



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI

DİRENÇLİ *Escherichia coli*
ELİMİNASYONU İÇİN YENİ ANTİMİKROBİYAL
KOMBİNASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

PINAR ŞAHİNTÜRK

DOKTORA TEZİ

BURSA

2018

PINAR ŞAHİNTÜRK

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2018



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI

DİRENÇLİ *Escherichia coli*
ELİMİNASYONU İÇİN YENİ ANTİMİKROBİYAL
KOMBİNASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

Pınar ŞAHİNTÜRK

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç. Dr. Murat CENGİZ

TUBİTAK BİDEB-2211

TUBİTAK 2140316

BURSA-2018

**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum



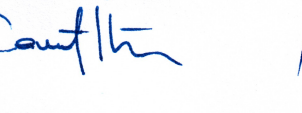
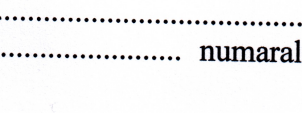

“Dirençli *Escherichia coli* eliminasyonu için yeni antimikrobiyal kombinasyonların araştırılması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.



Pınar ŞAHİNTÜRK
27/02/2018

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Uludağ Üniversitesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Pınar Şahintürk tarafından hazırlanan "Dirençli *Escherichia coli* eliminasyonu için yeni antimikrobiyal kombinasyonların araştırılması" konulu Doktora tezi 15/03/2018 günü, 10.00-13.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Murat CENGİZ	
Üye	Prof. Dr. Songül SONAL	
Üye	Prof. Dr. Emin Halis AKALIN	
Üye	Prof. Dr. Tülay BAKIREL	
Üye	Prof. Dr. Cavit KUM	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ali AYDOĞDU

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

27/02/2018

Adı Soyadı: Pınar ŞAHİNTÜRK

Anabilim Dalı: Veteriner-Farmakoloji ve Toksikoloji

Tez Konusu: Dirençli *Escherichia coli* Eliminasyonu İçin Yeni Antimikrobiyal Kombinasyonların Araştırılması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

DANIŞMAN ONAYI

Doç. Dr. Murat CENGİZ

İmza: 

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN	
KABUL ONAY	
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	
İÇİNDEKİLER	I
TÜRKÇE ÖZET	IV
İNGİLİZCE ÖZET	V
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Antimikrobiyal Terapi.....	4
2.1.1. Antimikrobiyal Seçimini Etkileyen Faktörler	5
2.1.2. Antimikrobiyal Terapinin Riskleri	7
2.2. Antimikrobiyal Direnç	7
2.2.1. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları	9
2.2.1.1. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları: Biyokimyasal Yaklaşım	10
2.2.1.1.2. Antimikrobisallerin İnaktivasyonu	10
2.2.1.1.3. Hedef Bölgelerdeki Değişiklikler	11
2.2.1.1.4. Dış Membran Geçirgenliğindeki Değişiklikler ve Geri Çıkartım Pompaları	12
2.2.1.2. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları: Genetik Yaklaşım	13
2.2.1.2.1. Mutasyonlar	13
2.2.1.2.2. Horizontal Gen Transferi	14
2.3. Florokinolon Direnci	15
2.3.1. Kromozomal Florokinolon Direnci.....	15
2.3.1.1. Florokinolonların Hedef Enzimlerindeki Değişiklikler	15
2.3.1.2. Hücre İçine Alınan Florokinolon Miktarının Azalması	17
2.3.2. Plazmid Aracılı Florokinolon Direnci (Plazmid Mediated Quinolone Resistance: PMQR).....	17
2.3.2.1. Qnr Genleri.....	18
2.3.2.2. aac(6')-Ib-cr.....	19
2.3.2.3. QepA ve OqxAB	19
2.4. MDR.....	20
2.5. Antimikrobiyal Direnci Önleme Stratejileri.....	24
2.5.1. Kombinasyon Terapisi	25
2.5.1.1. Kombinasyonların Kullanım Amaçları	26
2.6. Antimikrobiyal Bileşikler Arasındaki Etkileşimler	27
2.6.1. Sinerjizma	28
2.6.1.1. Sinerjizma Etki Mekanizmaları.....	29
2.6.2. Additif Etki	30
2.6.3. Antagonizma	30
2.7. Antimikrobiyal Bileşikler.....	31
2.7.1. Sefalosporinler	31
2.7.1.1. CRO	32
2.7.1.2. CEF	33
2.7.2. Florokinolonlar.....	34

2.7.2.1. DAN	34
2.7.3. Aminoglikozidler	35
2.7.3.1. GEN	36
2.7.4. Polimiksinler	38
2.7.4.1. CST	38
2.8. <i>E. coli</i>	39
2.9. Antimikrobiyal Direncin ve MDR'ın Karakterizasyonu.....	41
2.9.1. Fenotipik Yöntemler	41
2.9.1.1. Disk Difüzyon	42
2.9.1.2. Gradient Difüzyon.....	42
2.9.1.3. Agar Dilüsyon	43
2.9.1.4. Broth Mikrodilüsyon	43
2.9.2. Moleküler Yöntemler	44
2.9.2.1. PCR	44
2.9.2.2. Dizi Analizi	44
2.9.2.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polimorphic DNA: RAPD) PCR.....	44
2.9.2.4. qRT-PCR.....	45
2.10. Antimikrobiyal Bileşikler Arasındaki Etkileşimlerin Değerlendirilmesi	48
2.10.1. Checkerboard Yöntemi	48
2.10.2. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri.....	49
2.11. <i>In vitro</i> FK/FD Araştırmalar	49
2.11.1. MBK.....	51
2.11.2. MÖK, MÖİ, MF ve MSP	51
2.11.3. PAE ve PA-SME.....	52
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. Laboratuvar Donanımı ve Cihazlar.....	54
3.2. <i>E. coli</i> İzolatları ve Kontrol Suşları.....	55
3.3. Antimikrobiyaller	56
3.4. Fenotipik Yöntemler	56
3.4.1. Broth Mikrodilüsyon.....	56
3.5. Moleküler Yöntemler	58
3.5.1. Bakteriyel DNA ve RNA İzolasyonu.....	58
3.5.1.1. DNA İzolasyonu.....	58
3.5.1.2. Kaynatma Yöntemi ile DNA İzolasyonu	59
3.5.1.3. RNA İzolasyonu.....	59
3.5.2. RAPD PCR	60
3.5.3. PCR Amplifikasyonu	61
3.5.4. Jel Elektroforez ve Görüntüleme	64
3.5.4.1. Agaroz Jel Hazırlama.....	64
3.5.4.2. Jel Elektroforez	64
3.5.4.3. Görüntüleme.....	64
3.5.5. qRT-PCR Amplifikasyonu.....	65
3.6. Sinerji Testleri.....	66
3.6.1. Checkerboard Mikrodilüsyon	66
3.6.1.1. FİK ve FİKİ Hesaplama	67
3.6.2. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri.....	67
3.7. <i>In vitro</i> FD Testleri.....	68

3.7.1. MBK Testi.....	68
3.7.2. MÖK, MÖK:MİK, MF ve MSP'nin Belirlenmesi.....	69
3.7.3. PAE ve PA-SME'nin Belirlenmesi.....	70
4. BULGULAR.....	72
4.1. Hayvanlardan İzole Edilen <i>E. coli</i> 'nin Epidemiyolojik Tiplendirmesi.....	72
4.2. Fenotipik Karakterizasyon.....	73
4.3. Moleküler Karakterizasyon.....	75
4.3.1. Florokinolon Direncinin Moleküler Karakterizasyonu.....	75
4.3.1.1. Florokinolon Direncinden Sorumlu Genlerdeki Mutasyonların Belirlenmesi.....	75
4.3.1.2. Florokinolon Direncinden Sorumlu PMQR Genlerinin Tespiti.....	76
4.3.2. MDR'ın Moleküler Karakterizasyonu.....	77
4.4. Antimikrobiyal İlaçlar Arasındaki Etkileşimlerin Belirlenmesi.....	80
4.4.1. FİK Tespiti.....	80
4.4.1.1. β -laktam+Florokinolon Kombinasyonu.....	81
4.4.1.1.1. FEP+Florokinolon.....	81
4.4.1.1.2. CRO+Florokinolon.....	82
4.4.1.1.3. CEF+Florokinolon.....	83
4.4.1.2. β -laktam+Aminoglikozid Kombinasyonu.....	84
4.4.1.3. β -laktam+Polimiksin Kombinasyonu.....	85
4.4.1.4. Florokinolon+Polimiksin Kombinasyonu.....	86
4.4.2. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri.....	87
4.4.2.1. β -laktam+Florokinolon Kombinasyonu.....	87
4.4.2.1.1. FEP+Florokinolon.....	87
4.4.2.1.2. CRO+Florokinolon.....	89
4.4.2.1.3. CEF+Florokinolon.....	92
4.4.2.2. β -laktam+Aminoglikozid Kombinasyonu.....	94
4.4.2.3. β -laktam+Polimiksin Kombinasyonu.....	97
4.4.2.4. Florokinolon+Polimiksin Kombinasyonu.....	99
4.5. Antimikrobiyal İlaçlar ve Etkin Kombinasyonların MBK'ü.....	101
4.6. Antimikrobiyal İlaçların ve Etkin Kombinasyonların MÖK, MÖK:MİK, MF ve MSP'si.....	104
4.6.1. CEF+DAN.....	104
4.6.2. CEF+GEN.....	105
4.6.3. CRO+CST.....	106
4.6.4. DAN+CST.....	107
4.7. Antimikrobiyal İlaçların ve Etkin Kombinasyonların PAE ve PA-SME'si.....	108
4.7.1. CEF+DAN.....	108
4.7.2. CEF+GEN.....	110
4.7.3. CRO+CST.....	112
4.7.4. DAN+CST.....	114
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	117
6. KAYNAKLAR.....	143
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	156
8. TEŞEKKÜR.....	163
9. ÖZGEÇMİŞ.....	164

TÜRKÇE ÖZET

DİRENÇLİ *Escherichia coli* ELİMİNASYONU İÇİN YENİ ANTİMİKROBİYAL KOMBİNASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma, *Escherichia coli* (*E. coli*)’de direnç gelişiminin önlenmesi için yeni antimikrobiyal kombinasyonların araştırılması ve farmakodinamik (PD) etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, kombinasyon terapisinin etkinliğini arttırmak için, öncelikle florokinolon direnci ve çoklu ilaç direncinin (MDR) fenotipik ve moleküler karakterizasyonuna odaklanılmıştır.

Sağlıklı ve hasta hayvanlardan toplanan 25 izolat ve 2 kontrol suşu (*E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG100) kullanıldı. İzolatların direnç profili, 19 bileşik kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. MDR’in moleküler karakterizasyonu için kinolon direnci belirleyici bölge (QRDR) mutasyonları ile plazmid aracılı kinolon direnç (PMQR) genleri tespit edildi ve geri çıkartım pompası etkinliği değerlendirildi. Antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimin belirlenmesi için checkerboard yöntemi ile zamana bağlı doz-yanıt deneyleri ve etkin bulunan kombinasyonların FD parametrelerinin belirlenmesi için ise minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK), mutant önleyici konsantrasyon (MÖK), post antibiyotik etki (PAE) ve post antibiyotik sub-MİK etki (PA-SME) testleri kullanıldı.

E. coli izolatlarında %66 düzeyde florokinolon direnci, %88 düzeyde ise MDR fenotipi belirlendi. *E. coli*’de florokinolon direncinden *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonların ve *oqxB* geninin, MDR’dan ise MDR ile ilişkilendirilen genlerdeki ekspresyon değişikliklerinin sorumlu olduğu tespit edildi. Direnç mekanizmalarının, antimikrobiyal bileşiklerin MİK, MBK ve MÖK düzeylerinde artışa neden olduğu ancak, antimikrobiyal bileşikler arasındaki sinerjizmanın ve PAE ile PA-SME sürelerinin direnç mekanizmalarından bağımsız olduğu belirlendi.

Seftiofur+danofloksasin (%100), seftiofur+gentamisin (%100), seftriakson+kolistin (%66) ve danofloksasin+kolistin (%66) kombinasyonlarının, MDR *E. coli*’ye karşı sinerjistik etkili olduğu ve kombinasyon terapisinin, monoterapiye göre MBK ile MÖK açısından avantaj sağladığı tespit edildi. MBK, MÖK ve PAE ile PA-SME süreleri dikkate alınarak daha düşük konsantrasyonlarda, daha uzun aralıklarla uygulandığında bile etkin olan kombinasyonların, *E. coli*’de direnç gelişimini yüksek düzeyde önleme potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: MDR, *E. coli*, antimikrobiyal kombinasyon

İNGİLİZCE ÖZET

NEW ANTIMICROBIAL COMBINATIONS FOR THE ELIMINATION OF RESISTANT *Escherichia coli*

This study was conducted to assessment of novel antimicrobial combinations and its pharmacodynamic (PD) parameters to prevent antimicrobial resistance in *Escherichia coli* (*E. coli*). The focus was primarily on the phenotypic and molecular characterization of fluoroquinolone resistance and multidrug resistance (MDR) to enhance the effectiveness of combination therapy.

Twenty five *E. coli* strains isolated from healthy and sick animals and 2 control strains (*E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* AG100) were used in this study. The resistance profile of the isolates was determined by microdilution method using 19 antimicrobial agents. Quinolone resistance determining region (QRDR) mutations and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes were identified and the efflux pump activity was evaluated to molecular characterization of MDR. The interactions between antimicrobial agents were assessed by checkerboard test and time-kill assays. The minimum bactericidal concentration (MBC), mutant prevention concentration (MPC), post antibiotic effect (PAE) and post antibiotic sub-MIC effect (PA-SME) tests were performed to determine PD parameters of antimicrobial combinations.

Fluoroquinolone resistance and MDR phenotype were detected in 66% and 88% of *E. coli* isolates, respectively. It was determined that the mutations in the *gyrA* and *parC* genes, and the presence of *oqxB* gene were responsible for fluoroquinolone resistance in *E. coli*. MDR was mainly related to the alteration of expression levels in genes associated with MDR. Although the resistance determinants increased the MIC, MBC and MPC levels of antimicrobial agents, synergism between antimicrobial agents and the duration of PAE and PA-SME were independent of resistance mechanisms.

The combinations of ceftiofur+danofloxacin (100%), ceftiofur+gentamicin (100%), ceftriaxone+colistin (66%), and danofloxacin+colistin (66%) showed synergy against MDR *E. coli* isolates. *E. coli* isolates displayed a reduced MBC and MPC in combinations relative to the individual antimicrobial MBCs and MPCs. These antimicrobial combinations may provide an effective therapy at lower concentrations, even at longer intervals against resistant *E. coli* by consideration of MBC, MPC, PAE and PA-SME.

Keywords: MDR, *E. coli*, antimicrobial combination

1. GİRİŞ

Veteriner ve beşeri hekimlikte antimikrobialların yaygın ve hatalı kullanımına bağlı olarak son yıllarda önemli derecede artan antimikrobiyal direnç, insan ve hayvan sağlığı bakımından önemli bir risk faktörüdür. Antimikrobiyal direnç; kromozomlardaki mutasyon, aktarılabılır direnç faktörleri ya da çoklu ilaç direnci (Multidrug Resistance: MDR) ile ortaya çıkabilir. Çoklu antibiyotik lokusu (mar) tarafından düzenlenen MDR, bakterilerin membran proteinlerindeki yapısal değişime bağlı olarak ilacın hücre içi birikiminin azalması ile karakterizedir (Khan ve ark., 2005; Robicsek ve ark., 2006). Antimikrobiyal direnç ve MDR profili, antimikrobiyal kemoterapinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olur. MDR bakterilerden kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için harcanan zaman ve maliyet artar, hastalıkların morbidite ve mortalite oranlarında artış gözlenebilir (Finch ve ark., 2004)

Escherichia coli (*E. coli*), insan ve hayvanlarda sindirim sistemi enfeksiyonu ile septisemi oluşturmasının yanında solunum sistemi enfeksiyonlarından da sorumlu olan önemli bir patojendir (Hopkins ve ark., 2005). Florokinolonlar, tıp ve veteriner hekimliği alanında yaygın bir şekilde kullanılan sentetik yapılu antimikrobiyal ilaçlardır ve özellikle Enterobacteriaceae familyasında yer alan bakterilerde geniş bir antimikrobiyal etkiye sahip olması nedeniyle klinik uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Türkiye’de veteriner ve tıp hekimliğinde *E. coli*’de florokinolon direncinin varlığını gösteren araştırmalar mevcuttur (Cengiz ve ark., 2012, Cengiz ve ark., 2013). Florokinolon direncine aracılık eden mutasyonların büyük çoğunluğu kinolon direncini belirleyici bölge (Quinolone Resistance Determining Region: QRDR) olarak tanımlanan *gyrA* ve *parC* genlerinde meydana gelir (Lee ve ark., 2005). Florokinolon direncine neden olan diğer bir faktör, genetik unsurların bakteriler arasında aktarılabılmesidir. Plazmid aracılı kinolon direnci (PMQR), *E. coli*’de *qnr* genleri, *qepA*, *oqxA*, *oqxB* ve *aac (6’)-Ib-cr* genleri ile ilişkilendirilir.

Gram negatif bakterilerde MDR, direnç nodülasyon bölümünün (resistance nodulation division: RND) geri çıkartım pompası aktivasyonu sonucu gelişir. *Enterobacteriaceae* bakterileri için MDR'dan sorumlu olan geri çıkartım pompası AcrAB-TolC, farklı grup antimikrobiyal (florokinolon, β -laktam, makrolid, tetrasiklin ve sulfonamid grubu bileşikleri ve trimetoprim), biyosid ve boyaları içeren birçok bileşiğin hücre dışına atılımını sağlar. Geri çıkartım pompasını düzenleyen genlerin ekspresyonu, antimikrobiyal bileşiklere karşı bakterinin direnç geliştirmesini kolaylaştırır (Bambeke ve ark., 2006).

Antimikrobiyal bileşikler kombine kullanıldığında *in vivo* direncin gelişmesi önlenir veya geciktirilir. Kombinasyondaki bileşikler için pozitif etkileşimler sinerjizma, negatif etkileşimler ise antagonizma olarak kabul edilir. Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK), kombinasyon çalışması sonuçlarının matematiksel ifadesidir. Bu yöntemde her bir ilaç için FİK, o ilacın tek başına ve kombine kullanıldığında bakteriyi inhibe etmesi için gerekli olan konsantrasyonlarının oranlanmasıyla hesaplanır. Farmakokinetik/farmakodinamik (FK/FD) parametreler, yeni kombinasyonların geliştirilmesi, mevcut ilaçların arasından en uygun ilaç seçiminin yapılması, en etkin doz rejiminin belirlenmesi ve antimikrobiyal direncin azaltılması amacıyla kullanılır. FK/FD veri, minimum miktarda ilaç kullanarak patojen ajanı ortamdaki uzaklaştırmayı, böylece kommensal bakterileri antimikrobiyal ilacın etkisine daha az maruz bırakıp direnç oluşumunu önlemeyi ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FİK_i) sonuçlarının teyidini sağlar (McKellar ve ark., 2004; Petersen ve ark., 2006). FK/FD araştırmalar (1) minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), (2) FİK, (3) minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK), (4) mutant önleyici konsantrasyon (MÖK), (5) mutant seçim penceresi (MSP), (6) mutant frekansı (MF), (7) post antibiyotik etki (PAE), (8) post antibiyotik sub-MİK etki (PA-SME) ile (9) zamana bağlı doz yanıt deneylerini kapsar (EMA/CVMP/261180/2012). Antimikrobiyal direncin önlenmesi için çözüme yönelik yaklaşımlardan biri yeni bileşiklerin sentezlenmesidir. Ancak dirençli

mikroorganizmalara karşı etkili yeni bileşiklerin geliştirilmesi uzun zaman alan maliyeti yüksek bir süreçtir (WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance World). Bu kapsamda mevcut bileşiklerin terapötik etkinliklerinin artırılması için yeni antimikrobiyal kombinasyonların oluşturulması ve FK/FD parametrelerinin ortaya konması antimikrobiyal dirençle mücadelede önemli ve gereklidir (Nielsen ve Friberg, 2013). Sinerjistik bakterisidal aktiviteye sahip yeni kombinasyonların geliştirilmesi kadar, aralarında bir sinerjizma tespit edilmemesine rağmen, kombinasyonların direnç gelişimini önleyebilmesi de klinik açıdan değerlidir (Dawis ve ark., 2003). Çünkü dirençten sorumlu olan mekanizma antimikrobiyal bileşiğin davranış karakteristiğini değiştirebilir (Cengiz ve ark., 2013). Bu yaklaşım esas alınarak tez projesinin amacı dirençli *E. coli*'de farklı etki mekanizmasına sahip antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimin tanımlanması, additif veya sinerjistik etkili olan kombinasyonların FK/FD parametrelerinin belirlenmesidir. Elde edilen veriler doğrultusunda kombinasyon terapisinin etkinlik ve antimikrobiyal direnç açısından monoterapiye göre daha üstün bir tedavi sağlaması ve doz revizyonu ile daha düşük dozlarda ve daha uzun aralıklarla ilaç uygulanarak antimikrobiyal direnç gelişiminin önlenmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Antimikrobiyal devrimi, 1920'lerin sonunda fizikçi bilim adamı Gerhard Domagk tarafından ilk antimikrobiyal ilaç olarak sülfonamidin keşfedilmesiyle başlamıştır. Sonraki yıllar boyunca birçok sülfü türevi ilaç üretilmiş ve İkinci Dünya Savaşı sırasında binlerce hastanın hayatı kurtarılmıştır. 1928'de Alexander Fleming'in *Staphylococcus* kolonilerinin *Penicillium* küfıyla kontamine olmuş plaka üzerinde üremediğini fark etmesiyle penisilinin keşfedilmesi ve 1940 yılında Chain ile Florey ve çalışma arkadaşları tarafından *Penicillium notatum* kültürlerinden penisilinin (PEN) üretilmesi ve geliştirilmesiyle antimikrobiyal devriminde ikinci aşamaya geçilmiştir. Bu gelişmeden sonra etki gücü, mekanizması ve spektrumu açısından birbirinden farklı birçok antimikrobiyal ilaç grubu geliştirilmiştir (Lobanovska ve Pilla, 2017 ve Presscott, 2013).

2.1. Antimikrobiyal Terapi

Kemoterapi, uygulandığı ökaryot canlı üzerinde herhangi bir toksik etki oluşturmaksızın, bakteri, iç ve dış parazit, virüs ve protozoa gibi prokaryot patojenlere karşı selektif toksisite göstererek, bu patojenlerin öldürülmesi veya gelişmelerinin durdurulması olarak tanımlanır ve kemoterapi amacıyla kullanılan bileşikler kemoterapötik ajan olarak nitelendirilir. Selektif toksisite, memeli hücreleri ile patojen mikroorganizmanın yapısal ve biyokimyasal özelliklerinin birbirinden farklı olmasından kaynaklanır. Güvenli bir kemoterapötik ajanın selektif toksisitesi yüksektir (Leekha ve ark., 2011). Kemoterapötik ajanlar, etkili oldukları patojen türüne göre antibakteriyel, antiviral, antiparazitik, antiprotozoal ve antifungal olarak sınıflandırılır. Antibiyotikler, bakteri, aktinomiset ve mantar gibi mikroorganizmalar tarafından doğal yolla sentezlenir ve kemoterapide önemli bir yere sahiptir. Antimikrobiyaller ise doğal, yarı-sentetik veya sentetik yolla üretilir ve antibiyotiklere göre daha geniş bir kavramı temsil eder. Bu nedenle antimikrobiyal terapi alanında antibiyotik yerine antimikrobiyal tanımının kullanılması daha doğrudur (Presscott, 2013).

Antimikrobiyal terapi, bakteriyel enfeksiyonların bir antimikrobiyal bileşik kullanılarak tedavi edilmesidir. Antimikrobiyal terapinin amacı, enfeksiyona neden olan mikroorganizmaları elimine etmek için vücudun savunma sistemine yardımcı olmaktır. Bunu sağlamak için enfeksiyon bölgesinde eliminasyon için gereken süre boyunca terapötik ilacın etkin miktarlarına ulaşılması ve sürdürülmesi gerekir. Böylece patojenin çoğalması önlenir veya eliminasyon sağlanır (Lorian, 2005).

Antimikrobiyaller, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde birincil olarak kullanılmasının yanı sıra kemoterapi tedavisi uygulanan kanser hastalarında, diyabet, böbrek yetmezliği ya da romatoid artrit gibi kronik hastalığa sahip olan ve organ nakli, eklem replasmanları ya da kalp operasyonu gibi kompleks ameliyat geçiren hastalarda oluşabilecek enfeksiyonları başarıyla önler veya tedavi eder. Antimikrobiyallerin bu olumlu katkısı insan ömrünün uzamasına yardımcı olur (Presscott, 2013).

2.1.1. Antimikrobiyal Seçimini Etkileyen Faktörler

Doğru bir antimikrobiyal terapi, hekimin enfeksiyona neden olan mikroorganizmayı doğru tahmin etmesi ve enfeksiyon bölgesinde terapötik miktara ulaşabilecek uygun antimikrobiyal ilacı seçmesi ile mümkündür. Ayrıca enfeksiyon bölgesinde ilacın miktarını değiştirebilecek faktörler, ilaç toksisitesi ve bunu arttıran faktörler bilinmeli, tedavinin maliyeti, ilaçla ilgili yasal ve bilimsel düzenlemeler göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak yaşamı tehdit eden enfeksiyonlarda, patojen ve duyarlılık profilinin belirlenmesi beklenmeden enfeksiyonun ampirik olarak tedavi edilmesi gerekir. Bu durumda, β -laktam+ β -laktamaz inhibitörleri kombinasyonu, üçüncü kuşak sefalosporinler ve florokinolonlar gibi geniş spektrumlu bileşikler kullanılabilir. Böylece birçok farklı patojen türüne karşı antibakteriyel etkinlik sağlanır. Ancak geniş spektrumlu antimikrobiyal bileşiklerin kullanıldığı terapide, dar spektrumlu bileşiklere göre direnç gelişme olasılığı daha

yüksektir. Bu nedenle patojen ve duyarlılık profili belirlendikten sonra mümkün olduğu sürece antimikrobiyal terapiye penisilin ve basitrasın gibi dar spektrumlu bileşiklerle devam edilmelidir (Varley ve ark., 2009).

Yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonlarda, savunma sisteminin önemli ölçüde zayıfladığı durumlarda, hayati dokularda (sinir, kardiyovasküler ve kemik gibi) oluşan enfeksiyonlarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış hayvanlarda bakterisit etkili ilaçlar tercih etmelidir (Leekha ve ark., 2011). Bileşiklerin bakterisit etkinliğinin belirlenmesi için ilaç serum pik konsantrasyonu, MİK ve eğrinin altında kalan alan (EAKA) gibi FK/PD parametreler kullanılır. Buna göre antimikrobiyal bileşikler, konsantrasyona veya doza bağlı bakterisit etkili olarak sınıflandırılır. Aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi konsantrasyona bağlı etki gösteren bileşiklerin bakterisit etkinliği, ilacın serum pik konsantrasyonu/MİK ve EAKA/MİK oranına bağlıdır (Varley ve ark., 2009). Bu nedenle konsantrasyona bağlı etki gösteren bileşiklerin kullanıldığı tedavi süresince, enfeksiyon bölgesinde ilaç konsantrasyonunun en yüksek düzeyde ve MİK'in üzerinde olması ile EAKA/MİK düzeyinin basit enfeksiyonlarda > 25, ciddi ve immun sistemin baskılanmış olduğu enfeksiyonlarda ise > 100 olması hedeflenir (Fincancı, 2000 ve Jacobs, 2001). β -laktamlar ve eritromisin (ERY) gibi zamana bağlı bakterisit etki gösteren bileşiklerin kullanıldığı terapide ise ilaç serum konsantrasyonunun miktarı değil, MİK'in üzerinde olduğu süre önemlidir (zaman/MİK). Daha somut bir ifadeyle, etkin bir tedavi sağlamak için doza bağlı bakterisit etki gösteren bileşikler toksik etkiye neden olmayan en yüksek konsantrasyonlarda, zamana bağlı bakterisit etki gösteren bileşikler ise daha sık aralıklarla kullanılmalıdır (Varley ve ark., 2009). Konsantrasyona bağlı bakterisit etkili bileşikler, zamana bağlı etki gösterenlere göre daha uzun PAE süresine sahiptir (Burgess ve ark., 1999).

Tedavi süresi, enfeksiyonun antimikrobiyal ilaca karşı verdiği yanıtla göre değişir. Klinik bulgular ve laboratuvar verileri normale döndüğünde tedaviye son verilebilir (Varley ve ark., 2009). Herhangi bir yanıtın

alınmadığı durumda tanı ve tedavi gözden geçirilmelidir. Akut enfeksiyonlarda tedavi en az 5 gün sürdürülmelidir. Ciddi akut enfeksiyonlar ise tedavi süresi en az 7-10 gün olmalıdır. Kronik ve özellikle de hücre içi enfeksiyonlar için tedavi süresi daha uzundur ve bu süre birkaç aya kadar uzatılabilir. Komplike olmayan enfeksiyonlar tek doz antimikrobiyal uygulanarak tedavi edilebilir (Presscott, 2013).

2.1.2. Antimikrobiyal Terapinin Riskleri

Antimikrobiyal terapi sırasında, bireye ve/veya ilaca bağlı olarak istenmeyen etkiler oluşabilir. Bireye bağlı risk faktörleri; (1) renal ve hepatic yetmezlik, (2) yaş, (3) genetik varyasyon, (4) gebelik ve laktasyon, (5) alerji veya intolerans ile (6) mevcut uygulanan tedavi nedenleriyle ortaya çıkan istenmeyen etkiler ve (7) normal floranın bozulması olarak sıralanabilir. Antimikrobiyal ilaca bağlı risk faktörleri ise; (1) uygulanma yolu, (2) enfeksiyon bölgesindeki etkinlik, (3) farmakodinamik özellik ve (4) diğer ilaçlarla geçimsizliğe bağlı olarak meydana gelebilir (Leekha ve ark., 2011). Bununla birlikte antimikrobiyal terapi sırasında ve sonrasında oluşabilecek kalıntı problemi veya antimikrobiyal ilaca maruz kalma nedeniyle direnç gelişebilir ve tedavi başarısızlıkla sonuçlanabilir (Tello ve ark., 2012).

2.2. Antimikrobiyal Direnç

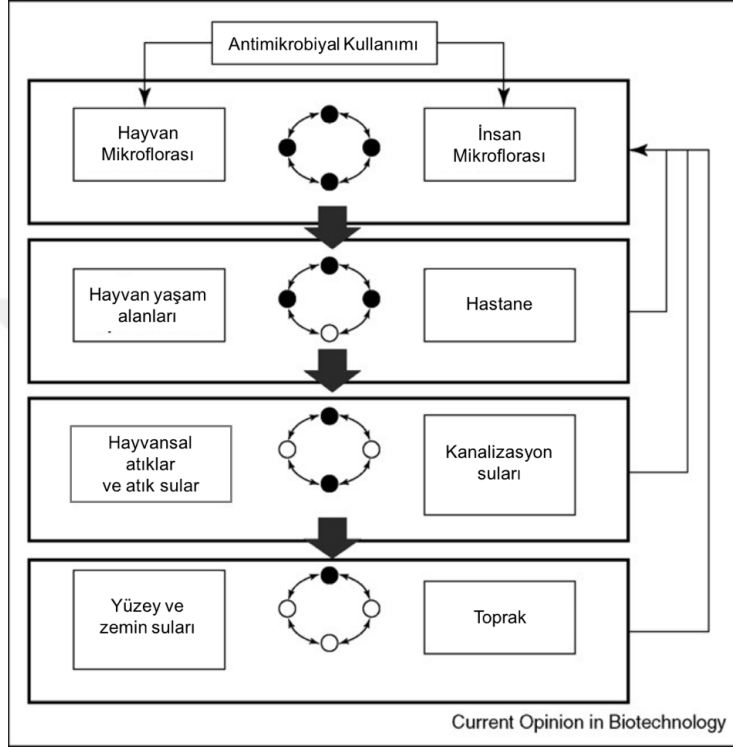
Antimikrobiyal direnç, bakterilerin antimikrobiyal bileşiklerin inhibe edici ya da öldürücü etkilerine karşı koyabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Tenover ve Hughes, 1996). Veteriner ve beşeri hekimlikte antimikrobiyallerin yaygın ve hatalı kullanımına bağlı olarak son yıllarda önemli derecede artan antimikrobiyal direnç, insan ve hayvan sağlığı bakımından önemli bir risk faktörüdür (Levy, 2001). Antimikrobiyal direnç, bulaşıcı enfeksiyöz hastalıklarında tedavi başarı oranının düşmesine, daha uzun süren hastalıklara, sakatlık ve ölüme neden olabilir. Dirençli bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonları tedavi etmek için antimikrobiyal ilaçların daha

yüksek konsantrasyonda kullanılması gerekebilir. Bu durum toksisite riskini arttırır (Jasovsky ve ark., 2016). Antimikrobiyal direncin klinik etkisi, bakteri türüne, direnç düzeyine, direnç mekanizmasına, enfeksiyon yerine ve toksik olmayan terapötik alternatiflerin bulunmasına göre değişir (Cosgrove ve Carmeli, 2003 ve Rice, 2009). Enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi için kullanılan antimikrobisyonların etkinliğinin azalması, organ transplantasyonu, kanser kemoterapisi, diyabetle mücadele ve büyük cerrahi operasyonlar (örneğin, sezaryen veya kalça replasmanı) gibi tıbbi müdahaleler çok yüksek bir risk oluşturur (Jasovsky ve ark., 2016).

Antimikrobiyal direnç, insan ve hayvan sağlığını tehdit etmesinin yanı sıra ekonomik kayıplara da neden olur. Antimikrobiyal direnç nedeniyle hastanede kalma süresi uzar, daha fazla yoğun bakım gereksinimi duyulur ve daha pahalı ilaçların kullanılmasına bağlı olarak sağlık hizmeti masrafları artar (Prestinaci ve ark., 2015). Bununla birlikte tedavisi güç olan enfeksiyonlar, besi hayvanlarında et ve süt, damızlık hayvanlarda yavru, yük hayvanları veya yarış atlarında güç veriminin azalmasına neden olur (Cosgrove ve Carmeli, 2003 ve WHO Fact Sheet, 2016).

İnsan ve hayvanlarda antimikrobisyonların tedavi amacıyla yaygın kullanımı ile hayvanlarda buna ilave olarak profilaktik ve büyümeyi teşvik edici olarak kullanılması antimikrobiyal direncin artmasına neden olur (Marshall ve ark, 2011). Direnç etmenlerinin hayvansal atıklarla çevreye yayılması, hayvan gübrelerinin tarımsal alanda ve kontamine suların sulama amacıyla kullanılması ile su ürünleri yetiştiriciliğinde bilinçsiz antimikrobiyal kullanımı, antimikrobiyal direncin yaygınlaşmasına neden olabilir (Karcı ve Balcıoğlu, 2010). Diğer taraftan beşeri sağlık kuruluşları ve hayvan hastanelerinin, MDR suşları da dahil olmak üzere antimikrobiyal dirençli bakterileri en sık barındıran yerler olduğu belirtilmiştir (Marshall ve ark., 2011). Antimikrobiyal direncin gelişmesi ve yaygınlaşması bakımından yüksek biyolojik ilişki ve bakteriyel tür çeşitliliği nedeniyle genetik değişimlerin sık meydana geldiği genetik reaktörler önemlidir (Fletcher, 2015). Genetik

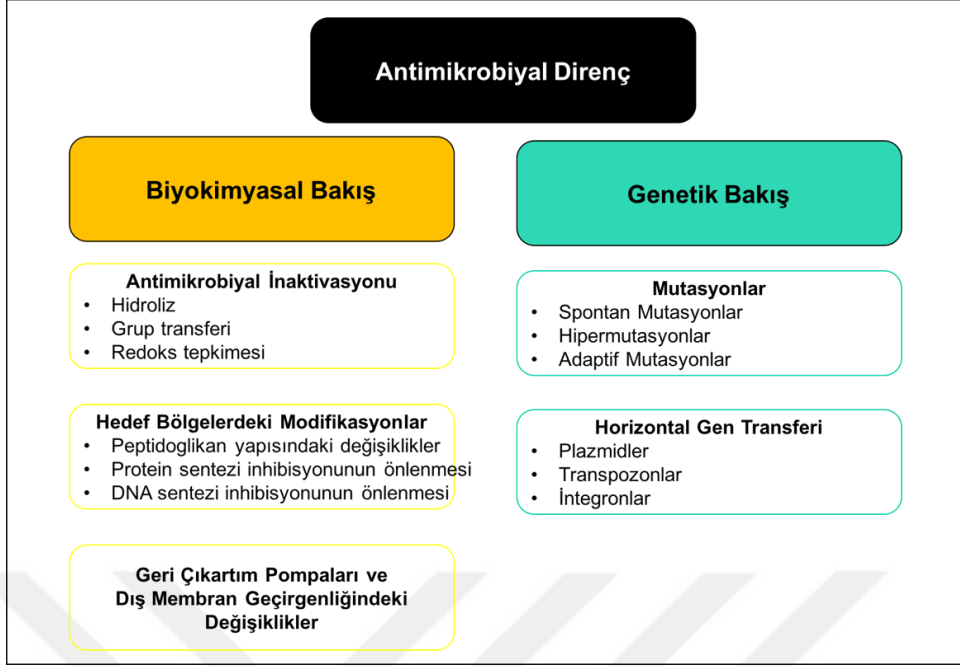
reaktörler, (I) insan ve hayvan floraları, (II) hastane ve hayvan yaşam alanları, (III) insan ve hayvan fekal depo alanları ile (IV) çevredeki organizmalarla etkileşebilen ve diğer reaktörlerden gelen bakterileri içeren toprak, yüzey ve zemin suları olarak sınıflandırılabilir (şekil 1) (Baquero ve ark., 2008).



Şekil 1. Antimikrobiyal dirence neden olan genetik reaktörler. Siyah daire: insan ve hayvan kaynaklı bakteriler; beyaz daire: çevresel kaynaklı bakteriler (Baquero ve ark., 2008).

2.2.1. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

Bakteriler, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla antimikrobiyal bileşiklere karşı direnç gösterebilir. Antimikrobiyal dirençle mücadele için dirence neden olan bu mekanizmaların belirlenmesi önemli ve gereklidir (Dzidic ve ark., 2008). Direnç mekanizmaları, biyokimyasal ve genetik açıdan iki farklı şekilde değerlendirilebilir (şekil 2) (Tenover ve ark., 2006).



Şekil 2. Antimikrobiyal direnç mekanizmaları (Dzidic ve ark., 2008).

2.2.1.1. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları: Biyokimyasal Yaklaşım

Antimikrobiyal dirençten sorumlu biyokimyasal mekanizmalar; (1) antimikrobiyallerin inaktivasyonu, (2) hedef bölgelerdeki değişiklikler ve (3) geri çıkartım pompalarının aktivasyonu ile dış membran geçirgenliğindeki değişiklikler olarak sıralanır. Bu mekanizmaların her biri bakteri türüne göre çeşitlilik gösterir ve bir bakteri birden fazla direnç mekanizmasına sahip olabilir. Bu mekanizmalardan hangisinin klinik direnç açısından üstün olduğu antimikrobiyal bileşiğin yapısına, hedef bölgeye, bakteri türüne ve kromozomal ya da plazmid aracılı olmasına bağlıdır (Shaikh ve ark, 2015).

2.2.1.1.2. Antimikrobiyallerin İnaktivasyonu

Bakteriler tarafından üretilen enzimler, antimikrobiyal bileşiklerin kimyasal yapılarında hidrolize neden olarak etkinliklerini engelleyebilir (Shaikh ve ark, 2015). Antimikrobiyallerin inaktivasyonuna neden olan ve bakteriler tarafından en yaygın olarak üretilen enzimler, β -laktamaz enzimleridir. Bakteriler arasında 400'den fazla geniş spektrumlu β -laktamaz (Extended Spectrum β -laktamase: ESBL) türü tanımlanmıştır (Sharma ve ark.,

2017). Bu enzimler en sık *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ve *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*)'te bulunur ve PEN ile sefalosporinlerin yapılarındaki β -laktam halkasını parçalayarak bu bileşiklere karşı dirence neden olur. ESBL'lerin yanı sıra esterazlar ve epoksidazlar sırasıyla makrolid ve fosfomisin direncinden sorumludur (Dzidic ve ark., 2008). Buna ek olarak transferaz enzimleri, aminoglikozid, kloramfenikol (CHL), streptogramin, makrolid ve rifampisin (RIF) gibi bileşiklere adenilil, fosforil veya asetil gruplarının eklenmesine neden olarak, bu bileşikleri etkisiz hale getirir (Shaikh ve ark., 2015).

2.2.1.1.3. Hedef Bölgelerdeki Değişiklikler

Bakteriler tarafından üretilen enzimlerin yanı sıra antimikrobiyal hedef bölgelerindeki değişiklikler, bileşiklerin etkisiz kalmasına neden olur. Örneğin, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler), β -laktam grubu bileşikler için hedef bölgedir ve PBP'lerdeki mutasyonlar, β -laktamlara karşı affiniteyi azaltır (Kong ve ark., 2010). Ayrıca vankomisin (VAN) gibi glikopeptidler, Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan prekürsörlerine bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe eder ve peptidoglikan tabakasında değişiklikler ve böylece VAN direnci ile şekillenir (Malanovic ve Lohner, 2016). Diğer yandan hedef bölgedeki değişiklikler, aminoglikozidler, tetrasiklinler, makrolidler, CHL, fusidik asit, mupirosin, streptograminler ile oksazolidinonlar gibi protein sentezini ve rifamisinler gibi ribonükleik asit (RNA) transkripsiyonunu inhibe eden bileşiklere karşı dirençten sorumludur. Makrolid, linkozamid ve streptogramin B grubundan bileşiklere karşı direnç, 50S'lik ribozomal alt biriminin 23S'lik ribosomal RNA (rRNA) bileşenindeki post-transkripsiyonel mutasyonlardan kaynaklanır (Munita ve Arias, 2016). DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerindeki mutasyonlar ise florokinolonların bağlanmasını önleyerek dirence neden olur (Hooper, 1999).

2.2.1.1.4. Dış Membran Geçirgenliğindeki Değişiklikler ve Geri Çıkartım Pompaları

Dış membran geçirgenliğindeki azalmaya bağlı olarak hücre içine alınan antimikrobiyal miktarı azalır. Hücre içine alınan ilaç miktarının azalması ve hücre dışına atılan ilaç miktarının artması, klinik açıdan önemli olan birçok bakteride düşük düzeyli dirence neden olur (Piddock ve ark., 2006).

Gram negatif bakteriler, fosfolipid ve lipopolisakkaritler (LPS)'den oluşan bir dış membrana sahiptir. Antimikrobiyal bileşiklerin dış membrana penetrasyonu porinler aracılığıyla difüzyon yoluyla veya kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla olabilir ve bileşiğin kimyasal yapısına göre değişir. β -laktamlar, CHL ve florokinolonlar porinler aracılığıyla, aminoglikozidler ise kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla hücre içine girer. Bu nedenle porinlerin ekspresyon düzeyi, büyüklüğü veya seçiciliğindeki değişiklikler, bu bileşiklerin hücre içine alınmasını etkiler (Nikaido ve Zgurskaya, 2001).

Geri çıkartım pompaları, antimikrobisideri hücre dışına çıkaran ve hücre içi konsantrasyonlarının düşük seviyelerde tutulmasını sağlayan membran proteinleridir. Protein ve deoksiribonükleik asit (DNA) sentezi inhibisyonu yapan bileşiklerin etki göstermesi için hücre içine alınması gerekir. Buna göre geri çıkartım pompaları, başta makrolidler, tetrasiklinler ve florokinolonlar olmak üzere birçok antimikrobiyal ilaç grubunu etkiler. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde birçok geri çıkartım pompası tanımlanmıştır. Geri çıkartım pompalarının özgünlükleri ve mekanizmaları birbirinden farklıdır. Bazıları antimikrobiyal bileşiğe spesifik olmasına rağmen; birçok geri çıkartım sistemi, yapısal olarak ilgisiz antimikrobiyal grupları substrat olarak tanıyabilir ve buna bağlı olarak MDR gelişimine katkı sağlayabilir (Piddock ve ark., 2006). Geri çıkartım pompası aktivasyonundan sorumlu regülatör birimlerdeki mutasyonlar, birçok bakteri türünde intrinsik dirence neden olur. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)'da MexAB-OprM geri çıkartım pompasının regülasyonundan sorumlu *mexR*'deki

mutasyonlar, geri çıkartım pompasının aktivasyonuna neden olur ve β -laktamlar gibi antimikrobiyal bileşiklere karşı direnci artırır (Venter ve ark., 2015).

Geri çıkartım sistemleri (1) major fasilitatör süper familyası (MFS), (2) adenosin trifosfat bağlayıcı kaset (ATP Binding Cassette: ABC) süper familyası, (3) küçük çoklu ilaç direnci (Small Multidrug Resistance: SMR) familyası, (4) direnç-nodülasyon bölümü (Resistance Nodulation Division: RND) süper familyası ile (5) çoklu antibiyotik ve toksin ekstrüzyon (Multiple Antibiotic Toxin Extrusion: MATE) familyası olmak üzere 5 ana grupta incelenir. Geri çıkartım pompaları, tek bileşenli ya da üç bileşenli olabilir. Tek bileşenli pompalarda substratlar sitoplazmik membran aracılığıyla hücre dışına çıkarılır. Gram negatif bakterilerde bulunan çok bileşenli pompalarda periplazmik membran füzyon proteini (MFP), dış membran proteini (Outer Membrane Protein: OMP) ve pompa substratları birlikte çalışır (Pidcock ve ark., 2006).

2.2.1.2. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları: Genetik Yaklaşım

Direnç, intrinsik olarak bakterilerin yapısında olabildiği gibi sonradan edinilebilir. Edinilmiş direnç, (1) kromozomlardaki mutasyonlar ve/veya (2) horizontal gen aktarımı yoluyla meydana gelebilir (Martinez ve Baquero, 2000).

2.2.1.2.1. Mutasyonlar

Antimikrobiyal dirence neden olan mutasyonlar, spontan mutasyonlar, hiper mutasyonlar ve adaptif mutasyonlar olarak sınıflandırılır. Herhangi bir antimikrobiyalin seçici baskısı altında kalmamasına rağmen, rastgele gerçekleşen replikasyon hatalarından veya aktif olarak bölünen hücrelerde hasar görmüş DNA'nın hatalı onarımından kaynaklanan mutasyonlar spontan mutasyonlar, bakteri popülasyonunun uzun süre antimikrobiyalin letal olmayan

seçici baskısı altında kalması sonucu ortaya çıkan mutasyonlar ise hipermutasyonlar olarak adlandırılır. Yalnızca antimikrobiallerin letal olmayan seçici baskısının altında ve aktif olarak bölünen bakterilerin yanı sıra yavaş yavaş bölünen hücrelerde meydana gelen mutasyonlar ise adaptif mutasyonlar olarak nitelendirilir (Dzidic ve ark., 2008).

2.2.1.2.2. Horizontal Gen Transferi

Antimikrobiyal direncin yayılmasından birincil olarak horizontal gen transferi sorumludur. Direnç genleri konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyon aracılığıyla bakteriler arasında aktarılabildiği gibi rekombinasyon yoluyla alıcı kromozomuna eklenebilir (Bennett, 2008). Gram negatif anaeroblar ve Gram pozitif bakterilerden enterik bakterilerin direnç (R)-plazmidleri üzerindeki konjugatif transpozonlar, genetik aktarımın önemli araçlarından biridir. Örneğin, *Bacterioides*'in klinik izolatlarında tetrasiklin (TET) direncinden birincil olarak konjugatif transpozonlar sorumludur. Enterokoklarda ise gentamisin (GEN) ve diğer aminoglikozidlere karşı (streptomisin hariç) yüksek düzeyli direnç, direnç genlerini taşıyan plazmidlerle ilişkilidir (Dzidic ve ark., 2008).

Direnç genlerinin birarada bulunabilmesi ve alıcı mikroorganizmaya birden fazla genin horizontal gen transferi ile aktarılması, MDR'in yaygınlaşmasına neden olur. Bu tip aktarım, integron olarak adlandırılan spesifik DNA yapıları aracılığıyla gerçekleşir. İntegronlar, özellikle antimikrobiyal direnci kodlayan genleri yakalama kabiliyetine sahip genetik elemanlardır ve kromozomlar veya plazmidlerin üzerinde bulunabilir (Bennett, 2008).

Gen kasetleri, direnç faktörlerini taşıyabilen en küçük mobil genetik elemanlardır ve trimethoprim (TMP), CHL, β -laktamlar, aminoglikozidler, fosfomisin (FOF) ve florokinolonlar da dahil olmak üzere pek çok bileşiğe karşı dirence neden olabilir (Dzidic ve ark., 2008).

2.3. Florokinolon Direnci

Florokinolonlar geniş etki spektrumuna sahip, insan ve hayvanlarda çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan en önemli antimikrobiklerdir. Florokinolonlara karşı dirençli bakterilerin ortaya çıkması, bakteriyel enfeksiyonların klinik tedavisinde önemli bir sorundur. Bu nedenle, florokinolonlara karşı dirençli bakterilerin gözlemlenmesi ve florokinolon direncine neden olan faktörlerin belirlenmesi bulaşıcı hastalıkların kontrolü için önemli bilgiler sağlar (Sato ve ark., 2014).

Florokinolon direnci, kromozomal ve plazmid aracılı florokinolon direnci olarak ikiye ayrılır.

2.3.1. Kromozomal Florokinolon Direnci

2.3.1.1. Florokinolonların Hedef Enzimlerindeki Değişiklikler

Florokinolonların bakteri DNA'sındaki hedef bölgesi, topoizomerez II enzimlerinden DNA giraz ve topoizomerez IV'tür ve bu bölgede meydana gelen mutasyonlar direncin oluşmasından sorumludur. DNA girazın alt birimleri *gyrA* ve *gyrB*, topoizomerez IV enziminin alt birimleri ise *parC* ve *parE*'dir. *gyrA* ile *parC* ve *gyrB* ile *parE* birbirinin homoloğudur. DNA Topoizomerez II enzimlerinin inhibisyonuyla florokinolonlar, DNA çift zincirinde kırılmalara neden olarak ve kırılmaların yeniden kapanmasını engelleyerek bakterinin etki gösterir (Breines ve ark., 1997).

DNA giraz ve topoizomerez IV'teki tek bir aminoasit değişikliği florokinolon direncine neden olabilir. Florokinolon direncine aracılık eden mutasyonların büyük çoğunluğu kinolon direncini belirleyici bölge (Quinolone Resistance Determining Region: QRDR) olarak tanımlanan *gyrA* ve *gyrB* genlerinde meydana gelir. Mutasyon sonucu florokinolonların bağlandığı aktif

bölgelerin yapısı değişir ve buna bağlı olarak direnç gelişir. *E. coli*'de *gyrA* genindeki mutasyon en yaygın olarak 83. ve 87. kodonlardaki Ser-83 ve Asp-87 aminoasitlerinde meydana gelir (Hooper, 1999). *E. coli*'de *gyrA*'daki Ser mutasyonları, giraz enziminin katalitik etkinliği üzerinde çok az etkili olmasına rağmen, bitişiğindeki Asp-87 aminoasitindeki mutasyonlar katalitik etkinliği genellikle 5-10 kat daha fazla düşürür (Drlica ve ark., 2009).

gyrB ve *parE*'de spesifik alanlardaki mutasyonlar, *gyrA* ve *parC*'deki mutasyonlara göre daha az yaygın olmasına rağmen, florokinolon direncine neden olabilir. Örneğin *gyrB*'deki mutasyonları enoksasinin enzim-DNA komplekslerine bağlanmasında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Özellikle *E. coli*'de *gyrB*'deki (Asp-426→Asn) ve diğer türlerde *parE*'deki mutasyonlar florokinolon direncinden sorumlu olabilir (Breines ve ark., 1997).

Florokinolon direnç düzeyi, bakteri türü ve antimikrobiyal bileşiğe göre değişir. Florokinolon grubu bileşiğin DNA giraz ve topoizomeraz IV'e karşı duyarlılığı, mutasyon fenotipini belirler (Munita ve Arias, 2016). Bununla birlikte Gram negatif bakterilerde florokinolonlar için DNA giraz birincil, topoizomeraz IV ise ikincil hedeftir. Gram pozitif bakterilerde ise tersi durum söz konusudur. Gatifloksasin (GAT), moksifloksasin (MOX) ve trovafloksasin (TVA) gibi yeni kuşak florokinolonlar, her iki enzimi de hedef alır, bu nedenle bu bileşiklere karşı direnç gelişimi için her iki enzimde de mutasyon olması gerekir. Tek bir hedef enzimde meydana gelen mutasyonlar, direncin 8-16 kat artması ile sonuçlanır. Her iki enzimdeki sıralı mutasyonlar, artan düzeyde florokinolon direncine neden olur. Birçok bakteri türünde, yüksek düzeyli florokinolon direnci hem DNA giraz hem de topoizomeraz IV'teki mutasyonlar ile ilişkilidir (Saravolatz ve Leggett, 2003).

2.3.1.2. Hücre İçine Alınan Florokinolon Miktarının Azalması

DNA giraz ve topoizomeraz IV, sitoplazmik enzimler olduğundan, florokinolonların hedeflerine ulaşması için bakteriyel zarfı geçmeleri gerekir. Ancak mutasyonlar sitoplazmik ilaç konsantrasyonunda azalmaya neden olabilir. Bu azalmanın nedeni, florokinolonların hücre dışına aktif transportla çıkartılması ve/veya hücre içine alınan ilaç miktarının sınırlandırılmasıdır. Gram pozitif bakterilerde aktif geri çıkartım taşıyıcıları, sitoplazmik ilaç konsantrasyonunun azalmasından sorumludur. Gram negatif bakterilerde ise florokinolon direnci, florokinolonların periplazmik boşluğa girmek için kullandığı dış membran porin kanallarındaki azalma ve geri çıkartım pompası veya porin genlerinin transkripsiyonunu kontrol eden düzenleyici proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (Piddock ve ark., 2006).

2.3.2. Plazmid Aracılı Florokinolon Direnci (Plazmid Mediated Quinolone Resistance: PMQR)

PMQR, çoklu ilaç direncine neden olan plazmidin porin eksikliği olan *K. pneumoniae* suşuna aktarılması sırasında keşfedilmiştir. Plazmidin varlığında siprofloksasin (CIP) direncinin 8 kat arttığı belirlenmiş ve duyarlılık değişiminden sorumlu direnç geni *qnrA* olarak adlandırılmıştır (Hooper ve Jacoby, 2015). *qnrA* geni taşıyan plazmid ile yapılan araştırmalarda CIP direncinin beklenen seviyenin üzerinde olması, aminoglikozid asetiltransferaz (AAC(6')-Ib-cr) olarak adlandırılan ikinci bir plazmid aracılı mekanizma CIP direnci ile ilişkilendirilmiştir. PMQR'dan sorumlu diğer bir mekanizma ise, QepA ve OqxAB olarak adlandırılan plazmid aracılı florokinolon geri çıkartım pompalarıdır. PMQR genleri, florokinolonlara karşı düşük düzeyli dirençten sorumlu olmasına rağmen daha yüksek düzeyli florokinolon direncine neden olan mutantların seçimini kolaylaştırır (Yamane ve ark., 2008).

2.3.2.1. Qnr Genleri

qnrA, 218 aminoasitlik proteinin kodlanmasından sorumlu olan bir genidir. *qnrA* geninden sonra plazmid aracılı *qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* ve en son olarak da *qnrVC* keşfedilmiştir. Genellikle diğer *qnr* genleri *qnrA*'dan ve birbirlerinden %35 veya daha fazla farklılık gösterir. *qnrC* için 1, *qnrD* için 2, *qnrA* ve *qnrVC* için 7, *qnrS* için 9 ve *qnrB* için ise 78 varyant tespit edilmiştir. *qnr* genleri özellikle *E. coli* gibi Enterobacteriaceae türleri ile *Enterobacter*, *Klebsiella* ve *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *A. baumannii* ve *S. maltophilia*'da belirlenmiştir. Bu bakteri türlerinde en yaygın olarak *qnrB*, en az sıklıkta ise *qnrC* geni tespit edilmiştir. Çin'deki bir hastanede *E. cloacae* izolatlarında belirlenen % 39'luk *qnr* prevalansı hariç, *qnr* geni görülme sıklığı % 10'dan daha azdır. Hayvanlarda yapılan prevalans çalışmalarında kuşlar, kediler, sığırlar, tavuklar, köpekler, ördekler, balıklar, kazlar, atlar, domuzlar, sürüngenler, koyunlar, hindiler ve hayvanat bahçesi hayvanları da dahil olmak üzere çok çeşitli yabani ve evcil hayvanlarda PMQR genleri tespit edilmiştir (Cengiz ve ark., 2012; Hooper ve Jacoby, 2015).

PMQR genleri yapıcı birbirinden farklı plazmidler üzerinde bulunabilir. *qnrA* geni çoğunlukla ISCR1 ve IS26 gibi mobil veya transpoze edilebilir bir genetik eleman ile ilişkilendirilirken, *qnrD* ile *qnrS2* mobil gen kasetleri içinde, *qnrB* allelleri ise sıklıkla faj şoku proteini (*psp*) ve peptid ABC taşıyıcısı ile ATP bağlayıcı protein (*sap*) genlerinin operonlarıyla bağlantılı olan plazmidler üzerinde yer alır. Bu genler DNA giraz enzimini florokinolonların inhibisyonundan korur (Bennett, 2008).

Çevresel koşullar, *qnr* genlerinin ekspresyonunu ve doğal fonksiyonlarını etkiler. Düşük sıcaklıkta gelişmeye adapte olmuş bir organizma olan *S. algae*'de DNA hasarı, oksidatif veya ozmotik stress ve açlık veya ısı şoku gibi koşullar sabit tutularak soğuk şoku uygulandığında *qnrA* geninin ekspresyonunun 8 kat arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte klasik SOS sistemi aracılığıyla CIP veya mitomisin C gibi DNA hasarı yapan bileşiklere maruz

bırakıldığında *qnrB* allellerinin ekspresyonunda 9 kat artış belirlenmiştir. *V. splendidus*'ta CIP stimülasyonu sonucu plazmid aracılı *qnrS1* veya kromozomal *qnrVS1* ekspresyonunda 30 kat artış tespit edilmiştir (Hooper ve Jacoby, 2015).

2.3.2.2. *aac(6')-Ib-cr*

aac(6')-Ib-cr amikasin (AMK), kanamisin (KAN) ve tobramisin (TOB) gibi aminoglikozidlerin yanı sıra CIP ve norfloksasin (NOR) gibi piperazinil halkasında bir amino azotu bulunan florokinolonları asetilleyeabilen asetiltransferazın varyantıdır. Diğer *aac(6')-Ib* enzimleriyle karşılaştırıldığında, *-cr* varyantının Trp-102→Arg ve Asp-179→Tyr olmak üzere iki amino asit alt ünitesi vardır ve bu aminoasitler florokinolon asetilasyon aktivitesinden sorumludur. Asp-179→Tyr aminoasiti, florokinolon halkası ile etkileşime girerek florokinolon bağlanmasını kolaylaştırmak için önemlidir. Trp-102→Arg'nın rolü, en uygun etkileşim için Tyr kısmını konumlandırmak veya florokinolonların keto ile karboksil gruplarına hidrojen bağıyla bağlanmasını sağlayarak yerine sabitlemektir (Fabrega ve ark., 2009).

aac(6')-Ib-cr geni genellikle diğer PMQR genlerini de bulundurabilen çoklu dirençli plazmiddeki integronun bir parçası olan gen kaseti içerisinde yer alır. Yaygın olarak özellikle ESBL CTX-M-15 ve mobil genetik etmenlerden olan IS26 ile birlikte bulunan *aac(6')-Ib-cr* geni, kromozomlar üzerinde de bulunabilir. Özellikle *E. coli*'de yaygın olarak tespit edilen *aac(6')-Ib-cr* geni, birçok Enterobacteriaceae türünde ve *P. aeruginosa*'da da gözlenir (Hooper ve Jacoby, 2015).

2.3.2.3. *QepA* ve *OqxAB*

QepA, özellikle CIP ve NOR gibi hidrofilik florokinolonların duyarlılığında azalmaya neden olan MFS ailesine ait plazmid aracılı bir geri çıkartım pompasıdır. *qepA* geni ekspresyon seviyesindeki değişkenlikler, florokinolon direnci ile sonuçlanabilir (Li ve Nikaido, 2009).

OqxAB, domuzlarda büyüme gelişimi için kullanılan olaquindoks (OLA) direncinden sorumlu olan ve aktarılabilir plazmidlerde yerleşik RND familyasına ait bir geri çıkartım pompasıdır. CHL ve TMP ile CIP, NOR ve nalidiksik asit (NAL) gibi bazı florokinolonları içeren geniş bir substrat özgüllüğü vardır. *oqxAB*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de plazmidlerde ve *S. enteritis*'te ise hem kromozom hem de plazmidlerde tespit edilmiştir. *oqxAB*'nin CTX-M-14 genleri ve diğer plazmid aracılı CTX-M allelleri ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. *K. pneumoniae*'de *rara* geninin yakındaki ekspresyon artışı OqxAB ekspresyonunda artışa, *oqxR* genindeki ekspresyon artışı ise OqxAB üretiminin azalmasına neden olur (Hooper ve Jacoby, 2015).

2.4. MDR

Patojen bir mikroorganizmanın, kimyasal yapı ve etki mekanizması açısından birbirinden farklı birçok antimikrobiyale karşı direnç geliştirmesi MDR olarak tanımlanır. Ancak MDR tanımı, yaygın ilaç direnci (Extensively-Drug Resistance: XDR) ve tüm antimikrobiallere karşı direnç (Pan-Drug Resistance: PDR) terimlerini de kapsayan genel bir kavramdır ve bu farklı tanımlamalar yanlış değerlendirmelere yol açabilir. Bu nedenle olası karışıklıkları önlemek için Avrupa Hastalık kontrol ve Koruma Merkezi (European Center for Disease Control and Prevention: ECDC) ve Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention: CDC)'nin ortak çalışmaları ile uluslararası terminoloji oluşturulmuştur. Bu terminolojiye göre MDR, üç veya daha fazla antimikrobiyal grubundan en az bir bileşiğe karşı dirençli olma durumunu tanımlar. Ancak MDR olan bir bakteri, diğer bileşiklere karşı duyarlı olabilir. Örneğin, seftriakson (CRO), CIP ve trimetoprim-sülfametoksazole (TMP-SMX) karşı dirençli olan bir izolat, diğer antimikrobiallere karşı duyarlı olabilir. XDR ise birden fazla antimikrobiyal bileşiğe karşı dirençli olma ve en fazla 2 antimikrobiyal ilaç grubuna karşı duyarlı olma durumudur ve MDR'a göre klinik olarak daha anlamlıdır. Örneğin, kolistin (CST) ve tigesiklin (TGC) dışındaki tüm antimikrobiyal gruplara karşı dirençli olan bir izolat XDR olarak

nitelendirilir. Antimikrobiyallerin tümüne karşı dirençli olma durumu ise PDR olarak tanımlanır (Magiorakos ve ark., 2012 ve Viehman ve ark., 2014).

MDR, halk sağlığını tehdit eden global bir problemdir. MDR bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlardan kaynaklanan ölüm oranları ve bu enfeksiyonların tedavi masrafları, duyarlı enfeksiyonlara göre ortalama iki kat fazladır. MDR nedeniyle her yıl ortalama yirmibeş bin insan hayatını kaybetmekte ve tedavi amacıyla 35 trilyon harcanmaktadır. 2050 yılında ölüm oranlarının 10 milyona, tedavi masraflarının ise 66 trilyona ulaşacağı öngörülmektedir (WHO, 2014).

Antimikrobiyal bileşiklerin hedef bölgelerindeki mutasyonlar ve plazmid aracılı direnç etmenleri MDR'a neden olabilir. Ancak MDR, birincil olarak geri çıkartım pompası aktivasyonundan kaynaklanır. Geri çıkartım pompaları bakteri türlerine göre çok farklılık gösterir (Zgurskaya ve Nikaido, 2000).

Gram pozitif bakterilerde, aktif geri çıkartım mekanizmasına bağlı olarak gelişen MDR, en yaygın olarak *S. aureus*'ta incelenmiştir. Geri çıkartım pompalarından NorA, NorB ve NorC'deki ekspresyon artışları, florokinolon, biyosid boyalar ve etidiyum bromidin duyarlılığında azalmaya neden olur. Bu geri çıkartım pompaları, sitoplazmik membranın ikincil taşıyıcı gruplarından MFS familyasına aittir. NorA'daki ekspresyon artışı, NOR ve CIP gibi hidrofilik florokinolonlara karşı dirençten sorumluyken, NorB ve NorC'deki ekspresyon artışları ise, sparfloksasin (SPX) gibi hidrofilik ve MOX gibi hidrofobik florokinolonlara karşı dirence neden olur (Aeschlimann ve ark., 1999). Bu taşıyıcıların ekspresyonunun düzenlenmesi, birkaç düzenleyici proteinin etkileşimi ile olur. *norA* ekspresyonunun pozitif bir düzenleyicisi ve *norB* ile *norC* ekspresyonunun ise negatif bir düzenleyicisi olan MgrA detaylı şekilde incelenmiştir (Costa ve ark., 2013). PknB kinaz etkinliği ile gerçekleşen MgrA'nın post-translasyonel fosforilasyonu, MgA dimerlerinin *norA* promotörlerine bağlanmasını engellerken, *norB* promotörlerine

bağlanmalarında artışa neden olur. Asidik koşullar, fosforile ve fosforile edilmemiş MgrA oranlarını değiştirir. Bununla birlikte oksidatif durumun ve havalandırma koşullarının dimerizasyonu ve promotöre bağlanmayı etkilemesi, NorA, NorB ve NorC'nin ekspresyonunun çevresel koşullardan etkilendiğini gösterir. Buna göre Gram pozitif bakterilerde florokinolon *in vitro* duyarlılık test sonuçları ile klinik çalışmalar arasında farklılık olabilir. Gram pozitif bakterilerde MDR'dan sorumlu olan başka taşıyıcı sistemler de bulunur. *S. aureus*'taki MdeA (virjinyamisin, novobiyosin), SdrM (akriflavin, NOR), QacB(III) (NOR, CIP) ve LmrS (GAT, TMP, CHL) gibi MFS taşıyıcılarındaki ekspresyon artışının florokinolonlara karşı duyarlılığı azalttığı gösterilmiştir (Hooper ve Jacoby, 2015).

Gram negatif bakterilerde çoğunlukla RND süper familyasına ait geri çıkartım pompaları ekspresyonlarındaki artış MDR'a neden olur. RND pompalarının sitoplazmik membran içerisinde lokalize olan bir pompa proteini, bir dış membran kanalı proteini ve pompa ile OMP'yi birbirine bağlayan bir MFP olmak üzere üç yapısal bileşeni vardır. Bu yapı, hem iç hem de dış membran boyunca substratların hücre dışına atılmasını sağlar (Sun ve ark., 2014). *E. coli*'de en yaygın olarak AcrAB-TolC geri çıkartım pompası kompleksi incelenmiştir. AcrAB-TolC geri çıkartım pompası kompleksinde ilaçlar iç ve dış membran arasında kalan periplazmik boşluğa ulaşır. AcrB'nin periplazmik alanının orta boşluğu, CIP ve diğer substratlar için bağlama alanı olarak tanımlanmıştır ve geri çıkartım pompasının MDR karakterini belirler. Zwitterionik özellikte olan florokinolonlar, dış membranı OmpF ve OmpC gibi porin difüzyon kanalları yoluyla geçer ve bu kanalların ekspresyonunun azalması ya da yapısal genlerdeki mutasyon dirence katkıda bulunabilir. Özellikle, MarR regülatöründeki mutasyonlar, *acrB* ekspresyonunda artışa, *ompF* ekspresyonunda ise azalmaya neden olur. Böylece, porin kanalları aracılığıyla aminoglikozid, florokinolon ve TMP gibi bileşiklerin hücre içine girişi azalır ve geri çıkartımı artar. Bununla birlikte *E. coli*'de MarA regülatörüne ek olarak, SoxRS ve Rob regülatörlerindeki mutasyonlar, AcrAB-TolC geri çıkartım pompasını etkileyerek ve OmpF ekspresyonunda azalmaya

neden olarak florokinolon ve diğer antimikrobiyal bileşiklere karşı dirence neden olur. Safra tuzlarına karşı oluşan dirençten de aynı mekanizma sorumludur (Piddock ve ark., 2006).

P. aeruginosa'da OprF porin kanalı, *E. coli*'de OmpF'den daha düşük geçirgenliğe sahiptir. Bu durum florokinolon ve diğer antimikrobiyal bileşiklere karşı intrinsik dirençle ilişkilidir. Buna ek olarak, AcrAB-TolC'ye benzer bir RND pompası olan MexAB-OprM geri çıkartım pompası, OprF'nin düşük geçirgenliği ile uyumlu olarak, florokinolonlara karşı intrinsik dirence neden olan etkenlerdendir (Sun ve ark., 2014). *mexA* ve *oprM* genlerindeki mutasyonlar, norfloksasinin hücre içine girmesini ve florokinolonlara karşı duyarlılığı arttırır. MexR negatif regülatöründeki mutasyonlara bağlı olarak şekillenen MexAB-OprM'deki ekspresyon artışı CIP ve NAL'a karşı direncin artmasına neden olur. *P. aeruginosa*'da MexAB-OprM geri çıkartım pompasının yanı sıra MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM geri çıkartım pompa sistemleri de MDR'dan sorumludur (Hooper, 2001). Bunların yanı sıra Gram negatif bakterilerde MDR'a neden olan daha az kapsamlı olarak incelenmiş birçok geri çıkartım pompası bulunmaktadır. *E. coli*'de, RND pompaları gibi üçlü yapıda işlev gören bir MFS pompası olan EmrAB-TolC, negatif olarak EmrR tarafından düzenlenir ve sadece NAL'a karşı dirence neden olur. *K. pneumoniae*'de birçok suşun kromozomlarında OqxAB-TolC RND pompası bulunur. *Salmonella* spp. ve *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) AcrAB homologlarına sahiptir ve bunlardaki ekspresyon artışı MDR ile ilişkilidir. *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*)'de CmeABC RND pompasının, antimikrobiyal bileşiklere, ağır metallere ve boyalara karşı direnç gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (Lin ve ark., 2002). *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*)'ta MATE familyasından olan NorM florokinolon direncine neden olabilir. *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*)'te NorA pompasının ve *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. thetaiotaomicron*)'de BexA pompasının bileşiklerin geri çıkartımından sorumlu olduğu gösterilmiştir. *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*)'de AdeIJK RND pompası, florokinolonlarla birlikte birçok antimikrobiyale karşı dirence neden olur.

Ayrıca iki komponentli bir sensör-regülatör sistemi olan AdeRS ve LysR familyasının regülatörü olan AdeL'deki mutasyonlar sırasıyla AdeABC ve AdeFGH RND pompalarında ekspresyon artışına neden olur ve geniş bir direnç profili gösterir. *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*)'da, SmeDEF RND pompasındaki ekspresyon artışının florokinolon ve ko-trimoksazol direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Hooper ve Jacoby, 2015).

2.5. Antimikrobiyal Direnci Önleme Stratejileri

Tüm dünyada antimikrobiyal dirençli bakterilerin giderek artan hızla yaygınlaşması, mevcut bileşiklerle yapılan monoterapilerin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olur (Cassir ve ark., 2014). Tıbbi, sosyal ve ekonomik açıdan koordineli çalışmalar, antimikrobiyal direnci önleme stratejilerinin temelini oluşturur. Antimikrobiyal direncin önlenmesi için en kısa sürede (1) vektör kontrolü yapılması, (2) aşıların kullanılmasının yaygınlaşması, (3) doğal mikrobiyomun korunması, (4) hızlı tanı yöntemleri geliştirilerek tedavi için uygun antimikrobiyal bileşiğin seçilmesi, (5) mevcut bileşiklerin etkinliğinin yeniden kazandırılması için FK/FD araştırmalarla doz optimizasyonu yapılması ya da alternatif yaklaşımların geliştirilmesi, (6) klinisyenlerin, eczacıların ve halkın antimikrobiyal direnç, akılcı antimikrobiyal ilaç kullanımı (şekil 3) ve sanitasyon kuralları hakkında bilinçlendirilmesi, (7) resmi antimikrobiyal direnç tanı standartlarının oluşturulması ve (8) her ülkenin yeni düzenlemeler yapması ile önlenabilir (Michael ve ark., 2014).



Şekil 3. Akılcı antimikrobiyal kullanımı

Yeni ilaç geliştirme süreci zorlu, uzun ve masraflı olduğu için sınırlı sayıda yeni antimikrobiyal bileşik üretilmektedir. Bu nedenle antimikrobiyal dirençle mücadelede yenilikçi yaklaşım ve araçların geliştirilmesi önemli ve gereklidir (WHO, 2016).

2.5.1. Kombinasyon Terapisi

Kombinasyon terapisi, hastalıkların tedavisinde tek bir bileşik yerine, aralarında PK/PD olarak pozitif etkileşim olan iki veya daha bileşiğin kullanılmasındır (Sun ve ark., 2016). Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde farklı etki mekanizmasına sahip bileşiklerin kullanılması, tedavi başarı oranını artırır (Tamma ve ark., 2012). Bu kapsamda farklı mekanizmalar aracılığıyla antimikrobiyal bileşiklerin etkinliğini arttıran veya daha etkin bir antimikrobiyal tedavi sağlayan yeni bileşikler; çevreyi algılama (quorum sensing) inhibitörleri, antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), bakteriyofajlar, antimikrobiyal olmayan adjuvanlar, antiseptik adjuvanlar, inhibitör adjuvanlar ve doğal adjuvanlar olarak sıralanabilir (Brooks ve Brooks, 2014).

Quorum sensing, bakterilerde hücreler arası iletişimi sağlayan haberleşme sistemidir. Bakteriler bu sistemi; antibiyotik biyosentezi, konjugasyon, önemli virülens faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi fizyolojik işlemlerde kullanır ve bu iletişim sistemi bozulduğunda bakteriler koordineli davranamaz ve konağa kolonize olma yetenekleri azalır (Fuqua ve ark., 1994).

AMP'ler, 12-50 aminoasit uzunluğunda olan ve geniş etki spektrumlu bileşiklerdir. Bağışıklık sisteminin bir bileşeni olarak görev yapan AMP'ler, hücre membranı hasarı, hücre duvarı sentezi inhibisyonu ya da nükleik asit ve protein sentezi inhibisyonu yaparak etki gösterir. Ancak stabil olmamaları, genellikle antijenik özellikte ve pahalı olmaları nedeniyle kullanımları sınırlıdır (Bahar ve Ren, 2013).

Bakteriyofaj, hücre yüzeyindeki reseptörlerin tanınması yoluyla bakterileri enfekte eden bir virüstür. Bakteriyofajların titresi ve etkinliği direkt olarak bakteri popülasyonlarıyla bağlantılıdır. Buna göre bakteri popülasyonu arttığında bakterilerle mücadele etmek için bakteriyofaj etkinliği artar. Ancak faj DNA'sının bakteri genomuna entegrasyonunun zor olması ve antimikrobiyal dirence bağlı olarak bakteriyel hücre yüzeyindeki reseptörlerde değişikliklerin olması bakteriyofaj terapisini sınırlayan faktörlerdendir (Drulis-Kawa ve ark., 2012).

Enfeksiyöz hastalıkların tedavisi, önlenmesi veya tedaviye yardımcı olmak üzere kullanılan ve antimikrobiyal özellikte olmayan bileşenler adjuvan olarak nitelendirilir. Klorheksidin (CHX) gibi antiseptikler, en bilinen adjuvanlardandır ve antiseptik özelliklerinin yanı sıra hücre membranını parçalanmasına ve ATPaz enzimin inaktivasyonuna neden olarak bakterilere karşı bakteriostatik/bakterisit etki gösterir (Brooks ve Brooks, 2014).

β -laktamaz inhibitörleri ve geri çıkartım pompası inhibitörleri, inhibitör adjuvanlardandır. β -laktamaz inhibitörleri, β -laktamların parçalanmasını önlerken, geri çıkartım pompası inhibitörleri ise antimikrobiyal bileşiğin hücre içi akümüasyonunu artırır ve MDR'ı baskılamak için tamamlayıcı bir etkinlik gösterir (Drawz ve Bonomo, 2010 ve Lomovskaya ve Watkins, 2001).

Bitki türevi bileşikler ve biyosurfaktantlar oldukça güvenli doğal adjuvanlardır ve son yıllarda antimikrobiyal dirençle mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır (Brooks ve Brooks, 2014).

2.5.1.1. Kombinasyonların Kullanım Amaçları

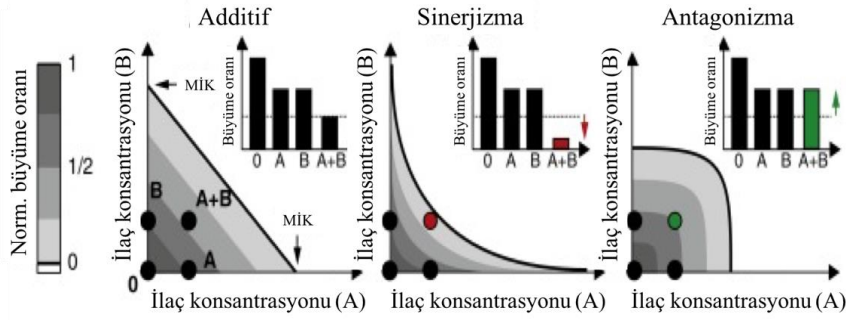
Kombinasyon terapisi ile; (1) etki spektrumunun genişletilmesi ve buna bağlı olarak etkeni bilinmeyen ciddi enfeksiyonların ya da karma enfeksiyonların etkin tedavisi, (2) hücre içine yerleşen bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi, (3) tedavide kullanılacak dozların azaltılması

ve istenmeyen etkilerin (toksikite, yan etki ve ölüm) oluşmasının önlenmesi, (4) dirençli bakterilerden kaynaklanan ölüm oranlarının azaltılması, (5) dirençli bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların tedavi süresinin kısaltılması; buna bağlı olarak besin değeri olan hayvanlarda et ve süt, damızlık hayvanlarda ise yavru verimlerindeki kayıpların ve süperenfeksiyonların önlenmesi, (6) dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için harcanan maliyetin azaltılması, (7) mevcut bileşiklerin etkinliğinin yeniden kazandırılması, (8) direncin önlenmesi ve geciktirilmesi sağlanabilir (Tamma ve ark., 2012).

Antimikrobiyal bileşiklerin yeni bileşiklerle birlikte kullanılmasının yanı sıra mevcut antimikrobiyal bileşiklerin kombinasyon terapisinde kullanılması, antimikrobiyal direncin önlenmesine yönelik etkili bir yaklaşımdır. Antimikrobiyal bileşikler birlikte kullanıldığında, *in vivo* direnç gelişimi önlenir veya geciktirilir. Ayrıca bileşiklerin dirençli bakterilere karşı etkin olarak kullanılabilme süreleri önemli derecede uzar ve direnç gelişimi gözlenen bileşiklerin bakterilere karşı yeniden etkin olmaları sağlayabilir (Brooks ve ark., 2014). Ancak etkin bir kombinasyon terapisini için antimikrobiyal bileşikler arasındaki pozitif/negatif etkileşimlerin ve bu etkileşimlerden sorumlu mekanizmaların belirlenmesi önemlidir (Ocampo ve ark., 2014).

2.6. Antimikrobiyal Bileşikler Arasındaki Etkileşimler

Antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimin çoğunlukla additif, daha az sıklıkla sinerjizma, nadir olarak da antagonizma ile sonuçlandığı *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle gösterilmiştir (şekil 5) (Gradelski ve ark., 2001).



Şekil 4. Antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimler (Bollenbach ve ark., 2015)

2.6.1. Sinerjizma

İki ya da daha fazla antimikrobiyal bileşik kombine edildiğinde meydana gelen etki, bileşiklerin bireysel etkilerinden daha fazla ise sinerjizma olarak nitelendirilir. Sinerjistik etkili iki bileşiğin birlikte kullanılması, bakterisit etki hızını arttırarak bileşiklerin tek başlarına belirli bir sürede inhibe ettikleri bakteri sayısının toplamından daha fazla bakterinin inhibe edilmesini sağlayabilir. Antimikrobiyal bileşikler arasındaki sinerjizma tek taraflı olabilir. Buna göre bileşiklerden biri inhibitör etkinlik gösterirken diğeri etkisiz kalabilir. *In vivo* ortamda ilaçlar arasındaki uyumsuzluk, ilaçların farmakokinetik özelliklerinde ve uygulanma zamanlarındaki farklılık, kombinasyonun antimikrobiyal etkinliğini değiştirir. Bu nedenle *in vitro* sinerji testlerinden elde edilen sonuçların *in vivo* çalışmalara uyarlanabilmesi için farmakokinetik faktörlerin göz önünde bulundurulması önemlidir (Nielsen ve Friberg, 2013).

β -laktam+aminoglikozid ve β -laktam+florokinolon kombinasyonları, birçok bakteriye karşı sinerjistik etkinliği tanımlanmış kombinasyonlardandır (Tamma ve ark., 2012). Bu kombinasyonlara örnek olarak ampisilin (AMP)+AMK, AMP+CIP ve sefepim (FEP)+GAT kombinasyonları verilebilir. Bunlara ek olarak seftazidim (CAZ)+CST ve CIP+CST kombinasyonları da sinerjistik etkili kombinasyonlardandır (Bollenbach ve ark., 2015; Dawis ve ark., 2003 ve D'Souza ve ark., 2014). Diğeryandan farklı grup antimikrobiyal bileşikler arasında sinerjizma gözlenmesinin yanı sıra aynı antimikrobiyal

gruptan bileşikler arasında da sinerjizma gözlenebilir. Örneğin CIP+GAT, CIP+enrofloksasin (ENR) ve danofloksasin (DAN)+orbifloksasin (ORB) sinerjistik etkili kombinasyonlardandır (Blondeau ve ark., 2012; Cengiz ve Sahinturk, 2013 ve Pankey ve Ashcraft, 2005).

2.6.1.1. Sinerjizma Etki Mekanizmaları

Antimikrobiyal bileşikler arasındaki sinerjistik etki (1) farklı yollarla farklı hedeflerin inhibisyonu, (2) aynı yolla farklı hedeflerin inhibisyonu ve (3) aynı hedef bölgenin inhibisyonu şeklinde olmak üzere üç farklı mekanizma ile ortaya çıkabilir (Kohanski ve ark., 2010).

β -laktam+aminoglikozid kombinasyonu farklı yollardan farklı hedeflerin inhibisyonuyla sinerjistik etki gösterir. Aminoglikozidler, bakteri ribozomlarına bağlanarak protein sentezini inhibe eder ve bakterisit etki gösterir. β -laktam grubu bileşikler ise hücre duvarı sentezini inhibe eder ve aminoglikozidlerin hücreye girişini artırarak ribozomlara ulaşmasını kolaylaştırır (Kohanski ve ark., 2010).

TMP ve sülfonamidler, aynı yolla farklı hedefleri inhibe ederek sinerjistik gösterir. Örneğin sülfonamidler, p-aminobenzoik asit (PABA) ile yarışır ve dihidropteroatsentaz enzimini inhibe ederek hücre metabolizmasında kofaktör olarak görev yapan folik asit sentezini engeller. TMP ise dihidrofolatredüktaz enzimini inhibe ederek folik asit sentezindeki katalitik siklusu tamamlayan dihidrofolik asitin tetrahidrofolik aside dönüşmesini bloke eder (Salter, 1982).

Streptogramin ile kinupristin ve dalfopristin aynı hedef bölgeleri inhibe ederek sinerjistik etki gösterir. Bu bileşikler bakteri ribozomlarının 50S'lik alt birimlerinde yakın yerlere bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Ortaya çıkan sinerjistik etki, tek başlarına kullanımlarına göre 10-100 kat daha güçlüdür (Breitinger, 2012).

2.6.2. Additif Etki

Antimikrobiyal bileşikler arasında en sık gözlenen etkileşim additif etkidir. Biri güçlü diğeri zayıf etkili iki bileşik kombine edildiğinde ortaya çıkan etkinin güçlü olan bileşiğin etki şiddetine eşit ya da ayrı ayrı etkilerinin toplamına eşit olduğu etkileşimler additif olarak nitelendirilir. Additif etkili bileşikler birlikte kullanıldığında, belirli bir bakteriye karşı etki gücünde artış görülmemesine rağmen, etki spektrumunun genişlemesini sağlayabilir. AMP+sülfonamid ve CIP+RIF bileşikleri additif etkili kombinasyonlardandır (Athamna ve ark., 2005).

2.6.3. Antagonizma

Birlikte kullanılan bileşiklerden birinin veya her ikisinin inhibitör etkilerindeki ya da bakterisit etki hızlarındaki azalma kombinasyonun antimikrobiyal etkinliğini azaltabilir. Antimikrobiyal bileşikler birlikte kullanıldığında iki bileşiğin meydana getirdiği ortak etki toplamının, kombinasyonda kullanılan en güçlü bileşiğin tek başına gösterdiği etkiden daha düşük olması antagonizma olarak nitelendirilir. Antagonistik etki, bileşiklerin kombinasyondaki konsantrasyonlarına bağlıdır. Bakterisit etkili bir bileşik bakteriyostatik bir bileşik birlikte kullanıldığında antagonistik etki gözlenme olasılığı yüksektir. Hücre duvarı sentezini inhibe eden bileşikler aktif üreme fazındaki bakterilere karşı etkilidir. CHL veya TET gibi bakteriyostatik bileşikler, penisilinlerin etkisini azaltır. AMP+TET, CHL+ERY, TET+GEN ve TET+nitrofurantoin kombinasyonları da antagonistik etkili etkileşime örnek olarak gösterilebilir (Bollenbach ve ark., 2015).

2.7. Antimikrobiyal Bileşikler

2.7.1. Sefalosporinler

Sefalosporinler β -laktam grubu bileşiklerdendir. Sefalosporinlerde β -laktam halkası, 6 üyeli bir dihidrotiazin halkasına bağlanır. Bu yapısal farklılık, β -laktamazlara karşı sefalosporinlerin penisilinlerden daha dayanıklı olmalarını sağlar. Genellikle parenteral enjeksiyonla uygulanırlar, yarı ömürleri kısadır ve böbrekler aracılığıyla idrarla atılırlar (Bergan, 1984).

Sefalosporinler antibakteriyel özellikleri, β -laktamaz enzimlerine karşı dayanıklılıkları ve farmakolojik özelliklerine göre sınıflandırılır. Birinci kuşak bileşikler primer olarak Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Parenteral (i.v., i.m., s.c.) ya da bazı durumlarda oral olarak uygulanabilen birinci kuşak sefalosporinler penisilinaza karşı dayanıklıdır. İkinci kuşak bileşikler Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkili, tüm yollardan uygulanabilir ve β -laktamazlara karşı birinci kuşak bileşiklere göre dayanıklılıkları daha fazladır. Üçüncü kuşak bileşikler Gram pozitiflere karşı daha az, Gram negatif bakterilere karşı daha çok etkilidir. Parenteral ve nadiren oral yolla uygulanabilen üçüncü kuşak bileşiklerin β -laktamazlara karşı çok dayanıklıdır. Dördüncü kuşak bileşikler ise hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkinliği arttırılmış, tüm yollardan uygulanabilir özelliktedir. Ayrıca bu gruptaki bileşikler β -laktamazlara karşı en dayanıklı sefalosporinlerdendir (Bergan, 1984).

Veteriner hekimlikte ruhsatlı sefalosporinler CEF, sefaleksim (LEX), sefuroksim (CXM), sefapirin, sefasetril, sefovesin ve sefkuinom olarak sıralanabilir. Bununla birlikte CRO'nun hayvanlarda kullanımı onaylanmamış olmasına rağmen, veteriner hekimler tarafından yasal olarak reçete edilmektedir. Hayvanlarda özellikle solunum yolu ve meme enfeksiyonlarının tedavisinde CEF, CRO ve LEX yaygın olarak kullanılmaktadır (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

2.7.1.1. CRO

CRO, 3. kuşak parenteral sefalosporinlerdendir. Oral yolla uygulandığında emilimi düşük olması nedeniyle parenteral yolla kullanılır. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır. Dokulara dağılımı iyidir ve kan beyin bariyeri (KBB) ile plasentayı geçer. Beyin zarı, göz ve iç kulakta yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir. Yarı ömrü, köpeklerde 1,1-1,7 saat arasındadır. Vücutta biyotransformasyona uğrar; değişmemiş halde ya da metabolitleri şeklinde idrar ve safra ile atılır (Bergan, 1984).

CRO, geniş spektrumlu bir bileşiktir. Özellikle Gram negatif bakterilerde olmak üzere Gram pozitif bakterilere karşı 1. ve 2. kuşak sefalosporinler kadar etkilidir. *H. influenza*, *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*), pnömokoklar ve menengokoklara karşı güçlü, *Pseudomonas*, enterekok, stafilokok ve *Bacillus fragilis* (*B. fragilis*)'e karşı daha zayıf etkilidir. CRO, bakteriyel hücre duvarının iç membranında bulunan PBP'lere bağlanır ve inhibe eder. PBPler, büyüme ve bölünme sırasında bakteri hücre membranının yeniden şekillendirilmesinden ve hücre duvarının oluşturulmasından sorumlu enzimlerdir. PBP'lerin inaktivasyonu, bakteri hücre duvarının sağlamlığı için gerekli olan peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlanmasını engelleyerek, bakteri hücre duvarının zayıflamasına ve hücre lizisine neden olur (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

CRO için hedef bölge olan PBP'lerdeki mutasyonlar, CRO'ya karşı dirence neden olur. PBP'lerin alt türlerinden özellikle PBP2'deki mutasyonların CRO direncinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Chiu ve ark., 2007). 1990'lı yılların başından itibaren CRO direnci gözlenmekte ve giderek yaygınlaşmaktadır. Örneğin 2004 yılında ortalama %3,5 düzeyinde CRO direnci gözlenirken, 2005 yılına gelindiğinde bu oranın %11,5'e yükseldiği belirlenmiştir (Chiu ve ark., 2007).

CRO uygulanan hayvanlarda en yaygın olarak (%2) ishal, kaşıntı ve enjeksiyon bölgesinde irritasyon gibi istenmeyen etkiler gözlenir. Bununla birlikte immun aracılı hemolitik anemi şekillenebilir. Sefalosporin veya penisilinlere karşı alerjisi olan hayvanlarda dikkatli olunmalı ve hayvanlar takip edilmelidir (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

2.7.1.2. CEF

CEF, yarı-sentetik, β -laktamlara karşı dayanıklı, parenteral 3. kuşak sefalosporinlerdendir. CEF'in hidroklorür ve sodyum tuzları ile kristalize serbest asit şekilleri bulunur. Klinikte en yaygın olarak hidroklorür çözeltileri kullanılır. Hidroklorür ve sodyum tuzlarının farmakokinetiği birbirine benzer. Yarı ömrü 8-12 saattir ve vücutta hızla furoik asit ve desfluroilseftiofura dönüştürülür. Desfluroilseftiofur metaboliti de antimikrobiyal etkinliğe sahiptir ve yarı ömrü yaklaşık 10 saattir (Meegan ve ark., 2013).

CEF, geniş spektrumlu bir bileşiktir, özellikle *Pasteurella spp.*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* olmak üzere çok sayıda Gram negatif bakteriye karşı etkilidir. Üçüncü kuşak parenteral sefalosporinlerden olmasına bağlı olarak, CEF'in etki mekanizması seftriaksonla benzerdir (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

E. coli'de CEF direnci giderek yaygınlaşmaktadır. Bu doğrultuda, 2008 yılında %25,6 düzeyinde olan CEF direnci, 2012'de %46,9 olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte kullanımlarının sınırlandırılması ile bu oran %35'e gerilemiştir (Zang ve ark., 2017). CEF direnci, yaygın olarak *bla*CMY-2 enzimleri ile ilişkilidir (Giuriatti ve ark., 2017).

CEF, güvenli antimikrobiyal bileşiklerden biridir. Oral ya da parenteral uygulandığında akut toksik etkileri düşüktür. Bununla birlikte CEF uygulanan köpeklerde anemi ya da trombosit sayısında azalma görülebilir. Suda

çözdürülmüş formları, enjeksiyon bölgesinde çok düşük miktarda irritasyona neden olabilir (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

2.7.2. Florokinolonlar

Florokinolonların çoğu zwitteriyon (çift tuz) haldedir. Bileşiklerin zwitteriyon halinde bulunduğu pH, izoelektrik nokta olarak nitelendirilir. Bu noktada sudaki çözünürlük en az, yağdaki çözünürlükleri ise en yüksektir. Bu nedenle vücut sıvılarının pH'sındaki değişiklikler, çözünürlüklerini önemli derecede etkiler. Mide pH'sında iyonize halde olup iyi çözünmelerine rağmen, suda çözünmezler ve yağdaki çözünürlükleri ise iyidir.

Florokinolonların, vücutta dağılımları iyidir. Kemik, kıkırdak, prostat, BOS, kan hücreleri ve vücut sıvılarında etkili konsantrasyonlara ulaşır. Bununla birlikte burun mukozası, bronşiyal epitel, tükürük salgısı, makrofaj ve akyuvarlara yüksek konsantrasyonda geçerler. Vücuttan safra ve idrar yoluyla atılır ve florokinolonların çoğu süte geçebilir (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

2.7.2.1. DAN

DAN 2. kuşak florokinolonlardandır ve mesilat (metansulfonat) tuzu halinde bulunur, suda iyi derecede çözünür. DAN, tedavi amaçlı oral ve parenteral yollarla kullanılır. Plazma proteinlerine düşük oranda bağlanır. Vücutta dağılımı iyidir, safra, karaciğer, akciğer, böbrekler, eklem ve prostat sıvısı da dahil olmak üzere bu yerlerdeki konsantrasyonları yüksektir. Alüminyum, magnezyum, çinko, demir ve kalsiyum gibi maddeler emiliminin azalmasına neden olur. Çoğunlukla idrar ve dışkıyla değişmemiş halde vücuttan atılır (Bergeron, 1989).

DAN, geniş spektrumlu sentetik bir bileşiktir. Özellikle *E. coli*, *Enterobacter*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Yersinia*, *Serratia*, *Brucella*, *Vibrio*,

Chlamydia, penisilinaz salgılayan ve metisiline dirençli olanlar da dahil stafilkoklar, *Mycoplasma* ve *Mycobacterium* türleri gibi Gram negatif koklar ile Gram negatif basillere karşı etkilidir. DAN bakterisit etkili bir bileşiktir. Bakterilerde DNA giraz enzimini inaktive eder. Böylece DNA çift zinciri sarmal hale geçemez ve DNA kalıbı çıkarılamaz. Bunun sonucunda DNA kalıbı çıkarılamayan bakterilerde bölünme oluşmaz ve anormal uzamaya bağlı olarak bakterisit etki gözlenir (Kaya, 2013 ve Prescott, 2013).

DAN direncinden birincil olarak DNA giraz'daki mutasyonlar sorumludur. Buna ilave olarak PMQR genleri ile geri çıkartım pompası aktivasyonu, danofloksasin direnci ile ilişkilendirilir (Piddock ve ark., 2006).

Özellikle gelişmekte olan yavru köpeklerde kıkırdak yapıda hasara neden olur ve artropati gözlenebilir. Bu nedenle küçük ya da orta boy köpek ırklarında 8, büyük ırklarda ise 18 aydan küçük köpeklerde kullanılması önerilmez (Kaya, 2013 ve Prescott, 2013).

2.7.3. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler, büyük molekülü ve fizyolojik pH'da iyonize olmaları nedeniyle yağda çözünürlükleri düşük olan bileşiklerdendir. Buna bağlı olarak hücre içine girişleri ve hücresel bariyerlere penetrasyonları sınırlıdır. Bu bileşikler özellikle serebrospinal ve oküler sıvı gibi hücrelerarası sıvılarda terapötik konsantrasyonlara ulaşamaz (Maurin ve Raoult, 2001).

Aminoglikozid grubu bileşiklerin hepsi, değişen oranda ototoksik ve nefrotoksik etkiye sahiptir. Özellikle nefrotoksisite (akut tübüler nekroz) aminoglikozid tedavisinde en sık rastlanan yan etkidir (Kaya, 2013 ve Prescott, 2013).

2.7.3.1. GEN

GEN, *Micromonospora purpurea* (*M. Purpurea*) bakterisinden elde edilir. Çok dayanıklı bir bileşiktir, 120°C’de 30 dk süreyle tutulduğunda bile etkinliğini kaybetmez. Antimikrobiyal tedavi amacıyla gentamisin sülfat halinde kullanılır ve çözeltileri alkali koşullarda etkinliğini hızla kaybeder. Amfoterisin B, ampisilin sodyum, dopamin hidroklorür, furosemid, heparin sodyum, karbenisilin disodyum, sefamandol naftalat, sefalotin sodyum ve sefapirin sodyum gibi maddelerle pH, ısı, çözünürlük ve yoğunluk gibi faktörlere bağlı olarak fiziksel geçimsizlik gösterir. Diğer yandan enjektabl β -laktam formülasyonları, GEN’le uyumsuz olduğu için bu gruptan bileşiklerle aynı enjektörde karıştırılmamalıdır (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

Oral yolla uygulandığında sindirim kanalından çok az emilir. Sistemik hastalıkların tedavisi için özellikle intra musküler olmak üzere parenteral yollarla uygulanmalıdır. Plazma proteinlerine neredeyse hiç bağlanmamasına rağmen, %10 oranda alyuvarlara bağlanabilir. Bu nedenle anemili hastalarda plazmadaki serbest ilaç konsantrasyonu yüksektir. GEN vücutta en çok böbrek, kas ve karaciğerde toplanır. Plasenta, göğüs ile karın zarlarını kolay geçer ve sinoviyal sıvı ile apse sıvısına girer. Parenteral yollarla uygulandığında kemik, kalp, akciğer ve idrar kesesi gibi yerlerde etkili konsantrasyonlara ulaşır. Özellikle iç kulak ve böbreklerde birikir. Vücuttan değişmemiş halde glomerüler filtrasyon aracılığıyla idrarla atılır. İdrardaki GEN konsantrasyonu plazmadakinin 10-100 katına ulaşabilir. Süte geçer ve sütteki konsantrasyonu plazmadakinin 2-3 katına çıkabilir (Abo-EL-Sooud ve ark., 2012).

GEN, en etkili aminoglikozidlerdendir. *P. aeruginosa* dahil çoğu Gram negatif bakterilere ve bazı Gram pozitif bakteriler ile mikoplazmalara karşı etkilidir. Streptokoklara karşı etkinliği amikasine göre daha fazladır. GEN, mikobakterler ya da *Nocardia spp.*’ye karşı düşük etkili; anaerobik bakterilere ya da anaerobik koşullardaki aerobik bakterilere karşı ise etkisizdir. Tüm aminoglikozidler gibi konsantrasyona bağlı bakterisit etki gösterir ve fagositik

hücrelere penetrasyonları düşüktür. GEN, ribozomların 30S'lik alt birimlerine bağlanır ve genetik kodun yanlış okunmasını sağlayarak protein sentezini inhibe eder. Aminoglikozidler, doza bağlı bakterisit etki gösteren bileşiklerdendir. Etkilerini bakteriye penetre olarak gösterir. Buna bağlı olarak β -laktam grubu bileşikler gibi hücre duvarı sentezi inhibitörleri aminoglikozidlerin penetrasyonunu kolaylaştırır ve etkinliklerini artırır. Ortam pH'sı ve prulent akıntı aminoglikozidlerin bakterisidal etkinliğini değiştiren faktörlerdendir. Lokal asiditenin arttığı doku hasarı ya da bakteriyel yıkımlanma durumunda duyarlı patojenlere karşı bile etkinlik gösteremez. Pulent akıntı ise (abse tedavisi) aminoglikozidleri bağlayarak inaktivasyona neden olabilir. Bu nedenle öncelikle abse drenajı yapılması tedavinin başarı oranını artırır. Uzun süreli tedavi (> 7-10 gün), günde birden fazla doz ilaç uygulaması, asidoz ve elektrolit bozuklukları (hipokalemi, hiponatremi), şok ile endotoksemi, eşzamanlı nefrotoksik ilaç tedavisi, yaş (yenidoğanlar ve geriatrikler) ve önceden varolan böbrek hastalığı aminoglikozid toksisitesi için risk faktörlerindedir (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

GEN direnci, özellikle 2007 yılında hızlı bir şekilde artmaya başlamıştır ve 2014 yılında *E. coli* izolatlarının %54'ünün GEN'e karşı dirençli olduğu saptanmıştır. GEN'e karşı dirençten, aminoglikozidleri inaktive eden fosfotransferaz, asetiltransferaz ve adeniltransferazlar gibi plazmid aracılı enzimler sorumludur. Aminoglikozidleri inaktive eden en az 11 enzim tanımlanmıştır. Bu enzimler, bakterilerin periplazmik boşluğunda bulunur ve aminoglikozidlerin hidroksil ya da amino gruplarında değişikliğe neden olarak ribozomal bağlanmayı engeller (Chalmer ve ark., 2017).

Dokularda uzun süre kalıntı yapması ve tedavi maliyetinin yüksek olması nedeniyle GEN'in sığır, koyun ve keçilerde kullanımı sınırlıdır. Yüksek oranda nefrotoksik, daha düşük oranda ise ototoksik etkili olması uzun süreli kullanımı sınırlayan diğer bir faktördür (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

2.7.4. Polimiksinler

Polimiksinler, *Bacillus polymyxa* (*B. polymyxa*)'dan üretilen antibiyotiklerdir. Klinik olarak kullanılan polimiksinler; polimiksin E (CST) ve polimiksin B'dir. 1940'lı yıllarda ilk üretildikleri zaman *P. aeruginosa*'ya karşı etkinlikleri nedeniyle sıklıkla kullanılmalarına rağmen, sistemik toksik etkileri oral (CST) veya topikal (polimiksin B) kullanılmalarını sınırlamıştır (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013). Son yıllarda yapılan çalışmalarla, oluşan toksik etkinin düşünülenden daha az olduğu ve özellikle karbapenem dirençli Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde iyi bir seçenek oldukları kanıtlanmıştır (Liu ve ark., 2014).

2.7.4.1. CST

CST sülfat oral yolla, kolistimetat sodyum ise parenteral yolla kullanılan formlarıdır. Kolistimetat sodyumun ön ilaç özelliğindedir ve kendisi etkisiz olmasına rağmen vücutta hidrolize uğrayarak CST'ye dönüşür. CST'nin tuzları oldukça dayanıklıdır; kuru toz halinde dayanıklı olan bu bileşiğin sulu çözeltileri buzdolabında 6 ay süreyle etkinliğini koruyarak saklanabilir. Kuvvetli asit ve alkali koşullarda hızla yıkımlanmalarına rağmen pH 5-7 arasında kaynatıldığında bile parçalanmazlar. Magnezyum, kobalt ve demir gibi 2 değerli iyonlar, CST ile geçimsizdir ve CST'nin bakteriye girişini engeller.

Oral yolla uygulandığında emiliminin sınırlı olması nedeniyle sistemik etki için parenteral yollarla uygulanır. CST plazma proteinlerine %70-90 oranında, kas dokuya ise yüksek oranda bağlanır. Vücutta dağılımı iyidir, özellikle kalp, akciğer, karaciğer, böbrek ve iskelet kaslarına affinitesi vardır. CST vücutta büyük oranda biyotransformasyona uğrar ve metabolitleri halinde idrar ve safrayla atılır. CST'nin yaklaşık %60'ının idrarla atılması nedeniyle böbrek yetmezliğinde vücutta birikebilir.

CST, dar spektrumlu bakterisit etkili bir bileşiktir. Hücre membranı üzerindeki etkinliği nedeniyle Gram negatif bakterilere karşı yüksek derecede etkili olmasına rağmen, Gram pozitif bakterilere karşı etkisizdir. İrinli akıntılar ve doku döküntüleri CST etkinliğini azaltır. *Enterobacter*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Shigella*, *Bordetella*, *Heamophilus*, *Brucella*, *Vibrio*, *Pseudomonas* ve *Paracolon* türlerine karşı etkilidir.

CST, katyonik-yüzeyde etkin bir bileşiktir ve bakterilerin hücre membranındaki fosfolipidlere bağlanır ve membran yapısı ile geçirgenliğini bozarak bakterisit etki gösterir. Membranda meydana getirdiği değişiklikler, diğer antimikrobiyal bileşiklerin hücreye geçişini kolaylaştırır (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

Türkiye’de 2014 ve 2015 yıllarında yapılan araştırmalarda CST direncinin *A. baumannii*’de %6, *K. pneumoniae*’de %7 ve MDR *P. aeruginosa*’da %1,7 düzeyinde olduğu gösterilmiştir (Cakırlar ve ark., 2015; Cıkman ve ark., 2015 ve Ergönül ve ark., 2014). CST direncinden *pmrC* ve *lpxD* genlerindeki mutasyonlar, plazmid aracılı CST direnci ile ilişkilendirilen *mcr-1* geninin varlığı ile *pmrA* ve *pmrB* genlerindeki ekspresyon artışları sorumludur (Liu ve ark., 2016).

Özellikle parenteral yollarla CST uygulanan hayvanlarda, denge bozukluğu, kol ve bacak derisinde duyunun azalması veya kaybolması ile kas güçsüzlüğü görülebilir, oral yolla verildiğinde ise bulantı, kusma ve diareye neden olabilir (Kaya, 2013 ve Presscott, 2013).

2.8. *E. coli*

E. coli, Enterobacteriaceae familyasında yer alan çomak formunda Gram negatif bir bakteridir (Hopkins ve ark., 2005). Sindirim sistemindeki yardımcı görevleri ve diğer bakteri populasyonları üzerindeki baskılayıcı özelliğinin yanı sıra *E. coli*, insan ve hayvanların bağırsaklarında mikrobiyom

olarak adlandırılan büyük bir mikroorganizma topluluğunun fırsatçı patojen bir üyesidir (Ingerson-Mahar ve ark., 2011 ve Li ve ark., 2014). Mikrobiyomdaki diğer organizmaların aksine oksidatif koşullarda gelişimine devam edebilir. İnsan vücudu ortalama 10 trilyon hücreden oluşmasına rağmen, insanlardaki bağırsak mikrobiyomunun yaklaşık 90 trilyon mikroorganizma içermesi mikrobiyomun büyüklüğünü ve mikrobiyom karakterinin bilinmesinin insan ile hayvan sağlığı açısından önemini gösterir. *E. coli* ise tek bir hücreden oluşur ve tüm genom analizi yapılan ilk mikroorganizmalardandır. *E. coli*'nin basit yapılı ve oksidatif koşullara dayanıklı olması, *in vitro* çalışmalara kullanılmasına olanak sağlar ve memelilerde çalışılması zor ve/veya etik olmayan biyolojik deneyler *E. coli*'de uygulanabilir. *E. coli* laboratuvar şartlarında kolay ve hızlı üremesi, basit nutrisyonel gereksinimi, yüksek adaptasyon yeteneği, iyi bilinen genetik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile biyolojik sistemlerinin diğer organizmalara uyarlanabilmesi nedeniyle bilimsel araştırmalar için iyi bir model bakteridir. *E. coli* gıda güvenliği alanında da sıklıkla kullanılır. İnsan ve hayvanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan *E. coli* dışkıyla atılır. Gıda güvenliği için tasarlanan teşhis testlerinde, dışkı kökenli *E. coli* tespit edilmesi normal floranın göstergesi olabildiği gibi tüketilen gıdanın sağlıklı koşullara maruz kalmış olabileceği konusunda da bilgi verir (Ingerson-Mahar ve ark., 2011).

Enfeksiyona neden olan *E. coli* suşları klinik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre enterik ve enterik olmayan türler olarak iki gruba ayrılır. Enterik *E. coli* grubunda; enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterohemarajik *E. coli* (EHEC), Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) olarak da nitelendirilen enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), diffuz adherent *E. coli* (DAEC), enteroinvazif *E. coli* (EIEC), adherent invazif *E. coli* (AIEC) suşları bulunur ve bu suşlar sindirim sistemi enfeksiyonlarından sorumludur. Enterik olmayan *E. coli* grubu ise; üropatojenik *E. coli* (UPEC), neonatal menenjit *E. coli* (NMEC) ve avian patojenik *E. coli* (APEC) suşlarını içerir (Allocati ve ark., 2013 ve Souto ve ark., 2017).

Dünyanın farklı bölgelerinde MDR mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların yaygınlığı, hızlı çözüm gerektiren küresel bir sorundur. Enterobacteriaceae familyası, bakteriyel enfeksiyonlardan birincil olarak sorumlu mikroorganizmalardan biridir. Hayvan ve hayvansal gıdalardan toplanan örneklerde, diğer bakteri türlerinin yanı sıra, Enterobacteriaceae familyasına ait türlerde antimikrobiyal direnç prevalansı dikkate değer bir sıklıktadır. Enterobakterler aynı zamanda iyi bir gen rezervuarı ve gen transferinde önemli bir vektördür. Enterobacteriaceae familyasına ait olan *E. coli*'deki mevcut direnç eğilimlerinin izlenmesi MDR ile mücadele için önemli ve gereklidir (Allen ve ark., 2010; Lu ve ark., 2010 ve Matar, 2017).

2.9. Antimikrobiyal Direncin ve MDR'in Karakterizasyonu

Antimikrobiyal direnç ve özellikle MDR, genetik transfer mekanizmaları aracılığı ile bakteriler arasında hızla yayılır ve kromozomal direnç genlerinin ekspresyonunu düzenleyen genlerdeki mutasyonlar, antimikrobiyal direnç olgularındaki hızlı artışa neden olur. Diğer yandan yeni antimikrobiyallerin keşfi ya da geliştirilmesindeki duraksama nedeniyle de MDR, halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Antimikrobiyal direnci önlemek, öncelikle direncin hızlı ve doğru olarak tanımlanması ile mümkündür (Hasdemir, 2016). Antimikrobiyal direnç ve MDR'in karakterizasyonu için fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılır. Fenotipik karakterizasyon için broth mikrodilüsyon, moleküler karakterizasyon için ise Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR) ve kantitatif Real Time PCR (quantitative Real Time PCR: qRT-PCR) yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.9.1. Fenotipik Yöntemler

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal bileşiğin belli bir patojene karşı *in vitro* etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Başarılı bir antimikrobiyal terapi için, tedavide kullanılacak antimikrobiyal

bileşiklerin spesifik hastalık etkenine karşı olan statik ve/veya sidal etkisinin çok iyi belirlenmesi ve etkin ilacın seçilerek yeterli süre ve dozda uygulanması gereklidir. Disk difüzyon, gradient difüzyon, agar dilüsyon ve broth mikrodilüsyon yaygın olarak kullanılan duyarlılık testlerindedir. Disk difüzyon testinden elde edilen sonuçların agar dilüsyon ve broth mikrodilüsyon testi sonuçları ile uyumlu olmaması disk difüzyon testinin daha az tercih edilmesinde önemli bir nedendir. Gradient difüzyon testi ile doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesine rağmen, pahalı olması uygulamayı kısıtlar. Broth mikrodilüsyon yönteminde inokülüm yoğunluğunun standardize edilmesi testin tekrarlanabilirliği açısından önemlidir. Ayrıca analitik standartların kullanılması, kantitatif sonuç elde edilmesi ve anaerob bakterilere de rahatlıkla uygulanabilirliği yönünden broth mikrodilüsyon yöntemi diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır (Jenkins ve Schuetz, 2012).

2.9.1.1. Disk Difüzyon

Kirby-Bauer disk difüzyon testi, rutin laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu test, kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besi yerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu amaçla; belli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek olan mikroorganizmanın yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra zon çapları ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobiyallere karşı duyarlılık durumu belirlenir (Jenkins ve Schuetz 2012).

2.9.1.2. Gradient Difüzyon

Gradient difüzyon yönteminin ticari versiyonu olan E testi[®] (bioMerieux AB BIODISK), katı besi yerinde difüzyon yoluyla MİK'in saptanmasını sağlayan kantitatif bir yöntemdir. E-test yönteminde 0,5

McFarland yoğunluğuna ulaştırılan bakteri Mueller-Hinton Agar (MHA) yzeyine steril bir ekvyonla yayılır ve agar yzeyine belli bir antibiyotik gradienti içeren E-test şeritleri yerleştirilir. İnoküle besi yeri 18-24 saat sreye 35 °C'de inkübe edilir. şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerinde keşiştiği nokta MİK olarak belirlenir (Sader ve Pignatari, 1994).

2.9.1.3. Agar Dilüsyon

Agar dilüsyon yönteminde ½ oranda azalan ilaç seri dilüsyonlarından 1 ml alınarak 20 ml MHA içeren petrilere konulur. Bulanıklığı 0,5 McFarland yoğunluğuna ulaştırılan bakteriler agar plakalara ekilir ve 35-37 °C'de 18 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda gözle görülebilir üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlenir. Bu yöntem çok sayıda izolat veya antimikrobiyalin test edileceği durumlarda tercih edilebilir. Ancak broth mikrodilüsyona göre daha zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir (Jenkins ve Schuetz, 2012).

2.9.1.4. Broth Mikrodilüsyon

Broth mikrodilüsyon, seri dilüsyon temeline dayanan bir duyarlılık testidir. *In vitro* koşullarda antimikrobiallerin duyarlılık profillerinin belirlenmesi amacıyla antimikrobiallerin saf toz haldeki analitik standartları, besi yeri olarak Mueller Hinton Broth (MHB) ve testin standardizasyonu için yoğunluğu 0,5 McFarland'a ulaştırılmış bakteri kltürleri kullanılır.

Broth mikrodilüsyon yönteminde, stok ilaç solüsyonun konsantrasyonu 1 mg/ml veya daha fazla olmalıdır. Gerekli hallerde stok solüsyonu membran filtrasyonu ile sterilize edilir. MHB ile ½ oranda azalan seri ilaç dilüsyonları hazırlanır. 500 µl ve daha düşük kapasiteli mikro plakalara seri ilaç dilüsyonlarını içeren sıvı besi yeri konulur ve besi yeriyle eşit hacimde ve yoğunluğu 0,5 McFarland'a ulaştırılmış bakteri inoküle edilerek 35-37 °C'de

16-20 saat inkübe edilir. Bakteri üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlenir (CLSI, 2012).

2.9.2. Moleküler Yöntemler

2.9.2.1. PCR

PCR, karmaşık bir DNA havuzundan spesifik bir DNA parçasının çoğaltılmasını sağlayan enzimatik bir reaksiyondur. PCR reaksiyonu için çok küçük DNA miktarlarının yeterli olması ve spesifik primerlerin kullanılması nedeniyle hassas bir tekniktir. Klinisyenler ve araştırmacılar tarafından genetik çalışmaları hızlı ve çok hassas bir şekilde yürütmek, hastalıkları teşhis etmek, genleri klonlamak ve dizilemek için yaygın şekilde kullanılmaktadır (Garibyan ve ark., 2013).

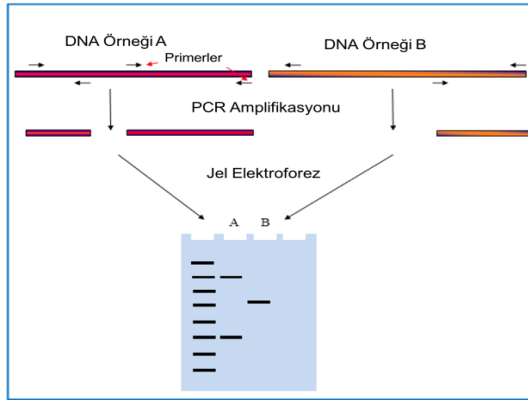
2.9.2.2. Dizi Analizi

Genlerdeki mutasyon ve direnç geni varyantları, amplifiye edilen DNA fragmanlarını oluşturan nükleik asitlerin dizilenmesi ve dizinin analiz edilmesiyle belirlenir. Nükleik asit dizisi, ilgili DNA fragmanına ait nükleik asit homologlarının bulunduğu veri tabanı ile karşılaştırılarak analiz edilir. Karşılaştırma için The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) veri tabanı yaygın olarak kullanılmaktadır (Gasc ve ark., 2016).

2.9.2.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polimorphic DNA: RAPD) PCR

İlk kez William ve ark. tarafından kullanılan RAPD, DNA temeline dayalıdır ve genetik yakınlık ile filogenetik araştırmalarında kullanılır. Uygulaması kolay ve ucuz olan, araştırılacak genomla ilgili ön bilgi gerektirmeyen ve görüntülenmesi için radyoaktiviteye ihtiyaç duyulmayan bir yöntemdir. RAPD analizinde, rastgele seçilmiş genellikle 10 bp uzunluğunda

primerler kullanılarak, düşük bağlanma sıcaklığında DNA amplifiye edilir. Rastgele seçilmiş primerlerin genomdaki sayısız bölgeyi çoğaltabilme potansiyeli vardır. PCR reaksiyonu esnasında primerler genomik DNA'da simetriği olan bölgelere bağlanır ve DNA geometrik olarak çoğaltılır. Jel elektroforez ve görüntülemeyle molekül büyüklüklerine göre bant gösteren DNA parçacıkları değerlendirilerek, DNA polimorfizmi belirlenir (şekil 6). Primerlerin bağlanma sayısı ve noktaları türe özgüdür. Buna bağlı olarak genotipin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, kültür ve ırk tayini, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi, adli tıp, klinik teşhis, prenatal tanı, salgınlar ve ekolojide yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Aydin, 2004 ve Sabat ve ark., 2013).



Şekil 6. RAPD PCR reaksiyonu

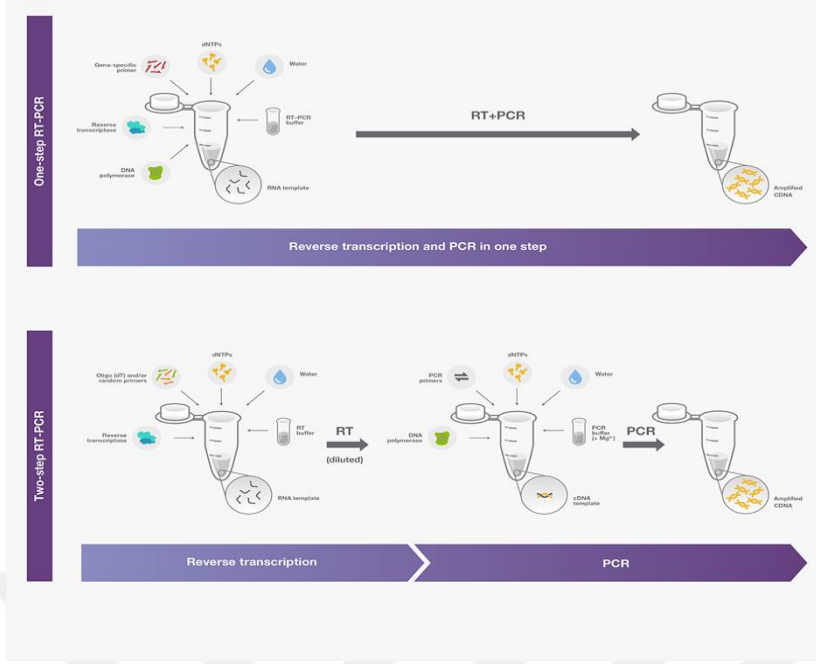
2.9.2.4. qRT-PCR

Antimikrobiyal dirence katkıda bulunan birçok mutasyon tespit edilmiş olsa da, mutasyonlar ile dirençten sorumlu fenotipik değişiklikler arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Antimikrobiyal direncin karakterizasyonunda genotipik değişikliklerin fenotipe yansımaları daha iyi tanımlamak için gen ekspresyonlarındaki değişikliklerin nicel olarak belirlenmesi önemlidir (Suzuki ve ark., 2014).

qRT-PCR, PCR amplifikasyonunu görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob veya boyaların kullanıldığı, DNA miktarı ile

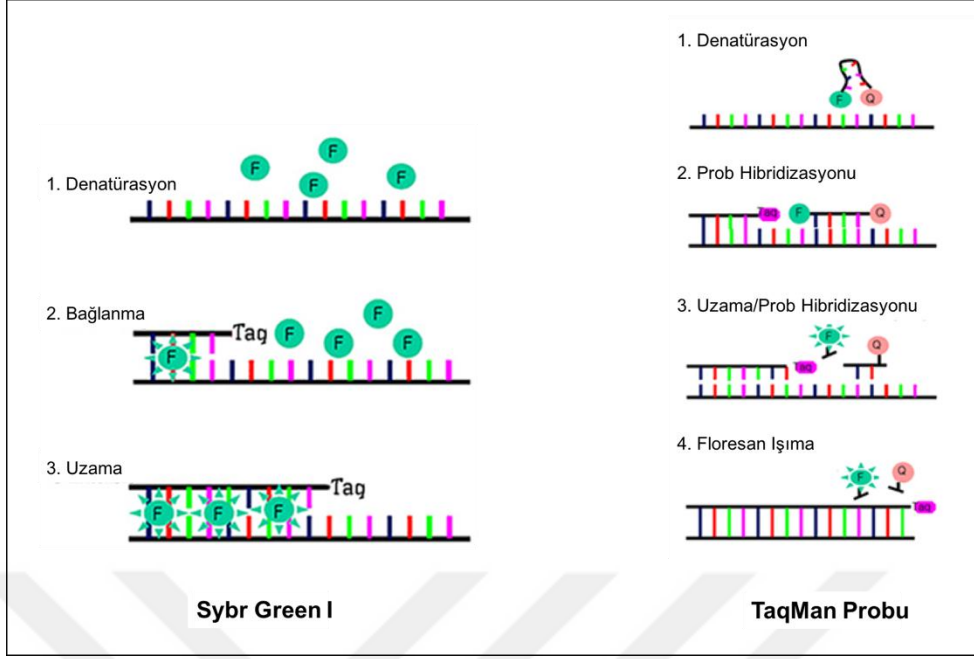
doğru orantılı olarak floresanın oluştuğu bir çoğaltma yöntemidir. Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mesajcı RNA (mRNA) düzeyini sayısal olarak belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tek nokta mutasyonlarının belirlenmesi, patojen tespiti, DNA hasarının belirlenmesi, metilasyon tespiti, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanılmaktadır (Günel, 2007).

qRT-PCR, revers transkripsiyon (RT) ve PCR amplifikasyon basamaklarından oluşur. RNA fonksiyonlarının belirlenmesi için, RNA, revers transkriptaz enzimi ile daha stabil olan komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürölür. Ardından PCR amplifikasyonu ile cDNA'lar çoğaltılarak, incelenen genlerin ekspresyon düzeyi RNA ve protein seviyesinde ayrıntılı olarak belirlenir. qRT-PCR, tek ya da çift aşamalı olarak uygulanabilir (şekil 7). Tek aşamalı qRT-PCR'da, RT ve PCR amplifikasyonu tek bir deney tüpünde, çift aşamalı qRT-PCR'da ise farklı deney tüplerinde gerçekteşir. Tek aşamalı qRT-PCR çift aşamalı qRT-PCR'dan daha kısa sürer ve daha az pipetaj yapılmasına bağlı olarak pipetaj hataları ile kontaminasyon riskini düşürölür. Ayrıca, tek aşamalı qRT-PCR, çok sayıda örnekle verimli bir çalışma imkanı sunar. Çift aşamalı qRT-PCR'da RT ve PCR amplifikasyon basamaklarının farklı tüplerde gerçekteşmesi nedeniyle RT basamağından sonra cDNA'ların saklanabilmesi ve tek bir RNA örneğiyle çok sayıda genin incelenmesi mümkündür.



Şekil 7. Tek ve çift aşamalı qRT-PCR

qRT-PCR reaksiyonunda DNA miktarının görülebilir ve ölçülebilir olmasını sağlayan floresan ışığa için Sybr Green I veya Taqman problemleri kullanılır. Sybr Green I, sadece çift zincirli DNA'ya bağlanır ve artan DNA miktarına paralel olarak floresan miktarı da eş zamanlı olarak artar. Serbest halde olan DNA iplikçığı çok az bir floresan ışığa yapar. Primerlerin DNA'ya bağlanmaya başlamasıyla Sybr Green I molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresans ışığa başlar. TaqMan problemleri 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli ve tek zincirli yapıdadır. 5' uçta raportör florokrom olarak FAM, 3' uçta ise baskılayıcı florokrom olarak TAMRA boyası bulunur. qRT-PCR reaksiyonu sırasında primerler DNA'ya bağlanarak yeni zincir oluşmaya başlar ve probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde TaqMan probu DNA polimeraz enzimi 5'-3' nükleaz aktivitesi ile raportör florokrom probdan ayrılır. Serbest hale geçen boya sinyal oluşturur ve her döngüde ürün miktarındaki artışa bağlı olarak floresan ışığa da artar (şekil 8).



Şekil 8. Sybr Green I boyası ve TaqMan probu ile floresan ışımaya

2.10. Antimikrobiyal Bileşikler Arasındaki Etkileşimlerin Değerlendirilmesi

2.10.1. Checkerboard Yöntemi

Antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimin belirlenmesinde kullanılan birbirinden farklı deneysel yöntemler ve elde edilen sonuçların sayısal değerlendirilmesi için birçok yaklaşım vardır. Antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimin belirlenmesinde kolay uygulanabilirliği açısından mikrodilüsyon temeline dayanan checkerboard yöntemi sıklıkla kullanılır (Dosler ve ark., 2015). Bu yöntemde kombine edilecek antimikrobiyal bileşiklerin seri dilüsyonları hazırlanır ve mikropalakalara artan konsantrasyonlarda yatay ve dikey düzlemde dağıtılır. Üzerine yoğunluğu 0,5 McFarland'a ulaştırılmış bakteri kültürleri eklenerek inkübe edilir. 16-20 saat inkübasyondan sonra üremenin olmadığı antimikrobiyal konsantrasyonlar belirlenir. FİK, kombinasyondaki ilaçların etkileşimlerinin matematiksel ifadesidir. Bu hesaplama yönteminde her bir bileşik için FİK, antimikrobiyal bileşiğin tek başına ve kombine kullanıldığında bakteriyi inhibe etmesi için gerekli olan konsantrasyonlarının oranlanmasıyla hesaplanır. FİK indeksi (FİK_i)

ise, kombinasyondaki her bir bileşimin FİK'lerinin toplamına eşittir. Antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşim $FİK_i \leq 0,5$ sinerjizma; $FİK_i < 4$ additif etki; $FİK_i \geq 4$ ise antagonizma olarak nitelendirilir (Lorian, 2005). Ancak checkerboard mikrodilüsyon yönteminde elde edilen sonuçlar, antimikrobiyal kombinasyonun tek bir zaman aralığındaki (16-20 saatlik inkübasyon) etkinliğini gösterir ve sadece inhibitör antimikrobiyal konsantrasyon hakkında bilgi verir (Cappelletty, 1996). Bu nedenle kombinasyonların etki şeklinin (bakteriostatik/bakterisit) belirlenmesi ve zaman veya konsantrasyona bağlı olarak antimikrobiyal kombinasyonların etkinliğinde meydana gelen değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla checkerboard testi zamana bağlı doz-yanıt deneyleriyle desteklenmelidir (Dosler ve ark. 2015).

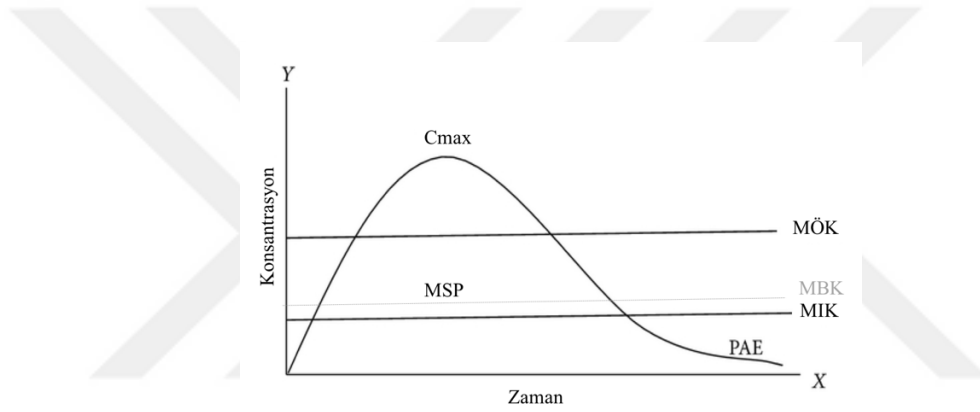
2.10.2. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri

Zamana bağlı doz-yanıt deneyleri, belirli konsantrasyonlardaki antimikrobiyal kombinasyonların varlığında sıvı besi yerindeki canlı bakteri sayısının belirli zaman noktalarında (0, 6 ve 24 s) izlenmesi temeline dayanır. Antimikrobiyal kombinasyonların etkinliği 0. saatteki toplam bakteri sayısının, sırasıyla 6 ve 24. saatlerdeki bakteri sayısına oranlanmasıyla değerlendirilir. Bakteri sayısındaki azalma $\geq 3 \log_{10}$ ise bakterisidal sinerjizma, $\geq 2 \log_{10}$ ise bakteriostatik sinerjizma, $< 2 \log_{10}$ ise additif etki; bakteri sayısındaki artışın $\geq 2 \log_{10}$ olduğu durum ise antagonizma olarak nitelendirilir (Koh ve ark., 2015). Zamana bağlı doz-yanıt deneyleri, antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimin belirlenmesinde primer yaklaşım olmamasına rağmen, checkerboard yöntemiyle elde edilen sonuçların teyid edilmesi ve klinik araştırmalar için model oluşturması bakımından önemlidir (Langeveld ve ark., 2013).

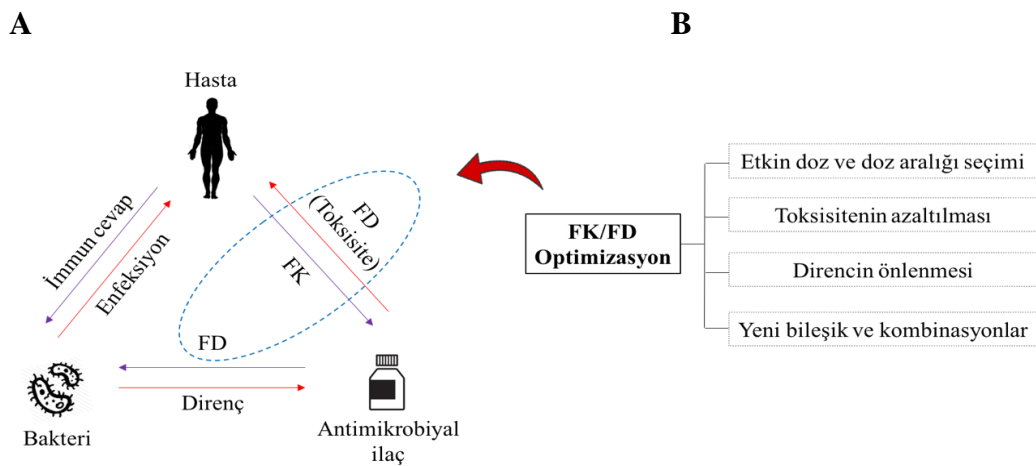
2.11. *In vitro* FK/FD Araştırmalar

Broth mikrodilüsyon ve checkerboard yöntemiyle statik sonuçlar elde edilir. Bu sonuçlar bileşiklerin ve antimikrobiyal kombinasyonların FK/FD

karakterizasyonu için en basit *in vitro* düzeneği temsil eder ve ilaca maruz kalma ile etkinlik arasındaki ilişki hakkında temel bilgiyi oluşturur. FK/FD yaklaşımlar, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar arasında köprü görevi görerek deneysel ve klinik çalışmaların verimliliğini arttırmak için olanak sunar (şekil 10A) (Friberg, 2013). Yeni kombinasyonların geliştirilmesi, mevcut bileşikler arasından en uygun seçimin yapılması, en etkin doz ile doz rejiminin belirlenmesi ve antimikrobiyal direncin önlenmesi amacıyla FK/FD modeller kullanılır (şekil 10B) (Ahmad ve ark., 2016). FK/FD araştırmalar MBK, MÖK, MF, MSP, PAE ve PA-SME'nin belirlenmesi deneylerini kapsar (şekil 9) (EMA/CVMP/261180/2012).



Şekil 9. En sık kullanılan FK/FD parametreleri



Şekil 10. (A) Antimikrobiyal terapide hasta, antimikrobiyal ilaç ve bakteri arasındaki ilişki (B) FK/FD optimizasyonunun amaçları

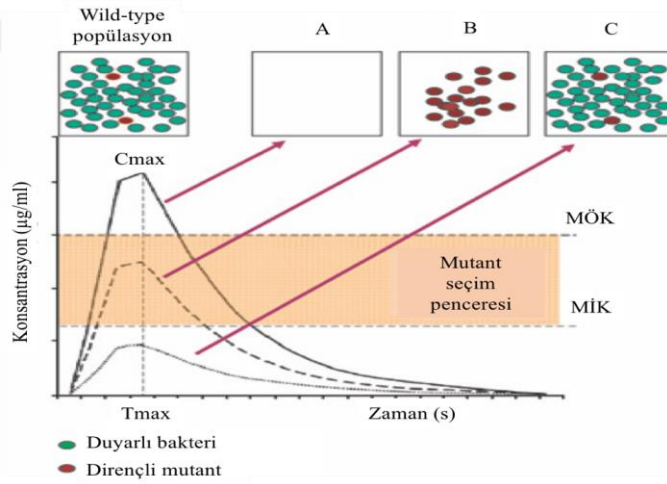
2.11.1. MBK

MBK, antimikrobiyal bileşiklerin ve kombinasyonların bakteriler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılan temel parametrelerdendir. Bakterilerin %99,9'unu öldüren en düşük ilaç konsantrasyonu MBK olarak tanımlanır. Antimikrobiyal bileşiklerin ve kombinasyonların etkinliği MBK:MİK oranına göre değerlendirilir. Buna göre MBK:MİK oranı 1-4 olan antimikrobisidler ve kombinasyonlar bakterisit, ≥ 8 olanlar ise bakteristatik etkili olarak nitelendirilir (Maaland ve ark., 2015).

2.11.2. MÖK, MÖİ, MF ve MSP

Antimikrobiyal direncin artması ve yeni bileşiklerin sentezlenmesinin zorluğu nedeniyle bakteriyel enfeksiyonların etkin tedavisinde mevcut bileşiklerin etkinliğinin yeniden kazandırılması veya yeni antimikrobiyal kombinasyonların PD özelliklerinin belirlenmesi için doz ve doz rejimi optimizasyonu önemli ve gereklidir. Böylece antimikrobiyal bileşik ve kombinasyonların terapötik etkinliği maksimize edilirken, antimikrobiyal terapi sırasında ortaya çıkabilecek direnç riski en aza indirilebilir (Balaje, 2013). MÖK, uygulandığı bakteri popülasyonunda birinci nesil mutantların oluşmasına izin vermeden bakterilerin eliminasyonunu sağlayan ilaç konsantrasyonudur ve MİK'in katları halinde uygulanan antimikrobiyalin yoğun bakteri popülasyonu üzerinde (10^{10}) meydana getirdiği morfolojik ve sayısal değişikliklerin değerlendirilmesi temeline dayanır (Marcusson ve ark., 2005). İnsan ve hayvanların bakteriyel enfeksiyonlarında, enfeksiyon bölgesinde bakteri yoğunluğu $>10^9$ 'a ulaşabilir. Bu nedenle MÖK testinde yoğun bakteri popülasyonunun kullanılması elde edilen *in vitro* sonuçların klinik araştırmalara uyarlanabilirliğini artırır (Blondeau ve ark., 2009). MİK ile MÖK arasında kalan aralık MSP olarak ifade edilir. MÖK'ün MİK'e oranlanmasıyla hesaplanan MÖİ ise MSP'nin boyutunu temsil eder (Daoud ve ark., 2014). MSP konsantrasyonları mutant bakterilerin gelişmesi için risk oluşturur (Baquero ve ark., 1997). Bu risk MF'nin belirlenmesi ile ortaya

konulabilir. MF, antimikrobiyal bileşimin MSP içinde kalan ilaç konsantrasyonlarında kullanılması durumunda bakteri popülasyonunda mutant oluşma sıklığı olarak ifade edilir (şekil 11). Rasyonel antimikrobiyal tedavide etkin tedavi ve direnci önlemek için tedavi boyunca uygulanan ilaç konsantrasyonunun MÖK'ün üzerinde olduğu sürenin uzatılması ve ilacın MSP'de kalma süresinin kısaltılması amaçlanır. Etkin doz belirlenirken $T > MİK$ yerine, $T > MÖK$ 'ün (ilaç konsantrasyonunun MÖK'ün üzerinde olduğu zaman) kullanılması ile mutant oluşumu azaltılabilir veya önlenebilir (Xu ve ark., 2013).



Şekil 11. MÖK ve MSP

2.11.3. PAE ve PA-SME

PAE ve PA-SME klinik açıdan önemli FD parametrelerdendir. PAE, antimikrobiyalin uygulanmasından kısa bir süre sonra mikroorganizma üzerinde oluşan kalıcı inhibitör etkiyi veya kombinasyonun mikroorganizma üzerindeki etkisinin sona ermesi için geçen süreyi tanımlar. Ancak inhibitör konsantrasyon ya da üzerindeki ilaç miktarıyla başlayan tedavi *in vivo* koşullarda ilacın metabolize edilmesine bağlı olarak sub-inhibitör ilaç miktarıyla devam eder. Bu nedenle PAE'nin yanı sıra PA-SME süresinin dikkate alınması klinik açıdan önemlidir (Odenholt ve ark., 2001). PAE ve PA-SME, *in vitro* olarak ilacın uzaklaştırılmasından sonra bakteriyel büyüme

kinetiğinin izlenmesiyle hesaplanır ve kombinasyonun doz aralığının belirlenmesine olanak sağlar (Lorian, 2005). PAE ile PA-SME süresi uzun olduğunda, antimikrobiyal bileşik ya da kombinasyonlar etki gücünde azalma olmaksızın daha uzun doz aralıklarında uygulanabilir. Böylece antimikrobiyal terapi sırasında oluşabilecek istenmeyen etkilerin görülme olasılığı azalır (Athamna ve ark., 2004). Bununla birlikte PAE, antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşim hakkında bilgi verir. Kombinasyonun PAE'si, bileşiklerin tek başına PAE'lerinin ortalamasından daha uzun olduğunda bileşikler arasındaki etkileşim sinerjizma, benzer olduğunda additif etki, daha kısa olduğunda ise antagonizma olarak nitelendirilir (Li ve ark., 2004). Bakteri türü, antimikrobiyal bileşiğin yapısı ve konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve besi yeri gibi faktörler PAE süresini etkiler (Athamna ve ark., 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Laboratuvar Donanımı ve Cihazlar

Araştırmalarda kullanılan donanım ve cihazlar tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Donanım ve cihaz listesi

Cihaz Adı/Marka ve modeli	Kullanım Amacı
Thermal Cyclers TECHNE TC-3000	RAPD PCR
Elektroforez CLEAVER MULTISUB CHOICE	PCR Jel Görüntüleme
Elektroforez Güç Kaynağı WWR 300V	PCR Jel Görüntüleme
Mini Santrifüj CLEAVER CSL omniSPIN	PCR Ürün Boyama
Mikrodalga Fırın VESTEL MW17	Agaroz Jel Hazırlama
Koloni Sayıcı/Görüntüleme Sistemi UVITEC Cambridge	PCR Jel Görüntüleme, Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri, MÖK, MBK, PAE ve PA-SME'nin belirlenmesi
Otomatik Spiral Hücre Yayıcı Sistem WASP	Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri, MÖK, MBK, PAE ve PA-SME'nin belirlenmesi
Real Time PCR (qRT-PCR) BIONEER	qRT-PCR
Mikro Plaka Okuyucu BIO-RAD iMark	Broth mikrodilüsyon ve checkerboard mikrodilüsyon, MBK'nın belirlenmesi
Hassas Terazı SARTORIUS BA210S	Standart Bileşik Tartımı
Turbidimetre BIOSAN DEN-1B	Broth mikrodilüsyon ve checkerboard mikrodilüsyon, MÖK, MBK, PAE ve PA-SME tespiti
Çoklu Pipetleyici EPPENDORF Research pro	MİK ve FİK testi, MÖK, MBK, PAE ve PA-SME'nin belirlenmesi
Multi Vorteks VELP CLASSIC	DNA ve RNA İzolasyonu
Mikro Santrifüj WWR GALAXY 16 DH	DNA ve RNA İzolasyonu
Dijital Kuru Blok Isıtıcı LABNET ACCUBLOCK	DNA ve RNA İzolasyonu

Soğutmalı Santrifüj	PAE ve PA-SME'nin belirlenmesi
Soğutmalı İnkübatör NÜVE ES 120	Kültür İnkübasyonu
İnkübatör NÜVE EN 055	Kültür İnkübasyonu
Orbital Karıştırıcı BIOSAN OS10	Kültür İnkübasyonu
Laminar Hava Kabini ESCO Class II BSC	Fenotipik, Moleküler ve FK/FD Çalışmaları
Pipet Seti (0.5-5 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) THERMO FINNPIPETTE F1	Fenotipik, Moleküler ve FK/FD Çalışmaları
Ultra Saf Su Sistemi ELGA	Fenotipik, Moleküler ve FK/FD Çalışmaları
Otoklav NÜVE OT 40L	Sterilizasyon
Soğutucu BOSCH	Besi Yeri ve Reaktiflerin Saklanması
Derin Dondurucu (x 2) BOSCH	Bakteri, Reaktif, DNA ve RNA İzolatlarının Saklanması

3.2. *E. coli* İzolatları ve Kontrol Suşları

1100478 numaralı TUBİTAK (COST) projesi kapsamında sağlıklı veya enfeksiyon bulgusu gösteren sığır, keçi, koyun köpek ve kedilerden rektal swap yöntemiyle 311 adet *E. coli* izolatu toplandı ve Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Kültür Koleksiyonu oluşturuldu. Antimikrobiyal kombinasyonların etkinliğini test etmek için 311 adet *E. coli* izolatu arasından Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) duyarlılık sınırına göre ENR ve DAN MİK'i 4 µg/ml veya daha düşük olan 116 adet seçildi. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında sıklıkla kullanılan *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG100 kontrol suşu olarak seçildi.

3.3. Antimikrobiyaller

Araştırmalarda 8 farklı antimikrobiyal ilaç grubundan 19 bileşik kullanıldı (tablo 2).

Tablo 2. Antimikrobiyal ilaç grupları ve bileşikler

Antimikrobiyal Grup	Antimikrobiyal Bileşikler
Florokinolonlar	Nalidiksik asit (NAL) Enrofloksasin (ENR) Danofloksasin (DAN) Orbifloksasin (ORB) Gatifloksasin (GAT) Siprofloksasin (CIP)
Beta-laktamlar	Ampisilin (AMP) Sefotaksim (CTX) Seftriakson (CRO) Sefepim (FEP) Seftiofur (CEF)
Aminoglikozidler	Gentamisin (GEN)
Sülfonamidler	Sülfametoksazol (SMX) Trimetoprim (TMP)
Tetrasiklinler	Tetrasiklin (TET) Oksitetrasiklin (OTC)
Polipeptidler	Kolistin (CST)
Makrolidler	Eritromisin (ERY)
Fenikoller	Kloramfenikol (CHL)

3.4. Fenotipik Yöntemler

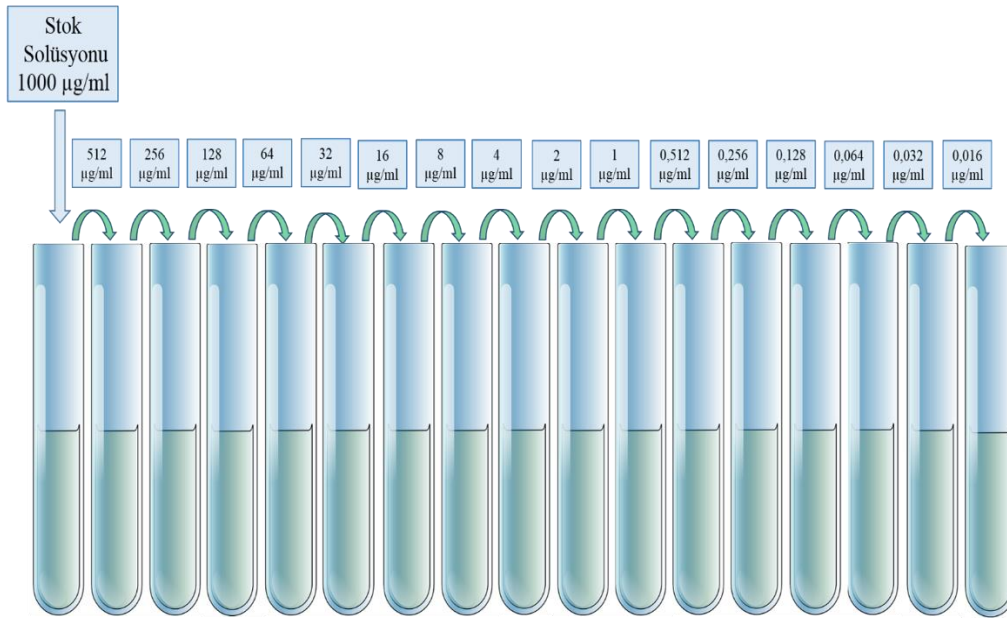
3.4.1. Broth Mikrodilüsyon

Broth mikrodilüsyon yöntemi CLSI kriterlerine göre uygulandı. (CLSI, 2012). *E. coli* izolatları MHB'de 37 °C'de 16-20 saat inkübe edilerek bakteri kültürü hazırlandı. Toz formda analitik standart olarak temin edilen antimikrobiyal bileşikler, 10:90 metanol (MeOH)/fosfat tamponlu tuz

(Phosphate Buffered Saline: PBS) (v/v) çözeltisinde çözdürüldü. Taze olarak hazırlanan stok çözeltiler 0,20 µm tek kullanımlık şırınga filtre kullanılarak (Minisart, Sartorius Stedim Biotech.) sterilize edildi. Ana stok çözeltiden her bileşik için 0,016-512 µg/ml aralığında seri dilüsyonlar hazırlandı (şekil 12). Son konsantrasyonlar 0,008-256 µg/ml aralığında olacak şekilde 50 µl antimikrobiyal seri dilüsyonları mikropalakalara dağıtıldı ve üzerine bulanıklığı 0,5 McFarland olarak standardize edilen 50 µl bakteri kültürleri eklendi (şekil 13).

Mikropalakalar 37 °C’de 16-20 saat inkübe edildi. Bakteri kültürlerinin optik yoğunlukları (Optical Density: OD) mikropalaka okuyucu sistem yardımıyla (Bio-Rad, iMark) 595 nm dalga boyunda ölçüldü ve üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlendi.

On dokuz antimikrobiyal bileşik için belirlenen MİK’ler, CLSI kriterlerine göre duyarlı ya da dirençli olarak değerlendirildi. Bakterilerin üç veya daha fazla antimikrobiyal ilaç grubunun her birinden en az bir bileşiğe karşı dirençli olması MDR olarak değerlendirildi.



Şekil 12. Broth-mikrodilüsyon testlerinde kullanılan seri dilüsyon

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	256 µg/ml	1 µg/ml	X	256 µg/ml	1 µg/ml	X	256 µg/ml	1 µg/ml	X	256 µg/ml	1 µg/ml	X
B	128 µg/ml	0,512 µg/ml	X	128 µg/ml	0,512 µg/ml	X	128 µg/ml	0,512 µg/ml	X	128 µg/ml	0,512 µg/ml	X
C	64 µg/ml	0,256 µg/ml	X	64 µg/ml	0,256 µg/ml	X	64 µg/ml	0,256 µg/ml	X	64 µg/ml	0,256 µg/ml	X
D	32 µg/ml	0,128 µg/ml	X	32 µg/ml	0,128 µg/ml	X	32 µg/ml	0,128 µg/ml	X	32 µg/ml	0,128 µg/ml	X
E	16 µg/ml	0,064 µg/ml	X	16 µg/ml	0,064 µg/ml	X	16 µg/ml	0,064 µg/ml	X	16 µg/ml	0,064 µg/ml	X
F	8 µg/ml	0,032 µg/ml	X	8 µg/ml	0,032 µg/ml	X	8 µg/ml	0,032 µg/ml	X	8 µg/ml	0,032 µg/ml	X
G	4 µg/ml	0,016 µg/ml	X	4 µg/ml	0,016 µg/ml	X	4 µg/ml	0,016 µg/ml	X	4 µg/ml	0,016 µg/ml	X
H	2 µg/ml	0,008 µg/ml	X	2 µg/ml	0,008 µg/ml	X	2 µg/ml	0,008 µg/ml	X	2 µg/ml	0,008 µg/ml	X

Antimikrobiyal_A
Antimikrobiyal_B
Antimikrobiyal_C
Antimikrobiyal_D

Şekil 13. Broth mikrodilüsyon testlerinde kullanılan antimikrobiyal konsantrasyonları ve antimikrobiyal yerleşim planı.

3.5. Moleküler Yöntemler

3.5.1. Bakteriyel DNA ve RNA İzolasyonu

3.5.1.1. DNA İzolasyonu

Gen amplifikasyonu için Genomik DNA Purifikasyon Kiti (Fermentas, K0277) kullanılarak bakteri DNA'sı izole edildi. DNA izolasyonu için seçilen bakteriler MHB'de 16-20 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bakteri kültüründen 2 ml mikrotüpe alındı, 10 dk 8000 rpm'de santrifüj uygulandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen bakteri peleti 180 µl Digestion Buffer'da süspansiyon edildi, üzerine 20 µl proteinase K solüsyonu eklendi ve 56 °C'de 30 dk thermoshaker'da inkübe edildi. Daha sonra 20 µl RNase A solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi ve 200 µl Lysis solüsyonu daha eklenerek 15 saniye (sn) vorteks uygulandı. Bir sonraki aşamada üzerine 400 µl %50 etanol eklenerek homojen bir karışım için pipetaj uygulandı. Oluşan homojenat GeneJet Genomik DNA Purification kolonuna aktarıldı, 500 µl Wash Solution I eklendi ve 1 dk 9000 rpm'de santrifüj uygulandı. Kolonun alt

bölümünde toplanan kısım uzaklaştırıldı. Ardından 500 µl Wash Solution II eklendi, 3 dk 12000 rpm'de santrifüj uygulandı ve kolonun alt bölümünde toplanan kısım tekrar uzaklaştırıldı. Son aşamada 200 µl Elution Buffer eklenerek 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 3 dk 12000 rpm'de santrifüj uygulanarak saflaştırılmış DNA elde edildi. İzole edilen DNA'lar nano drop moleküler spektrofotometrik sistemde ölçülerek miktarları belirlendi. Daha belirgin amplikonlar elde edebilmek için 50 ng/ml konsantrasyonun altındaki DNA'lar ekarte edildi ve ilgili bakteri izolatlarından yeniden DNA izole edildi. ≥ 50 ng/ml DNA izolatları kodlanarak amplifikasyon için hemen kullanıldı veya daha sonra kullanılmak üzere -25 °C'de saklandı.

3.5.1.2. Kaynatma Yöntemi ile DNA İzolasyonu

Triptik Soy Agar (TSA)'da 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilen bakteriler öze yardımıyla toplandı ve 0,2 ml steril distile su içinde çözdürülerek homojenize edildi, Daha sonra bakteri homojenatı 99 °C'de 5 dk kaynatıldı ve buz üzerinde 1 dk bekletildi. Santrifüjden sonra homojenatın üstte kalan ve DNA içeren kısmı, bakterilerin epidemiyolojik kökenlerini belirlemek için uygulanan PCR amplifikasyonunda kullanıldı.

3.5.1.3. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, eksponansiyel üreme fazında ($OD_{600} = 0,6$) bulunan bakteri kültürlerinden ticari kit (Fermentas #K0732) kullanılarak üretici firma tarafından belirtilen esaslara göre yapıldı. RNA izolasyonu için seçilen bakteriler MHB'de 16-20 saat 37 °C'de inkübe edildi. 1,5 ml bakteri kültürü mikrotüplere koyularak, 2 dk 10000 rpm'de santrifüj uygulandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerine 100 µl Tris-EDTA (TE) buffer'dan (0,4 mg/ml konsantrasyonda lizozimle karıştırılıp taze hazırlanmış) eklendi ve $15-25$ °C'de 5 dk inkübe edildi. Üzerine 300 µl Lysis Buffer (dithiothreitol: DDT ile karıştırılmış) eklendi ve homojen karışım elde edene kadar 15 sn vortex uygulandı. Daha sonra üzerine 180 µl ethanol eklendi ve pipetaj uygulandı.

Oluşan lizattan 700 µl GeneJet RNA saflaştırma kolonuna transfer edildi. 1 dk 10000 rpm’de santrifüj uygulandı ve kolonun alt kısmında kalan sıvı uzaklaştırıldı. GeneJet saflaştırma kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi ve bu işlem 2 kez tekrarlandı. Toplama tüpü uzaklaştırıldı ve GeneJet saflaştırma kolonu yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 700 µl Wash Buffer 1 eklendi ve 1 dk 10000 rpm’de santrifüj uygulandı. Kolonun alt kısmında kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolon geri yerleştirildi. Üzerine 600 µl Wash Buffer 2 eklendi ve 1 dk 10000 rpm’de santrifüj uygulandı. Kolonun alt kısmında kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolon geri yerleştirildi. Üzerine 250 µl Wash Buffer 2 eklendi ve 2 dk 10000 rpm’de santrifüj uygulandı. Kolonun alt kısmında kalan sıvı uzaklaştırıldı ve GeneJet saflaştırma kolonu 1,5 ml’lik steril RNase-free mikrotüpüne yerleştirildi. Saflaştırma kolonunun merkezine 20 µl nükleaz içermeyen su (Nuclease Free Water: NFW) eklendi. RNA elüsyonu için 1 dk 13000 rpm’de santrifüj uygulandı ve saflaştırma kolonu uzaklaştırıldı. İzole edilen RNA’lardan genomik DNA kalıntıları DNase I enzim kiti kullanılarak uzaklaştırıldı. RNA’dan cDNA sentezlemek için RevertAid’ First Strand cDNA Sentez kiti (Fermentas) kullanıldı. Buna göre RNA’lar (0,5 µg/mL) ve oligo (dT) 18 primerler 65 °C sıcaklıkta 5 dk inkübe edildikten sonra toplam hacim 12 µL olacak şekilde 4 µL 5X reaksiyon buffer, 1 U/µL RiboLock RNase inhibitor, 1 mM dNTP miks ve 10 U/µL RevertAid M-MuLV reverse transkriptaz enzim karışımı 42 °C’de 60 dk ve 70 °C’de 5 dk inkübe edilerek cDNA’lar sentezlendi. cDNA daha sonra *marA*, *acrB*, *soxS* ve *ompF* genlerinin qRT-PCR amplifikasyonunda kullanılmak üzere -25 °C’de saklandı.

3.5.2. RAPD PCR

Hayvansal kökenli *E. coli* izolatlarının epidemiyolojik tiplendirmesi RAPD amplifikasyonu ve analizi ile yapıldı. Bunun için bakteri kültüründen kaynatma yöntemiyle izole edilen DNA’lar kullanıldı.

RAPD için kullanılan primerler tablo 3’te verilmiştir. Bir reaksiyonluk amplifikasyon hacmi 27 µl olacak şekilde her bir primerden (Alpha DNA) 4

μM , 23 μl 2X PCR Master Mix (Thermo) ve 1 μl DNA karışımı kullanıldı. Amplifikasyon Techne TC3000 Thermal Cycler cihazı kullanılarak 94 °C’de 1 dk, 45 °C’de 1 dk, 72 °C’de 2 dk, 72 °C’de 10 dk olacak şekilde 45 döngü olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3. RAPD analizi için kullanılan oligonükleotidler

Hedef Bölge	Primer
	GTCATCGCAG
RAPD	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC
	TGGTGGCCTCGAGCAAGAGAACAAAG

3.5.3. PCR Amplifikasyonu

E. coli’de florokinolon direncinden sorumlu mutasyonların belirlenmesi ve PMQR genlerinin tespit edilmesi amacıyla *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *qepA* ve *oqxB* genlerine daha önce tanımlanan PCR amplifikasyonu uygulandı (Hansen ve ark., 2007; Perichon ve ark., 2007 ve Robicsek ve ark., 2006). Direnç genlerin amplifikasyonu için tablo 4’te verilen spesifik oligonükleotidler kullanıldı.

Tablo 4. Hedef gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan oligonükleotidler

Hedef Bölge	Primer	Büyükük (bp)	Kaynak
QRDR			
<i>gyrA</i>	F-ACGTACTAGGCAATGACTGG R-AGAAGTCGCCGTCGATAGAAC	189	Everet, 1996
<i>gyrB</i>	F-CAGACTGCCAGGAACGCGAT R-AGCCAAGTGC GG T GATAAGA	203	Everet, 1996
<i>parC</i>	F-TGTATGCGATGTCTGAACTG R-CTCAATAGCAGCTCGGAATA	264	Everet, 1996
<i>parE</i>	F-TACCGAGCTGTTCTTGTGG R-GGCAATGTGCAGACCATCAG	266	Everet, 1996

PMQR

<i>qepA</i>	F-CTTCTCTGGATCCTGGACAT R-TGAAGATGTAGACGCCGAAC	720	Bu tez çalışması
<i>oqxB</i>	F-ATCGGTATCTTCCAGTCACC R-ACTGTTTGTAGAACTGGCCG	541	Bu tez çalışması

gyrA, *parC* ve *oqxB* genlerinin amplifikasyonu için; bir reaksiyonluk amplifikasyon hacmi 50 µl olacak şekilde 0,2 µM her bir primer (Alpha DNA), 2,5 µl reaksiyon buffer (Fermentas), 40 µM dNTP (Fermentas), 1,25 mM MgCl₂, 1,5 U Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve 1 µl DNA kullanıldı. *gyrB* ve *parE* genleri için bir reaksiyonluk amplifikasyon hacmi 50 µl, *qepA* geni için 25 µl olacak şekilde olacak şekilde; 0,2 µM her bir primer (Alpha DNA), 2x OneTaq PCR master mix (NEB) ve 1 µl DNA kullanıldı. Genlerin amplifikasyonunda kullanılan termal programlar tablo 5-9’da verilmiştir.

Tablo 5. *gyrA* ve *parC* için termal program

Termal Siklus Programı (<i>gyrA</i> ve <i>parC</i>)			
Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	94	5 dk	1
Denaturasyon	94	1 dk	35
Bağlanma	55	1 dk	
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	10 dk	1
Soğutma	4	Süresiz	

Tablo 6. *gyrB* için termal program

Termal Siklus Programı (<i>gyrB</i>)			
Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	94	2 dk	1
Denaturasyon	94	30 sn	35
Bağlanma	60	1 dk	
Uzama	68	1 dk	
Son Uzama	68	5 dk	1
Soğutma	4	Süresiz	

Tablo 7. *parE* için termal program

Termal Siklus Programı (<i>parE</i>)			
Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	94	30 sn	1
Denaturasyon	94	30 sn	35
Bağlanma	60	1 dk	
Uzama	68	1 dk	
Son Uzama	68	5 dk	1
Soğutma	4	Süresiz	

Tablo 8. *qepA* için termal program

Termal Siklus Programı (<i>qepA</i>)			
Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	95	5 dk	1
Denaturasyon	95	30 sn	30
Bağlanma	59	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Son Uzama	72	10 dk	1
Soğutma	4	Süresiz	

Tablo 9. *oqxB* için termal program

Termal Siklus Programı (<i>oqxB</i>)			
Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	95	5 dk	1
Denaturasyon	95	30 sn	30
Bağlanma	56	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Son Uzama	72	10 dk	1
Soğutma	4	Süresiz	

3.5.4. Jel Elektrophorez ve Görüntüleme

3.5.4.1. Agaroz Jel Hazırlama

PCR amplikonlarının görüntülenebilmesi için % 1'lik, RAPD amplikonları için ise % 2'lik agaroz jel hazırlandı. Amplikon sayısına bağlı olarak küçük (55 ml), orta (75 ml) veya büyük boy (110 ml) agaroz jel tepsileri kullanıldı. Toz haldeki agaroz (AppliChem) hassas terazide (SARTORIUS BA210S) tartıldı ve 1x Tris Asetat EDTA (TAE)'da çözdürüldü. Homojen znme için mikrodalga (VESTEL MV17) fırın kullanılarak yüksek ısıda 3 dk ısıtma/kaynatma işlemi uygulandı. Homojenize agaroz çözeltisine %0,01'lik etidyum bromid (Vivantis Biochemical) eklendi ve 10 sn karıştırıldı. Son olarak çözelti agaroz tepsinine boşaltıldı ve katılaşması için oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. Daha sonra agaroz jel elektrophorez küvetine yerleştirildi.

3.5.4.2. Jel Elektrophorez

PCR amplikonlarının görüntülenebilmesi için 5 µl amplikonun üzerine 2 µl yükleme boyası (Bio-Rad), RAPD amplikonlarının görüntülenebilmesi için ise 8 µl amplikonun üzerine 2 µl yükleme boyası eklendi ve pipetajla karıştırıldıktan sonra jelde oluşturulan kuyucuklara konuldu. Amplikon büyüklüğünü belirlemek amacıyla 100 bp'lik DNA marker (Fermentas) kullanıldı. Elektrophorez 120 V ve 30 dk olarak uygulandı.

3.5.4.3. Görüntüleme

RAPD PCR ve konvansiyonel PCR'la elde edilen amplikonların büyüklüğü jel görüntüleme sistemi (UVITECH Cambrige) ile FireReader Version 15 ve ultraviyole (UV) filtre kullanılarak kontrol edildi. Elde edilen görüntü UVIssoft-UVIBand yazılımı ile değerlendirildi.

3.5.5. qRT-PCR Amplifikasyonu

qRT-PCR amplifikasyonunda kullanılmak üzere saklanan cDNA'lar 1:10 oranda NFW ile dilüe edildi. qRT-PCR için tablo 10'da verilen primer çiftleri ve normalizasyon için *16S rRNA* referans geni kullanıldı. qRT-PCR, hidroliz problemleri kullanılarak yetkili firma tarafından belirtilen esaslara göre uygulandı. Amplifikasyon, başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 10 dk, denatürasyon 95 °C'de 15 sn, bağlanma 60 °C'de 30 sn, uzama 72 °C'de 1 sn ve son uzama 40 °C'de 30 sn olacak şekilde 45 döngü olarak iki paralel çalışıldı. Ekspresyon verileri LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche) ile analiz edildi. Referans gene göre *marA*, *acrB* ve *soxS* genlerindeki ekspresyon düzeylerindeki 1,5 katlık artış, *ompF* geni için ise 1,5 katlık azalma MDR fenotipi ile ilişkilendirildi (Karczmarczyk ve ark., 2011).

Tablo 10. qRT-PCR'da kullanılan oligonükleotidler

Hedef Bölge	Primer	Büyüklik (bp)	Kaynak
MDR			
<i>16S rRNA</i>	F-ATGCCGCGTGTATGAAGAA	93	UPL, Roche
	R-GGTAACGTCAATGAGCAAAGG		
<i>marA</i>	F-CCGTAAGATGACGGAAATCG	62	UPL, Roche
	R-CCAGATAGAGTATCGGCTCGTT		
<i>acrB</i>	F-GCGGGAACCATCCTGATT	65	UPL, Roche
	R-CGCGTCTGACCTCTACTGAA		
<i>soxS</i>	F-GCAATGGACCTGGGTTATGT	61	UPL, Roche
	R-CAAACCTGCCGACGAAAA		
<i>ompF</i>	F-CGTACCAACCTGCAAGAAGC	65	UPL, Roche
	R-CCAGTAGCCCACTGTTCAGC		

3.6. Sinerji Testleri

3.6.1. Checkerboard Mikrodilüsyon

E. coli izolatları MHB'da 37 °C'de 16-20 saat inkübe edilerek bakteri kültürü hazırlandı. Toz formda analitik standart olarak temin edilen antimikrobiyal bileşikler, 10:90 MeOH/PBS (v/v) çözeltilisinde çözdürüldü. Taze olarak hazırlanan stok çözeltiler 0,20 µm tek kullanımlık şırınga filtre kullanılarak (Minisart, Sartorius Stedim Biotech.) sterilize edildi. Kombine edilecek iki bileşik için MHB ile seri dilüsyon (1/32, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 4 x MİK) hazırlandı.

Antimikrobiyal _B	1/32 x MİK _A 4 x MİK _B	1/16 x MİK _A 4 x MİK _B	1/8 x MİK _A 4 x MİK _B	1/4 x MİK _A 4 x MİK _B	1/2 x MİK _A 4 x MİK _B	1 x MİK _A 4 x MİK _B	2 x MİK _A 4 x MİK _B	4 x MİK _A 4 x MİK _B
	1/32 x MİK _A 2 x MİK _B	1/16 x MİK _A 2 x MİK _B	1/8x MİK _A 2 x MİK _B	1/4 x MİK _A 2 x MİK _B	1/2 x MİK _A 2 x MİK _B	1 x MİK _A 2 x MİK _B	2 x MİK _A 2 x MİK _B	4 x MİK _A 2 x MİK _B
	1/32 x MİK _A 1 x MİK _B	1/16 x MİK _A 1 x MİK _B	1/8 x MİK _A 1 x MİK _B	1/4 x MİK _A 1 x MİK _B	1/2 x MİK _A 1 x MİK _B	1 x MİK _A 1 x MİK _B	2 x MİK _A 1 x MİK _B	4 x MİK _A 1 x MİK _B
	1/32 x MİK _A 1/2 x MİK _B	1/16 x MİK _A 1/2 x MİK _B	1/8 x MİK _A 1/2 x MİK _B	1/4 x MİK _A 1/2 x MİK _B	1/2 x MİK _A 1/2 x MİK _B	1 x MİK _A 1/2 x MİK _B	2 x MİK _A 1/2 x MİK _B	4 x MİK _A 1/2 x MİK _B
	1/32 x MİK _A 1/4 x MİK _B	1/16 x MİK _A 1/4 x MİK _B	1/8x MİK _A 1/4 x MİK _B	1/4x MİK _A 1/4 x MİK _B	1/2 x MİK _A 1/4 x MİK _B	1 x MİK _A 1/4 x MİK _B	2 x MİK _A 1/4 x MİK _B	4 x MİK _A 1/4 x MİK _B
	1/32 x MİK _A 1/8 x MİK _B	1/16 x MİK _A 1/8 x MİK _B	1/8 x MİK _A 1/8 x MİK _B	1/4 x MİK _A 1/8 x MİK _B	1/2 x MİK _A 1/8 x MİK _B	1 x MİK _A 1/8 x MİK _B	2 x MİK _A 1/8 x MİK _B	4 x MİK _A 1/8 x MİK _B
	1/32 x MİK _A 1/16 x MİK _B	1/16 x MİK _A 1/16 x MİK _B	1/8 x MİK _A 1/16 x MİK _B	1/4 x MİK _A 1/16 x MİK _B	1/2 x MİK _A 1/16 x MİK _B	1 x MİK _A 1/16 x MİK _B	2 x MİK _A 1/16 x MİK _B	4 x MİK _A 1/16 x MİK _B
	1/32 x MİK _A 1/32 x MİK _B	1/16 x MİK _A 1/32 x MİK _B	1/8 x MİK _A 1/32 x MİK _B	1/4 x MİK _A 1/32 x MİK _B	1/2 x MİK _A 1/32 x MİK _B	1 x MİK _A 1/32 x MİK _B	2 x MİK _A 1/32 x MİK _B	4 x MİK _A 1/32 x MİK _B
Antimikrobiyal _A								

Şekil 14. Checkerboard mikrodilüsyon yöntemine göre antimikrobiyal ilaçların dağıtılması

Hazırlanan dilüsyonlar, Bambeke ve ark. (2006) tarafından belirtilen checkerboard mikrodilüsyon yöntemine göre mikropalakalara dağıtıldı ve üzerine bulanıklığı 0,5 McFarland olarak standardize edilen bakteri kültürleri eklendi. Mikropalakaların 37 °C'de 16-20 s inkübasyonundan sonra kültürlerin OD'leri 595 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucu sistemle (Bio-Rad, iMark)

ölçüldü. Mikroorganizmayı inhibe eden MİK, kombinasyonun FİK'i olarak değerlendirildi.

3.6.1.1. FİK ve FİKİ Hesaplama

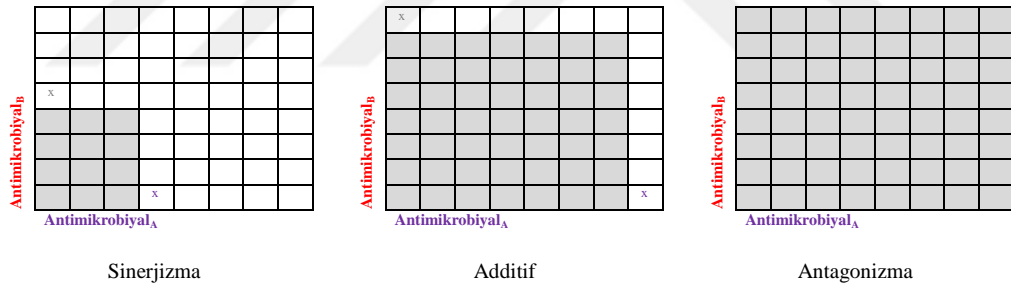
İki antimikrobiyal bileşik arasındaki etkileşimin belirlenmesi (şekil 15) amacıyla aşağıda belirtilen formüle göre kombinasyonların FİKİ'leri hesaplandı.

$$FİK_{(A)} = MİK_{A (Kombinasyon)} / MİK_{A (Bireysel)}$$

$$FİK_{(B)} = MİK_{B (Kombinasyon)} / MİK_{B (Bireysel)}$$

$$FİKİ = FİK_{(A)} + FİK_{(B)}$$

Sinerjizma: $FİKİ \leq 0,5$; additif etki: $0,5 < FİKİ \leq 4$; antagonizma: $FİKİ > 4$ olarak nitelendirildi (Lorian, 2005).



Şekil 15. Antimikrobiyal ilaçlar arasındaki etkileşimin checkerboard yöntemine değerlendirilmesi (X; Antimikrobiyal bileşiklerin kombinasyondaki MİK'i)

3.6.2. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri

Checkerboard mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen etkileşim sonuçlarının teyid edilmesi için zamana bağlı doz-yanıt deneyleri Petersen ve ark. (2006) tarafından belirtilen yöntemle yapıldı. Zamana bağlı doz-yanıt deneylerinde antimikrobiyal bileşiklerin checkerboard mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen FİK düzeyleri kullanıldı. 10^6 colony forming unit

(cfu)/ml bakteri yoğunluğuna sahip 5 ml MHB'ye kombine edilecek antimikrobiyal ilaçlar FİK düzeylerinde eklendi ve 37 °C'de inkübe edildi. 0, 6 ve 24. saatlerde, seri dilüsyon yapılan bakteri kültürlerinden 100 µl örnek alınarak otomatik spiral plater (WASP; Don Whitley Scientific) yardımı ile Plate Count Agar (PCA)'a yayıldı ve 37 °C'de inkübe edildi. Görüntüleme sistemi (UVITEC Cambridge) ve UVIsoft-UVIBand yazılımıyla koloni sayımı yapılarak 0-6-24. saatlerde bakteri yoğunluğundaki değişiklikler değerlendirildi. 6 ve 24. saatte yapılan örneklemelerde bakteri yoğunluğundaki azalmanın $\geq 3 \log_{10}$ olduğu etkileşim bakterisidal sinerjizma; $\geq 2 \log_{10}$ olduğu etkileşim bakteriostatik sinerjizma; $< 2 \log_{10}$ olduğu etkileşim additif; bakteri yoğunluğunun $\geq 2 \log_{10}$ artması ise antagonizma olarak nitelendirildi.

3.7. *In vitro* FD Testleri

3.7.1. MBK Testi

Aralarında sinerjizma gözlenen 5 antimikrobiyal bileşik (CRO, CEF, DAN, GEN ve CST) ve bu 5 bileşikle oluşturulan 4 kombinasyon (CEF+DAN, CEF+GEN, CRO+CST ve DAN+CST) için MBK testi daha önce tanımlanan yönteme göre uygulandı (Hansen ve Blondeau, 2005). *E. coli* izolatları MHB'de 37 °C'de 16-20 s inkübe edilerek bakteri kültürü hazırlandı. Toz formda analitik standart olarak temin edilen antimikrobiyal bileşikler, 10:90 MeOH/PBS (v/v) zeltisinde zdrld. Taze olarak hazırlanan stok zeltiler 0,20 µm tek kullanımlık şiringa filtre kullanılarak (Minisart, Sartorius Stedim Biotech.) sterilize edildi. MHB kullanılarak seri ilaç dilüsyonları hazırlandı. Her antimikrobiyal bileşik için 1, 2, 4, 8 ve 16 x MİK ilaç içeren MHB ile hazırlanan seri dilüsyonlardan 125 µl; her kombinasyon için ise 1, 2, 4, 8 ve 16 x FİK ilaç içeren dilüsyonlardan kombinasyonu oluşturan antimikrobiyal bileşiklerden 62,5'er µl alınarak mikroplakalara dağıtıldı ve üzerlerine yoğunluğu 10^7 cfu/ml olarak standardize edilmiş 125 µl bakteri kültürü eklendi.

MBK testi için 37 °C'de 16-20 s inkübe edilen mikropalakalardaki bakteri kültüründen 100 µl alınarak otomatik spiral yayıcı sistem (Whitley's Automatic Spiral Plater: WASP) yardımı ile TSA'ya ekildi. Daha sonraki aşamada 72 s süreyle besi yerindeki üremeler izlendi ve koloni sayımı yapıldı. İlaça maruz bırakılmayan besi yerindeki koloni sayısına göre 3 log₁₀'luk azalmanın olduğu konsantrasyon MBK_{99,9} olarak tayin edildi. Antimikrobisyonların bireysel ve kombinasyondaki etkinliğinin belirlenmesi için MBK:MİK oranı hesaplandı. MBK:MİK oranı 1-4 olan antimikrobiyal bileşikler ve kombinasyonlar bakterisidal, ≥ 8 olanlar bakteristatik etkili olarak nitelendirildi (Maaland, 2015).

3.7.2. MÖK, MÖK:MİK, MF ve MSP'nin Belirlenmesi

E. coli izolatları için MÖK tespiti Blondeau ve ark. (2001) tarafından belirtilen yöntemle göre uygulandı. 100 ml MHB içeren steril beherlerde 37 °C'de 16-20 s inkübe edilerek bakteri kültürü hazırlandı. Her bir bakteri kültüründen 25 ml alınarak 4 farklı steril plastik deney tüpüne aktarıldı ve 9000 rpm'de 15 dk santrifüj uygulandı. Yaklaşık 10¹⁰ cfu/ml bakteri yoğunluğu elde edebilmek için oluşan bakteri peletlerinin üzerine 0,75 ml MHB eklenerek kültür homojenatı oluşturuldu.

Her ilaç için önceden yapılan MİK testi sonuçlarına göre değişen konsantrasyonlarda (1 x MİK → 64 x MİK) antimikrobiyal içeren plakalara WASP yardımıyla seri bakteri dilüsyonları (100 µl) ekildi ve 37 °C'de 72 s boyunca inkübe edildi. Her 24 saatte bir görüntüleme cihazıyla koloni sayımı yapılarak kolonilerdeki sayısal değişiklikler izlendi. Hiçbir bakteri üremesinin olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu MÖK olarak tayin edildi. Kombinasyonların MF'leri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$MF = \frac{\text{Ortalama mutant sayısı} \times \text{Konsantrasyon faktörü}}{\text{konsantrasyon sayısı}} \times \frac{1}{\text{Toplam cfu sayısı}}$$

3.7.3. PAE ve PA-SME'nin Belirlenmesi

E. coli izolatlarında PAE ve PA-SME'nin tespiti daha önce tanımlanan yöntemlere göre yapıldı (Lorian, 2005). Antimikrobiyal bileşiklerin bireysel PAE ve PA-SME tespitinde broth mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen MİK düzeyleri, antimikrobiyal kombinasyonların PAE ve PA-SME tespitinde ise checkerboard mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen FİK düzeyleri kullanıldı. *E. coli* izolatlarının kültürü 5 ml MHB içeren steril cam tüplerde 37 °C'de 16-20 s inkübe edilerek hazırlandı. Logaritmik üreme fazında 5×10^7 cfu/ml yoğunlukta bakteri üretmek için bir gece önce üremeye bırakılan bakteri kültüründen 1/20 oranda dilüsyon yapılarak, 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde 1 s inkübe edildi. Antimikrobiyal eklenmeden önceki koloni sayımı için bakteri dilüsyonları WASP yardımıyla 100 µl MHA içeren petrilere ekildi. Logaritmik üreme fazındaki bakteri kültüründen 1 ml alınarak önceden ısıtılmış antimikrobiyal içeren (1 x MİK ve 4 x MİK) ve içermeyen (kontrol grubu) 9 ml MHB'ye eklendi. Hazırlanan inokülüm 1 s boyunca çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. İlacın uzaklaştırılması için antimikrobiyal içeren (1 x MİK ve 4 x MİK) inokülüm ile kontrol inokülümü plastik santrifüj tüplere alınarak 1500 g'de 10 dk santrifüj uygulandı ve inokülümlar sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra 10 ml PBS ile yıkandı. Santrifüj ve yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Oluşan bakteri peleti önceden ısıtılmış 10 ml MHB'de çözdürüldü. Antimikrobiyal uzaklaştırıldıktan hemen sonra koloni sayımı için WASP yardımıyla bakteri dilüsyonları (100 µl) MHA içeren petrilere ekildi. PAE'deki inokülümlar (1 x MİK, 4 x MİK ve antimikrobiyal içermeyen) çalkalayıcı inkübatörde bekletildi ve 6 saat boyunca her saatte bir koloni sayımı için örnek alındı. PA-SME tespiti için ise 0,1; 0,2 ve 0,3 x MİK antimikrobiyal içeren 9 ml MHB'ye 1 x MİK ve 4 x MİK ile indüklenmiş post antibiyotik etki altındaki inokülümlardan 1'er ml eklendi ve PAE tespitine paralel olarak 6 s boyunca her saatte bir koloni sayımı için örnek alındı. Alınan her bir örnek için koloni sayımı yapılarak *E. coli* izolatlarına ait logaritmik üreme eğrisi çizildi. Bir saat antimikrobiyale maruz bırakılan inokulum (1 x MİK ve 4 x MİK) ve kontrol

inokülümü için bakteri sayısındaki 1 log'luk artış için gerekli zaman hesaplandı ve aşağıdaki formül kullanılarak PAE ve PA-SME süreleri belirlendi.

$$\text{PAE: } T_{(\text{test})} - K_{(\text{kontrol})}$$

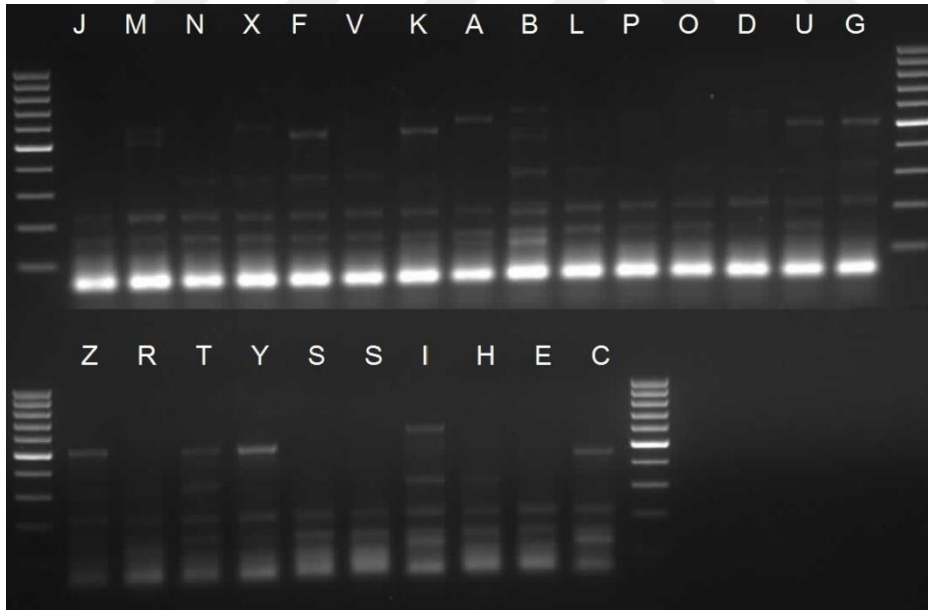
Antimikrobiyal kombinasyonların PAE ve PA-SME tespitinde ise 1 x FİK ve 0,1; 0,2 ile 0,3 x FİK düzeyleri kullanıldı, diğer tüm basamaklar bireysel bileşiklerle paralel olarak yürütüldü.

Tek yönlü varyans analizinin (ANOVA) ardından LSD çoklu karşılaştırma testi uygulanarak antimikrobiyal bileşikler ile kombinasyonların PAE ve PA-SME süreleri incelendi. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık değeri olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hayvanlardan İzole Edilen *E. coli*'nin Epidemiyolojik Tiplendirmesi

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Kültür Koleksiyonunda bulunan 311 *E. coli* izolatu arasında CLSI duyarlılık sınırına göre ENR ve DAN MİK'i 4 µg/ml ve daha düşük olan 116 adet seçildi. Toplam 116 izolata uygulanan RAPD sonucu 24 farklı epidemiyolojik köken belirlendi. Fenotipik ve genotipik özelliklerine göre her bir epidemiyolojik kökenden daha sonraki araştırmalarda kullanılmak üzere birer adet izolat seçildi. *E. coli* izolatlarının epidemiyolojik kökenleri alfabetik olarak kodlandı. Genotipik çeşitliliği nedeniyle S olarak kodlanan epidemiyolojik kökenden iki adet izolat seçildi. Direnç karakterizasyon çalışmalarına toplam 25 izolatla devam edildi.



Şekil 16. *E. coli* izolatlarının RAPD analizine göre epidemiyolojik kökenleri

4.2. Fenotipik Karakterizasyon

Epidemiyolojik kökenlerine göre sınıflandırılan 25 izolatın MDR fenotipi, 8 farklı antimikrobiyal ilaç grubundan 19 bileşik kullanılarak belirlendi. *E. coli* izolatlarının üremelerini inhibe eden MİK, CLSI kriterlerine göre değerlendirildi (tablo 11). *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik paneli tablo 12’de gösterilmiştir. Buna göre en duyarlı izolat *E. coli* E175 ve en dirençli izolat *E. coli* E245 olarak tespit edildi. *E. coli* izolatlarının florokinolon grubundan en duyarlı olduğu bileşik ENR olarak belirlendi (25/25, %100). Florokinolon grubu bileşiklerin hepsine karşı duyarlı olan *E. coli* izolatı sayısı 9/25 (%36), β-laktam grubu bileşiklerin hepsine karşı duyarlı olan *E. coli* izolatı sayısı 14/25 (%56) olarak tespit edildi. *E. coli* izolatlarının β-laktam grubundan en duyarlı olduğu bileşik FEP (24/25, %96), en dirençli olduğu bileşik AMP olarak belirlendi (8/25, %32). Bir aminoglikozid olan GEN’e karşı dirençli *E. coli* izolatı sayısı 3/25 (%12), CHL’ye karşı dirençli *E. coli* izolatı sayısı 12/25 (%48), tetrasiklin grubu bileşiklere karşı dirençli *E. coli* izolatı sayısı 11/25 (%44), ERY’e karşı dirençli *E. coli* izolatı sayısı 16/25 (%64), CST’ye karşı dirençli *E. coli* izolatı sayısı ise 8/25 (%32) olarak tespit edildi.

Bakterilerin üç veya daha fazla antimikrobiyal ilaç grubunun her birinden en az bir bileşiğe karşı dirençli olması MDR olarak değerlendirildi. Buna göre izolatların 22/25’inde (%88) MDR fenotipi belirlendi.

Tablo 11. Hayvanlardan izole edilen *E. coli* izolatlarında MDR'in fenotipik karakterizasyonu

İzolatlar	MİK (µg/ml)																			
	Florokinolonlar						β-laktamlar					Sülfonamidler		Amino- glikozid	Tetrasiklinler		Makrolid	Fenikol	Polimiksini	
	Nalidiksik Asit	Enrofloksasin	Danofloksasin	Siprofloksasin	Orbifloksasin	Gatifloksasin	Ampisilin	Sefotaksim	Seftriakson	Sefepim	Seftiofur	Sülfametoksazol	Trimetoprim	Gentamisin	Tetrasiklin	Oksitetrasiklin	Eritromisin	Kloramfenikol	Kolistin	
	(NAL)	(ENR)	(DAN)	(CIP)	(ORB)	(GAT)	(AMP)	(CTX)	(CRO)	(FEP)	(CEF)	(SMT)	(TMP)	(GEN)	(TET)	(OTC)	(ERY)	(CHL)	(CST)	
E145	16	0,032	0,064	8	64	0,016	4	0,128	0,016	0,064	0,512	128	128	4	2	≥256	≥256	8	8	
E159	4	0,032	0,064	0,016	0,128	0,016	4	0,256	≤0,008	0,256	0,512	128	0,128	4	0,512	0,512	64	8	4	
E306	32	1	1	2	64	0,512	256	0,256	0,064	0,128	4	0,064	≥256	2	128	128	256	32	2	
E205	32	1	1	0,032	0,128	0,032	4	0,256	0,016	0,512	4	128	8	4	4	2	256	8	2	
E269	256	2	1	0,256	2	0,512	4	0,256	0,128	0,032	1	128	256	4	256	256	32	4	4	
E114	8	1	1	0,512	0,128	0,032	4	0,128	0,032	0,128	2	128	0,256	16	16	1	64	8	2	
E210	16	0,064	0,064	0,128	0,064	0,032	8	0,256	0,064	0,512	2	128	0,256	4	2	2	≥256	16	2	
E264	4	0,032	0,128	0,032	0,128	0,016	4	0,064	0,032	0,032	1	128	0,256	4	1	0,512	≥256	8	4	
E249	4	0,032	0,064	0,016	0,064	0,512	4	0,064	≤0,008	0,256	2	128	0,256	4	1	4	≥256	16	4	
E7	0,512	0,512	0,512	0,016	0,256	≤0,008	128	0,128	0,016	0,032	4	128	64	4	32	256	256	16	8	
E140	128	2	2	0,016	0,128	0,016	4	0,128	0,512	0,512	2	128	0,256	4	8	256	64	4	2	
E175	4	0,016	0,064	0,016	0,064	0,016	4	0,128	0,016	0,256	1	128	0,128	4	2	2	64	8	2	
E21	4	0,032	0,032	0,256	0,128	0,016	8	1	0,016	0,032	1	128	0,256	4	4	2	256	16	2	
E28	128	2	2	0,512	32	2	2	8	16	32	64	128	1	4	4	4	32	8	≥256	
E201	32	0,128	0,256	0,032	0,256	0,256	128	0,256	≤0,008	0,064	1	128	16	4	128	8	256	64	2	
E194	0,256	1	2	0,016	0,128	0,256	256	0,016	0,032	0,064	1	128	0,256	2	16	4	32	128	2	
E213	8	0,128	0,256	0,032	0,256	0,032	4	0,512	0,256	0,256	4	128	4	4	2	2	≥256	32	2	
E245	≥256	2	2	2	32	8	≥256	0,256	2	0,128	16	0,064	0,512	128	256	256	128	128	2	
E246	≥256	1	1	0,512	16	2	≥256	0,512	0,032	0,512	2	0,256	≥256	64	256	≥256	64	32	8	
E222	≥256	2	2	4	8	1	4	0,064	0,256	0,256	2	128	256	4	128	256	64	16	2	
E208	4	0,064	0,128	0,016	1	16	4	256	32	0,256	2	128	≥256	4	1	0,512	64	1	2	
E116	≥256	4	4	4	4	1	≥256	0,256	0,128	0,512	2	128	256	4	128	256	≥256	≥256	2	
E112	128	1	1	0,032	0,128	0,016	8	0,512	1	0,032	32	128	0,512	4	8	4	64	8	0,512	
E248	16	1	1	0,512	32	0,512	≥256	0,256	16	0,032	2	0,256	2	4	32	64	64	4	2	
E211	32	0,128	0,128	0,032	0,256	0,064	8	0,256	0,256	0,512	0,512	128	1	4	4	2	≥256	8	4	
<i>E. coli</i> 25922	2	0,512	1	0,256	16	4	32	0,512	0,016	0,512	8	0,032	≥256	2	8	8	128	0,512	4	
<i>E. coli</i> AG100	8	0,512	1	0,256	8	8	≥256	0,512	0,128	1	8	0,512	2	8	8	256	256	1	2	

*S: duyarlı; R: dirençli

Tablo 12. *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal dirençlilik paneli

İzolatlar	Epidemiyolojik kökeni	Dirençli olduğu bileşikler
E145	A	NAL, CIP, ORB, SMX, TMP, OTC, ERY, CST
E159	B	SMX, CST
E306	C	NAL, CIP, ORB, AMP, TMP, TET, OTC, ERY, CHL
E205	D	NAL, SMX, TMP, ERY
E269	E	NAL, SMX, TMP, TET, OTC, CST
E114	F	SMX, GEN
E210	G	NAL, SMX, ERY, CHL
E264	H	SMX, ERY, CST
E249	I	SMX, ERY, CHL, CST
E7	J	AMP, SMX, TMP, TET, OTC, ERY, CHL
E140	K	NAL, SMX, OTC
E175	L	SMX
E21	M	SMX, ERY, CHL
E28	N	NAL, ORB, GAT, CTX, CRO, FEP, CEF, SMX, CST
E201	O	NAL, AMP, SMX, TMP, TET, ERY, CHL
E194	P	AMP, SMX, CHL
E213	R	SMX, ERY, CHL
E245	S	NAL, CIP, ORB, GAT, AMP, CEF, GEN, TET, OTC, ERY, CHL
E246	S	NAL, GAT, AMP, TMP, GEN, TET, OTC, CHL, CST
E222	T	NAL, CIP, SMX, TMP, TET, OTC, CHL
E208	U	GAT, CTX, CRO, SMX, TMP
E116	V	NAL, DAN, CIP, AMP, SMX, TET, OTC, ERY, CHL
E112	X	NAL, CEF, SMX
E248	Y	NAL, ORB, AMP, CRO, TET, OTC
E211	Z	NAL, SMX, ERY, CST

4.3. Moleküler Karakterizasyon

4.3.1. Florokinolon Direncinin Moleküler Karakterizasyonu

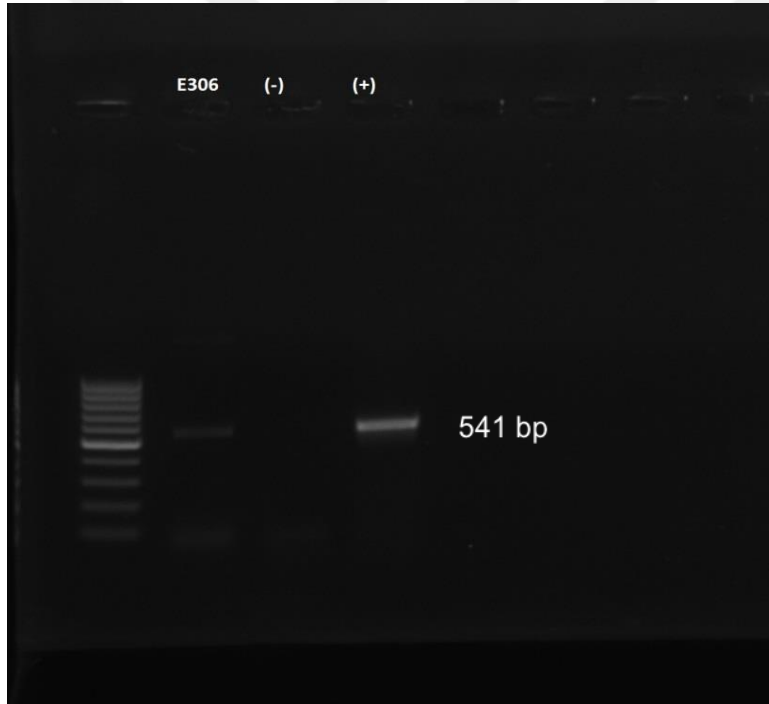
4.3.1.1. Florokinolon Direncinden Sorumlu Genlerdeki Mutasyonların Belirlenmesi

gyrA, *gyrB*, *parC* ve *parE* genlerindeki mutasyonların belirlenmesi için spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilen PCR örnekleri sekanslama için gönderildi (Macrogen co., Kore). *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parE* genlerinin DNA

nükleotid dizileri BLAST programı kullanılarak analiz edildi. *E. coli* E306 izolatının *gyrA* geninde Ser-83→Thr, *E. coli* E246 izolatının *gyrA* geninde Ser-83→Leu, *E. coli* E245 izolatının *gyrA* geninde ise Ser-83→Leu ile Asp-87→Gly mutasyonları belirlendi. *E. coli* E222 izolatının *gyrA* geninde Ser-83→Leu ve *parC* geninde Ser-80→Ile mutasyonu birlikte tespit edildi. *E. coli* izolatlarının hiçbirinde *gyrB* ve *parE* genlerine ait mutasyon gözlenmedi.

4.3.1.2. Florokinolon Direncinden Sorumlu PMQR Genlerinin Tespiti

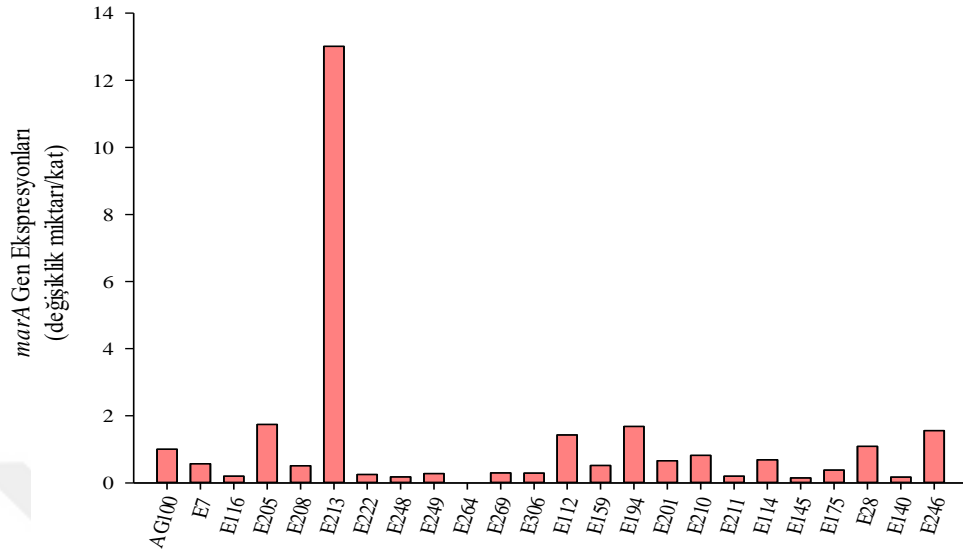
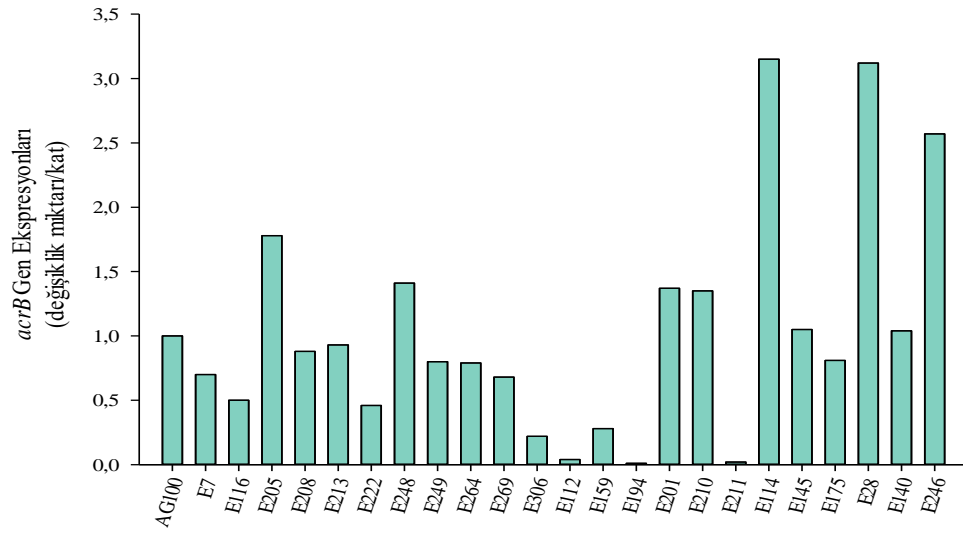
PCR sonuçlarına göre *E. coli* E306'da *oqxB* geni tespit edildi. *oqxB* pozitif izolat şekil 17'de gösterilmiştir. *E. coli* izolatlarının hiçbirinde *qepA* geni tespit edilemedi.

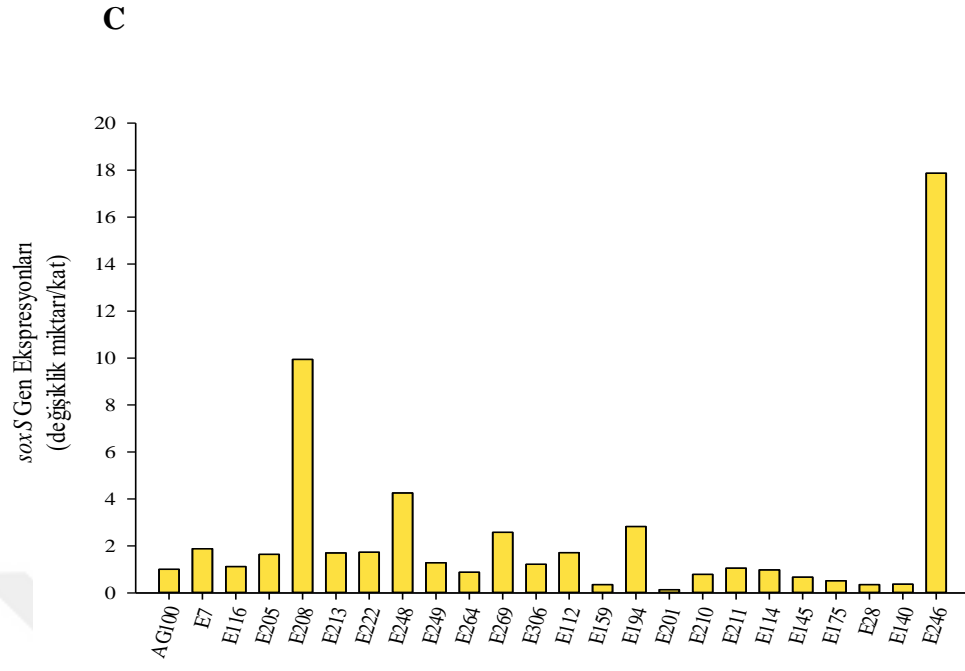


Şekil 17. *E. coli* E306 izolatında *oqxB* geni

4.3.2. MDR'ın Moleküler Karakterizasyonu

marA, *acrB* ve *soxS* genlerinin ekspresyonunda 1,5 katlık artış, *ompF* geni ekspresyonunda ise 1,5 katlık azalma geri çıkartım pompası aktivasyonu olarak değerlendirildi ve MDR ile ilişkilendirildi. *E. coli* izolatların 13/25'inde (%52) MDR'dan sorumlu gen ekspresyon değişikliği belirlendi. *E. coli* izolatlarının gen ekspresyonları şekil 18 (A, B, C, D)'de görülebilir. En duyarlı izolat olan *E. coli* E175'te *marA*, *acrB*, *soxS* ve *ompF* genlerinde MDR ile ilişkilendirilen hiçbir ekspresyon değişikliği tespit edilmedi. NAL, GAT, AMP, TMP, GEN, TET, OTC, CHL ve CST'ye karşı dirençli olan *E. coli* E246 izolatında *marA*'da 1,56; *acrB*'de 2,57 ve *soxS* geninde 17,87 katlık ekspresyon artışı, *ompF* geni ekspresyonunda 23 katlık azalma belirlendi. NAL, SMP, TMP ve ERY'ye karşı dirençli *E. coli* E205'te *marA*'da 1,74; *acrB*'de 1,78 ve *soxS* geninde 1,63 katlık ekspresyon artış tespit edildi. CTX, GEN, ERY ve CHL'ye karşı dirençli *E. coli* E213'te *marA*'da 13 ve *soxS* geninde 1,7 katlık ekspresyon artışı, *ompF* geni ekspresyonunda ise 3,06 katlık azalma tespit edildi. *E. coli* E194'te *marA*'da 1,68 ve *soxS* geninde 2,82 katlık ekspresyon artışı belirlendi. *E. coli* izolatlarında tek başına en sık ekspresyon değişikliği *soxS* geninde belirlendi (6/25, %24). MDR fenotipi göstermeyen *E. coli* E114 ve E159 izolatlarında sırasıyla tek başına *acrB* ve *ompF* geni ekspresyon değişikliği tespit edildi.

A**B**



Şekil 18. *E. coli*'de MDR'dan sorumlu genlerin ekspresyon düzeyleri (A) *marA* ekspresyonu; (B) *acrB* ekspresyonu (C) *soxS* ekspresyonu; (D) *ompF* ekspresyonu

4.4. Antimikrobiyal İlaçlar Arasındaki Etkileşimlerin Belirlenmesi

Antimikrobiyal ilaçlar arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi için FİK testi kullanıldı ve elde edilen sonuçlar zamana bağlı doz-yanıt deneyleriyle teyid edildi. Sinerji testlerinde tablo 13'te belirtilen antimikrobiyal ilaç grupları ve bileşikler kullanıldı.

Tablo 13. Sinerji testlerinde kullanılan antimikrobiyal ilaç kombinasyonları

Antimikrobiyal Kombinasyonlar					
β-laktam+Florokinolon			β-laktam+ Aminoglikozid	β-laktam+ Polimiksin	Florokinolon+ Polimiksin
FEP+CIP	CRO+CIP	CEF+CIP	FEP+GEN	FEP+CST	CIP+CST
FEP+ENR	CRO+ENR	CEF+ENR	CRO+GEN	CRO+CST	ENR+CST
FEP+DAN	CRO+DAN	CEF+DAN	CEF+GEN	CEF+CST	DAN+CST

β-laktam grubundan 3, florokinolonlardan 3, aminoglikozidlerden 1 ve polimiksinlerden 1 bileşik kullanılarak 18 antimikrobiyal ilaç kombinasyonu oluşturuldu. Kombinasyonların antimikrobiyal etkinliği, antimikrobiyal direnç profili belirlenen 25 izolat arasından fenotipik özellikleri ve moleküler karakterizasyonlarındaki varyasyonlar göz önünde bulundurularak seçilen 6 adet *E. coli* izolatı (E175, E222, E245, E246, E269, E306) ve 2 standart suş (*E. coli* 25922 ile *E. coli* AG100) kullanılarak değerlendirildi.

4.4.1. FİK Tespiti

On sekiz antimikrobiyal kombinasyon arasındaki etkileşim checkerboard yöntemiyle belirlendi ve FİK'i'leri hesaplandı. Kombine edilen ilaçlar arasındaki etkileşim tipi sinerjizma (SİN; FİK*i* ≤ 0,5) additif etki (ADD; 0,5 < FİK*i* ≤ 4) ve antagonizma (ANT; FİK*i* > 4) olarak değerlendirildi. Checkerboard yönteminde her kombinasyon için en az iki FİK*i* hesaplandı ve en düşük FİK*i*, zamana bağlı doz-yanıt deneylerinde kullanıldı. Antimikrobiyal ilaçlar arasındaki etkileşimler tablo 14-19'da verilmiştir.

4.4.1.1. β -laktam+Florokinolon Kombinasyonu

4.4.1.1.1. FEP+Florokinolon

FEP+CIP kombinasyonunun FİKi'leri 0,37 ve 4,06; FEP+ENR kombinasyonunun 0,28 ve 2,03; FEP+DAN kombinasyonunun ise 0,31 ve 2,03 aralığında bulundu (tablo 14). FEP+CIP, FEP+ENR ve FEP+DAN kombinasyonlarının, *E. coli* izolatlarının 2/6'sına (%33) karşı sinerjistik etkili olduğu belirlendi. FEP+florokinolon kombinasyonları arasında antagonizma sadece FEP+CIP kombinasyonu için *E. coli* E269'a karşı gözlemlendi.

Tablo 14. Sefepim+Florokinolon kombinasyonlarının checkerboard yöntemine göre etkileşimleri

İzolatlar	-laktam+Florokinolon								
	FEP+CIP			FEP+ENR			FEP+DAN		
	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Checkerboard FiKi	Etkileşim	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Checkerboard FiKi	Etkileşim	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Checkerboard FiKi	Etkileşim
E175	0,064/0,002	0,37	SİN	0,064/0,002	0,37	SİN	0,064/0,004	0,31	SİN
E222	0,128/2	1,00	ADD	0,008/4	2,03	ADD	0,256/0,128	1,06	ADD
E245	0,004/2	1,03	ADD	0,004/4	2,03	ADD	0,004/4	2,03	ADD
E246	0,256/0,032	0,56	ADD	0,128/0,032	0,28	SİN	0,128/0,064	0,31	SİN
E269	0,128/0,016	4,06	ANT	0,001/2	1,03	ADD	0,001/1	1,03	ADD
E306	0,064/0,064	0,50	SİN	0,064/0,128	0,62	ADD	0,064/0,128	0,62	ADD
<i>E. coli</i> 25922	0,016/0,064	0,28	SİN	0,016/0,064	0,15	SİN	0,008/0,016	0,02	SİN
<i>E. coli</i> AG100	4/1	8,00	ANT	4/2	8,00	ANT	4/4	8,00	ANT

4.4.1.1.2. CRO+Florokinolon

CRO+CIP kombinasyonunun FİKİ'leri 0,28 ve 4,12; CRO+ENR kombinasyonunun 0,09 ve 3,00; CRO+DAN kombinasyonunun ise 0,12 ve 3,00 aralığında bulundu (tablo 15). CRO+CIP, CRO+ENR ve CRO+DAN kombinasyonlarının *E. coli* izolatlarına karşı sırasıyla %66, %50 ve %33 oranda sinerjistik etkili olduğu belirlendi. CRO+florokinolon kombinasyonları arasında antagonizma sadece CRO+CIP kombinasyonu için *E. coli* E175'e karşı gözlemlendi.

Tablo 15. Seftriakson+Florokinolon kombinasyonlarının checkerboard yöntemine göre etkileşimleri

İzolatlar	-laktam+Florokinolon								
	CRO+CIP			CRO+ENR			CRO+DAN		
	Konsantrasyon (µg/ml)	Checkerboard FiKi	Etkileşim	Konsantrasyon (µg/ml)	Checkerboard FiKi	Etkileşim	Konsantrasyon (µg/ml)	Checkerboard FiKi	Etkileşim
E175	0,064/0,002	4,12	ANT	0,016/0,032	3,00	ADD	0,032/0,064	3,00	ADD
E222	0,008/1	0,28	SİN	0,032/0,064	0,15	SİN	0,064/1	0,75	ADD
E245	0,064/0,512	0,28	SİN	0,128/0,064	0,09	SİN	0,128/0,128	0,12	SİN
E246	0,001/0,512	1,03	ADD	0,001/1	1,03	ADD	0,001/1	1,03	ADD
E269	0,032/0,008	0,28	SİN	0,016/0,256	0,25	SİN	0,032/0,032	0,28	SİN
E306	0,002/1	0,50	SİN	0,064/0,064	1,06	ADD	0,064/0,032	1,03	ADD
<i>E. coli</i> 25922	0,0005/0,128	0,50	SİN	0,0005/0,064	0,15	SİN	0,0005/0,128	0,09	SİN
<i>E. coli</i> AG100	0,032/0,016	0,31	SİN	0,032/0,016	0,28	SİN	0,032/0,032	0,28	SİN

4.4.1.1.3. CEF+Florokinolon

CEF+CIP kombinasyonunun FİKİ'leri 0,16 ve 0,63; CEF+ENR ve CEF+DAN kombinasyonlarının ise 0,16 ve 0,50 aralığında bulundu (tablo 16). CEF+CIP kombinasyonunun *E. coli* izolatlarının 5/6'sına (%83) karşı, CEF+ENR ve CEF+DAN kombinasyonlarının ise *E. coli* izolatlarının hepsine (%100) karşı sinerjistik etkili olduğu belirlendi. CEF+florokinolon kombinasyonlarının hiçbirinde *E. coli* izolatlarına karşı antagonizma gözlenmedi.

Tablo 16. Seftiofur+florokinolon kombinasyonlarının checkerboard yöntemine göre etkileşimleri

-laktam+Florokinolon									
İzolatlar	CEF+CIP			CEF+ENR			CEF+DAN		
	Konsantrasyon	Checkerboard		Konsantrasyon	Checkerboard		Konsantrasyon	Checkerboard	
	(µg/ml)	FİKİ	Etkileşim	(µg/ml)	FİKİ	Etkileşim	(µg/ml)	FİKİ	Etkileşim
E175	0,512/0,0005	0,50	SİN	0,512/0,0005	0,50	SİN	0,512/0,002	0,50	SİN
E222	0,064/1	0,28	SİN	0,512/0,512	0,50	SİN	0,512/0,512	0,50	SİN
E245	2/0,256	0,25	SİN	1/0,512	0,31	SİN	2/0,512	0,38	SİN
E246	0,064/0,128	0,28	SİN	0,256/0,256	0,38	SİN	0,256/0,256	0,38	SİN
E269	0,512/0,032	0,63	ADD	0,128/0,256	0,25	SİN	0,032/0,512	0,50	SİN
E306	0,512/0,064	0,16	SİN	0,512/0,032	0,16	SİN	0,512/0,032	0,16	SİN
<i>E. coli</i> 25922	0,512/0,008	0,09	SİN	0,512/0,016	0,09	SİN	0,512/0,064	0,09	SİN
<i>E. coli</i> AG100	16/0,512	4,00	ANT	32/0,512	5,00	ANT	32/0,064	4,06	ANT

4.4.1.2. β -laktam+Aminoglikozid Kombinasyonu

FEP+GEN kombinasyonunun FİKİ'leri 0,06 ve 1,12; CRO+GEN kombinasyonunun 0,07 ve 1,50; CEF+GEN kombinasyonunun ise 0,16 ve 0,50 aralığında bulundu (tablo 17). FEP+GEN ve CRO+GEN kombinasyonlarının *E. coli* izolatlarına karşı sırasıyla %66 ve %50 oranda, CEF+GEN kombinasyonunun ise *E. coli* izolatlarının hepsine (%100) karşı sinerjistik etkili olduğu belirlendi. β -laktam+GEN kombinasyonlarının hiçbirinde *E. coli* izolatlarına karşı antagonizma gözlenmedi.

Tablo 17. β -laktam+Aminoglikozid kombinasyonlarının checkerboard yöntemine göre etkileşimleri

β -laktam+Aminoglikozid									
İzolatlar	FEP+GEN			CRO+GEN			CEF+GEN		
	Konsantrasyon	Checkerboard		Konsantrasyon	Checkerboard		Konsantrasyon	Checkerboard	
	(μ g/ml)	FİKİ	Etkileşim	(μ g/ml)	FİKİ	Etkileşim	(μ g/ml)	FİKİ	Etkileşim
E175	0,032/0,128	0,15	SİN	0,002/2	0,62	ADD	0,128/1	0,37	SİN
E222	0,032/1	0,37	SİN	0,032/2	0,62	ADD	0,128/1	0,31	SİN
E245	0,128/16	1,12	ADD	0,128/1	0,07	SİN	1/16	0,18	SİN
E246	0,004/4	0,06	SİN	0,001/4	0,09	SİN	0,512/8	0,38	SİN
E269	0,002/2	0,50	SİN	0,032/0,128	0,28	SİN	0,256/1	0,50	SİN
E306	0,016/2	1,00	ADD	0,064/1	1,50	ADD	0,512/0,064	0,16	SİN
<i>E. coli</i> 25922	0,064/0,064	0,15	SİN	0,008/1	1,00	ADD	1/0,256	0,25	SİN
<i>E. coli</i> AG100	0,032/1	0,15	SİN	0,032/1	0,37	SİN	0,256/4	0,50	SİN

4.4.1.3. β -laktam+Polimiksin Kombinasyonu

FEP+CST kombinasyonunun FİKİ'leri 0,13 ve 1,03; CRO+CST kombinasyonunun 0,01 ve 2,03; CEF+CST kombinasyonunun ise 0,16 ve 0,75 aralığında bulundu (tablo 18). FEP+CST kombinasyonunun *E. coli* izolatlarının 2/6'sına (%33) karşı, CRO+CST ve CEF+CST kombinasyonlarının ise *E. coli* izolatlarının 4/6'sına (%66) karşı sinerjistik etkili olduğu belirlendi. β -laktam+CST kombinasyonlarının hiçbirinde *E. coli* izolatlarına karşı antagonizma gözlenmedi.

Tablo 18. β -laktam+Polimiksin kombinasyonlarının checkerboard yöntemine göre etkileşimleri

β-laktam+Polimiksin									
İzolatlar	FEP+CST			CRO+CST			CEF+CST		
	Konsantrasyon	Checkerboard		Konsantrasyon	Checkerboard		Konsantrasyon	Checkerboard	
	(μ g/ml)	FİKİ	Etkileşim	(μ g/ml)	FİKİ	Etkileşim	(μ g/ml)	FİKİ	Etkileşim
E175	0,064/0,064	0,28	SİN	0,002/2	1,12	ADD	0,256/1	0,75	ADD
E222	0,008/2	1,03	ADD	0,128/0,064	0,50	SİN	0,128/1	0,56	ADD
E245	0,064/1	1,00	ADD	0,128/0,064	0,09	SİN	4/0,512	0,50	SİN
E246	0,004/1	0,13	SİN	0,128/0,016	0,01	SİN	0,128/1	0,18	SİN
E269	0,032/0,128	1,03	ADD	0,004/1	0,28	SİN	0,032/2	0,50	SİN
E306	0,004/2	1,03	ADD	0,002/4	2,03	ADD	0,512/0,064	0,16	SİN
<i>E. coli</i> 25922	0,032/0,256	0,19	SİN	0,0005/2	1,03	ADD	1/2	0,62	ADD
<i>E. coli</i> AG100	4/8	8,00	ANT	0,512/8	8,00	ANT	32/1	4,50	ANT

4.4.1.4. Florokinolon+Polimiksin Kombinasyonu

CIP+CST kombinasyonunun FİKİ'leri 0,15 ve 1,03; ENR+CST kombinasyonunun 0,15 ve 1,25; DAN+CST kombinasyonunun ise 0,15 ve 2,03 aralığında bulundu (tablo 19). CIP+CST, ENR+CST ve DAN+CST kombinasyonlarının *E. coli* izolatlarına karşı sırasıyla %83, %33 ve %66 oranda sinerjistik etkili olduğu belirlendi. Florokinolon+CST kombinasyonlarının hiçbirinde *E. coli* izolatlarına karşı antagonizma gözlenmedi.

Tablo 19. Florokinolon+Polimiksin kombinasyonlarının checkerboard yöntemine göre etkileşimleri

Florokinolon+Polimiksin									
İzolatlar	CIP+CST			ENR+CST			DAN+CST		
	Konsantrasyon	Checkerboard		Konsantrasyon	Checkerboard		Konsantrasyon	Checkerboard	
	(µg/ml)	FİKİ	Etkileşim	(µg/ml)	FİKİ	Etkileşim	(µg/ml)	FİKİ	Etkileşim
E175	0,0005/2	1,03	ADD	0,0005/2	1,03	ADD	0,002/4	2,03	ADD
E222	2/0,064	0,50	SİN	2/0,512	1,25	ADD	0,064/1	0,50	SİN
E245	0,064/1	0,50	SİN	0,128/2	1,06	ADD	0,064/1	0,50	SİN
E246	0,016/1	0,15	SİN	0,032/1	0,15	SİN	0,032/1	0,15	SİN
E269	0,008/2	0,50	SİN	1/0,256	0,56	ADD	0,064/1	0,31	SİN
E306	0,256/0,512	0,38	SİN	0,032/1	0,50	SİN	0,064/1	0,56	ADD
<i>E. coli</i> 25922	0,032/0,512	0,38	SİN	0,016/4	2,03	ADD	0,512/0,512	0,50	SİN
<i>E. coli</i> AG100	0,008/0,512	0,15	SİN	0,064/0,512	0,25	SİN	0,064/0,512	0,19	SİN

4.4.2. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri

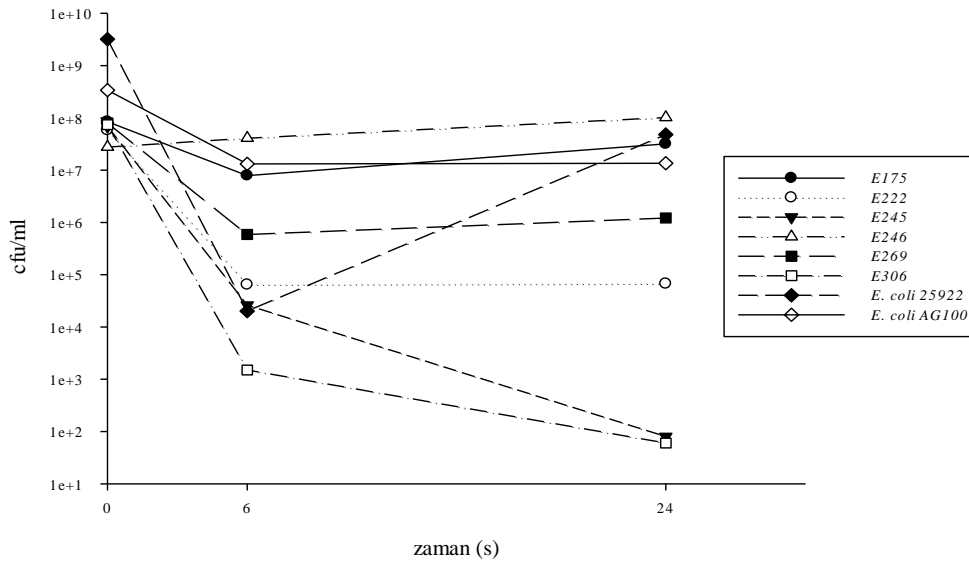
4.4.2.1. β -laktam+Florokinolon Kombinasyonu

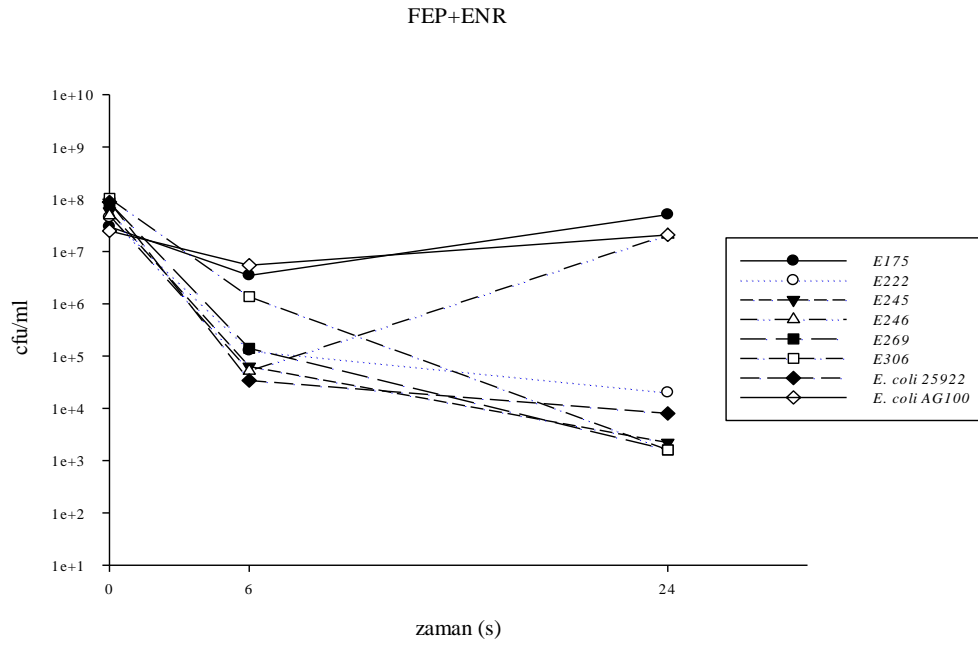
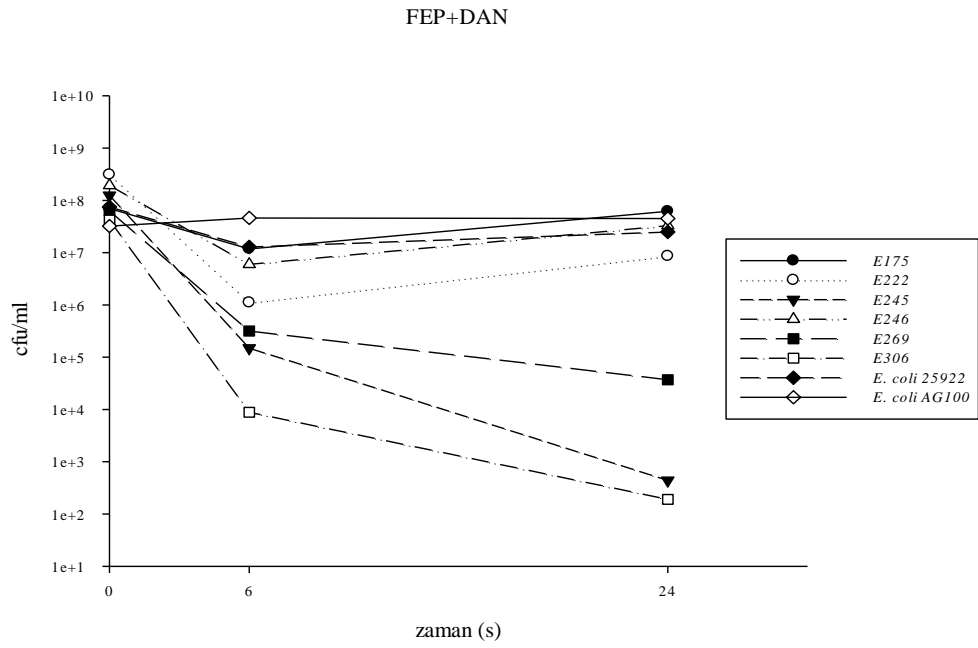
4.4.2.1.1. FEP+Florokinolon

FEP+florokinolon kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt deneyleri sonuçları şekil 19 (A, B C) ile tablo 20’de verilmiştir. Buna göre sefepim+florokinolon kombinasyonlarının, 6. ve 24. saatte en duyarlı izolat olan *E. coli* E175’e karşı additif etkili olduğu belirlendi. Bununla birlikte 6. saatte FEP+CIP kombinasyonunun dirençli *E. coli* izolatlarının hepsine karşı (%100), FEP+ENR ve FEP+DAN kombinasyonlarının ise 4/5’ine (%80) karşı sinerjistik etkili olduğu tespit edildi. 24. saatte FEP+CIP, FEP+ENR ve FEP+DAN kombinasyonlarının dirençli *E. coli* izolatlarına karşı sırasıyla %60, %80 ve %60 oranda sinerjistik etkili olduğu belirlendi. FEP+florokinolon kombinasyonlarının hiçbirinde 6. ve 24. saatte antagonizma gözlenmedi.

A

FEP+CIP



B**C**

Şekil 19. Sefepim+florokinolon kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt grafikleri (A) FEP+CIP; (B) FEP+ENR; (C) FEP+DAN

Tablo 20. Sefepim+Florokinolon kombinasyonlarının 6 ve 24. saat etkileşimleri

B-laktam+Florokinolon													
İzolatlar	FEP+CIP				FEP+ENR				FEP+DAN				
	Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*		
	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 h	24 s	6 s	24 s	
E175	1,03	0,42	ADD	ADD	0,93	-0,23	ADD	ADD	0,77	0,05	ADD	ADD	
E222	2,96	2,94	SİN ^b	SİN ^b	2,55	3,35	SİN ^b	SİN ^a	2,45	1,56	SİN ^b	ADD	
E245	3,42	5,94	SİN ^a	SİN ^a	2,97	4,43	SİN ^b	SİN ^a	2,92	5,45	SİN ^b	SİN ^a	
E246	3,51	1,51	SİN ^a	ADD	2,97	0,36	SİN ^b	ADD	1,51	0,76	ADD	ADD	
E269	2,13	1,82	SİN ^b	ADD	2,79	4,73	SİN ^b	SİN ^a	2,30	3,23	SİN ^b	SİN ^a	
E306	4,69	6,09	SİN ^a	SİN ^a	1,88	4,81	ADD	SİN ^a	3,68	5,34	SİN ^a	SİN ^a	
<i>E. coli</i> 25922	5,20	1,82	SİN ^a	ADD	3,42	4,05	SİN ^a	SİN ^a	0,76	0,47	ADD	ADD	
<i>E. coli</i> AG100	1,41	1,40	ADD	ADD	0,65	0,07	ADD	ADD	-0,15	-0,14	ADD	ADD	

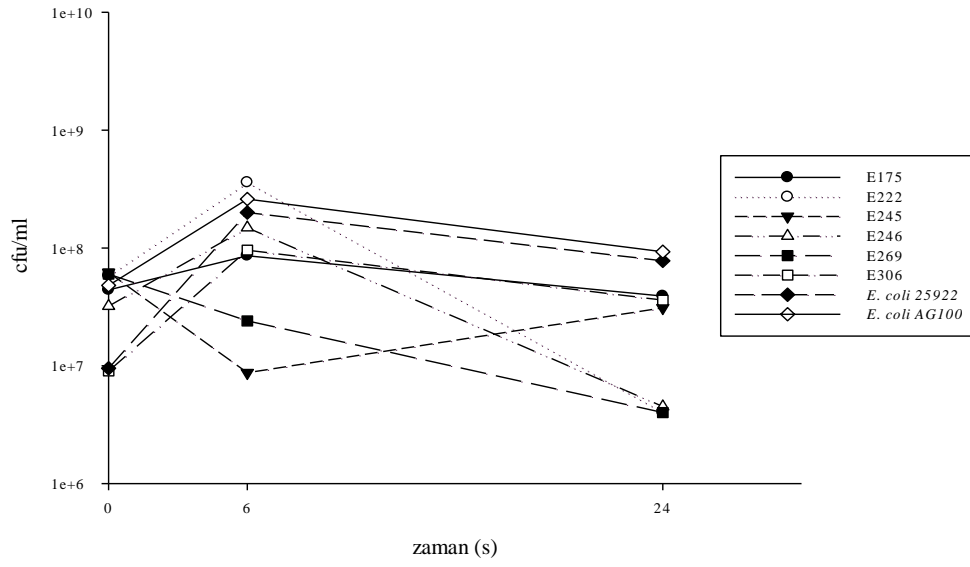
*a: Bakterisidal sinerjizma; b: Bakteriostatik sinerjizma

4.4.2.1.2. CRO+Florokinolon

CRO+florokinolon kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt deneyleri sonuçları şekil 20 (A, B C) ile tablo 21’de verilmiştir. Buna göre CRO+CIP kombinasyonunun 6. ve 24. saatte *E. coli* izolatlarının hepsine karşı additif etkili olduğu gözlemlendi. CRO+ENR kombinasyonu *E. coli* E175 ve E269’a karşı 6. saatte bakteriostatik sinerjistik etkili olmasına rağmen, 24. saatte additif etkili olduğu ve *E. coli* E306’ya karşı ise 6. saatte bakterisidal sinerjistik etkiliyken, 24. saatte bakteriostatik sinerjistik etkili olduğu belirlendi. CRO+DAN kombinasyonunun 6. saatte *E. coli* izolatlarının 1/6’sına (%16) karşı, 24. saatte ise 3/6’sına (%50) karşı sinerjistik etkili olduğu gözlemlendi. CRO+florokinolon kombinasyonlarının hiçbirinde 6. ve 24. saatte antagonizma tespit edilmedi.

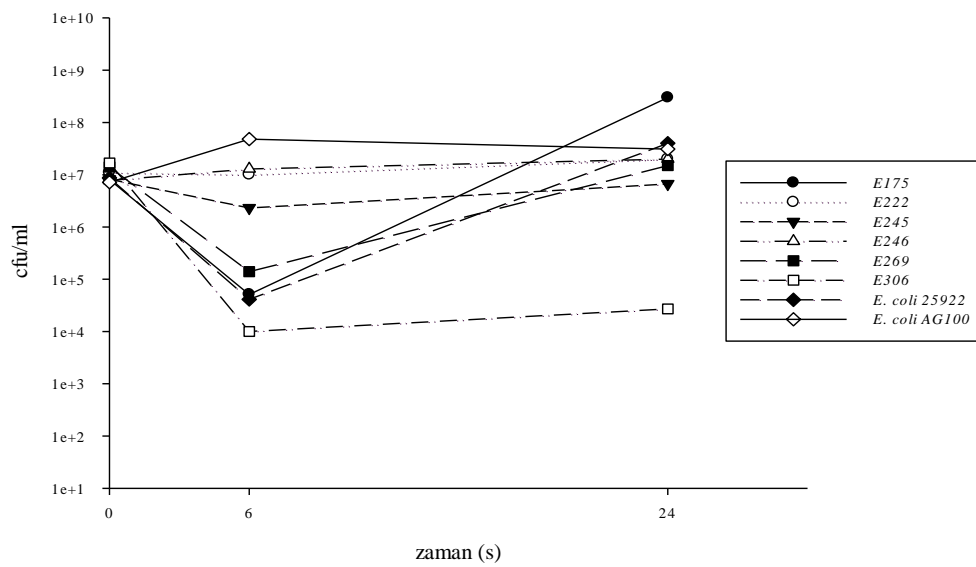
A

CRO+CIP

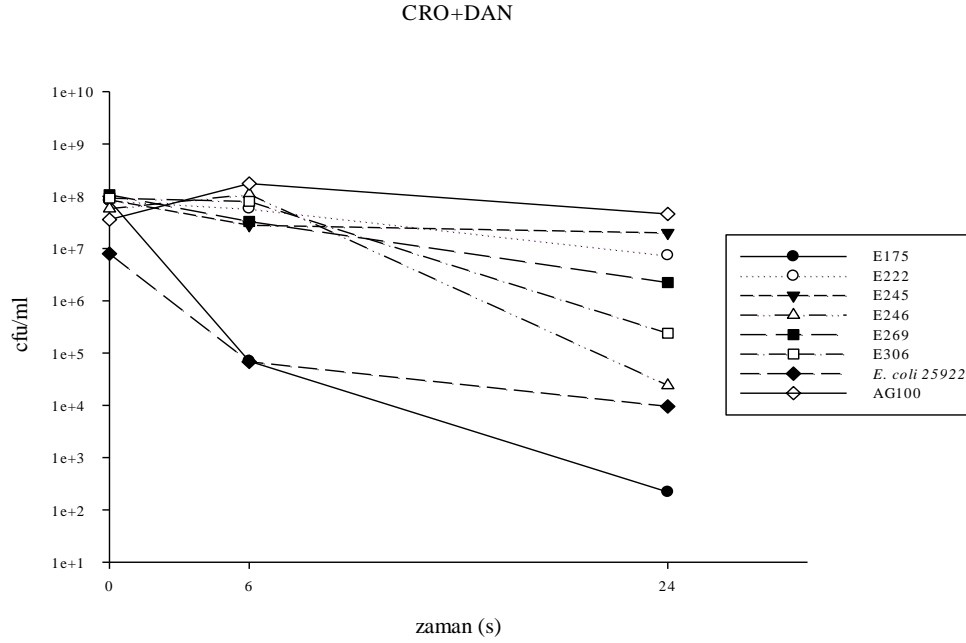


B

CRO+ENR



C



Şekil 20. Seftriakson+florokinolon kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt grafikleri (A) CRO+CIP; (B) CRO+ENR; (C) CRO+DAN

Tablo 21. Seftriakson+Florokinolon kombinasyonlarının 6 ve 24. saat etkileşimleri

β-laktam+Florokinolon												
İzolatlar	CRO+CIP				CRO+ENR				CRO+DAN			
	Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*	
	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 h	24 s	6 s	24 s
E175	-0,29	-0,05	ADD	ADD	2,20	-1,57	SİN ^b	ADD	3,07	5,58	SİN ^a	SİN ^a
E222	-0,79	1,16	ADD	ADD	0,04	-0,26	ADD	ADD	0,15	1,05	ADD	ADD
E245	0,85	0,30	ADD	ADD	0,54	0,08	ADD	ADD	0,48	0,63	ADD	ADD
E246	-0,66	0,85	ADD	ADD	-0,22	-0,40	ADD	ADD	-0,27	3,38	ADD	SİN ^a
E269	0,39	1,18	ADD	ADD	2,0	-0,02	SİN ^b	ADD	0,51	1,68	ADD	ADD
E306	-1,03	-0,60	ADD	ADD	3,23	2,79	SİN ^a	SİN ^b	0,06	2,58	ADD	SİN ^b
<i>E. coli</i> 25922	-1,32	-0,91	ADD	ADD	2,33	-0,66	SİN ^b	ADD	2,07	2,93	SİN ^b	SİN ^b
<i>E. coli</i> AG100	-0,73	-0,28	ADD	ADD	-0,82	-0,63	ADD	ADD	-0,68	-0,01	ADD	ADD

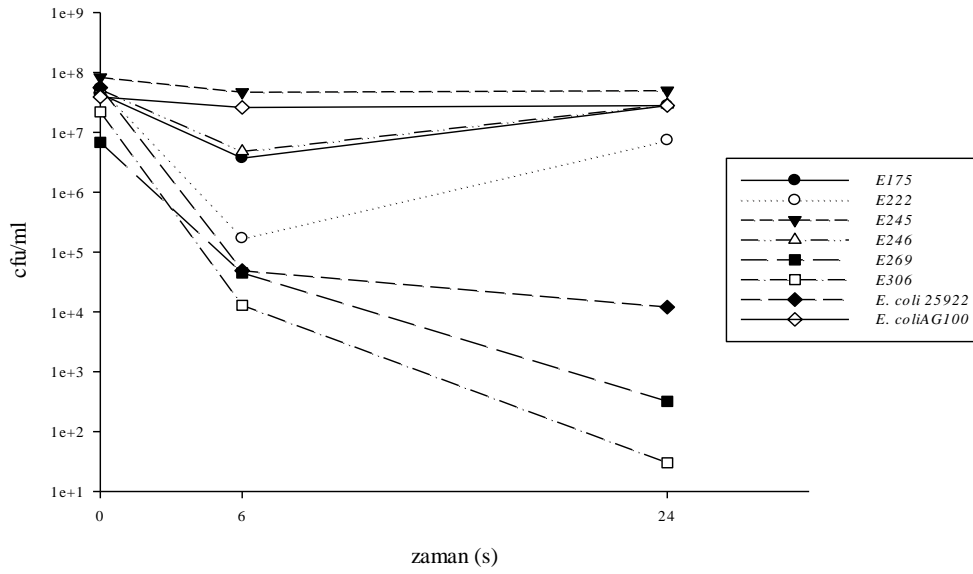
*a: Bakterisidal sinerjizma; b: Bakteriostatik sinerjizma

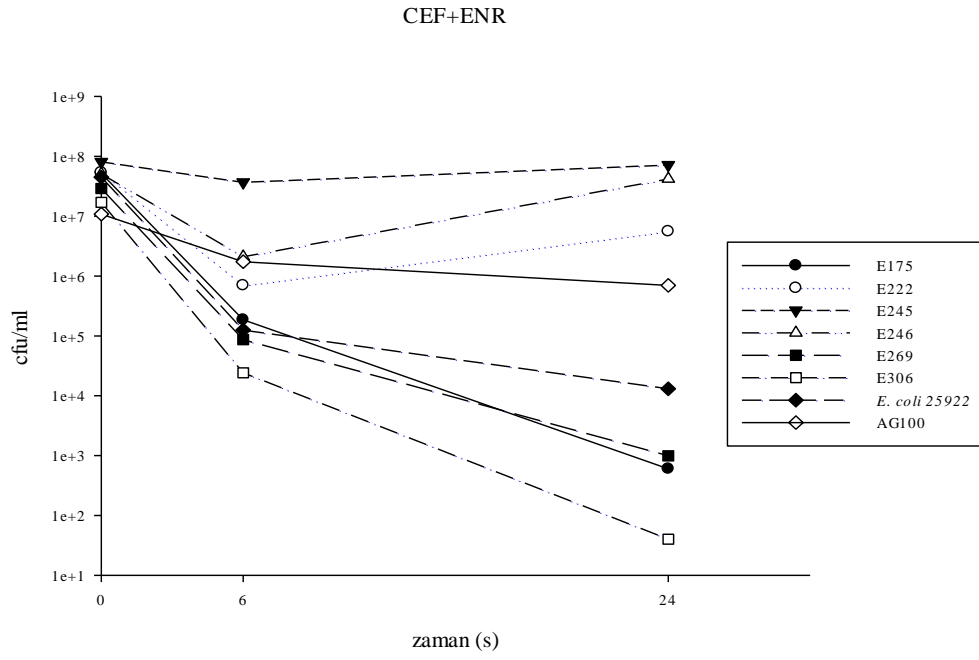
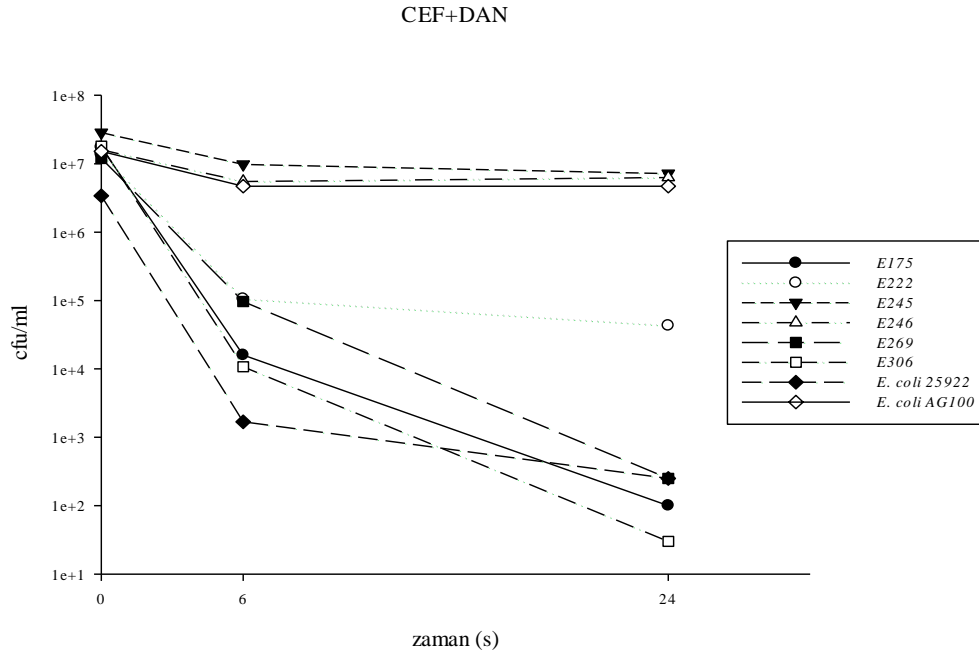
4.4.2.1.3. CEF+Florokinolon

CEF+florokinolon kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt deneyleri sonuçları şekil 21 (A, B C) ile ve tablo 22’de verilmiştir. Buna göre CEF+CIP kombinasyonunun 6. saatte *E. coli* izolatlarının 3/6’sına (%50) karşı, 24. saatte 2/6’sına (%33) karşı; CEF+ENR kombinasyonunun 6. ve 24. saatte *E. coli* izolatlarının 3/6’sına (%50) karşı, CEF+DAN kombinasyonunun ise 6. ve 24. saatte *E. coli* izolatlarının 4/6’sına (%66) karşı sinerjistik etkili olduğu belirlendi. CEF+florokinolon kombinasyonlarının hiçbirinde 6. ve 24. saatte antagonizma gözlenmedi.

A

CEF+CIP



B**C**

Şekil 21. Seftiofur+florokinolon kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt grafikleri (A) CEF+CIP; (B) CEF+ENR; (C) CEF+DAN

Tablo 22. Seftiofur+Florokinolon kombinasyonlarının 6 ve 24. saat etkileşimleri

β-laktam+Florokinolon												
İzolatlar	CEF+CIP				CEF+ENR				CEF+DAN			
	Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*	
	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s
E175	1,08	0,19	ADD	ADD	2,44	4,94	SİN ^b	SİN ^a	3,04	5,24	SİN ^a	SİN ^a
E222	2,50	0,86	SİN ^b	ADD	1,89	0,98	ADD	ADD	2,11	2,50	SİN ^b	SİN ^b
E245	0,24	0,22	ADD	ADD	0,34	0,05	ADD	ADD	0,46	0,59	ADD	ADD
E246	1,03	0,25	ADD	ADD	1,39	0,08	ADD	ADD	0,46	0,40	ADD	ADD
E269	2,18	4,33	SİN ^b	SİN ^a	2,52	4,47	SİN ^b	SİN ^a	2,09	4,68	SİN ^b	SİN ^a
E306	3,24	5,87	SİN ^a	SİN ^a	2,85	5,63	SİN ^b	SİN ^a	3,23	5,78	SİN ^a	SİN ^a
<i>E. coli</i> 25922	3,06	3,67	SİN ^a	SİN ^a	2,55	3,54	SİN ^b	SİN ^a	3,31	4,13	SİN ^a	SİN ^a
<i>E. coli</i> AG100	0,17	0,14	ADD	ADD	0,79	1,19	ADD	ADD	0,51	0,51	ADD	ADD

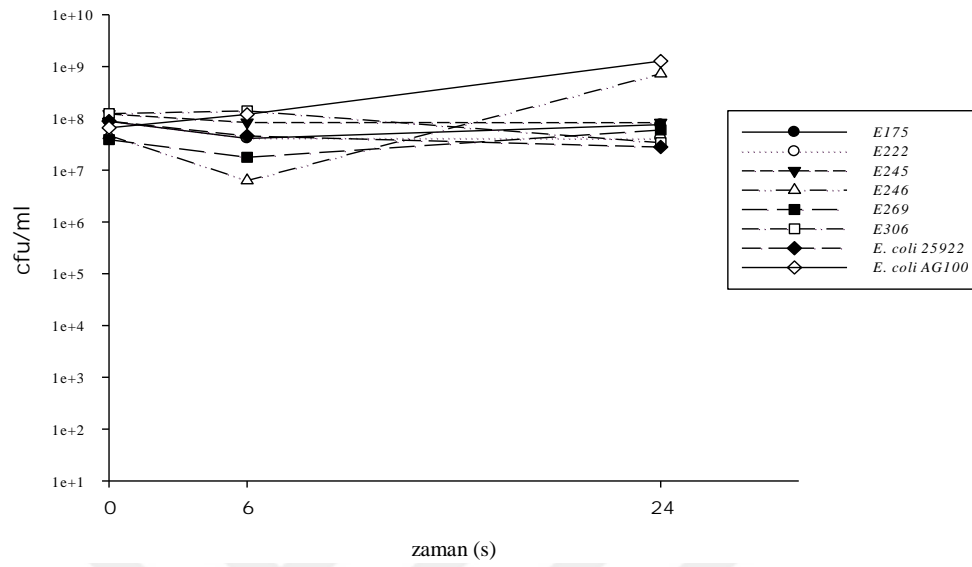
*a: Bakterisidal sinerjizma; b: Bakteriostatik sinerjizma

4.4.2.2. β-laktam+Aminoglikozid Kombinasyonu

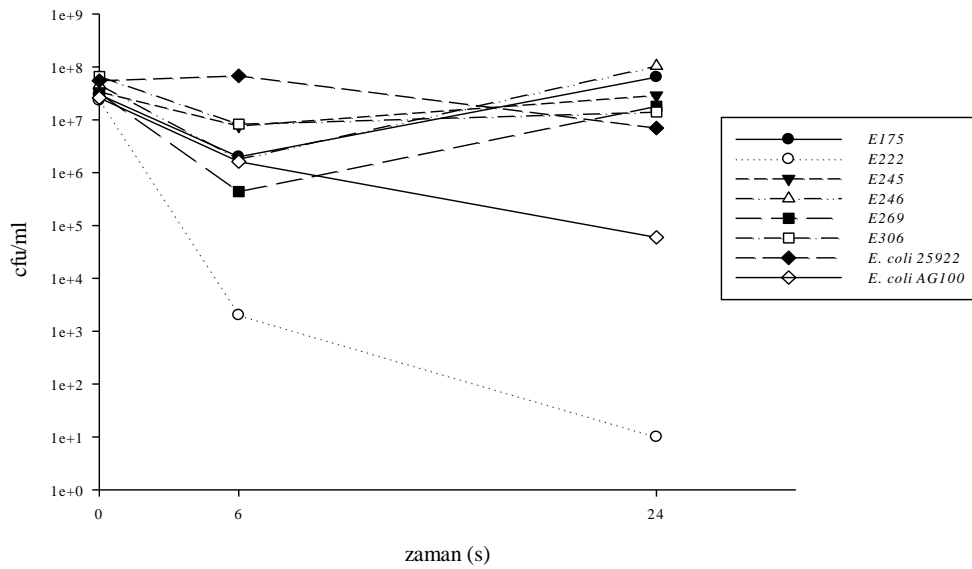
β-laktam+GEN kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt deneyleri sonuçları şekil 22 (A, B C) ile tablo 23'te verilmiştir. Buna göre FEP+GEN kombinasyonunun 6. ve 24. saatte *E. coli* izolatlarının hepsine (%100) karşı additif etkili olduğu belirlendi. CRO+GEN kombinasyonu 6. ve 24. saatte *E. coli* E222'ye karşı bakterisidal sinerjistik etkili olmasına rağmen, diğer izolatlara karşı (%88) additif etkili bulundu. CEF+GEN kombinasyonunun 6. saatte *E. coli* E222 ve E246'ya karşı, 24. saatte *E. coli* E246'ya karşı sinerjistik etkili olduğu tespit edildi. β-laktam+GEN kombinasyonlarının hiçbirinde 6. ve 24. saatte antagonizma gözlenmedi.

A

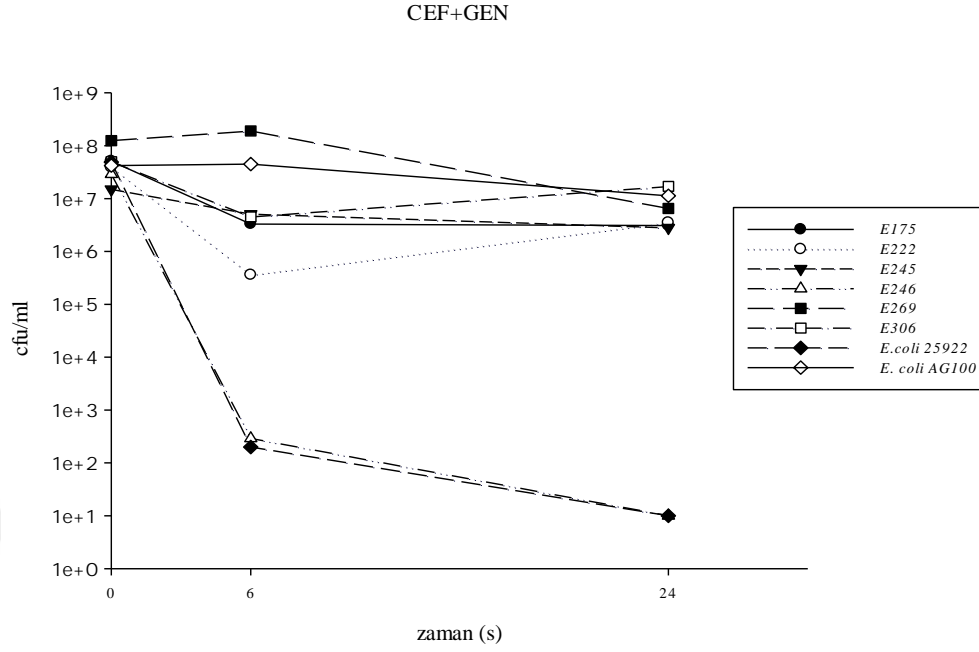
FEP+GEN

**B**

CRO+GEN



C



Şekil 22. β -laktam+gentamisin kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt grafikleri (A) FEP+GEN; (B) CRO+GEN; (C) CEF+GEN

Tablo 23. β -laktam+Aminoglikozid kombinasyonlarının 6 ve 24. saat etkileşimleri

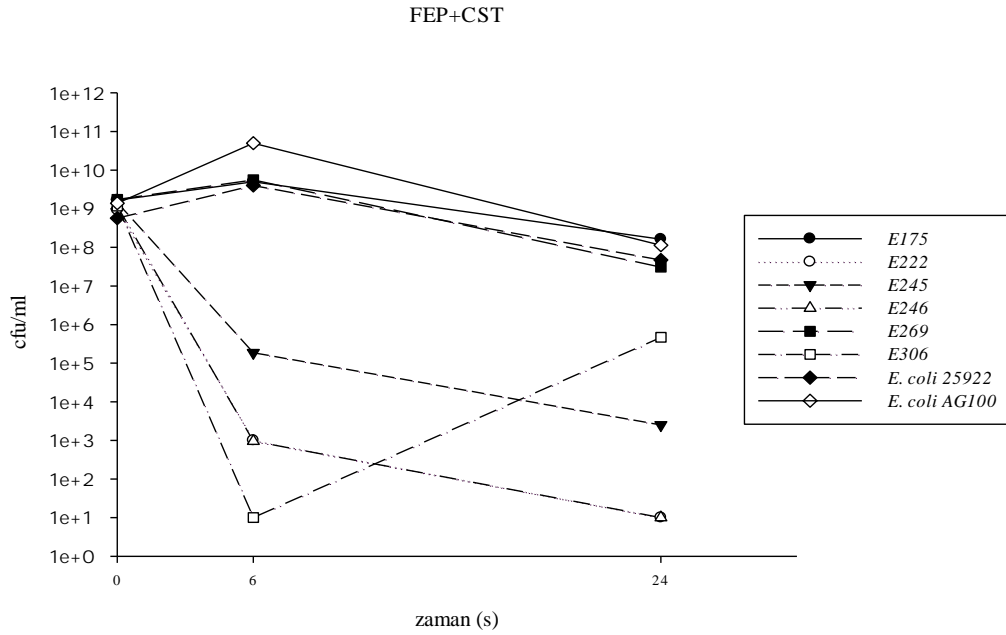
β -laktam+Aminoglikozid												
İzolatlar	FEP+GEN				CRO+GEN				CEF+GEN			
	Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*	
	6 s	24 s	6 s	24 h	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s
E175	0,33	0,06	ADD	ADD	1,18	-0,32	ADD	ADD	1,19	1,22	ADD	ADD
E222	0,33	0,34	ADD	ADD	4,06	6,36	SİN ^a	SİN ^a	2,03	1,05	SİN ^b	ADD
E245	0,16	0,16	ADD	ADD	0,64	0,06	ADD	ADD	0,46	0,72	ADD	ADD
E246	0,87	-1,19	ADD	ADD	1,41	-0,35	ADD	ADD	5,00	6,46	SİN ^a	SİN ^a
E269	0,34	-0,18	ADD	ADD	1,86	0,25	ADD	ADD	-0,18	1,28	ADD	ADD
E306	-0,05	0,56	ADD	ADD	0,90	0,67	ADD	ADD	1,05	0,46	ADD	ADD
<i>E. coli</i> 25922	0,28	0,50	ADD	ADD	-0,09	0,89	ADD	ADD	5,39	6,69	SİN ^a	SİN ^a
<i>E. coli</i> AG100	-0,26	-1,29	ADD	ADD	1,21	2,64	ADD	SİN ^b	-0,03	0,57	ADD	ADD

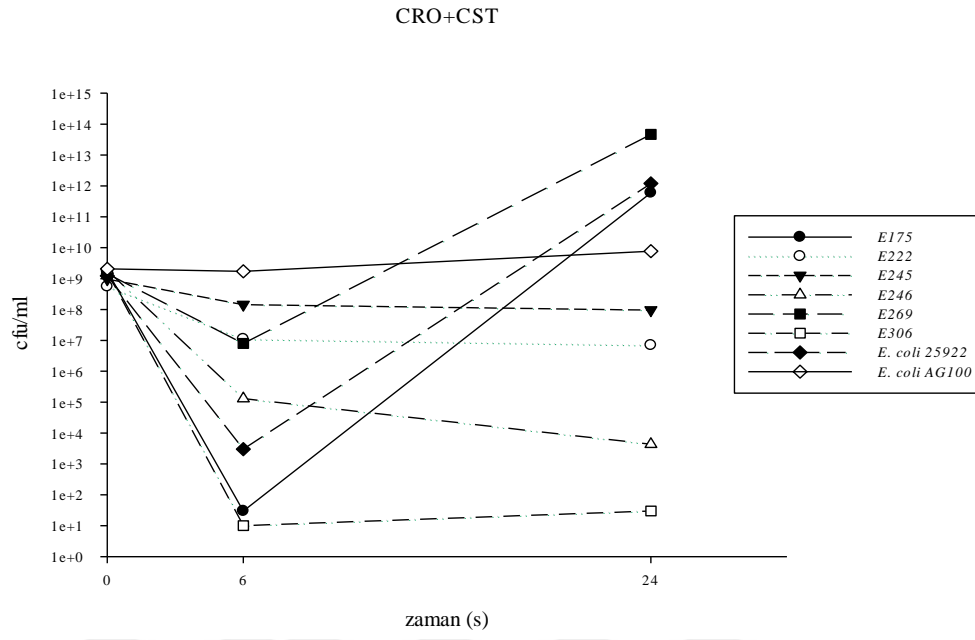
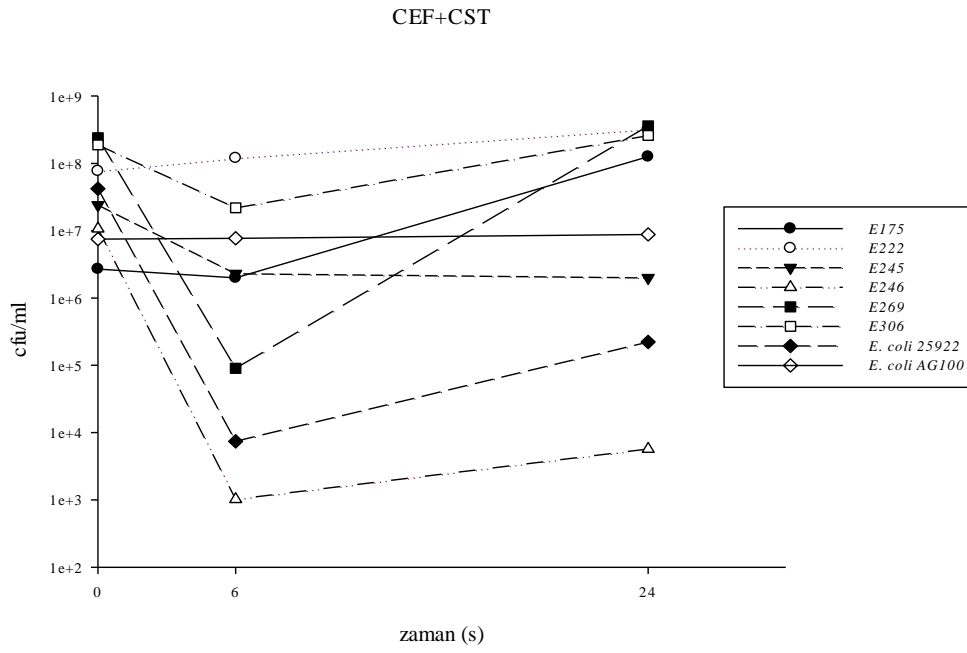
*a: Bakterisidal sinerjizma; b: Bakteriostatik sinerjizma

4.4.2.3. β -laktam+Polimiksin Kombinasyonu

β -laktam+CST kombinasyonlarının zamana bağılı doz-yanıt deneyleri sonuçları şekil 23 (A, B C) ile tablo 24'te verilmiştir. Buna göre FEP+CST kombinasyonunun 6. ve 24. saatte *E. coli* izolatlarının 4/6'sına (%66) karşı bakterisidal sinerjistik etkili olduğu belirlendi. CRO+CST kombinasyonu 6. saatte *E. coli* E175 ve E269'a karşı sinerjistik etkili olmasına rağmen, 24. saatte antagonistik etkili olduğu gözlemlendi. CEF+CST kombinasyonunun 6. saatte *E. coli* izolatlarının 2/6'sına (%33) karşı, 24. saatte ise 1/6'sına (%16) karşı sinerjistik etkili olduğu tespit edildi.

A



B**C**

Şekil 23. β -laktam+kolistin kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt grafikleri (A) FEP+CST; (B) CRO+CST; (C) CEF+CST

Tablo 24. β -laktam+Polimiksin kombinasyonlarının 6. ve 24. saat etkileşimleri

β -laktam+Polimiksin												
İzolatlar	FEP+CST				CRO+CST				CEF+CST			
	Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*	
	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s
E175	-0,47	1,01	ADD	ADD	7,77	-2,54	SİN ^a	ANT	0,13	-1,67	ADD	ADD
E222	5,97	7,97	SİN ^a	SİN ^a	1,14	1,10	ADD	ADD	-0,19	-0,61	ADD	ADD
E245	3,89	5,76	SİN ^a	SİN ^a	0,81	0,39	ADD	ADD	1,02	1,08	ADD	ADD
E246	6,09	8,07	SİN ^a	SİN ^a	4,16	5,64	SİN ^a	SİN ^a	4,02	3,27	SİN ^a	SİN ^a
E269	-0,50	1,75	ADD	ADD	2,26	-4,51	SİN ^b	ANT	3,43	-0,17	SİN ^a	ADD
E306	8,07	3,40	SİN ^a	SİN ^a	8,20	7,72	SİN ^a	SİN ^a	0,93	-0,14	ADD	ADD
<i>E. coli</i> 25922	-0,84	1,08	ADD	ADD	5,62	-2,99	SİN ^a	ANT	3,75	2,27	SİN ^a	SİN ^b
<i>E. coli</i> AG100	-1,56	1,09	ADD	ADD	0,08	-0,57	ADD	ADD	-0,01	-0,06	ADD	ADD

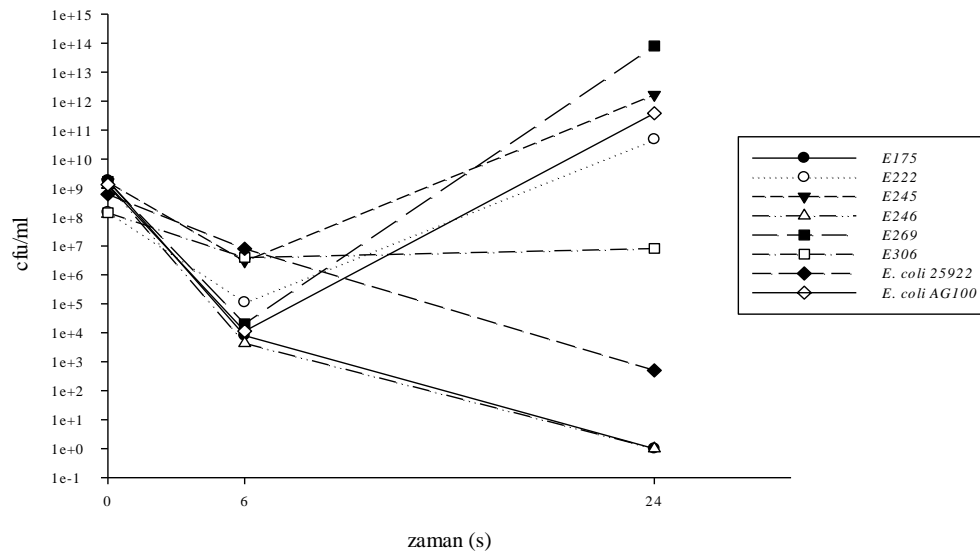
*a: Bakterisidal sinerjizma; b: Bakteriostatik sinerjizma

4.4.2.4. Florokinolon+Polimiksin Kombinasyonu

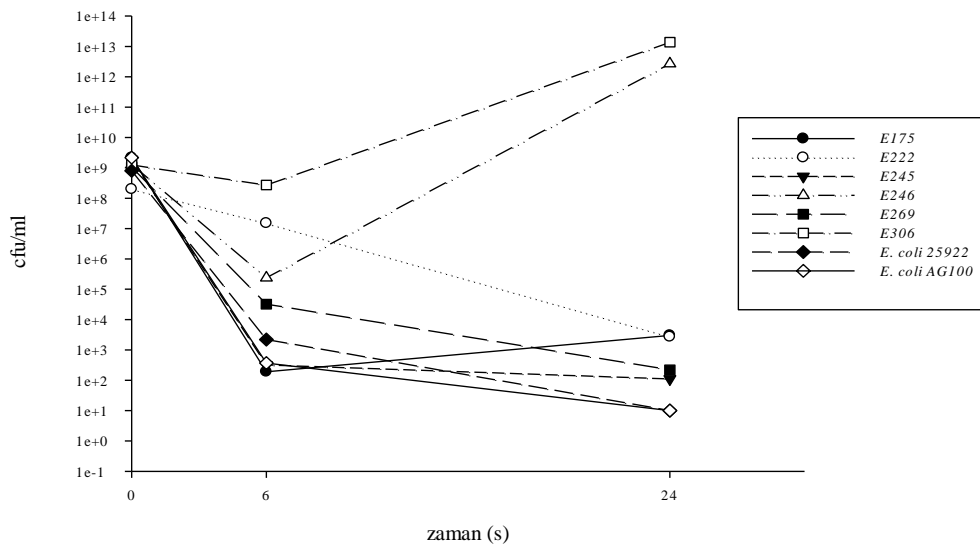
Florokinolon+CST kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt deneyleri sonuçları şekil 2 (A, B C) ile tablo 25'te verilmiştir. Buna göre CIP+CST kombinasyonunun 6. ve 24. saatte *E. coli* E175 ve E246'ya karşı bakterisidal sinerjistik etkili olduğu; *E. coli* E222, E245 ve E269'a karşı ise 6. saatte bakterisidal sinerjistik etkili olmasına rağmen, 24. saatte antagonistik etki gösterdiği belirlendi. ENR+CST kombinasyonunun 6. ve 24. saatte *E. coli* izolatlarının 4/6'sına (%66) karşı sinerjistik etkili olduğu tespit edildi. DAN+CST kombinasyonu 6. ve 24. saatte *E. coli* E175'e karşı sinerjistik etkili olmasına rağmen, *E. coli* E222'ye karşı antagonistik etki gösterdiği gözlemlendi. Bununla birlikte DAN+CST kombinasyonu 6. saatte *E. coli* E245, E246, E269 ve E306'ya karşı bakterisidal sinerjistik etkiliyken, 24. saatte antagonistik etkili olduğu belirlendi.

A

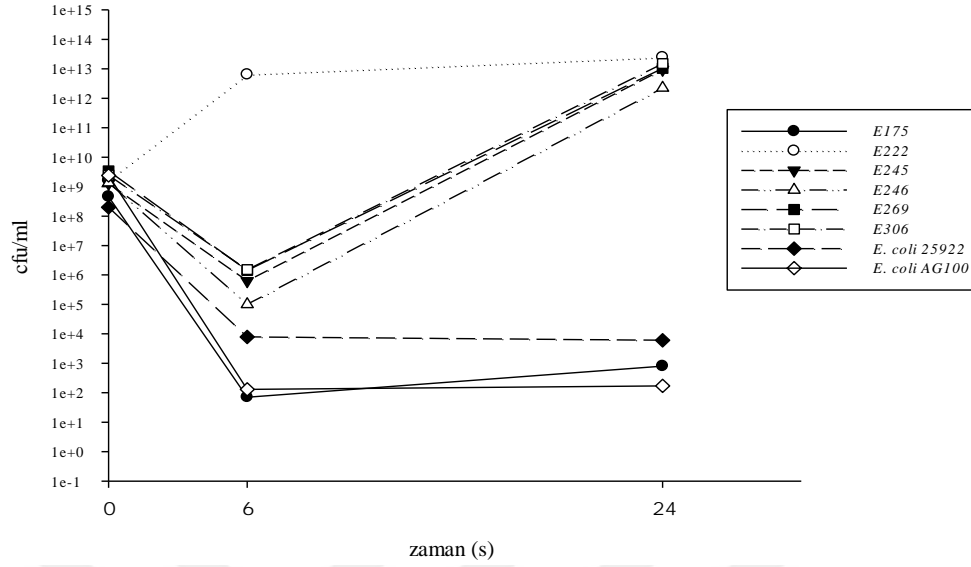
CIP+CST

**B**

ENR/CST

**C**

DAN/CST



Şekil 24. Florokinolon+kolistin kombinasyonlarının zamana bağlı doz-yanıt grafikleri (A) CIP+CST; (B) ENR+CST; (C) DAN+CST

Tablo 25. Florokinolon+Polimiksin kombinasyonlarının 6 ve 24. saat etkileşimleri

Florokinolon+Polimiksin												
İzolatlar	CIP+CST				ENR+CST				DAN+CST			
	Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*		Log azalma		Etkileşim*	
	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s	6 s	24 s
E175	5,36	9,26	SİN ^a	SİN ^a	7,06	5,86	SİN ^a	SİN ^a	6,82	5,76	SİN ^a	SİN ^a
E222	3,12	-2,52	SİN ^a	ANT	1,12	4,87	ADD	SİN ^a	-3,59	-4,18	ANT	ANT
E245	2,73	-3,02	SİN ^a	ANT	6,77	7,24	SİN ^a	SİN ^a	3,32	-3,86	SİN ^a	ANT
E246	5,47	9,10	SİN ^a	SİN ^a	3,74	-3,31	SİN ^a	ANT	4,14	-3,21	SİN ^a	ANT
E269	4,92	-4,68	SİN ^a	ANT	4,52	6,68	SİN ^a	SİN ^a	3,38	-3,49	SİN ^a	ANT
E306	1,55	1,24	ADD	ADD	0,66	-4,04	ADD	ANT	3,21	-3,79	SİN ^a	ANT
E. coli 25922	1,88	6,09	ADD	SİN ^a	5,56	7,90	SİN ^a	SİN ^a	4,41	4,52	SİN ^a	SİN ^a
E. coli AG100	5,06	-2,46	SİN ^a	ANT	6,77	8,34	SİN ^a	SİN ^a	7,27	7,15	SİN ^a	SİN ^a

*a: Bakterisidal sinerjizma

4.5. Antimikrobiyal İlaçlar ve Etkin Kombinasyonların MBK'ü

En düşük MBK, en duyarlı izolat olan *E. coli* E175 izolatında DAN için 0,064 µg/ml, en yüksek MBK ise en dirençli izolat olan *E. coli* E245 izolatında GEN için 256 µg/ml olarak tespit edildi (tablo 26). MBK:MİK oranı 1-4 aralığında olan antimikrobiyal ilaçlar ve kombinasyonlar bakterisit, MBK:MİK oranı ≥ 8 olanlar bakteristatik etkili olarak değerlendirildi (Maaland, 2015). Buna göre DAN ve GEN bileşikleri ile CEF+DAN ve CEF+GEN kombinasyonlarının *E. coli* izolatlarının hepsine karşı bakterisit etkili olduğu belirlendi. CRO, CEF ve CST bileşikleri ile CRO+CST ve DAN+CST kombinasyonlarının *E. coli* izolatlarına karşı sırasıyla %50, %83, %66, %33 ve %66 oranında bakterisit etki gösterdiği tespit edildi.

Tablo 26. *E. coli* izolatlarının MBK_{99,9}'ları

MBK _{99,9}																			
İzolatlar	CRO		CEF		DAN		GEN		CST		CEF+DAN		CEF+GEN		CRO+CST		DAN+CST		
	MBK (µg/ml)	MBK:MİK	MBK (µg/ml)	MBK:MİK	MBK (µg/ml)	MBK:MİK	MBK (µg/ml)	MBK:MİK	MBK (µg/ml)	MBK:MİK	MBK (µg/ml)	MBK:FİK	MBK (µg/ml)	MBK:FİK	MBK (µg/ml)	MBK:FİK	MBK (µg/ml)	MBK:FİK	
E175	0,256	16	8	8	0,064	1	4	1	2	1	2/0,008	4	0,128/1	1	0,002/2	1	0,002/4	1	
E222	0,512	2	8	4	8	4	4	1	2	1	2/2	4	0,128/1	1	1/0,512	8	0,064/1	1	
E245	2	1	64	4	8	4	256	2	32	16	4/1	2	1/16	1	1/0,512	8	1/16	16	
E246	0,512	16	2	1	4	4	64	1	128	16	0,256/0,256	1	0,512/8	1	1/0,128	8	0,512/16	16	
E269	0,256	2	1	1	4	4	4	1	4	1	0,032/0,512	1	0,256/1	1	0,008/2	2	0,064/1	1	
E306	0,512	8	4	1	4	4	2	1	2	1	0,512/0,032	1	1/0,128	2	0,128/0,128	8	0,064/1	1	
<i>E. coli</i> 25922	0,256	16	64	8	4	4	32	16	32	8	2/0,256	4	4/1	4	0,008/32	16	4/4	8	
<i>E. coli</i> AG100	2	16	32	4	4	4	128	16	32	16	64/0,128	2	0,512/8	2	1/16	2	1/8	16	

4.6. Antimikrobiyal İlaçların ve Etkin Kombinasyonların MÖK, MÖK:MIK, MF ve MSP'si

4.6.1. CEF+DAN

CEF'in bireysel MÖK'ü 32 ve 512 µg/ml, CEF+DAN kombinasyonundaki MÖK'ü ise 0,128 ve 64 µg/ml aralığında; DAN'ın bireysel MÖK'ü 0,512 ve 32 µg/ml, CEF+DAN kombinasyonundaki MÖK'ü ise 0,128 ve 4 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi. CEF için en yüksek MÖK:MIK 128, DAN için en yüksek MÖK:MIK 32, CEF+DAN kombinasyonu için ise en yüksek MÖK:MIK 128 olarak belirlendi. *E. coli* izolatlarına karşı CEF'in bireysel MF'leri $2,58 \times 10^{-12}$ ve $3,33 \times 10^{-11}$, DAN'ın bireysel MF'leri $2,5 \times 10^{-12}$ ve $2,9 \times 10^{-9}$, CEF+DAN kombinasyonunun MF'leri ise $3,37 \times 10^{-12}$ ve $3,59 \times 10^{-10}$ aralığında bulundu. CEF'in bireysel MSP'sinin 1 ve 512 µg/ml, CEF+DAN kombinasyonundaki MSP'sinin ise 0,032 ve 64 µg/ml aralığında; DAN'ın bireysel MSP'sinin 0,064 ve 32 µg/ml, CEF+DAN kombinasyonundaki MSP'sinin ise 0,002 ve 4 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi (tablo 27).

Tablo 27. Seftiofur, danofloksasin ve seftiofur+danofloksasin kombinasyonu için MÖK, MÖK:MİK, MF ve MSP

Beta-laktam+Florokinolon					
İzolatlar	Antimikrobiyal	MÖK (-g/ml)	MÖK:MİK	MF	MSP (µg/ml)
E175	CEF	128	128	2,58E-12	1-128
	DAN	0,512	8	2,65E-12	0,064-0,512
	CEF+DAN	64/0,256	128	3,37E-12	0,512-64/0,002-0,256
E222	CEF	128	64	3,00E-12	2-128
	DAN	8	4	2,90E-09	2-8
	CEF+DAN	4/4	8	3,92E-12	0,512-4/0,512-4
E245	CEF	256	16	2,33E-11	16-256
	DAN	32	16	8,04E-11	2-32
	CEF+DAN	8/2	4	1,96E-11	2-8/0,512-2
E246	CEF	128	64	1,36E-11	2-128
	DAN	32	32	2,50E-12	1-32
	CEF+DAN	1/1	4	4,00E-11	0,256-1/0,256-1
E269	CEF	32	32	2,29E-11	1-32
	DAN	16	16	6,44E-12	1-16
	CEF+DAN	0,128/2	4	3,59E-10	0,032-0,128/0,512-2
E306	CEF	512	128	3,33E-11	4-512
	DAN	4	4	1,35E-09	1-4
	CEF+DAN	2/0,128	4	5,14E-11	0,512-2/0,032-0,128
<i>E. coli</i> 25922	CEF	512	64	8,24E-11	8-512
	DAN	16	16	1,06E-10	1-16
	CEF+DAN	8/1	16	6,90E-13	0,512-8/0,064-1

4.6.2. CEF+GEN

CEF'in bireysel MÖK'ü 32 ve 512 µg/ml, CEF+GEN kombinasyonundaki MÖK'ü 1 ve 4 µg/ml aralığında; GEN'in bireysel MÖK'ü 16 ve 4096 µg/ml, CEF+GEN kombinasyonundaki MÖK'ü ise 0,256 ve 64 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi. GEN ve CEF+GEN kombinasyonu için en yüksek MÖK:MİK 32 olarak belirlendi. *E. coli* izolatlarına karşı GEN'in bireysel MF'leri $7,41 \times 10^{-13}$ ve $3,57 \times 10^{-11}$, CEF+GEN kombinasyonunun MF'leri ise $1,42 \times 10^{-12}$ ve $1,96 \times 10^{-9}$ aralığında bulundu. CEF'in bireysel MSP'sinin 1 ve 512 µg/ml, CEF+GEN kombinasyonundaki MSP'sinin ise 0,128 ve 4 µg/ml; GEN'in bireysel MSP'sinin 2 ve 4096 µg/ml, CEF+GEN

kombinasyonundaki MSP'sinin ise 0,064 ve 64 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi (tablo 28).

Tablo 28. Seftiofur, gentamisin ve seftiofur+gentamisin kombinasyonu için MÖK, MÖK:MİK, MF ve MSP

Beta-laktam+Aminoglikozid					
İzolatlar	Antimikrobiyal	MÖK (-g/ml)	MÖK:MİK	MF	MSP (µg/ml)
E175	CEF	128	128	2,58E-12	1-128
	GEN	128	32	1,60E-12	4-128
	CEF+GEN	4/32	32	1,50E-12	0,128-4/1-32
E222	CEF	128	64	3,00E-12	2-128
	GEN	128	32	4,71E-12	4-128
	CEF+GEN	2/16	16	1,42E-12	0,128-4/1-16
E245	CEF	256	16	2,33E-11	16-256
	GEN	4096	32	3,57E-11	128-4096
	CEF+GEN	4/64	4	1,97E-10	1-4/16-64
E246	CEF	128	64	1,36E-11	2-128
	GEN	512	8	1,67E-12	64-512
	CEF+GEN	1/16	2	1,96E-09	0,512-1/8-16
E269	CEF	32	32	2,29E-11	1-32
	GEN	32	8	7,41E-13	4-32
	CEF+GEN	2/8	8	6,55E-11	0,256-2/1-8
E306	CEF	512	128	3,33E-11	4-512
	GEN	16	16	3,33E-12	2-16
	CEF+GEN	2/0,256	4	3,20E-11	0,256-2/0,064-0,256
<i>E. coli</i> 25922	CEF	512	64	8,24E-11	8-512
	GEN	16	8	3,48E-11	2-16
	CEF+GEN	32/16	64	1,52E-13	0,512-32/0,256-16

4.6.3. CRO+CST

CRO'nun bireysel MÖK'ünün 0,256 ve 64 µg/ml, CRO+CST kombinasyonundaki MÖK'ünün ise 0,064 ve 1 µg/ml aralığında; CST'in bireysel MÖK'ünün 32 ve 256 µg/ml, CRO+CST kombinasyonundaki MÖK'ünün ise 0,128 ve 512 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi. CRO, CST ve CRO+CST için en yüksek MÖK:MİK 128 olarak belirlendi. *E. coli* izolatlarına karşı CRO'nun bireysel MF'leri $2,17 \times 10^{-12}$ ve $4,13 \times 10^{-10}$, CST'in bireysel MF'leri $7,41 \times 10^{-13}$ ve $5,6 \times 10^{-10}$, CRO+CST kombinasyonunun MF'leri ise $3,14 \times 10^{-12}$ ve $1,97 \times 10^{-10}$ aralığında bulundu. CRO'nun bireysel

MSP'sinin 0,016 ve 64 µg/ml, CRO+CST kombinasyonundaki MSP'sinin ise 0,002 ve 1 µg/ml; CST'in bireysel MSP'sinin 2 ve 256 µg/ml, CRO+CST kombinasyonundaki MSP'sinin ise 0,016 ve 512 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi (tablo 29).

Tablo 29. Sefriakson, kolistin ve seftriakson+kolistin kombinasyonu için MÖK, MÖK:MİK, MF ve MSP

Beta-laktam+Polimiksin					
İzolatlar	Antimikrobiyal	MÖK (-g/ml)	MÖK:MİK	MF	MSP (µg/ml)
E175	CRO	0,256	16	8,34E-11	0,016-0,256
	CST	32	16	3,50E-11	2-32
	CRO+CST	0,064/64	32	3,14E-12	0,002-0,064/2-64
E222	CRO	1	2	6,76E-12	0,256-1
	CST	64	32	7,41E-13	2-64
	CRO+CST	0,512/0,256	4	1,97E-10	0,128-0,512/0,064-0,256
E245	CRO	64	32	2,17E-12	2-64
	CST	256	128	5,60E-10	2-256
	CRO+CST	1/0,512	8	1,73E-11	0,128-1/0,064-0,512
E246	CRO	0,512	16	4,13E-10	0,032-0,512
	CST	256	32	5,00E-12	8-256
	CRO+CST	1/0,128	8	1,36E-10	0,128-1/0,016-0,128
E269	CRO	2	16	1,97E-11	0,128-2
	CST	32	8	7,55E-13	4-32
	CRO+CST	0,128/32	32	3,10E-11	0,004-0,128/1-32
E306	CRO	8	128	1,00E-11	0,064-8
	CST	64	32	2,22E-12	2-64
	CRO+CST	0,256/512	128	5,12E-12	0,002-0,256/4-512
<i>E. coli</i> 25922	CRO	1	64	3,00E-12	0,016-1
	CST	32	8	5,52E-11	4-32
	CRO+CST	0,016/64	32	2,86E-12	0,0005-0,016/2-64

4.6.4. DAN+CST

DAN'ın bireysel MÖK'ü 0,512 ve 32 µg/ml, DAN+CST kombinasyonundaki MÖK'ü 0,016 ve 4 µg/ml; CST'nin bireysel MÖK'ü 32 ve 256 µg/ml, DAN+CST kombinasyonundaki MÖK'ü ise 16 ve 64 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi. DAN+CST kombinasyonu için ise en yüksek MÖK:MİK 64 olarak belirlendi. *E. coli* izolatlarına karşı DAN+CST

kombinasyonunun MF'leri $6,45 \times 10^{-13}$ ve $1,48 \times 10^{-10}$ aralığında bulundu. DAN'ın bireysel MSP'sinin 0,064 ve 32 µg/ml, DAN+CST kombinasyonunda DAN'ın MSP'sinin ise 0,002 ve 4 µg/ml; CST'in bireysel MSP'sinin 2 ve 256 µg/ml, DAN+CST kombinasyonundaki MSP'sinin ise 1 ve 64 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi (tablo 30).

Tablo 30. Danofloksasin, kolistin ve danofloksasin+kolistin kombinasyonu için MÖK, MÖK:MİK, MF ve MSP

Florokinolon+Polimiksin					
İzolatlar	Antimikrobiyal	MÖK (-g/ml)	MÖK:MİK	MF	MSP (µg/ml)
E175	DAN	0,512	8	2,65E-12	0,064-0,512
	CST	32	16	3,50E-11	2-32
	DAN+CST	0,016/32	8	3,33E-11	0,002-0,016/4-32
E222	DAN	8	4	2,90E-09	2-8
	CST	64	32	7,41E-13	2-64
	DAN+CST	4/64	64	2,17E-11	0,064-4/1-64
E245	DAN	32	16	8,04E-11	2-32
	CST	256	128	5,60E-10	2-256
	DAN+CST	4/64	64	1,26E-11	0,064-4/1-64
E246	DAN	32	32	2,50E-12	1-32
	CST	256	32	5,00E-12	8-256
	DAN+CST	1/32	32	1,60E-11	0,032-1/1-32
E269	DAN	16	16	6,44E-12	1-16
	CST	32	8	7,55E-13	4-32
	DAN+CST	1/16	16	1,48E-10	0,064-1/1-16
E306	DAN	4	4	1,35E-09	1-4
	CST	64	32	2,22E-12	2-64
	DAN+CST	2/32	32	6,45E-13	0,064-2/1-32
<i>E. coli</i> 25922	DAN	16	16	1,06E-10	1-16
	CST	32	8	5,52E-11	4-32
	DAN+CST	1/1	2	2,22E-11	0,512-1/0,512-1

4.7. Antimikrobiyal İlaçların ve Etkin Kombinasyonların PAE ve PA-SME'si

4.7.1. CEF+DAN

CEF ve DAN bileşiklerinin bireysel PAE sürelerinin konsantrasyon (1x-4xMİK) artışına bağlı olarak değişmediği tespit edildi (CEF: $p < 0.992$, DAN: $p < 0.818$). MDR *E. coli* izolatlarının 1xMİK CEF ile indüklenen PA-SME sürelerinin, PAE süresine göre en az 2,3 ve en çok > 24 s uzadığı belirlendi ($p < 0.002$, $p < 0.009$ ve $p < 0.010$) (tablo 31-32). 4xMİK CEF ile indüklenen PA-SME (0,2 ve 0,3xMİK) sürelerinin, PAE süresine göre en az 1,4 ve en çok > 24 s uzadığı tespit edildi ($p < 0.002$ ve $p < 0.001$).

Tablo 31. Seftiofur, danofloksasin ve seftiofur+danofloksasin kombinasyonu için PAE ve PA-SME süreleri

Beta-laktam+Florokinolon									
İzolatlar	Antimikrobiyal	PAE (s)		1xPA-SME (s)			4xPA-SME (s)		
		1xMİK	4xMİK	0.1xMİK	0.2xMİK	0.3xMİK	0.1xMİK	0.2xMİK	0.3xMİK
E175	CEF	-1.3	-1.4	>24	2.5	2.3	1.4	2.3	5.2
	DAN	1.9	4.5	7.4	10.9	13.2	3.8	8.7	7.8
	CEF+DAN	-1.7		-1	0.3	6.1			
E222	CEF	0.1	0.6	2.5	4.2	4.2	3.2	4.2	4.4
	DAN	1.7	1.8	0.3	0.3	0.8	1.3	1.3	2.6
	CEF+DAN	-0.1		1.5	1.6	1.5			
E245	CEF	-0.1	0	>24	>24	>24	>24	>24	>24
	DAN	0.5	1.5	2.5	10.2	14.1	0.6	5.2	8.9
	CEF+DAN	0.3		1.6	15.9	15.6			
E246	CEF	0.6	0	>24	3.7	3.7	3.9	20.7	>24
	DAN	1.7	2.5	7	9.9	10.6	8.1	8.8	>24
	CEF+DAN	0.8		1.7	2	2.2			
E269	CEF	-0.8	-0.3	2.6	3	3	2.5	2.8	3.1
	DAN	1.3	2.3	4.3	8.6	11.7	4.6	9.7	8.2
	CEF+DAN	0.7		7.2	8	10.1			
E306	CEF	-0.2	-0.1	3.7	>24	>24	3.7	>24	>24
	DAN	0.8	1.1	2.2	3.2	3.2	1.2	3.9	4
	CEF+DAN	0.6		2.1	2.5	2.7			
<i>E. coli</i> 25922	CEF	0.2	0	>24	>24	>24	>24	>24	>24
	DAN	5.9	6.6	4.5	0.8	3	>24	>24	>24
	CEF+DAN	0		0.1	0	0.9			

Tablo 32. Seftiofur, danofloksasin ve seftiofur+danofloksasin kombinasyonu için istatistiksel çoklu karşılaştırma (LSD) testi sonuçları

Beta-laktam+Florokinolon				
	İlişki	Ortalama PAE Süresi (s)	Anlamlılık (p < 0.05)	Önemlilik Düzeyi
1xMİK CEF ^a	1x-0,1xMİK CEF	(-0,21) ^a 15,54	0.002	**
	1x-0,2xMİK CEF	12,62	0.009	**
	1x-0,3xMİK CEF	12,6	0.010	*
4xMİK CEF ^a	4x-0,2xMİK CEF	(-0,17) ^a 15	0.002	**
	4x-0,3xMİK CEF	16,1	0.001	**
1x-0,1xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+DAN	(15,54) ^a 0,08	0.000	**
	1x-0,1xMİK CEF+DAN	1,74	0.001	**
	1x-0,2xMİK CEF+DAN	4,32	0.006	**
	1x-0,3xMİK CEF+DAN	5,58	0.015	*
1x-0,2xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+DAN	(12,62) ^a 0,08	0.002	**
	1x-0,1xMİK CEF+DAN	1,74	0.009	**
	1x-0,2xMİK CEF+DAN	4,32	0.041	*
1x-0,3xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+DAN	(12,60) ^a 0,08	0.002	**
	1x-0,1xMİK CEF+DAN	1,74	0.009	**
	1x-0,2xMİK CEF+DAN	4,32	0.042	*
4x-0,1xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+DAN	(9,24) ^a 0,08	0.025	*
4x-0,2xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+DAN	(15) ^a 0,08	0.000	**
	1x-0,1xMİK CEF+DAN	1,74	0.001	**
	1x-0,2xMİK CEF+DAN	4,32	0.009	**
	1x-0,3xMİK CEF+DAN	5,58	0.021	*
4x-0,3xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+DAN	(16,1) ^a 0,08	0.000	**
	1x-0,1xMİK CEF+DAN	1,74	0.001	**
	1x-0,2xMİK CEF+DAN	4,32	0.004	**
	1x-0,3xMİK CEF+DAN	5,58	0.010	*
1x-0,3xMİK DAN ^a	1xMİK CEF+DAN	(8,08) ^a 0,08	0.049	*
4x-0,2xMİK DAN ^a	1xMİK CEF+DAN	(8,94) ^a 0,08	0.030	*
4x-0,3xMİK DAN ^a	1xMİK CEF+DAN	(11,64) ^a 0,08	0.005	**
	1x-0,1xMİK CEF+DAN	1,74	0.017	*

^a Karşılaştırma yapılan grubun ortalama PAE süresi (s)

* p < 0,05, ** p < 0,01

4.7.2. CEF+GEN

CEF ve GEN bileşiklerinin bireysel PAE sürelerinin konsantrasyon (1x-4xMİK) artışına bağlı olarak değişmediği tespit edildi (CEF: p < 0.992, GEN: p < 0.499). MDR *E. coli* izolatlarının 1xMİK CEF ile indüklenen PA-SME

sürelerinin, PAE süresine göre en az 2,3 ve en çok > 24 s uzadığı belirlendi ($p < 0.002$, $p < 0.009$ ve $p < 0.010$) (tablo 33-34). 4xMİK CEF ile indüklenen PA-SME (0,2 ve 0,3xMİK) sürelerinin, PAE süresine göre en az 1,4 ve en çok > 24 s uzadığı tespit edildi ($p < 0.002$ ve $p < 0.001$). 4xMİK GEN ile indüklenen PA-SME sürelerinin, PAE süresine göre en az 4,1 ve en çok > 24 s artış gözlemlendi ($p < 0.015$, $p < 0.004$ ve $p < 0.003$). 1xMİK CEF+GEN ile indüklenen PA-SME (0,2 ve 0,3xMİK) sürelerinin, PAE süresine göre belirgin derecede uzun olduğu tespit edildi ($p < 0.030$ ve $p < 0.004$).

Tablo 33. Seftiofur, gentamisin ve seftiofur+gentamisin kombinasyonu için PAE ve PA-SME süreleri

Beta-laktam+Aminoglikozid									
İzolatlar	Antimikrobiyal	PAE (s)		1xPA-SME (s)			4xPA-SME (s)		
		1xMİK	4xMİK	0.1xMİK	0.2xMİK	0.3xMİK	0.1xMİK	0.2xMİK	0.3xMİK
E175	CEF	-1.3	-1.4	>24	2.5	2.3	1.4	2.3	5.2
	GEN	0.8	1.2	3.2	3.1	3.3	7.8	8.2	11.7
	CEF+GEN	-0.1		1	1.4	1.9			
E222	CEF	0.1	0.6	2.5	4.2	4.2	3.2	4.2	4.4
	GEN	2.1	2.2	3	3.1	3.3	>24	>24	>24
	CEF+GEN	-0.3		21.3	>24	>24			
E245	CEF	-0.1	0	>24	>24	>24	>24	>24	>24
	GEN	1	1.3	3.1	3.2	3.3	7.4	11.8	11.5
	CEF+GEN	0.4		-0.7	-0.3	-0.1			
E246	CEF	0.6	0	>24	3.7	3.7	3.9	20.7	>24
	GEN	>24	-0.4	>24	>24	>24	>24	>24	>24
	CEF+GEN	-0.8		>24	>24	>24			
E269	CEF	-0.8	-0.3	2.6	3	3	2.5	2.8	3.1
	GEN	1.1	1.5	2.5	3.2	4.4	7	7	>24
	CEF+GEN	-0.3		1.6	9.5	13.2			
E306	CEF	-0.2	-0.1	3.7	>24	>24	3.7	>24	>24
	GEN	1	0.7	15.8	17.4	17.6	8.9	19.1	2.7
	CEF+GEN	-0.1		0.8	1.6	2.4			
<i>E. coli</i> 25922	CEF	0.2	0	>24	>24	>24	>24	>24	>24
	GEN	1.5	2.9	3	3.2	2.9	7	7	6.9
	CEF+GEN	-0.1		9.7	11.6	13.4			

Tablo 34. Seftiofur, gentamisin ve seftiofur+gentamisin kombinasyonu için istatistiksel çoklu karşılaştırma (LSD) testi sonuçları

Beta-laktam+Aminoglikozid				
	İlişki	Ortalama PAE Süresi (s)	Anlamlılık (p < 0.05)	Önemlilik Düzeyi
1xMİK CEF ^a	1x-0,1xMİK CEF	(-0,21) ^a 15,54	0.004	**
	1x-0,2xMİK CEF	12,62	0.018	*
	1x-0,3xMİK CEF	12,6	0.019	*
4xMİK CEF ^a	4x-0,2xMİK CEF	(-0,17) ^a 15	0.006	**
	4x-0,3xMİK CEF	16,1	0.003	**
1x-0,1xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+GEN	(15,54) ^a -0,18	0.002	**
1x-0,2xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+GEN	(12,62) ^a -0,18	0.010	*
1x-0,3xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+GEN	(12,60) ^a -0,18	0.010	*
4x-0,2xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+GEN	(15) ^a -0,18	0.002	**
4x-0,3xMİK CEF ^a	1xMİK CEF+GEN	(15,54) ^a -0,18	0.001	**
4xMİK GEN ^a	4x-0,1xMİK GEN	(1,31) ^a 12,58	0.015	*
	4x-0,2xMİK GEN	14,7	0.004	**
	4x-0,3xMİK GEN	15,4	0.003	**
4x-0,1xMİK GEN ^a	1xMİK CEF+GEN	(12,58) ^a -0,18	0.010	*
4x-0,2xMİK GEN ^a	1xMİK CEF+GEN	(14,7) ^a -0,18	0.003	**
4x-0,3xMİK GEN ^a	1xMİK CEF+GEN	(15,4) ^a -0,18	0.002	**
1xMİK CEF+GEN ^a	1x-0,2xMİK CEF+GEN	(-0,18) ^a 10,54	0.030	*
	1x-0,3xMİK CEF+GEN	13,98	0.004	**

^a Karşılaştırma yapılan grubun ortalama PAE süresi (s)

* p < 0,05, ** p < 0,01

4.7.3. CRO+CST

CRO ve CST bileşiklerinin bireysel PAE sürelerinin konsantrasyon (1x-4xMİK) artışına bağlı olarak değişmediği tespit edildi (CRO: p < 0.974, CST: p < 0.378). 1xMİK CST ile indüklenen PA-SME (0,3xMİK) süresinin, PAE süresine göre en az 0,9 ve en çok > 24 s uzadığı belirlendi (p < 0.028) (tablo 35-36). 1xMİK CRO+CST ile indüklenen PA-SME sürelerinin; CRO+CST (1xMİK), CRO (1x ve 4xMİK) ve CST (1xMİK)'nin PAE sürelerine göre belirgin derecede uzun olduğu tespit edildi. Bu sonuçlara ek olarak 1xMİK CRO+CST ile indüklenen PA-SME (0,3xMİK) süresinin; CRO'nun bireysel PA-SME sürelerine ve CST'nin bireysel PAE ve PA-SME sürelerine göre daha uzun olduğu belirlendi.

Tablo 35. Seftriakson, kolistin ve seftriakson+kolistin kombinasyonu için PAE ve PA-SME süreleri

Beta-laktam+Polimiksin									
İzolatlar	Antimikrobiyal	PAE (s)		1xPA-SME (s)			4xPA-SME (s)		
		1xMİK	4xMİK	0.1xMİK	0.2xMİK	0.3xMİK	0.1xMİK	0.2xMİK	0.3xMİK
E175	CRO	-0.7	-0.7	-0.6	-0.6	-0.5	-0.8	-0.6	-0.6
	CST	0.4	0.9	1.2	1.1	1.3	1.1	1.2	-0.1
	CRO+CST	6.6		>24	>24	>24			
E222	CRO	-0.8	-0.9	2.8	3.2	3.3	2.8	3	3.1
	CST	1.2	1.0	4	4.5	5.2	1.2	1.6	1.7
	CRO+CST			>24	>24	>24			
E245	CRO	-0.7	-0.9	>24	>24	>24	>24	>24	>24
	CST	3.5	2.4	-0.1	>24	>24	0.9	>24	>24
	CRO+CST	0		15.	17.7	>24			
E246	CRO	-0.9	-0.9	>24	>24	>24	>24	>24	>24
	CST	3.2	>24	10.7	>24	>24	>24	>24	>24
	CRO+CST	0		1.4	12.3	12.7			
E269	CRO	-0.9	-0.6	-0.7	2.7	3	-0.5	2.5	3
	CST	2.5	6.1	4.9	4.7	4.6	0.4	0	-0.3
	CRO+CST	2.1		>24	>24	>24			
E306	CRO	0	0	0.5	0.9	1.5	0.1	0.9	1.6
	CST	2.6	4.0	>24	0.9	>24	>24	>24	>24
	CRO+CST	-0.2		0	0	1.8			
<i>E. coli</i> 25922	CRO	0.9	-0.3	0.9	1.3	1	0.2	1.3	1.5
	CST	2.1	9.0	11.2	12.4	12.2	4.3	4.0	3.5
	CRO+CST	-0.2		1.8	2	2			

Tablo 36. Seftriakson, kolistin ve seftriakson+kolistin kombinasyonu için istatistiksel çoklu karşılaştırma (LSD) testi sonuçları

Beta-laktam+Polimiksin				
	İlişki	Ortalama PAE Süresi (s)	Anlamlılık (p < 0.05)	Önemlilik Düzeyi
1xMİK CRO ^a	1x-0,1xMİK CRO+CST	(-0,44) ^a 16,8	0.001	**
	1x-0,2xMİK CRO+CST	15,2	0.004	**
	1x-0,3xMİK CRO+CST	19,9	0.000	**
4xMİK CRO ^a	1x-0,1xMİK CRO+CST	(-0,61) ^a 16,8	0.001	**
	1x-0,2xMİK CRO+CST	15,2	0.003	**
	1x-0,3xMİK CRO+CST	19,9	0.000	**
1x-0,1xMİK CRO ^a	1x-0,3xMİK CRO+CST	(7,55) ^a 19,9	0.021	*
1x-0,2xMİK CRO ^a	1x-0,3xMİK CRO+CST	(1,3) ^a 19,9	0.029	*
1x-0,3xMİK CRO ^a	1x-0,3xMİK CRO+CST	(8,32) ^a 19,9	0.031	*
4x-0,1xMİK CRO ^a	1x-0,3xMİK CRO+CST	(7,41) ^a 19,9	0.020	*
4x-0,2xMİK CRO ^a	1x-0,3xMİK CRO+CST	(7,87) ^a 19,9	0.028	*
4x-0,3xMİK CRO ^a	1x-0,3xMİK CRO+CST	(8,37) ^a 19,9	0.031	*
1xMİK CST ^a	1x-0,3xMİK CST	(2,21) ^a 14,04	0.028	*
	1x-0,1xMİK CRO+CST	16,8	0.007	**
	1x-0,2xMİK CRO+CST	15,2	0.015	*
	1x-0,3xMİK CRO+CST	19,9	0.001	**
4xMİK CST ^a	1x-0,3xMİK CRO+CST	(6,91) ^a 19,9	0.016	*
1x-0,1xMİK CST ^a	1x-0,3xMİK CRO+CST	(8,12) ^a 19,9	0.028	*
1x-0,3xMİK CST ^a	1xMİK CRO+CST	(14,04) ^a 1,15	0.017	*
4x-0,1xMİK CST ^a	1x-0,3xMİK CRO+CST	(8,27) ^a 19,9	0.030	*
1xMİK CRO+CST ^a	1x-0,1xMİK CRO+CST	(1,15) ^a 16,8	0.004	**
	1x-0,2xMİK CRO+CST	15,2	0.009	**
	1x-0,3xMİK CRO+CST	19,9	0.001	**

^a Karşılaştırma yapılan grubun ortalama PAE süresi (s)

* p < 0,05, ** p < 0,01

4.7.4. DAN+CST

DAN ve CST bileşiklerinin bireysel PAE sürelerinin konsantrasyon (1x-4xMİK) artışına bağlı olarak değişmediği tespit edildi (DAN: p < 0.841, CST: p < 0.378). 1xMİK CST ile indüklenen PA-SME (0,3xMİK) süresinin, PAE süresine göre en az 0,9 ve en çok > 24 s uzadığı belirlendi (p < 0.028) (tablo 37-38).

1xMİK DAN+CST ile indüklenen PA-SME sürelerinin; DAN+CST (1xMİK), DAN (1x-4xMİK) ve CST (1xMİK)'nin PAE sürelerine ve DAN ile CEF'in bireysel PA-SME sürelerine göre belirgin derecede uzun olduğu tespit edildi.

Tablo 37. Danofloksasin, kolistin ve danofloksasin+kolistin kombinasyonu için PAE ve PA-SME süreleri

Florokinolon+Polimiksin									
İzolatlar	Antimikrobiyal	PAE (s)		1xPA-SME (s)			4xPA-SME (s)		
		1xMİK	4xMİK	0.1xMİK	0.2xMİK	0.3xMİK	0.1xMİK	0.2xMİK	0.3xMİK
E175	DAN	1.9	4.5	7.4	10.9	13.2	3.8	8.7	7.8
	CST	0.4	0.9	1.2	1.1	1.3	1.1	1.2	-0.1
	DAN+CST	2.5		1.6	1.7	1.7			
E222	DAN	1.7	1.8	0.3	0.3	0.8	1.3	1.3	2.6
	CST	1.2	1.0	4	4.5	5.2	1.2	1.6	1.7
	DAN+CST	3.0		>24	>24	>24			
E245	DAN	0.5	1.5	2.5	10.2	14.1	0.6	5.2	8.9
	CST	3.5	2.4	-0.1	>24	>24	0.9	>24	>24
	DAN+CST	1.5		>24	>24	>24			
E246	DAN	1.7	2.5	7	9.9	10.6	8.1	8.8	>24
	CST	3.2	>24	10.7	>24	>24	>24	>24	>24
	DAN+CST	2.9		>24	>24	>24			
E269	DAN	1.3	2.3	4.3	8.6	11.7	4.6	9.7	8.2
	CST	2.5	6.1	4.9	4.7	4.6	0.4	0	-0.3
	DAN+CST	1.6		>24	>24	>24			
E306	DAN	0.8	1.1	2.2	3.2	3.2	1.2	3.9	4
	CST	2.6	4.0	>24	0.9	>24	>24	>24	>24
	DAN+CST	4.7		>24	>24	>24			
<i>E. coli</i> 25922	DAN	5.9	6.6	4.5	0.8	3	>24	>24	>24
	CST	2.1	9.0	11.2	12.4	12.2	4.3	4.0	3.5
	DAN+CST	4.4		2.2	1.9	2.3			

Tablo 38. Danofloksasin, kolistin ve danofloksasin+kolistin kombinasyonu için istatistiksel çoklu karşılaştırma (LSD) testi sonuçları

Florokinolon+Polimiksin				
	İlişki	Ortalama PAE Süresi (s)	Anlamlılık (p < 0.05)	Önemlilik Düzeyi
1xMİK DAN ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(1,9) ^a 18,4	0.001	**
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.001	**
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.001	**
4xMİK DAN ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(2,9) ^a 18,4	0.001	**
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.001	**
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.001	**
1x-0,1xMİK DAN ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(4,02) ^a 18,4	0.002	**
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.002	**
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.002	**
1x-0,2xMİK DAN ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(6,27) ^a 18,4	0.010	*
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.010	*
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.010	*
1x-0,3xMİK DAN ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(8,08) ^a 18,4	0.028	*
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.028	*
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.028	*
4x-0,1xMİK DAN ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(6,37) ^a 18,4	0.010	*
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.010	*
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.010	*
4x-0,2xMİK DAN ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(8,94) ^a 18,4	0.043	*
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.043	*
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.043	*
1xMİK CST ^a	1x-0,3xMİK CST	(2,21) ^a 14,04	0.028	*
	1x-0,1xMİK DAN+CST	18,4	0.001	**
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.001	**
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.001	**
4xMİK CST ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(6,91) ^a 18,4	0.014	*
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.014	*
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.014	*
1x-0,1xMİK CST ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(8,12) ^a 18,4	0.028	*
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.028	*
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.028	*
1x-0,3xMİK CST ^a	1xMİK DAN+CST	(14,04) ^a 2,94	0.018	*
4x-0,1xMİK CST ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(8,27) ^a 18,4	0.031	*
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.031	*
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.031	*
1xMİK DAN+CST ^a	1x-0,1xMİK DAN+CST	(2,94) ^a 18,4	0.001	**
	1x-0,2xMİK DAN+CST	18,3	0.001	**
	1x-0,3xMİK DAN+CST	18,4	0.001	**

^a Karşılaştırma yapılan grubun ortalama PAE süresi (s)

* p < 0,05, ** p < 0,01

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan ve hayvanlarda, antimikrobiyal bileşiklerin uzun süreyle profilaktik, tedavi veya büyümeyi teşvik amacıyla kullanılması, bakteriler üzerinde seçici bir etki oluşturarak uygulanan bileşiğe veya yapısal olarak benzer özelliklere sahip diğer bileşiklere karşı direnç gelişmesine neden olur. Bakterilerde antimikrobiyal dirençten bir veya birden çok direnç mekanizması sorumlu olabilir. İntrinsik ve/veya kazanılmış direnç olarak sınıflandırılan antimikrobiyal direnç mekanizmalarının varlığı, klinik olarak bakterinin duyarlılık düzeyini etkiler. Antimikrobiyal direnç mekanizmalarındaki çeşitlilik bakterilerin farklı grup bileşiklere karşı dirençli hale gelmesine neden olur ve MDR'in ortaya çıkmasıyla sonuçlanabilir (Hasdemir, 2013 ve Szmolka ve Nagy, 2013).

Antimikrobiyal direnci önlemeye yönelik stratejilerin geliştirilmesi için direncin tanımlanması önemlidir. Belirli bir bölgedeki antimikrobiyal bileşiklerin duyarlılık profillerinin bilinmesi ve diğer ülkelerle karşılaştırılması, antimikrobiyal dirence karşı etkili ve ortak bir çözüm geliştirilebilmesi için gereklidir. Ancak veteriner hekimliği alanında sürveyans çalışmalarının yeterli düzeyde olmaması nedeniyle antimikrobiyal dirençle ilgili yapılan retrospektif çalışmalardan elde edilen veriler kısıtlıdır. Bu nedenle antimikrobiyal dirençle mücadelede fenotipik veriler, moleküler karakterizasyon çalışmalarıyla desteklenmelidir (Marques ve ark., 2016 ve Szmolka ve Nagy, 2013).

Florokinolonlar, beşeri ve veteriner hekimlikte Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı en yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal bileşiklerdendir. Hayvanlarda florokinolonların tedavi veya profilaktik amaçlı kullanımı insanlara göre daha fazladır. Buna bağlı olarak, özellikle besin değeri olan hayvanlarda florokinolon direncinin prevalansı insanlara göre daha yüksektir (Hu ve ark., 2017). Sağlıklı ve hasta hayvanlardan toplanan *E. coli* izolatlarının NAL, CIP, ENR, DAN, ORB ve GAT gibi florokinolon grubu bileşiklerden en az birine karşı %64 oranında dirençli olduğunun belirlenmesi

bu görüşü desteklemektedir. *E. coli*'de florokinolon direncinden birincil olarak *gyrA* ve/veya *parC* genlerindeki mutasyonlar sorumludur ve *gyrB* ile *parE* mutasyonları, *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonlara göre daha az sıklıkta görülür (Johnning ve ark., 2015). Buna paralel olarak hayvanlardan izole edilen *E. coli*'de *gyrA* ve *parC* genlerine göre *gyrB* ve *parE* genlerinde mutasyonlara daha az rastlanmıştır. *gyrA* geninde Asp-87→Tyr mutasyonları, NAL'ın duyarlılığında azalmaya neden olmasına rağmen florokinolon grubundan diğer bileşiklerin duyarlılığını etkilemeyebilir (Chattaway ve ark., 2016). Benzer şekilde hayvanlardan izole edilen *E. coli*'de *gyrA* genindeki Ser-83→Leu mutasyonlarının, NAL'ın MİK'inde önemli düzeyde (> 256 µg/ml) artışa neden olmasına rağmen, CIP, ENR, DAN, ORB ve GAT duyarlılığını değiştirmedeği belirlenmiştir. QRDR mutasyonlarının sayısı florokinolonlara karşı direnç düzeyini belirler. Dolayısıyla *gyrA* geninde meydana gelen çift mutasyonlar sonucunda, tek mutasyonlara göre florokinolonların MİK'inde daha fazla artış görülür (Zhao ve ark., 2005). Buna paralel olarak, *gyrA* genindeki Ser-83→Leu ve Asp-87→Gly mutasyonlarının NAL ve CIP MİK'lerinde sırasıyla 128 ve 8 katlık, ORB ve GAT MİK'lerinde ise 2 katlık bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. *gyrA* veya *parC* genlerinde mutasyon olmayan duyarlı izolatların MİK'i birbirine yakın olmasına rağmen, dirençli izolatların MİK'i önemli derecede değişkenlik gösterir (Boyd ve ark., 2009). *gyrA* veya *parC* genlerindeki mutasyonlar CIP, GAT, NOR ve levofloksasin (LVX) MİK'inde artışa neden olur. Ancak QRDR mutasyonları, bileşiklerin kimyasal yapılarındaki farklılığa bağlı olarak CIP ile NOR'un MİK'ini, GAT ile LVX MİK'ine göre 10 kat daha fazla etkiler. Dolayısıyla CIP ile NOR MİK'i, GAT ile LVX'e göre daha yüksektir (Boyd ve ark., 2009). Oysa *gyrA* geninde Ser-83→Leu ve Asp-87→Gly mutasyonları meydana gelen *E. coli* izolatlarında, GAT MİK'inin (8 µg/ml) CIP MİK'ine (2 µg/ml) göre 4 kat fazla olduğu gözlenmiştir. Diğer yandan *gyrA* geninde Ser-83→Leu mutasyonu olan *E. coli* izolatlarının sadece NAL'a karşı, *gyrA*'daki Ser-83→Leu mutasyonu ile birlikte *parC*'deki Ser-80→Ile mutasyonu olan izolatların ise NAL ve CIP'e karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu durum *gyrA* ve *parC* genlerinde birlikte görülen mutasyonların, CIP direncine neden olması ile açıklanabilir

(Röderova ve ark., 2017). QRDR mutasyonlarının yanı sıra plazmid aracılı OqxAB ve QepA geri çıkartım pompaları, florokinolon direncinden sorumlu mekanizmalardandır. OqxAB geri çıkartım pompasının aktivasyonu ile NAL, flumekuin, CIP ile NOR gibi pompa substratları hücre dışına atılır ve *oqxB* geninin varlığı, bu bileşiklerin MİK'lerinde 8-64 katlık artışa neden olur (Ruiz ve ark., 2012). Benzer şekilde *oqxB* genini taşıyan *E. coli*'de NAL, CIP ve ORB MİK'lerinin *E. coli* ATCC 25922 standart suşuna göre 8-16 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. *qepA* geni ise düşük düzeyde florokinolon direncine neden olur ve *E. coli* izolatlarında görülme sıklığı azdır (Röderova ve ark., 2017). Florokinolonlara karşı dirençli olan *E. coli* izolatlarının hiçbirinde *qepA* geni tespit edilmemiş olması bu veriyi destekler.

AcrAB ve OqxAB gibi florokinolon geri çıkartım pompaları, florokinolonlarla benzer yapıda olmayan β -laktam, makrolid, tetrasiklin ve sülfonamid grubu bileşikler ile TMP gibi birçok antimikrobiyal bileşiğin hücre dışına atılımını sağlar ve MDR ile ilişkilendirilir (Bambeke ve ark., 2006). Geri çıkartım pompasını düzenleyen genlerdeki ekspresyon artışı, antimikrobiyal bileşiklere karşı bakterinin direnç geliştirmesini kolaylaştırır ve *E. coli*'de bunu MarA, SoxS ile Rob transkripsiyon faktörleri kontrol eder. Transkripsiyon faktörleri, MDR'in önemli bir göstergesi olan *acrAB* ve *tolC* gibi genlerin ekspresyonunu artırır ve geri çıkartım pompası aktive olur (Aono ve ark., 1998; Chollet ve ark., 2002 ve Pomposiello ve ark., 2001). Bunun yanı sıra *micF* üretiminin artışı, OmpF sentezini azaltır. Böylece hem antimikrobiyalin hücre dışına çıkartımı artar hem de hücre içine membran aracılığıyla alınan antimikrobiyal miktarı azalır (Piddock ve ark., 2014). Bu kapsamda *marA*, *acrB* ve *soxS* genlerinde ekspresyon artışı ve buna ek olarak *ompF* geni ekspresyonundaki azalma olan *E. coli* izolatlarının 7 farklı antimikrobiyal ilaç grubundan 9 bileşiğe karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Buna göre geri çıkartım pompası aktivasyonundan sorumlu olan genlerin ekspresyonundaki değişikliklerin kombine etkisi, yüksek düzeyde MDR'a neden olabilir. Diğer yandan *ompF* geninde ekspresyon değişikliği olmayan ancak diğer genlerde ekspresyon artışı görülen izolatların ise 4 farklı antimikrobiyal ilaç grubuna

karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir ve bu durum *ompF* geninin bileşiklerin duyarlılığı üzerindeki belirgin etkisini gösterir. *acrB* geninin bileşiklerin duyarlılığı üzerindeki etkisi ise *Salmonella*'da *acrB* geni susturulduğunda CIP MİK'inde 64 kat azalma meydana gelmesi ve *E. coli*'de *acrB* genindeki ekspresyon artışının CIP ile NOR MİK'ini 5 kat arttırması ile gösterilebilir (Ferrari ve ark., 2013). Yapısında QRDR mutasyonu veya PMQR genleri gibi direnç mekanizmalarından herhangi birini bulundurmayan, sadece *acrB* geninde ekspresyon artışı belirlenen *E. coli* izolatlarında CIP MİK'inin standart suşa göre 32 kat fazla olduğunun tespit edilmesi ise bu durumu destekler niteliktedir. Bununla birlikte AcrAB'deki ekspresyon artışları her zaman antimikrobiyal bileşiklerin MİK'inde artışa neden olmayabilir (Ferrari ve ark., 2013). Örneğin hayvanlardan izole edilen *E. coli*'de tek başına *acrB* ve *ompF* genlerinde ekspresyon artışı olmasına rağmen MDR fenotipi gözlenmemiştir. Farklı direnç mekanizmalarının varlığının yanı sıra yokluğu da antimikrobiyal bileşiklerin duyarlılığını belirler. Buna göre QRDR mutasyonları gözlenmeyen izolatlarda *marA* ve *soxS* genlerindeki ekspresyon artışlarının, QRDR mutasyonu olan izolatlara göre daha yüksektir (Ferrari ve ark., 2013). Oysa *gyrA* mutanlığı olan *E. coli*'de *soxS* geninde 17 katlık ekspresyon artışı tespit edilmiştir.

Geri çıkartım pompası aktivasyonu gibi intrinsik direnç ile kromozomal ve plazmid aracılı direnç gibi kazanılmış direnç mekanizmaları, mevcut antimikrobiyal bileşiklerin etkisizleşmesine neden olur ve antimikrobiyal terapi başarısızlıkla sonuçlanır. Antimikrobiyal kombinasyonlarla mevcut bileşiklerin antimikrobiyal etkinliğinde artış sağlanabilir ve direncin önlenmesi açısından etkili bir seçenek oluşturulabilir. Bu kapsamda antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimler checkerboard mikrodilüsyon testi ve zamana bağlı doz-yanıt deneyleri ile değerlendirilir. Ancak checkerboard yöntemi, bileşiklerin sadece inhibitör etkinliğini gösterir, bakterisidal etkinlikleriyle ilgili bilgi vermez. Ayrıca etkileşimlerin değerlendirilmesinde farklı kriterlerin (CLSI, EUCAST vb.) kullanılmasına bağlı olarak sonuçlar değişkenlik gösterebilir. Bu

nedenle checkerboard mikrodilüsyon testinden elde edilen veriler zamana bağlı doz-yanıt deneyleriyle desteklenmelidir (Leite ve ark., 2016).

β -laktamlar ve aminoglikozid grubu bileşikler, birçok bakteri türüne karşı sinerjistik etkili antimikrobiyal kombinasyonlardan birkaçıdır. Bu bileşikler arasındaki sinerjizma, hücre duvarı sentezi inhibitörü olan β -laktamların, aminoglikozidlerin hücre içine alınmasının arttırması ve aminoglikozidlerin ise hücre membranında hasara neden olarak β -laktamların hücre duvarı üzerindeki etkinliklerinin güçlendirmesinden kaynaklanmaktadır (Güzel ve Gerçeker, 2008). Örneğin AMK+CRO kombinasyonu *in vitro* koşullarda *P. aeruginosa* izolatlarının birçoğuna karşı sinerjistik etkilidir ve antagonizma gözlenmez (Mayer ve Nagy, 1999). Benzer şekilde *in vitro* koşullarda FEP+GEN ve CRO+GEN kombinasyonu MDR *E. coli* izolatlarına karşı sırasıyla %66 ve %50 düzeyinde, CEF+GEN kombinasyonu ise %100 düzeyinde sinerjistik etkili bulunmuştur ve antagonizma tespit edilmemiştir. β -laktam+aminoglikozid kombinasyonlarının *in vivo* sinerjistik etkinliği CXM+TOB kombinasyonunun, CXM'in tek başına uygulandığı tedaviye göre karaciğer ve dalaktaki bakteri yoğunluğunda anlamlı düzeyde azalmaya neden olması ile gösterilmiştir (Paul ve ark., 2014).

β -laktam+aminoglikozid kombinasyonu, birçok bakteri türüne karşı sinerjistik etkili olmasına rağmen, toksik etki potansiyelleri klinik kullanımlarını kısıtlar. Bu açıdan β -laktam+florokinolon grubu bileşikler, kombinasyon terapisinde etkili ve güvenli bir seçenek olabilir (Al-Hasan ve ark., 2009). Örneğin, β -laktamlar grubundan CRO ve CTX, florokinolonlardan ise LVX ve MOX'un kullanıldığı kombinasyon terapisinin, dirençli *S. pneumoniae*'ye karşı sinerjistik etkili olduğu gösterilmiştir (Drago ve ark., 2011). Ancak LVX ve MOX'un aynı antimikrobiyal ilaç grubuna ait olması nedeniyle etki mekanizmalarının ve kombinasyondaki etkinliklerinin benzer olması beklenirken, LVX ve β -laktam kombinasyonları, MOX ve β -laktam kombinasyonlarına göre daha yüksek oranda sinerjistik etkili bulunmuştur. Bu durum bileşiklerin intrinsik etkinliklerinin farklı olması ile açıklanabilir (Drago

ve ark., 2011). Aynı şekilde *P. aeruginosa* ve *E. coli*'de FEP+CIP ile FEP+TOB kombinasyonu yüksek düzeyde sinerjistik etkili olmasına rağmen, CAZ+CIP kombinasyonu orta düzeyde sinerjistik etki gösterebilir (Mayer ve Nagy, 1999; Paul ve ark., 2014). Benzer farklılık florokinolonlar ile kombine edilen FEP, CRO ve CEF arasında da gözlenmiştir. Buna göre CEF+florokinolon kombinasyonları hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli*'ye karşı en az %83 düzeyde sinerjistik etkili olmasına rağmen, FEP+florokinolon kombinasyonlarının %33 düzeyde ve CRO+florokinolon kombinasyonlarının ise %33-66 düzeyinde sinerjistik etkili olduğu belirlenmiştir.

β -laktam+aminoglikozid ve β -laktam+florokinolon kombinasyonları gibi etki spektrumunu genişletmek ve sinerjistik etkinlik oluşturmak amacıyla sıklıkla tercih edilen kombinasyonların yanı sıra son yıllarda antimikrobiyal direncin önlenmesine yönelik yapılan araştırmalarda, istenmeyen etkileri nedeniyle kullanılmayan CST'nin monoterapi ve kombinasyon terapisinde kullanımı yeniden gündeme gelmiştir (Tangden, 2014). CST, tek başına veya diğer antimikrobiyal bileşiklerle kombine olarak kullanıldığında MDR Gram negatif bakterilere karşı etkilidir ve β -laktam grubu bileşiklerle birlikte kullanıldığında daha hızlı ve daha etkili bir bakteriyel eradikasyon sağlar (Falagas ve ark., 2005 ve Timurkaynak ve ark., 2006). Örneğin CAZ+CST kombinasyonu *P. aeruginosa*'ya karşı %24 düzeyinde sinerjistik etkilidir (Güzel ve Gerçekler, 2008). Buna paralel olarak hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli*'de FEP+CST kombinasyonu %33 düzeyinde sinerjistik etkili olmasına rağmen, CRO+CST ve CEF+CST kombinasyonlarının %66 düzeyinde sinerjistik etkili olduğu tespit edilmiştir.

Kombinasyon terapisinde bileşiklerin bireysel MİK'lerinin dirençlilik sınırlarının altında olması veya bakterilerin bu bileşiklere karşı düşük düzeyde dirençli olması, kombinasyonun etkinliğini değiştirebilir ve sinerjizma görülme olasılığını artırabilir (Wareham ve ark., 2006). Bunun aksine LVX+imipenem (IMP) ve CST+IMP arasındaki etkileşim bileşiklerin bireysel MİK'inden bağımsızdır (Safarika ve ark., 2015). Hayvanlardan izole edilen MDR *E.*

coli'de CIP, ENR ve DAN ile CST kombinasyonları arasındaki etkileşim de bu görüşü desteklemektedir. Buna göre ENR ve DAN'a karşı duyarlı olan *E. coli* izolatlarının CIP'e karşı dirençli olmasına rağmen ENR+CST kombinasyonunun %33, DAN+CST kombinasyonunun %66, CIP+CST kombinasyonunun ise %83 düzeyde sinerjistik etkili olduğu belirlenmiştir.

Antimikrobiyal kombinasyonlar arasındaki sinerjizmanın etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, CST gibi bazı bileşiklerin kombinasyondaki etki mekanizmaları ile ilgili tatmin edici açıklamalar bulunmaktadır (Tangden, 2014). Buna göre CST'nin deterjan benzeri etki göstermesi sonucu hücre membranının yapısı bozulur ve geçirgenliği artar. Bu sayede florokinolonlar ve diğer bileşiklerin hücre içine girişi kolaylaşır. Bu etki mekanizması sayesinde hücre membranındaki porinlerin sayısında azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan antimikrobiyal direnç önlenebilir ve ayrıca geleneksel olarak Gram negatif bakteriler için tedavi seçeneği olarak düşünülmeyen antimikrobiyallerle etkin bir tedavi sağlanabilir (Tangden, 2014). Örneğin, DAN+CST kombinasyonu, DAN MİK'inde 16-64 katlık azalmaya neden olmasına rağmen, CST MİK'inde yalnızca 2 katlık bir azalma gözlenmiştir. Buna göre florokinolon ile polimiksin kombinasyonlarında daha çok florokinolonlar lehine bir sinerjizma olduğu söylenebilir. CRO+CST kombinasyonunda ise bileşiklerin bireysel MİK'lerindeki azalma birbiriyle benzerdir ve ortalama 2-32 katlık bir azalma tespit edilmiştir. Diğer yandan antimikrobiyal bileşikler birlikte kullanıldığında her zaman sinerjistik etki gözlenmemesine rağmen bileşiklerin kombinasyondaki FİK'i, bireysel MİK'lerinden düşük olabilir. Bu durum MDR bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde yüksek dozda ilaç kullanma gereksinimini azaltır ve böylece yüksek doza bağlı olarak ortaya çıkan istenmeyen etkilerin en aza indirilmesini sağlar (D'Souza ve ark., 2014). Bu duruma örnek olarak checkerboard mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre MDR *E. coli* izolatlarına karşı %66 düzeyde sinerjistik, %34 düzeyde ise additif etkili bulunan CRO+CST ve DAN+CST kombinasyonları verilebilir. CRO+CST ve DAN+CST kombinasyonlarının additif etkili olduğu izolatlarda CRO ve

DAN'ın kombinasyondaki FİK'lerinin, bireysel MİK'lerine göre 8-64 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ancak kombinasyonun klinik etkinliğinin belirlenmesi açısından, bileşiklerin kombinasyondaki FİK'lerinin, CLSI kriterlerine göre dirençlilik sınırının altında olması önemlidir. Örneğin, *A. baumannii* izolatlarına karşı CST+IMP kombinasyonunda IMP'nin FİK'i, MİK'ine göre daha düşük olmasına rağmen CLSI kriterlerine göre hala dirençlilik sınırının üzerinde olması bu kombinasyonun klinik etkinliğinin tartışılabilir olduğunu gösterir (Wareham ve ark., 2006). Hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli* izolatlarına karşı checkerboard mikrodilüsyon yöntemi sonuçlarına göre ise sinerjistik etkili olduğu belirlenen CRO+CST, CEF+DAN ve DAN+CST kombinasyonlarının hepsinde, bileşiklerin kombinasyondaki FİK'lerinin, bireysel MİK'lerinden daha düşük olduğu ve CLSI kriterlerine göre dirençlilik sınırının altında olduğu tespit edilmiştir. Ancak *E. coli* izolatlarına karşı %100 sinerjistik etkili olan CEF+GEN kombinasyonu için izolatların 2/6'sında GEN'in kombinasyondaki FİK'inin, bireysel MİK'ine göre 8 kat düşük olmasına rağmen, dirençlilik sınırlarının üzerinde olduğu gözlenmiş ve bu durumun izolatların GEN'e karşı dirençli olmasından kaynaklandığı kanısına varılmıştır.

Antimikrobiyal bileşiklerin arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesinde en yaygın olarak checkerboard testi kullanılır. Bu testten elde edilen sonuçların teyid edilmesi ve kombinasyonun bakteriyostatik/bakterisit etkinliğinin değerlendirilmesi için ise zamana bağlı doz-yanıt deneyleri uygulanır. Ancak bu iki sinerji testinden elde edilen sonuçların nadiren uyumlu olduğu, çoğunlukla ise test koşullarının farklı olmasına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (White ve ark., 1996). Örneğin zamana bağlı doz-yanıt deneylerinde başlangıç bakteri yoğunluğu, sonucu etkileyen faktörlerdendir. Ayrıca incelenen antimikrobiyal konsantrasyonlarının az sayıda ve deney süresinin ise 24 saatle sınırlı olması zamana bağlı doz-yanıt deneylerinin dezavantajlarından (White ve ark., 1996). Checkerboard testi ve zamana bağlı doz-yanıt deney sonuçlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda, bu iki test arasındaki uyumun belirgin düzeyde

düşük olduğu bildirilmiştir (Pankey ve ark., 2005). White ve ark. (1996) tarafından FEP, CAZ, TOB ve CIP arasındaki etkileşimin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan checkerboard testi ve zamana bağlı doz-yanıt deneyleri arasındaki uyum %44-88 aralığında bulunmuştur. Bonapace ve ark. (2000) tarafından ise bu uyumun %30-67 aralığında olduğu belirtilmiştir. Hayvanlardan izole edilen *E. coli*'de β -laktam, florokinolon, aminoglikozid ve polimiksin gruplarının bulunduğu 4 farklı antimikrobiyal gruptan 8 antimikrobiyal bileşik kullanılarak 18 antimikrobiyal kombinasyon oluşturulmuştur. Bu kombinasyonlar arasındaki etkileşimin değerlendirildiği sinerji testleri arasındaki uyum, daha önce yapılan araştırmaların sonuçlarına benzer şekilde düşük düzeydedir. Checkerboard testi sonuçları ile zamana bağlı doz-yanıt deneylerinin 6. saat sonuçları arasındaki uyum %16 olarak saptanmış, zamana bağlı doz-yanıt deneylerinin 24. saat sonuçlarıyla ise bir uyum tespit edilmemiştir. Antimikrobiyal kombinasyonların, *E. coli* izolatlarına karşı checkerboard testi sonuçlarına göre %58, zamana bağlı doz-yanıt deneylerinin 6. saat sonuçlarına göre %45, 24. saat sonuçlarına göre ise %30 düzeyde sinerjistik etkili olduğu belirlenmiştir. Principe ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada checkerboard testi sonuçlarına göre antimikrobiyal bileşikler arasındaki sinerjizma düzeylerinin, zamana bağlı doz-yanıt deneyleri sonuçlarına göre daha yüksek olması bu veriyi destekler. Sinerji testlerine göre *E. coli*'ye karşı en etkili antimikrobiyal kombinasyon CEF+DAN kombinasyonudur ve checkerboard testi sonuçlarına göre %100, zamana bağlı doz-yanıt deneyleri 6 ve 24. saat sonuçlarına göre ise %66 düzeyde sinerjistik etkili olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan her iki sinerji testi sonuçlarına göre β -laktam+aminoglikozid kombinasyonları için antagonizma gözlenmemiştir. Buna ek olarak checkerboard testi sonuçlarına göre β -laktam+polimiksin ve florokinolon+polimiksin kombinasyonları için antagonizma tespit edilmemesine rağmen, duyarlı *E. coli* E175 izolatına karşı CRO+CIP ve FEP+CIP'in antagonistik etkili olduğu belirlenmiştir. Zamana bağlı doz-yanıt deneylerinde ise checkerboard testi sonuçlarına göre antimikrobiyal bileşikler arasında daha yüksek oranda antagonizma gözlenmiştir ve bu antagonistik etkileşimin çoğunlukla 24. saatin sonunda

olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun 24. saatin sonunda bakterilerin yeniden üremesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Zamana bağlı doz-yanıt deneylerinde 24. saatin sonunda yeniden üremenin görülmesi ise sub-inhibitör konsantrasyonlarda antimikrobiyal kullanımına bağlı olarak gelişen dirençli sub-popülasyonların ortaya çıkması, deneyde kullanılan materyalin yüzeyine yapışan bakterilerin varlığı veya antimikrobiyal bileşiklerin *in vitro* olarak inaktive edilmesinden kaynaklanabilir (Pankey ve ark., 2005).

Antimikrobiyal kombinasyonlar, duyarlı bakterilere karşı etkili olmalarının yanı sıra MDR bakterilere karşı da etkilidir (Gunderson ve ark., 2003 ve Timurkaynak ve ark., 2006). Bununla birlikte dirence neden olan β -laktamaz ve sefalosporinaz enzimlerinin varlığı, OMP'lerin azalması ve geri çıkartım pompası aktivasyonu gibi farklı direnç mekanizmaları, antimikrobiyal kombinasyonların etkinliğini azaltabilir. Ancak direnç etmenleri ile antimikrobiyal kombinasyonlar arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir (D'Souza ve ark., 2014). Benzer şekilde hayvanlardan izole edilen *E. coli* izolatlarında antimikrobiyal kombinasyonların etkinliği ile izolatların duyarlı ve dirençli olmaları arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Örneğin, MDR fenotipine sahip ve *gyrA*, *parC* ve/veya *oqxB* mutanları olan izolatlar karşı DAN+CST kombinasyonu antagonistik etkili olmasına rağmen duyarlı *E. coli* izolatına karşı sinerjistik etkilidir. Diğer yandan sadece duyarlı *E. coli*'ye karşı antagonistik etki gösteren CRO+CIP kombinasyonunun MDR izolatlar karşı sinerjistik veya additif etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca fenotipik ve moleküler açıdan MDR profiline sahip *E. coli* izolatı ile duyarlı *E. coli* izolatının her ikisine karşı sinerjistik etkili olan antimikrobiyal kombinasyonların sayısının eşit olduğu (9/18) belirlenmiştir. Bu verilere bağlı olarak antimikrobiyal bileşikler arasındaki sinerjizmanın direnç mekanizmasından bağımsız olduğu varsayılmıştır.

Antimikrobiyal direncin önlenmesine yönelik araştırmalarda antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesi kadar, antimikrobiyal bileşik ve kombinasyonların MBK'sının belirlenmesi de

önemlidir. MBK, antimikrobiyal bileşiklerin ve kombinasyonların bakteriler üzerindeki öldürücü ve üremelerini engelleyici potansiyellerinin belirlenmesini sağlar. Ayrıca antimikrobiyal direncin önleme stratejileri arasında önemli yere sahip olan doz optimizasyonu açısından bilgi verir. Böylece zamana bağlı doz-yanıt deneylerinden elde edilen bileşiklerin bakteristatik/bakterisit etkinlikleri ile ilgili veriler, MBK testi sonuçlarıyla da desteklenebilir (Levison ve ark., 2009). Çoğunlukla zamana bağlı doz-yanıt deneyleri ile MBK testi sonuçları birbirine benzerdir (Lee ve ark., 2017). Ancak zamana bağlı doz-yanıt deneylerinde 6 ve 24. saatte, hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli* izolatlarına karşı %16-33 düzeyinde sinerjistik etkili bulunan CEF+GEN kombinasyonunun, MBK testi sonuçlarına göre %100 düzeyinde bakterisit-sinerjistik etkili olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte zamana bağlı doz-yanıt deneylerinde 6. saatte %84 düzeyinde sinerjistik etkili bulunan DAN+CST kombinasyonunun, MBK testinde %66 düzeyinde bakterisit-sinerjistik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın nedeni duyarlılık ve sinerji testlerinin tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve bu testlerden elde edilen sonuçların, aynı kişiler tarafından yapılmasına rağmen bazen sadece %50 oranda uyumlu olması ile açıklanabilir (MacGowan ve ark., 1999).

Antimikrobiyal bileşikler zamana veya konsantrasyona bağlı olarak bakterisit etki gösterir (Levison ve ark., 2009). Florokinolon, aminoglikozid ve polimiksinler gibi konsantrasyona bağlı bakterisit etki gösteren bileşiklerin MBK:MİK oranı genellikle 1-2 iken, β -laktamlar gibi zamana bağlı bakterisit etki gösteren bileşikler için ise bu oran daha yüksektir (Bennett ve ark., 2014 ve Hansen ve ark., 2005). Buna paralel olarak duyarlı *E. coli* izolatlarında DAN, GEN ve CST için MBK:MİK oranı 1 olmasına rağmen, CRO ve CEF için bu oranın diğer bileşiklere göre 8-16 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal bileşiklerin etki şekillerinin yanı sıra direnç mekanizmalarının varlığı ve kombinasyon terapisi MBK'yı etkileyen faktörlerdendir (Briales ve ark., 2011). Örneğin, *qnrS* geni taşıyan *E. coli* izolatlarının CIP MBK'sı, *gyrA* veya *parC* mutantlarına göre sırasıyla 2 ve 32 kat daha yüksektir. Ayrıca hem *gyrA* hem de *parC* mutantı olan suşlarda CIP MBK'sı *E. coli* standart suşuna

göre 125 kat, sadece *gyrA* mutantına göre ise 16 kat daha yüksektir. Kromozomal direnç mekanizmalarına *qnrS* gibi plazmid aracılı direnç genlerinin de eklenmesiyle bu artışın standart suşa göre 250, *gyrA+parC* mutantına göre ise 32 kat fazla olduğu belirtilmiştir (Briales ve ark., 2011). Benzer şekilde kromozomal ve plazmid aracılı direnç etmenlerinden bir veya birkaçını bulduran *E. coli* izolatlarında DAN MBK'sının, duyarlı *E. coli* izolatına göre 125 kat yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna göre direnç mekanizmalarının, antimikrobiyal bileşik ve kombinasyonların bakterisidal etkinliğini değiştirebileceği kanısına varılmıştır. Antimikrobiyal kombinasyonlar, direnç mekanizmalarının aksine bileşiklerin bireysel MBK'larında azalmaya neden olarak daha düşük dozlarda kullanıldıklarında bile etkili olmalarını sağlar ve böylece sub-terapötik dozlarda ilaç kullanımına bağlı olarak gelişen direnç önlenebilir (Ganiere ve ark., 2009). Örneğin, LEX+KAN, bakterisit-sinerjistik etkili bir kombinasyondur ve kombinasyondaki LEX ile KAN MBK'sı, bileşiklerin bireysel MBK'larına göre sırasıyla 8 ve 4 kat daha düşüktür (Ganiere ve ark., 2009). Benzer şekilde *E. coli*'de CEF+GEN kombinasyonu için, CEF ve GEN'in kombinasyondaki MBK'larının, bireysel MBK'larına göre sırasıyla 64 ve 16 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. *E. coli* izolatlarına karşı CEF+DAN ve DAN+CST kombinasyonlarında da aynı değişiklik gözlenmiştir. CEF'e karşı dirençli olan *E. coli*'de CEF'in bireysel MBK:MİK oranı 4 olmasına rağmen, CEF+DAN kombinasyonunda bu oran 2 olarak bulunmuştur. DAN+CST kombinasyonunda ise DAN'ın kombinasyondaki MBK'sının, bireysel MBK'sına göre 128 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Kombinasyonların MBK:MİK oranında meydana getirdiği düşüşün çok yüksek düzeyde olmasının yanı sıra, antimikrobiyal kombinasyonların etkinliği ile ilgili diğer bir çarpıcı sonuç ise bireysel MİK'leri ve kombinasyondaki MBK'ları arasındaki ilişkidir. Bu doğrultuda CEF, DAN ile birlikte uygulandığında kombinasyondaki MBK'sının, dirençlilik sınırları üzerinde olan bireysel MİK'inden 4 kat düşük olduğu ve bu değerın dirençlilik sınırlarının altında olduğu belirlenmiştir. CEF+GEN kombinasyonunda da benzer şekilde, GEN'e karşı dirençli *E. coli*'de GEN'in kombinasyondaki MBK'sının bireysel MİK'inden 8 kat düşük

olduğu ve bu değerin dirençlilik sınırlarının altında olduğu gözlenmiştir. DAN+CST kombinasyonunda ise DAN'ın kombinasyondaki MBK'sının, bireysel MİK'inden 2-32 kat daha düşük olmasına rağmen, CST'nin kombinasyondaki MBK'sının, bireysel MİK'inden fazla olabildiği görülmüştür. Bu kapsamda *in vitro* MBK testi sonuçlarına göre CEF+DAN ve CEF+GEN kombinasyonu bakterilerin gelişimini durduran bireysel ilaç konsantrasyonundan daha düşük konsantrasyonlarda uygulandığında bile bakterilere karşı öldürücü etki gösterebilir. Buna ek olarak CEF tek başına kullanıldığında *E. coli*'ye karşı bakteriyostatik etki gösterirken, CEF+DAN kombinasyonunun bakterisit etkili olduğu belirlenmiş ve bileşikler arasındaki bakterisidal sinerjizma, checkerboard ve zamana bağlı-doğ yanıt deneyleriyle de desteklenmiştir. Buna göre antimikrobiyal kombinasyonlar, bileşiklerin etki şekillerini değiştirebilir ve monoterapide bakteriyostatik etki gösteren bileşikler, kombinasyon terapisinde bakterisit etkili olabilir.

Antimikrobiyal bileşikler ve kombinasyonların MBK'sının belirlenmesi ile elde edilen sonuçlar bakteriyel etkinin statik bir göstergesidir ve zamana veya konsantrasyona bağlı olarak ilacın etkinliğinde meydana gelen değişikliklerin değerlendirilmesi mümkün olmaz (Craig, 1998 ve Dalhoff ve ark. 2003). Bu nedenle, MBK testine ilave olarak direnç mekanizması esas alınarak uygulanan MÖK testi, kombinasyonların dirençli bakteriler üzerindeki etkisini izlemek ve doz optimizasyonu için kullanılabilir (Cengiz ve ark., 2013a ve Gebru ve ark., 2012).

MÖK, antimikrobiyal terapi sırasında antimikrobiyalin seçici etkisi altında dirençli bakterilerin gelişiminin önlenmesinde antimikrobiyal bileşikler ile kombinasyonların etkinliğini ve potensini belirleyen bir parametredir (Li ve ark., 2016). Antimikrobiyal bileşiklerin *in vitro* potensinin yüksek olması, düşük MÖK değerleri ile ilişkilendirilir (Wetzstein, 2005). Buna göre CRO, CEF, DAN, GEN ve CST'nin hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli*'ye karşı potent etkileri sırasıyla CRO > DAN > CST > CEF > GEN'dir. Etkin bir antimikrobiyal terapi için bileşik ve kombinasyonların *in vitro* potensininin

belirlenmesinin yanı sıra MÖK değerlerinin CLSI kriterlerine göre dirençlilik sınırının altında olması istenir (Credito ve ark., 2010). Bu kapsamda CRO ve DAN'ın MÖK değerleri sırasıyla izolatların 4/6 ve 1/6'sında dirençlilik sınırının altında bulunmasına rağmen; CEF, GEN ve CST'nin MÖK değerlerinin izolatların 6/6'sına karşı dirençlilik sınırının üzerinde olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyal terapi sırasında antimikrobiyalın seçici etkisi altında mikroorganizmada meydana gelen spontan mutasyonlar nedeniyle direnç geliştirebilir ve MÖK düzeylerinde artış görülebilir (Zhanel ve ark., 2006). Antimikrobiyal terapide tek bileşik yerine farklı etki mekanizmasına sahip bileşikler birlikte kullanıldığında, tek bileşiğe göre etki mekanizması farklı olan 2 antimikrobiyal bileşiğe karşı spontan mutasyonların oluşmasının daha zor olması nedeniyle, antimikrobiyal kombinasyonlar direncin önlenmesi açısından etkili bir seçenek olabilir (Zhanel ve ark., 2006). Örneğin; CAZ, CST ve MEM'in tek başına kullanıldığında *P. aeruginosa*'da direnç gelişimini önleyememesine ve LVX ile TOB'un ise direnç gelişimini önleyebilmesi için ancak yüksek dozlarda uygulanması gerekmesine rağmen; LVX+TOB, LVX+CAZ, LVX+CST ve LVX+MEM kombinasyonları direnç gelişiminin önlenmesi açısından bileşiklerin bireysel kullanımlarına göre daha etkilidir (Zhanel ve ark., 2006). Benzer şekilde *E. coli* izolatlarına karşı CEF, GEN ve CST'nin tek başına kullanıldığında direnç gelişimini önleyemediği, CRO ve DAN'ın ise direnç gelişimini önleyebilmesi için ancak yüksek dozlarda uygulanması gerektiği gösterilmiştir. Bununla birlikte CEF+DAN kombinasyonunda CEF ve DAN MÖK'lerinin izolatların 5/6'sına; CEF+GEN kombinasyonunda CEF ve GEN MÖK'lerinin sırasıyla izolatların 6/6 ve 1/6'sına; CRO+CST kombinasyonunda CRO ve CST MÖK'lerinin sırasıyla izolatların 6/6 ve 3/6'sına karşı dirençlilik sınırının altında olduğu tespit edilmiştir. DAN+CST kombinasyonunda ise DAN MÖK'ü izolatların 4/6'sına karşı dirençlilik sınırının altında olmasına rağmen, CST MÖK'ü izolatların hiçbirinde bu sınırında altında bulunmamıştır. Bu durum DAN+CST kombinasyonunda DAN'ın lehine bir durumun söz konusu olması ile açıklanabilir.

Antimikrobiyal direnç mekanizmalarının niceliği ve niteliği, MÖK ile MÖK:MİK oranında artışa neden olur (Baquero ve ark., 1997; Shimizu ve ark., 2013). Antimikrobiyal dirençle ilgili birçok araştırmada florokinolon direncinden sorumlu QRDR mutasyonları ile *qnr* genlerinin ve MDR'a neden olan geri çıkartım pompası aktivasyonundan sorumlu genlerdeki ekspresyon artışlarının antimikrobiyal bileşik ve kombinasyonların MÖK ve MÖK:MİK oranı üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Briales ve ark., 2011; Goto ve ark., 2015; Machuca ve ark., 2014; Machuca ve ark., 2015; Shimizu ve ark., 2013; Zhanel ve ark., 2006 ve Zhanel ve ark., 2009). Örneğin, duyarlı *E. coli*'de ORB MÖK'ünün 0,5-2 µg/ml aralığında ve MÖK:MİK oranının 4-16 olmasına rağmen, *gyrA* mutanlığı olan dirençli *E. coli*'de MÖK'ün 8-64 µg/ml aralığında ve MÖK:MİK oranının ise 4-32 olduğu belirlenmiştir (Shimizu ve ark., 2013). Benzer şekilde DAN+CST kombinasyonunda DAN MÖK'ünün duyarlı *E. coli* izolatında 0,016 µg/ml, *gyrA* mutanlığı olan izolatlarda ise 1-4 µg/ml aralığında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca DAN+CST kombinasyonu için en yüksek MÖK:MİK oranı 64 olarak *gyrA* geninde çift mutasyon olan *E. coli* izolatında belirlenmiştir. Briales ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, *gyrA* mutasyonları ve/veya *qnr* genlerinin MÖK üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu direnç mekanizmalarından her ikisinin de CIP ve LVX MÖK'ünde 4 katlık artışa neden olduğu, genlerin kombine etkisi altında olan bakterilerde ise bu artışın 8 kat olduğu belirlenmiştir. Oysa CEF+DAN kombinasyonu için *gyrA* mutasyonuna ve *oqxB* genine sahip dirençli *E. coli*'de DAN MÖK'ünün beklenmedik şekilde duyarlı izolata göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. *gyrA* mutasyonları ve *qnr* genlerinin yanı sıra, geri çıkartım pompası aktivasyonundan sorumlu *marR* genindeki ekspresyon değişiklikleri ($\Delta marR$) CIP MÖK'ünde tek başına 4 katlık bir artışa neden olur (Machuca ve ark., 2014). Ayrıca $\Delta marR$ + *gyrA* (S83L) mutantlarında MÖK'te 32 kat, $\Delta marR$ + *gyrA* (Ser-83→Leu) + *parC* (Ser-80→Arg) mutantlarında 128 kat ve $\Delta marR$ + *gyrA* (Ser-83→Leu) + *gyrA* (Asp-87→Asn) + *parC* (Ser-80→Arg) mutantlarında 512 katlık bir artış görülebilir (Machuca ve ark., 2014). *gyrA* (Ser-83→Leu) + *parC* (Ser-80→Arg) mutantlarında ise CIP MÖK'ü, standart suşa göre 64 kat fazla olabilir (Machuca ve ark., 2014). Hayvanlardan izole

edilen *E. coli*'de CEF+DAN ve DAN+CST kombinasyonları için de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre CEF+DAN kombinasyonunda sadece *soxS* geninde ekspresyon artışı olan (*soxS*↑) izolatlarda duyarlı suşa göre DAN MÖK'ünün 8 kat fazla olduğu, *soxS*↑ + *gyrA* (Ser-83→Leu) + *parC* (Ser-80→Ile) mutantında ise 16 katlık bir artış tespit edilmiştir. DAN+CST kombinasyonunda *soxS*↑ izolatu için DAN MÖK'ünün duyarlı izolata göre 64 kat, *gyrA* (S83T) + *oqxB* mutantının 128 kat ve *soxS*↑ + *gyrA* (Ser-83→Leu) + *parC* (Ser-80→Ile) ile *gyrA* (Ser-83→Leu) + *gyrA* (Ala-87→Gly) mutantlarının ise 256 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Bir PMQR geni olan *qepA*'nın, *E. coli*'de CIP MÖK'ünde 4-16 katlık bir artışa neden olduğu belirtilmiştir (Machuca ve ark., 2015). PMQR genlerinin varlığında, florokinolonların MÖK'ünde artış gözlenmesine rağmen, MÖK düzeyi dirençlilik sınırlarının altında olabilir. Bu nedenle PMQR genleri, düşük düzeyde florokinolon direnci ile ilişkilendirilir (Goto ve ark., 2015). PMQR genlerinin klinik açıdan önemli olmasının nedeni, MSP'de kalan konsantrasyonlarda, QRDR mutantlarının ortaya çıkması ve/veya gelişmeleri için mikroorganizmaların yeterince uzun süre hayatta kalmasını sağlamalarıdır (Briales ve ark., 2011).

Antimikrobiyal direnci önlemeye yönelik çalışmalarda, kombinasyon terapisi ile mikroorganizmalara karşı ilacın seçici öldürücü etkinliğinin artırılması ve MÖK:MİK'in düşük olması, daha net bir ifadeyle MÖK'ün mümkün olduğu kadar MİK'e yakın olması hedeflenir. Bununla birlikte klinik olarak mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinlikte bir avantaj sağlanmasa bile, MÖK düzeyleri değerlendirilerek antimikrobiyal kombinasyonlarla direnç gelişimi en yüksek düzeyde engellenebilir (Zhanel ve ark., 2009). Kombinasyon terapisi ile bileşiklerin MİK'lerinde azalma sağlanarak MÖK, dirençlilik düzeyine kadar azaltılabilir (Credito ve ark., 2010). CEF+DAN kombinasyonu için MÖK testinden elde edilen sonuçlar bu görüşü desteklemektedir. Buna göre florokinolonlar için hedef bölge olan *gyrA* genindeki çift mutasyon bulunduran ve CEF'e karşı dirençli olan *E. coli* için, CEF+DAN kombinasyonunda, CEF FİK'inin MİK'ine göre 8 kat düşük ve

dirençlilik sınırının altında olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak CEF'in kombinasyondaki MÖK'ünün ise bireysel MİK'inden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan GEN'e karşı duyarlı olan izolatlarda CEF+GEN kombinasyonunun MÖK değerleri, GEN'in bireysel MİK'inin üzerinde olmasına rağmen, GEN'e karşı dirençli izolatlarda beklenmeyen bir şekilde bireysel MİK'lerinden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum CEF+DAN ve CEF+GEN kombinasyonlarının MDR *E. coli*'ye karşı sinerjistik etkili olmasının yanı sıra MÖK değerlerinde azalmaya bağlı olarak direnç gelişimini önleme potansiyelinin de yüksek olduğunu gösterir.

Kombinasyondaki bileşiklerin MÖK değerlerinde, bireysel MÖK'lerine göre ≥ 4 katlık azalma sinerjizma, < 4 katlık bir azalma ise additif etki olarak nitelendirilir (Zhanel ve ark., 2006). Buna göre hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli* izolatlarının %100'üne karşı CEF+GEN kombinasyonunda CEF'in bireysel MÖK'üne göre en az 16, GEN'in bireysel MÖK'üne göre ise en az 4 katlık bir azalma gözlenmesi, kombinasyonun izolatların %100'üne karşı sinerjistik etkili olduğunu göstermiştir. CEF+DAN ve DAN+CST kombinasyonlarında izolatların 4/6'sında, CRO+CST kombinasyonunda ise izolatların 3/6'sında en az 4 katlık bir azalma tespit edilmiştir. Direnç önleme potansiyelleri açısından tüm kombinasyonlar için belirlenen sinerjizma oranları, checkerboard mikrodilüsyon testi sonuçlarını desteklemektedir.

MÖK:MİK oranı, antimikrobiyal bileşik ve kombinasyonların mutant oluşumunu önleme potansiyellerinin gösterilmesi ve antimikrobiyal terapide doz rejiminin belirlenmesi açısından önemli parametrelerdendir (Baquero ve ark., 1997 ve Zhang ve ark., 2014). Buna göre *E. coli*'de CRO, CEF, DAN, GEN ve CST bileşikleri arasında en düşük MÖK:MİK oranına sahip olan bileşik DAN (4-32), en yüksek MÖK:MİK oranına sahip olan ise CEF (16-128) olarak belirlenmiştir. MÖK:MİK oranı en yüksek olan bileşik CEF olmasına rağmen; CEF+DAN, CEF+GEN, CRO+CST ile DAN+CST arasında en etkili kombinasyon, en düşük MÖK:MİK değerine sahip olan CEF+GEN (2-32) kombinasyonudur. CEF+GEN kombinasyonunda CEF'in

MÖK:MİK'inin bireysel MÖK:MİK'ine göre *E. coli* izolatlarının %100'üne karşı, CEF+DAN kombinasyonunda ise CEF'in MÖK:MİK'inin bireysel MÖK:MİK'ine göre *E. coli* izolatlarının 5/6'sına karşı 4-32 kat düşük olduğu tespit edilmiştir. Daha net bir ifadeyle *E. coli* izolatlarına karşı yüksek MÖK:MİK oranına sahip olan CEF'in klinik olarak etkili olabilmesi ve dirençli mutantların gelişimini engelleyebilmesi için yüksek konsantrasyonlarda kullanılması gerekirken, CEF+GEN ve CEF+DAN kombinasyonu ile daha düşük konsantrasyonlarda etkili bir tedavi sağlanabilir. CRO+CST ve DAN+CST kombinasyonlarının MÖK:MİK açısından önemli bir avantaj sağlamadığı gözlenmiştir.

In vitro MÖK testinde düşük MÖK değerlerinin nedeni, düşük MİK düzeyleri olabilir (Hansen ve ark., 2005). Buna paralel olarak CRO+CST kombinasyonunda, CRO FİK'i düşük olan izolatların, kombinasyondaki MÖK'lerinin de düşük olduğu belirlenmiştir. Ancak *in vitro* olarak uygulanan MÖK testinde kullanılan bakteri yoğunluğunun (10^{10}), MİK testine göre (10^5) daha yüksek olması nedeniyle bileşiklerin MİK'ine göre MÖK değerlerinin tahmin edilmesi veya karşılaştırılması doğru olmayabilir. Dolayısıyla MİK'i daha düşük olan bir antimikrobiyal bileşiğin, MÖK'ü daha yüksek olabilir (Hansen ve ark., 2005). Bu saptamaya uyumlu olarak CEF+DAN kombinasyonu için, CEF FİK'leri eşit olan *E. coli* izolatlarının, CEF'in kombinasyon MÖK değerleri arasında 16-32 kat fark olduğu belirlenmiştir. Bu kapsamda MÖK ve MİK düzeyleri arasında net bir ilişki olmaması ve kombinasyon terapisi sayesinde MÖK düzeyleriyle birlikte MİK düzeylerinde de azalma görülmesi nedeniyle, tek başına MÖK ve MİK düzeyleri düşük olmasına rağmen MÖK:MİK oranı yüksek çıkabilir. Bu nedenle antimikrobiyal terapide kombinasyonların etkinliğinin belirlenmesinde MÖK:MİK'in yanı sıra MSP konsantrasyonlarının değerlendirilmesi önemlidir (Zhang ve ark., 2014). Bu görüşe paralel olarak CEF+DAN ve CEF+GEN kombinasyonlarının MSP'leri *E. coli* izolatlarının %100'ünde, CRO+CST ve DAN+CST kombinasyonlarının MSP'leri ise izolatların %83'ünde (5/6) bileşiklerin bireysel MSP'lerinden daha düşüktür. Ayrıca CEF+DAN, CEF+GEN ve

CRO+CST kombinasyonları için hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli* izolatlarının 2/6'sında, DAN+CST kombinasyonunda ise izolatların 4/6'sında bileşiklerin bireysel ve kombinasyon MÖK:MİK oranları eşit olmasına rağmen, kombinasyondaki MSP'lerinin 2-32 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. CRO+CST kombinasyonunda izolatların 2/6'sında kombinasyon MÖK:MİK oranı, CRO'nun bireysel MÖK:MİK oranından 2 kat fazla olmasına rağmen; CRO'nun kombinasyondaki MSP'sinin, bireysel MSP'sinden 4-16 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir. DAN+CST kombinasyonunda ise izolatların 3/6'sında kombinasyon MÖK:MİK oranı, DAN'ın bireysel MÖK:MİK oranından 4-16 kat fazla olmasına rağmen; DAN'ın kombinasyondaki MSP'sinin, bireysel MSP'sinden 2-8 kat daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte MÖK testinden *in vitro* olarak elde edilen MÖK:MİK ve MSP ile ilgili verilerinin klinik açıdan anlamlı ve kullanılabilir olması için $T > MÖK$, EAKA/MÖK ve C_{max} gibi PK/PD parametrelerine ihtiyaç duyulmaktadır (Pasquali ve Manfreda, 2007 ve Shimizu ve ark., 2013).

Uygulanan ilaç konsantrasyonlarının MSP'de bulunması durumunda MF önemli derecede artar. Bu kapsamda bileşik ve kombinasyonların etkinliğinin belirlenmesinde kullanılan parametrelerden biri MF'dir (Zhang ve ark., 2014). Örneğin, CAZ ve CST tek başına kullanıldığında *P. aeruginosa*'da direnç gelişimini engelleyemediği ve bu bileşiklerin MF'sinin genellikle 10^{-6} ve 10^{-7} olduğu belirtilmiştir (Zhanel ve ark., 2006). Tek bileşiğe göre, etki mekanizması farklı olan 2 antimikrobiyal bileşiğe karşı spontan mutasyonların oluşmasının daha zor olması nedeniyle, antimikrobiyal kombinasyonlar direncin önlenmesi açısından etkili bir seçenek olabilir. Bu kapsamda *P. aeruginosa*'ya karşı LVX ile TOB, CAZ ve meropenem (MEM) kombine edildiğinde MF'lerinde 10^2 - 10^3 katlık bir azalma gözlenmiş ve bu kombinasyonlar arasında en düşük MF'ye sahip kombinasyonun LVX+MEM olduğu belirtilmiştir (Zhanel ve ark., 2006). Buna ek olarak LVX+CAZ kombinasyonunun MF'sinin 10^{-7} , LVX+TOB MF'sinin ise 10^{-7} ve 10^{-10} aralığında olmasına rağmen LVX+CST MF'si 10^{-5} ve 10^{-10} aralığında

bulunmuştur (Zhanel ve ark., 2006). LVX+CST kombinasyonu MF'sinin, CST'nin bireysel MF'sine yakın olduğu ve bu kombinasyonla MF'de anlamlı bir azalma olmadığı belirtilmiştir (Zhanel ve ark., 2006). Bunun aksine hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli*'de CEF+DAN, CEF+GEN, CRO+CST ve DAN+CST arasında en düşük MF'ye (10^{-13}) sahip kombinasyon DAN+CST olarak belirlenmiştir. CEF+DAN ve CRO+CST kombinasyonlarının MF'lerinin 10^{-10} ve 10^{-12} aralığında, CEF+GEN MF'sinin ise 10^{-9} ve 10^{-12} aralığında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca iki araştırmada benzer grup antimikrobiyal kombinasyonlar kullanılmasına rağmen, *E. coli*'de MF'nin, *P. aeruginosa*'ya göre 10^3 - 10^4 kat daha düşük olduğu ve daha önce belirtildiği gibi (Zhanel ve ark., 2006) mikroorganizma türünün MF üzerindeki etkisi gözlenmiştir.

Antimikrobiyal direncin önlenmesi için antimikrobiyal bileşik ve kombinasyonların etkinliğini gösteren MİK, FİK, MBK ve MÖK gibi parametrelerinin bilinmesi önemlidir. Ancak bu FD parametreler antibiyotik sonrası baskılayıcı etkinin düzeyini belirlemede yetersizdir. Bu nedenle doz optimizasyonu için antimikrobiyal bileşik ve kombinasyonların PAE sürelerinin belirlenmesi esastır (Rayaman ve ark., 2012). Böylece gereksiz yere yüksek dozlarda ve sık aralıklarla antimikrobiyal kullanımı azaltılarak antimikrobiyal direnç gelişimi önenebilir, mevcut bileşiklerin etkinliği yeniden sağlanabilir ve toksisite riski ile tedavi masrafları azaltılabilir (Gerçeker, 2003).

Kombinasyon terapisi ile bileşiklerin mikroorganizmalara karşı inhibitör etkinliklerinde artış görülmesinin yanı sıra PAE süresi açısından da yararlı etki sağlanabilir. Örneğin, *Streptococcus viridans* (*S. viridans*), *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'ye karşı CEF+GEN kombinasyonunun PAE süresi, bileşiklerin bireysel PAE sürelerinden daha uzundur (Buxbaum ve Georgopoulos, 1996). PAE açısından β -laktamlar ve aminoglikozidler arasındaki bu etki, aminoglikozidlerin protein sentezini inhibe ederek bakterisit etki göstermelerinden kaynaklanabilir. Aminoglikozidler tarafından protein

sentezinin inhibe edilmesiyle bakteri yaşamı için gerekli olan ribozomal proteinlerin yeniden üretilmesi için belirli bir zaman gerekir ve buna bağlı olarak bu bileşiklerin PAE süreleri genellikle uzar (Buxbaum ve Georgopoulos, 1996). Ancak antimikrobiyalin konsantrasyonu, antimikrobiyale maruz kalma süresi, antimikrobiyalin ortamdan uzaklaştırılma yöntemi, antimikrobiyalin ve mikroorganizmanın türü PAE süresini etkileyen faktörlerdendir (Odenholt, 2001). Örneğin, *Streptococcus viridans* (*S. viridans*), *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'ye karşı CRO+GEN kombinasyonunun PAE süresi, bileşiklerin bireysel PAE sürelerinden daha uzundur (Buxbaum ve Georgopoulos, 1996). Bununla birlikte *S. viridans*'ta CRO+GEN kombinasyonu için belirlenen PAE süresi, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'ye göre daha uzundur (Buxbaum ve Georgopoulos, 1996). *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'de bu sürenin daha kısa olması, yeniden üreme hızlarının *S. viridans*'a göre daha fazla olmasının bir sonucudur (Buxbaum ve Georgopoulos, 1996). Ayrıca *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı β -laktam+aminoglikozid kombinasyonlarının PAE süresi 1,0-3,3 s olarak belirlenmiş ve bu süre bileşiklerin bireysel PAE'lerinden uzun olmasına rağmen, bu kombinasyonun *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de PAE'ye sahip olmadığı gösterilmiştir (Gudmunsson ve ark., 1993). Paglia ve ark. (1989) tarafından yapılan çalışmada ise, *E. coli*'ye karşı CAZ+AMK kombinasyonunun PAE açısından bir avantaj sağlamadığı belirtilmiştir. Bu çalışmalara paralel olarak *E. coli*'de CEF+GEN kombinasyonunun PAE süresinin, CEF ve GEN bileşiklerinin bireysel PAE'sine göre önemli bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir ($p < 0.995$ ve $p < 0.324$).

Florokinolonlar, nükleik asit sentezini inhibe ederek bakterisit etki gösteren bileşiklerdir ve genellikle aminoglikozidler gibi PAE süreleri uzundur. Örneğin, Gram negatif bakterilere 4xMİK'te CIP 1 saat uygulandığında PAE süresi yaklaşık 2 s olarak belirlenir (Sharma ve ark., 2002). Benzer şekilde 1xMİK ve 4xMİK'te 1 saat DAN'a maruz bırakılan MDR *E. coli* izolatlarının ortalama PAE sürelerinin sırasıyla 1,9 ve 2,9 s olduğu tespit edilmiştir.

Antimikrobisidlerin hepsi Gram pozitif koklara karşı PAE'ye sahip olmasına rağmen, β -laktam gibi zamana bağlı bakterisit etki gösteren bileşikler, Gram negatif bakterilere karşı PAE'ye sahip değildir (karbapenem hariç) (Gerçeker, 2003 ve Odenholt, 2001). Buna paralel olarak hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli*'de CRO ile CEF'in PAE süreleri sırasıyla -0,35 ve -0,45 s olarak tespit edilmiştir. Zamana bağlı bakterisit etki gösteren bileşiklerin aksine florokinolon, aminoglikozid ve polimiksin gibi konsantrasyona bağlı bakterisit etki gösteren bileşikler daha uzun PAE süreleri ile karakterizedir (Gerçeker, 2003). Gram negatif bakterilere karşı CST'nin PAE süresinin genellikle uzun olması, Gram negatif bakterilerin hücre duvarında geri dönüşümsüz ciddi hasara yol açmasından kaynaklı olabilir. Örneğin, MDR *A. baumannii*'ye karşı CST'nin PAE süresi 1xMİK için 3,9 s; 4xMİK için ise 4,5 saattir (Plachouras ve ark., 2006). Benzer şekilde *E. coli*'de duyarlı (*E. coli* E175) ve MDR izolatlarına karşı CST'nin ortalama PAE süresi 1xMİK için 2,2 s; 4xMİK için ise 6,9 s olarak belirlenmiştir. Son yıllarda CST'nin diğer antimikrobiyal bileşiklerle birlikte kombinasyon terapisinden kullanımı yaygınlaşmıştır (Bedenic ve ark., 2016). Ancak 1xMİK ve 20xMİK'te 1 saat bireysel olarak CST ve AMK ile CST+AMK kombinasyonuna maruz bırakılan *P. aeruginosa*'da bileşiklerin bireysel PAE süreleri uzun olmasına rağmen; kombinasyon PAE sresinde, bireysel PAE'lerine göre anlamlı bir artış belirlenmemiştir (Güzel ve Gerçeker, 2012). Ayrıca CST+MEM kombinasyonunun, direnç mekanizması tanımlanan *Acinetobacter* izolatları üzerindeki etkinliğinin değerlendirildiği bir araştırmada, kombinasyonun PAE'sinde, bileşiklerin bireysel PAE'lerine göre anlamlı bir artış gözlenmemiş ve farklı direnç mekanizmalarına sahip izolatlarda negatif PAE değerleri belirlenmiş olmasına rağmen, direnç mekanizmaları ile PAE süresi arasında net bir ilişki kurulamamıştır (Bedenic ve ark., 2016). Benzer şekilde duyarlı (*E. coli* E175) ve MDR *E. coli*'ye karşı CRO+CST kombinasyonunun etkinliği incelenmiş ve duyarlı izolatların PAE süresinin dirençli olanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmesine rağmen direnç mekanizmaları ve PAE arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. CRO+CST kombinasyonun

ortalama PAE süresi 1,1 s; CRO ve CST'nin bireysel PAE süreleri ise sırasıyla -0,4 ve 2,2 s olarak tespit edilmiştir. Buna göre CRO+CST kombinasyonunda PAE süresi bakımından CST aleyhine bir durum söz konusu olmasına rağmen, CRO lehine bir artış gözlenmektedir. Bu kapsamda kombinasyon terapisinde zamana ve konsantrasyona bağlı bakterisit etki gösteren 2 bileşik yerine, konsantrasyona bağlı etki gösteren 2 bileşiğin kullanılması, başka bir ifadeyle uzun PAE sürelerine sahip 2 bileşiğin kombine edilmesiyle PAE sürelerinde artış sağlanabilir (Güzel ve Gerçeker, 2012). Hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli*'de CEF+DAN, CEF+GEN, CRO+CST ve DAN+CST kombinasyonları arasındaki ilişki bu saptamayı desteklemektedir. CEF+DAN ve CRO+CST gibi zamana bağlı etki gösteren β -laktam grubu bileşiklerle, konsantrasyona bağlı etki gösteren florokinolon ve aminoglikozid grubu bileşikler kombine edildiğinde PAE süresinin, β -laktam grubu bileşiklerin bireysel PAE sürelerinden uzun olmasına rağmen, florokinolon ve aminoglikozid grubu bileşiklerin bireysel PAE sürelerinden kısa olduğu belirlenmiştir. DAN+CST kombinasyonunun PAE süresinin ise, her iki bileşiğin bireysel PAE süresinden uzun olduğu tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (DAN+CST ve DAN: $p < 0.834$; DAN+CST ve CST: $p < 0.875$).

Genellikle *in vivo* PAE sürelerinin, *in vitro* PAE sonuçlarına göre daha uzun olduğu gözlenmiş ve bu durumun ise antimikrobiyal bileşik ve kombinasyonların inhibitör konsantrasyonları veya bu konsantrasyonların üzerindeki dozlarıyla başlayan tedavinin *in vivo* koşullarda antimikrobiyal bileşiğin metabolize edilmesine bağlı olarak sub-inhibitör ilaç miktarıyla devam etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Lövdin ve ark, 1993). Bu kapsamda PAE'nin yanı sıra PA-SME sürelerinin dikkate alınması klinik açıdan önemlidir. Böylece *in vitro* PAE ve PA-SME testlerinden elde edilen veriler, antimikrobiyal terapinin klinik etkinliği hakkında daha doğru bir bilgi sunabilir (Odenholt, 2001; Sharma ve ark., 2002). Buna paralel olarak PAE altındaki mikroorganizmalara sub-inhibitör konsantrasyonlarda yeniden ilaç uygulandığında, PAE sürelerinin önemli derecede uzadığı gösterilmiştir (Licata

ve ark., 1997; Odenholt ve ark, 1992; Odenholt, 2001 ve Odenholt ve ark., 2003). Örneğin, 0,5xMİK AMP ile indüklenen *E. coli*'ye 0,1; 0,2 ve 0,3xMİK sub-inhibitör konsantrasyonlarda AMP uygulandığında, PAE sürelerinde sırasıyla 0,4; 1,5 ve 3 s artış gözlenir (Odenholt, 2001). Buna paralel olarak, hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli*'de CEF'in ortalama PAE süresi -0,2 s olmasına rağmen, PAE altındaki *E. coli* izolatlarına, CEF'in 0,1; 0,2 ve 0,3xMİK sub-inhibitör konsantrasyonları uygulandığında, ortalama PAE sürelerinin sırasıyla 15,5; 12,6 ve 12,6 s olmak üzere belirgin derecede uzadığı tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların %33'ünde ise bakterisidal etkinlik (PA-SME > 24 s) gözlenmiştir. PA-SME mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, β -laktam grubu bileşiklerin etki mekanizması üzerinden tanımlanmaya çalışılmıştır (Licata ve ark., 1997). Buna göre β -laktamlar supra-inhibitör konsantrasyonlarda uygulandığında PBP'lere bağlanarak etki gösterir ve PBP'lerin inhibisyonuna neden olur. Supra-inhibitör konsantrasyondaki tedavi durdurulup, tedaviye sub-inhibitör konsantrasyonlarda devam edilmesi durumunda PBP'lerin çoğu hala inaktive haldedir ve yeni PBP'lerin üretilmesinin engellenmesi için düşük ilaç konsantrasyonları yeterlidir (Licata ve ark., 1997). Diğer yandan DNA giraz'a bağlanarak veya RNA sentezini inhibe ederek etki gösteren florokinolon ve aminoglikozidler için de benzer durum geçerlidir. Supra-inhibitör konsantrasyonlarda uygulanan ilaç, bakteride hasara neden olacağı için; düşük konsantrasyonlarda ilaç uygulaması, hasar gören hücrelerin büyümesinin engellenmesi ve etkin bir tedavi için yeterli olur (Licata ve ark., 1997 ve Odenholt, 2001). Florokinolon ve aminoglikozidlerle yapılan çalışmalarda da sonuçların benzer olduğu gösterilmiştir. Örneğin, *E. coli*'de CIP için PAE süresi yaklaşık 2,5 s, PA-SME süreleri ise 0,1; 0,2 ve 0,3xMİK için sırasıyla yaklaşık 3,1; 6,2 ve 20,2 s; diğer yandan AMK PAE süresi ise 5,1 s, PA-SME süreleri ise 0,1; 0,2 ve 0,3xMİK için sırasıyla yaklaşık 5,5; 22,3 ve > 22,3 saattir (Odenholt ve ark., 1992 ve Odenholt, 2001). Bu verilere benzer şekilde hayvanlardan izole edilen MDR *E. coli*'de CEF+GEN, CRO+CST ve DAN+CST kombinasyonlarının PAE sürelerinin uzadığı belirlenmiştir. Buna göre CEF+GEN kombinasyonunun ortalama PAE süresi -0,1 s olmasına rağmen, PAE altındaki *E. coli* izolatlarına, CEF+GEN'in

0,2 ve 0,3xMİK sub-inhibitör konsantrasyonları uygulandığında, ortalama PAE sürelerinde sırasıyla 10,5 ve 13,9 s uzadığı tespit edilmiştir. CRO+CST kombinasyonunun ortalama PAE süresi 1,1 s olmasına rağmen, PAE altındaki *E. coli* izolatlarına, CRO+CST'nin 0,1; 0,2 ve 0,3xMİK sub-inhibitör konsantrasyonları uygulandığında, ortalama PAE sürelerinin sırasıyla 15,7; 14,1 ve 18,8 s olmak üzere belirgin derecede uzadığı belirlenmiştir. DAN+CST kombinasyonunun ortalama PAE süresi ise 2,9 s olmasına rağmen, PAE altındaki *E. coli* izolatlarına, DAN+CST'nin 0,1; 0,2 ve 0,3xMİK sub-inhibitör konsantrasyonları uygulandığında, ortalama PAE sürelerinin 15,5 s uzadığı tespit edilmiştir. Sub-inhibitör konsantrasyonlara maruz bırakıldığında PAE sürelerine göre daha fazla artış olan DAN+CST kombinasyonunun PAE açısından CEF+DAN, CEF+GEN ve CRO+CST kombinasyonlarına göre çok daha etkin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca DAN+CST kombinasyonunun 0,1; 0,2 ve 0,3xMİK sub-inhibitör konsantrasyonlarda uygulandığında izolatların %84'ünde yeniden üreme gözlenmediği ve PA-SME sürelerinin > 24 s olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, PAE süresi uzun olan bileşiklerin, daha uzun PA-SME süresine sahip olması ile açıklanabilir (Odenholt, 2001). PAE ve PA-SME sonuçlarına göre, dirençli *E. coli* enfeksiyonlarının tedavisinde CEF'in supra-inhibitör konsantrasyonlarıyla başlanan antimikrobiyal terapiye düşük konsantrasyonlar ve daha uzun doz aralıklarıyla devam edilebileceği ve etkin bir tedavi sağlanabileceği belirlenmiştir. Ayrıca CRO+CST ve DAN+CST kombinasyonlarının PAE ve PA-SME süreleri, bileşiklerin bireysel PAE ve PA-SME sürelerine göre önemli düzeyde uzun olması ile kombinasyon terapisinin etkinliği gösterilmiştir. Ancak *in vitro* PAE sonuçlarının, *in vivo* hayvan deneyleri ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gereklidir (Sharma ve ark., 2002).

Bu tezin araştırma sonuçlarına göre Bursa ve çevresinden toplanan hayvansal kaynaklı *E. coli* izolatları %64 oranda florokinolon direncine, %88 oranda ise MDR fenotipine sahiptir. Florokinolon direncinden *gyrA* ve *parC* mutasyonları ile *oqxB* geni; MDR fenotipinden ise *marA*, *acrB*, *soxS* ve *ompF* geni ekspresyonlarındaki değişiklikler sorumludur. Direnç mekanizmaları,

antimikrobiyal bileşiklerin MİK, MBK ile MÖK düzeylerinde artışa neden olur. Antimikrobiyal bileşikler arasındaki etkileşimin değerlendirildiği checkerboard testi ve zamana bağlı doz-yanıt deneyleri arasındaki uyum düşük düzeydedir (%16). CEF+DAN, CEF+GEN, CRO+CST ve DAN+CST kombinasyonları dirençli *E. coli*'ye karşı yüksek düzeyde sinerjistik etkilidir. Bunlar arasında en yüksek bakterisidal sinerjistik etkili kombinasyon DAN+CST kombinasyonudur ve en az %66 düzeyde bakterisidal-sinerjistik etkiye sahiptir. CEF+DAN ve CEF+GEN kombinasyonları ise bileşiklerin bireysel inhibitör konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlarda uygulandığında bile, dirençli *E. coli*'ye karşı bakterisit etki gösterir. Ayrıca CEF+DAN kombinasyonu ile bakteristatik etkili olan CEF, bakterisit etki gösterir. Buna ilave olarak CEF+DAN ve CEF+GEN kombinasyonlarının mutant oluşumunu ve direnç gelişimini önleme potansiyelleri yüksektir. Diğer yandan PAE ve PA-SME süreleri dikkate alınarak yapılacak doz revizyonu sayesinde bireysel olarak CEF ve CRO+CST ile DAN+CST kombinasyonları, düşük doz ve doz aralıklarında MDR *E. coli* kökenli enfeksiyonların tedavisindeki başarı olasılığını artırır. Bununla birlikte antimikrobiyal bileşikler arasındaki sinerjizma ve antimikrobiyal bileşikler ile kombinasyonların PAE ve PA-SME'leri direnç mekanizmalarından bağımsızdır. Sinerji testleri ve *in vitro* FD deneylerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen etkin antimikrobiyal kombinasyonlar ile gereksiz yere yüksek dozlarda ve sık aralıklarla antimikrobiyal kullanımı azaltılarak antimikrobiyal direnç gelişimi önlenebilir, mevcut bileşiklerin etkinliği yeniden sağlanabilir, toksisite riski ve tedavi masrafları azaltılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abo-EL-Sooud K, Swielim GA, Khalifa EF, EL-Gammal SM (2012) Effect of different sites of intramuscular injection on elimination, bioavailability and tissue residues profile of gentamicin in broiler chickens. *Insight Poultry Research* 2 (1): 1-7.
- Aeschlimann JR, Dresser LD, Kaatz GW et al (1999) Effects of NorA inhibitors on in vitro antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2 (43): 335-340.
- Ahmad I, Huang L, Hao H et al (2016) Application of PK/PD modeling in veterinary field: dose optimization and drug resistance prediction. *BioMed Research International Article ID 5465678*, 12 pages.
- Al-Hasan MN, John W, Wilson JW et al (2009) β -lactam and fluoroquinolone combination antibiotic therapy for bacteremia caused by Gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (4): 1386-1394.
- Allen HK, Donato J, Wang HH et al (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 8: 251-259.
- Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF et al (2013) *Escherichia coli* in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10: 6235-6254.
- Aono R, Tsukagoshi N, Yamamoto M (1998) Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 180: 938-944.
- Athamna A, Athamna M, Medlej B et al (2004) In vitro post-antibiotic effect of fluoroquinolones, macrolides, β -lactams, tetracyclines, vancomycin, clindamycin, linezolid, chloramphenicol, quinupristin/dalfopristin and rifampicin on *Bacillus anthracis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53: 609-615.
- Athamna A, Athamna M, Nura A et al (2005) Is in vitro antibiotic combination more effective than single-drug therapy against anthrax? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4 (49): 1323-1325.
- Aydın Öz S (2004) RAPD (rastgele arttırılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği. *Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 6: 11-130.
- Bahar AA, Ren D (2013) Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* 6: 1543-1575.
- Balaje RM, Sidhu PK, Kaur G et al (2013) Mutant prevention concentration and PK-PD relationships of enrofloxacin for *Pasteurella multocida* in buffalo calves. *Research in Veterinary Science* 95: 1114-1124.
- Bambeke FV, Pages JM, Lee VJ (2006) Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 1: 157-175.

Baquero F, Martinez JI, Canton R (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 260-265.

Baquero F, Negri MC (1997) Strategies to minimize the development of antibiotic resistance. *Journal of Chemotherapy* 9: 29-37.

Bedenić B, Beader N, Godič-Torkar K et al (2016) Postantibiotic effect of colistin alone and combined with vancomycin or meropenem against *Acinetobacter* spp. with well defined resistance mechanisms. *Journal of Chemotherapy* 5 (28): 3715.

Bennett JH, Dolin R, Blaser MJ (2014) Principles and practice of infectious disease. 8th edition, 1600 John F. Kennedy Blvd. Philadelphia PA.

Bennett PM (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* 153: 347-357.

Bergan T (1984) Pharmacokinetics of beta-lactam antibiotics. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 42: 83-98.

Bergeron MG (1989) The pharmacokinetics and tissue penetration of the fluoroquinolones. *Clinical and Investigative Medicine* 12 (1): 20-27.

Blondeau J (2009) New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Veterinary Dermatology* 20: 383-396.

Blondeau JM, Borsos S, Blondeau LD (2012) In vitro killing of *Escherichia coli*, *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat. *Veterinary Microbiology* 155: 284-290.

Blondeau JM, Zhao X, Hansen G et al (2001) Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2 (45): 433-438.

Bollenbach T (2015) Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. *Current Opinion in Microbiology* 27: 1-9.

Bonapace CR, Friedrich LV, Bosso JA et al (2000) Determination of antibiotic effect in an in vitro pharmacodynamic model: comparison with an established animal model of infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11): 3574-3579.

Boyd LB, Maynard MJ, Morgan-Linnell SK (2009) Relationships among ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, and norfloxacin MICs for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (1): 229-234.

Breines DM, Ouabdesselam S, Ng EY et al (1997) Quinolone resistance locus *nfxd* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (1): 175-179.

Breitinger HG (2012) Drug synergy – Mechanisms and methods of analysis, toxicity and drug testing, Prof. Bill Acree (Ed.), ISBN: 978-953-51-0004-1

Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C et al (2011) In vitro effect of *qnrA1*, *qnrB1*, and *qnrS1* genes on fluoroquinolone activity against isogenic

Escherichia coli isolates with mutations in gyrA and parC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (3): 1266-1269.

Brooks BD, Brooks AE (2014) Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews* 78: 14–27.

Burgess DS (1999) Pharmacodynamic principles of antimicrobial therapy in the prevention of resistance. *Chest* 115 (3): 19S-23S.

Buxbaum A, Georgopoulos A (1996) Postantibiotic effect of ceftriaxone and gentamicin alone and in combination on *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus viridans*. *Infection* 24 (6): 459-464.

Cakirlar FK, Ciftci IH, Gonullu N (2015) OXA-type carbapenemases and susceptibility of colistin and tigecycline among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from patients with bacteremia in Turkey. *Clinical Laboratory* 61 (7): 741-747.

Cappelletty DM (1996) Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (3): 677-683.

Cassir N, Rolain JM, Brouqui P (2014) A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Frontiers in Microbiology* 20 (5): 551.

Cengiz M, Sahinturk P (2013) Assessment of synergistic interactions of danofloxacin and orbifloxacin against quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from animals by the checkerboard and time-kill methods. *The Journal of Antibiotics* 66 (10): 629-631.

Cengiz M, Sahinturk P, Sonal S et al (2013a) In vitro bactericidal activity of enrofloxacin against gyrA mutant and qnr-containing *Escherichia coli* isolates from animals. *Veterinary Record* 172: 474-479.

Chalmers G, Cormier AC, Nadeau M et al (2017) Determinants of virulence and of resistance to ceftiofur, gentamicin, and spectinomycin in clinical *Escherichia coli* from broiler chickens in Québec, Canada *Veterinary Microbiology* 203: 149-157.

Chattaway MA, Aaron O, Aboderin AO et al (2016) Fluoroquinolone-resistant enteric bacteria in sub-saharan africa: clones, implications and research needs. *Frontiers in Microbiology* 7, Article 558.

Chiu CH, Su LH, Huang YC et al (2007) Increasing ceftriaxone resistance and multiple alterations of penicillin-binding proteins among penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (9): 3404-3406.

Chollet R, Bollet C, Chevalier J et al (2002) Mar operon involved in multidrug resistance of *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 1093-1097.

Cikman A, Gulhan B, Aydin M et al (2015) In vitro activity of colistin in combination with tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients with ventilator-associated pneumonia. *International Journal of Medical Sciences* 12 (9): 695-700.

CLSI (2012) Clinical Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Ninth Edition. Approved standard M7-A9.

Cosgrove SE, Carmeli Y (2003) The Impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Antimicrobial Resistance* 36 (11): 1433-1437.

Costa SS, Viveiros M, Amaral L et al (2013) Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *The Open Microbiology Journal* 7 (1): 59-71.

Craig AW (1998) Pharmacokinetic/Pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 26 (1): 1-10.

Credito K, Kosowska-Shick K., McGhee P et al (2010) Comparative study of the mutant prevention concentrations of moxifloxacin, levofloxacin, and gemifloxacin against *Pneumococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (2): 673-677.

D'Souza BB, Padmaraj SR, Rekha PD et al (2014) In vitro synergistic activity of colistin and ceftazidime or ciprofloxacin against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance* 20 (6): 550-554.

Dalhoff A, Schmitz FJ (2003) In vitro antibacterial activity and pharmacodynamics of new quinolones. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22: 203-221.

Daoud Z, Sokhn ES, Azar E et al (2014) Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin against urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Infection in Developing Countries* 8 (2):154-159.

Dawis MA, Isenberg HD, France KA et al (2003) In vitro activity of gatifloxacin alone and in combination with cefepime, meropenem, piperacillin and gentamicin against multidrug-resistant organisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 1203-1211.

Dosler S, Karaaslan E, Gerceker AA (2015) Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *Journal of Chemotherapy* 28 (2): 95-103.

Doyle ME (2015) Multidrug-Resistant Pathogens in the Food Supply. *Foodborne Pathogens and Disease* 12 (4): 261-279.

Doyle MP, Loneragan GH, Scott HM et al (2013) Antimicrobial resistance: Challenges and perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12 (2): 234-248.

Drago L, Nicola L, Rodighiero V et al (2011) Comparative evaluation of synergy of combinations of B-lactams with fluoroquinolones or a macrolide in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66: 845-849.

Drawz SM, Bonomo RA (2010) Three decades of B-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews* 23 (1): 160-201.

Drlica K, Hiasa H, Kerns R et al (2009) Quinolones: action and resistance updated current. *Topics in Medicinal Chemistry* 9 (11): 981-998.

Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B et al (2012) Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein and Peptide Science* 13: 699-722.

Dzidic S, Suskovic J, Kos B (2008) Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology* 46 (1): 11-21.

EMA (2012) European Medicines Agency. Guideline for the demonstration of efficacy for veterinary medicinal products containing antimicrobial substances.

EMA/ CVMP/ 261180/ 2012.

Ergonul O, Aydin M, Azap A et al (2016) Healthcare-associated gram-negative bloodstream infections: antibiotic resistance and predictors of mortality. *Journal of Hospital Infection* 94: 381-385.

Everett MJ, Jin YF, Ricci V et al (1996) Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 2380-2386.

Fabrega A, Madurga S, Giraltve E et al (2009) Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology* 2 (1): 40-61.

Falagas ME, Kasiakou SK (2005) Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Disease* 40 (9): 1333-1341.

Ferrari RG, Galiana A, Cremades R et al (2013) Expression of the *marA*, *soxS*, *acrB* and *ramA* genes related to the AcrAB/TolC efflux pump in *Salmonella enterica* strains with and without quinolone resistance-determining regions *gyrA* gene mutations. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 17 (2): 125-130.

Fincancı M (2000) Konsantrasyona bağımlı aktivite gösteren antibiyotikler. *Ankem Dergi* 14 (3): 241-243.

Fletcher S (2015) Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. *Environ Health Prevention Medicine* 20: 243-252.

Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176 (2): 269-275.

Ganiere JP, Denuault L (2009) Synergistic interactions between cefalexin and kanamycin in Mueller–Hinton broth medium and in milk. *Journal of Applied Microbiology* 107: 117-125.

Gariyban L, Avashia N (2013) Research techniques made simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): e6.

Gasc C, Peyretaillade E, Peyret P (2016) Sequence capture by hybridization to explore modern and ancient genomic diversity in model and nonmodel organisms. *Nucleic Acids Research* 44 (10): 4504-4518.

Gebru E, Damte D, Choi MJ (2012) Mutant prevention concentration and phenotypic and molecular basis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates and in vitro-selected mutants of *Escherichia coli* from dogs. *Veterinary Microbiology* 154: 384-394.

Gerçeker AA (2003) Bir farmakodinamik parametre olarak postantibiyotik etkinin klinik kullanımdaki yeri. *Ankem Dergi* 17 (1): 75-81.

Giuriatti J, Stefani LM, Brisola MC (2017) *Salmonella Heidelberg*: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to extended spectrum β -lactamases (ESBLs). *Microbial Pathogenesis* 109: 195-199.

Goto K, Kawamura K, Arakawa Y (2015) Contribution of QnrA, a plasmid-mediated quinolone resistance peptide, to survival of *Escherichia coli* exposed to a lethal ciprofloxacin concentration. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 68: 196-202.

Gradelski E, Kolek B, Bonner DP et al (2001) Activity of gatifloxacin and ciprofloxacin in combination with other antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17: 103-107.

Gudmundsson S, Einarsson S, Erlendsdottir H (1993) The post-antibiotic effect of antimicrobial combinations in a neutropenic murine thigh infection model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31: 177-191.

Gunderson BW, Ibrahim KH, Hovde LB et al (2003) Synergistic activity of colistin and ceftazidime against multiantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 473 (3): 905-909.

Guzel CB, Gerceker AA (2008). In vitro activities of various antibiotics, alone and in combination with colistin methanesulfonate, against *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Chemotherapy* 54: 147-151.

Guzel CB, Gerceker AA (2012) Post-antibiotic effect of colistin, alone and in combination with amikacin, on *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *The Journal of Antibiotics* 65: 83-86.

Günel T (2007) Gen anlatımının kantitatif analizi “Real-Time PCR”. *Turkiye Klinikleri The Journal of Medicine Science* 27: 763-767.

Hansen GT, Blondeau JM (2005) Comparison of the minimum inhibitory, mutant prevention and minimum bactericidal concentrations of ciprofloxacin, levofloxacin and garenoxacin against enteric Gram-negative urinary tract infection pathogens. *Journal of Chemotherapy* 17 (5): 484-492.

Hansen LH, LB Jensen, Sørensenark HI et al (2007) Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60: 145-147.

Hasdemir UO (2014) Antimikrobiyal direncin belirlenmesinde moleküler yöntemler. *ANKEM Dergi* 28 (2): 229-234.

Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P et al (2004) Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (6): 2701-2706.

Hooper DC (1999) Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates* 2: 38-55.

Hooper DC (2001) Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases* 7 (2): 337-341.

Hooper DC, Jacoby GA (2015) Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of The New York Academy Of Sciences* 1354 (1): 12-31.

Hopkins K, Davies R, Therefall J (2005) Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25: 358-373.

Hu YS, Shin S, Park YH et al (2017) Prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from swine feces in Korea. *Journal of Food Protection*, 80 (7): 1145-1151.

Ingerson-Mahar M, Reid A (2011) *E. coli*: good, bad and deadly. A report from the American Academy of Microbiology.

Jacobs MR (2001) Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clinical Microbiology Infection* 7: 589-596.

Jasovsky D, Littmann J, Zorzet A et al (2016) Antimicrobial resistance-a threat to the world's sustainable development. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 121 (3): 159-164.

Jenkins SG, Schuetz AN (2012) Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. *Symposium on Antimicrobial Therapy MayoClinProc* 87 (3): 290-308.

Johanning A, Kristiansson E, Jerker Fick J et al (2015) Resistance mutations in *gyrA* and *parC* are common in *Escherichia* communities of both fluoroquinolone-polluted and uncontaminated aquatic environments. *Frontiers in Microbiology* 6: 1355.

Karcı A, Balcıoğlu IA (2009) Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of the Total Environment* 407 (16): 4652-4664.

Karczmarczyk M, Martins M, Quinn T et al (2011) Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (20): 7113-7120.

Kaya S, Piriñçi İ, Ünsal A ve ark. (2013) *Veteriner Farmakoloji 5.Baskı*, Medisan Yayınevi, Ankara, s: 740.

Koh JJ, Lin H, Caroline V et al (2015) Nrlipidated peptide dimers: effective antibacterial agents against Gram-negative pathogens through lipopolysaccharide permeabilization. *The Journal of Medicinal Chemistry* 58 (16): 6533-6548.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks *Nature Review Microbiology* 8 (6): 423-435.

Kong KF, Schnepfer L, Mathee K (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. 118 (1): 1-36.

Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA (2013) Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology* 40 (1): 76-94.

Lee WX, Basri DF, Ghazali AR (2017) Bactericidal effect of pterostilbene alone and in combination with gentamicin against human pathogenic bacteria. *Molecules* 22: 463.

Leekha S, Terrell C, Edson RS (2011) General principles of antimicrobial therapy. *Symposium on Antimicrobial Therapy* 86 (2): 156-167.

Leite GC, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV et al (2016) Antimicrobial combinations against pan-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with different resistance mechanisms. *PLoS One* 11 (3): e0151270.

Levison ME, Levison JH (2009) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infectious Disease Clinics of North America* 23 (4): 791.

Levy SB (2001) Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clinical Infectious Diseases* 33 (3): 124-129.

Li RC, Tang MC (2004) Post-antibiotic effect induced by an antibiotic combination: influence of mode, sequence and interval of exposure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 904-908.

- Li XZ, Nikaido H (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69 (12): 1555-1623.
- Li Y, Zhang Y, Ding H et al (2016) In vitro susceptibility of four antimicrobials against *Riemerella anatipestifer* isolates: a comparison of minimum inhibitory concentrations and mutant prevention concentrations for ceftiofur, cefquinome, florfenicol, and tilmicosin. *BMC Veterinary Research* 12: 250.
- Licata L, Smith CE, Goldschmidt RM et al (1997) Comparison of the postantibiotic and postantibiotic sub-MIC effects of levofloxacin and ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (5): 950-955.
- Lin J, Michel LO, Zhang Q (2002) CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni* *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 46 (7): 2124-2131.
- Liu Q, Li W, Feng Y et al (2014) Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. *Plos One* 9 (6): e98091.
- Lobanovska M, Pilla G (2017) Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future. *Yale Journal of Biology and Medicine* 90: 135-145.
- Lomovskaya O, Watkins W (2001) Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 3 (2): 225-236.
- Lorian V (2005) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins.
- Löwdin E, Odenholt-Tornqvist I, Bengtsson S et al (1993) A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy* 37 (10): 2200-2205.
- Lu L, Dai L, Wang Y et al (2010) Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China. *Acta Tropica* 113: 20-25.
- Maaland MG, Mo SS, Schwarz S et al (2015) In vitro assessment of chloramphenicol and florfenicol as second-line antimicrobial agents in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 38: 443-450.
- MacGowan AP, Rynn C, Wootton M et al (1999) In vitro assessment of colistin's antipseudomonal antimicrobial interactions with other antibiotics *Clinical Microbiology Infection* 5: 32-36.
- Machuca J, Briales A, Diaz-de-Alba P et al (2015) Effect of the efflux pump QepA2 combined with chromosomally mediated mechanisms on quinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy* 70 (9): 2524-2527.
- Machuca J, Briales A, Labrador G et al (2014) Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy* 69: 3203-3215.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international

expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18 (3): 268-281.

Malanovic N, Lohner K (2016) Antimicrobial peptides targeting gram-positive bacteria pharmaceuticals 9: 5.

Marcusson LL, Olofsson SK, Komp Lindgren P et al (2005) Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin for urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 38-43.

Marques C, Gama LT, Belas A et al (2016) European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. *BMC Veterinary Research* 12 (1): 213.

Marshall BM, Levy SB (2011) Food animals and antimicrobials: Impacts of human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (4): 718.

Martinez JL, Baquero F (2000) Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (7): 1771-1777.

Matar GM (2017) Emerging enterobacteriaceae infections: antibiotic resistance and novel treatment options. DOI 10.3389/978-2-88945-189-0.

Maurin M, Raoult D (2001) Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (11): 2977-2986.

Mayer I, Nagy E (1999) Investigation of the synergic effects of aminoglycoside-fluoroquinolone and third-generation cephalosporin combinations against clinical isolates of *Pseudomonas* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43: 651-657.

Meegan J, Collard WT, Grover GS et al (2013) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44 (3): 714-720.

Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M (2014) The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in Public Health* 145: 2.

Munita JM, Arias CA (2016) Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum* 4 (2).

Nielsen EI, Friberg LE (2013) Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacologic Reviews* 65: 1053-1090.

Nikaido H, Zgurskaya HI (2001) AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3 (2): 215-218.

Ocampo PS, Lazar V, Papp B et al (2014) Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (8): 4573-4582.

Odenholt I (2001) Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17: 1-8.

Odenholt-Törnqvist I, Löwdin E, Cars O (1992) Postantibiotic sub-mic effects of vancomycin, roxithromycin, sparflaxacin, and amikacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 (9): 1852-1858.

Odenholt-Törnqvist I, Löwdin E, Cars O (2003) Postantibiotic, postantibiotic sub-MIC, and subinhibitory effects of PGE-9509924, ciprofloxacin, and levofloxacin. *Agents and Chemotherapy* 47 (10): 3352-3356.

Paglia P, Molinari G, Pesce A, et al (1989) Dactimicin, a new aminoglycoside: in vitro activity, post-antibiotic effect and interaction with other antibiotics.

The European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 8 (7): 639-43.

Pankey GA, Ashcraft DS (2005) In vitro synergy of ciprofloxacin and gatifloxacin against ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 2959-2964.

Pasquali F, Manfreda G (2007) Mutant prevention concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Veterinary Microbiology* 119: 304-310.

Paul S, Maudsdotter L, Lipcsey M et al (2014) Beneficial antimicrobial effect of the addition of an aminoglycoside to a B-lactam antibiotic in an *E. coli* porcine intensive care severe sepsis model. *Plos One* 9 (2): e90441.

Perichon B, Courvalin P, Galimand M (2007) Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (7): 2464-2469.

Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH et al (2006) In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 573-576.

Piddock LJV (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (2): 382-402.

Piddock LJV (2014) Understanding the basis of antibiotic resistance: a platform for drug discovery. *Microbiology* 160: 2366-2373.

Plachouras D, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kentepozidis N et al (2006). In vitro postantibiotic effect of colistin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57: 419-422.

Pomposiello PJ, Bennik MH, Demple B (2001) Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *Journal of Bacteriology* 183: 3890-3902.

Prescott JF, Giguère S, Dowling PM (2013). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th edition, Blackwell Publishing.

Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109 (7): 309.

Principe L, D'Arezzo S, Capone A et al (2009) In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 18: 8.

Rayaman E, Soyogul-Gürer Ü, Rayaman P (2012) İmipenem ve meropenemin vankomisinle olan kombinasyonlarının postantibiyotik etkileri. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* cilt 2 (1): 15-21.

Rice LB (2009) The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Current Opinion in Microbiology* 12: 476-481.

Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC (2006) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases* 10 (6): 629-640.

Röderova M, Halova D, Papousek I et al (2017) Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. *Frontiers in Microbiology* 7: 2147.

Ruiz E, Saenz Y, Zarazaga M et al (2012) *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67: 886-897.

Sabat AJ, Budimir A, Nashev D et al (2013) Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveillance* 18 (4): 20380.

Sader HS, Pignatari ACC (1994) E Test: A novel technique for antimicrobial susceptibility testing. *Sao Paulo Medical Journal* 112 (4).

Safarika A, Galani I, Pistiki A (2015) Time–kill effect of levofloxacin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: synergism with imipenem and colistin. *European Journal of Clinical Microbiology* 34 (2): 317-323.

Salter AJ (1982) Trimethoprim-sulfamethoxazole: an assessment of more than 12 years of use. *Reviews of Infectious Diseases* 4 (2).

Saravolatz LD, Leggett J (2003) Gatifloxacin, gemifloxacin, and moxifloxacin: the role of 3 newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Disease*. 37 (9):1210-1215.

Sato T, Yokota S, Ichihashi R et al (2014) Isolation of *Escherichia coli* strains with *acrAB–tolC* efflux pump-associated intermediate interpretation or resistance to fluoroquinolone, chloramphenicol and aminopenicillin from dogs admitted to a university veterinary hospital. *Journal of Veterinary Medicine Science* 76 (7): 937-945.

Shaikh S, Fatima J, Shaki S et al (2015) Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Science* 2 (1): 90-101.

Sharma B, Parul, Verma AK et al (2017) Occurrence of multidrug resistant *Escherichia coli* in groundwater of Brij region (Uttar Pradesh) and its public health implications. *Veterinary World* 10 (3): 293-301.

Sharma KK, Sangraula H, Mediratta PK (2002). Some new concepts in antibacterial drug therapy. *Indian Journal of Pharmacology* 34: 390-396.

Shimizu T, Harada K, Kataoka Y (2013) Mutant prevention concentration of orbifloxacin: comparison between *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55: 37.

Souto SM, Coura Fm, Dorneles EMS et al (2017) Antimicrobial susceptibility and phylotyping profile of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates from calves and pigs in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 49:13-23.

Sun J, Deng Z, Yan A (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453: 254-267.

Sun W, Sanderson P, Zheng W (2016) Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discovery Today*. 21 (7): 1189-1195.

Suzuki S, Horinouchi T, Furusawa C (2014) Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nature Communications* 5: 5792.

Szmolka A, Nagy B (2013) Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Frontiers in Microbiology* 4: 258.

Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis L (2012) Combination therapy for treatment of infections with Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 25 (3): 450-470.

Tangden T (2014) Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Upsala Journal of Medical Sciences* 119: 149-153.

Tello A, Austin B, Telfer TC (2012) Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environmental Health Perspectives* 120 (8): 1100-1106.

Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine* 119 (6A): 3-10.

Tenover FC, Hughes JM (1996) The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *The Journal of the American Medical Association* 275: 300-304.

Timurkaynak F, Can F, Azap ÖK et al (2006) In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27: 224-228.

Varley AJ, Sule J, Absalom AR (2009) Principles of antibiotic therapy. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care and Pain* 9 (6): 184-188.

Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T et al (2015) RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Frontier Microbiology* 6: 377.

Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y (2014) Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs* 74 (12): 1315-1333.

Wareham DW, Bean DC (2006) In-vitro activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 10: 5.

White RL, Burgess DS, Manduru M et al (1996) Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy* 40 (8): 1914-1918.

Wetzstein HG (2005) Comparative mutant prevention concentrations of pradofloxacin and other veterinary fluoroquinolones indicate differing potentials in preventing selection of resistance. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy* 49 (10): 4166-4173.

WHO (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance, World Health Organization.

WHO (2016) Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance World.

Xu L, Wang H, Yang X et al (2013) Integrated pharmacokinetics/pharmacodynamics parameters-based dosing guidelines of enrofloxacin in grass carp *Ctenopharyngodon idella* to minimize selection of drug resistance. *BMC Veterinary Research* 9: 26-30.

- Yamane K, Wachino J, Suzuki S et al (2008) Plasmid-Mediated qepA gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (4): 1564-1566.
- Zgurskaya HI, Nikaido H, (2000) Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology* 37 (2): 219-225.
- Zhanel GG, Mayer M, Laing N et al (2006) Mutant prevention concentrations of levofloxacin alone and in combination with azithromycin, ceftazidime, colistin (polymyxin e), meropenem, piperacillin-tazobactam, and tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (6): 2228-2230.
- Zhanel GG, Vashisht V, Tam E (2009) Mutant prevention concentrations of doripenem and meropenem alone and in combination with colistin (polymyxin E), levofloxacin and tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 20 (A).
- Zhang B, Gu X, Li Y et al (2014) In vivo evaluation of mutant selection window of cefquinome against *Escherichia coli* in piglet tissue-cage model. *BMC Veterinary Research* 10: 297.
- Zhang P, Shena Z, Zhang C et al (2017) Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from chicken and swine, China, 2008-2015. *Veterinary Microbiology* 203: 49-55.
- Zhao S, Maurer JJ, Hubert S et al (2005) Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Veterinary Microbiology* 107: 215-224.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

A

<i>A. baumannii</i>	: <i>Acinetobacter baumannii</i>
AAC(6')-Ib-cr	: Aminoglikozid asetiltransferaz
ABC	: Adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset (ATP Binding Cassette)
ADD	: Additif
AIEC	: Adherent invazif <i>E. coli</i>
AMK	: Amikasin
AMP	: Ampisilin
AMP	: Antimikrobiyal peptidler
ANT	: Antagonizma
APEC	: Avian patojenik <i>E. coli</i>
Asp	: Aspartik asit

B

<i>B. anthracis</i>	: <i>Bacillus anthracis</i>
<i>B. burgdorferi</i>	: <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>B. fragilis</i>	: <i>Bacteroides fragilis</i>
<i>B. polymyxa</i>	: <i>Bacillus polymyxa</i>
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	: <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
BLAST	: The Basic Local Alignment Search Tool
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Bp	: Baz çifti (Base pair)

C

<i>C. jejuni</i>	: <i>Campylobacter jejuni</i>
CAZ	: Seftazidim
cDNA	: Komplementer DNA
CEF	: Seftiofur
cfu	: Colony forming unit
CHL	: Kloramfenikol

CHX	: Klorheksidin
CIP	: Siprofloksasin
CLSI	: The Clinical and Laboratory Standards Institute
COST	: Eurorean cooperation in science and technology
CRO	: Seftriakson
CST	: Kolistin
CTX	: Sefotaksim
CXM	: Sefuroksim
°C	: Santigrat

D

DAEC	: Diffuz adherent <i>E. coli</i>
DAN	: Danofloksasin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DTT	: Dithiothreitol

E

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. aerogenes</i>	: <i>Enterobacter aerogenes</i>
EAEC	: Enteroagregatif <i>E. coli</i>
EHEC	: Enterohemarajik <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvazif <i>E. coli</i>
ENR	: Enrofloksasin
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ERY	: Eritromisin
ESBL	: Geniş spektrumlu β -laktamaz
ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>

F

F Primer	: Forward primer
FEP	: Sefepim
FİK	: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon
FİK _i	: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi
FK/FD	: Farmakokinetik/farmakodinamik

FOF : Fosfomisin

G

g : Yer çekimi kuvveti (Gravity force)

GAT : Gatifloksasin

GEN : Gentamisin

H

H. influenza : *Haemophilus influenza*

H. pylori : *Helicobacter pylori*

I

Ile : İzolöysin

IPM : İmipenem

i.m. : Kas içi (intramüsküler)

i.v. : Damar içi (intravenöz)

K

K : Kontrol

K. pneumonia : *Klebsiella pneumoniae*

KAN : Kanamisin

KBB : Kan beyin bariyeri

L

L. lactis : *Lactococcus lactis*

L. monocytogenes : *Listeria monocytogenes*

L/kg : Litre/kilogram

Leu : Löykin

LEX : Sefaleksin

Log : Logaritma

LPS : Lipopolisakkaritlerin

LVX : Levofloksasin

M

M. Purpurea : *Micromonospora purpurea*

MATE : Çoklu antibiyotik ve toksin Ekstrüzyon (Multiple Antibiotic Toxin Extrusion)

MBK	: Minimum bakterisidal konsantrasyon
MDR	: Çoklu ilaç direnci (Multidrug Resistance)
MEM	: Meropenem
MeOH	: Metanol
mEq	: Miliekivalan (Miliee equivalent)
MF	: Mutant frekansı
MFP	: Membran füzyon proteini
MFS	: Major fasilitatör süper familyası
mg/kg	: miligram/kilogram
µg	: mikrogram
µm	: mikrometre
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MLS (B)	: Makrolid, linkozamid ve streptogramin B
MÖK	: Mutant önleyici konsantrasyon
mRNA	: Mesajcı RNA
MSP	: Mutant seçim penceresi
<u>N</u>	
<i>N. gonorrhoea</i>	: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitides</i>	: <i>Neisseria meningitides</i>
NAL	: Nalidiksik asit
NFW	: Nükleaz içermeyen su (Nuclease Free Water)
ng/ml	: nanogram/mililitre
Nm	: Nanometre
NMEC	: Neonatal menenjit <i>E. coli</i>
NOR	: Norfloksasin
<u>O</u>	
OD	: Optik dansite (Optical Dencity)
OLA	: Olaquindoks
OMP	: Dış membran proteini (Outer Membrane Protein)
ORB	: Orbifloksasin

OTC	: Oksitetrasiklin
<u>P</u>	
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. haemolytica</i>	: <i>Pasteurella haemolytica</i>
<i>P. mirabilis</i>	: <i>Proteus mirabilis</i>
<i>P. multocida</i>	: <i>Pasteurella multocida</i>
PA-SME	: Post antibiyotik sub-MİK etki
PABA	: P-aminobenzoik asit
PAE	: Post antibiyotik etki
PBP	: Penisilin bağlayıcı protein
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCA	: Plate Count Agar
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PDR Resistance)	: Tüm antimikrobilyallere karşı direnç (Pan-Drug Resistance)
PEN	: Penisilin
Phe	: Fenilalanin
PMQR	: Plazmid aracılı florokinolon direnci (Plasmid Mediated Quinolone Resistance)
Psp	: Faj şok protein
<u>Q</u>	
Qep	: Kinolon geri çıkartım pompası (quinolone efflux pump)
Qnr	: Kinolon direnci (Quinolone resistance)
QRDR	: Kinolon direncini belirleyici bölge (Quinolone Resistance Determining Region)
qRT-PCR PCR)	: Kantitatif Real Time PCR (quantitative Real Time PCR)
<u>R</u>	
R	: Dirençli
R Primer	: Reverse primer
R-plazmidleri	: Direnç-plazmidleri

rRNA	: Ribozomal RNA
RAPD	: Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polimorphic DNA)
RIF	: Rifampisin
RNA	: Ribonükleik asit
RND	: Direnç-nodülasyon bölümü (Resistance Nodulation Division)
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RT	: Revers transkripsiyon (Reverse Transcription)
<u>S</u>	
S	: Duyarlı
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enterica</i>	: <i>Salmonella enterica</i>
<i>S. maltophilia</i>	: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>S. pneumoniae</i>	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. suis</i>	: <i>Streptococcus suis</i>
<i>S. zooepidemicus</i>	: <i>Streptococcus zooepidemicus</i>
s.c.	: Deri altı (Subcutan)
Ser	: Serin
SİN	: Sinerjizma
SMR	: Küçük çoklu ilaç direnci (Small Multidrug Resistance)
SMX	: Sülfametoksazol
Sn	: Saniye
SOS	: oksidatif stress
SPX	: Sparflokssasin
STEC	: Shiga toksini üreten <i>E. coli</i>
<u>T</u>	
T	: Test
T	: Zaman
TE	: Tris-EDTA
TET	: Tetrasiklin
TGC	: Tigesiklin

TMP	: Trimetoprim
TOB	: Tobramisin
Trp	: Triptofan
TSA	: Triptik Soy Agar
TVA	: Travofloksasin
<u>U</u>	
U	: Ünite
UPEC	: Üropatojenik <i>E. coli</i>
UV	: Ultraviyole
<u>V</u>	
V	: Volt
<i>V. parahaemolyticus</i>	: <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
VAN	: Vankomisin
<u>X</u>	
XDR	: Yaygın ilaç direnci (Extensively-Drug Resistance)
<u>W</u>	
WASP	: Otomatik spiral yayıcı sistem (Whitley's Automatic Spiral Plater)

8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Murat CENGİZ başta olmak üzere, hayata dair güçlü duruşuyla bana örnek olan ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Songül SONAL'a ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ'a teşekkür ederim. Yoğun laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Dkt. Öğr. Gülçe HEPBOSTANCI'ya, iş deneyimleri ile bana büyük kolaylıklar sağlayan Dr. Erdem Arslan'a ve doktora eğitimime dönüp baktığımda gülümsememi sağlayacak anılar biriktirdiğim çok sevdiğim değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

2211 Yurt İçi Doktora Programı Bursiyeri olduğum ve 1100478 ile 2140316 projelerini finanse ederek bu araştırmanın gerçekleştirilmesini sağlayan, eğitim hayatıma yaptığı katkılarından dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na ayrıca teşekkür ederim.

Herkesten önce eğitimimi sağlayarak beni bugünlere getiren, bana her zaman maddi ve manevi destek olan, zorluklar karşısında moral vererek yılmadan devam etmemi sağlayan, koşulsuz sevgisi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve benim için dünyadaki en değerli ve saygı değer insanlar olan sevgili annem Gülten ŞAHİNTÜRK, babam NEDRET ŞAHİNTÜRK ve ablam Özgür KOCH'a sonsuz minnetimi ve teşekkürlerimi sunarım.

9. ÖZGEÇMİŞ

Eskişehir’de 1987 yılında dünyaya gelen Pınar ŞAHİNTÜRK, ilköğretimi Dumlupınar İlkokulu, ortaöğretimini İki Eylül Ortaokulu ve lise öğrenimini MAT-KFB Gelişim Koleji’nde tamamlamıştır. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2011 yılında üçüncü olarak mezun olarak Veteriner Hekim ünvanını almıştır. 2011 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamış ve TÜBİTAK 2211-Yurt İçi Doktora Bursiyeri olmaya hak kazanmıştır. 2013-2018 yılları arasında Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmıştır.

