Tikarsilin/Klavulanik asit	Seftazidim Seftarolin	Sefalotin
Gentamisin Tobramisin	Amikasin	Tetrasiklin Kloramfenikol	Sulfonamid
	Sefepim		Trimetoprim
	Sefotaksim veya Seftriakson		Nitrofurantoin
	sefotetan		
	Sefoksitin		
	Sefuroksim		
	Siprofloksasin		
	Levofloksasin		
	Doripenem		
	Ertapenem		
	İmipenem		
	Meropenem		
	Trimetoprim/Sulfametoksazol		

* *Klebsiella* suşlarında ampisilin intrinsek direnç nedeniyle kullanılmaz

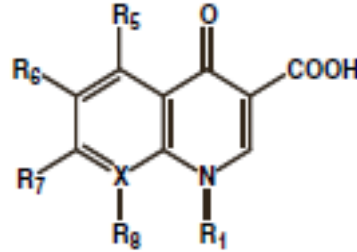
2.4. Kinolonlar

Kinolonlar tıpta ve veterinerlikte çeşitli infeksiyonların tedavisinde 1960'lı yıllardan beri kullanılan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir (78-79). Kinolonların ilk üyesi olan nalidiksik asit, 1962'de antimalaryal bir ajan olan klorokinin saflaştırılması esnasında elde edilen ara üründen üretilmiştir. Nalidiksik asit, dar etki spektrumlu bir bileşik olup idrarda yüksek yoğunluklara ulaşabildiğinden idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan çoğu *Enterobacteriaceae* üyesine karşı bakterisid etkili bir antibakteriyel olarak kalmıştır. Kinolonların yıllar içerisinde yapısının geliştirilmesiyle hem kullanımını artmış hem etki

spektrumu genişlemiştir (79-80). Oral ve intravenöz kullanılabilmesi, iyi oral biyoyararlanımı, yüksek serum seviyesi, dokularda yüksek konsantrasyona ulaşabilmesi, geniş etki spektrumu, yüksek etki gücü, düşük yan etki ve iyi tolere edilmeleri nedeniyle de klinikte tercih edilen ajanlar olmuşlardır (81).

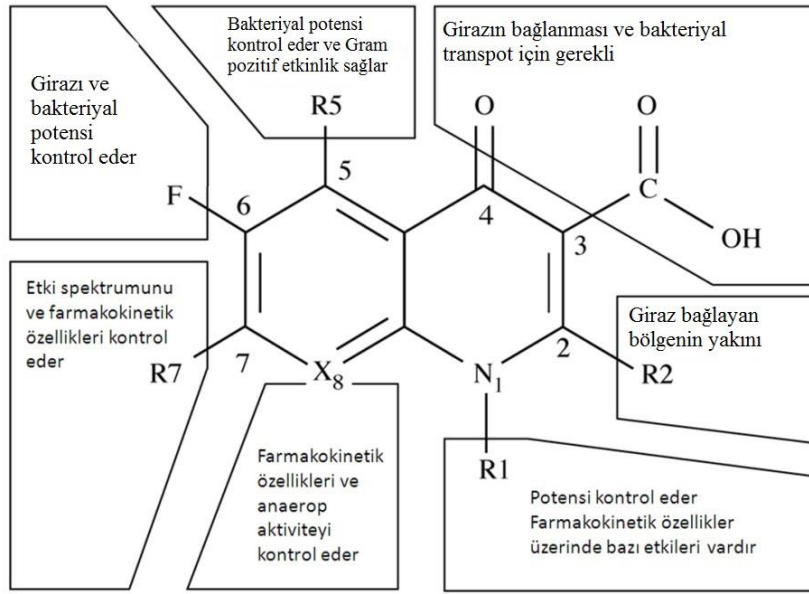
2.4.1. Kimyasal Yapısı

Kinolonlar tamamen sentetik olarak elde edilen antibakteriyel ilaçlardır. Temel yapısı, 1. pozisyondaki nitrojen, 3. pozisyondaki karboksil grubu ve 4. pozisyondaki karbona çift bağla bağlanmış oksijenin bulunduğu ikili halkadan oluşmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Kinolonların temel yapısı (82).

1970'lerde kinolon molekülünün C-6 pozisyonuna bir flor atomunun eklenmesiyle aktivitesi artırılarak ilk florokinolon olan norfloksasin elde edilmiştir (17). Daha sonraları kinolonların 7. karbonuna piperazinil (örn. siprofloksasin, norfloksasin, enoksasin), metil piperazinil (örn. ofloksasin, levofloksasin), dimetil piperazinil (örn. sparfloksasin) eklenmesiyle gram negatif bakterilere karşı; 7. karbonuna piperidinil (örn. klinafloksasin, gemifloksasin) ya da ikili halka (örn. moksifloksasin) eklenmesiyle gram pozitif bakterilere karşı ve 8. pozisyondaki karbonuna halid ya da metoksi grubu (örn. moksifloksasin, gatifloksasin) eklenmesiyle anaerob bakterilere karşı etkili yeni florokinolonlar türetilmiş ve etki spektrumu genişletilmiştir (15, 83) (Şekil 4).

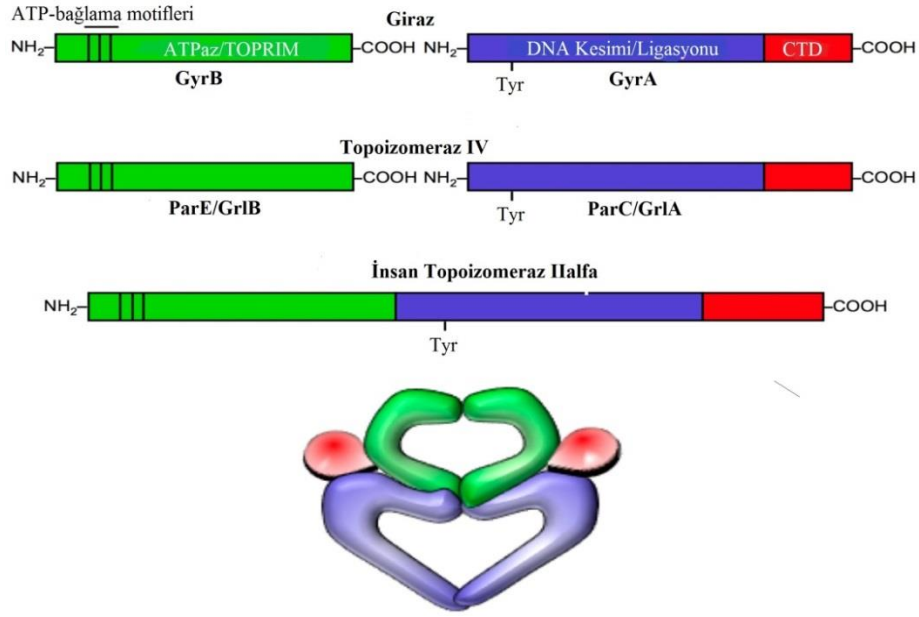


Şekil 4. Kinolon ve naftiridon molekülünün yapısı. X ile belirtilmiş olan yerler karbon atomu olduğunda bir kinolon molekülüdür (siprofloksasin, levofloksasin, norfloksasin, oflofloksasin, moksifloksasin, gatifloksasin, klinafloksasin, sinoksasin, temofloksasin). X, nitrojen atomu ise bir naftiridon molekülüdür (nalidiksik asit, enoksasin, tosufloksasin, trovafloksasin, gemifloksasin) (83).

2.4.2. Etki Mekanizması

Kinolonlar DNA sentezini hızlı bir şekilde inhibe ederek bakterisidal etki gösterirler. Çok yüksek konsantrasyonlarda RNA ve protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterdikleri de saptanmıştır (12, 84).

Kinolonların iki hedef enzimi, tip 2 topoizomerazlardan olan DNA giraz ve topoizomeraz IV'tür. Her ikisi de iki alt ünitenin tekrarından oluşan heterotetramerik proteinlerdir (17). DNA giraz enzimi iki A alt birimi ve iki B alt biriminden oluşur. A alt birimleri *gryA* ve B alt birimleri *gryB* genleriyle kodlanır. Topoizomeraz IV ise iki *parC* ve iki *parE* alt birimlerinden oluşmuştur. *ParC* alt birimlerini *parC* geni, *parE* alt birimlerini ise *parE* geni kodlamaktadır (12).



Şekil 5. Tip II topoizomerazların domein yapıları. Giraz ve topoizomeraz IV iki A ve iki B alt birimlerinden oluşan heterotetramerik enzimlerdir. A alt birimleri (mavi ve kırmızı; girazda GyrA ve Gram-negatif ve Gram-pozitiflerin topoizomeraz IV'lerinde sırasıyla ParC and GrIA) kırılma reaksiyonu sürecinde DNA'nın yeni üretilen 5'ucuna kovalent olarak bağlanan tirozin aktif bölgesi içerir. A altbirimlerinin C-terminal domainleri (CTDler; kırmızı) değişkendir ve girazın DNA süpersarmallarını oluşturmasını sağlar. B subunitleri (yeşil; girazda GyrB and Gram-negatif ve Gram-pozitiflerin topoizomeraz IV'lerinde sırasıyla ParE and GrIB) ATPaz ve TOPRIM domainleri içerir. TOPRIM, enzim aktivitesi için gerekli olan katalitik divalent metal iyonlarına bağlanır. İnsan topoizomeraz II α bakteriyel tip II enzimleri ile homoloji gösterir. Tip II topoizomerazların üç boyutlu şekli altta sunulmuştur (17).

Tip 2 topoizomerazlar bir DNA segmentinin her iki ipliğini kesip aradan bir başka DNA segmentini geçiren ve daha sonra da kesiği onaran enzimlerdir. DNA giraz bu işlemleri ATP yardımıyla DNA süpersarmalları oluştururken uygular ve DNA'da oluşan bu negatif kıvrımlar DNA'nın boyunu küçülterek hücre içine sığmasını sağlar. Ayrıca tam tersine DNA giraz, DNA replikasyonu sırasında, reversibl kesme ve tekrar bağlama işlevi ile replikasyon çatalının önündeki süper sarmalları kaldırır ve DNA ipliklerinin düğümlenmeden birbirinden ayrılmasını sağlar. Topoizomeraz IV ise replikasyon sonunda iki yüzük gibi birbirlerine geçmiş yeni DNA ipliklerinin birbirinden ayrılmasını ve hücre bölünmesi sırasında yavru hücrelere eşit olarak dağılmasını sağlar (12, 17). Bu etkileri ile DNA giraz ve Topoizomeraz IV DNA replikasyonunda yaşamsal öneme sahiptir.

Kinolonlar çift sarmallı DNA'nın replikasyonu sırasında sarmallar birbirinden ayrıldıktan sonra oluşan enzim-DNA kompleksinin kırılma-bağlanma aktif bölgesine

nonkovalent olarak bağlanırlar. Kinolonlar enzim-DNA kırığı kompleksini bakteriler için öldürücü olan hücresel toksinlere dönüştürürler (17). Topoizomerizasyonu engelleyerek bakterinin onaramayacağı DNA kırılmalarına yol açarlar (15). Ayrıca replikasyon çatalı, RNA polimeraz ve DNA helikazın önünde fiziksel bir bariyer oluşturarak hücre ölümüyle sonuçlanacak bir dizi olayın başlamasına neden olurlar (85).

Kinolonlar her iki enzime de bağlanabilseler de, *E. coli*'de olduğu gibi Gram negatif bakterilerde DNA giraz; *Staphylococcus aureus*'da olduğu gibi Gram-pozitif bakterilerde topoizomeraz IV birincil hedeftir (84). Ama C-8 pozisyonunda metoksi grubu taşıyan florokinolonların gram pozitiflerde de DNA giraz öncelikli hedefidir (85, 86).

İnsan hücrelerinde de topoizomerazlar mevcuttur. Bugün kullanılan kinolonlar bu enzimlere minimal de olsa etkilidirler (12).

2.4.3. Kinolonların Sınıflandırılması ve Antimikrobiyal Aktivitesi

Nalidiksik asit ve diğer birinci kuşak kinolonlar, sadece Gram negatif enterik basillere etkili, dar etki alanlı bileşikler olup idrarda yüksek yoğunluklara ulaşabildiğinden idrar yolu infeksiyonlarında kullanılırlar (17). İkinci kuşağın birinci alt grubundaki lomefloksasin, norfloksasin ve enoksasinin serum düzeyleri düşük olduğu için üriner sistem infeksiyonlarında kullanım alanı vardır ve enterik bakterilere, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)'ya ve biraz da *Staphylococcus aureus*'a etkilidirler. İkinci kuşağın ikinci alt grubundaki ofloksasin, siprofloksasin *Enterobacteriaceae* dışında *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* türlerine de etkilidir. Atipik bakterilerden olan *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Leigonella* türlerine de etkili oldukları gibi *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* gibi mikobakterilere etkili fakat *M.avium-intracellulare*'ye zayıf etkilidirler (12, 84, 87). İnvivo çalışmalarla tularemi tedavisinde siprofloksasinin etkinliği kanıtlanmıştır (15). Üçüncü kuşak kinolonlar pnömokoklar dahil streptokok enfeksiyonlarında da kullanılırlar (12, 84, 87). Dördüncü kuşakta gram negatif etkinliğin yanı sıra anaerob etkinlik önemlidir. Ek olarak gemifloksasin penisilin ve diğer florokinolonlara dirençli pnömokoklara da oldukça etkilidir. Florokinolonlar *Haemophilus*, *Neisseria* türleri ve *Morexella catarrhalis*'e çok iyi etkilidirler (12).

Kinolonların farmakodinamik özelliklerine göre sınıflandırılması Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Kinolonların farmakodinamik özelliklerine göre sınıflandırılması (15).

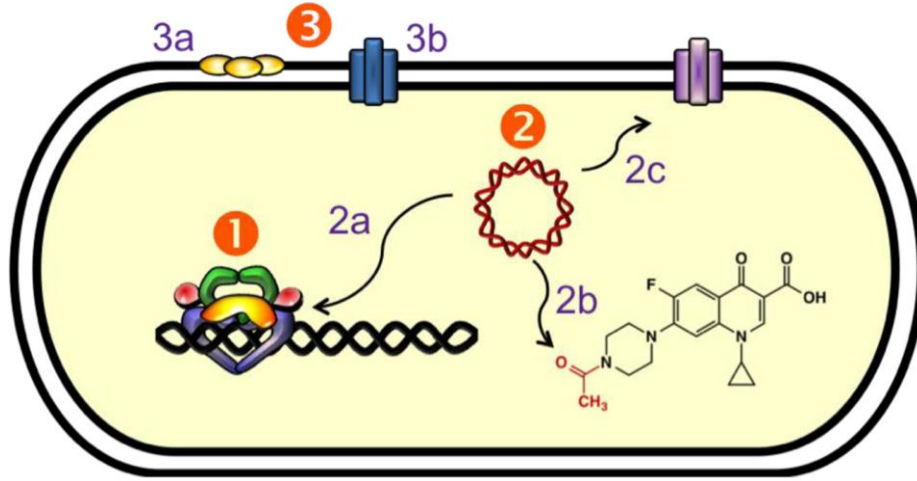
	1.Kuşak	2. Kuşak		3.Kuşak	4. Kuşak		5.Kuşak
		Alt grup 1	Alt grup 2		Alt grup 1	Alt grup 2	
Kinolon	Nalidiksik asid	Lomefloksasin	Siprofloksasin	Levofloksasin	Moksifloksasin	Gemifloksasin	Garenoksasin
	Oksolinik asid	Norfloksasin	Ofloksasin	Sparfloksasin	Gatifloksasin		
	Sinoksasin	Enoksasin	Pefloksasin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

MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*

2.4.4. Kinolonlara Karşı Direnç Mekanizması

Kinolonlara direnç gelişimi üç ana mekanizma ile olmaktadır. Bu üç mekanizma bakterilerde tek tek olabileceği gibi, bir bakteride biraraya geldiklerinde bakteriyeye çok yüksek düzeylerde kinolon direnci kazandırır. Bunlar:

1. Hedef enzimlerde meydana gelen değişiklikler
2. Membran geçirgenliğinde azalma ve/veya efluks pompa sistemlerinin aşırı çalışmasıyla hücrede kinolon birikiminde azalma
3. Plazmid aracılı kinolon direnci (12).



Şekil 6. Kinolon direnç mekanizmaları (1) Hedef enzimlerde meydana gelen değişiklikler. Giraz ve topoizomerez IV enzimlerindeki mutasyonlar kinolon-enzim etkileşimini zayıflatır (2) Plazmid aracılı kinolon direnci (2a) Qnr proteinleri (sarı) topoizomerez-DNA bağlanmasını azaltır enzim-DNA komplekslerini kinolondan korur (2b) Aac(6')-Ib-cr siprofloksasin ve norfloksasin moleküllerinin C7 pozisyonundaki piperazinil halkasında bulunan serbest azotu asetile eden bir aminoglikozit asetiltransferazdır ve bu yolla ilacın etkinliğini azaltır (2c) Plazmid tarafından kodlanan efluks pompaları kinolonların hücrede birikimini azaltır (3) Hücrede kinolon birikiminde azalma (3a) Gram negatif türlerde porinlerin ekspresyonunda azalma ilacın hücre içine alınımını azaltır (3b) Kromozom tarafından kodlanan efluks pompalarının aşırı üretimi hücre içinde ilaç birikimini azaltır (17).

2.4.4.1. Hedef Enzimlerde Meydana Gelen Değişiklikler

Kinolon direnci genellikle giraz ve/veya topoizomerez IV'te olan belirli mutasyonlar ile ilişkilidir. Genel olarak tek bir enzim mutasyonu 10 katlık ilaç direnci kazandırır. Yüksek düzey dirençli suşların seçimi için (yaklaşık 10-100 kat) genellikle her iki enzimde mutasyonlar olmaktadır (17).

Gram negatif bakterilerdeki kinolon direncinin sıklıkla GyrA ünitesindeki değişimlere bağlı olduğu gösterilmiştir. Dirence neden olan aminoasit değişimlerinin, Gyr A alt ünitelerinde genellikle amino ucundaki enzim aktif bölgesinde bulunan bir tirozin molekülünün çevresinde yer aldığı görülmektedir. Bu tirozin molekülü topoizomerizasyon sırasında kesilmiş DNA uçlarına kovalent olarak bağlanmaktadır (84). Kinolonların bağlandığı kısmı oluşturan üç boyutlu bir bölgede aminoasit değişimlerinin toplandığı gösterilmiştir (85). Bu bölgeye kinolon direncini belirleyen bölge [Quinolone Resistance Determining Region (QRDR)] adı verilmektedir. QRDR, GyrA'nın 67-106. aminoasitleri arasında bulunmaktadır. QRDR'de meydana gelen tek bir mutasyon yüksek düzey nalidiksik asit direncine neden olurken, florokinolonlarda yüksek düzey dirence neden olmak için ek mutasyonlara ihtiyaç vardır (79). GyrA'da en sık görülen mutasyon Serin 83-Triptofan veya Lösin değişimidir (12). Florokinolonlara yüksek düzeyde dirençli izolatlarda, GyrA'da 83'ncü kodondaki mutasyonla birlikte bir diğer mutasyon da 87'inci kodondaki aspartatta gözlenmektedir. Bununla birlikte, Ser83'te tek mutasyon taşıyan izolatlar, Asp87'de tek mutasyon taşıyanlara göre florokinolonlara daha yüksek direnç göstermektedir (88). GyrB'de meydana gelen mutasyonlar daha az sayıdadır. GyrB proteininin orta kısmı içinde tek bir aminoasit değişikliğinin, aynı zamanda, nalidiksik asit ve florokinolonlara daha düşük düzeyde dirence neden olduğu bulunmuştur (12). Topoizomeraz IV'de mutasyonlar sıklıkla ParC bölgesinde meydana gelmektedir. Vahşi tipte ParC bölgesinde serin 80-fenilalanin veya tirozin ile değişimi en yaygın gözlenen mutasyondur. Bu mutasyonlar bazı florokinolonlara 8 kat direnç artışına sebep olur. Direnç mutasyonları, daha az sıklıkta olmakla birlikte *gyrB* genine benzer pozisyonlarında *parE* bölgesinde de bulunmuştur (12).

Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin çok dirençli klinik suşlarında, *gyrA* ve *parC*'nin her birinde bir ya da daha fazla mutasyon yaygın olarak tespit edilmiştir (12). Bunun yanında *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* ve *Treponema pallidum*'da topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerin bulunmaması nedeniyle sadece giraz enziminde gelişen mutasyonlar bu bakterilerde yeni kinolonlara karşı dirence neden olmaktadır (12, 89). Bakterilerin değişik florokinolonlara duyarlılıkları, birincil hedefin hangi enzim olduğuna ve hedef enzimlerin kinolon afinitelerindeki farklara göre değişmektedir (84, 90).

2.4.4.2. Hücrede Kinolon Birikiminde Azalma

Hücre içinde ilaç birikiminin azalması Gram negatif bakterilerde dış membran porin kanallarındaki değişiklik, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde sitoplazmik membran eflüks pompalarının fazla çalışması ile ilişkilidir (17).

Kinolonlar Gram negatif bakterilerde dış membrandaki porinler aracılığı ile hücre içine girmektedir. Porin proteinlerinde değişikliğe yol açan mutasyonlar kinolonların dış membrandan girişini azaltarak hedef enzimlere daha az miktarda ulaşmalarına yol açmaktadır. *E. coli*'de OmpA, OmpC ve OmpF gibi dış membran porin proteinlerinin ekspresyonundaki azalış membran geçirgenliği azaltmaktadır (79). OmpF ekspresyonundaki azalış kinolon grubu antibiyotiklerin yanı sıra betalaktamlar, tetrasiklinler ve kloramfenikol gibi antibiyotiklerin de duyarlılığında azalmaya neden olmaktadır (79).

Hem Gram pozitif hem Gram negatif bakterilerde spesifik olmayan enerji bağımlı eflüks pompa sistemleri bulunmaktadır. Bazal seviyede sentezlenen eflüks pompaları, diğer antibiyotiklerde olduğu gibi kinolonlara doğal dirence sebep olmaktadır (91). AcrAB, AcrEF, EmrAB, MdfA ve YdhE *E.coli*'de kinolon direncine neden olan kromozomal kodlanan aktif eflüks pompalarıdır (79).

2.4.4.3. Plazmid Aracılı Kinolon Direnci

Plazmid aracılı kinolon direnci (PMQR-plazmid mediated quinolone resistance) ilk kez, 1998 yılında Birmingham'da Alabama Üniversitesi'ndeki bir hastanın idrar örneğinden 1994 yılında izole edilen siprofloksasine dirençli bir *K. pneumoniae* izolatında bildirilmiştir (92-93). Test edilen tüm kinolonların MİK değerini yükselttiği, kinolonların intrasellüler konsantrasyonlarına veya dış membran porininin baskısına etki etmediği ve *E. coli* türlerinde *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *ompF* ya da *ompC* mutasyonlarıyla birlikte direnci arttırdığı için bunun yeni bir direnç mekanizması olarak isimlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür (20, 93). Plazmidin tekrarlayan pentapeptid ailesine ait bir proteini kodladığı anlaşılmış ve bu gen bölgesi *qnr* olarak adlandırılmıştır (93). Sonrasında farklı *qnr* genlerinin de saptanması nedeniyle *qnrA1* olarak yeniden adlandırılmıştır. Dünya genelinde *Enterobacteriaceae* ailesinden birçok bakteride belirlenen *qnrA* genini diğer plazmid aracılı direnç genleri olan *qnrS*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrD* takip etmiştir (11). Yıllar

içerisinde plazmidle aktarılan eflüks pompa aktivitesine yol açan *qepA*, *oqxAB* ve bir aminoglikozit asetiltransferazı kodlayıp norfloksasin, siprofloksasin aktivitesini azaltan *aaa(6')-Ib-cr* genleri de tanımlanmıştır (11, 21).

Hedef enzim değişimi gibi kromozomal direnç, kuşaktan kuşağa vertikal geçerken, buna ilaveten PMQR, bakteriden bakteriye konjugasyon yoluyla horizontal geçiş göstererek acil bir klinik problem olmuştur (17).

2.4.4.3.1. *qnr* genleri

2.4.4.3.1.1. *qnrA*

İlk saptanan PMQR determinantı *qnrA1*, çoklu ilaç direnci olan *K. pneumoniae* suşunda FOX-5 tipi beta laktamaz kodlayan 56 kb'lık pMG252 plazmidi araştırılırken bulunmuştur. Daha sonra bu plazmidle transkonjugatlara, kinolonlara karşı düşük seviyeli direnç transferi yapılabildiği gösterilmiştir (11, 92-93). Transkonjugatlarda nalidiksik asit, norfloksasin, siprofloksasin, klinofloksasin, levofloksasin, pefloksasin ve trovafloksasin için MİK'lerin 4-16 kat arttığı saptanmıştır. Klinik direnci temsil edecek kadar MİK artışına sebep olmamasına rağmen yüksek düzey kinolon direncinin seleksiyonunu kolaylaştırmaktadırlar (21). pMG252 plazmidinin kinolonlara, betalaktamlara, aminoglikozitlere, sülfonamidlere, trimetoprim ve kloramfenikole direnç geni taşıdığı görülmüştür (91) *qnrA1*'in tekrarlayan pentapeptid ailesine ait 218 aminoasitlik bir proteini kodladığı belirlenmiştir (93). Bu proteinlerin biyokimyasal işlevi tam olarak bilinmemektedir (20-21).

Yapılan farklı çalışmalarda *K. oxytoca* izolatında *qnrA2*, *Shewenella algae* izolatında *qnrA3*, *qnrA4*, *qnrA5* ve *Proteus mirabilis* izolatında *qnrA6* genleri saptanmıştır (94-96). <http://www.lahey.org/qnrStudies> veritabanına göre bugüne kadar *qnrA1-qnrA7* varyantları tanımlanmıştır (97).

2.4.4.3.1.2. *qnrS*

qnrS, Japonya'da 2003 yılında bir besin zehirlenmesi sırasında izole edilen *Shigella flexneri* suşunda saptanmıştır (98). 218 aminoasitten oluşan QnrS proteini, QnrA ile %59

aminoasit benzerliği göstermektedir (11). Daha sonra, başka QnrS varyantları da tanımlanmıştır (QnrS1-QnrS9) (97).

2.4.4.3.1.3. *qnrB*

qnrB, Hindistan'da 2002 yılında Jacoby ve ark. tarafından QnrA bölgesi araştırmak için, CTX-M-15 beta laktamazını üreten *K. pneumoniae* suşları incelenirken tanımlanmıştır. 226 aminoasitten oluşan QnrB'nin QnrA ile %39,5, QnrS ile %37,4 oranında aminoasit benzerliği gösterdiği bildirilmiştir (99). *qnrB* varyantlarının sayısı *qnrA* ve *qnrS* varyantlarından daha fazladır (QnrB1-QnrB74) (97).

2.4.4.3.1.4. *qnrC*

qnrC, 2008 yılında Çin'de, Shanghai'de üriner sistemden izole edilen *Proteus mirabilis* suşunda bildirilmiştir. *qnrC*'nin kodladığı 221 aminoasitlik proteinin *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1* ve *qnrD* tarafından kodlanan proteinlerle sırasıyla %64, %42, %59, %43 oranında aminoasit benzerliği taşıdığı saptanmıştır (100).

2.4.4.3.1.5. *qnrD*

qnrD ise Çin'de 2009 yılında siprofloksasine azalmış duyarlılığı olan, siprofloksasin MİK düzeyinde 32 kat artış yapan, 2006-2007 yıllarında insandan izole edilen dört *Salmonella enterica* izolatında saptanmıştır. 214 aminoasitten oluşan tekrarlayan pentapeptid ailesinden olan bu proteinin geni *qnrD*, %48 *qnrA1*, %61 *qnrB1* ve %32 *qnrS* ile benzerlik göstermektedir (101).

2.4.4.3.1.6. *qnr* Genlerinin Kökenleri

Qnr varyantlarının etkileyici sayı, çeşit ve coğrafik alanda bulunmaları, bu veya benzer genlerin 1998'deki bildirimlerinden önce de hatırı sayılır bir süre boyunca var olduklarını düşündürmektedir (21). 48 Gram negatif klinik ve çevresel tür taranmış ve *qnrA*'nın atalarının kromozomal olarak *Shewanella algae* suşunda, *qnrS* geninin bir benzerinin *Vibrio splendidus*'ta, *qnrB* homologlarının *Stenotrophomonas maltophilia*

suşlarında bulunduğu saptanmıştır (11, 91). *Shewanella algae* sulak çevrede bol miktarda bulunan nadiren insan enfeksiyonları ile ilişkilendirilen bir bakteridir. Sargasso Deniz’inden toplu halde toplanan mikrobiyal popülasyonların sekans veritabanında, tekrarlayan pentapeptidleri kodlayan bir gen tespit edilmiştir. Bu genin proteini, QnrB5 ve QnrB19 ile %88 oranında benzerlik göstermiştir (102-103). 2006 yılında, Seine nehrinin kentsel bölgelerinden su örneklemeleri yapılmış ve kinolon direnci taşıyan *Aeromonas punctata* subsp. *punctata* ve *Aeromonas media* suşlarının *qnrS2* taşıdığı görülmüştür (104). Sonuç itibarıyla, bu veriler sirkülasyondaki bazı *qnr* genlerinin muhtemelen su kaynaklı çevresel mikroorganizmaların kromozomlarından köken aldığına işaret etmektedir (21).

Kinolonların metabolize edilmeden insanlar ve hayvanlar tarafından atık sulara bırakılmaları, fotodegradasyon ve terrestrial mantarlar tarafından değişime uğramadan aktif kalabilmeleri, akuatik mikroorganizmalarda *qnr* genlerinin bulunması için olası mekanizmalar oldukları düşünülmektedir (21).

Aynı zamanda birçok Qnr benzeri proteinler, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* gibi Gram pozitif bakterilerin kromozomunda tanımlanmıştır. Ancak, bu pentapeptid tekrar proteinleri, QnrA1, QnrB1 ve QnrS ile yalnızca %16–22 aminoasit benzerliği göstermiştir (11).

Stenotrophomonas maltophilia’da kromozomal kodlanan bir gen bulunmuş ve *Smqnr* olarak isimlendirilmiş, *Serratia marcescens*’te bulunan genin proteini SmaQnr’ın QnrB1 ile %80 aminoasit benzerliği gösterdiği ve *E. coli*’de eksprese edildiğinde kinolon direncine neden olduğu tespit edilmiştir (11).

2.4.4.3.1.7. Qnr Proteinlerinin Etki Mekanizması

PMQR proteini olan Qnr’ın detaylandırılmış etki mekanizması hala bilinmemektedir. Florokinolon direnci de gösteren analog pentapeptid tekrar proteinleri MbcG ve MfpA ile ilgili çalışmalardan bir takım çıkarımlar elde edilmiştir.

MbcG, Qnr ile %19,6 oranında aminoasit benzerliği gösteren bir pentapeptid tekrar proteindir. DNA giraz’ı mikrosin etkisinden korur. Mikrosinler etki mekanizmalarına göre farklılık gösteren küçük inhibitör protein sınıfıdır. Bunlardan bir tanesi, mikrosin B17 (MccB17), kinolonlar gibi DNA giraz’ı inhibe eden (kinolonlardan farklı bir bölge aracılığıyla) bir bakteriyel toksindir (105, 106). MccB17 üreten organizmalar, bu toksinin

etkisinden kendilerini koruyan MbcG de üretir ve MbcG klinik izolatlarda direnç plazmidlerinin üzerinde bulunmuştur. Konak *E.coli* J53 hücrelerinde plazmid aracılı MbcG, sparfloksasin'in MİK'inde hafif bir yükselme meydana getirmiştir (107).

QnrA ile %18,9 aminoasid benzerliğine sahip bir pentapeptid olan MfpA daha derinlemesine çalışılmıştır. *mfpA* geni ilk olarak *Mycobacterium smegmatis*'in kromozomunda görülmüştür. Plazmidde eksprese edildiğinde bu gen, siprofloksasin MİK değerinde 4-8 kat arasında değişen bir artışa sebep olmuştur. *M. smegmatis*'te bu genin inaktive edilmesi ile siprofloksasin duyarlılığının arttığı tespit edilmiştir. Bu genin bir varyantının *Mycobacterium tuberculosis*'de olduğu gösterilmiştir ve bunun DNA girazın aktivitesini direk olarak enzimle etkileşime girerek inaktive ettiği görülmüştür (11). Bu verilere dayanarak, MfpA'nın DNA yerine DNA giraza bağlandığı öne sürülmektedir. Bu yolla kinolon-giraz-DNA kompleksinin oluşmasını engelleyerek kinolonların etki yolunu ortadan kaldırdığı saptanmıştır (21). İn vitro çalışmalarla, saflaştırılmış Qnr proteinin MfbA'ya benzer ama aynı olmayan bir etki ile DNA giraz veya topoizomerez IV'e bağlanarak bu enzimleri siprofloksasinin inhibisyonundan koruduğu gösterilmiştir (21).

Sonuç olarak Qnr proteini, MbcG ve MfpA ile ortak bir homoloji paylaşırlar ve bu proteinler DNA taklitleridir. Qnr proteinleri kinolon direncini iki farklı mekanizma ile sunar. MbcG ve MfpA gibi DNA'ya DNA giraz veya topoizomerez IV'ün bağlanmasını azaltırlar. Dolayısıyla kromozom üzerindeki ulaşılabilir enzim sayısını azaltarak hücreleri kinolondan korurlar. Qnr proteinleri DNA giraz veya topoizomerez IV'e, (enzim, DNA, kinolon kompleksine ihtiyaç duymadan) bağlanarak enzim tarafından oluşturulan enzim-DNA kompleksine kinolonun girişini inhibe ederler (17).

Binden fazla tekrarlayan pentapeptit proteini tanımlanmış olmasına rağmen bunların doğal işlevi bilinmemektedir. Qnr'ın esas fonksiyonu hücreyi DNA hasarı yapan doğal ajanlardan korumak olabilir (21).

2.4.4.3.1.8. Qnr Proteinlerinin MİK Üzerine Etkisi

Plazmid kaynaklı *qnr*'ın birikimi Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) standartlarına göre nalidiksik asite dirençli, florokinolonlara duyarlı bir suş oluşturur. QnrA'nın kinolondan koruma derecesi tipik olarak *qnrA* plazmidini içeren ve içermeyen *E.coli* suşları kullanılarak çalışılmıştır. Yapılan başka çalışmalarda da bakteride *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*'in klonlanması ve *E.coli*'de eksprese edilmesi 8-64 kat MİK artışına

sebepe olmuştur (11). Genel olarak Qnr proteinleri nalidiksik aside dirence ve florokinolonların duyarlılığında azalmaya neden olmasına rağmen QnrD pozitif suşların siprofloksasine azalmış duyarlılık gösterdikleri, nalidiksik asite ise duyarlı oldukları bildirilmiştir (11, 91).

Genel olarak Qnr proteinleri tek başına nalidiksik aside dirence ve norfloksasin, siprofloksasin, levofloksasin gibi florokinolonların duyarlılığında azalmaya neden olmasına rağmen, kromozomal mutasyonların birlikteliği ile yüksek düzey kinolon direncine yol açabilmektedir (91).

2.4.4.3.1.9. Qnr Plazmidleri

Kinolon direnç genleri, farklı büyüklüklerde (2,7-320 kb) ve farklı bakteri türlerinde taşınabilen plazmidler üzerinde bulunur. Bu plazmidlerin neredeyse tamamı başka direnç genleri de taşımaktadır.

qnrA ve *qnrB* pozitif plazmidler diğer *qnr* genlerine göre çoklu ilaç direnci ile daha fazla ilişkilendirilmiştir.

qnr genleri, SHV, CTX-M, FOX, KPC, VEB, OXA, DHA gibi birçok farklı tipte beta laktamazla birlikte bulunmaları yanında, *aadA1*, *aadA2*, *dfrA1*, *dfrA12*, *cmlA1*, *catB2*, *aac(6')-Ib-cr*, *sull* gibi birçok beta laktamaz olmayan antimikrobiyal direnç genleri ile de ilişkilendirilmiştir (11, 91).

2.4.4.3.2. *aac(6')-Ib-cr* Geni

2006 yılında Shanghai'de toplanmış klinik *E. coli* suşlarında farklı bir direnç geni olan *aac(6')-Ib-cr* geni keşfedilmiştir (108). *aac(6')-Ib* geni kanamisin, tobramisin ve amikasin direncine neden olan bir aminoglikozit asetiltransferazı kodlar. Bu genin bir varyantı olan *aac(6')-Ib-cr* geni ise norfloksasin ve siprofloksasinin piperazinil parçasındaki amino grubunun nitrojenini asetilleme kabiliyetine sahip aminoglikozit asetiltransferazı kodlar. Sonuçta norfloksasin ve siprofloksasin gibi bazı kinolonların enzimatik inaktivasyonuna ve duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır Bu enzim piperazinil nitrojeni olmayan kinolonlara (levofloksasin gibi) etkisizdir (11). Sekanslama sonucunda siprofloksasin direncine neden olan bu allelin iki kodon (Trp102Arg ve Asp179Tyr) değişikliğiyle *aac(6')-Ib* geninden farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu

kodonların, Trp102Arg ve Asp179Tyr, siprofloksasin direnç fenotipi için gerekli ve yeterli olduğu ortaya koyulmuştur (21).

Vahşi tip *E. coli* suşlarının siprofloksasin için yaklaşık 0,008 µg/mL MİK değeri vardır ve çoğu qnr plazmidi *E. coli* için 0,25 µg/mL siprofloksasin MİK değerine neden olur. *aac(6')-Ib-cr* tarafından sunulan MİK artışı Qnr proteinlerinin sunduğundan daha azdır. Siprofloksasin ve norfloksasin'deki MİK artışı mütevazî seviyelerde olmasına rağmen (3-4 kat), Mutant Önleme Konsantrasyonuna (MPC) olan etki belirgindir (21, 108). "cr" dünyadaki en yaygın varyantır. *aac(6')-Ib-cr*'nin ilişkili olduğu diğer PMQR genleri arasında *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS*, *qepA* sayılabilir. *qnr* ve *aac(6')-Ib-cr* aynı hücrede birlikte bulduklarında *qnr*'nin tek başına sağladığından 4 kat daha fazla MİK artışı sağlamakta ve duyarlılık bakımından klinik breakpoint değerlerine (1 µg/ml) yaklaşmaktadır. Bunun yanı sıra *aac(6')-Ib-cr*'nin yalnız bulunması, siprofloksasine maruz kalma durumunda oluşacak kromozomal mutasyon sıklığını arttırmaktadır (108). Beta laktamazlar CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-24, DHA-1, SHV-12 ve KPC-2 ile de ilişkilendirilmiştir (11). Ayrıca *Aac(6')-Ib-cr* özellikle dünyadaki pekçok ülkede CTX-M-15'in predominant ESBL olmasına neden olacak kadar hızlı yayılım göstermiş olan, CTX-M-15 eksprese eden IncF11 plazmidlerinde bulunurlar (21).

2.4.4.3.3. Plazmid Aracılı Eflüks Pompa Genleri

Antimikrobiyal efflux mekanizmaları tek veya çoklu ajanlara etki gösterebilir veya hem plazmidlerle hem de kromozomlarla birlikte taşınabilir. Gram-negatif bakterilerde kinolon direncinin efflux determinantları çoğunlukla endojen kromozomal genlerce kodlanan direnç-nodülasyon-hücre-bölünme (RND: resistance nodulation cell division superfamily) ailesine üye olan çoklu ilaç taşıyıcılarıdır. İki plazmid aracılı kinolon taşıyıcısı bulunmuştur: OqxAB ve daha yakın zamanda da QepA (21).

2.4.4.3.3.1. *qepA* Geni

Eflüks pompaları sıklıkla kromozom kaynaklıdır. Ancak plazmid aracılı kinolon direncine neden olan *qepA* (quinolon efflux pump) geni 2002 yılında Japonya bir yatan hastanın idrar örneğinden izole edilen *E.coli* suşunda gösterilmiştir (109). Yeni efflux pompası QepA'nın plazmid pHPA'da kodlandığı bulunmuştur. Bu plazmid

aminoglikozidler, florokinolonlar ve geniş-spektrumlu β -laktamlara karşı çoklu-direnç profili sergilemiştir. *qepA* geni, 14 transmembran geri atım pompalarının major facilitator süperfamily (MFS) ile ilişkili olan 511 aminoasitlik bir proteini kodlayarak norfloksasin ve siprofloksasin gibi hidrofilik kinolonların hücre dışına pompalanmasına neden olmakta, böylece bu antibiyotiklerin MİK'lerini arttırmaktadır (109, 21). Bir yıl sonra Fransa'dan *qepA*'nın bir varyantı olan *qepA2*'nin varlığı bildirilmiştir. QepA (şimdiki adıyla QepA1) determinantına benzer bir fenotip göstermiştir (110).

Filogenetik analizlere göre QepA, Gram pozitif *Actinomycetales*'in 14-transmembran-segment-majör kolaylaştırıcı transporter süperalesine ait olup Gram negatif bakterilere ait değildir (109).

qepA'nın bir *E. coli* transkonjuganındaki nalidiksik asit, siprofloksasin ve norfloksasin'e ait MİK değerlerini sırasıyla 2, 32 ve 64 kat arttırdığı belirlenmiştir (109).

2.4.4.3.3.2 *oqxAB* Geni

Bir konjugatif plazmid olan ve olakindoks direnci gösteren pOLA52, domuz gübresinden izole edilen *E. coli* suşlarında bulunmuştur (111). Olakindoks tarım ve hayvansal büyüme desteği olarak kullanılan bir kinoksalin türevidir. Bu dirence neden olarak RND ailesine ait olan bir multidrug efflux pompası, OqxAB tanımlanmıştır (112). Plazmid aracılı OqxAB ilk kez 2009 yılında Güney Kore'de, 1999 yılında bir hastanın kanından izole edilen *E. coli* izolatında saptanmıştır (113). OqxAB olakindoks yanısıra, siprofloksasin, nalidiksik asit, kloramfenikol, trimetoprim de atmaktadır. Doğal bir *acrA* geninden yoksun olan bir *E. coli* suşunda eksprese olmasının ardından, pOLA52 nalidiksik asit ve siprofloksasin'in MİK değerlerinde sırasıyla 8 ve 16 katlık artışlar göstermiştir (114) *oqxAB* genleri, değişik derecede ekspresyonların olakindoks duyarlılığında farklılıklar ile korele olduğu, *K. pneumoniae*'nin kromozomunda da mevcuttur. *oqxAB*'nin doğal işlevi henüz bilinmemektedir (113).

Bugüne kadar yapılmış çalışmalar incelendiğinde, plazmid aracılı kinolon direnci genlerinin sıklığının %1-%50 gibi geniş bir aralıkta değiştiği görülmektedir. Bu durumun sebebi, çalışmalarda belli ve farklı özellikte bakterilerin seçilmesi olabilir. Plazmid aracılı kinolon direnci genlerinin kinolonlara duyarlı bakterilerde bulunabildiği gösterilmiş olmakla birlikte, çalışmaların çoğu kinolonlara dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinde yapılmıştır (115).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma grubu

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakteriyojoloji Biriminde Ocak 2012- Ağustos 2013 tarihleri arasında 187 hastaya ait kan örneklerinden izole edilen 193 *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. izolatları çalışmaya alınmıştır. Altı hastanın iki epizotu tespit edilmiş olup her epizotun ilk izolatu çalışmaya dahil edildi. Dört hafta veya daha uzun süre arayla izole edilen ikinci izolatu farklı epizot olarak kabul edildi (116). 193 izolattan nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen 81 hastaya ait 85 izolat PMQR genlerinin araştırılması için moleküler çalışmaya alındı. Dört hastanın iki epizotu tespit edilmiş olup her epizotun ilk izolatu çalışmaya dahil edildi (116). Her hastadan ilk izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. izolatu çalışıldı.

3.1.2. Araç ve Gereçler

1.5 mL'lik santrifüj tüpleri, 0.6 mL'lik microsantrifüj tüpleri (Nest Biotech, P.C.R), 0.2 mL'lik PCR tüpleri (Axygen, ABD), 10 µL'lik, 100 µL'lik, 1000 µL'lik pipet uçları (Axygen, ABD) gibi sarf malzemeler kullanıldı. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait; 37°C'lik etüv (Mettler BM 600, Almanya), biyogüvenlik kabini (Chemocell LRCX-UV, Teknomar, Ankara), bunsen beki, -20°C (BEKO D7210 SMF, Türkiye) ve -80°C soğutucu (New Brunswick Scientific Mod U570 premium, Thermo, ABD), +4°C buzdolabı (Arçelik, 2008), pastör fırını (Heraeus T550, Portekiz), dikey model otoklav (Kermanlar, İstanbul), Otomatize kültür sistemi (BACTEC™ 9240 Blood Culture System) (Becton Dickinson Company, ABD), Otomatize mikrobiyolojik bakteri tanımlama sistemi (Phoenix™ 100)

cihazı (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, ABD), CrystalSpec™ nefelometre (Becton Dickinson Company, ABD), otomatik pipetler (Lab-mate, İngiltere), çalkalayıcı su banyosu (Memmert GFL 1086, Almanya), pH metre (Hanna, Romanya), manyetik karıştırıcı (Stuart, İstanbul), vorteks (Heidolph, Almanya), santrifüj (Thermo, ABD), buz makinesi (Scotsman AF 80, İtalya), hassas terazi (Sartorius Laboratory, Almanya), mikrodalga fırın (Beko 1550, Türkiye), termal döngü cihazı (ABI 9700, Applied biosystems), elektroforez tankı (Thermo Scientific Owl, ABD), dijital güç kaynağı (EC-105), Jel dökümantasyon sistemi (Bio-Rad, ABD), UV illüminatör (Wilber lourmat, Almanya), deiyonize su cihazı (Barnstead, ABD) ve distile su cihazı (GFL, Ankara) gibi cihazlar kullanıldı. Vidalı kapaklı cam tüpler, 250 mL'lik erlenmayer, 50 mL'lik mezür, cam balon joje, 50 mL'lik ve 15 mL'lik falkon tüpler, kaynatma kabı, jel dökme tepsi ve tarak kullanıldı.

3.1.3. Kimyasallar

Bakteri identifikasyon (ID) ve antimikrobiyal duyarlılık test (ADT) indikatörleri (Becton Dickinson Company, ABD), 30 µg nalidiksik asit (NA) içeren disk (Bioanalyse, Türkiye), 5 µg siprofloksasin (CIP) içeren disk (Bioanalyse, Türkiye), Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya), Sodyum klorür (NaCl) (Merck, Almanya), Hidroklorik asit (HCl) (Merck, Almanya), Tris-HCl (Sigma, Almanya), EDTA(Etilendiamin-Tetra-Asetik Asit) (Sigma, Almanya), Tris Baz (Sigma, Almanya), Borik asit (Bio Basic INC., ABD), Agaroz (HIMEDIA, Hindistan), Etidyum bromür (Merck, Almanya), Bromfenol mavisi (BioRad, ABD), Ksilen siyanol (Sigma, Almanya), Gliserol (Merck, Almanya), Tryptone, Yeast Extract (Oxoid, İngiltere), double distile water (ddw), enjeksiyonluk su, Amplifikasyon seti (Promega, ABD), dNTP seti (Roche, Almanya; Fermentas, ABD), Primerler (Biomatik, ABD), 100 bp DNA marker (Biolabs, İngiltere) kullanıldı.

3.1.4. Besiyerleri

Eozin Metilen Blue agar (EMB) (Oxoid, İngiltere), %5 koyun kanlı agar (BD Colombia) (Becton Dickinson Company, ABD), Çikolatamsı agar (BD-CHOCO) (Becton Dickinson company, ABD), Triptik soy broth (Becton Dickinson Company, ABD), Mueller Hinton agaroz (HIMEDIA, Hindistan), Luria Bertani (LB) Broth (Oxoid,

İngiltere), Kan kültürü vasatları (BD Bactec Plus Aerobic/F ve BD Bactec Peds Plus/F, Becton Dickinson Company, ABD), Bakteri identifikasyon (ID) ve Antimikrobal duyarlılık test (ADT) buyyon (Becton Dickinson Company, ABD) besiyerleri çalışmamızda kullanıldı.

İzolatların saklanması için %15 gliserol içeren triptik soy broth besiyeri kullanıldı. 30 g triptik soy broth, 150 mL gliserol ve toplam hacim 1000 mL olacak şekilde 850 mL distile suda çözüldü. 1 atm basınç ve 121°C'de 15 dakika (dk) otoklavlandı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra 1.5 mL'lik mikrosantifüj tüplerine 1 mL hacimlerde dağıtıldı.

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi için Mueller Hinton agar (MHA) kullanıldı. 38 g Mueller Hinton agar, toplam hacim 1000 mL olacak şekilde distile suda eritildi ve 1 atm basınç ve 121°C'de 15 dk otoklavlandı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra petri plaklarına 4 mm kalınlığında olacak şekilde dökülerek donduruldu.

Polimeraz zincir reaksiyonu için bakteriyel DNA izolasyonu öncesinde Luria Bertani (LB) broth kullanıldı. 10 g Triptan, 5 g yeast ekstrakt, 10 g NaCl bir miktar distile suda çözüldükten sonra NaOH kullanılarak pH: 7.5'a ayarlandı. Hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandı ve otoklavlanarak steril edildikten sonra 3 mL hacimlerde kapaklı cam tüplere dağıtıldı.

3.1.5. Solüsyonlar

3.1.5.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar

- Tris HCl (1 M): Beher içerisine; 80 mL distile su konulup üzerine 15.7 gr Tris HCl eklendi. Solüsyon berraklaştığında pH metre ile pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim mezür aracılığı ile 100 mL'ye tamamlandı. Kapaklı cam şişe içerisine konulup, otoklavlanarak steril edildi.
- EDTA (0.5 M): Beher içerisine; 29.2 g EDTA (MA:292.2) distile su ile 200 mL'ye tamamlandı. Solüsyon berraklaştığında pH metre ile pH 8.0 olana kadar NaOH peleti ilave edildi. Kapaklı cam şişe içerisine konulup, otoklavda steril edildi.
- TE tamponu: Beher içerisine; son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde Tris HCl (1 M) stok solüsyonundan 1mL, EDTA (0.5 M)

stok solüsyonundan 200 µL alınarak 98.8 mL steril distile su eklendi. Hazırlanan tampon vortekslenerek karıştırıldı.

3.1.5.2. Master Mix İçin Kullanılan Solüsyonlar

- dNTP mix: 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine 100 mM'luk dTTP, dATP, dGTP, dCTP'in her birinden 40 µL koyuldu ve her birinin üzerine 240 µL steril distile su eklenerek hazırlandı. Hazırlanan karışım kısa bir süre vortekslendi. Böylece 10 mM konsantrasyonunda dNTP karışımı elde edildi. Hazırlanan karışım 200 µl olarak yeni, steril, mikrosantrifüj tüplerine bölünerek kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.
- Primer çalışma solusyonu: Liyofilize haldeki primerler stok konsantrasyonu 100 pmol/µL olacak şekilde, firmanın öneriler doğrultusunda, steril TE tamponuyla sulandırılarak stok çözeltiler elde edildi. Her bir primer için; 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne stok çözeltiden 20 µL koyuldu ve üzerine 180 µL steril TE tamponu eklenerek son konsantrasyonu 10 pmol/µL olan primer çalışma solüsyonu hazırlandı. Kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.5.3 Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar

- 5X TBE tamponu: Beher içerisine 54 gr Tris Baz, 27.5 gr Borik Asit, 3.72 gr EDTA yaklaşık 700 mL distile su ile manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözülüp berraklaştıktan sonra hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve pH metre ile pH 8.3'e ayarlandı.
- Yükleme Tamponu: Beher içerisinde 30 mL gliserol, 250 mg bromfenol mavisi, 250 mg ksilen siyanol distile su içinde karıştırıldı ve hacim 100 mL'ye tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine 1 mL olarak dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.
- Etidyum Bromür: 50 mg etidyum bromür 10 mL distile su ile son konsantrasyonu 5 mg/mL olmak üzere manyetik çalkalayıcı üzerinde karıştırılarak homojen olarak çözünmesi sağlandı. Koyu renkli cam şişeye konuldu. Oda ısısında muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Ocak 2012-Ağustos 2013 tarihlerinde laboratuvarımıza kan kültür vasatına inoküle edilmiş olarak gönderilmiş olan kan örnekleri BACTEC 9240 otomatize kültür sisteminde inkübe edildi (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, ABD). Üreme sinyali izlendiğinde kan kültür vasatından alınan bir miktar örnek %5 koyun kanlı agar, EMB agar ve çikolatamsı agara inoküle edildi ve uygun koşullarda inkübe edildi (117-118).

1. İnkübasyon sonrasında EMB agarda pembe-mor, metalik yeşil röfle yapan, laktoz pozitif, kanlı agarda düzgün 2-3 mm çapında *E. coli* olduğu düşünülen ve EMB agarda 3-4 mm çapında pembe mukoid ve laktoz pozitif, kanlı agarda mukoid 3-4 mm çapında *Klebsiella* spp. olduğu düşünülen oksidaz negatif, fermentatif, gram negatif basillere ait şüpheli koloniler klasik yöntemlere ilaveten (119), Phoenix idendifikasyon/antimikrobiyal duyarlılık testi (ID/AST) (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, ABD) cihazı üretici firma önerileri doğrultusunda Phoenix ID/AST otomotize mikrobiyoloji sisteminde tür düzeyinde tanımlandı ve antimikrobiyal duyarlılık testleri çalışıldı (120).
2. CrystalSpec™ nephelometre (Becton Dickinson company, ABD) kullanılarak ID buyyon içerisinde 0.5 McFarland standartına ayarlanmış bakteri süspansiyonları hazırlandı.
3. Antimikrobiyal duyarlılık testi (AST) buyyon tüpüne, bakteri konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde, 25 µL bakteri süspansiyonu ilave edildikten sonra AST buyyon içerisine bir damla Phoenix™ AST indikatörü damlatıldı.
4. Hazırlanan paneller 35°C inkübasyon sıcaklığı sağlayan ve 20 dakikada bir okuma yapan Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, ABD) cihazına yerleştirildi (120, 121).
5. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. olarak tiplendirilen şuşlar DNA izolasyonu yapılmaya kadar %15 gliserol (Riedel-de Haën AG, Germany) içeren triptik soy broth besiyerinde (Fluca, 22092) -80 °C'de saklandı.

6. İzolatların nalidiksik asit ve siprofloksasin antibiyotik duyarlılıkları NMIC/ID-55 panellerinin kullanıldığı BD Phoenix sistemine ilaveten Kirby-Bauer metoduna göre, MHA kullanılarak standart disk diffüzyon metodu ile araştırıldı. Duyarlılık testlerinin sonuçları CLSI kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (14).
7. GSBL üretiminin fenotipik tespiti için kombine disk yöntemi kullanıldı (14).

3.2.2. Moleküler Yöntemler

3.2.2.1. DNA İzolasyonu

Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin orta duyarlı/dirençli olan izolatların direnç gen bölgelerinin tespiti için öncelikle DNA eldesi işlemi gerçekleştirildi.

Kaynatma metodu ile hücre duvarı ve membranı parçalanarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Tür düzeyinde tanımlanan ve -80 °C'de saklanan bakteri izolatları %5 koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye) besiyerine inoküle edildi. Aerobik koşullarda 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi.
2. Üreyen kolonilerin saflığından emin olunarak 3 mL LB sıvı besiyerine tek koloni pasajı yapıldı.
3. 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcı su banyosunda 120 rpm'de bir gece inkübe edildi.
4. Kültürün 1.5 mL'si steril eppendorf (1.5 mL) tüplere transfer edilerek mikrosantrifüjde 10000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi yapıldı.
5. Süpernatant kısmı nazikçe dökülerek pelletin üzerine 1 mL TE tamponu eklenip vortekslendi.
6. Süspansiyona tekrar 5000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulandı.
7. Süpernatant kısmı atılıp pelletin üzerine 1 mL TE eklenip vortekslendi.
8. Santrifüj işlemi aynı koşullarda bir kez daha tekrarlanıp süpernatant kısmı döküldükten sonra pelletin üzerine 1000 µL TE eklendi ve vortekslendi.
9. Elde edilen bakteri süspansiyonu 95°C'de 15 dk kaynatıldı.
10. Kaynatma işleminin ardından bakteri süspansiyonu 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

11. Bakteriye DNA'nın olduğu süpernatant kısmından 400 µL alınıp steril 0.6 mL'lik PCR tüplerine beş alikot olacak şekilde paylaştırıldı. İzole edilen DNA çalışma için kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi (122).

3.2.2.2. PMQR Genlerinin Varlığını Araştırmak İçin Kullanılan Primerler

PMQR gen bölgelerini amplifiye etmek için, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* ve *aac(6)-Ib* genleri için birer primer çifti kullanıldı. *oqxAB* eflüks pompa genleri *oqxA* ve *oqxB* genleri için de birer primer çifti kullanıldı. İzole edilmiş -20°C'de muhafaza edilen DNA, PCR için kalıp olarak kullanıldı. Her test iki defa tekrarlandı. Çalışılan primer setlerinin dizileri Tablo 3'de verildi.

Tablo 3. PMQR genlerinin araştırılmasında kullanılan primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp*)	Referans
QnrA F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516	(123)
QnrA R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
QnrB F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469	(123)
QnrB R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
QnrC F	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	307	(124)
QnrC R	CACCTACCCATTTATTTTCA		
QnrD F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	582	(101)
QnrD R	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
QnrS F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	(124)
QnrS R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
QepA F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	199	(125)
QepA R	CTTCCTGCCCAGTATCGTG		
Aac(6)-Ib F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	(126)
Aac(6)-Ib R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTC		
oqxA F	CTTGCACTTAGTTAAGCGCC	868	(127)
oqxA R	GAGGTTTTGATAGTGGAGGTAGG		
oqxB F	GCGGTGCTGTTCGATTTTA	787	(127)
oqxB R	TACCGGAACCCATCTCGAT		

*bp: Baz çifti

3.2.2.3. Master Mix Solüsyonunun Hazırlanması

Master mix hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 4’de verildi.

Tablo 4. PCR için master mix bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Stok Konsantrasyonu	Miktar 1x(µl)
Buffer	5X	10
dNTP mix	10 mM	1
MgCl ₂	25 mM	3
Primer 1	10 µM	1
Primer 2	10 µM	1
Taq polimeraz	5 U/µl	0.2
ddw		31.8
Template		2
Toplam reaksiyon hacmi		50

Buz üzerine steril 1.5 mL santrifüj tüpü yerleştirildi. Tablo 4’de gösterilen kimyasallar -20°C dondurucudan çıkartıldı. *Taq* polimeraz işlem sırası geldiğinde çıkartıldı. Çözünen kimyasallar 5-10 sn vortekslendikten sonra Tablo 4’de belirtilen sıraya göre pipet aracılığı ile karıştırıldı. Bütün aşamalar buz üzerinde çalışıldı. *Taq* polimeraz kullanılmadan önce hızlı santrifüj (quic speen) edildi ve aşağı yukarı pipetleyerek tüpe aktarıldı. Steril deiyonize su konulduktan sonra tüp 30 sn vortekslenerek master mix karıştırıldı. Bu işlemler sonunda master mix hazırlanmış oldu. Hazırlanan master mix 0,2 mL’lik PCR tüplerine 48 µL olarak pipetlendi. Tüplerin üzerlerine örnek numaraları yazıldı, test edilecek bakteriler ve pozitif kontrollerin önceden izole edilerek -20°C’de saklanmış olan DNA’larından 2 µL’lik hacimlerde her biri için hazırlanmış olan reaksiyon karışımının üzerine pipetlendi. Negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak Doç. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban tarafından bölümümüze gönderilen Çoban ve ark.’nın ,(128) çalışmasında kullanılan *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* ve *aac(6’)**Ib* geni tespit edilen suşlar kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılan suşlar Tablo 5’te sunuldu. Bu şekilde hazırlanan tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi.

Tablo 5. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan suşlar

Suş	Taşıdığı gen	Kaynak*
<i>E. coli</i> J53 pMG252	<i>qnrA1</i>	G. A. Jacoby
<i>E. coli</i> J53 pMG252	<i>qnrS1</i>	G. A. Jacoby
<i>K. pneumoniae</i> ref: 15	<i>qnrB&aac(6')Ib</i>	P. Nordmann

* Prof. George A. Jacoby: Lahey Clinic, Burlington, Massachusetts, USA; Prof. Partice Nordmann: Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914 “Emerging Resistance to Antibiotics”, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine et Université Paris-Sud, K.-Bicêtre, France

3.2.2.4. PCR ile Amplifikasyon

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan reaksiyon bileşenleri otomatik termal döngü cihazına yerleştirildi. *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *aac(6')-Ib*, *oqxA* ve *oqxB* genleri için 94°C’de 5 dk başlangıç denatürasyonu sonrası; her döngü için 94°C’de 60 sn denatürasyon, 55°C’de 60 sn primer birleşmesi, 72°C’de 60 sn polimerizasyon aşamalarını içeren 30 döngü uygulandı ve 72°C’de 10 dk son uzama süresi eklendi (123).

3.2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

- Jelin hazırlanması: 1 gr agaroz 50 mL TBE tamponu ile karıştırılıp mikrodalga fırında agaroz partikülleri tamamen eriyinceye kadar ısıtıldı. İçinde erimiş agaroz bulunan erlen, 55°C’ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk bekletildikten sonra içine son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklendi ve dağılması için çalkalandı. Geniş kuyucuk oluşturan tarak, düz bir zemindeki tepsi üzerine oturtuldu. Jel tepsiye döküldükten sonra katılaşması için oda ısısına bırakıldı. Elektroforez için %2’lik agaroz jel hazırlandı (129).
- Yükleme: Katılaştıran agarozdan tarak çıkarıldıktan sonra tepsi ile birlikte yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi ve üzerini kapatacak şekilde TBE tamponu döküldü. DNA ağarlaştırılarak kuyucuklara pipetleyebilmek ve yürüyen DNA konumunu belirlemek için yükleme tamponu kullanıldı. 10 µL PCR ürünü 3 µL yükleme tamponuna karıştırılarak kuyucuklara aktarıldı. İlk ve son kuyucuklara 5 µL 100 bp adımlı DNA marker yüklendi. Örnekler 10 dk 80 voltta yürütüldükten sonra 100 volta çıkarılıp 30 dk daha yürütüldü. Oluşan bantlar UV transilluminatörde gözlemlendi. Jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekildi.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Genel Özellikleri

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakteriyoloji Biriminde Ocak 2012 - Ağustos 2013 tarihleri arasında 187 hastanın kan örneklerinden izole edilen 193 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatının gönderildiği birimlere göre dağılımı Tablo 6'da verilmektedir.

Tablo 6. Çalışma izolatlarının klinik birimlere göre dağılımı

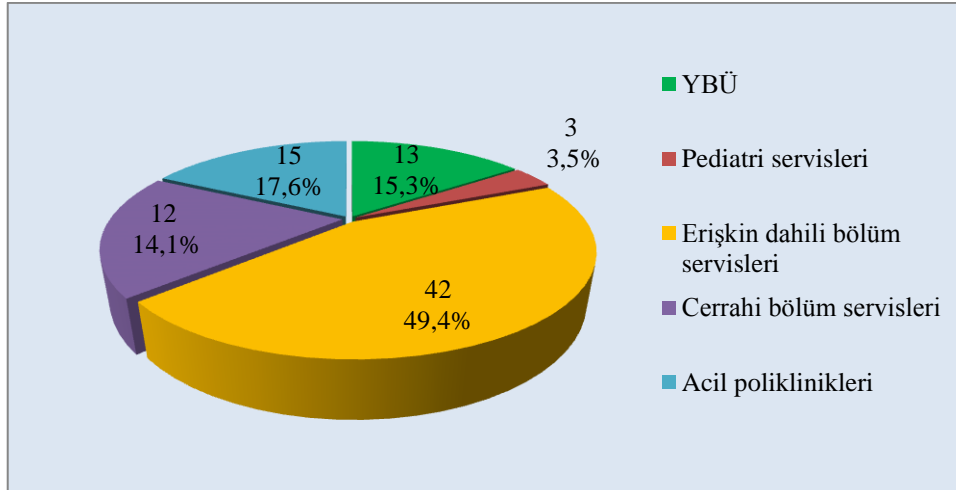
Bölüm	Sayı	Yüzde (%)
Erişkin yoğun bakım üniteleri	26	13,5
Yenidoğan yoğun bakım ünitesi	11	5,7
Erişkin dahili bölüm servisleri	92	47,6
Pediyatri servisleri	10	5,2
Cerrahi bölüm servisleri	28	14,5
Erişkin dahili bölüm poliklinikleri	1	0,5
Pediyatri poliklinikleri	0	0
Cerrahi bölüm poliklinikleri	0	0
Acil polikliniği	22	11,4
Pediyatri acil polikliniği	3	1,6
TOPLAM	193	100

İncelenen 193 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatından nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen 81 hastaya ait 85 izolat PMQR genlerinin araştırılması için çalışma kapsamına alınmıştır. Bu suşların izole edildiği hastaların tedavi aldığı birimler Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 7. Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin dirençli suşların izole edildiği hastaların klinik birimlere göre dağılımı

		Toplam	Yüzde (%)
Poliklinikler	Acil Poliklinik	14	16,4
	Pediyatri Acil Polikliniği	1	1,2
	TOPLAM	15	17,6
Servisler	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi	5	5,9
	Dahiliye Hematoloji Servisi	19	22,2
	Dahiliye Nefroloji Servisi	1	1,2
	Dahiliye Onkoloji Servisi	6	7,0
	Kemik İliği Transplantasyon Servisi	4	4,7
	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	5	5,9
	Radyasyon Onkolojisi Servisi	1	1,2
	Nöroloji Servisi	1	1,2
	Genel Cerrahi Servisi	4	4,7
	Kadın Doğum Servisi	1	1,2
	Kalp Damar Cerrahisi Servisi	2	2,4
	Beyin Cerrahi Servisi	1	1,2
	Üroloji Servisi	4	4,7
	Pediyatri Hematoloji Servisi	2	2,4
	Pediyatri Adölesan Servisi	1	1,2
TOPLAM	57	67,1	
Yoğun Bakım Servisleri	Anestezi Yoğun Bakım Servisi	2	2,4
	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi	3	3,4
	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi	1	1,2
	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi	1	1,2
	Nöroşiruji Yoğun Bakım Servisi	3	3,5
	Koroner Yoğun Bakım Servisi	1	1,2
	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi	2	2,4
TOPLAM	13	15,3	
GENEL TOPLAM	85	100	

İzolatların 13'ü (%15,3) yoğun bakım servislerinde, 42'si (%49,4) erişkin dahili bölüm servislerinde, 12'si (%14,1) cerrahi bölüm servislerinde, 3'ü (%3,5) pediatri servislerinde ve 15'i (% 17,6) acil polikliniklerinde takip edilen hastalardan izole edildi (Şekil 7).



Şekil 7. İzolatların gönderildiği birimlere göre dağılımı. YBÜ: yoğun bakım ünitesi

4.2. İzolatların Antibiyotik Direnç Durumu

Çalışmamızda 187 hastaya ait 193 örneğin 127'si (% 65,8) *E. coli*, 66'sı (%34,2) *Klebsiella* spp. olarak bulundu. 193 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatında nalidiksik asit direnci sırasıyla %56,7 ve %19,7; siprofloksasin direnci %42,5 ve %18,2 olarak saptandı. Tüm *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatında GSBL oranı sırasıyla %40,9 ve %42,4 olarak belirlendi. 193 örneğin GSBL varlığına göre nalidiksik asit ve siprofloksasin direnci Tablo 8'de verilmektedir.

Tablo 8. Tüm izolatlarda GSBL ile kinolon direnç durumu

	Antibiyotik Direnç Oranları n (%)				Toplam n
	<i>E.coli</i> n:127		<i>Klebsiella</i> spp. n:66		
	GSBL (+) n:52 (%40,9)	GSBL (-) n:75 (%59,1)	GSBL (+) n:28 (%42,4)	GSBL (-) n:38 (%57,6)	
Nalidiksik asit	41(%78,8)	31(%41,3)	9(%32,1)	4(%10,5)	85
Siprofloksasin	33(%63,5)	21(%28)	9(%32,1)	3(%7,9)	66

Nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda GSBL üretimi (%58,8), duyarlı olanlara göre (%27,7) daha yüksek bulundu.

Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen 81 hastaya ait 85 izolatın 72'si (%84,7) *E. coli*, 13'ü (%15,3) *Klebsiella* spp. olarak bulundu.

Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları Tablo 9’da gösterildi. GSBL varlığı kombine disk yöntemiyle, siprofloksasin, nalidiksik asit, seftazidim, sefotaksim duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle, diğer antibiyotik duyarlılıkları ise otomatize sistem ile belirlendi. Duyarlılık testlerinin sonuçları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (14).

Tablo 9. Kinolon dirençli çalışma izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

Sıra No	İzolat Kodu	NA	CİP	LEV	AK	GM	GSBL	CAZ	CTX	FEP	FOX	ATM	SAM	TZP	SXT	MEM	IMP	ERT	CZ
1	HEC1	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
2	HEC2	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
3	HEC3	R	R	R	S	R	+	R	R	R	I	R	R	S	R	S	S	S	R
4	HEC4	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	BM	S
5	HEC5	R	R	R	S	R	-	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	BM	R
6	HEC6	R	R	R	R	R	+	R	R	S	S	R	R	I	S	S	S	S	R
7	HKP7	I	I	S	S	R	+	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
8	HEC8	R	S	S	S	S	+	I	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
9	HEC9	R	R	R	S	S	+	R	R	R	I	R	R	S	R	S	S	S	R
10	HEC10	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R
11	HEC11	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	BM	S
12	HEC12	R	R	R	S	R	+	R	R	I	S	R	R	S	R	S	S	S	R
13	HKP13	I	I	S	S	R	+	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
14	HEC14	R	R	R	S	S	+	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	BM	R
15	HEC15	R	R	R	S	S	+	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
16	HEC16	R	I	I	S	S	-	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S
17	HEC17	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	BM	BM
18	HEC18	R	S	S	S	S	+	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	BM	R
19	HEC19	R	R	R	S	S	+	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
20	HEC20	R	R	R	S	S	+	I	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
21	HEC22	R	R	R	S	R	-	S	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S
22	HEC23	R	R	R	S	S	+	S	R	S	S	S	R	I	R	S	S	S	R
23	HEC24	R	R	R	S	R	-	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
24	HEC25	R	R	R	S	S	+	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
25	HEC26	R	R	R	S	R	+	I	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
26	HEC27	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	BM	S
27	HEC28	R	R	R	S	S	-	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R
28	HEC29	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	S	R
29	HEC30	R	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I
30	HEC31	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
31	HEC32	R	R	R	S	S	+	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
32	HEC33	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I
33	HEC34	R	R	R	S	S	+	R	R	I	S	R	R	S	S	S	S	S	R

Tablo 9'un devamı

34	HEC35	R	S	S	S	R	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I
35	HEC36	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	I
36	HEC37	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	I	R	S	S	S	R
37	HEC38	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
38	HKP40	I	I	S	S	R	+	R	R	R	S	R	R	I	R	S	S	S	R
39	HKO41	R	R	I	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
40	HEC42	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R
41	HEC43	R	R	R	S	S	-	S	S	S	I	S	R	S	R	S	S	S	R
42	HEC44	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R
43	HEC45	R	S	S	S	S	-	R	R	S	R	I	S	S	R	S	S	S	R
44	HKO46	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
45	HEC47	R	R	R	S	S	-	S	I	S	I	S	I	S	R	S	S	S	R
46	HEC48	R	S	S	S	S	+	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
47	HEC49	R	S	S	S	R	+	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
48	HKP50	I	I	BM	S	R	+	R	R	R	S	R	R	I	R	S	S	S	R
49	HKP51	I	I	S	S	S	+	I	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
50	HEC52	R	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I
51	HEC54	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	I	R	S	S	S	R
52	HEC55	R	R	R	S	R	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
53	HEC56	R	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R
54	HEC57	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
55	HEC58	R	R	BM	S	S	+	S	R	R	I	R	R	S	S	S	S	S	R
56	HEC59	R	R	R	S	S	+	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
57	HEC60	R	R	R	S	R	+	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R
58	HEC61	R	R	R	S	R	+	R	R	R	I	R	R	S	R	S	S	S	R
59	HKP62	R	R	R	S	S	+	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S	I	R
60	HKP63	I	I	S	S	R	+	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
61	HEC64	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
62	HEC65	R	I	S	S	R	+	S	R	R	S	I	R	R	R	S	S	S	R
63	HEC66	R	R	R	S	S	+	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R
64	HEC67	R	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
65	HEC68	R	R	R	I	S	+	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
66	HEC69	R	S	S	S	R	+	I	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
67	HEC70	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
68	HEC71	R	S	S	S	S	-	R	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	R

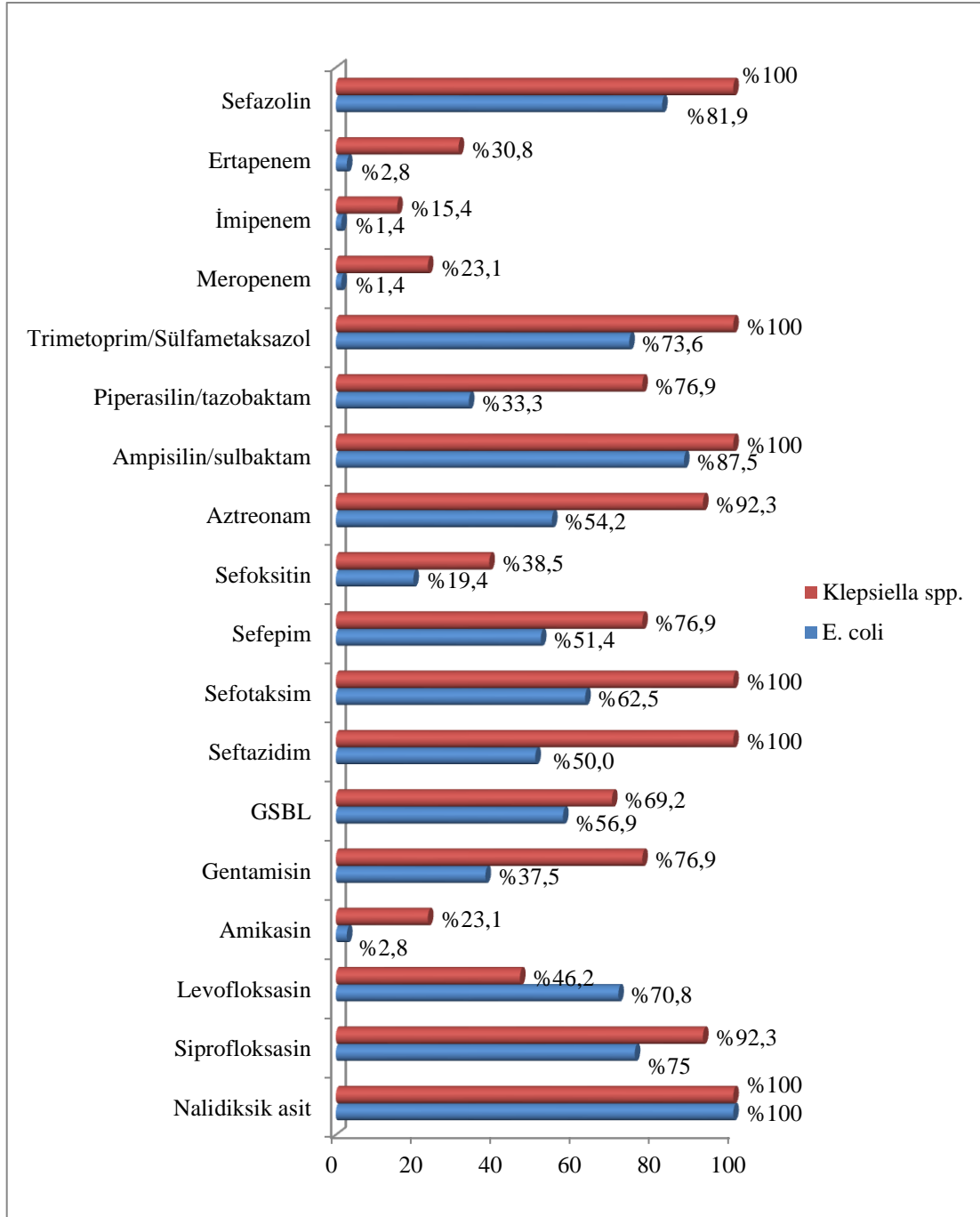
Tablo 9'un devamı

69	HEC73	R	R	S	S	S	+	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R
70	HEC74	R	S	S	S	R	+	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R
71	HEC75	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
72	HEC76	R	R	R	S	S	-	S	I	S	S	S	R	R	R	S	S	S	I
73	HEC77	R	S	S	S	R	+	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	R
74	HEC78	R	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
75	HKP79	I	S	S	S	S	-	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R
76	HKP80	R	R	R	R	R	+	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R
77	HKP81	R	R	R	S	R	-	R	R	BM	R	R	R	R	R	R	S	R	R
78	HEC82	R	R	R	S	S	+	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
79	HKP83	R	R	I	S	R	+	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
80	HEC84	R	R	R	S	R	+	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R
81	HEC85	R	R	R	S	S	-	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R
82	HEC86	R	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
83	HEC87	R	S	S	S	R	+	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R
84	HEC88	R	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	HEC89	R	R	R	S	S	+	R	R	I	S	R	R	S	R	S	S	S	R

NA: Nalidiksik asit, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, AK: Amikasin, GM: Gentamisin, GSBL: Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz, CAZ: Seftazidim, CTX: Sefotaksim, FEP: Sefepim, FOX: Sefoksitin, ATM: Aztreonam, SAM: Ampisilin/sulbaktam, TZP: Piperasilin/tazobaktam, SXT: Trimetoprim/Sülfametaksazol, MEM: Meropenem, IPM: İmipenem, ERT: Ertapenem, CZ: Sefazolin, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli, BM: Bakılmadı

4.2.1. *E. coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarının Antibiyotik Direnç Oranları

Çalışmaya dahil edilen toplam 85 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatının çeşitli antibiyotiklere direnç oranlarının dağılımı Şekil 8’de gösterilmektedir.



Şekil 8. Çalışma izolatlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları (antimikrobiyal duyarlılık test sonucu orta duyarlı bulunan izolatlar dirençli kabul edildi) GSBL: Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz

4.3. PCR Yöntemiyle PMQR Genlerinin Araştırılması

Çalışmada 85 kan örneğinden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarının kaynatma metodu ile elde edilen DNA'ları kullanıldı.

PMQR gen bölgelerini amplifiye etmek için, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* ve *aac(6)-Ib* ve *oqxAB* eflüks pompa genleri (*oqxA* ve *oqxB*) için birer primer çifti kullanıldı.

4.3.1. *qnrA* Geninin Araştırılması

qnrA genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 72 *E. coli* izolatının 1'inde, 13 *Klebsiella* spp. izolatının 2'sinde 516bp büyüklüğünde amplifikasyon bandı belirlendi. Örnekler için jel görüntüsü Resim 1'de sunulmaktadır.

qnrA geni saptanan HKO41, HKO46 kodlu izolatlar pediatri - hematoloji servisinde, HEC24 kodlu izolat ise dahiliye - hematoloji servisinde yatan hastalardan izole edildi.

4.3.2. *qnrB* Geninin Araştırılması

qnrB genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 72 *E. coli* izolatının 3'ünde, 13 *Klebsiella* spp. izolatının 8'inde 469bp büyüklüğünde amplifikasyon bandı belirlendi. Örnekler için jel görüntüsü Resim 1'de sunulmaktadır.

qnrB geni saptanan HKP7, HKP13, HKP40, HKP51, HKP62 kodlu izolatlar nöroloji-nöroşirurji yoğun bakım ve nöroloji servislerinde yatan hastalardan izole edildi. HKP63, HKP79, HEC84 kodlu izolatlar acil polikliniklerinde takip edilen hastalardan, HEC22, HKP50, HEC59 kodlu izolatlar ise çeşitli servislerde yatan erişkin yaş hastalardan izole edildi.

4.3.3. *qnrC* Geninin Araştırılması

qnrC genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu hiçbir izolatta 307 bp büyüklüğünde *qnrC* genine ait amplifikasyon bandı saptanmadı.

4.3.4. *qnrD* Geninin Araştırılması

qnrD genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu izolatlatda 582 bp büyüklüğünde *qnrD* genine ait amplifikasyon bandı saptanmadı.

4.3.5. *qnrS* Geninin Araştırılması

qnrS genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 72 *E. coli* izolatının 1'inde, 13 *Klebsiella* spp. izolatının 1'inde 428 bp büyüklüğünde amplifikasyon bandı belirlendi. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 1'de sunulmaktadır.

qnrS geni saptanan HEC11 kodlu izolat dahiliye-hematoloji servisinde, HKP80 kodlu izolat anestezi yoğun bakım servisinde yatan hastalardan izole edildi.

4.3.6. *qepA* Geninin Araştırılması

qepA genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 72 *E. coli* izolatının 1'inde 199 bp büyüklüğünde amplifikasyon bandı belirlenmişken, 13 *Klebsiella* spp. izolatında pozitiflik saptanmadı. Örneğe ait jel görüntüsü Resim 2'de sunulmaktadır.

qepA geni saptanan HEC15 kodlu izolat acil polikliniğinde takip bir hastadan izole edildi.

4.3.7. *aac(6')-Ib* Geninin Araştırılması

aac(6')-Ib genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 72 *E. coli* izolatının 30'u, 13 *Klebsiella* spp. izolatının 12'sinde 482 bp büyüklüğünde amplifikasyon bandı belirlendi. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 2'de sunulmaktadır.

aac(6')-Ib geni saptanan 42 izolattan 17'si (%40,5) çeşitli erişkin dahili bölüm servislerinde, 8'i (%19,0) çeşitli erişkin yoğun bakım ünitlerinde, 6'sı (%14,3) cerrahi birim servislerinde, 5'i (%11,9) acil polikliniklerinde takip edilen, 3'ü (%7,1) çeşitli pediatri servislerinde, 3'ü yenidoğan yoğun bakım servisinde yatan hastalardan izole edildi.

4.3.8. *oqxAB* Eflüks Pompa Genlerinin Araştırılması

oqxA ve *oqxB* geninin birlikte pozitif olduğu örnekler *oqxAB* eflüks pompası açısından pozitif kabul edildi (112).

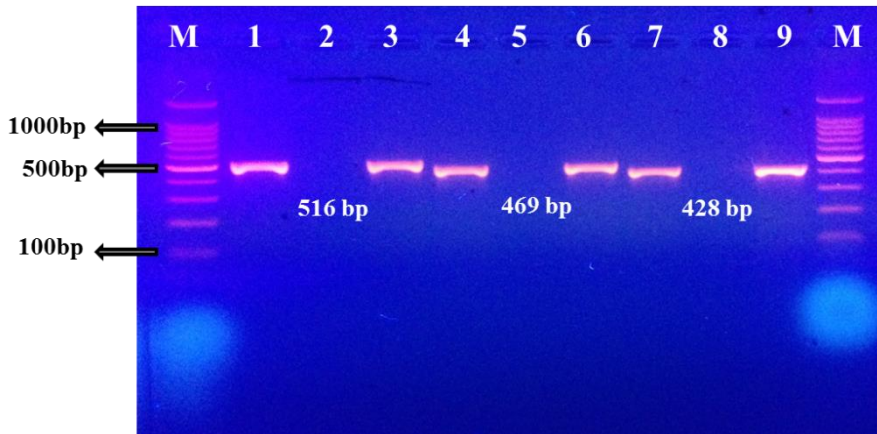
oqxAB eflüks pompası geni saptanan HKP7, HKP13, HKP40, HKP50, HKP51, HKP80, HKP81 kodlu izolatlar çeşitli erişkin yoğun bakım ünitlerinde yatan hastalardan izole edildi. HKP63, HKP79 kodlu izolatlar acil polikliniklerinde takip edilen, HEC17, HKP62 kodlu izolatlar çeşitli erişkin dahili birim servislerinde, HKP83 kodlu izolat üroloji servisinde yatan hastalardan izole edildi.

4.3.8.1. *oqxA* Geninin Araştırılması

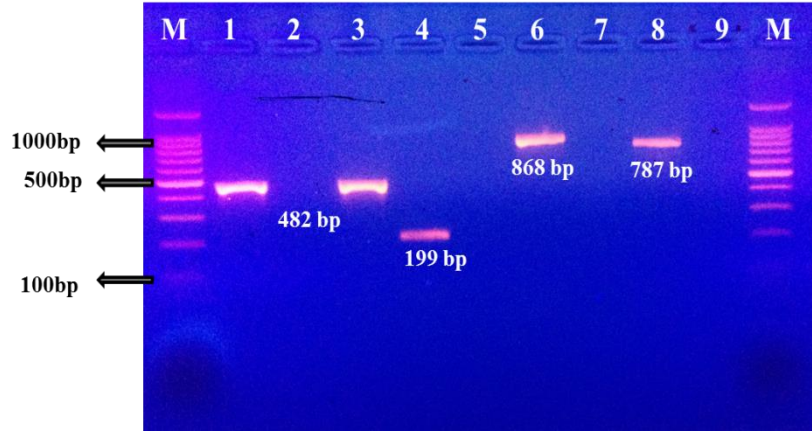
oqxA genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 72 *E. coli* izolatının 1'i, 13 *Klebsiella* spp. izolatının 11'inde 868 bp büyüklüğünde amplifikasyon bandı belirlendi. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 2'de sunulmaktadır.

4.3.8.2. *oqxB* Geninin Araştırılması

oqxB genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 72 *E. coli* izolatının 1'i, 13 *Klebsiella* spp. izolatının 11'inde 787 bp büyüklüğünde amplifikasyon bandı belirlendi. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 2'de sunulmaktadır.



Resim 1. *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü M: 100 bp DNA marker, 1: *qnrA* pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol 3: HKO41, 4: *qnrB* pozitif kontrol, 5: Negatif kontrol, 6: HKP51, 7: *qnrS* pozitif kontrol, 8: Negatif kontrol, 9: HEC11



Resim 2. *aac(6)-Ib*, *qepA*, *oqxA* ve *oqxB* genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü M: 100 bp DNA marker, 1: *aac(6)-Ib* pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol 3: HKP80, 4: *qepA* geni taşıyan HEC15 nolu suş, 5: Negatif kontrol, 6: *oqxA* geni taşıyan HKP13 nolu suş, 7: Negatif kontrol, 8: *oqxB* geni taşıyan HKP13 nolu suş, 9: Negatif kontrol

4.4. Çalışma Grubuna Ait PCR Sonuçları

Çalışmamıza ait toplam 85 kinolon dirençli izolatta tespit edilen plazmid aracılı kinolon direnç genlerinin dağılımı Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10'un devamı

44	HKO46	(+)	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-
45	HEC47	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
46	HEC48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	HEC49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	HKP50	-	(+)	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)
49	HKP51	-	(+)	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)
50	HEC52	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	HEC54	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
52	HEC55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	HEC56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	HEC57	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
55	HEC58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	HEC59	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-
57	HEC60	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
58	HEC61	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
59	HKP62	-	(+)	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)
60	HKP63	-	(+)	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)
61	HEC64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	HEC65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	HEC66	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
64	HEC67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	HEC68	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
66	HEC69	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	HEC70	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
68	HEC71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	HEC73	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
70	HEC74	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	HEC75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	HEC76	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	HEC77	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	HEC78	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	HKP79	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	(+)
76	HKP80	-	-	(+)	-	-	(+)	-	(+)	(+)
77	HKP81	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)
78	HEC82	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
79	HKP83	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)
80	HEC84	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-
81	HEC85	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	HEC86	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	HEC87	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	HEC88	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	HEC89	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): PCR sonucu pozitif; -: PCR sonucu negatif

4.5. PMQR Genlerinin Dağılımı

Çalışma izolatlarımızda *qnrC* ve *qnrD* genleri bulunamadı. İzolatlara göre PMQR genlerinin dağılımı Tablo 11’de gösterilmektedir.

Tablo 11. İzolatlara göre PMQR genlerinin dağılımı

İzolat	<i>qnrA</i> n/%	<i>qnrB</i> n/%	<i>qnrC</i> n/%	<i>qnrD</i> n/%	<i>qnrS</i> n/%	<i>qepA</i> n/%	<i>aac(6')-Ib</i> n/%	<i>oqxAB</i> n/%
<i>E. coli</i>	1	3	0	0	1	1	30	1*
n: 72	%1,4	%4,2	%0	%0	%1,4	%1,4	%41,7	%1,4
<i>Klebsiella spp</i>	2	8	0	0	1	0	12	11**
n: 13	%15,4	%61,5	%0	%0	%7,7	%0	%92,3	%84,6
Toplam	3	11	0	0	2	1	42	12
n: 85	%3,5	%12,9	%0	%0	%2,4	%1,2	%49,4	%14,1

*Plazmid aracılı olma olasılığı yüksek

**Kromozomal olma olasılığı yüksek

4.6. Direnç Genlerin Birlikte Bulunma Durumları

Çalışmamızda belirlenen direnç genlerinin izolatlarda birlikte bulunma durumlarına ait veriler Tablo 12’de sunulmaktadır.

Tablo 12. İzolatlardaki PMQR Genlerinin Birlikte Bulunma Durumları

	<i>E. coli</i> n:72 (n/%)	<i>Klebsiella spp.</i> n:13 (n/%)	TOPLAM n:85 (n/%)
<i>qnrA</i> + <i>aac(6')-Ib</i>	0	2(%15,4)	2(%2,4)
<i>qnrB</i> + <i>aac(6')-Ib</i>	3(%4,2)	0	3(%3,5)
<i>qnrB</i> + <i>oqxAB</i>	0	1(%7,7)	1(%1,2)
<i>aac(6')-Ib</i> + <i>oqxAB</i>	0	2(%15,4)	2(%2,4)
<i>qnrB</i> + <i>aac(6')-Ib</i> + <i>oqxAB</i>	0	7(%53,9)	7(%8,3)
<i>qnrS</i> + <i>aac(6')-Ib</i> + <i>oqxAB</i>	0	1(%7,7)	1(%1,2)

4.7. *qnr* ve *aac(6')-Ib* Genlerinin GSBL Varlığına Göre Dağılımı

GSBL varlığına göre *qnr* ve *aac(6')-Ib* genlerinin dağılımı Tablo 13’de verilmektedir.

Tablo 13. İzolatlardaki *qnr* ve *aac(6')-Ib* Genlerinin GSBL Varlığına Göre Dağılımı

	GSBL (+) n(%)	GSBL (-) n(%)
<i>qnr</i> (+) n:16	10(%62,5)	6(%37,5)
<i>aac(6')-Ib</i> (+) n:42	36(%85,7)	6(%14,3)

4.8. *qnr* ve *aac(6')-Ib* Genlerinin Birlikteliği

qnr (+) 16 izolatın 13'ünde (%81,3), *qnr* (-) 69 izolatın 29'unda (%42) *aac(6')-Ib* geni pozitif olarak bulundu.

5. TARTIŞMA

Sepsis, komplikasyonlara ve ölüme yol açabilen sistemik bir enfeksiyondur (2, 53). Sepsiste Gram pozitif etkenlerden stafilokok türleri ve Gram negatif etkenlerden *E. coli* ve *K. pneumoniae* en sık izole edilen bakterilerdir (5-6). Sık görülen bu etiyolojik ajanlarda, özellikle ampirik kullanımda, antibiyotiklere direncin artması tedaviyi her geçen gün biraz daha zorlaştırmaktadır (2). Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine karşı etkinliği yüksek olan ve tedavide sıklıkla kullanılan kinolonlar ve beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç artışı önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (130). Son yıllarda yapılan bildirimler kinolon direncinin dünyada ve ülkemizde oldukça yüksek düzeylere ulaştığını göstermektedir (26, 131-132).

Bu çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakteriyoloji Biriminde Ocak 2012 - Ağustos 2013 tarihleri arasında kan örneklerinden izole edilen, 187 farklı hastaya ait 193 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatu antibiyotik direnci açısından araştırılmıştır. Kan kültüründe *E. coli* ve *Klebsiella* spp. üremesi saptanan örneklerin çoğunun (%47,6) erişkin dahili bölüm servislerinde yatan hastalara ait olduğu görülmüştür. Çalışmaya aldığımız nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen grupta da %49,4 ile erişkin dahili bölüm servislerinin sırası değişmemektedir. İzolatların %67,1'i servislerden, %15,3'ü yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Wisplinghoff ve ark. (133) Amerika Birleşik Devletlerinde 1995-2002 yılları arasında 49 hastaneden, hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonu olan 24179 vaka incelemiş ve *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarının yoğun bakım dışı servislerde, yoğun bakım servislerinden daha fazla görüldüğünü bulgulamışlardır. Lautenbach ve ark. (134) 1998-1999 yılları arasında 123'ü florokinolon dirençli 70'i florokinolon duyarlı hastane kökenli *E. coli* ve *Klebsiella* spp. infeksiyonlarında florokinolon direnci için risk faktörlerini araştırdıkları çalışmalarında da *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarının yoğun bakım dışı servislerde (özellikle dahili bölüm servislerinde) daha fazla görüldüğünü saptamışlardır. *qnr* pozitif *K.*

pneumoniae bakteriyemisi tespit edilen hastaların klinik özellikleri ve risk faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmada da *Klebsiella pneumoniae* suşlarının servis hastalarında yoğun bakım servislerinden daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir (135). Ülkemizde yapılmış bir çalışmada Duman ve ark. (136) *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'nin en sık dahili bölüm servislerinden gönderilen kan kültürlerinden izole edildiğini bildirmişlerdir. Gerek yayınlanmış çalışmalarda gerekse bizim çalışmamızda görüldüğü gibi kan akım enfeksiyonlarından izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp, en sık yoğun bakım dışı servislerde, özellikle dahili bölüm servislerinden hematoloji-onkoloji birimlerinde takip edilen hastalardan izole edilmektedir. Bu veri, ilgili bakterilerin immünsüpre hastalarda daha sık enfeksiyon yaptığını göstermektedir. Özakin ve arkadaşları da benzer şekilde immünsüpresyonun fırsatçı patojenlerin (*Klebsiella* spp. gibi) enfeksiyonlara katkılarını artırdığını belirtmektedir (60). Bu veriler doğal veya terapötik amaçlı immünsüpresif hasta artışının (AIDS hastaları, kemik iliği transplantasyonu, solid organ transplantasyonundaki artış sonucu olarak) ileride *E.coli* ve *Klebsiella* spp. enfeksiyonlarında artış olarak karşımıza çıkacağını düşündürmektedir. Değişik çalışmalarda florokinolon direnci ile ilişkili olduğu bildirilen risk faktörleri arasında immünsüpresyonun varlığından bahsedilmiştir ki bu da ileride immünsüpresif hastalarda *E.coli* ve *Klebsiella* spp. enfeksiyonlarının tedavisinde bu ajanların yetersizliği ile karşılaşacağımızı göstermektedir (32).

Genişlemiş spektrumlarına bağlı olarak kinolonlar gerek oral yolla gerek intravenöz yolla birçok enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (12). GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonlarında oldukça sık reçete edildikleri gibi bakteriyemi ve hastane kaynaklı pnömonide de karbapenemlerin kullanılamayacağı durumlarda tercih edilebilmektedirler (12, 13, 15, 77). Bu yaygın kullanıma bağlı olarak kinolonlara direnç gelişimi de giderek artmaktadır (12)

2012 yılı Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (EARSS) verilerine bakıldığında *E. coli* izolatlarında florokinolon direncinin %22,3, *K. pneumoniae* izolatlarında %25,3 olarak belirlendiği görülmektedir. *E. coli* için rapor eden ülkelerde florokinolon dirençli izolatların yüzdeleri %9,7 (İzlanda)-%42,0 (Kıbrıs ve İtalya) arasında değişmekte iken; *K. pneumoniae* rapor eden ülkelerde dirençli izolatların yüzdeleri %2,1 (Finlandiya)-%69,7 (Yunanistan) arasında değişmektedir (26).

ARMed izlem çalışmasında Akdeniz ülkelerinde invaziv *E. coli* izolatlarının direnç prevalansı üç yıllık bir periyot boyunca incelenmiş ve genel florokinolon direnç oranı %

21,0 (%7.7–%32.6) olarak bulunmuştur. 2005 yılında, Cezayir’de *E. coli* florokinolon direnci sadece %2 iken Tunus’ta bu oran %15 olarak tespit edilmiştir. Yüzde 40’ı aşan direnç oranları Lübnan (%53), Mısır (%48) ve Türkiye (%44)’de gözlenmiştir. Türkiye’den 11 hastane bu çalışmaya dahil olmuş ve florokinolon direnci üç yılın ortalamasında %42 olarak bildirilmiştir. Türkiye’den ARMed çalışması boyunca florokinolon direncinde artış bildirilmiştir (131).

EARSS verilerine göre 2003-2008 yılları arasında Türkiye’de invaziv *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının florokinolonlara direnç oranları sırasıyla Tablo 14’de belirtilmiştir.

Tablo 14. Türkiye’de invaziv *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının florokinolonlara direnç oranları (26)

	2003		2004		2005		2006		2007		2008	
	* <i>Ec</i>	** <i>Kpn</i>	<i>Ec</i>	<i>Kpn</i>	<i>Ec</i>	<i>Kpn</i>	<i>Ec</i>	<i>Kpn</i>	<i>Ec</i>	<i>Kpn</i>	<i>Ec</i>	<i>Kpn</i>
Lab sayısı	12	-	11	-	10	3	14	14	16	16	16	16
İzolat sayısı	719	-	765	-	782	13	889	456	1076	639	1377	711
Florokinolon direnci (%)	%38	-	%43	-	%44	%46	%48	%23	%53	%23	%52	%26

* *Ec*, *E.coli*

***Kpn*, *K. Pneumoniae*

Ülkemizde 13 merkezin katıldığı HITIT-2 sürveyans çalışmasında 2007 yılında hastanede yatan hastalardan izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* şuşlarında siprofloksasin direnç oranları sırasıyla %58 ve %17,8 olarak bulunmuştur (132). Ülkemizde *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında florokinolon direncine ait geçtiğimiz beş yıl içinde yapılmış olan bölgesel bildirimlere bakıldığında ise oldukça farklı rakamlarla karşılaşılmaktadır (Tablo 15-16).

Tablo 15. 2009-2013 yılları arasında ülkemizde yapılmış çeşitli çalışmalarda *E.coli* izolatlarında belirlenen florokinolon direnç oranları

Çalışmanın Yapıldığı İl	İzolat Sayısı	Florokinolon Direnci (%)	Tarih	Kaynak
İstanbul	644 (2010 yılı)	72,3 (GSBL pozitif) 28,6 (GSBL negatif)	2013	Karagöz ve ark. (137)
	1396 (2011 yılı)	59,3 (GSBL pozitif) 14,1 (GSBL negatif)		
İzmir	297	88 (GSBL pozitif) 30 (GSBL negatif)	2012	Karaayak Uzun ve ark. (138)
Malatya	119	49,6	2011	Duman ve ark. (136)
Erzurum	88	67 (GSBL pozitif) 24 (GSBL negatif)	2010	Uyanık ve ark. (9)
İstanbul	706	59 (GSBL pozitif) 9 (GSBL negatif)	2009	Köksal ve ark. (29)

Tablo 16. 2009-2013 yılları arasında ülkemizde yapılmış çeşitli çalışmalarda *K. pneumoniae* izolatlarında belirlenen florokinolon direnç oranları

Çalışmanın Yapıldığı İl	İzolat Sayısı	Florokinolon Direnci (%)	Tarih	Kaynak
İstanbul	404	21	2013	Nazik ve ark. (179)
İzmir	103	92(GSBL pozitif) 38(GSBL negatif)	2012	Karaayak Uzun ve ark. (138)
Malatya	39	10,3	2011	Duman ve ark. (136)
Erzurum	34	7(GSBL pozitif) 0(GSBL negatif)	2010	Uyanık ve ark. (9)
İstanbul	382	33 (GSBL pozitif) 5 (GSBL negatif)	2009	Köksal ve ark. (29)

Çalışmamızdaki kan izolatlarının tümü değerlendirildiğinde *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında nalidiksik asit direnci sırasıyla %56,7 ve %19,7; siprofloksasin direnci %42,5 ve %18,2 olarak saptanmıştır. Kinolon direncimiz Avrupa devletlerindeki direnç oranlarından daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Ancak bulgularımızın EARSS'ın Türkiye verileri ve HİTİT verileri ile benzer olduğu görülmektedir. Bununla birlikte bölgesel veriler incelendiğinde bölgeler arasında farklılıklar olduğu göze çarpmaktadır. Çalışmaların sonuçları arasındaki bu farklılık, merkezler arasındaki antibiyotik kullanım politikalarının farklı olması sebebine dayandırılabilir. Ayrıca çalışmada yer alan örnek sayısının farklılığı ile de ilişkilendirilebilir.

GSBL üreten suşlardaki artmış kinolon direnci, önceleri üriner sistem enfeksiyonları olmak üzere kinolon grubu ilaçların artan kullanımına bağlanmıştır. Ayrıca GSBL üreten suşlarda porin kaybından dolayı kinolonların hücre içine girmesinin azalmasının da bunda etkili olabileceği tespit edilmiştir. Ancak 1998 yılında GSBL üretimini kodlayan genleri taşıyan ve türler arası aktarılabilen plazmidlerde kinolon direncinden sorumlu genlerin de taşındığının gösterilmesi gelecekte önemli sorunlarla karşılaşılacağına habercisi olmuştur (30-32, 91).

Yapılan bildirimlerdeki kinolon/florokinolon direnç oranları incelenen izolatların GSBL üreten üretilmemelerine bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir. GSBL üretimi ile florokinolon direnci arasında yakın ilişki olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Tablo 15 ve 16) (26-29). Çeşitli çalışmalarda plazmid kökenli kinolon direncinin de GSBL enzim üretimi ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir. Beta laktamaz tipi ile kinolon direnci arasında da ilişki olduğunu ortaya koyan çalışmalar vardır (11, 26-27, 91, 139).

Chen ve ark. (140) çok merkezli çalışmalarında GSBL üreten izolatlarda kinolon direncini %84,6, GSBL üretmeyenlerde ise %26,7 oranında bulmuşlardır. İtalya’da yapılan çalışmada GSBL üreten *E. coli*’lerde kinolon direncini %92, üretmeyenlerde ise %41,7 bulmuşlardır (141). Wu JJ ve ark. (27) 526 *Enterobacter cloacae* suşu incelemişler ve GSBL üreten grupta qnr prevalansını %39,6 olarak GSBL üretmeyen gruptan (%4,6) daha yüksek bulmuşlardır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda GSBL üreten izolatlarda %70-80’leri aşan florokinolon direnç oranları gözlenmektedir ve florokinolon direnci GSBL üretmeyen izolatlardan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (28, 138, 142, 137). Türkiye’de klinik örnekten elde edilen GSBL üreten izolatlarla yapılan moleküler çalışmalarda CTX-M-3 ve CTX-M-15 tipi ile *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS*, OXA-48 tipi ile *qnrA*, TEM ve SHV tipi ile *qnrA* ve *qnrS* genlerinin birlikteliği gösterilmiştir (91).

Çalışmamızda GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp izolatlarında kinolon direnci sırasıyla %78,8 ve %32,1; GSBL üretmeyenlerde ise sırasıyla %41,3 ve %10,5 oranında tespit edilmiştir. Çalışmamızda nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda GSBL üretimi (%58,8), duyarlı olanlara göre (%27,7) daha yüksek bulunmuştur. Gerek kinolon direncindeki yüksek oranlar gerekse GSBL pozitif izolatlardaki yüksek kinolon direnç oranları ülkemizde kinolon grubu antibiyotiklerin kullanım politikasının gözden geçirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Bu veri ayrıca, kinolon türevi antibiyotiklerin

antimikrobiyal duyarlılık testleri uygulanmadan hastalara verilmemesi gerektiği yaklaşımını desteklemektedir (143, 144, 145). Bölgemizde de kinolon grubu antibiyotiklerin *E.coli* ve *Klebsiella* spp. infeksiyonlarında özellikle GSBL varlığında ampirik tedavide güvenilir olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak ülkemizde de Avrupa ülkelerindekine benzer kontrol önlemlerinin alınması ile bu sorunun önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz salgılayan *Enterobacteriaceae* türleri tüm dünyada giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalar hem GSBL üreten hem de kinolona dirençli suşların hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda artan oranda tespit edildiğini göstermiştir (22-23). GSBL üreten bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kinolonlar dahil birçok antibiyotiğin etkisiz kalabilmesi hastanede yatış süresinin uzaması, artan morbidite ve mortalite oranları ve ciddi ekonomik kayıplar nedeniyle etkenin GSBL oluşturup oluşturmadığı da önemlidir (24-25).

Kuzey Amerika'da GSBL oranı *E. coli*'de %3,3-4,7 ve *Klebsiella* spp'de %4,2-44, Güney/Latin Amerika'da *E. coli*'de %6,7-25,4 ve *Klebsiella* spp'de %40-47,3 olarak bulunmuştur (23). On Avrupa ülkesindeki 31 merkezde yapılan kapsamlı MYSTIC programında 1610 *E. coli* izolatu ve 785 *K. pneumoniae* izolatu incelenmiş GSBL prevalansı Kuzey Avrupa ülkelerinde %1-5 kadar düşük, Doğu Avrupa ülkelerinde (örn. Rusya, Polonya, Türkiye) ise %39-47 kadar yüksek bulunmuştur (146). *Enterobacteriaceae* ve direnç eğilimlerini izleyen SMART programının verilerine göre GSBL üreten *E.coli* türlerinin oranı Asya'da önemli oranda artmıştır. Bu oran Çin'de %55, Hindistan'da %79 olarak tespit edilmiştir (147).

Ülkemizdeki MYSTIC çalışmasının 2007 verilerine göre *E. coli* suşlarının %15,3'ü ve *K. pneumoniae* suşlarının %40,5'i GSBL üretmektedir (148). Altı merkezin katıldığı HITIT sürveyans çalışmasına göre, kan örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında GSBL oranı % 31,7 iken *K. pneumoniae*'da bu oran % 33,3 olarak bulunmuştur (149). Onüç merkezin katıldığı HITIT-2 sürveyans çalışmasında 2007 yılında hastanede yatan hastalardan izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında GSBL oranları %42 ve %41,4 bulunmuştur (132). Ülkemizde kan kültüründen izole edilmiş *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında yapılan çeşitli çalışmalarda GSBL sıklığı *E. coli* için %14-%38,5, *K. pneumoniae* için %31,2-%54,3 olarak rapor edilmiştir (29, 150-155). 2012 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada hastanemizden izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında GSBL sıklığı sırasıyla %52,7 ve %57,1 olarak bildirilmiştir (128).

Çalışmamızda kan izolatlarında GSBL sıklığı *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'de sırasıyla %40,9 ve %42,4 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızın bulguları ülkemizdeki çok merkezli çalışmalarla uyumlu görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa ülkelerindeki GSBL oranlarının bizim verilerimize göre daha düşük olması, ülkemizde de benzer kontrol önlem politikalarının geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Lautenbach ve ark.'nın (156) GSBL üreten *E.coli* ve *K. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonlarda florokinolon direncinin epidemiyolojik incelenmesini yaptıkları çalışmada, florokinolon direnci olan grupta imipenem direnç saptanmamış, amikasin %40-60 aralığında, gentamisin %60-80 aralığında, trimetoprim/sülfametaksazole %80-90 aralığında direnç belirlenmiştir.

Killgore ve ark.'nın (157) toplum kökenli siprofloksasin dirençli *E.coli* ile gelişen idrar yolu enfeksiyonu için risk faktörlerini araştırdıkları çalışmada sefazoline %20-30 aralığında, trimetoprim/sülfametaksazole %90- 100 aralığında direnç belirlenmiştir.

Çalışmamızda nalidiksik asit direnci tespit edilen *E. coli* izolatlarında siprofloksasin direnci %75, levofloksasin %70,8, amikasin %2,8, gentamisin %37,5, GSBL varlığı %56,9, seftazidim %50, sefotaksim %62,5, sefepim %51,4, sefoksitin %19,4, aztreonam %54,2, ampisilin/sulbaktam %87,5, piperasilin/tazobaktam %33,3, trimetoprim/sulfametoksazol %73,6, meropenem ve imipenem %1,4, ertapenem %12,8, sefazolin, %81,9 olarak bulunmuştur.

Nalidiksik asit direnci tespit edilen *Klebsiella* spp izolatlarının ampisilin/sulbaktam, seftazidim, sefotaksim, sefazolin ve trimetoprim/sulfametoksazol direnci %100, siprofloksasin %92,3, levofloksasin %46,2, amikasin %23,1, gentamisin %76,9, GSBL varlığı %69,2, sefepim %76,9, sefoksitin %38,5, aztreonam %92,3, piperasilin/tazobaktam %76,9, %73,6, meropenem %23,1, imipenem %15,4, ertapenem %30,8, olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda tespit edilen direnç oranlarının hastanemiz ve bölgemiz hastaları için sorun oluşturacak boyutta olduğu görülmektedir Antibiyotik direnç oranları coğrafi bölgeler hatta sağlık kuruluşları arasında farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle uygun antimikrobik tedavi ve kontrol önlemleri için sağlık kuruluşları kendi oranlarını bilmek zorundadır (158). Bu şekilde morbidite ve mortalitenin önlenmesi adına tedbirlerin alınması mümkün olabilir.

Literatürde bahsedildiği gibi kinolon direncinin artışı dikkat çekmektedir. Kinolon grubu antibiyotiklere direnç genellikle temel hedef olan DNA giraz ve topoizomerez IV'de

görülen mutasyonlar veya efluks pompalarının aşırı üretimi ile oluşmaktadır. En sık mutasyonlar DNA girazda *gyrA* ve topoizomeraz IV'de *parC* gen bölgelerinde görülmektedir. Ancak son yıllarda plazmid kökenli kinolon direncinin *Enterobacteriaceae* üyelerinde önemli bir direnç mekanizması olduğu bildirilmektedir (17). Hastanelerde direnç aktarımının önlenmesi ve tedavinin optimum seviyede uygulanabilmesi açısından PMQR varlığının araştırılması önemlidir.

İlk kez 1998 yılında plazmid aracılı kinolon direncine neden olan *qnr* geni tanımlanmıştır. *qnr* geninin kodladığı Qnr proteinleri pentapeptid tekrar ailesinin bir üyesi olup, DNA girazı ve topoizomeraz IV'ü kinolonların inhibitör etkisinden korumaktadır (17). Tanımlanmış olan ilk protein 218 aminoasit içeren QnrA'dır. Dünya genelinde *Enterobacteriaceae* ailesinden birçok bakteride *qnrA* genini, diğer plazmid aracılı direnç genleri olan *qnrS*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrD* takip etmiştir (11). *qnr* genleri, birçok farklı tipte beta laktamazla birlikte bulunmalarının yanında, beta laktamaz olmayan antimikrobiyal direnç genleri ile de ilişkilendirilmiştir (11, 91).

Dünya genelinde bu konuyla ilgili yapılmış çalışmalara bakıldığında, 28 Kasım 2008'e kadar 70'den fazla hakemli dergi ve konferans özet raporu, PMQR için test edilmiş 20,960'dan fazla izolat bildirimini yapmıştır. Bu derlenmiş veritabanındaki *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* ve *aac(6')-Ib-cr* prevalansları sırasıyla %1,5, %4,6, %2,4, ve %10,8 olarak bildirilmiştir (21). Tayvan'dan 1999'dan 2005'e kadar toplanan 2035 *E. coli* ve 1147 *K. pneumoniae* kan akımı izolatının *qnr* gen prevalansı sırasıyla %0,6 ve %7,8 olarak rapor edilmiştir (159). Çin'de bir çalışmada GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında *qnrA* %3,6, *qnrB* %2,2 ve *qnrS* %2,5; toplamda *qnr* pozitifliği %8,0 olarak bulunmuştur. Ayrıca *K. pneumoniae* (% 16,2) izolatlarının *qnr* taşıma oranının *E. coli*'den (%5,3) daha fazla olduğu bildirilmiştir (160). İsrail'de 1994'ten 2005'e kadar toplanan 485 klinik *Enterobacter* spp. izolatının 33'ünde (%6,8) *qnr* bildirilmiştir. Bulgular *K. pneumoniae* için benzerlik göstermektedir (161). Fransa'da GSBL üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarında *qnr* gen prevalansı %3,8, nalidiksik asit dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında ise %3,2 olarak bulunmuştur (162) Kanada'da siprofloksasin ve/veya tobramisine dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında *qnr* gen prevalansı %0,8 gibi düşük bulunmuştur (163). Amerika'da *E. coli*'de %4, *K. pneumoniae*'da %20 *Enterobacter* spp.'de %31 gibi daha yüksek prevalanslar tespit edilmiştir (123). Mısır'da da *qnrA* %16, *qnrB* %23 ve *qnrS* %16; toplamda *qnr* pozitifliği %26,6 olarak bulunmuştur (164).

Dünya genelindeki literatürlere bakıldığında, *qnr* genleri yapılan ilk çalışmalarda *E. coli* izolatlarında daha fazla tespit edilse de son yapılan geniş çaplı araştırmalarda *Enterobacter* spp. ve *Klebsiella* spp. izolatlarında daha sık bulgulanmıştır (11, 21, 123, 159-160).

Dünya genelinde kinolon direncinin bakteriler arasında yayılımından sorumlu olan PMQR genlerinin prevalansını konu alan birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte, ülkemize ait veriler oldukça sınırlıdır. Ülkemizde ilk plazmid aracılı kinolon direnci geni, *qnr*, 2005 yılında Nazik ve ark. (165) tarafından bildirilmiştir. Çalışmada 49 nalidiksik asit dirençli ve GSBL pozitif suşta *qnrA* geni varlığı PCR ile araştırılmış, iki suşta (bir *Enterobacter cloacae* ve bir *Citrobacter freundii*) (%4) bulunduğu gösterilmiştir. Daha sonra İstanbul, Ankara, İzmir, Kuzey Doğu Anadolu gibi değişik merkezlerden yapılan çalışmalarda plazmidde kodlanan çeşitli direnç genleri bildirilmiştir (91).

Avşaroğlu ve ark. (166) yiyeceklerden izole edilen *Salmonella enterica* serovar Virchow suşları ile yaptıkları bir çalışmada nalidiksik aside dirençli, siprofloksasine azalmış duyarlılık gösteren dokuz suşun üçünde (%33) *qnrS1* pozitifliği saptamışlardır.

Öktem ve ark. (167) 2008 yılında yaptıkları çalışmalarında, kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* üyesi olan 356 izolattan nalidiksik asite dirençli/orta duyarlı bulunan 166 izolatın 6'sında (%3,6) *qnrA*, 3'ünde (%1,8) *qnrS*; toplamda %5,4'ünde *qnr* genlerini pozitif olarak saptamışlardır.

Özgümüş ve ark. (169) Türkiye'nin kuzeydoğu bölgesindeki çeşitli nehirlerden aldıkları su örneklerinden izole ettikleri 183 koliform bakteriden 1 *E.coli* ve 1 *K.pneumoniae* suşunda (%1) *qnrS* geninin bulunduğunu belirlemişlerdir.

Ülkemizde 2008 yılındaki HİTİT 1 sürveyans çalışmasında (168) %6,4; 2010 yılında yayınlanan HİTİT 2 sürveyans çalışmasında ise % 14,5 *qnr* prevalansı bildirilmiştir. HİTİT 2 sürveyans çalışmasında *qnr A(A1)*, *B(B1, B2, B5, B6/9)* ve *S (S1)*'in sırasıyla %1,9, %10,5 ve %1,9 sıklıkta olduğu tespit edilmiştir (170-171).

Çoban ve ark. (172) 2010 yılında solunum yolu örneklerinden izole edilen 110 *P.aeruginosa* suşunda *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS* ve *aac(6')-Ib-cr* gen bölgelerinin varlığını araştırmışlardır. Çalışmada hem *qnr* gen bölgesi hem de *aac(6')-Ib-cr* gen bölgesi tespit edilememiştir.

Nazik ve ark. (173) PMQR ve ilişkili beta laktamaz genlerini araştırdıkları çalışmada 61 GSBL üreten üriner *E. coli* izolatında 1 *qnrA1* (%1,6), 1 *qnrS1* (%1,6) geni tanımlanmıştır.

Limoncu ve ark. (174) 2004-2008 yıllarında toplanan GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* üyesi 192 izolattan nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin dirençli 133 (106 *E. coli* ve 27 *K. pneumoniae*) izolatta PMQR genlerini araştırmıştır. *qnrB* ve *qnrS* genlerinin oranları 106 *E. coli* suşunda sırasıyla %1,8 ve %0,9 olarak; *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genlerinin oranları 27 *K. pneumoniae* suşunda sırasıyla %7,4, %11,1 ve % 3,7 olarak tespit edilmiştir. Toplamda *qnrA*'nın %1,5, *qnrB*'nin %3,7, *qnrS*'in %1,5 sıklıkta olduğu belirlenmiştir.

Hastanemizin de katıldığı çok merkezli bir çalışmada Çoban ve ark. (128) 2009 yılında Trabzon, Çanakkale, Ankara ve Tokat'tan toplanan 647 *Enterobacteriaceae* klinik izolatta *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrS* genlerinin varlığını araştırmıştır. *qnrA*'nın %0,3, *qnrB*'nin %0,9 ve *qnrS*'in %0,4 sıklıkta olduğunu belirlemişlerdir. *qnrC* genine rastlanmamıştır. Hastanemizden gönderilen 387 izolattın 6'sında (%1,5) *qnr* gen varlığı tespit edilmiştir. Çalışmada *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* gen sıklığının düşük olduğunu vurgulanmıştır.

Çalışmamızda kinolon direnci saptanan 85 kan örneğinden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında PMQR genlerinden *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, genlerinin varlığı PCR yöntemi ile araştırılmıştır. *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında *qnrA* %3,5, *qnrB* %12,9 ve *qnrS* %2,4; toplamda *qnr* pozitifliği %18,8 olarak yüksek prevalansta bulunmuştur. Ülkemizdeki HİTİT 1 ve HİTİT 2 surveyans çalışmasında (168, 170-171) belirlenen *qnr* prevalansından da daha yüksek orandaki verilerimiz bize bölgemizde PMQR genlerinin kinolon direncine katkısının azımsanmayacak düzeyde olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda *qnrC*, *qnrD* genleri saptanmamıştır. Ulusal ve uluslararası literatür araştırıldığında bu genlerin daha az araştırıldığı ve saptandığı görülmüştür (11, 100, 124, 128, 175). Ayrıca *Klebsiella* spp (% 84,6) izolatlarının *qnr* taşıma oranının *E. coli*'den (% 6,9) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu verimiz dünya literatürü ile örtüşmektedir (160).

Hastanemizdeki *qnr* prevalansındaki bu yükseklik ülkemizdeki diğer tıp merkezlerine kıyasla florokinolonların aşırı kullanımına bağlı olabilir. Kinolonlar aynı zamanda hayvancılık ve su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır. Yakın zamanda *qnr* genlerinin kökeni için bir odak olarak ifade edilen, *Shewanella algae* ve *Aeromonas* spp. gibi akuatik rezervuar bakteriler üzerinde durulmaktadır (11, 91, 169). Trabzon kıyı şehridir ve yıl boyu nemli kalmaktadır. Balık çiftlikleri özellikle subtropik bir iklimi olan Trabzon'da siktir. Bu çiftliklerde kullanılan kinolonların akuatik çevre ve eşzamanlı olarak

toplumda *qnr* determinantlarının seçilimi ve aktarımı için gerekli koşulları meydana getirdiği tahmin edilmektedir. Ayrıca ilimiz bölgedeki en büyük şehirdir ve yakın şehirlerdeki hastalar genellikle üçüncü basamak hizmeti veren hastanemize sevk edilmektedir. Bu durum hastanemizdeki direnç yükünün ve paralelinde PMQR gen pozitiflik oranının artışına ilave bir etki yapıyor olabilir. Ayrıca, hastanemizde veya bölgemizde *qnr* geni içeren ve endemisine gösteren bakteri klonları bulunabilir. Bu klonların saptanması bölgesel endemisine gösteren dirençli suşların kontrol altına alınmasını hedefleyen önlemlerin alınması gibi kurumsal uygulamaları başlatabilir. Bunun için bu suşların klonal yakınlıklarının bilinmesi yararlı olacaktır. Buna ilaveten, çalışmalara dahil edilen suşların seçimindeki farklılıkların da (GSBL pozitifliği, nalidiksik asit direnci gibi) çalışma sonuçlarını etkilemiş olabileceği düşünülmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalar, PMQR'nin diğer direnç genleriyle, özellikle de GSBL'lerle arasında bir bağlantıya işaret eden genetik verilerin desteklenmesine yardımcı olmuştur. Çeşitli araştırmacılar GSBL pozitif suşlar arasında daha yüksek *qnr* prevalansları ortaya koymuştur (11, 21). Çalışmamızda da benzer şekilde *qnr* pozitif suşların çoğunun (%62,5) GSBL ürettiği gösterilmiştir. Bu sonuç GSBL genlerinin *qnr* genleriyle birlikte aktarıldığına dair yargıyı desteklemektedir. Ancak, çalışmamızın sonuçlarından farklı olarak *qnr* saptanan suşların daha sık olarak GSBL negatif olduklarını belirten çalışma da mevcuttur (167).

Dünya genelinde *qnrB*'nin (21), Avrupa'daki çalışmalarda genellikle *qnrS* ve *qnrB* genlerinin baskın olduğu görülmektedir (19). Türkiye'de yapılan çalışmalara bakıldığında *qnrA*'nın ilk yapılan çalışmalarda daha yüksek oranda olduğu, *qnrB* geninin ise son yapılan çalışmalarda daha baskın olduğu gözlenmektedir (128, 168, 174). Dünya ve Türkiye verilerine benzer olarak çalışmamızda *qnrB* (%68,7) en sık rastlanan *qnr* geni olmuştur.

aac(6')-Ib-cr geni piperazinil grubu taşıyan norfloksasin ve siprofloksasin gibi bazı kinolonların enzimatik inaktivasyonuna ve böylelikle duyarlılığın azalmasına neden olan aminoglikozit asetiltransferazı kodlar. Bu enzim piperazinil nitrojeni olmayan kinolonlara (levofloksasin gibi) etkisizdir (11, 108). *qnr* ve *aac(6')-Ib-cr* aynı hücrede birlikte bulduklarında *qnr*'nin tek başına sağladığından dört kat daha fazla MİK artışı sağlamakta ve duyarlılık bakımından klinik breakpoint değerlerine (1 µg/ml) yaklaşmaktadır. Bunun yanı sıra *aac(6')-Ib-cr*'nin yalnız bulunması, siprofloksasine maruz kalma durumunda oluşacak kromozomal mutasyon sıklığını arttırmaktadır ve mutant seçimini kolaylaştırmaktadır (108, 163).

Bir meta analizde *aac(6')-Ib-cr* prevalansı %10,8 olarak bildirilmiştir (21). Çin'de bir çalışmada 362 GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatu incelenmiş, 62'sinde (%17,1) *aac(6')-Ib* geni pozitif bulunmuş ve bunların 36'sının (toplamın %9,9'u) –cr varyantı olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *qnr* pozitiflerde *aac(6')-Ib-cr* oranını %55,2, *qnr* negatiflerde ise %6 olarak bulmuşlar ve bu durumun *aac(6')-Ib-cr* ve *qnr* genlerinin aynı plazmid üzerinde birlikte aktarılabilirliğiyle açıklanabileceğini söylemişlerdir (160). Kim ve ark. (124) Kore'de *aac(6')-Ib* oranını %11, *aac(6')-Ib-cr* oranını ise %2,2; Briaes ve ark. (19) İspanya'da GSBL pozitif suşlarda *aac(6')-Ib-cr* pozitiflik oranını %16,2 olarak bulmuşlardır. Mısır'da da GSBL pozitif suşlarda *aac(6')-Ib-cr* pozitifliği %23,3 olarak yüksek bulunmuştur (164). Kanada'da siprofloksasin dirençli *E. coli* izolatlarında *aac(6')-Ib-cr* gen prevalansı 2004 yılında %4, 2007 yılında %15 bulunmuştur (163).

Türkiye'de *aac(6')-Ib-cr* geninin araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Ülkemizdeki HİTİT 1 sürveyans çalışmasında *aac(6')-Ib-cr* geninin varlığının %32,4; HİTİT 2 çalışmasında ise %69,5 oranında yüksek olduğu bulunmuştur (170, 171). Poirel ve ark. (176) Türkiye'de farklı hastanelerde kandan izole edilen GSBL oluşturan *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* genlerinin sıklığını araştırmışlar ve *aac(6')-Ib-cr* geninin GSBL oluşturan 50 izolatın 39'unda (%78) bulunduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma kan kültürü gibi önemli klinik izolatları içeren GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında PMQR belirleyicilerinden *aac(6')-Ib-cr*'nin Türkiye'de yüksek yaygınlığını göstermektedir.

Nazik ve ark. (177) toplam 1044 Gram negatif suşta *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* ve *qnr*-pozitif suşlar arasında *aac(6')-Ib-cr* varlığını araştırmıştır. Yirmi (%1,9) suş *qnr*-pozitif bulunurken, *qnr* pozitif suşlar arasından üç (%15) suşta *aac(6')-Ib-cr* geninin varlığı saptanmıştır. Yine Nazik ve ark. (173) 2011 yılında 61 GSBL pozitif üriner *E. coli* izolatını incelemişler ve *aac(6')-Ib-cr* gen prevalansını %45,9 olarak bildirmişlerdir. Nazik ve ark. (178) başka bir çalışmada karbapenemlere azalmış duyarlılık veya direnç gösteren ve hepsi OXA-48 beta laktamazı üreten 22 *Klebsiella pneumoniae* izolatının 3'ünde (%13,6) *aac(6')-Ib-cr* genini pozitif bulmuştur.

Çoban ve ark. (172) 2010 yılında 110 *P.aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmalarında hem *qnr* hem de *aac(6')-Ib-cr* gen bölgesi tespit edememişlerdir.

Aktepe ve ark. (180) 112 kinolona dirençli *E.coli* suşunun hiçbirinde *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* ve *qepA* tipi gen saptamazken, *aac(6')-Ib-cr* gen varlığını %59,8 (67/112)

oranında bulmuşlar ve bu izolatların da %86,6 (58/67)'sının GSBL üreten suşlar olduğunu göstermişlerdir.

Limoncu ve ark. (174) GSBL pozitif nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin dirençli 106 *E. coli* ve 27 *K. pneumoniae* izolatta *aac(6')-Ib-cr* gen oranlarını sırasıyla %40,5 ve %59,3 olarak tespit etmişlerdir. Toplamda *aac(6')-Ib-cr* gen oranının %44,4 olduğu belirlenmiştir.

Robicsek ve ark. (108) saptadıkları *aac(6')-Ib*'lerin %84'ünü, Jiang ve ark. (160) %58'ini, Kim ve ark. (124) %19,6'sını, Aktepe ve ark. (180) ise tamamını *aac(6')-Ib-cr* varyantı olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda öncelikle *aac(6')-Ib* genine bakılmıştır. *E. coli* izolatlarının 30'unda (%41,7), *Klebsiella* spp. izolatlarının 12'sinde (%92,3) *aac(6')-Ib* geni belirlenmiştir. Toplamda *aac(6')-Ib* gen pozitifliği %49,4 olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamıza dahil edilen suşların kinolon dirençli olması *aac(6')-Ib* pozitifliklerinin daha çok *-cr* varyantı olabileceğini düşündürse de öngörünün sekanslama veya restriksiyon analiz yöntemlerinden biriyle araştırılması gerekmektedir. Çalışmamız literatürle uyumlu olarak *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında *aac(6')-Ib*'nin en baskın PMQR belirleyicisi olduğunu göstermektedir.

Genel olarak *aac(6')-Ib* prevalansının *E. coli* izolatlarında daha yaygın görüldüğü rapor edilse de (21, 115), çalışmamızda Limoncu ve ark.'nın (174) çalışmalarındaki benzer şekilde *Klebsiella* spp izolatlarında *aac(6')-Ib* prevalansı daha yüksek bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda *aac(6')-Ib-cr* varyantının *qnr* pozitif izolatlarda *qnr* negatiflere göre daha yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir (160). Çalışmamızda da *qnr* pozitif 16 izolatın 13'ünde (%81,3), *qnr* negatif 69 izolatın 29'unda (%42) *aac(6')-Ib* geni pozitif olarak bulunmuştur. *qnr* ve *aac(6')-Ib-cr* genleri aynı hücrede birlikte bulduklarında daha fazla MİK artışı sağlayarak yüksek düzey kinolon direncine neden olmaktadır. Genlerin aktarılabiliyor olması gelecekte kinolon direncinin daha da artacağı ve yayılacağı endişesini doğurmaktadır.

Epidemiyolojik çalışmaların sebep olduğu bir başka endişe de *aac(6')Ib-cr* ile son yıllarda dünya genelinde baş gösteren bir GSBL olan CTX-M-15'in yakın ilişki içerisinde olmasıdır (21, 170). Çalışmamızda *aac(6')-Ib* pozitif suşların %85,7'nin (36/42) GSBL ürettikleri, %14,3'nün (6/42) GSBL üretmedikleri bulunmuştur. GSBL üretimini kodlayan genleri taşıyan ve türler arası aktarılabilen plazmidlerde kinolon direncinden sorumlu genlerin de taşındığının gösterilmesi, gelecekte bu özellikteki bakterilerin artmasından kaynaklanan tedavi sorunları ile karşılaşılabileceğinin habercisi olabilir.

Yeni keşfedilen PMQR pompası QepA hakkında daha az bilgi mevcuttur. *qepA* geni ilk olarak Japonya'da *E.coli* suşunda gösterilmiştir (109). Japonya'da gerçekleştirilen bir sürveyans çalışmasında 751 *E. coli* izolatında *qepA* gen prevalansı %0,3 olarak bulunmuştur (125). İkinci büyük sürveyans çalışması Fransa'da gerçekleştirilmiştir. 121 GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* suşu arasında bir tek *E. coli* izolatı (%0,8) *qepA2* olarak adlandırılan bir varyant yönünden pozitif bulunmuştur (110). Mısır'da da GSBL pozitif suşlarda *qepA* pozitifliği %6,6 oranında yüksek bulunmuştur (164). Güney Kore'den %0,2 (124), Londra'dan %3,6 (181) *qepA* pozitifliği bildirilmiştir. 1996'dan 2000'e kadar Amerika Birleşik Devletleri'den toplanan non-Typhi *Salmonella enterica* izolatları ile yapılan büyük bir sürveyans çalışmasında *qepA* bulunmamıştır (182).

Ülkemizdeki HİTİT 1 sürveyans çalışmasında *qepA* geni bulunmamıştır (171). Mevcut verileri güncellemek için Gülay ve ark. (170) HİTİT 2 çalışma grubuyla birlikte 2010 yılında GSBL pozitif nalidiksik asit dirençli invaziv *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında PMQR genlerini araştırmışlar ve aynı zamanda *qnrB2* ve *aac(6')*-*Ib-cr* genlerini de taşıyan 2 (% 2,3) *E. coli* izolatında *qepA*'yı ilk kez bildirmişlerdir. Nazik ve ark. (173) 61 GSBL pozitif üriner *E. coli* izolatını incelemişler ve *qepA* gen prevalansını %3,3 olarak bildirmişlerdir. Limoncu ve ark. (174) Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin dirençli 106 *E. coli* izolatında *qepA* gen oranını %0,9 olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda kinolon dirençli 85 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatından sadece 1 *E. coli* izolatında *qepA* geni (%1,2) bulunmuştur. Bugüne kadar yapılmış çalışmalara bakıldığında *qepA* prevalansının klinik izolatlarda %0,2-6,6 gibi bir aralıkta değiştiği görülmektedir. Daha doğru prevalans oranları için geniş çaplı sürveyans çalışmalarına ihtiyaç vardır. Bu çalışmada bölgemizde ilk kez *qepA* varlığı belirlenmiştir. Diğer bakteri cinslerinde de araştırılması yaygınlığının ortaya konması açısından doğru bir yaklaşım olacaktır.

Multidrug efflux pompası olan OqxAB'nin ilk kez 2009 yılında Güney Kore'de klinik *E. coli* izolatında plazmid aracılı kodlandığı gösterilmiştir. Kim ve ark.'nın (113) yaptığı bu çalışmada 1998-2006 yıllarında kandan izole edilen 461 *Enterobacteriaceae* üyesinde *oqxAB* genleri araştırılmış; bir *E. coli* izolatında plazmidik *oqxAB* geni %0,4 prevalansta saptanmıştır. Kromozomal *oqxAB* geni *E. cloacae* için %4,6 ve *K. pneumoniae* için %74,1 prevalansta rapor edilmiştir. Görüldüğü üzere *oqxAB* genleri, *K. pneumoniae*'nin kromozomunda da mevcuttur fakat genin doğal işlevi henüz bilinmemektedir (113). Çin'de PMQR genlerinden *oqxAB* geni insan *E. coli* izolatlarında

%5,2, tavuklarda %19,8, domuzlarda %51,0, diğerk hayvanlarda %4,5 ve çevresel izolatlarda %20,5 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, *oqxAB* en sık izole edilen PMQR geni olarak rapor edilmiştir (183). Park ve ark. (184) Güney Kore’de GSBL üreten *K. pneumoniae* klinik izolatlarında aktarılabılır *oqxAB* genini %24,4 oranında bulmuşlardır. *OqxAB* efluks pompa prevalansı İran’da GSBL üreten *K. pneumoniae*’da %60,2 oranında yüksek bulunmuştur ve *oqxAB* geninin yayılması için *K. pneumoniae*’nın potansiyel bir rezervuar olabileceği vurgulanmıştır (185). İspanya’da GSBL pozitif *K. pneumoniae* izolatlarında hibridizasyon deneyleri *oqxA*’nın %16 ve *oqxB*’nin %13 oranında kromozom üzerinde ve büyük plazmidler üzerinde aynı anda mevcut olduğunu göstermiştir. Kromozomal ve/veya plazmidik *oqxA* ve *oqxB* prevalansı ise toplamda sırasıyla %76 ve %75 olarak bulunmuştur (186).

Çalışmalara göre daha çok domuz ve tavuklardan izole edilen bakterilerde saptanan ve yakın zamana kadar bir PMQR belirleyicisi olarak tanınmayan *oqxAB* genine ait insan izolatlarının prevalans ve epidemiyolojik verileri diğerk PMQR genleri ile kıyaslandığında oldukça kısıtlıdır (183).

Çalışmamızda nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin dirençli 72 *E. coli* izolatının birinde (%1,4), 13 *Klebsiella* spp. izolatlarının 11’inde (%84,6); toplamda 85 izolatın 12’sinde (%14,1) *oqxAB* geni pozitif olarak bulunmuştur. Ülkemizde *oqxAB* gen varlığı ilk kez bizim çalışmamızda gösterilmiştir. Hem dünyada hem de ülkemizde daha doğru prevalans verileri için geniş çaplı sörveyans çalışmalarına ihtiyaç vardır. *E. coli* izolatının muhtemelen plazmid aracılıklı, *Klebsiella* spp. izolatlarının ise muhtemelen kromozomal kökenli *oqxAB* geni taşıdığı düşünölmektedir (111-113). Bunun konjugasyon ve hibridizasyon deneyleri ile doğrulanması gerçek PMQR prevalansının ve klinik dirençdeki öneminin belirlenmesi açısından yararlı olacaktır.

PMQR’ler kinolon direncinin ortaya çıkması sürecinde öncü veya yardımcı rollere sahiptirler, ancak varlıkları ile klinik kinolon direnci arasındaki bağlantı henüz tam olarak kurulmuş değildir. Bununla birlikte, PMQR’nin insanlar ve hayvanlarda, kinolonların kullanıldığı organizmalar arasında, klinik öneme sahip ileri derecede gedikler oluşturduğu açık ve nettir. Direncin global gelişimine nasıl katkı sağlamış olursa olsunlar, şu andaki prevalansları bir problem teşkil etmektedir. 1998’de *qnr*’in keşfedilmesiyle beraber dirence karşı mücadelede önemli bir adım atılmıştır, ancak bakterilerin bu mücadeleye bizden önde başladığı açıktır.

Günümüzde, PMQR genlerini taşıyan plazmidlerin bakteriler arasında yayılmasıyla direnç oranlarının artması ve yakın zamanda kinolonların klinikte kullanım alanlarının daha da sınırlanmasından korkulmaktadır. Ayrıca invitro olarak kinolonlara duyarlı suşların da bu genleri taşıyabilmesi ve rutinde kullanılan tekniklerle kolayca saptanamaması, infeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasında güçlükler neden olabilecektir. Bu konuda dünya genelinde birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte, ülkemize ait PMQR prevalansı verileri sınırlıdır. Plazmid aracılı kinolon direnç genlerinin prevalansının takibi için çok merkezli çalışmaların yapılması, kinolon grubu antibiyotiklerin tedavi protokollerindeki yerinin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Sonuç olarak *qnrD* ve *oqxAB*'nin de tarandığı ilk ulusal verileri sunan bu çalışmada, PMQR genlerinin kinolon dirençli *E.coli* ve *Klebsiella* izolatlarında dünya geneli ve ülkemiz oranlarından genel olarak daha yüksek oranda taşındığı gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, kodlanma şekli henüz doğrulanmamış olmasına karşın *E.coli*'de muhtemelen plazmidle kodlanan *oqxAB*'nin varlığı ilk kez gösterilmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na Ocak 2012-Ağustos 2013 tarihleri arasında gönderilen kan örneklerinden izole edilmiş 187 hastaya ait 193 *E. coli* ve *Klebsiella* spp izolatından fenotipik testler sonucu nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen 85 izolatta (%44,04) PMQR gen varlığının moleküler metodlarla belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

1. Kan örneklerinden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında nalidiksik asit direnci sırasıyla %56,7 ve %19,7; siprofloksasin direnci %42,5 ve %18,2 olarak saptandı.
2. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp suşları %47,6 ile en sık erişkin dahili bölüm servislerinde saptandı. Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen grupta da %49,4 ile erişkin dahili bölüm servisleri yine ilk sırada saptandı. İkinci sıklıkta acil polikliniklerinde (% 17,6), üçüncü sıklıkta yoğun bakım servislerinde (%15,3) ve daha az sıklıkta cerrahi bölüm servislerinde (%14,1) ve pediatri servislerinde (%3,5) takip edilen hastalardan izole edildi.
3. Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen *E. coli* izolatlarının siprofloksasin direnci %75, levofloksasin %70,8, amikasin %2,8, gentamisin %37,5, GSBL varlığı %56,9, seftazidim %50, sefotaksim %62,5, sefepim %51,4, sefoksitin %19,4, aztreonam %54,2, ampisilin/sulbaktam %87,5, piperasilin/tazobaktam %33,3, trimetoprim/sulfametoksazol %73,6, meropenem ve imipenem %1,4, ertapenem %12,8, sefazolin %81,9 olarak bulundu.
4. Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen *Klebsiella* spp izolatlarının ampisilin/sulbaktam, seftazidim, sefotaksim, sefazolin ve trimetoprim/sulfametoksazol direnci %100, siprofloksasin %92,3, levofloksasin %46,2, amikasin %23,1, gentamisin %76,9, GSBL varlığı %69,2,

sefepim %76,9, sefoksitin %38,5, aztreonam %92,3, piperasilin/tazobaktam %76,9, %73,6, meropenem %23,1, imipenem %15,4, ertapenem %30,8 olarak bulundu.

5. *Escherichia coli*, ve *Klebsiella* spp. izolatlarında GSBL oranı sırasıyla %40,9 ve %42,4 olarak belirlendi. Nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda GSBL üretimi (%58,8), duyarlı olanlara göre (%27,7) daha yüksek bulundu.
6. Çalışmamızda GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp izolatlarında kinolon direnci sırasıyla %78,8 ve %32,1; GSBL üretmeyenlerde ise sırasıyla %41,3 ve %10,5 oranında tespit edildi.
7. *qnrA* geni *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'de sırasıyla %1,4 ve %15,4; toplamda %3,5 olarak saptandı.
8. *qnrB* geni *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'de sırasıyla %4,2 ve %61,5; toplamda %12,9 oranında saptandı.
9. *qnrS* geni *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'de sırasıyla %1,4 ve %7,7; toplamda %2,4 oranlarında saptandı.
10. PCR ile izolatlarda *qnrC* ve *qnrD* genleri saptanmadı.
11. Toplamda *qnr* pozitifliği %18,8 olarak yüksek prevalansta bulundu.
12. *Klebsiella* spp (% 84,6) izolatlarının *qnr* taşıma oranının *E. coli*'den (% 6,9) daha fazla olduğu tespit edildi.
13. *qnr* pozitif suşların %62,5'nin GSBL ürettikleri, %37,5'nin GSBL üretmedikleri belirlendi.
14. *aac(6')-Ib* geni varlığı *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'de sırasıyla %41,7 ve %92,3; toplamda %49,4 olarak yüksek bulundu.
15. *aac(6')Ib* pozitif suşların %85,7'sinin GSBL ürettikleri, %14,3'ünün GSBL üretmedikleri bulundu.
16. *qnr* pozitif 16 izolatın 13'ünde (%81,3), *qnr* negatif 69 izolatın 29'unda (%42) *aac(6')-Ib* geni pozitif olarak bulundu.
17. *qepA* geni *E. coli*'de %1,4 oranında saptanırken, *Klebsiella* spp.'de saptanmadı.
18. *oqxA* ve *oqxB* genlerinin birlikte varlığı *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'de sırasıyla %1,4 ve %84,6 oranlarında saptandı.

Hastanemizde kan örneklerinden izole edilen fenotipik olarak nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında PMQR genleri PCR analizi ile saptandı. Kinolon dirençli mikroorganizmalar sıklıkla diğer antibiyotiklere de çoklu direnç gösterdikleri için enfeksiyonların tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadırlar. Direnç profilinin takip edilmesi ve izole edilen mikroorganizmaların kinolon direncinin saptanması bu nedenle önemlidir. Hastanemizde izole edilen izolatlarda direnç oranlarının belirlenmiş olmasının, doğru antimikrobiyal tedavinin seçilmesinde ve gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılması konularında yardımcı olması beklenmektedir.

Ayrıca plazmid aracılı kinolon direnç genlerinin prevalansının takibi, kinolon grubu antibiyotiklerin tedavi protokollerindeki yerine ışık tutması açısından önemlidir.

Ek olarak GSBL üretimini kodlayan genleri taşıyan ve türler arası aktarılabilen plazmidlerde kinolon direncinden sorumlu genlerin de taşındığının gösterilmesi gelecekte önemi artan sorunlarla karşılaşılacağına habercisidir. PMQR genlerinin prevalansının takibi bu açıdan da önemlidir. Bu nedenle ileriki çalışmalarımızda GSBL enzim tipleri ile PMQR genlerinin arasında ilişkinin gösterilmesi yararlı olacaktır.

Bölgemizde kinolon grubu antibiyotiklerin *E.coli* ve *Klebsiella* spp. enfeksiyonlarında özellikle GSBL varlığında ampirik tedavide güvenilir olmadığı sonucuna varıldı. Ancak ülkemizde de Avrupa ülkelerindeki benzer kontrol önlemlerinin alınması ile bu sorunun önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

Ayrıca çalışmamızda PCR ile pozitif bulunan sonuçlarımızın doğrulanması için DNA dizi analizi yapılması gerekmektedir.

Çalışmamıza dahil edilen suşların kinolon dirençli olması *aac(6')-Ib* pozitifliklerinin daha çok *-cr* varyantı olabileceğini düşündürse de öngörünün sekanslama veya restriksiyon analiz yöntemlerinden biriyle araştırılması gerekmektedir.

Ülkemizde *oqxAB* gen varlığı ilk kez bizim çalışmamızda gösterilmiştir. *E. coli* izolatının muhtemelen plazmid aracılı, *Klebsiella* spp. izolatlarının ise muhtemelen kromozomal kökenli *oqxAB* geni taşıdığı düşünüldü. Konjugasyon ve hibridizasyon deneyleri ile bu pozitifliğin genetik orijininin doğrulanması gerçek PMQR prevalansının ve klinik dirençteki öneminin belirlenmesi açısından yararlı olacaktır.

Ayrıca hem dünyada hem de ülkemizde daha doğru prevalans verileri için geniş çaplı süreyans çalışmalarına ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Kan Kültürlerinden İzole Edilmiş Kinolon Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Plazmid Aracılı Kinolon Direncinin Araştırılması

Kinolonlar özellikle *E.coli* ve *Klebsiella* spp gibi Gram negatif basillerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Ancak kinolon direnci bu suşlarda hızlı bir artış göstermektedir. Bakterilerde görülen kinolon direnci, genellikle temel hedef olan DNA giraz ve topoizomeraz IV'de görülen mutasyonlar veya efluks pompalarının aşırı üretimi ve porinlerin kaybı ile oluşmaktadır. Ancak, son yıllarda plazmid kökenli kinolon direncinin *Enterobacteriaceae* üyelerinde önemli bir direnç mekanizması olduğu, kinolon direncinin yayılması ve görülen hızlı artışının, plazmide bağlı direnç genlerinin aktarımına bağlı olabileceğini bildirilmektedir. Bugüne kadar tanımlanmış plazmid aracılı kinolon direnç genleri *qnr*'lar, *aac(6')-Ib-cr* varyantı, *qepA* ve *oqxAB*'dir.

Bu çalışmada kan örneklerinden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında kinolon direnç oranlarının belirlenmesi, kinolon direnç mekanizmalarından aktarılabilir plazmid aracılı kinolon direnç (PMQR) genlerinin (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* ve *oqxAB*) varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakteriyoloji Biriminde, Ocak 2012-Ağustos 2013 tarihleri arasında kan örneklerinden izole edilmiş 193 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatından fenotipik yöntemlerle nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen 85 (%44,04) izolat dahil edildi. PMQR genlerinin varlığı PCR yöntemi ile araştırıldı.

Bu çalışmada, *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatında nalidiksik asit direnci sırasıyla %56,7 ve %19,7, toplamda %44,04 olarak bulundu. 72 *E. coli* suşunda *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* ve *oqxAB* genlerinin varlığı sırasıyla %1,4 (1), %4,2 (3), %1,4 (1), %41,7 (30), %1,4 (1), %1,4 (1) olarak tespit edildi. *E. coli*'de *qnrC*, *qnrD* tipi genler saptanmadı. 13 *Klebsiella* spp. suşunda *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* ve *oqxAB* genlerinin varlığı sırasıyla %15,4 (2), %61,5 (8), %7,7 (1), %92,3 (12) ve %84,6 (11) olarak saptandı. *Klebsiella* spp. izolatlarının muhtemelen kromozomal kökenli *oqxAB* geni

taşıdığı düşünöldü ancak deneylerle genin lokalizasyonu doğrulanmadı. *Klebsiella* spp.'de *qnrC*, *qnrD* ve *qepA* varlığı tespit edilmedi. Nalidiksik asit dirençli 47 (%55,3) izolat PMQR genlerinden en az birine sahipti.

Sonuç olarak, toplamda *E. coli* ve *Klebsiella* spp izolatlarında *qnrA* %3,5, *qnrB* %12,9, *qnrS* %2,4, *aac(6')-Ib* %49,4, *qepA* %1,2, *oqxAB* %1,2 prevalansta bulundu. Bölgemizde, yaygın bir klinik kullanıma sahip olan kinolonlara karşı direnç oranlarının *E. coli* ve *Klebsiella* spp suşlarında yüksek olduğu izlenmektedir. Bu dirençten PMQR genlerinden, temel olarak *aac(6')-Ib-cr* plazmid direnç geninin varlığı sorumlu olduğu görölmektedir. Elde edilen veriler, kinolon direncinin saptanmasında ilk bakılmakta olan *qnr* tiplerinin yanı sıra, dirençten sorumlu tüm plazmid kökenli genlerin incelenmesinin de önemli olduğunu ve kaynak araştırılmasında bu durumun göz önüne alınması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamız Türkiye'de *oqxAB* geninin rapor edildiği ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: *Escherichia coli*; *Klebsiella* spp; kinolon; plazmid aracılı direnç; *qnr*; *qepA*; *aac(6')-Ib*; *oqxAB*.

8. SUMMARY

Investigation of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance among Quinolone-Resistant Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Isolated from Blood Cultures

Quinolons are antibiotics that have been used to a wide extent over the past few years especially in the treatment of infections caused by gram-negative bacillus such as *E. coli* and *Klebsiella* spp. However, an increase in quinolon resistance amongst these strains has occurred. Quinolone resistance observed in bacteria usually occurs due to mutations in primary targets DNA gyrase and topoisomerase IV or excessive production of efflux pumps and loss of porin. However, over the past few years it has been suggested that plasmid mediated quinolon resistance (PMQR) may be an important resistance mechanism amongst members of *Enterobacteriaceae* and that the uprise in the spreading of quinolon resistance may be connected to plasmid mediated resistance gene transmission. The plasmid mediated quinolon resistance genes defined till date are *qnr*'s, *aac(6')-Ib-cr* variant, *qepA* and *oqxAB*.

The aim of this study was to determine quinolon resistance ratios amongst *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates from blood samples and to investigate quinolon resistance mechanisms such as the presence of transmissible PMQR genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')-Ib*, *qepA* and *oqxAB*. Eighty five (44.04%) of 193 *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates from blood samples which were determined as resistant against nalidixic acid and/or ciprofloxacin via phenotypic methods at Karadeniz Technical University Faculty of Medicine Department of Medical Microbiology Patient Services Laboratory Bacteriology Unit between January 2012 and August 2013 were recruited in the study. The presence of PMQR genes was analysed via PCR.

In this study, nalidixic acid resistance rates for *E. coli* and *Klebsiella* spp isolates were 56.7% and 19.7%, respectively and 44.04% totally. Seventy two *E. coli* carried *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB* genes with ratios of 1.4% (1), 4.2% (2), 1.4% (1), 41.7% (30), 1.4% (1), and 1.4% (1), respectively. *qnrC* and *qnrD* type genes were not detected amongst *E. coli*. Thirteen *Klebsiella* spp. carried *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, and *oqxAB* with ratios of 15.4% (2), 61.5% (8), 7.7% (1), 92.3% (12) and 84.6% (11),

respectively. *Klebsiella* spp. were suggested to have probably the chromosomally carried *oqxAB* gene, but this idea hasn't confirmed yet. *qnrC*, *qnrD* and *qepA* genes were not detected amongst *Klebsiella*.spp. Forty seven nalidixic acid resistant isolates (55.3%) carried at least one of the PMQR genes.

In conclusion *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *qepA*, *oqxAB* prevalances were determined as 3.5%, 12.9%, 2.4%, 49.4%, 1.2% and 1.2%, respectively. It has been concluded that *E. coli* and *Klebsiella* spp. strains show high resistance against quinolons which are widely used in our region. Among PMQR genes, the *aac(6')-Ib-cr* has been mostly accounted for plasmid mediated resistance. The data obtained suggest that both the type of *qnr* and other plasmid mediated resistance genes should be analyzed and be taken into consideration in the search of resources of resistance. Moreover, our study is the first in Turkey reporting the *oqxAB* gene in *E. coli* isolates.

Key words: *Escherichia coli*; *Klebsiella* spp; quinolon; plasmid mediated resistance; *qnr*; *qepA*; *aac(6')-Ib*; *oqxAB*.

9. KAYNAKLAR

1. Çetinkol Y, Çakır FÖ, Enginyurt Ö: Kan kültürlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisiline direncin yıllara göre değişimi. *Ankem Derg*, 27(1): 38-42, 2013.
2. Pradipta IS, Sodik DC, Lestari K, Parwati I, Halimah E, Diantini A, Abdulah R. Antibiotic Resistance in Sepsis Patients: Evaluation and recommendation of antibiotic use. *N Am J Med Sci*, 5(6): 344-52, 2013.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29(7): 1303-10, 2001.
4. <http://www.prnewswire.com/news-releases/international-organizations-declare-sepsis-a-global-medical-emergency-104142073.html>.
5. Sevim S, Öztürk Ş, Coşkuner A, Özgenç O, Avcı M: Bactec kan kültür sistemi ile izole edilen mikro-organizmaların değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*. 21(3): 135-40, 2007.
6. Mehli M, Gayyurhan ED, Zer Y, Akgün S, Özgür Akın FE, Balcı İ: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde kan kültürlerinden izole edilen mikro-organizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 21(3): 141-5, 2007.
7. Aktas Z, Satana D, Kayacan C, Ozbek B, Gurler N, Somer A, Salman N, Aydın AE: Carbapenem resistance in Turkey: repeat report on OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* and first report on IMP-1 beta-lactamase in *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(17): 3874-8, 2012.
8. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2): 123-40, 2004.
9. Uyanık MH, Hancı H, Yazgı H, Karameşe M: Kan kültürlerinden soyutlanan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumonia* suşlarında GSBL sıklığı ve ertapenem dahil çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 24(2): 86-91, 2010.

10. Huh K, Kim J, Cho SY, Ha YE, Joo E-J, Kang C-I, Chung DR, Lee NY, Song J-H, Peck KR: Continuous increase of the antimicrobial resistance among Gram-negative pathogens causing bacteremia: A nationwide surveillance study by the Korean Network for Study On Infectious Diseases (KONSID). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(4): 477-82, 2013.
11. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*, 17(2): 149-82, 2011.
12. Hooper DC, Strahilevitz J: Quinolones. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (Eds). 7th ed., Philadelphia, Elsevier Chirchill Livingstone, 2010, pp. 487-510.
13. Paterson DL: Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control*, 119: 20-8, 2006.
14. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
15. Topçu AW, Koç MM: Kinolonlar. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi içinde*. AW Topçu, G Söyletir, M Doğanay (Editörler). Nobel Kitabevi, İstanbul, 2008, s. 341-353.
16. Muylaert A, Mainil JG: Fluoroquinolones resistances: the current situation. *Annales de Medecine Veterinaire*, 157: 15-26, 2013.
17. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N: Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10): 1565-74, 2014.
18. Nazik H, Öngen B: Türkiye’de plazmit aracılı kinolon direnci. *ANKEM Derg*, 24(1): 46-54, 2010.
19. Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual A: Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6’)-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents*, 39(5): 431-4, 2012.
20. Jacoby GA: Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, 41(2): 120-6, 2005.
21. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A: Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*, 22(4): 664-89, 2009.
22. Bradford PA: Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 14(4): 933-51, 2001.

23. Stürenburg E, Mack D: Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect*, 47(4): 273-95, 2003.
24. Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K: Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med*, 28(6): 401-12, 2008.
25. Paterson DL, Bonomo RA: Extended-spectrum beta-lactamase: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18(4): 657-86, 2005.
26. <http://www.rivm.nl/earss/database>.
27. Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ: Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(4): 1223-7, 2007.
28. Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP: Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, 62(2): 284-8, 2008.
29. Köksal F, Sirekbasan S, Ak K, Küçükbasmacı Ö, Samastı M: Kan kültürlerinden izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-Laktamaz oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin prevalansı ve antimikrobiyal direnç patternleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 39(1-2): 31-5, 2009.
30. Tolun V, Küçükbasmacı O, Törümküney-Akbulut D, Catal C, Anđ-Küçükker M, Anđ O: Relationship between ciprofloxacin resistance and extended spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microb Infect*, 10(1): 72-5, 2004.
31. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Munian MA, de Cueto M, Ríos MJ, Hernández JR, Pascual A: Bacteremia due to extendedspectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis*, 43(11): 1407-14, 2006.
32. Balkan İİ, Gençer S, Batırel A, Özer S: Florokinolonlara karşı direnç gelişimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin analizi. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*, 10(2): 65-73, 2005.
33. Unat EK: *Escherichia coli*. *Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi içinde*. EK Unat (Ed). *Dergah Tıp Yayınları*, Cilt 1, 2. Baskı, İstanbul, 1986, s. 546.
34. Chen HD, Frankel G: Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*, 29(1): 83-98, 2005.
35. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 18(3): 775-9, 1977.

36. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Eng J Med, 308(12): 681-5, 1983.
37. Töreci K: *Escherichia* Türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi içinde. AW Topçu, G Söyletir, M Doğanay (Editörler). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002, s. 1564-1575.
38. Fındık D: *Escherichia* Türleri: AW Topçu, G Söyletir, M Doğanay (Eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi içinde. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008, s. 2136-2147.
39. Flemming S and Strockbine NA: The Genus *Escherichia*. In Bergey's Manuel of Systemic bacteriology. Garrity GM (Ed). Second ed., East Lansing, Springer, USA, 2005, pp. 607-625.
40. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS: *Enterobacteriaceae*. In Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Elevent Edition, 2002, pp. 365-377.
41. Erdem B: *Enterobacteriaceae*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji içinde. Ş Ustaçelebi (Ed). Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, 1999, s. 471- 485.
42. Farmer JJ, Boatwright KD, Michael Janda J: *Enterobacteriaceae*: Giriş ve Tanımlama (çev. O Aktepe). Klinik Mikrobiyoloji (Manual of clinical microbiology) içinde. A Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Editörler). Dokuzuncu Baskı, Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, s. 649-669.
43. Bilgehan H: *Enterobacteriaceae*. Klinik Mikrobiyolojik Tanı içinde. Beşinci baskı. Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, İzmir, 2009, s. 425-454.
44. Mamıkoğlu L, İnan D: İdrar Yolu Enfeksiyonları. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi içinde. AW Topçu, G Söyletir, M Doğanay (Editörler). Nobel Tıp Kitabevleri, 2008, s. 1485-1499.
45. Bannister BA, Begg NT, Gillespie SH: Gastrointestinal Infections and Food Poisoning. In Infectious Disease. 1th ed. 1996, pp. 150-182.
46. Blanco JE, Blanco J, Blanco M, Alonso MP, Jansen WH: Serotypes of CNF1-producing *Escherichia coli* strains that cause extraintestinal infections in humans. Eur J Epidemiol, 10(6): 707-11, 1994.
47. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA: *Enterobacteriaceae* (çev. Zarakolu Köşker IP). Tıbbi Mikrobiyoloji (Medical Microbiology) içinde. AC Başustaoğlu (Ed). Altıncı baskı, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2010, s. 301-315.
48. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Procop GW, Woods GL: *Enterobacteriaceae*. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott, Philadelphia-New York, 6th ed. 2006, pp. 211-302.

49. Huang LF, Lo YC, Su LH, Chang CL: Antimicrobial susceptibility patterns among *Escherichia coli* urinary isolates from community-onset health care-associated urinary tract infection. *Journal of the Formosan Medical Association*, 1-4, 2014.
50. Mathai D, Jones RN, Pfaller MA; SENTRY Participant Group North America: Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 40(3): 129-36, 2001.
51. McNally A, Alhashash F, Collins M, Alqasim A, Paszckiewicz K, Weston V, Diggle M: Genomic analysis of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* urosepsis. *Clin Microbiol Infect*, 19(8): E328-34, 2013.
52. Paradisi F, Corti G, Mangani V: Urosepsis in the critical care unit. *Crit Care Clin*, 14(2): 165-80, 1998.
53. Lever A, Mackenzie I: Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ*, 335(7625): 879-83, 2007.
54. Shanthachol T, Nilgate S, Suankratay C: A comparative study to determine the recovery rate of microorganisms of bloodstream infections: two versus three blood culture specimens. *J Med Assoc Thai*, 95(8): 1053-8, 2012.
55. Laupland KB: Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clin Microbiol Infect*, 19(6): 492-500, 2013.
56. Kim KS: Current concepts on the pathogenesis of *Escherichia coli* meningitis: implications for therapy and prevention. *Curr Opin Infect Dis*, 25(3): 273-8, 2012.
57. Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA: *Escherichia*, *Shigella* ve *Salmonella* (çev. Levent B), *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of clinical microbiology)* içinde. A Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Editörler). Dokuzuncu Baskı, Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, s. 670-687.
58. Huang DB, Koo H, DuPont HL: Enteroggregative *Escherichia coli*: An emerging pathogen. *Curr Infect Dis Rep*, 6(2): 83-6, 2004.
59. Shon AS, Bajwal RPS, Russo TA: Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence*, 4(2): 107-18, 2013.
60. Özakin C: *Klebsiella* Türleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* içinde. AW Topçu, G Söyletir, M Doğanay (Editörler). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008, s. 2147-2149.
61. Abbott SL: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas* ve Diğer *Enterobacteriaceae* (çev. İ Kaleli). A Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Editörler): *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of clinical microbiology)* içinde. Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, s. 698-715.

62. Aydoğan H, Başustaoğlu A. Nozokomiyal patojen olarak *Klebsiella* türlerinin mikrobiyolojik klinik ve epidemiyolojik özellikleri. Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 4: 135-143, 2000.
63. Podschun R, Ullmann U: *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev, 11(4): 589-603, 1998.
64. Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Despaux E, Ramuz M: Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. J Clin Microbiol, 32(2): 301-5, 1994.
65. Murphy CN, Clegg S: *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Future Microbiol, 7(8): 991-1002, 2012.
66. Bilgehan H: Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 2002, s. 189-226.
67. Medeiros AA: Cooperative evolution of mechanisms of beta-lactam resistance. Clin Microbiol Infect, 6(3): 3-5, 2000.
68. Sümerkan B: Yoğun Bakım Ünitesinde Gram-Negatif Mikroorganizmalar ve Direnç Sorunu. Yoğun Bakım Dergisi, 3(2): 129-34, 2003.
69. Biedenbach DJ, Moeta GJ, Jones RN: Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). Diagn Microbiol Infect Dis., 50(1): 59-69, 2004.
70. Pourakbari B, Sadr A, Ashtiani MTH, Mamishi S, Dehghani M, Mahmoudi S, Salavati A, Asgari F: Five-year evaluation of the antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing bloodstream infections in Iran. J Infect Dev Ctries, 6(2): 120-5, 2012.
71. Valles J, Leon C, Alvarez-Lerma F: Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multi-center study evaluating epidemiology and prognosis Spanish Collaborative Group for Infections in Intensive Care Units of Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias (SEMIUC). Clin Infect Dis, 24(3): 387-95, 1997.
72. Wendt C, Messer SA, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Herwaldt LA: Recurrent Gram-negative bacteremia: incidence and clinical patterns. Clin Infect Dis, 28(3): 611-7, 1999.
73. Farrell DJ, Morrissey I, Rubeis DD, Robins M, Felmingham D: A UK multicenter study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. J Infect, 46(2): 94-100, 2003.

74. Gordon KA, Jones RN; SENTRY Participant Groups (Europe, Latin America, North America): Susceptibility patterns of orally administered antimicrobials among urinary tract infection pathogens from hospitalized patients in North America: comparison report to Europe and Latin America. Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 45(4): 295-301, 2003.
75. Bahadin J, Teo SS, Mathew S: Aetiology of community-acquired urinary tract infection and antimicrobial susceptibility patterns of uropathogens isolated. *Singapore Med J*, 52(6): 415-20, 2011.
76. Pope JV, Teich DL, Clardy P, McGillicuddy DC: *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging problem in North America. *J Emerg Med*, 41(5): 103-5, 2011.
77. CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Document M100-S23 (ISBN 1-56238-865-7[Print]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013.
78. Webber M, Piddock LJ. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet Res*, 32(6): 275-84, 2001.
79. Ruiz J: Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection, *J Antimicrob Chemother* 51(5):1109-17, 2003.
80. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC: The world-wide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*, 6(10): 629-40, 2006.
81. Emamia S, Shafieeb A, Foroumadib A: Quinolones: recent structural and clinical Developments. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3: 123-136, 2005.
82. Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM: Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect*, 11(4): 256-80, 2005.
83. Anderson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother*, 51(1): 1-11, 2003.
84. Hooper DC: Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*, 31(2): 24-8, 2000.
85. Gülay Z: Kinolon Direnci. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*, 7(4): 225-232, 2002.
86. Peterson LR: Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis*, 33(3): 180-6, 2001.
87. Ball P: Quinolone generations: natural history or natural selection?. *J Antimicrob Chemother*, 46(1): 17-24, 2000.

88. Barnard FY, Maxwell A: Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser83 and Asp87. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(7): 1994-2000, 2001.
89. Hooper DC: Mechanisms of quinolone resistance. In *Quinolone antimicrobial agents*. DC Hooper, E Rubinstein (Eds). 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 2003, pp. 41-67.
90. Hooper DC: Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis*, 7(2): 337-41, 2001.
91. Nazik H, Öngen B: Türkiye’de plazmit aracılı kinolon direnci. *ANKEM Derg*, 24(1): 46-54, 2010.
92. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA: Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351(9105): 797-9, 1998.
93. Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA: Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother*, 51(4): 1037-9, 2003.
94. Nordmann P, Poirel L: Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother*, 56: 463–469, 2005.
95. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P: Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother*, 49: 3523–3525, 2005.
96. Cambau E, Lascols C, Sougakoff W, Bebear C, Bonnet R, Cavallo JD, Gutmann L, Ploy MC, Jarlier V, Soussy CJ, Robert J: Occurrence of qnrA-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002–2005. *Clin. Microbiol. Infect*, 12: 1013–1020, 2006
97. <http://www.lahey.org/qnrStudies>.
98. Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K: Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(2): 801-3, 2005.
99. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC: qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(4): 1178-82, 2006.
100. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M: New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(5): 1892-7, 2009.

101. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM: qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(2): 603-8, 2009.
102. Sánchez MB, Hernández A, Rodríguez-Martínez JM, Martínez-Martínez L, Martínez JL: Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol*, 8: 148, 2008.
103. Venter JC¹, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO: Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667): 66-74, 2004.
104. Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P: Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis*, 14(2): 231-7, 2008.
105. Heddle JG, Blance SJ, Zamble DB, Hollfelder F, Miller DA, Wentzell LM, Walsh CT, Maxwell A: The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. *J Mol Biol*, 307(5): 1223-34, 2001.
106. Parks WM, Bottrill AR, Pierrat OA, Durrant MC, Maxwell: The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie*, 89(4): 500-7, 2007.
107. Jacoby GA, Chow N, Waites KB: Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(2): 559-62, 2003.
108. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC: Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase: *Nat Med*, 12(1): 83-8, 2006.
109. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y: New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(9): 3354-60, 2007.
110. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P: Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(10):3801-4, 2008.
111. Sørensen AH, Hansen LH, Johannesen E, Sørensen SJ: Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(2): 798-9, 2003.

112. Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ: Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(9): 3332-7, 2004.
113. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC: oqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(8): 3582-4, 2009.
114. Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ: Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 60(1): 145-7, 2007.
115. Martinez-Martinez L, Eliecer Cano M, Manuel Rodriguez-Martinez J, Calvo J, Pascual A: Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6(5): 685-711, 2008.
116. Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Gísladóttir AL, Gottfredsson M: Molecular epidemiology of late recurrent candidaemia: a population-based study in Iceland. *Clin Microbiol Infect*, 18(2): 195-201, 2012.
117. Richard B, Thomson JR, Speert DP: Bakteriyolojik Örneklerin Toplanması, Taşınması ve İşleme Alınması (çev. Z Şenses). *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of clinical microbiology) içinde*. A Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Editörler). Dokuzuncu Baskı, Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, s. 291-333.
118. Nolte FS, Williams JM, Jerris RC, Morello JA, Leitch CD, Matushek S, Schwabe LD, Dorigan F, Kocka FE: Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240). *J Clin Microbiol*, 31(3): 552-7, 1993.
119. Schreckenberger PC, Lindquist D: Aerobik Gram negatif bakterilerin identifikasyonu için algoritmalar (çev D Fındık). *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of clinical microbiology) içinde*. A Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Editörler). Dokuzuncu Baskı, Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009, s. 371-376.
120. <http://www.bd.com/ds/>.
121. O'Hara CM: Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST system and NID panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*, 44(3): 928-33, 2006.
122. Begum D, Strockbine NA, Sowers EG, Jackson MP: Evaluation of a technique for identification of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. *J Clin Microbiol*, 31(12): 3153-6, 1993.

123. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC: qnr Prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(8): 2872-4, 2006.
124. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC: Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance Determinants over a 9-Year Period. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(2): 639-45, 2009.
125. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y: Plasmid-mediated qepA gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(4): 1564-6, 2008.
126. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC: Prevalence in the United States of aac(6')Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(11): 3953-5, 2006.
127. Liu BT, Wang XM, Liao XP, Sun J, Zhu HQ, Chen XY, Liu YH: Plasmid-mediated quinolone resistance determinants oqxAB and aac(6')-Ib-cr and extended-spectrum β -lactamase gene blaCTX-M-24 co-located on the same plasmid in one *Escherichia coli* strain from China. *J Antimicrob Chemother*, 66(7): 1638-58, 2011.
128. Çoban AY, Nohut OK, Tanrıverdi Çaycı Y, Bayramoğlu G, Pirinççiler M, Çetinkaya E, Çekiç Cihan Ç, Bozdoğan B, Durupınar B: *Enterobacteriaceae* üyelerinde plazmid aracılı kinolon direnç determinantlarının araştırılması: çok merkezli bir çalışma. *Mikrobiyol Bul*, 46(3): 366-74, 2012.
129. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P: Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*, 60(2): 394-7, 2007.
130. Karaoğlu İ, Zer Y, Süner A, Namıduru M. Bazı *Enterobacteriaceae* türlerine ertapenemin in-vitro Etkinliği. *Ankem Derg*, 22(4): 183-7, 2008.
131. Borg MA, van de Sande-Bruinsma N, Scicluna E, de Kraker M, Tiemersma E, Monen J, Grundmann H; ARMed Project Members and Collaborators: Antimicrobial resistance in invasive strains of *Escherichia coli* from southern and eastern Mediterranean laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 14(8): 789-96, 2008.
132. Gur D, Hascelik G, Aydın N, Telli M, Gültekin M, Ogülneç D, Arikan OA, Uysal S, Yaman A, Kibar F, Gülay Z, Sumerkan B, Esel D, Kayacan CB, Aktas Z, Soyletir G, Altinkanat G, Durupınar B, Darka O, Akgün Y, Yayla B, Gedikoglu S, Sinirtas M, Bertkas M, Yaman G: Antimicrobial resistance in Gram-negative hospital isolates: Results of the Turkish HITIT-2 surveillance study of 2007. *J Chemother*, 21(4): 383-9, 2009.
133. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB: Nosocomial bloodstream infections in US Hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 39(3): 309-17, 2004.

134. Lautenbach E, Fishman NO, Bilker WB, Castiglioni A, Metlay JP, Edelstein PH, Strom BL: Risk factors for fluoroquinolone resistance in nosocomial *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections. Arch Intern Med, 162(21): 2469-77, 2002.
135. Liao CH, Hsueh PR, Jacoby GA, Hooper DC: Risk factors and clinical characteristics of patients with qnr-positive *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. J Antimicrob Chemother, 68(12): 2907-14, 2013.
136. Duman Y, Kuzucu Ç, Çuğlan SS: Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Erciyes Tıp Dergisi, 33(3): 189-196, 2011.
137. Karagöz G, Kadanalı A, Dede B, Çomoğlu Ş, Muhterem Yücel F, Bektaşoğlu MF: *Escherichia coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Sıklığı ve Antibiyotik Direnç Oranları. TAF Prev Med Bull, 12(3):291-296, 2013.
138. Karaayak Uzun B, Güngör S, İlgün MŞ, Özdemir R, Baran N, Ergin ÖY: Kan kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve in-vitro antibiyotiklere direnç paternleri. Ankem Derg, 26(4): 181-6, 2012.
139. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA: High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. J Antimicrob Chemother, 56(6):1115-7, 2005.
140. Chen WY, Jang TN, Huang CH, Hsueh PR: In vitro susceptibilities of aerobic and facultative anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intraabdominal infections at a medical center in Taiwan: results of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) 2002-2006. J Microbiol Immunol Infect, 42(4): 317-23, 2009.
141. Treccarichi EM, Tumbarello M, Spanu T, Caira M, Fianchi L, Chiusolo P, Fadda G, Leone G, Cauda R, Pagano L: Incidence and clinical impact of extended-spectrum-beta-lactamase production and fluoroquinolone resistance in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* in patients with hematological malignancies. J Infect, 58(4): 299-307, 2009.
142. Yılmaz N, Ağus N, Köse S, Yurtsever SG, Öner Ö: Geniş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının ertapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 39(3-4): 80-4, 2009.
143. Arslan H, Azap OK, Ergönül O, Timurkaynak F; Urinary Tract Infection Study Group: Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. J Antimicrob Chemother, 56(5): 914-8, 2005.
144. Canbaz S, Peksen Y, Sunter AT, Leblebicioglu H, Sunbul M: Antibiotic prescribing and urinary tract infection. Int J Antimicrob Agents, 20(6): 407-11, 2002.

145. Tekin O, Catal F, Ibik B, Acikgoz ZC. Increasing incidence of quinolone-resistant *E. coli* from urinary cultures in Ankara-Pursaklar region. *Int J Antimicrob Agents*, 23(4): 416-7, 2004.
146. Goossens H; MYSTIC Study Group (Europe): MYSTIC program: summary of European data from 1997 to 2000. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 41(4): 183-9, 2001.
147. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh PR, Paterson DL: Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(8): 3280-4, 2009.
148. Eraksoy H, Basustaoglu A, Kortan V, Kurt H, Ozturk R, Ulusoy S, Yaman A, Yuce A, Zarakolu P; Turkish MYSTIC Study Group: Susceptibility of bacterial isolates from Turkey-a report from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program. *J Chemother*, 19(6): 650-7, 2007.
149. Gür D, Gülay Z, Arıkan Akan Ö, Aktaş Z, Bal Kayacan Ç, Çakıcı Ö, Eraç B, Gültekin M, Ögünç D, Söyletir G, Ünal N, Uysal S: Türkiye’de hastane izolatu Gram negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: Çok merkezli HİTİT surveyansının sonuçları. *Mikrobiyol Bul*, 42: 537-44, 2008.
150. Gülay Z: Gram negatif basillerde antibiyotik direnci: 2003-2005 yılında ülkemizdeki durum. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı. D Gür, İ Köksal, AC Başustaoğlu (Editörler): *Türk Mikrobiol Cem yayını*, No: 54, İstanbul, 2006, s. 161-76.
151. Bülüş M, Gürol Y, Bal Ç: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Oranları: 2000-2002. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 33(1): 31-4, 2003.
152. Mumcuoğlu İ, Gündüz T, Baydur H: *Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Varlığı ve Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Durumu. *Ankem Derg*, 18(1): 9-11, 2004.
153. Kiremitçi A, Durmaz G, Aybey A, Us T, Akgün Y: *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşlarında NCCLS tarama ve fenotipik doğrulama yöntemleriyle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığının araştırılması, XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 340, 2004.
154. Çolakoglu S, Turunç T, Aliskan H, Demiroglu YZ, Timurkaynak F, Arslan H: Kan Kültürlerinden İzole Edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* Suşlarında Antibiyotik Duyarlılığı. 8. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı. Gür D (Ed.): *Türk Mikrobiyol Cem Deg Yayını*, No: 57, İstanbul, 2008, s. 220-1.

155. Nazik H, Öksüz L, Aktaş Gökalp A, Karayay S, Bal Kayacan C, Gürler N: İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kan kültüründen izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. 8. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı. D Gür (Ed). Türk Mikrobiol Cem Derg Yayını, No: 57, İstanbul, 2008, s. 224-225.
156. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO: Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Clin Infect Dis, 33(8): 1288-94, 2001.
157. Killgore KM, March KL, Guglielmo BJ: Risk factors for community-acquired ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* urinary tract infection. Ann Pharmacother, 38(7-8):1148-52, 2004
158. Arslan U, Türk Dağı H, Yüksekaya Ş, Uysal E, Tuncer İ: Kan kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılığı ve genişlemiş Spektrumlu β -Laktamaz oranı. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 40(3): 169-74, 2010.
159. Wu JJ, Ko WC, Wu HM, Yan JJ: Prevalence of Qnr determinants among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Taiwanese hospital, 1999–2005. J Antimicrob Chemother, 61(6): 1234-9, 2008.
160. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, Li L: Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China . J Antimicrob Chemother, 61(5): 1003-6, 2008.
161. Strahilevitz J, Engelstein D, Adler A, Temper V, Moses AE, Block C, Robicsek A: Changes in qnr prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005. Antimicrob Agents Chemother, 51(8): 3001-3, 2007.
162. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P: Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. Antimicrob Agents Chemother, 50(12): 3992-7, 2006.
163. Pitout JD, Wei Y, Church DL, Gregson DB: Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of aac(6')-Ib-cr. J Antimicrob Chemother, 61(5): 999-1002, 2008.
164. Hassan WM, Hashim A, Domany R: Plasmid mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qep in ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates from Egypt. Indian J Med Microbiol, 30(4): 442-7, 2012.

165. Nazik H, Poirel L, Nordmann P: Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey, *Antimicrob Agents Chemother*, 49(5): 2146-7, 2005.
166. Avsaroglu MD, Helmuth R, Junker E, Hertwig S, Schroeter A, Akcelik M, Bozoglu F, Guerra B: Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by *qnrS1* in *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin. *J Antimicrob Chemother*, 60(5): 1146-50, 2007.
167. Öktem İMA, Biçmen M, Gülay Z: Kan kültürlerinden soyutlanan *Enterobacteriaceae* izolatlarında plazmit ile ilişkili kinolon direnci genlerinin saptanması. 8. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, Program ve Özet Kitabı, Türk Mikrobiyoloji Cem yayını, No.57, İstanbul, 2008, s. 28.
168. Oktem IMA, Gulay Z, Bicmen M, Gur D; HITIT Project Study Group: *qnrA* prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis*, 61(1): 13-7, 2008.
169. Ozgumus OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N: Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in Northern Turkey. *J Microbiol*, 47(1): 19-27, 2009.
170. Gulay Z, Bicmen M, Gur D: Prevalance and diversity of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum beta-lactamase positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: first report of *qepA* from Turkey. *Clin Microbiol Infect*, 16(2): 193, 2010.
171. Gülay Z: *Enterobacteriaceae* üyelerinde direnç epidemiyolojisi. Antimikrobik Kemoterapi Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. Gülhane Mikrobiyoloji Günleri 20-22 Nisan 2010.
172. Çoban AY, Tanrıverdi Çaycı Y, Yıldırım T, Erturan Z, Durupınar B, Bozdoğan B: Kistik fibrozisli hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında plazmid aracılı kinolon direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 45(4): 602-8, 2011.
173. Nazik H, Bektöre B, Öngen B, Ilktaç M, Özyurt M, Kuvat N, Baylan O, Keküllüoğlu H, Haznedaroglu T, Kelesoglu FM: Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* urinary isolates from two teaching hospitals in Turkey: coexistence of TEM, SHV, CTX-M and VEB-1 type β -lactamases. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3): 325-33, 2011.
174. Hoşgör-Limoncu M, Eraç B, Yurtman AN, Aydemir S: Plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in ESBL positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains at a tertiary-care hospital in Turkey. *J Chemother*, 24(3): 144-9, 2012.
175. Gunell M, Webber MA, Kotilainen P, Lilly AJ, Caddick JM, Jalava J, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen AJ, Piddock LJ: Mechanisms of Resistance in Nontyphoidal *Salmonella enterica* Strains Exhibiting a Nonclassical Quinolone Resistance Phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9): 3832–3836, 2009.

176. Poirel L, Gür D, Minarini L, Arslan U, Nordmann P: Molecular epidemiology of plasmid mediated quinolone resistance determinants in extended spectrum beta-lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates from Turkey. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 2008, p. 1527.
177. Nazik H, İlkaç M, Öngen B: Prevalence of qnrA, qnrB, qnrS and aac(6')-Ib-cr (in qnr-positive isolates) among the ESBL-positive and/or ciprofloxacin-resistant isolates in Turkey. *J Chemother*, 21(2): 219-21, 2009.
178. Nazik H, Öngen B, Mete B, Aydın S, Yemişen M, Keleşoğlu FM, Ergül Y, Tabak F: Coexistence of blaOXA-48 and aac(6')-Ib-cr genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Istanbul, Turkey. *J Int Med Res*, 39(5): 1932-40, 2011.
179. Nazik H, Gürler N, Akgün Karapınar DB, Öksüz L, Albayrak R, Dikici SB, Yılmaz M, Aydın D, Öngen B: Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları: on bir yıllık sonuçlar. 28. Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi. *ANKEM Derg*, 27(Ek 1), Poster 69, Antalya, 22-26 Mayıs 2013.
180. Aktepe OC, Aşık G, Çetinkol Y, Biçmen M, Gülay Z: *Escherichia coli* suşlarında plazmide bağlı kinolon direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 46(1): 9-16, 2012.
181. Amin AK, Wareham DW: Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolates associated with community and nosocomial urinary tract infection in East London, UK. *Int J Antimicrob Agents*, 34(5): 490-503, 2009.
182. Sjolund-Karlsson M, Folster JP, Pecic G, Joyce K, Medalla F, Rickert R, Whichard JM: Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates from humans in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(5): 2142-4, 2009.
183. Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, Jiao X: Prevalence of qnr, aac(6')-Ib-cr, qepA, and oqxAB in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(6): 3423-7, 2012.
184. Park KS, Kim MH, Park TS, Nam YS, Lee HJ, Suh JT: Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance genes, aac(6')-Ib-cr, qepA, and oqxAB in clinical isolates of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Ann Clin Lab Sci*, 42(2): 191-7, 2012.
185. Taherpour A, Hashemi A: Detection of OqxAB efflux pumps, OmpK35 and OmpK36 porins in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. *Hippokratia*, 17(4): 355-8, 2013.
186. Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernández-Cuenca F, Rodríguez Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual Á: Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 68(1): 68-73, 2013.