



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



**PLAZMİD ARACILI KİNOLON DİRENCİ
(*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve ENROFLOKSASİN
İLE ELİMİNASYONU**

Erdem ARSLAN

DOKTORA TEZİ

BURSA-2017





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



**PLAZMİD ARACILI KİNOLON DİRENCİ
(*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve ENROFLOKSASİN
İLE ELİMİNASYONU**

Erdem ARSLAN

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç.Dr. Murat CENGİZ

TUBİTAK (COST) 1100478

BURSA-2017

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum





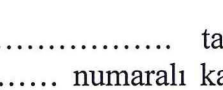
“Plazmid Aracılı Kinolon Direnci (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve Enrofloksasin ile Eliminasyonu” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.



Erdem ARSLAN
15.02.2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Erdem ARSLAN tarafından hazırlanan “Plazmid Aracılı Kinolon Direnci (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve Enrofloksasin ile Eliminasyonu” konulu Doktora tezi 26/01/2017 günü, 10:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Murat CENGİZ	
Üye	Prof. Dr. Songül SONAL	
Üye	Prof. Dr. Aysin ŞEN	
Üye	Prof. Dr. Muammer ELMAS	
Üye	Prof. Dr. Tülay BAKIREL	

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

Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü



ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ÇALIŞMASININ YAZIM KURALLARINA UYGUNLUĞU FORMU

Adı Soyadı / No	Erdem Arslan / 610946001
Anabilim Dalı / Bilim Dalı	Farmakoloji Ve Toksikoloji /
Programı (35.madde veya ÖYP ise belirtilecek)	<input type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Lisans Sonrası Doktora <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/> 35.madde <input type="checkbox"/> ÖYP

Tezin Başlığı/Adı	Türkçe	Plazmid Aracılı Kinolon Direnci (QnrS1 Ve Aac (6')-Ib-Cr) Ve Enrofloxasin İle Eliminasyonu
	İngilizce	Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (QnrS1 And Aac (6')-Ib-Cr) And Its Elimination With Enrofloxacin
Tezin Konusu	Plazmid Aracılı Kinolon Direnci	

Kriter	Tez Kısımları ve Yazım Kuralları	Uygun	Uygun Değil
Format	• Belirli tür ve boyuttaki harflerde uyum	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Tablo ve şekil yazıları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Metin başlıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• İçindekiler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Kaynakça	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Ekler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Numaralama	• Tablo ve şekil numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Metin bölümleri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Ekler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doğruluk	• Yöntem	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Veriler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• İstatistik	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Dipnotlar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Kaynakça	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Şekiller	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dil	• İfadelerin doğru kullanılıp kullanılmadığı	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• İfadelerin çok sık kullanılıp kullanılmadığı	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fiil Zamanları	• Cümlelerdeki zamanların kontrolü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
İmla Kuralları	• Tüm noktalama işaretlerinin kontrolü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Plan	• Metnin bütünlüğü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Bölümlerin dağılımı ve dengesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kısaltmalar	• Gerçekten gerekli mi?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• İlk okunduğunda açıkça anlaşılıyor mu?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tablo ve Şekiller	• Tablo ve şekil üzerindeki yazıların metinle tutarlılıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tez çalışmamın, Tez Yazım Yönergesindeki kurallara uygun olarak yazıldığını taahhüt ederim.

Danışman
(Unvan, Ad Soyad, Tarih, İmza)
Doç.Dr. Murat Cengiz

26.01.2017

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY	III
İÇİNDEKİLER	IV
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. <i>Escherichia coli</i>	8
2.2. Antimikrobikaller	11
2.3. Florokinolonlar	11
2.3.1. Florokinolonların Moleküler Yapılarındaki Spesifik Değişiklikler	14
2.3.2. Birinci Kuşak Florokinolonlar	17
2.3.3. İkinci Kuşak Florokinolonlar	17
2.3.4. Üçüncü Kuşak Florokinolonlar	17
2.3.5. Dördüncü Kuşak Florokinolonlar	18
2.4. Florokinolonların Etki Mekanizmaları	18
2.5. Veteriner Hekimliğinde Sık Kullanılan Florokinolonlar	20
2.5.1. Danofloksasin	20
2.5.2. Orbifloksasin	22
2.5.3. Pradofloksasin	23
2.5.4. Marbofloksasin	25
2.5.5. Enrofloksasin	26
2.6. Antimikrobiyal Direnç ve Çevre	27
2.7. Antimikrobiyal Direnç	27
2.7.1. Antimikrobiyal Direncin Kökeni	28
2.7.2. Klinik Direnç	30
2.7.3. Mikrobiyolojik Direnç	30
2.7.4. Doğal Direnç	31
2.7.5. Kazanılmış Direnç	31
2.7.5.1. Kromozomal Direnç	31
2.7.5.2. Ekstrakromozomal Direnç (Aktarılabılır Direnç)	32
2.7.5.3. Ekstrakromozomal Hareketli Genetik Materyaller	32
2.7.5.4. Plazmidler	32
2.7.5.5. Transpozonlar	33
2.7.5.6. İntegronlar ve Gen Kasetleri	33
2.8. Hareketli Direnç Etmenlerinin Bakteriler Arasında Transferi	34
2.8.1. Konjugasyon	36
2.8.2. Transformasyon	37
2.8.3. Transdüksiyon	37
2.9. Çapraz Direnç	37
2.10. Çoklu İlaç Direnci	38
2.11. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları	38

2.11.1. Antimikrobiyallerin Hedefine Ulaşmanın Engellenmesi	39
2.11.1.1 Hücre Zarının Geçirgenliğinin Azalması	39
2.11.1.2. Antimikrobiyalın Geri Çıkartılması	39
2.11.2 Hedef Yapının Korunması	40
2.11.2.1 Mutasyon	40
2.11.2.2. Hedef Molekülün Koruyucu Yapılar ile Değiştirilmesi	40
2.11.3. Antimikrobiyallerin Yapılarının Değiştirilmesi	41
2.11.3.1. Enzimatik İnaktivasyon	41
2.11.3.2. Enzimatik Modifikasyon	41
2.12. Florokinolon Direnci	41
2.12.1. MDR Kaynaklı Florokinolon Direnci	42
2.12.2. Kromozomal Florokinolon Direnci	42
2.12.3. Plazmid Aracılı Kinolon Direnci	43
2.13. Florokinolonlara Spesifik Geri Çıkartım Pompaları	43
2.13.1. <i>qepA</i> (1 ve 2)	43
2.13.2. <i>oqx</i> (A ve B)	43
2.14 Hedef Yapıların Qnr Proteinleri Tarafından Değiştirilmeleri	44
2.14.1. <i>qnr</i> genleri	44
2.15. Florokinolonların enzimatik modifikasyonu	45
2.15.1. <i>aac</i> (6')-Ib-cr Geni	45
2.16. Çevre	45
2.17. Antimikrobiyal Direnci Önleme Stratejileri	47
2.18. Antimikrobiyal Direncin İzlenmesi	50
2.18.1. Fenotipik Yöntemler	50
2.18.1.1. Disk Difüzyon (EUCAST v 5.0, 2015)	50
2.18.1.2. Gradient Difüzyon	51
2.18.1.3. Agar dilüsyon (EUCAST E.Def. 3.1, 2000)	51
2.18.1.4. Broth dilüsyon (EUCAST E.Dis 5.1, 2003)	51
2.18.1.5. Mutant Önleyici Konsantrasyon (MÖK) Testi	52
2.18.1.6. Mutant Frekansı	52
2.18.1.7. Mutant Seçim Penceresi	52
2.18.2. Moleküler Yöntemler	53
2.18.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)	53
2.18.2.2. Dizi Analizi	53
2.18.2.3. Klonlama ve Transformasyon	54
2.19. Farmakokinetik/Farmakodinamik (FK/FD) Araştırmalar	57
2.19.1. MİK Bazlı PK/PD Araştırmalar	58
2.19.2. MÖK Bazlı FK/FD Araştırmalar	60
2.19.3. <i>İn vivo</i> Modeller	61
2.19.4. <i>İn vitro</i> Modeller	62
2.19.4.1. Dinamik <i>İn vitro</i> Modeller	62
2.19.4.2. Statik <i>İn vitro</i> Modeller	62
3. GEREÇ VE YÖNTEM	64
3.1. Araştırmalarda Kullanılan İzolat ve Suşlar	64
3.2. Tez Projesinde Kullanılan Gereçler	65
3.3. Duyarlılık Testi	66
3.4. DNA İzolasyonu	67
3.5. PCR-Amplifikasyonu ve Görüntüleme	70

3.5.1. <i>qnrS</i> Geninin PCR-Amplifikasyonu	70
3.5.2. <i>aac</i> (6')-Ib Geninin PCR-Amplifikasyonu	70
3.6. Jel Elektroforez ve Görüntüleme	71
3.6.1. Agaroz Jel Hazırlama (%1)	71
3.6.2. Görüntüleme	71
3.7. Klonlama ve Transformasyon	71
3.7.1. <i>aac</i> (6')-Ib-cr Geninin Klonlanması	72
3.7.2. <i>qnrS1</i> Geninin Klonlanması	73
3.7.3. Amplikon ve Vektörün <i>Hind</i> III Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	74
3.7.4. Ligasyon	74
3.7.5. Transformasyon	75
3.8. Mutant Önleyici Konsantrasyon (MÖK)	77
3.9. Mutant Frekansı	77
3.10. Mutant Seçim Aralığı	77
3.11. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri	78
4. BULGULAR	79
4.1. Enrofloksasin Duyarlılığının Belirlenmesi	79
4.2. PCR-Amplifikasyonu ve Görüntüleme	80
4.3. Klonlama ve Transformasyon	82
4.3.1. Duyarlılık	82
4.3.2. MÖK	82
4.3.3. Mutant Frekansı	82
4.4. Mutant Önleyici Konsantrasyonun Belirlenmesi	83
4.5. Mutant Frekansının Belirlenmesi	85
4.6. Mutant Seçim Penceresi (MSP)	90
4.7. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri	91
4.7.1. Kontrol Suşları	91
4.7.1.1. <i>E. coli</i> ATCC 25922	91
4.7.1.2. <i>E. coli</i> AG 100	92
4.7.2. Klon Suşlar	93
4.7.2.1. MtX	93
4.7.2.2. MtS	94
4.7.2.3. MtSX	95
4.7.3. <i>E. coli</i> İzolatları	96
4.7.3.1. <i>E. coli</i> E248	96
4.7.3.2. <i>E. coli</i> E101	97
4.7.3.3. <i>E. coli</i> E103	98
4.7.3.4. <i>E. coli</i> E 247	99
4.7.3.5. <i>E. coli</i> E 308	100
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	103
6. KAYNAKLAR	122
7. SİMGELER ve KISALTMALAR	147
8. EKLER	152
9. TEŞEKKÜR	154
10. ÖZGEÇMİŞ	155
11. TEZ KONTROL BEYAN FORMU	156

TÜRKÇE ÖZET

PLAZMİD ARACILI KİNOLON DİRENCİNİN (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve ENROFLOKSASİN İLE ELİMİNASYONU

Bu çalışma, florokinolon direncini tanımlamak, florokinolon direnç etmenlerinin enrofloksasinin mutant oluşumunu önleme potansiyeli ve bakteriyel inhibisyon özellikleri üzerindeki etkilerini belirlemek ve enrofloksasinin hayvansal kaynaklı *E. coli* izolatları üzerindeki etkinliğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Tez projesinde TÜBİTAK (COST) 1100478 numaralı proje kapsamında Bursa ili ve çevresinden toplanan 311 adet hayvansal kaynaklı *E. coli* izolatı ve 2 kontrol suşu (*E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG100) ve moleküler olarak oluşturulmuş 3 klon suş kullanıldı. Enrofloksasinin duyarlılığı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Plazmidal genlerin tespiti ve klonlama işlemleri moleküler teknikler ile gerçekleştirildi. kromozomal mutasyonların ve plazmidal genlerinin direnç üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla izolatlar arasından en geniş genetik skalaya sahip 5 izolat, 2 kontrol suşu ve 3 klon suş için Mutant önleyici konsantrasyon (MÖK), Mutant frekansı (MF) ve mutant seçim penceresi (MSP) değerleri belirlendi. Statik *in vitro* farmakodinamik model kullanılarak zamana bağlı doz-yanıt deneyleri yapıldı.

Doksan dokuz *E. coli* izolatı duyarlı, 50 orta derecede duyarlı, 162 tanesi ise dirençli olarak sınıflandırıldı. On *qnrS1* ve 32 adet *aac (6')-Ib-cr* geni tespit edildi. Gen prevalansları sırasıyla % 3,3 ve % 10,3 olarak belirlendi. İki genin birlikte bulunma oranı ise % 0,62 olarak hesaplandı. MÖK, MF ve MSP çalışmaları sonunda QRDR mutasyonları ve *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin enrofloksasinin MÖK, MF ve MSA değerlerini arttırarak bakterileri enrofloksasinin antimikrobiyal etkilerinden koruduğu belirlendi. Ayrıca zamana bağlı doz-yanıt deneyleri ile enrofloksasinin karakteristik konsantrasyona bağlı bakterisidal etkisi klon suşlar, PMQR genlerine ve/veya QRDR mutasyonlarına sahip *E. coli* izolatlarında zamana-bağlı veya ko-etkiye dönüştüğü saptandı.

Anahtar kelimeler: *E. coli*, *qnrS*, *aac (6')-Ib-cr*, enrofloksasin, Mutant Önleyici Konsantrasyon, statik *in vitro* farmakodinami

SUMMARY

PLAZMID-MEDIATED QUINOLONE RESISTANCE (*qnrS1* and *aac (6')-Ib-cr*) AND ITS ELIMINATION WITH ENROFLOXACIN

Aims of this study were to identify fluoroquinolone resistance, characterization of QRDR mutations and PMQR genes and their influence on enrofloxacin resistance as well as assessment and characterization of enrofloxacin activity against fluoroquinolone resistant *E. coli* isolated from animals.

Three hundred and eleven *E. coli* strains from the sample collection of COST Project 1100478, 2 control strains (*E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* AG100) and 3 molecularly constructed clones were used in this study. Broth microdilution tests were performed for determination of enrofloxacin susceptibility. Molecular methods were used for detection and cloning of PMQR genes. Mutant prevention concentration (MPC), mutant frequency (MF) and mutant selection window (MSW) values were determined for 5 *E. coli* isolates 3 clone and 2 control strains. Static *in vitro* pharmacodynamic model was used for assessment and characterization of enrofloxacin pharmacodynamics.

Ninety nine *E. coli* isolates were classified as susceptible, 50 as intermediate and 162 as resistant. Sequencing results verified 10 *S1* and 32 *cr* variants. Prevalence of PMQR genes were 3,3 % and 10,3 % respectively. Prevalence of coexistence was 0,62 %. MPC, MF, MSW experiments indicated that QRDR mutations and PMQR genes enhance MPC, MF, MSW values and provide protection against enrofloxacin activity thus aiding survival and provoking emergence of enrofloxacin resistant sub-populations in *E. coli*. Static *in vitro* pharmacodynamic modelling revealed characteristic dose-dependent bactericidal effect of enrofloxacin is altered and displayed as time-dependent or co-effect in the presence of QRDR mutations and/or PMQR genes in *E. coli*.

Keywords: *E. coli*, *qnrS*, *aac (6')-Ib-cr*, enrofloxacin, Mutant Prevention Concentration, static *in vitro* pharmacodynamics

1. GİRİŞ

Escherichia coli (*E. coli*), *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan, farklı ekosistemlere geçebilen ve uygun olmayan çevre koşullarında aktivitesine sürdürebilen dayanıklı Gram negatif bir bakteridir (Aleskun ve Levy, 1999). İnsan ve hayvanlarda primer olarak gastrointestinal ve üriner sistem enfeksiyonlarına, sekonder olarak da septisemi ve pnömonilere neden olur (Khan ve ark., 2005; Lee ve ark., 2005; Pallo-Zimmerman ve ark., 2010; Webber ve Piddock, 2001). Florokinolonlar insan ve hayvan klinik *E. coli* izolatlarına karşı çok iyi *in vitro* aktiviteye sahip olmaları nedeniyle veteriner ve beşeri hekimliğinde sıklıkla tercih edilen kemoterapötik ajanlardır (Yue ve ark., 2008). Ancak, *Enterobacteriaceae* familyasında bulunan bakteriler florokinolonlara karşı hızlı bir şekilde direnç geliştirebilir (Venglovsky ve ark., 2009). *E. coli*, önemli bir patojen olması, mutasyonel florokinolon direnç mekanizmalarının birçok bakteriye uyarlanabilmesi ve aktarılabilir direnç genlerini kolaylıkla eksprese edebilmesi nedeniyle deneysel çalışmalar için uygun bir model bakteridir (EMA, 2006; Yu ve ark., 2009).

Antimikrobiyal bileşiklerin yaygın kullanımı, özensiz seçimi ve çevresel kirlilik seçici bir etki oluşturarak bakterilerin genetik yapısında değişikliklere neden olur ve direnç gelişebilir (Venglovsky ve ark., 2009; Yu ve ark., 2009). Direncin diğer bakterilere aktarmasıyla da direncin neden olduğu risk artar. Son yıllarda hızla yaygınlaşan önemli risklerden biri kinolon direncidir. Kinolonların yaygın kullanılması sonucu son 20 yıl içerisinde kinolon dirençli bakteri sayısında dramatik bir artış gözlenmiştir (Nelson ve ark., 2007). Bu durum klinik açıdan önemli olan kinolonların tedavideki başarı olasılığını azaltır (Martinez ve ark., 1996). Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency: EMA) kinolon direncini önlemek amacıyla kinolon kullanımını diğer antimikrobiyal ajanlarla tedavi edilemeyen enfeksiyonlarla sınırlar (EMA, 2006). Amerika Birleşik Devletlerinde ise antimikrobiyal direnci önlemek

amacıyla florokinolonların besin değeri olan kanatlı hayvanlarda kullanılması yasaklanmıştır (Gouvea ve ark., 2015).

Kinolonlar, sentetik yapılı, geniş etki spektrumlu ve biyoyararlanımı yüksek kemoteropötik ajanlardır. Etki şekillerine, biyoyararlanımlarına ve etki spektrumlarına göre dört farklı kuşağa ayrılır. Birinci kuşakta bulunan nalidiksik asit, oksolinik asit ve sinoksasin Gram negatif bakteriler üzerine etkilidir. İkinci kuşakta siprofloksasin, enrofloksasin, marbofloksasin, danofloksasin, difloksasin ve enoksasin yer alır. İkinci kuşak kinolonlar Gram negatif bakterilere ve bazı Gram pozitif bakterilere etkilidir. Üçüncü kuşakta orbifloksasin, levofloksasin, sparfloksasin, grepafloksasin ve gatifloksasin gibi bileşikler bulunur. Üçüncü kuşak kinolonlar geniş Gram negatif, güçlendirilmiş Gram pozitif ve bazı atipik patojenlere karşı etkilidir. Dördüncü kuşak kinolonlar trovafloksasin, klinafloksasin, pradofloksasin ve moksifloksasindir. Bu kuşaktaki kinolonlar geniş Gram negatif, geniş Gram pozitif ve güçlendirilmiş atipik etkinin yanında anaerob bakterilere karşı da etkilidir. İkinci, üçüncü ve dördüncü kuşak kinolonlar yapılarında flor atomu taşıdıkları için florokinolon olarak adlandırılır (Hophins ve ark., 2005; Pallo-Zimmerman ve ark., 2010) ve florokinolonlar düşük MÖK/MİK (mutant önleyici konsantrasyon/minimum inhibitör konsantrasyon) oranları ile bilinen en potent antimikrobiyal ajanlardır (Jang ve ark., 2010).

Florokinolonlar porin kanallarından bakteri hücrelerine girerek, topoizomeraz II (DNA giraz) veya topoizomeraz IV enzimlerini inhibe eder ve DNA replikasyonunu engelleyerek bakterisidal etki gösterir. Etkileri doza bağımlı olarak artar. Birçok Gram negatif bakteri için birincil hedef DNA giraz, ikincil hedef ise topoizomeraz IV enzimidir. Gram pozitif bakteriler için florokinolonların birincil hedef bölgesi topoizomeraz IV enzimidir. Moksifloksasin, pradofloksasin ve travofloksasin gibi dördüncü kuşak florokinolonlar hem DNA giraz hem de topoizomeraz IV enzimlerini eş zamanlı olarak inhibe eder. Bu durum dördüncü kuşak florokinolonlara karşı bakteriyel direncin gelişme olasılığını azaltır (Mustaev ve ark., 2013; Pallo-Zimmerman ve ark., 2010).

Florokinolonlara karşı spesifik direnç, kromozomal veya plazmid aracılı (Plasmid-mediated Quinolone Resistance: PMQR) olmak üzere iki şekilde gelişir. Florokinolonlara karşı spesifik olmayan direnç ise çoklu ilaç direncini (Multiple Drug Resistance: MDR) kodlayan genlerin ekspresyon oranlarının değişimi veya bu genlerdeki mutasyon sonucu oluşur. Bu genetik değişimler florokinolonların bakteri hücrelerine alınmalarını engeller veya hücre içerisine girmiş olan florokinolonların geri çıkartılmasını sağlar. Bu direnç mekanizmalarının dışında çevre koşullarının tetiklediği ve bakterilerin hayatta kalmasını sağlayan SOS yanıtına bağlı olarak da florokinolon direnci gelişebilir (Hooper, 1999).

Kromozomal florokinolon direnci kinolon direncini belirleyici bölgede (Quinolone Resistance Determining Region: QRDR) meydana gelen mutasyonlara bağlıdır ve bu mutasyonlar sıklıkla DNA giraz enzimini kodlayan *gyrA* ve *gyrB* genleri ile topoizomeraz IV enzimini kodlayan *parC* ve *parE* genlerinde görülür. Genellikle 80. ve 102. kodonlar arasında oluşan mutasyonlar *gyrA* geni için sıklıkla 83. ve 87. kodonda, *parC* geni için ise 80. ve 84. kodonda gözlenir (Bast ve ark., 2000; Cattoir ve ark., 2010; Hopkins ve ark., 2005; Hooper, 1999; Jang ve ark., 2010; Martinez ve ark., 1998; Martinez ve ark., 2011). Topoizomeraz IV, DNA giraz kadar florokinolonlara karşı duyarlı olmadığından *parC* ve *parE* bölgesindeki mutasyonlar sıklıkla *gyrA* mutasyonları ile birlikte meydana gelir. Bu durum yüksek etkili florokinolon direncinin oluşması bakımından önemlidir. *parC* ve *parE* bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar tek başlarına bakterinin florokinolon duyarlılığını değiştirmez (Poole, 2005).

Aktarılabılır florokinolon direncinden *qnr* (A, B, C, D ve S), *aac (6')-Ib* (-*cr* varyantı), *qepA* (1 ve 2) ve *oqx* (A ve B) genleri sorumludur. *qnr* genleri ilk kez 1998 yılında Martinez ve arkadaşları tarafından *Klebsiella pneumonia*'da pMG252 plazmidini üzerinde tespit edilmiştir (Martinez ve ark., 1998; Strahilevitz ve ark., 2009; Yamane ve ark. 2008). Qnr proteinleri DNA giraz enzimine bağlanarak enzimin moleküler yapısında değişime neden olur. Bu değişimin sonucunda florokinolonların DNA giraz enziminine bağlanmaları engellenir ve böylece DNA giraz enzimi florokinolonların inhibisyonundan korunmuş olur (Veldman ve ark., 2011). Bugüne kadar *qnrA* geninin 7,

qnrB geninin 54, *qnrS* geninin 4, *qnrC* ve *qnrD* geninin ise birer varyantı tanımlanmıştır (Cattoir ve ark., 2008). *aac (6')-Ib-cr* geni ise aminoglikozid asetil transferaz enzimini kodlayan *aac (6')-Ib* geninin bilinen 30 varyantından biridir. Aminoglikozid asetil transferaz enzimi aminoglikozitleri asetilleyerek inaktive eder. *-cr* varyantı *aac (6')-Ib*'den farklı olarak Trp-102 → Arg ve Asp-179→Tyr kodonlarında farklı mutasyonlara sahiptir. *aac (6')-Ib-cr* tarafından kodlanan aminoglikozit asetil transferaz aminoglikozitlerin yanı sıra siprofloksasin ve norfloksasin gibi florokinolonları da asetilleyerek aktivitelerini azaltır (Cattoir ve ark., 2008; Cavaco ve ark., 2009; Park ve ark., 2010; Strahilevitz ve ark., 2009). *aac (6')-Ib-cr* ve *qnr* genleri aynı plazmid üzerinde bulunabilir (Herrera-Leon ve ark., 2011). Bu fenomen *E. coli* gibi ekosistemler arasında geçiş yapabilen bakterileri florokinolon direnci açısından önemli bir vektör haline getirir. Kinolon direncinin karakteristik özelliği QRDR ve PMQR faktörlerinin aynı bakteri üzerinde bulunabilmesi ve giderek artan güçlü bir karakter kazanabilmesidir (*akümülatif kinolon direnci*) (Stravilehitz ve ark., 2009).

Son yıllarda yapılan çalışmalar *qnrS* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin florokinolon direnci bakımından daha önemli olduğunu göstermektedir (Cavaco ve ark., 2009; Herrera-Leon ve ark., 2011; Ogbolu ve ark., 2004; Savaşan ve ark., 2005; Savaşan ve ark., 2008; Stravilehitz ve ark., 2009). Ancak bu genlerin bir arada bulunmalarına bağlı olarak oluşan florokinolon direnci ile ilgili veriler yetersizdir. *qnrS* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin bakteriler arasındaki aktarımı, bu aktarımın genotipik ve fenotipik yansımaları ile florokinolon direncinin yaygınlaşmasına sağladığı katkı bilinmemektedir.

EMA direncin yaygın etkisi nedeniyle, bilinen bir mekanizma ile herhangi bir antibiyotiğe dirençli olan bir bakterinin aynı grup veya benzer gruptaki ilaçlara karşı duyarlılığının test edilmesi gerektiğini belirtir (EMA, 1999). Bu nedenle, hızla yaygınlaşan florokinolon direncine karşı etkin bir çözüm bulunabilmesi için direncin fenotipik ve genotipik yöntemlerle incelenmesi gerekir. Ayrıca farmakodinamik araştırmalara dayalı *qnrS* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerini taşıyan patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için yeni stratejiler oluşturulmalıdır. Antimikrobiyal terapinin başarısı enfeksiyona neden olan patojenin hızlı ve dirençli alt-populasyon oluşturmasına

izin vermeden elimine edilmesine bağlıdır. Antimikrobiyal kemoterapide uygun antimikrobiyal, optimal süre ve doz seçimi yapılmış olsa bile mutant patojenler oluşabilmektedir. Bu durumu önleyerek başarılı bir kemoterapi uygulamak için antimikrobiyal ajan-patojen ilişkisi için tanımlanmış olan MİK, minimal bakterisitdal konsantrasyon (MBK), MÖK, mutant frekansı (MF) ve mutant seçim penceresi (MSP) parametrelerini kapsayan araştırmalardan elde edilen veriler incelenerek antimikrobiyal kemoterapide kullanılmalıdır (Blondeau, 2009; Mouton ve ark., 2005).

MİK ve MBK, ilaçların bakteriler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılan temel parametrelerdir. Bakteri gelişimini durduran en düşük ilaç konsantrasyonu MİK, bakterilerin % 99'unu öldüren ilaç konsantrasyonu ise MBK olarak tanımlanır. Ancak MİK ve MBK ile elde edilen sonuçlar ilacın bakteriyel aktivitesinin statik bir göstergesidir ve zaman ya da konsantrasyona bağlı olarak ilacın etkinliğinde meydana gelen değişiklikler izlenemez (Olofson ve ark., 2007). Ayrıca kronik bakteriyel enfeksiyonlarda mikroorganizma yoğunluğu 10^8 , akut enfeksiyonlarda ise 10^{12} cfu/ml düzeyindedir. Bu durumda MİK veya üzeri konsantrasyonda antimikrobiyal uygulansa bile dirençli mutantlar oluşabilir ve bakterilerin inhibisyonu güçleşebilir. Kemoterapötik ajanların yüksek yoğunluktaki bakteri popülasyonları üzerindeki etkinliğinin daha iyi anlaşılması için MÖK, MSP ve MF verilerinin değerlendirilmesi gereklidir. Bu nedenle, MİK ve MBK testine ilave olarak direnç mekanizmasına dayalı farmakodinami çalışmalarında MÖK, MSP ve MF verileri belirlenip kemoterapötik ajanların dirençli bakteriler üzerindeki etkisi değerlendirilebilir (Blondeau, 2009; Drilica ve Xilin, 2007).

MÖK, bir antimikrobiyal ajanın uygulandığı homojen bakteri popülasyonda (10^9 veya daha çok bakteri içeren) birinci jenerasyon mutantların oluşumuna izin vermeden eliminasyon gerçekleştiren veya birden fazla bakteri içeren popülasyonda (10^9 cfu/ml veya daha çok bakteri içeren) en yüksek fenotipik direnç özellikleri gösteren bakteri için minimal inhibitör konsantrasyonudur (Olofson ve ark., 2007). MF, antimikrobiyal ajanın bakteri popülasyonunda mutant oluşturma sıklığının zaman ve antimikrobiyalin konsantrasyonu arasındaki ilişki olarak tanımlanabilir. MSA, antimikrobiyal ajanın

bakteri popülasyonu için herhangi bir zamana ait MİK ve MÖK arasında kalan konsantrasyon aralığıdır (Blondeau., 2009). MSA konsantrasyonları mutant bakterilerin gelişmesi için risk oluşturur (Olofson ve ark., 2007). Bu risk MF'nın belirlenmesi ile ortaya konabilir. Etkin bir tedavi sağlamak ve direnci önlemek için tedavi süresince uygulanan ilaç konsantrasyonunun MÖK'un üzerinde olduğu sürenin artırılması ve ilacın MSA'da kalma süresinin azaltılması gerekir (Ferran ve ark., 2007).

Genotipik özellikleri bakımından farklı karaktere sahip *E. coli* izolatlarında MÖK, MF ve MSA çalışmaları fenotipik olarak aynı özellikte olsalar bile bu izolatların özellikle florokinolon inhibisyonu etkisindeyken sergiledikleri davranışların anlaşılması bakımından önemlidir (Blondeau., 2009; Ferran ve ark., 2007; Olofson ve ark., 2007). QRDR mutasyonlarının MİK değerini değiştirmeksizin MF'nı arttırabileceği ve *qnr* genlerinin florokinolonların bakterisit etki karakteristiğini değiştirebileceği gösterilmiştir (Briales ve ark., 2011; Cengiz ve ark., 2012). Ayrıca, zaman-konsantrasyon eğrisi altında kalan alan/MÖK oranının (EAA/MÖK) direnç gelişimi üzerindeki önemli olduğu bulunmuştur (Blondeau, 2009; Olofson ve ark., 2007). MÖK verilerinin diğer farmakodinamik parametreler ile entegrasyonu sonucu oluşturulan tedavi protokollerinin konvensiyonel protokollere göre dirençli alt-popülasyon oluşumunu önleme bakımından daha etkili olduğu bulunmuştur (Wang ve ark., 2003). MÖK/MİK oranları antibakteriyel ajanların potenslerine göre sınıflandırmak için de kullanılabilir. Ancak genetik altyapının özellikle de aktarılabilir florokinolon direnci genlerinin MÖK, MF ve MSA değerleri üzerindeki etkileri ile ilgili veriler yetersizdir (Blondeau, 2009). Ayrıca birden fazla florokinolon direnç etmeninin aynı bakteri hücresinde bulunması akümülatif karakteristik özellikleri gösteren florokinolon direncine sebep olur (Strahilevitz et al., 2009). Bu durum florokinolonların inhibisyon özelliklerini değiştirerek antimikrobiyal kemoterapinin başarısı için risk oluşturabilir (Briales ve ark., 2014; Cengiz et al 2012). Bu riski elimine etmek ve optimum antimikrobiyal etki oluşturmak için doz optimizasyonu yapılması gereklidir. Tez projesi kapsamında bu hipotezden yola çıkılarak *E. coli* bakterisinde PMQR genlerinin ve QRDR mutasyonlarının enrofloksasin inhibisyon karakteristiği üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, *E. coli*

izolatlarının duyarlılıkları broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. PMQR genlerinin tespiti ve klonlama işlemleri için moleküler yöntemler kullanıldı. Florokinolon direnç etmenlerinin enrofloksasinin mutant oluşumunu önleme potansiyeli ve bakteriyel inhibisyon özellikleri üzerindeki etkilerini detaylı olarak inceleyebilmek için MÖK, MF, MSP ve zaman-yanıt deneyleri uygulandı.

Bu proje kapsamında elde edilen veriler antimikrobiyal direncin önlenmesi için belirlenen önemli stratejiler olan “antimikrobiyal direncin izlenmesi”, antimikrobiyal direnç konusundaki kanıt niteliğindeki bilimsel verilerin bilimsel araştırmalar ile güçlendirilmesi ve geliştirilmesi” ve “beşeri ve veteriner alanda antimikrobiyal kullanımının optimize edilmesi” konularında katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan çomak formunda Gram negatif bir bakteridir (Hopkins ve ark., 2005). İlk olarak 1885’de Alman pediatrist ve bakteriyolog Theodore Escherich tarafından sağlıklı bir çocuğun dışkılarından izole edilmiş ve *Bacterium coli commune* (*Bacillus communis coli*) olarak adlandırılmıştır (Wasteson, 2001). Theodore Escherich’in ölümünün ardından bu bakteriye bulucusunun adı olan “*Escherichia*” ve kolon kaynaklı anlamına gelen “*coli*” adları verilmiştir (Ingerson-Mahar ve ark., 2011). *E. coli* sindirim sistemindeki yardımcı görevleri ve diğer bakteri populasyonları üzerindeki baskılayıcı özelliği ile memeli ve kanatlı hayvanların sindirim sistemi florasının doğal üyesidir (Ingerson-Mahar ve ark., 2011).

E. coli fizyolojik, genetik ve biyokimyasal açıdan araştırmalarda kullanılmasına rağmen doğadaki yaşam süreci detaylı olarak bilinmemektedir. Evrim süresince farklı *E. coli* alt gruplarının bifazik (konakçı bağımsız ve konakçı ilişkili) yaşam döngüsüne sahip oldukları düşünülmektedir (Allen ve ark., 2010). *E. coli*’nin konakçıdan bağımsız yaşam süresi sıcaklık, pH, su aktivitesi ve besin varlığı gibi çevresel etkenlere bağlı olarak değişmektedir. Genel bir gözlem olarak çevre koşulları populasyonu negatif yönde etkileyebilse de *E. coli*’nin akuatik ortamda bir ay, toprakta ise bir yıl kadar yaşamını sürdürebilmektedir (Van Elas ve ark., 2011; Wcislo, 2000). *E. coli* akuatik taşınım sayesinde yeraltı sularına, göçmen kuşlar sayesinde kutup bölgelerine ulaşabilir (Allen ve ark., 2010; Van Elas ve ark., 2011; Wcislo, 2000). Durgun su, toprak, gübre ve kontamine gıda maddeleri ile eklem bacaklı ve besin değeri olan hayvanlardan izole edilebilir (Bach ve ark., 2002). Bazı *E. coli* türleri flamentsel yapı oluşturarak organik yüzeylere sıkıca tutunabilir ve gıda hammaddelerinin internal yapılarında kolonize

olabilir. Bu sayede dezenfeksiyon ve yıkama işlemleri ile elimine edilemez, gıda işleme hatları boyunca taşınır ve bu hatları kontamine edebilir (Fukushima ve ark., 1999; Jiang ve ark., 2002; Solomon, 2002; Van Elas ve ark., 2011) Bu durum özellikle *E. coli* O157:H7 gibi gıda kaynaklı patojenler sayesinde risk oluşturur (Solomon, 2002; Itoh, 1998).

Çoğu *E. coli* türü patojen değildir. 1950'li yıllara kadar komensal bir bakteri olarak nitelenen *E. coli*'nin 2719 serotipi tanımlanmıştır (Ishii ve Sadowsky, 2008). Ancak sonraki yıllarda *E. coli*'nin insan ve hayvanlarda sindirim sistemi, deri ve üriner sistem enfeksiyonlarının yanı sıra mastitis, menenjit, peritonitis, sepsis ve pnömoni gibi ölümlü sonuçlanabilen olguların önemli bir etiyolojik etkeni olduğu ortaya konulmuştur (Wasteson, 2001). Patojenik *E. coli* suşları oluşturdukları enfeksiyon türleri ve semptomlarına veya salgıladıkları toksinlerin özelliklerine göre enterik ve ekstra intestinal *E. coli* olmak üzere iki ana grupta toplanır. Enterik *E. coli* grubunda sindirim sistemi patolojilerinden sorumlu *E. coli* suşları bulunmaktadır ve bunlar başlıca 7 prototip ile sınıflandırılmıştır. Bu prototipler enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterohemorojik *E. coli* (EHEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), diffuz adherent *E. coli* (DAEC), enteroinvazif *E. coli* (EIEC), adherent invazif *E. coli* (AIEC)'dir (Ingerson-Mahar ve ark., 2011). Ekstra intestinal *E. coli* grubunda ise sistemik enfeksiyonlara neden olan *E. coli* suşları bulunur ve başlıca 3 prototip olarak incelenmektedir. Bu prototipler üropatojenik *E. coli* (UPEC), neonatal menenjit *E. coli* (NMEC) ve avian patojenik *E. coli* (APEC)'dir (Allocati ve ark., 2013, Ingerson-Mahar ve ark., 2011). Patojen *E. coli* suşları tarafından oluşturulan enfeksiyonların belirtileri şiddetli ve kanlı diare, abdominal kramp, ateş, hemolitik üremik sendrom (HUS), böbrek yetmezliği ve ölümdür. Çok genç, geriatric veya immunosupresif hastalar dışında tanısı konabilen olgularda prognoz genellikle iyidir ve tedaviye yanıt alınabilir. *E. coli* O157:H7, EHEC grubunda yer alan patojen özellikleri ile öne çıkan hayvansal kökenli bir *E. coli* suşudur. Hayvanlar için patojen olarak nitelendirilmeyen *E. coli* O157:H7'nin yaygınlaşmasındaki en önemli faktör hayvansal gıdalardır. Avrupa'da 2011 yılında 9475 *E. coli* nedenli enfeksiyon vakası kayıt altına alınmıştır. Uzmanlar Amerika Birleşik

Devletlerinde *E. coli* O157:H7'nin yılda 76 milyon vaka, 325000 hospitalizasyon, 5000 ölüm ve 405 milyon dolar ekonomik kayba neden olduğu bilinmektedir (ECDC, 2014; CDC, 2015; Kiranmanyi 2010).

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. Jaques Monod 1965 yılında Nobel Ödülü aldığı törende yaptığı konuşmada “*E. coli* için doğru olan herşey bir fil için de doğrudur” diyerek bu organizmanın bilimsel önemini vurgulamıştır. *E. coli* ile yapılan araştırmalar bilim adamlarına 11 adet Nobel Ödülü kazandırmıştır. Araştırmalardaki önemi sayesinde *E. coli* tüm genomu dizilenen ilk organizmalardan biridir (Ingerson-Mahar ve ark., 2011). *E. coli*, gen ekspresyonundaki esnekliği sayesinde diğer organizmalardan elde edilen genlerin bu bakteriye aktarılmasını, önemli enzimlerin (insulin ve renin), fosil yakıtların ve biyolojik silahların üretimini kolaylaştırır (Ingerson-Mahar ve ark., 2011). *E. coli*, iyi bir gen rezervuarıdır ve gen transferinde önemli bir vektördür (Allen ve ark., 2010). Bu nedenle ev ve hayvan barınaklarından izole edilen *E. coli* suşlarında antimikrobiyal direnç etmenleri yaygın olarak tespit edilebilir. Kuş göçü, direnç etmenlerinin çok uzun mesafelere taşınmasını kolaylaştırır (Allen ve ark., 2010; Ochman ve ark., 2000).

E. coli intrinsik olarak penisilin G'ye karşı dirençlidir (Allocati ve ark., 2013). Özellikle Avrupa'da insan kaynaklı *E. coli* izolatlarında florokinolon, aminoglikozit, β -laktam ve karbapenem direnci yaygındır (ECDC, 2014). Direncin yaygınlığı Güney Avrupa ülkelerinde daha fazladır. Avrupa'da en yüksek florokinolon, aminoglikozit, sefalosporin ve çoklu antimikrobiyal dirençli *E. coli* oranına sahip ülkeler Türkiye ve Kıbrıs'dır (Allocati ve ark., 2013; Cengiz ve ark., 2012; ECDC, 2011). Çoklu antimikrobiyal dirençli *E. coli* suşlarının yaygınlaşması toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için risk oluşturur. Çünkü *E. coli* bu enfeksiyonların en sık karşılaşılan etmenidir. Hayvan ve gıda kaynaklı *E. coli* izolatlarında çoklu antimikrobiyal direnç yaygın olarak tespit edilmektedir. Veteriner hekimliğinde

antimikrobiyallerin yaygın kullanılmasına bağlı olarak dirençli *E. coli* suşları artmıştır (Allocati ve ark., 2013). Bu durum direkt kontak veya kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu insan ve hayvan sağlığı için risk oluşturur. Sonuç olarak *E. coli* birçok ekstraintestinal ekosisteme adapte olabilir ve antimikrobiyal direnç etmenlerini insan, hayvan ve gıdalar ile çevreye taşıyabilir (Ewers, 2012).

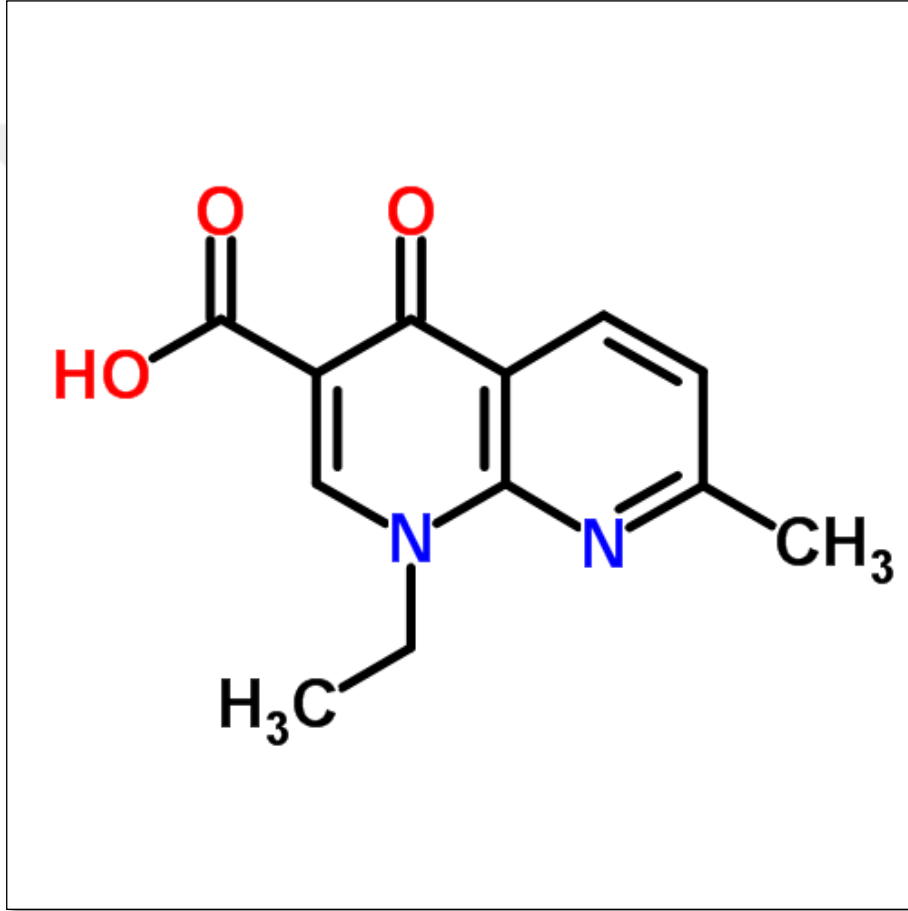
2.2. Antimikrobiyaller

Antimikrobiyal doğal, yarı sentetik veya sentetik olarak elde edilen, mikroorganizmaların çoğalmasını önleyen (inhibe eden) veya öldüren bileşikleridir. Mikroorganizmaların çoğalmalarını önleyen bileşikler bakteriyostatik, öldüren bileşikler ise bakterisit olarak tanımlanır. Bazı bileşikler konsantrasyon ve zaman gibi faktörlere bağlı olarak her iki etkiyi de gösterebilir. Antimikrobiyal ajanlar tıp ve veteriner hekimliğinde bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için kullanılır. Bu yararlı etkinin yanında antimikrobiyallerin konakçıya zarar vermemesi veya en düşük düzeyde zarar vermesi beklenir. Antimikrobiyal kemoterapide ilk kullanılan ajanlar metal tuzları, iyot ve fenol bileşikleridir. Bu ajanlar seçici olmayan toksik nitelikleri nedeniyle konakçı için de zararlıdır ve bu nedenle kullanımları topikal enfeksiyonların tedavisiyle sınırlı kalmıştır. 1930'ların ortasında sülfanomidlerin, 1940'lı yılların başında ise penisilinin klinik kullanımıyla beraber sistemik antimikrobiyaller kemoterapideki yerlerini almıştır (Saga ve Yamaguchi, 2009). Günümüzde sıklıkla tercih edilen antimikrobiyaller, β -laktam, makrolid ve florokinolonlardır. 2010 yılı verilerine göre en çok antimikrobiyal tüketen ülkeler Hindistan, Çin ve Amerika Birleşik Devletleridir. 2000 ve 2010 yılları arasında antimikrobiyal tüketimi % 36 artmıştır. Kullanımı en çok artış gösteren gruplar β -laktam ve florokinolonlardır (Grave ve ark., 2012; Van Boeckel ve ark., 2014)

2.3. Florokinolonlar

Florokinolonlar, sentetik yapılı, geniş etki spektrumlu ve biyoyararlanımı yüksek bakterisidal kemoteropötik ajanlardır. Kinolon grubu antimikrobiyal ajanların ilk üyesi

nalidiksik asittir (Şekil 1). Nalidiksik asit ($C_{12}H_{12}N_2O_3$, MA: 232,23538 g/mol, erime sıcaklığı: 230 °C) 1962’de Geouge Leshar ve arkadaşları tarafından malarya tedavisinde kullanılan klorkuin sentezi sırasında oluşan antimikrobiyal özellikteki ilave bir ürün olarak bulunmuştur (Emmerson ve Jones, 2003; Martinez 2006; Pallo-zimmerman ve ark., 2010).



Şekil 1: Nalidiksik asitin moleküler yapısı (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4268.html?rid=a58d1e2f-d16c-4b38-9202-1e75273ebb6d>).

Nalidiksik asidin Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry: IUPAC) ismi, 1-etil-7-metil-4-okso-1,8-naptridin-3-karboksilik asittir. Kloroformda ve metanolde iyi çözünen beyaz-açık sarı renkli kristalize toz haldedir. Nalidiksik asidin bisiklik moleküler yapısı bir yerine iki nitrojen atomu içerdiği için kinolon değil naptridon bileşiğidir. Düşük

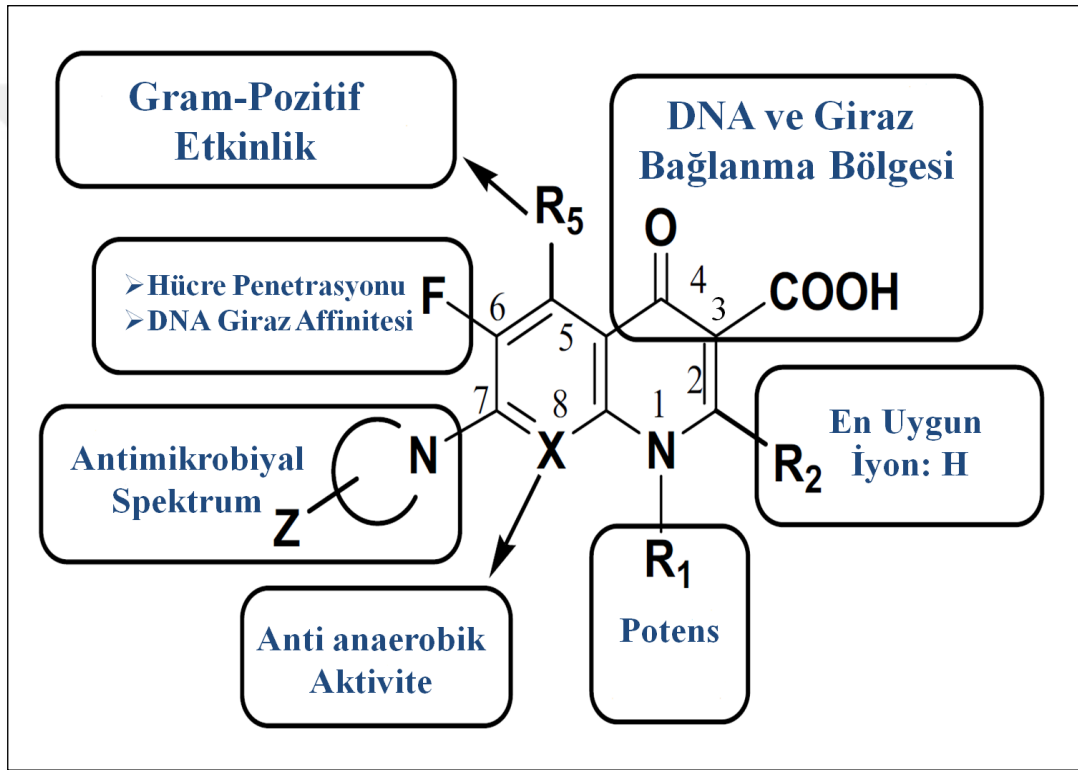
konsantrasyonlarda bakteriyostatik etkiye sahipken yüksek konsantrasyonlarda bakterisit etkilidir. Nalidiksik asidin etki mekanizması 1964 yılında DNA giraz enzimini inhibe ederek bakteri DNA'sının süpersarmal yapılanmasını engellenmesi sonucu oluşan bakterisit etki olarak tanımlanmış ve 1960'lı yılların ikinci yarısında klinik kullanıma sunulmuştur (Pallo-Zimmerman ve ark., 2010). Nalidiksik asit ve türevleri (oksolinik asit, sinoksasin, pirodimik asit, pipedimik asit ve rasoksasin) dar etki spektrumudur ve düşük biyoyararlanıma sahiptir. Etkisi sadece *Enterobacteriaceae* familyasına ait türlerin neden olduğu basit üriner sistem enfeksiyonları ile sınırlıdır. 1980'li yıllara kadar kullanımı devam etmiştir. 1988 yılında Çevre Sağlığı Değerlendirme Ofisi (Office of Environmental Health Hazard Assessment: OEHHA) kararı ile karsinojenik etkileri yüzünden kullanımdan kaldırılmıştır. Günümüzde kinolon direnci ile ilgili yapılan araştırmalarda referans bileşik olarak kullanılmaktadır (<http://oehha.ca.gov/search/content/nalidixic%20acid>).

Bulunışundan günümüze kadar geçen sürede nalidiksik asidin moleküler yapısı değiştirilerek florokinolon grubu antimikrobiyal bileşikler geliştirilmiştir. Nalidiksik asidin moleküler yapısındaki en önemli değişiklikler; 6. karbon pozisyonuna flor atomunun eklenmesi, 7. karbon pozisyonuna piperazin eklenmesi, 1. azot pozisyonuna siklopropil eklenmesi ve 8. karbon pozisyonuna metoksil grubunun eklenmesidir. Bu moleküler değişiklikler sonucunda antibakteriyel aktivite, etki spektrumu, biyoyararlanım, doku dağılımı ve diğer farmakodinamik/farmakokinetik nitelikler önemli düzeyde gelişmiştir. 1980'li yıllarda nalidiksik asidin moleküler yapısının natriodon yerine kinolon çekirdeği içerecek şekilde değiştirilmesi ve bu kinolon halkasının 6. karbon atomuna flor atomu bağlanması sonucu DNA giraz enziminin inhibisyonunda 10 kat artış ve minimum inhibitör konsantrasyonda (MİK) ise 100 kat azalma sağlanmıştır (Anderson ve Alasdair, 2003, Hunter ve ark, 2010). Bu gelişmeden sonra yapısında flor atomu içeren kinolonlar florokinolon olarak adlandırılmıştır (Ball, 2000; Pallo-Zimmerman ve ark., 2010). 1980'li yılların başında biyoyararlanım ve etki spektrumu bakımından nalidiksik asitten çok daha üstün ve günümüzde yaygın olarak kullanılan norfloksasin, enrofloksasin ve siprofloksasin gibi bileşikler klinik kullanım

için onay almıştır. 2000 yılında dördüncü kuşak bir florokinolon olan moksifloksasin tıp hekimliğinde, 2011 yılında ise moksifloksasine yapıca çok benzeyen pradofloksasin veteriner hekimliğinde klinik kullanıma sunulmuştur (EMA, 2011; FDA, 2011).

2.3.1. Florokinolonların Moleküler Yapılarındaki Spesifik Değişiklikler

Florokinolonların moleküler yapısı şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2: Florokinolonların moleküler yapısı (Peterson, 2001)

1. pozisyon: Topoizomeraz veya DNA bağlanma bölgesi olarak tanımlanmıştır ve DNA ile hidrofobik bir bağ oluşturur. Bu bölgedeki en etkili değişiklik siklopropil ve 2, 4-diflorofenil grubunun bağlanması olarak düşünülmektedir. Bu modifikasyon ile florokinolonların topoizomeraz veya DNA yapısına bağlanması daha spesifik gerçekleşir. 1. pozisyona bağlanan diğer moleküllerin ana bileşiğin etkinliğini azaltacağı düşünülmektedir (Domagala, 1994; Ennami 2005; Peterson, 2001; Morrisey 1996).

2. pozisyon: Lokasyon olarak topoizomeraz ve DNA giraz enzimlerine bağlanma noktasına çok yakındır. Bu nedenle büyük yapıli moleküllerin bu pozisyona eklenmesi antimikrobiyal etkinliği azaltabilir. (Domagala, 1994; Tilloston 1996)

3. ve 4. pozisyon: Florokinolonların DNA fragmanlarına bağlanma bölgesi olduğu düşünölmektedir. Bu pozisyonlar için herhangi bir yararlı modifikasyon bildirilmemiştir. Bu nedenle bu pozisyonlarda bulunan 3-karboksilat ve 4-karbonil gruplarının antimikrobiyal etkinlik için gerekli olduğu düşünölmektedir (Peterson, 2001; Tilloston 1996.).

5. pozisyon: Bu pozisyona amino, hidroksil veya metil grubunun eklenmesi Gram pozitif bakteri ve *Toksoplazma gondii*'ye karşı *in vitro* antimikrobiyal etkiyi arttırmıştır. Bu pozisyona metil grubunun eklenmesiyle Gram pozitif antimikrobiyal etkinlik artarken Gram negatif etkinlik değişmez. Ancak halojen tuzları veya metoksi gruplarının bağlanması antimikrobiyal etkinliği azaltır (Domagala, 1994; Kahn, 1999; Peterson, 2001; Yoshida, 1996).

6. pozisyon: Bu pozisyondaki en etkili modifikasyon flor, hidrojen veya amino grubunun eklenmesidir. Bu pozisyonda yapılan modifikasyonlarla ve 1., 7. ile 8. pozisyonlardaki modifikasyonlar arasında sinerjistik etki belirlenmiştir (Peterson, 2001). Florin molekülünün eklenmesiyle DNA giraz enziminin inhibisyonunda 10 kat artış ve MİK'da ise yaklaşık 100 kat azalma meydana gelir (Pallo-Zimmerman ve ark., 2010). 6. pozisyonda flor atomu içeren ilk florokinolon norfloksasindir ve 1986 yılında klinik kullanıma sunulmuştur. 1986'dan sonra florokinolonların moleküler yapılarına piperazinil, metil piperazinil, dimetil piperazinil, pirolidinil ve metoksi grubu yapılarının eklenmesi ile geniş etki spektrumuna sahip yeni nesil florokinolonlar elde edilmiştir. Son yıllarda 6. pozisyonda hidrojen, amino veya amonyum yapıları içeren kinolonlar geliştirilmiştir. 6-amino, 8-metil kinolonlar Gram pozitif koklara karşı genişletilmiş etkiye sahiptir. 6-amino, 7-tetrahidroisoquinolin bileşiklerinin *in vitro* antimikrobiyal etkisi siprofloksasine kıyasla 100 kat daha fazladır (Cecchetti ve ark., 1996; Cecchetti ve

ark., 1997; Hooper, 1998, Peterson, 2001; Takenouchi ve ark., 1996; Zeller ve ark., 1997).

7. pozisyon: Bu pozisyonun DNA giraz veya topoizomeraz IV ile bağlanan bölge olduğu düşünülmektedir. Bu pozisyona bağlanacak optimum moleküller 5 veya 6 nitrojen atomu taşıyan heterosiklik halkalardır. Bağlanma için en sık kullanılan yapılar piperazinler ve aminopirolidinlerdir. Aminopirolidinler genel olarak Gram pozitif etkinliği arttırırken piperazinler Gram negatif etkinliği arttırır (Beyer ve ark., 2000; Peterson, 2001; Piddock ve ark., 1998).

8. pozisyon: Bu pozisyona flor veya klor atomunun eklenmesi anaerob mikroorganizmalara karşı, metil veya metoksi grubunun eklenmesi ise Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiyi güçlendirir. Bu pozisyonda modifikasyon içeren florokinolonların *E. coli* ve *Mycobacterium* türlerinin *gyrA* mutantlarına karşı güçlü bakteriyostatik, *S. aureus*'un sokak tipi ve *parC* mutantlarına karşı yüksek bakterisidal etkili olduğu bildirilmiştir (Cecchetti ve ark., 1996; Cecchetti ve ark., 1997; Peterson, 2001). 8. pozisyondaki karbon atomunun nitrojen atomu ile değiştirilmesi veya bu pozisyona serbest metil veya metoksi grubunun eklenmesiyle antimikrobiyal etki güçlenir, etki spektrumunu genişler ve kromozomal dirençli suşlara karşı antimikrobiyal etkinlik artar. Bu nedenle 4. kuşak florokinolonlara karşı direnç oluşma olasılığı daha düşüktür (Beyer ve ark., 2000; Peterson, 2011; Yoshida ve ark., 1996).

Oksakuinolizinler: Florokinolonlara eklenen yeni bir gruptur. C-4 ve C-5 halkalarının arasındaki karbon atomunun nitrojen atomu ile değiştirilmesi ile elde edilmişlerdir. Bu sayede moleküler yapıdaki diğer pozisyonlar da değişir ve siprofloksasin ile metisiline dirençli *S. aureus* dahil olmak üzere *in vitro* ve *in vivo* olarak Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinlik artar (Peterson, 2001).

Florokinolonlar etki şekillerine, biyoyararlanımlarına, etki spektrumlarına ve doku dağılımlarına göre dört farklı kuşağa ayrılır.

2.3.2. Birinci Kuşak Florokinolonlar

Birinci kuşakta bulunan nalidiksik asit, oksolinik asit, pirodimik asit, pipedemik asit, rasoksasin, flumekuın ve sinoksasin düşük doku penetrasyonuna ve % 50-55 biyoyararlanım oranına sahiptir. Birinci kuşak kinolonlar Gram negatif bakteriler üzerinde sınırlı bakterisidal etkiye sahiptir. *Pseudomonas* türlerine karşı etkisizdir. *Enterobacteriaceae* familyasına ait türlerin neden olduğu basit üriner sistem enfeksiyonları ile sınırlı antimikrobiyal bileşiklerdir. Çoğu *Enterobacteriaceae* üyesi olan bakterilere karşı bakterisid etki gösterir. Günümüzde sınırlı etkileri nedeniyle kullanımdan kaldırılmışlardır. Bu kuşakta yer alan ana bileşik nalidiksik asitin kullanımı, florokinolon direnci belirleme çalışmalarında temel molekül olmasıyla sınırlıdır (Pallo-Zimmerman 2010; Emmerson ve Jones 2003).

2.3.3. İkinci Kuşak Florokinolonlar

Naptriodon yerine kinolon yapısına sahip olmaları, C-6 pozisyonuna flor atomu ve C-7 pozisyonuna piperazin molekülünün eklenmesi ile özellikle Gram-negatif etki spektrumu, doku dağılımları ve biyoyararlanımları geliştirilmiştir. C-7 pozisyonuna piperazin molekülünün eklenmesiyle bu gruptaki bileşiklerin atım pompası inhibitörü olarak etki gösterdikleri belirlenmiştir. Moleküler yapısına N-1 siklopropil grubunun eklenmesi antibakteriyel aktivitede önemli artış sağlar. İkinci kuşakta norfloksasin, siprofloksasin, enrofloksasin, marbofloksasin, danofloksasin, difloksasin ve enoksasin yer alır. İkinci kuşak florokinolonlar % 70'den daha yüksek biyoyararlanım oranına ve iyi doku penetrasyonuna sahiptir. Gram negatif ve bazı Gram pozitif bakteriler ile atipik patojenlere karşı etkilidirler. *Streptococcus pneumoniae*'ye karşı etkinlikleri yoktur (Emmerson ve Jones, 2003; Pallo-zimmerman ve ark., 2010; Peterson, 2001).

2.3.4. Üçüncü Kuşak Florokinolonlar

İkinci kuşak bileşikler geliştirilerek C-7 piperazin pozisyonuna aminopirolidin gibi yeni moleküllerin eklenmesi sonucu üçüncü kuşak florokinolonlar elde edilmiştir. Bu kuşakta orbifloksasin, levofloksasin, sparfloksasin, grepafloksasin ve gatifloksasin

gibi bileşikler bulunur. Bu bileşikler % 80'den daha yüksek biyoyararlanım oranına ve iyi doku penetrasyonuna sahiptir. Geniş Gram negatif ve güçlendirilmiş Gram pozitif etkinlik gösterirler. Penisiline dirençli bakterilere, *Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamidia pneumoniae* gibi bazı atipik patojenlere karşı da etkinlikleri vardır (Peterson, 2001).

2.3.5. Dördüncü Kuşak Florokinolonlar

C-8 pozisyonuna metoksil grubunun eklenmesi sonucu 4. kuşak florokinolonlar elde edilmiştir. Bu yapısal değişiklikle kromozomal dirençli suşlara ve Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinlik artmıştır. Ayrıca bazı florokinolonlarda görülen fototoksosite azalmıştır. Dördüncü kuşak florokinolonlar DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerine eş zamanlı olarak bağlanır. Bu nedenle 4. kuşak florokinolonlara karşı direnç gelişimi daha az görülür. Bu kuşakta travofloksasin, klinafloksasin, pradofloksasin ve moksifloksasin gibi bileşikler bulunur. Biyoyararlanımları % 100'e yakındır ve iyi doku penetrasyonuna sahiptirler. Bu kuşaktaki florokinolonlar geniş Gram negatif, geniş Gram pozitif ve güçlendirilmiş atipik etkinin yanında anaerob bakterilere karşı da etkilidirler (Emmerson ve Jones, 2003; Pallo-Zimmerman 2010).

Tüm florokinolonlar, kinolonlara göre yüksek biyoyararlanım, proteinlere düşük bağlanma oranı, geniş etki spektrumu ve yüksek doku penetrasyonuna sahiptir. Vücut sıvılarında iyi dağılırlar ve bu nitelikleri endikasyon alanlarını genişletir. Uzun biyolojik yarılanma sürelerine sahip oldukları için günlük tek doz uygulanabilirler. Bu durum klinik kullanımlarını kolaylaştırır. Florokinolonlar düşük MÖK/MİK oranları ile potent antimikrobiyal bileşiklerdir (Pallo-Zimmerman 2010).

2.4. Florokinolonların Etki Mekanizmaları

Florokinolonlar membran kanallarından bakteri hücrelerine girerek DNA replikasyonu için gerekli olan topoizomeraz II (DNA giraz) ve Topoizomeraz IV enzimlerini inhibe eder ve DNA replikasyonunu, onarımını ve transkripsiyonunu engelleyerek bakterisit etki gösterir. Bakteri DNA'sı normal şartlarda süpersarmal

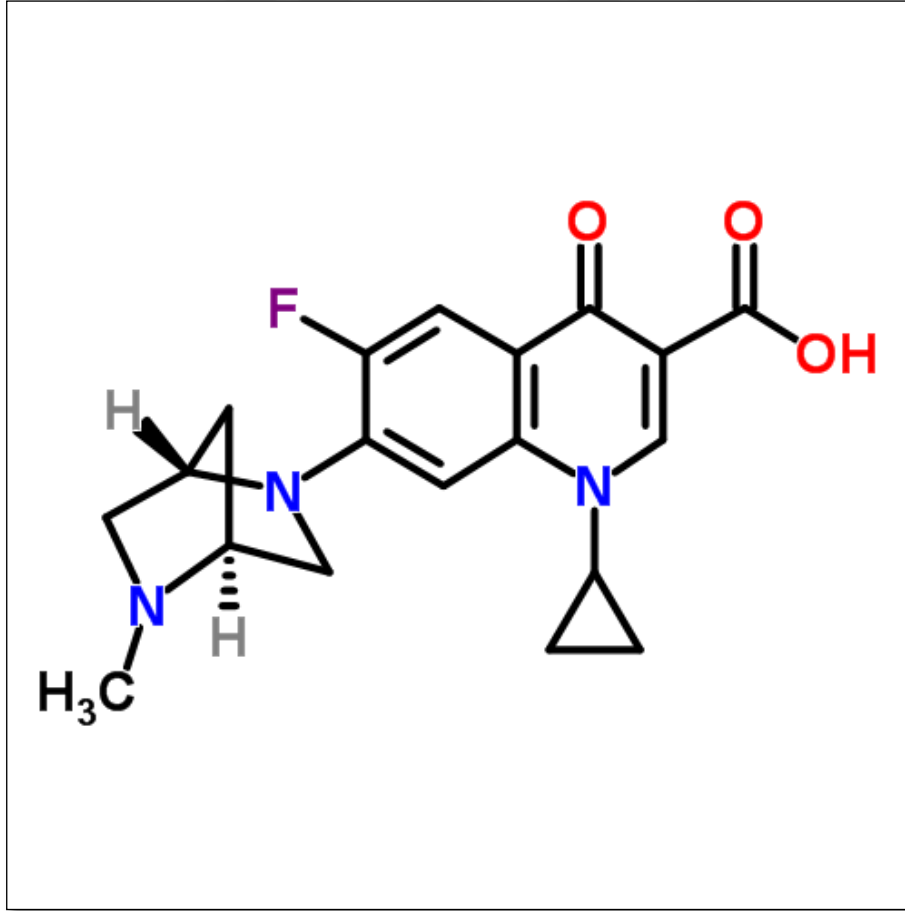
yapıda bulunur. Süpersarmal yapı replikasyon, transkripsiyon veya onarım işlemleri sırasında açılır ve sonrasında tekrar oluşur. Topoizomeraz II enzimi DNA'nın süpersarmal yapısının kesim, ayırım ve birleştirilmesinde görevlidir. Florokinolonlar moleküler özelliklerine göre hem topoizomeraz II ile IV enzimine hem de DNA'ya bağlanarak geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz üçlü yapılar oluşturur. Bu üçlü yapının oluşması DNA replikasyonu ve protein sentezi gibi bakteriyel yaşamın devamlılığı için gerekli esansiyel işlevlerin sürdürülmesini engeller. Bu engellenmeyle farklı hücre ölüm mekanizmaları tetiklenir. Örneğin nalidiksik asit ve siprofloksasin gibi eski kuşak florokinolonlar yavaş hücre ölümüne neden olur. *In vitro* çalışmalar bu bileşikler tarafından oluşturulan üçlü yapının geri dönüşümlü olduğunu göstermiştir ve bileşikler ortamdaki uzaklaştığında DNA religasyonu gerçekleşmiştir. Moksifloksasin gibi yeni kuşak florokinolonlar ise hızlı hücre ölümü gerçekleştirir. Bu bileşiklerin oluşturduğu etki geri dönüşümsüzdür ve bileşik ortamdaki uzaklaştırılsa bile DNA religasyonu gerçekleşmez (Emmerson ve Jones, 2003; Mustaev ve ark., 2013; Pallo-Zimmerman 2010). Memeli hücrelerinde DNA replikasyonu ve tamiri için topoizomeraz II enzimine ihtiyaç duyulmasına rağmen florokinolonların bakteriyel topoizomeraz II enzimine olan afinitesi memeli topoizomeraz II enzimine olan afinitesinden daha yüksektir. Bu fark nedeniyle florokinolonlar konakçı üzerinde istenmeyen etki oluşturmaksızın bakterisit etki gösterebilir. Florokinolonlar topoizomeraz II'nin yanı sıra topoizomeraz IV enzimini de inhibe eder. Bu enzim DNA'nın uzaması ve replikasyonundan sonra eş kromozomların birbirinden ayrılmasını sağlar. Topoizomeraz IV enziminin inhibisyonu bakteriyel replikasyonu engelleyerek hücre ölümüne neden olur. Florokinolonların etkileri dozlarına bağımlı olarak artar. Birçok Gram negatif bakteri için birincil hedef topoizomeraz II, ikincil hedef topoizomeraz IV enzimidir. Gram pozitif bakteriler için florokinolonların birincil hedef bölgesi topoizomeraz IV'tür. Moksifloksasin, pradofloksasin ve travofloksasin gibi dördüncü kuşak florokinolonlar hem topoizomeraz II hem de topoizomeraz IV'ü eş zamanlı olarak inhibe eder. Bu durum dördüncü kuşak florokinolonlara karşı bakteriyel direncin gelişme olasılığını azaltır (Mustaev ve ark., 2013; Pallo-zimmerman ve ark., 2010;).

2.5. Veteriner Hekimliğinde Sık Kullanılan Florokinolonlar

Veteriner hekimliğinde bakteriyel enfeksiyonların tedavisi amacıyla sıklıkla kullanılan florokinolonlar enrofloksasin, orbifloksasin, pradofloksasin, marbofloksasin ve danofloksasindir. Florokinolonlar pet hayvanlarında topikal, oral veya deri altı yada kas içi enjeksiyon yolu ile kullanılır. Çiftlik hayvanlarında ise deri altı veya kas içi enjeksiyon yolu ile kullanımları yaygındır.

2.5.1. Danofloksasin

Danofloksasinin moleküler yapısı şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 3. Danofloksasinin moleküler yapısı (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.64439.html>)

IUPAC ismi: 1-siklopropil-6-floro-7-[(1S, 4S)-5-metil-2, 5-diazabisiklil [2.2.1]heptan-2]-4-oksokuinolin-3-karboksilik asittir.

Moleküler Formülü: C₁₉H₂₀FN₃O₃

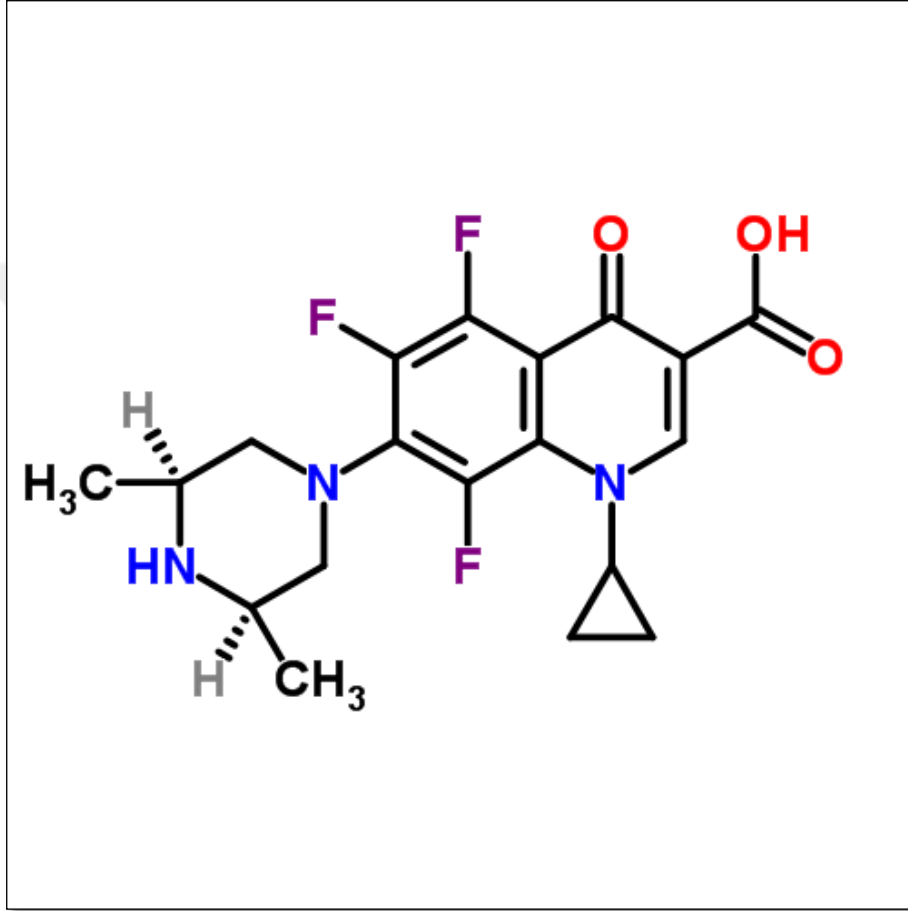
Moleküler Ağırlığı: 357,378803 g/mol.

Kimyasal Özellikleri: Kloroform ve metanolde iyi çözünen beyaz-açık sarı renkli kristalize bir tozdur.

Veteriner hekimliğinde laktasyon döneminde olmayan sığırların yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisi için antimikrobiyal ve antimikoplazmal olarak intramusküler veya subkutan enjeksiyon yoluyla kullanılan ikinci kuşak bir florokinolon bileşiğidir. Danofloksasin Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde iyi bir *in vitro* aktiviteye sahiptir. İntramusküler ve subkutan enjeksiyonla benzer biyoyararlanım karakteristiği gösterir. Önerilen danofloksasin dozu 5-8 mg/kg canlı ağırlıktır (EMA, 1998; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Danofloxacin>; McKellar 1999; Sem-Tov ve ark., 1997).

2.5.2. Orbifloksasin

Orbifloksasinin moleküler yapısı şekil 4’te sunulmuştur.



Şekil 4. Orbifloksasinin moleküler yapısı (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.54631.html>)

IUPAC ismi: 11-siklopropil-7-[(3S, 5R)-3, 5-dimetilpiperazin-1-yl]-5, 6, 8-trifloro-4-oksokuinolin -3-karboksilik asittir.

Moleküler Formülü: C₁₉H₂₀FN₃O₃

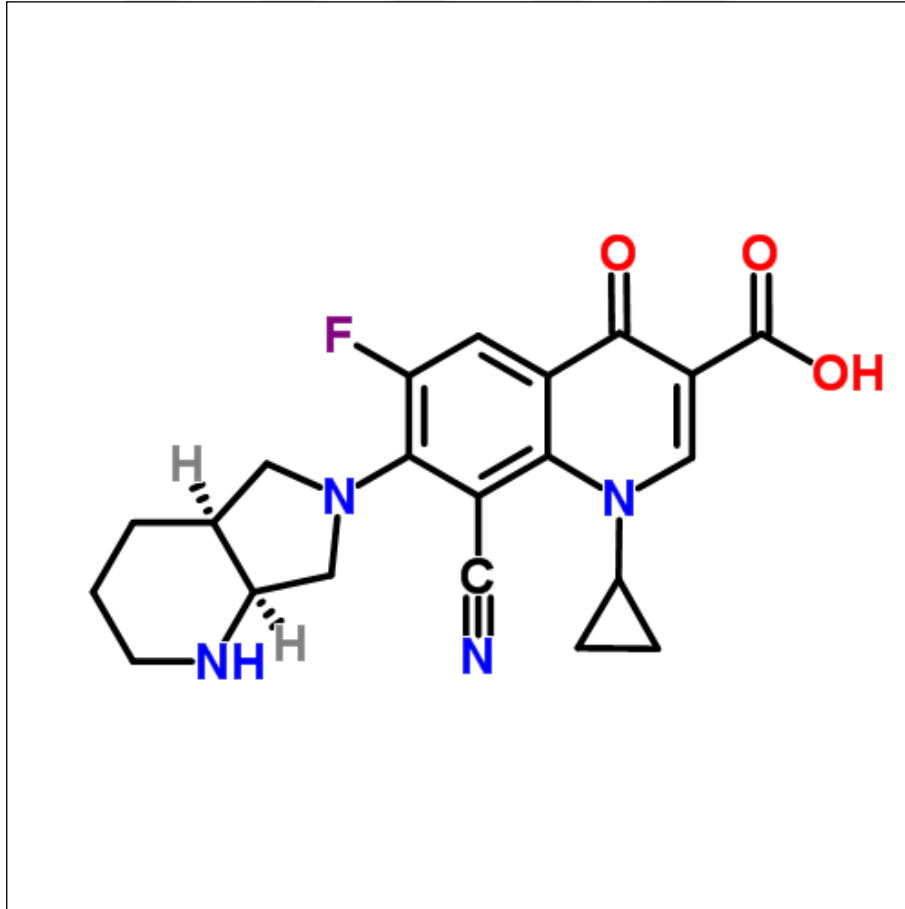
Moleküler Ağırlığı: 357,378803 g/mol

Kimyasal Özellikleri: Kloroform ve metanolde iyi çözünen beyaz-açık sarı renkli kristalize bir tozdur.

Orbifloksasin Gram negatif ve Gram pozitif patojenlerin oluşturduğu yumuşak doku ve üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan üçüncü kuşak bir florokinolon bileşimidir. Enrofloksasinden sonra kedi ve köpeklerde kullanılması onaylanan ikinci florokinolon bileşimidir. Tavsiye edilen orbifloksasin oral dozu kedi ve köpeklerde 2.5-7.5 mg/kg canlı ağırlıktır. Lokal kullanım için geliştirilmiş farmasötik formları deri ve kulak enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60605>; Palla-Zimmerman ve ark., 2010).

2.5.3. Pradofloksasin

Pradofloksasinin moleküler yapısı şekil 5’te sunulmuştur.



Şekil 5. Pradofloksasinin moleküler yapısı (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7978646.html>)

IUPAC ismi: 7-[(4aS,7aS)-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 7, 7a-oktahidropirololo [3, 4-b] pridin-6-il]-8-siyano-1-siklopropil-6-floro-4- oksokuinolin -3-karboksilik asittir.

Moleküler Formülü: C₂₁H₂₁FN₄O₃

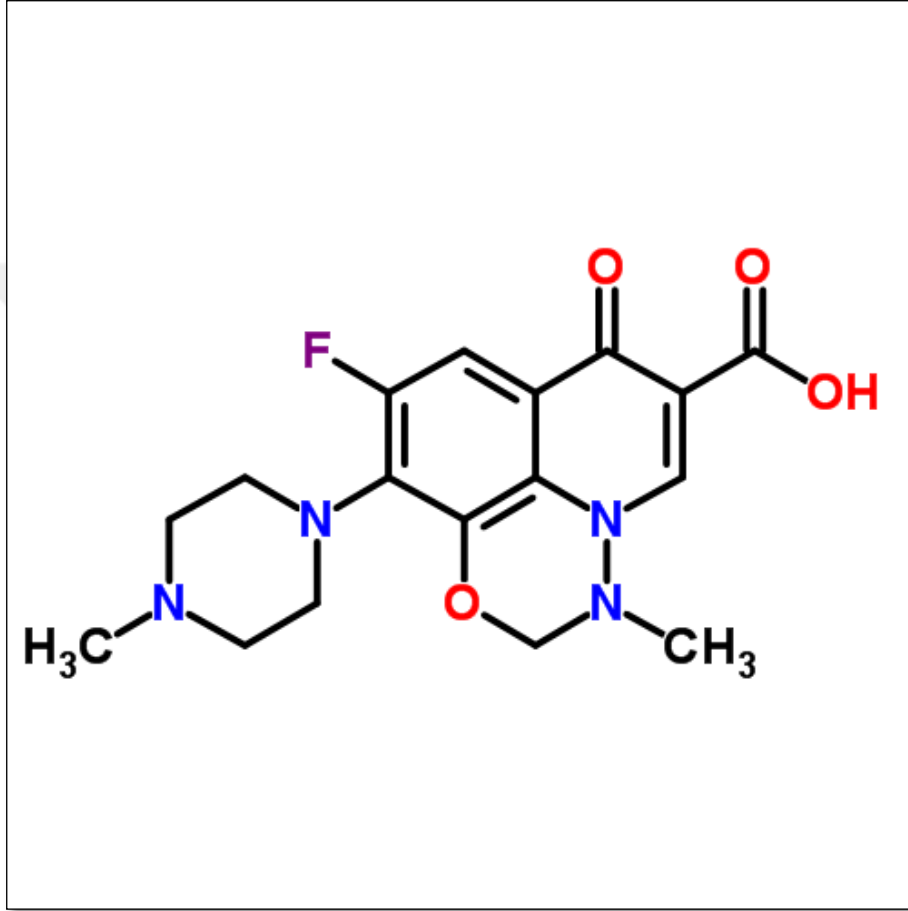
Moleküler Ağırlığı: 396,414843 g/mol

Kimyasal Özellikleri: Kloroform ve metanolde iyi çözünen beyaz-açık sarı renkli kristalize bir tozdur.

Pradofloksasin kedi ve köpeklerde Gram negatif, Gram pozitif ve anaerob mikroorganizmalar tarafından oluşturulan deri, üriner sistem ve solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan dördüncü kuşak bir florokinolon bileşiğidir. Tavsiye edilen pradofloksasin dozu 5 mg/kg canlı ağırlıktır. Tablet ve oral süspansiyon farmasötik formları mevcuttur ([https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9802884](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9802884#section=Top) #section=Top, EMA prd, Lidiz 2010).

2.5.4. Marbofloksasin

Marbofloksasinin moleküler yapısı şekil 6’da sunulmuştur.



Şekil. 6 Marbofloksasinin moleküler yapısı (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.54663.html>)

IUPAC ismi: 9-floro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-ridol (3, 2, 1-il) (4, 2,1) benzoksadiazin-6 karboksilik asittir.

Moleküler Formülü: C₁₇H₁₉FN₄O₄,

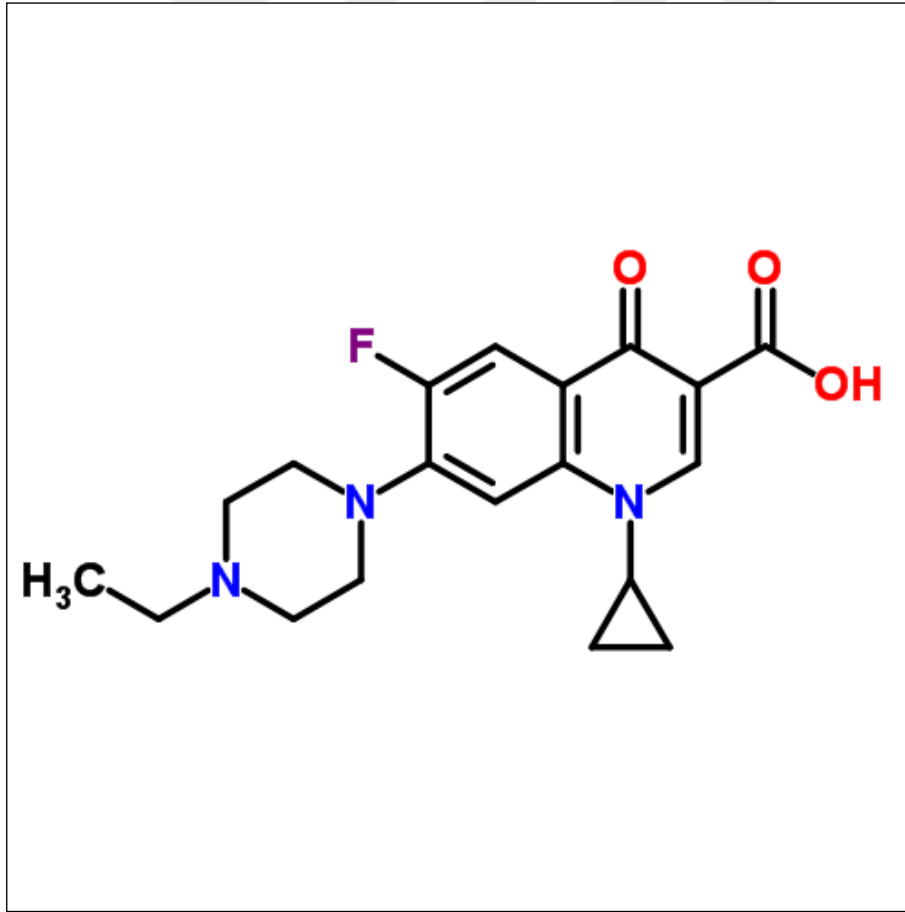
Moleküler Ağırlığı: 370,404857 g/mol

Kimyasal Özellikleri: Kloroform ve metanolde iyi çözünen beyaz-açık sarı renkli kristalize bir tozdur.

Marbofloksasin köpek ve sığırlarda Gram negatif bakterilerin oluşturduğu solunum yolları ve genital sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ikinci kuşak bir florokinolondur. Oral biyoyararlanımı % 100'e yakındır (EMA MARB, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60651>, Pallo-Zimmerman ve ark., 2010; Sem-Tov ve ark., 1997;). Yapılan araştırmalar diğer ikinci kuşak florokinolonların aksine marbofloksasin direncinin son 20 yıl içerisinde önemli ölçüde artmadığını vurgulamaktadır. Bu nedenle marbofloksasin klinik açıdan önemli bir bileşik olarak nitelendirilmektedir.

2.5.5. Enrofloksasin

Enrofloksasinin moleküler yapısı şekil 7'de sunulmuştur.



Şekil 7. Enrofloksasinin moleküler yapısı (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.64326.html>)

IUPAC ismi: 1-siklopropil-7-(4-etilpiperazin-1-il)-6-floro-4- oksokuinolin -3- karboksilik asittir.

Moleküler Formülü: C₁₉H₂₂FN₃O₃,

Moleküler Ağırlığı: 359,394683 g/mol

Kimyasal Özellikleri: Suda az, kloroform ve metanolde iyi çözünen sarı veya hafif turuncu kristalize bir tozdur.

Enrofloksasin ruminant, domuz, kedi ve köpeklerde Gram negatif ve bazı Gram pozitif bakterilerin oluşturduğu üriner sistem, solunum yolu, yumuşak doku, kemik ve eklem enfeksiyonları ile septisemi tedavisinde kullanılan ikinci kuşak bir florokinolondur. Tüm aerobik basillere ve sindirim sistemi patojenlerine karşı etkilidir. Vücut sıvılarında iyi dağılır. Tavsiye edilen enrofloksasin dozu 5 mg/kg canlı ağırlıktır (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71188>, EMA, 1998; Pallo-Zimmerman 2010).

2.6. Antimikrobiyal Direnç ve Çevre

Antimikrobiyal direnç antimikrobiyal bileşiklerin kullanıma sunulmasından daha uzun süredir var olan ve bakterilerin çevresel etmenlerden korunmak için geliştirdiği bir adaptasyon şeklidir. Bakteriyel ekosistemlerde bulunan ve bakteriyel yaşam için risk oluşturan çevresel etmenlerin antimikrobiyal direnç oluşumunda önemli faktörler oldukları düşünülmektedir (EMA, 1999, Allen ve ark., 2010).

2.7. Antimikrobiyal Direnç

Antimikrobiyal direnç bakterilerin antimikrobiyal ajanların bakterisidal veya bakteriyostatik etkilerine karşı koyabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Tenover ve Hughes, 1996). Antimikrobiyal direnç kavramı karakteristik özelliklerine göre klinik direnç, mikrobiyolojik direnç, doğal (instink), kazanılmış, çapraz, çoklu ilaç direnci olarak sınıflandırılabilir (EMA, 1999).

2.7.1. Antimikrobiyal Direncin Kökeni

Antimikrobiyaller 80 yıldan daha uzun süredir tedavi ve araştırma amaçlı olarak tıp ve veteriner hekimliğinde kullanılmaktadır. Ayrıca 10 yıl öncesine kadar antimikrobiyaller, tarımsal ve ticari üretim alanlarında yaygın olarak kullanılmış ve bunun sonucu olarak bakteriyel ekosistemler üzerinde oluşan yoğun seçici etki bakterilerin genetik yapısında değişikliklere neden olmuştur (Venglovsky ve ark., 2008; Yu ve ark., 2009). Antimikrobiyallerin yaygın kullanımı ve direnç gelişimi arasında doğrusal bir ilişki henüz kurulamamış olsa da yaygın kullanımın direnç gelişimini artırabileceği bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Allen ve ark., 2010; McEwen ve ark., 2002; Mindlin ve ark., 2006; Seppala ve ark., 1997). Direncin gelişmesi öngörülebilir bir süreç olmasına rağmen, çok etmenli ve karmaşık yapıda olması ve bazı mikroorganizmaların diğerlerine göre daha kolay direnç kazanabilme nitelikleri nedeniyle spesifik olarak tahmin edilemez. Antimikrobiyal ajanların kullanıma başlaması ve dirençli patojenlerin tanımlanma zamanları şekil 8'de kronolojik olarak gösterilmiştir (EMA, 1999; McEwen ve ark., 2002).

Antimikrobiyal direncin tam olarak ne zaman ortaya çıktığına veya nereden köken aldığına dair doğruluğu kanıtlanmış herhangi bir veri olmamasına rağmen, genel görüş çevrede bakteri yaşamı için olumsuz etkili bileşiklerin varlığının spesifik veya spesifik olmayan antimikrobiyal direncin oluşumunu tetiklediği yönündedir (Allen ve ark., 2010). Antimikrobiyal direnç bir adaptasyon sürecidir ve antimikrobiyal direnci kodlayan bazı genlerin metabolik fonksiyonlarının da olduğu bildirilmiştir (Lu ve ark., 2004). Örneğin MDR'dan sorumlu geri çıkartım pompaları antimikrobiyal dışında ağır metal gibi birçok toksik maddenin de hücre dışına çıkartılmasından sorumludur (Nies, 2003; Poole, 2005). Antimikrobiyal ajanlara hiç maruz kalmadıkları düşünülen eklem bacaklıların intestinal florasından izole edilen bakterilerin bazı genleri *E. coli*'ye transfer ederek antimikrobiyal direnç oluşturdukları rapor edilmiştir (Allen ve ark., 2009; Kadavy ve ark., 2000). Daha önemli olarak Murray kolleksiyonu olarak bilinen ve antimikrobiyallerin kullanılmaya başlamasından önce izole edilen 433 *Enterobacterial* izolatın 11 tanesi birçok antimikrobiyale karşı dirençlidir. Bu kolleksiyon içinde yer alan bakterilerin % 24'ünün plazmid aktarabildiği saptanmıştır (Hughes ve Datta N, 1983)

2.7.2. Klinik Direnç

Klinik direnç bakteriyel kaynaklı bir enfeksiyonun uygulanan tedaviye yanıt vermemesi olarak tanımlanır ve bakterinin genetik özelliklerinden bağımsız olduğu için antimikrobiyal direncin karakteri hakkında detaylı bilgi sunmaz (EMA, 1999).

2.7.3. Mikrobiyolojik Direnç

Mikrobiyolojik açıdan direnç bir bakterinin herhangi bir direnç genetik etmen veya mekanizmasına sahip olup olunmaması ile belirlenir. Mikrobiyolojik direnç kantitatif olarak ölçülebilir ve duyarlı, orta derecede duyarlı, dirençli veya metisilin dirençli gibi karakteristik özellikler ile tanımlanabilir (EMA, 1999).

2.7.4. Doğal Direnç

Bakteriler yapıları gereği bazı antimikrobiklere dirençli olabilir. Bu tür direnç bakterinin temel özelliğidir ve ilgili antimikrobiyalın konsantrasyonu veya uygulama süresi ile ilişkili değildir. Doğal direnç mikroorganizmanın tür özelliği olarak ilgili antimikrobiyalın hedefi olan yapının bulunmamasının veya antimikrobiyalın yapısal olarak hedefine ulaşmamasının bir sonucudur. Gram negatif bakteriler çok katmanlı peptidoglikan hücre duvarlarına sahip oldukları için vankomisine ve metisiline, enterokoklar sefalosporinlere doğal olarak dirençlidir. Bakterilerin L formları ve mikoplazmalar gibi hücre çeperine sahip olmayan mikroorganizmalar penisilin gibi hücre duvar sentezi inhibitörlerine doğal olarak dirençlidir. Aynı şekilde metabolik olarak inaktif olan bakteri sporları veya bakterilerin dormant formları antimikrobiklere doğal olarak dirençlidir. Çünkü birçok antimikrobiyalın etkili olabilmesi için bakterinin metabolik olarak aktif olması gereklidir (EMA, 1999; Hurdle ve ark., 2011). Doğal direnç klonal olarak aktarılır ve bir antimikrobik maddeye doğal dirençli olan türün hiç bir kökeni uygulanan antibiyotikten etkilenmez.

2.7.5. Kazanılmış Direnç

Bakterilerin genetik yapılarındaki değişimler sonucu gelişen direnç tipidir. Bir bakteri genetik değişimlere bağlı olarak bir süre duyarlı olduğu bilinen antimikrobiklerden etkilenmeyebilir. Kazanılmış direnç kromozomal veya ekstrakromozomal kaynaklı olarak gelişebilir (EMA,1999).

2.7.5.1. Kromozomal Direnç

Bakteri kromozomal yapısında oluşan mutasyonlar sonucu gelişir ve *de novo* direnç olarak adlandırılır. *De novo* direnç başlangıçta düşük etkili bir direncin oluşmasını sağlayan tekli mutasyonların aşamalı olarak artarak yüksek etkili bir dirence dönüşmesi ile karakterizedir. *De novo* direnç özellikle protein veya enzim gibi antimikrobiyal aktivite ile ilişkili makromoleküllerin sentezinden sorumlu kromozomal bölgelerde oluşan mutasyonlar nedeniyle gelişir ve sadece klonal (vertikal) olarak

aktarılabılır. Bakteriyel DNA oldukça kırılğan bir yapıya sahiptir. UV ışınları, oksidasyon, sıcaklık değişimleri, kimyasal ajanlar ve antimikrobiyal bileşik gibi çevresel faktörler mutasyonları tetikleyebilir (Drilica, 2003).

2.7.5.2. Ekstrakromozomal Direnç (Aktarılabılır Direnç)

Plazmid, transpozon, integron veya gen kasetleri gibi kromozom dıőı hareketli genetik materyallerin konjugasyon, transformasyon veya transpozisyon gibi yollar ile bakteriler arasında aktarılması ile oluşur. Bakterilerin supterapötik dozlarda antimikrobiyallere maruz kalmaları antimikrobiyal direnç özelliğini avantaj haline getirir. Bu nedenle ortamda antimikrobiyal varlığı antimikrobiyal direnç genlerinin aktarılmasını provoke edici bir neden olarak kabul edilmektedir (EMA, 1999).

2.7.5.3. Ekstrakromozomal Hareketli Genetik Materyaller

Kromozom dıőı genetik materyaller genetik çeşitliliğin sürdürülebilmesi açısından evrimsel öneme sahiptir, bakteriler arasında aktarılabılır ve DNA gibi sabit yapılara entegre olarak genetik varyasyonun gelişiminden sorumludur. Bu yapılardan en önemlileri plazmidler, transpozonlar, integronlar ve gen kasetleridir (EMA, 1999).

2.5.7.4. Plazmidler

Kromozomdan bağımsız olarak replike olabilen sirküler yapıda ekstrakromozomal DNA parçacıklarıdır. Genel olarak plazmidler bakterilerin yaşamlarını sürdürmeleri için gerekli yapılar değildir. Fakat bakteriyel replikasyon, metabolizma, fertilitte ve daha önemli olarak toksinlere, bakteriyofajlara ve antimikrobiyallere karşı direnci etkiledikleri için bakteriyel evrimin önemli etmenleridir. Birçok bakteri türü plazmid transferi ve ekspresyonu yapabilir. Bu durum bakteriyel ekosistemlerde plazmidler ile kodlanan karakteristiklerin yaygınlaşması ile sonuçlanır. Plazmidler aynı veya farklı genusa ait bakteriler arasında transfer edilebilir. Yapılarında antimikrobiyal, ağır metal veya kimyasal ajanlara karşı direnç genleri taşıyan plazmidler R (rezistans)-plazmidleri olarak tanımlanır. Bir R-plazmidi birçok direnç etmeni

taşıyabilir bu yüzden R-plazmidlerinin bakteriler arasındaki transferi kromozomal mutasyonlardan daha hızlı ve etkili antimikrobiyal direncin gelişimine sebep olabilir. Günümüze kadar birçok R-plazmidi tanımlanmıştır. İnsan ve hayvan kaynaklı bakteri izolatlarından elde edilen R-plazmidleri yapısal olarak büyük benzerlikler göstermektedir (Abd el Rahim ve ark 2015; Kruse, 1994).

2.7.5.5. Transpozonlar

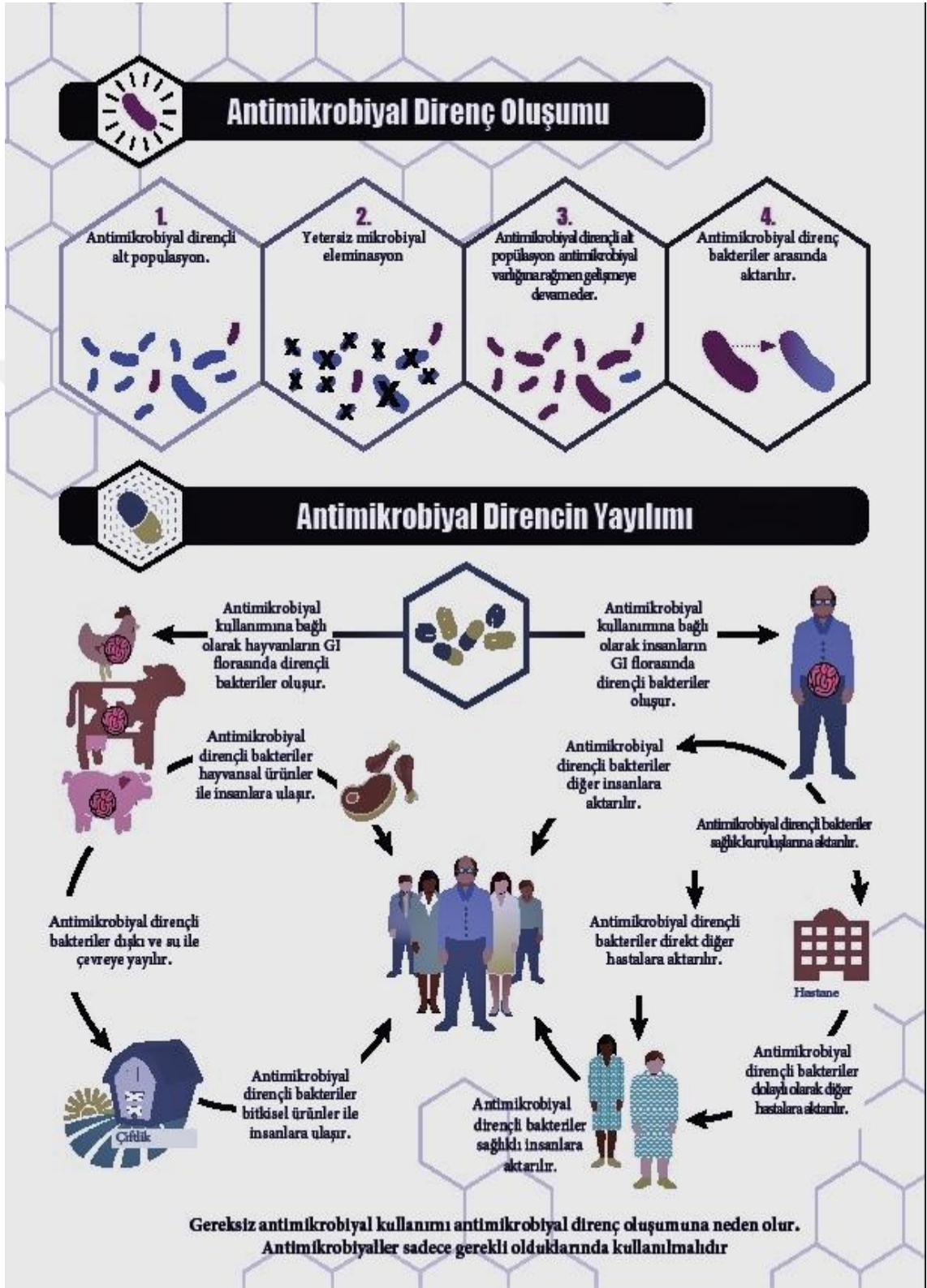
Transpozonlar kromozom, plazmid ve bakteriyofajların yapılarına entegre olabilen ve bu yapılar arasında hareket edebilen kısa DNA parçalarıdır. Kendi kendilerine replike olamazlar ve fonksiyonel bir DNA parçası (plazmid veya kromozom) içinde korunmaları gerekir. Gram negatif bakterilerin transpozonları konjugatif bir plazmid veya DNA yapısına entegre olmadıkları sürece konjugatif değildir. *Bacteroides spp* ve Gram pozitif bakteriler ise konjugatif karakteristikler taşıyabilir. Direnç genlerini taşıyan transpozonlar kolaylıkla plazmidlerin yapısına entegre olabilir ve sonrasında bakteriyel DNA'nın yapısına katılabilirler. Direnç etmeni taşıyan birçok transpozon aynı plazmid ile taşınabilir böylece tek konjugasyon ile birçok direnç etmeni bakteriler arasında aktarılabilir. Transpozonların bakteri içi ve bakteriler arasındaki hareketleri ile antimikrobiyal direnç etmenleri birçok bakteri popülasyonuna ulaşabilir. Fakat transpozonların antimikrobiyal direncin yaygınlaşmasındaki en önemli etkileri antimikrobiyal direnç genlerinin konakçı çeşitliliğini arttırmalarıdır (Burns, 1995; EMA, 1999).

2.7.5.6. İntegronlar ve Gen Kasetleri

İntegronlar mobil gen ekspresyon elementleri olarak tanımlanır. Yapılarında entegraz geni, gen kasetleri ve o gen için rekombinasyon bölgesi bulundurlar. İntegraz geni integron tarafından taşınan gen kasetinin başka DNA'ya entegre edilmesinden sorumludur. İntegronlar kromozom, plazmid veya transpozonların yapılarında yer alır ve birçok integronun antimikrobiyal direnç etmeni taşıdığı rapor edilmiştir (Butaye ve ark., 2003; Hall, 1997).

2.8. Hareketli Direnç Etmenlerinin Bakteriler Arasında Transferi

Ekstrakromozomal direnç etmenleri, antimikrobiyal direncin yaygınlaşmasının en önemli nedenidir. Direnç etmeni başlıca konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyon yolları ile aynı ve farklı genusa ait bakteriler arasında aktif veya pasif olarak aktarılır. 2008 yılında tanımlanmış olan ve IncH1 plazmidi üzerinde yer alan NDM1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1) geni β -laktam antimikrobiyallere karşı gelişen direncin de aktarılabilir olduğunu ve bu direncin hızla yayılabileceğini göstermektedir. Bu gen 2008-2013 yılları arasında 40'tan fazla ülkeye yayılmıştır (Jhonson, 2013). Benzer şekilde plazmid aracılı kinolon direnci ilk olarak 1998 yılında tanımlanmış ve günümüzde küresel yayılım göstermiştir (Dalhoff, 2012). Antimikrobiyal direncin oluşum ve yayılım mekanizmaları şekil 9' da gösterilmiştir.



Şekil 9: Antimikrobiyal direncin yayılımı (CDC 2013)

2.8.1. Konjugasyon

Konjugasyon, horizontal gen transfer mekanizmaları arasında en çok araştırılmış olan mekanizmadır ve iki bakteri hücrelerinin teması sonucunda çok aşamalı olarak gerçekleşen genetik materyal aktarımı olarak tanımlanır. Bakteri hücreleri arasında seks pillusu olarak adlandırılan stoplazmik bir köprü oluşur ve hareketli genetik materyal bu yapı aracılığı ile bir bakteriden diğerine aktarılır. Konjugasyonun gerçekleşmesi bakterilerin genetik yapılarında konjugatif özellikleri kodlayan genlerin veya otonom olarak replike olabilen plazmidlerin bulunması gereklidir (Smillie ve ark., 2010; Wozniak ve Waldor, 2010). Konjugasyon, transformasyona göre daha etkili gen aktarımı sağlaması ve transdüksiyona göre daha geniş bakteri çeşitliliğini kapsamaması nedeni ile antimikrobiyal direnç genlerinin aktarımından sorumlu olan en önemli mekanizma olduğu düşünülmektedir (Norman ve ark., 2009). Antimikrobiyal direnç genlerinin konjugasyon yolu ile aktarımı toprak ve su bazlı birçok ekosistemde gerçekleşebilir (Davidson 1999). Ayrıca plazmid ve transpozonların konjugasyon yolu ile birbirinden farklı taksonomik gruplar arasında da aktarılabilmesi bu mekanizmanın antimikrobiyal direnç genlerinin yaygınlaşmasındaki önemini göstermektedir (Von-Wintersdorff ve ark., 2016). β -laktam, kinolon, aminoglikozid, tetrasiklin ve sülfanomid grubu antimikrobiyallere karşı direnç gelişimi ve yaygınlaşmasından antimikrobiyal direnç genlerinin plazmidler ile aktarımı sorumludur (Huddleston, 2014). Daha önemli olarak birçok antimikrobiyal direnç geni aynı plazmid üzerinde bulunmaktadır ve bu durum çoklu ilaç direncinin yaygınlaşmasına neden olmaktadır. Direnç genlerinin yeni konaklara aktarımında tek yol plazmid transferi değildir. Konjugasyon yoluyla transpozon ve integronlar da aktarılabilir. Özellikle Gram pozitif bakterilerde bulunan konjugatif transpozonlar, plazmid olmaksızın gen aktarımını sağlayabilir. Son yıllarda direnç genlerinin özellikle transpozonlarca taşındıkları anlaşılmıştır (Von-Wintersdorff ve ark., 2016).

2.8.2. Transformasyon

Transformasyon, ortamda serbest bulunan DNA'nın bakteri hücresi içine alınmasıdır. Bir bakterinin lize olması ile açığa çıkan genetik materyal başka bir bakteri tarafından stoplazmik reseptörler aracılığı ile tanınır ve hücre zarı tarafından bakteri içerisine alınır. *Neisseria* türleri ile patojen ve patojen olmayan streptokok türleri arasında gen aktarımı sonucu penisilin bağlayan protein (PBP) değişimlerinin transformasyon yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Araştırmalar antimikrobiyallerin sup-terapötik dozlarına maruz kalan bakterilerin transformasyon kapasitelerinin arttığını gösterilmiştir. Bu durum antimikrobiyallerin direnç genlerinin aktarımını tetiklediğini göstermektedir (Bengtsson-Palme ve Larsson 2016; Charpentier et al., 2011).

2.8.3. Transdüksiyon

Transdüksiyon ise direnç genlerinin bakteriyofaj aracılığı ile transferidir. Bir bakteri hücrelerini enfekte eden bakteriyofaj bakterinin lize olması ile serbest kalır ve o bakteriye ait genetik materyali bir başka bakteriye taşıyabilir. Sıklıkla laboratuvar koşullarında direnç aktarımı için uygulanır. Transdüksiyonun *in vitro* koşullarda gelişen klinik direnç açısından önemi bilinmemektedir (Lee ve ark., 2010; Pallo-Zimmerman ve ark., 2010; Venglovsky ve ark., 2009; Yue ve ark., 2008). Fakat bazı bakteriofajların farklı türlere ait bakterilerden oluşan geniş konak yelpazesine sahip olmaları transdüksiyonun antimikrobiyal direnç genlerinin yaygınlaşmasında önemli potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir (EMA, 1998; Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011).

2.9. Çapraz Direnç

Bir antimikrobiyale karşı dirençli hale gelen bir mikroorganizma türünde bu antimikrobiyal ajana yapıca veya etki tarzı bakımından yakın diğer antimikrobilyallere karşı da direnç gelişebilir. Bu çapraz direnç (Cross Resistance) olarak adlandırılır. Çapraz direnç genellikle eritromisin ve diğer makrolitler gibi yapıları benzer antimikrobilyaller arasında gözlenirse de eritromisin ve linkomisin gibi yapıları birbirinden oldukça farklı antimikrobilyaller arasında da çapraz direnç gözlenebilir (EMA, 1998; Lee

ve ark., 2010; Pallo-Zimmerman ve ark., 2010; Venglovsky ve ark., 2009; Yue ve ark., 2008).

2.10. Çoklu İlaç Direnci

Bir mikroorganizmanın yapısı ve etkisi farklı birçok antimikrobiyale karşı direnç geliştirmesi çoklu ilaç direnci (MDR) olarak tanımlanır. Bu kavram, yaygın ilaç dirençli (Extensively-Drug Resistant: XDR), tam ilaç dirençli (Pandrug-resistant: PDR) ve çoklu ilaç dirençli gibi birçok tanımı kapsar. Olası karışıklıkları önlemek için Avrupa Hastalık kontrol ve Koruma Merkezi (European Centre for Disease Control and prevention: ECDC) ve Amerike Birleşik Devletleri Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention: CDC)'nin ortak çalışmaları ile uluslararası terminoloji oluşturulmuştur. Bu terminolojiye göre yaygın ilaç dirençli, tüm antimikrobiyal gruplarından her gruba ait iki ya da daha az antimikrobiyal ajana dirençlilik olarak tanımlanır. Tam ilaç dirençli, tüm antimikrobiyal kategorileri içindeki tüm üyelere dirençlilik; çoklu ilaç dirençli, üç veya daha fazla farklı gruba ait antimikrobiyal ajana direnç olarak tanımlanmıştır (Magiorakos ve ark., 2012). Çoklu antibiyotik lokusu (*mar*) tarafından düzenlenen MDR, bakterilerin membran proteinlerindeki yapısal değişime bağlı olarak ilacın hücre içi birikiminin azalması ile karakterizedir (Robicsek ve ark., 2006). Gram negatif bakterilerde MDR, direnç nodülasyon bölümünün (resistance nodulation division: RND) geri çıkartım pompasının 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 (WHO, 2014).

2.11. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

Dirençli mikroorganizmalar antimikrobiyallerin inhibitör etkinliğinden bileşiğin hedef bölgeye ulaşmasını engelleyerek, hedef yapıyı değiştirerek, hedef bölgeyi koruyarak ve bileşiğin yapısını değiştirerek korunurlar (Blair ve ark., 2015).

Antimikrobiyal ajanların bakteri hücrelerinde hedef yapılarına ulaşmasının engellenmesi, hücre zarının geçirgenliğinin azalması ve hücre içine giren antimikrobiyalın atım pompası (efflux) aracılığıyla uzaklaştırılması sonucu gerçekleşir. Hedef yapı, mutasyon ve molekülün koruyucu yapılarla değiştirilmesi sayesinde korunur. Antimikrobiyal yapısı ise enzimatik inaktivasyon veya modifikasyonla değiştirilebilir (Giguere ve ark., 2013).

2.11.1 Antimikrobiallerin Hedefine Ulaşmasını Engellenmesi

Antimikrobiallerin bakteri hücresi içerisindeki hedeflerine ulaşmalarının engellenmesi hücre zarının antimikrobiyal ajana geçirgenliğinin azalması ve antimikrobiyal ajanların hücreden geri çıkartılması ile gerçekleşir.

2.11.1.1. Hücre Zarının Geçirgenliğinin Azalması

Gram negatif bakteriler hücre zarlarının dış katmanının seçici olması nedeniyle Gram pozitif bakterilere göre birçok antimikrobiale daha az geçirgendirler. Hidrofilik antimikrobialler hücre zarının porin proteinlerine bağlanarak geçerler. *Enterobacteraceae* familyasında bulunan başlıca porin proteinleri (OmpF ve OmpC) seçici değildir. Bakteriler seçici olmayan porin proteinlerinin sayısını azaltarak veya seçici proteinlerle değiştirerek hücre geçirgenliğini azaltabilir. Bu mekanizma *Enterobacteraceae* familyasında karbapenem ve sefalosporinlere karşı gelişen direnç mekanizmalarından biridir (Tamber ve Hancock, 2003; Blair ve ark., 2015).

2.11.1.2. Antimikrobiyalın Geri Çıkartılması

Enterobacteriaceae bakterileri için MDR'dan sorumlu olan ve birçok antimikrobiyalın hücre dışına atılımından sorumlu olan atım pompası *AcrAB-TolC*'den farklı olarak bazı atım pompaları daha spesifiktir. Örneğin *oqxA* ve *oqxB* ile *qepA1* ve *qepA2* genleri hidrofilik florokinolonların hücre dışına çıkartılmasını sağlar (Strahilevitz ve ark., 2009; Yamane ve ark., 2009). Genellikle atım pompalarının aktiviteleri

kromozom ve plazmid genleri aracılığıyla düzenlenir. Bu durum antimikrobiyal direncin yaygınlaşması açısından önemlidir. (Blair ve ark., 2015)

2.11.2. Hedef Yapının Korunması

Antimikrobiyallerin bakteri hücresi içerisindeki hedef yapılarının değiştirilmesi kromozomal mutasyonlar sonucu hedef yapının moleküler özelliklerinin değişmesi ve hedef yapıya koruyucu proteinlerin eklenmesi ile gerçekleşir.

2.11.2.1. Mutasyon

Birçok antimikrobiyal bakterideki hedef yapısına spesifik olarak bağlanarak bu yapıların normal aktivitelerini engeller. Hedef yapıların moleküler olarak değişmesini sağlayan mutasyonlar antimikrobiyallerin bu yapılarla bağlanmasını önler. Böylece hedef yapı normal aktivitesini sürdürür. Kinolon direnci belirleyici bölge (Quinolone resistance determining region: QRDR) mutasyonları bu tip dirence örnek olarak gösterilebilir. Mutasyonların lokalizasyonu DNA giraz enzimini kodlayan *gyrA* ve *gyrB* genleri ile topoizomeraz IV enzimini kodlayan *parC* ve *parE* genleridir. Oluşan mutasyon sonucu DNA giraz ve topoizomeraz enziminin moleküler yapısı değişir ve bakteri florokinolonların inhibisyonundan korunmuş olur (Bast ve ark., 2010; Blair ve ark., 2015; Cattoir ve ark., 2010; Jang ve ark., 2010; Hopkins ve ark., 2005; Martinez ve ark., 1998; Martinez ve ark., 2011).

2.11.2.2. Hedef Molekülün Koruyucu Yapılar ile Değiştirilmesi

Antimikrobiyallerin hedef yapıları koruyucu moleküllerin bu yapılarla bağlanması ile de değiştirilebilir. Aktarılabılır florokinolon direncinden sorumlu Qnr proteinleri DNA giraz ve topoizomeraz enzimlerine bağlanarak moleküler yapıda değişikliğe neden olur. Bu değişiklik sonucunda florokinolonların DNA giraz enziminine bağlanması engellenir ve böylece DNA giraz ile topoizomeraz IV enzimleri florokinolonların inhibisyonundan korunmuş olur (Blair ve ark., 2015; Veldman ve ark., 2011).

2.11.3. Antimikrobiyallerin Yapılarının Değiştirilmesi

Antimikrobiyallerin yapıları bakteriler tarafından salgılanan enzimler aracılığı ile değiştirilebilir. Bu olay enzimatik inaktivasyon veya enzimatik modifikasyon ile gerçekleşir.

2.11.3.1. Enzimatik İnaktivasyon

Antimikrobiyallerin enzimatik inaktivasyonu moleküler yapılarının hidroliz yolu ile ayrıştırılması sonucu gerçekleşir. Günümüzde β -laktam, aminoglikozit, fenikol ve makrolid grubu antimikrobiyalleri inaktive eden birçok enzim tanımlanmıştır. Ayrıca aynı gruba ait farklı antimikrobiyalleri parçalayan izozimler de mevcuttur. Bu duruma β -laktam grubu antimikrobiyallerin yapılarındaki laktam halkasını ayrıştıran β -laktamaz grubu enzimler örnek olarak verilebilir (Blair ve ark., 2015)

2.11.3.2. Enzimatik Modifikasyon

Bakteriler antimikrobiyallerin moleküler yapılarına asetil, fosfat ve açıl gibi kimyasal grupları ekleyerek hedeflerine bağlanmalarını önleyen birçok enzime sahiptir. *aac(6')-Ib-cr* geni tarafından kodlanan aminoglikozit asetil transferaz enzimi aminoglikozitlerin yanı sıra siprofloksasin ve norfloksasin gibi hidrofilik florokinolonları da asetilleyerek aktivitelerini azaltır (Blair ve ark., 2015; Cavaco ve ark., 2008; Cattoir ve ark., 2008; Park ve ark., 2010;)

2.12. Florokinolon Direnci

Son yıllarda hızla yaygınlaşan ve halk sağlığı açısından risk yaratan önemli sorunlardan biri florokinolon direncidir. EMA kinolon direncinin önlenebileceği öngörüsüyle kinolonların diğer antimikrobiyal ajanlarla tedavi edilemeyen enfeksiyonlarda kullanılmasını önermektedir (EMA, 2006). Amerika Birleşik Devletlerinde ise florokinolonların besin değeri olan kanatlı hayvanlarda kullanılması

yasaklanmıştır (Nelson ve ark., 2007). Florokinolon direnci başlıca MDR kaynaklı, kromozomal ve plazmidal olmak üzere üç ana başlık altında incelenebilir.

2.12.1. MDR Kaynaklı Florokinolon Direnci

Florokinolonlara spesifik olmayan bu direnç tipi MDR'ı kodlayan genlerin ekspresyon oranlarının değişmesi veya mutasyonu sonucu oluşur. Buna bağlı olarak florokinolonların bakteri hücrelerine alınmaları engellenir veya hücre içine girmiş olan florokinolonlar geri çıkartılır (EMA, 1998)

2.12.2. Kromozomal Florokinolon Direnci

Kromozomal kinolon direnci florokinolonların hedef yapısı olan topoizomeraz II (DNA giraz) ve topoizomeraz IV enzimlerini kodlayan bölgelerde oluşan mutasyonlar sonucu gelişir. Topoizomeraz II enzimi *gyrA* ve *gyrB* genleri, topoizomeraz IV enzimi ise *parC* ve *parE* genleri tarafından kodlanır. Genetik yapı bakımından *gyrA* geni *parC* geni ile *gyrB* geni ise *parE* geni ile benzer özellikler taşır (Hooper, 2002). Gram negatif bakterilerde mutasyonlar ilk olarak *gyrA*, Gram pozitif bakterilerde ise *parC* geninde oluşur (Jacoby, 2005). Kromozomal kinolon direnci karakteristik olarak *de novo* direnç özelliği gösterir.

Gram negatif bakterilerde QRDR *gyrA* geninin 67. ve 106. kodonları, *gyrB* geninin ise 426. ve 447. kodonları arasında yer alır. Bu genlerde oluşan mutasyonlar *gyrA* geni için sıklıkla 83. ve 87. kodonlarda, *gyrB* geni için 426. ve 447. kodonlarda oluşur. Gram pozitif bakterilerde QRDR *parC* geninin 56. ve 108. kodonları, *parE* geninin ise 416. ve 529. kodonları arasındadır.(Jacoby., 2005) Bu bölgedeki *parC* geni mutasyonları 80. ve 84. kodonda gözlenir (Bast ve ark., 2010; Cattoir ve ark., 2010; Hopkins ve ark., 2005; Jang ve ark., 2010; Martinez ve ark., 1998; Martinez ve ark., 2011). *parE* geninde birçok mutasyon oluşabilmesine rağmen bu mutasyonların klinik önemi henüz belirlenememiştir. *parE* geni mutasyonları florokinolon duyarlılığını tek başlarına değiştirmez (Poole, 2005).

2.12.3. Plazmid Aracılı Kinolon Direnci

Plazmid aracılı kinolon direnci, florokinolonlara spesifik atım pompalarından sorumlu *qepA* (1 ve 2) ve *oqx* (A ve B), hedef yapıların koruyucu moleküller ile değiştirilmesinden sorumlu *qnr* genleri ve florokinolonların enzimatik modifikasyonunu sağlayan *aac (6')-Ib-cr* geni tarafından kodlanır (Wong ve ark., 2014).

2.13. Florokinolonlara Spesifik Geri Çıkartım Pompaları

Florokinolonlara spesifik olarak tanımlanan geri çıkartım pompaları *qepA* (1 ve 2) ve *oqx* (A ve B) geri çıkartım pompalarıdır.

2.13.1. *qepA* (1 ve 2)

qepA geni *E. coli*'de pHPA plazmidi üzerinde 2002 yılında Yamane ve arkadaşları (2007) tarafından Japonya'da tespit edilmiştir (Strahilevitz ve ark., 2009, Yamane ve ark., 2007). *qepA* geni 511 amino asitten oluşan 14 transmembran segmentine sahip atım pompasını kodlar. Filogenetik analizler *qepA* geninin *Actinomycetales* familyasına ait olduğunu göstermiştir (Yamane ve ark., 2007). 2008 yılında Fransa'da Cattoir ve arkadaşları tarafından *qepA* geninin iki amino asit değişimine sahip olan bir varyantını daha tanımlanmıştır ve bu varyant *qepA2* olarak adlandırılmıştır (Cattoir ve ark., 2008). *qepA* genleri florokinolonların yanı sıra eritromisin, akriflavin ve etidiyum bromidin de hücre dışına çıkartılmasından sorumludur. *qepA* geni coğrafik olarak yaygındır ve hayvan izolatlarında daha sık rastlanır (Strahilevitz ve ark., 2009).

2.13.2. *oqx* (A ve B)

oqxAB geni RND atım pompaları grubunda yer alır ve ilk olarak *E. coli*'de pOLA52 plazmidinde tanımlanmıştır. Nalidiksik asit ve siprofloksasinin geri çıkartımından sorumludur. İnsan ve hayvan izolatlarında bulunabilir. *oqxAB*

florokinolonların yanı sıra kloramfenikole karşı da direnç kodlar (Strahilevitz ve ark., 2009).

2.14. Hedef Yapıların Qnr Proteinleri Tarafından Değiştirilmesi

qnr genleri tarafından kodlanan QNR proteinleri florokinolonların hedef yapıları olan GyrA ve Topoizomeraz IV enzimlerine bağlanarak bu enzimlerin moleküler yapılarını değiştirir.

2.14.1. *qnr* Genleri

qnr genleri ilk kez 1998 yılında Martinez ve arkadaşları tarafından *Klebsiella pneumonia*'da pMG252 plazmidi üzerinde tespit edilmiştir (Martinez ve ark., 1998). Qnr proteinleri topoizomeraz enzimlerine bağlanarak enzimin moleküler yapısında değişime neden olan proteinleri kodlar. Bu değişimin sonucunda florokinolonların DNA giraz enzimine bağlanması engellenir ve böylece DNA giraz enzimi florokinolonların inhibisyonundan korunmuş olur (Veldman ve ark., 2011). *qnr* genleri varlığında, dış membran proteinlerinin sayısı, florokinolonların hücre içi birikimi ve etkinliği değişmeyip, sadece *gyrA* mutasyonlarının etki potansiyeli arttığı bildirilmiştir (Tran ve Jacoby, 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalar Qnr proteinlerinin topoizomeraz enzimine bağlanan florokinolonların enzimden ayrılmasını sağladığını göstermiştir (Strahilevitz, 2009). Böylece serbest kalan enzimler normal aktivitelerini sürdürür (Blair ve ark., 2015). Ayrıca *qnr* proteinleri topoizomeraz enzimlerini 2-piridon ABT-719, kuinazolin - 2,4-dion PD 0305970 ve spiropirimidintirion gibi topoizomeraz inhibitörü olarak görev yapan diğer sentetik ve doğal bileşiklere karşı korur (Jacoby., 2005). Bugüne kadar *qnrA* geninin 7, *qnrB* geninin 54, *qnrS* geninin 4, *qnrVC* geninin 10, *qnrC* ve *qnrD* geninin ise birer varyantı tanımlanmıştır (Ruiz ve Levy, 2014). *qnr* grupları yapısal olarak birbirlerinden en az % 30 farklılık gösterir. Bu grup genlerin kromozomlarda yer alan *qnr* benzeri genlerden köken aldığı düşünülmektedir. Ayrıca birçok mikroorganizmada kromozomal *qnr* genleri de tanımlanmıştır (Ruiz ve Levy., 2014; Strahilevitz ve ark., 2009).

2.15. Florokinolonların Enzimatik Modifikasyonunu

Günümüze kadar florokinolonlara bağlanarak yapılarını değiştirebilen sadece bir enzim tanımlanmıştır ve bu enzim aminoglikozid asetil transferaz enzimidir.

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

aac(6')-Ib-cr geni aminoglikozid asetil transferaz enzimini kodlayan *aac(6')-Ib* geninin bilinen 30 varyantından biridir. Aminoglikozid asetil transferaz enzimi, aminoglikozitleri asetilleyerek inaktive eder. Bu gen birçok integron ve plazmid üzerinde bulunabilir. IncF11 bu plazmidlerin en önemlilerinden biridir. IncF11 plazmidi geniş spektrumlu β -laktam direncinden sorumludur, yüksek prevalansa sahiptir ve coğrafik olarak yaygındır. *-cr* varyantı *aac (6')-Ib* den farklı olarak Trp-102 \rightarrow Arg ve Asp-179 \rightarrow Tyr kodonlarında farklı mutasyonlara sahiptir. *aac (6')-Ib-cr* varyantı tarafından kodlanan aminoglikozid asetil transferaz enzimi aminoglikozitlerin yanı sıra siprofloksasin ve norfloksasin gibi florokinolonları da asetilleyerek aktivitelerini azaltır (Strahilevitz ve ark., 2009). *aac (6')-Ib-cr* geni *qepA*, *qnr* genleri (A1, B2, B4, B6, B10, S1, S2) ve birçok β -laktamaz geni (CTX-M15, CTX-M-1, CTX-M-14 CTX-M-24 DHA-1, SHV-12 ve KPC-2) ile aynı plazmid üzerinde bulunabildiği için MDR açısından önemlidir. (Cavaco ve ark., 2008; Cattoir ve ark., Park ve ark., 2010; Herrera-Leon ve ark., 2010).

Florokinolon direnci ile ilgili yapılan araştırmalar kromozomal, plazmidal veya MDR kaynaklı florokinolon direnci MİK'u 500 kata kadar arttırabilir ve bu artış klinik *E. coli* izolatlarının % 50-70'inde tanımlanabilmiştir. Bu fenomen bilinmeyen florokinolon direnç mekanizmalarının var olabileceğini gösterir (Dalhoff, 2012).

2.16. Çevre

Çevre, antimikrobiyal direncin yaygınlaşmasında antimikrobiyal direnç genlerinin bir rezervuarı olarak önemli role sahiptir. Genetik reaktörlerin ilki (I) insan ve hayvan mikrobiyal topluluğu tarafından oluşturulur ve antibiyotiğe duyarlı 500'den fazla

bakteri türünü içerir. İkinci reaktör (II), uzun süreli tedavilerin uygulandığı hastane ve hayvan yaşam alanları ile bakteri temasına maruz kalan duyarlı bireylerin bulunduğu diğer alanları kapsar. Üçüncü reaktör (III), atık su, bakterilerin genetik olarak etkileşebilecekleri hayvansal gübre depoları, arıtma üniteleri veya tuvalet kompostları gibi ikincil reaktörlerden köken alan biyolojik herhangi bir kalıntıdır. Dördüncü reaktör (IV) ise çevredeki organizmalarla etkileşebilen ve diğer reaktörlerden gelen bakterileri içeren toprak, yüzey ve zemin sularındır (Baquero ve ark., 2008). *E. coli* çevreden edindiği antimikrobiyal direnç genlerini farklı ekosistemlerdeki potansiyel patojenlere aktarabilir (Hou ve ark., 2012). Dr. Richard Heal ve Dr. Alan Parsons'un 2002 yılında yaptığı bir araştırmada fiziksel olarak birbirinden ayrı gelişen *E. coli* kolonilerinin hava yolu ile antimikrobiyal direnci aktarabildiği gösterilmiştir. Koloniler arasındaki hava boşluğu kapatıldığında direnç aktarımının gerçekleşmediği gözlenmiştir (Heal ve Parsons., 2002).

Antimikrobiyaller ve antimikrobiyal direnç genleri çevrede yaygın olarak bulunur ve çeşitli etkenler ile hareket edebilir. Bu etkenlerden ilki rüzgar ve su hareketliliği gibi fiziksel faktörlerdir. Deniz ve nehir sularından dirençli bakteriler izole edilebilmektedir. Toprak gibi haraketsiz olarak nitelendirilen çevrelerin doğa olaylarıyla hareketliliği sonucu bakteriler ve antimikrobiyal direnç genleri kıtalar arasında taşınabilir. Bu duruma çöl tozları ile bakterilerin taşınması örnek olarak gösterilebilir (Gandara ve ark., 2006; Rosas ve ark., 2006). İkinci faktör vahşi hayvan hareketleridir. İngiltere'de fareler ve kurtlardan izole edilmiş bakterilerin % 90'ının β -laktamlara dirençli olduğu rapor edilmiştir. Göçmen kuşların antimikrobiyallere karşı dirençli bakterileri ve direnç genlerini uzak mesafelerdeki habitatlara transfer ettiği belirlenmiştir (Cole ve ark., 2005). Üçüncü faktör ise insan hareketleridir. β -laktam direncini kodlayan *ndm1* geni insan hareketi ile İsveç'e taşınmıştır (Yong ve ark., 2009). Ayrıca insan yaşam alanları çevresinde meydana gelen doğa olayları ve hayvan hareketlerinin antimikrobiyal direnç etmenlerinin yayılmasını hızlandırdığı bildirilmiştir (Allen ve ark., 2010)

2.17. Antimikrobiyal Direnci Önleme Stratejileri

Antimikrobiyaller insan ve hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için gereklidir. Bu nedenle antimikrobiyallerin etkinlikleri korunmalıdır (Allen ve ark.,2010). Antimikrobiyallerin yaygın kullanımı, özensiz seçimi ve çevresel kirliliğin bakteriler üzerinde oluşturduğu seçici etki bakterinin genetik yapısında değişikliklere neden olur ve direnç gelişebilir (Venglovsky ve ark., 2008; Yu ve ark., 2009). Direncin diğer bakterilere aktarmasıyla sorun büyür. Dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların görülme sıklığı artar, zaman, maliyet ve işgücü kaybına neden olur. Ayrıca hospitalizasyon oranı ve süresi, morbidite ve mortalite de artış gözlenir (Finch ve ark., 2004; Kollef, 2003; WHO 2014) Antimikrobiyal direncin 2050 yılında en önemli ölüm nedeni olacağı öngörülmektedir (O'neil 2015, WHO 2014). 2050 yılında antimikrobiyal direnç ilişkili tahmini ölüm oranları ve kıtalara göre dağılımı şekil 10 ve 11 'de gösterilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization: WHO), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (World Organization for Animal Health: OIE) ve Amerikan Gıda ve Tarım Organizasyonu'nun (Food and Agriculture Organization: FAO) ortak çalışma grubu veteriner ve beşeri hekimlikte direncin gelişmesini önlemek amacıyla global aksiyon planı hazırlamıştır.

Bu plana göre gerçekleştirilmesi amaçlanan hedefler:

1. Antimikrobiyal direnç konusunda etkili iletişim ve eğitim programları ile profesyonel düzeyde farkındalık yaratmak,
2. Antimikrobiyal direnç konusundaki kanıt niteliğindeki bilimsel verileri izleme programları ve bilimsel araştırmalar ile güçlendirmek ve geliştirmek,
3. Etkili sanitasyon, hijyen, biyogüvenlik ve enfeksiyon kontrol programları oluşturarak enfeksiyon insidansını düşürmek,
4. Beşeri ve veteriner alanda antimikrobiyal kullanımını optimize etmek ve izlemek,

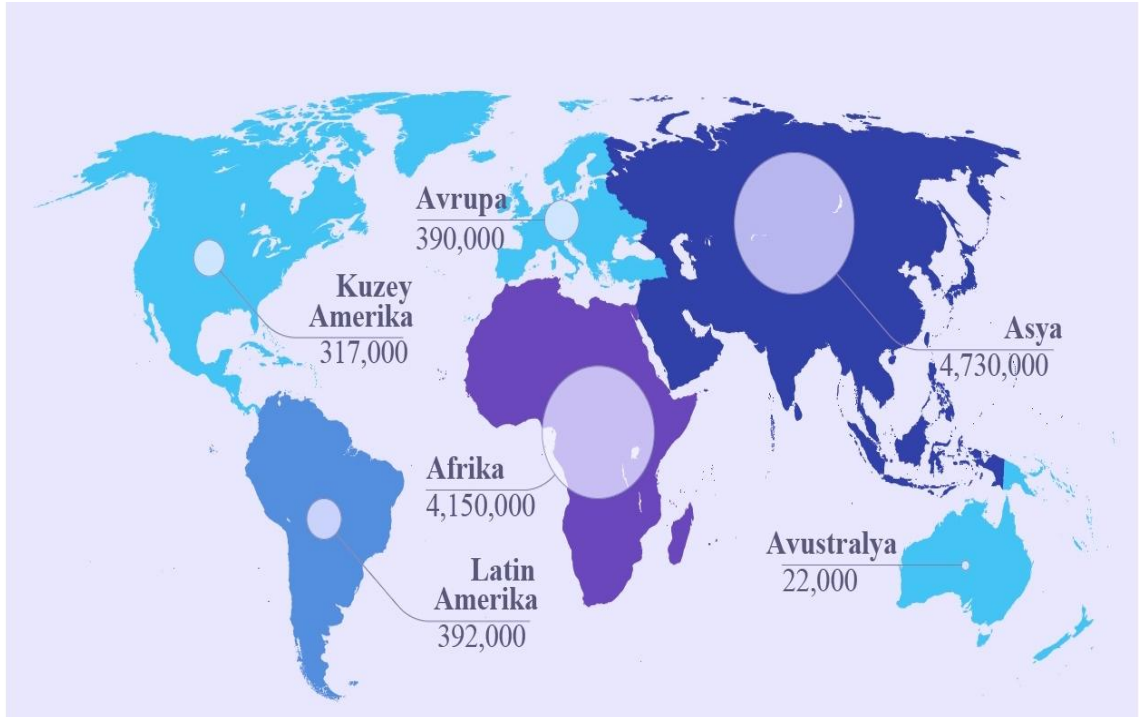
5. Tüm ülkelerde yeni antimikrobiyal ajanların, antimikrobiyal direnç belirleme metodlarının, aşı ve diğer önlemlerin geliştirilebilmesi için sürdürülebilir yatırım kaynakları oluşturmaktır.

WHO ve EMA etkin antimikrobiyal kemoterapi ve direncin önlenmesi için direncin tanımlanması ve izlenmesini önerir (Dalhoff ve Schmitz 2003). Avrupa'da European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals (EASSA) ve European Food Safety Authority (EFSA) hayvansal kökenli patojenlerde direncin izlenmesini amaçlayan programlardır. EFSA, besin değeri olan hayvanlar ve hayvansal besinlerde antimikrobiyal direncin izlenmesine odaklanır. Ayrıca FDA ve WHO çerçevesinde antimikrobiyal direnci izlemek amacıyla GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System) ve TATFAR (The Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance) gibi birçok izleme programı uygulanmaktadır (O'Neil., 2014)

Antimikrobiyal kullanımının kısıtlanması da direnç riskinin azalmasını sağlayabilir (Shallcross ve Davies, 2014).



Şekil 10: 2050 yılı için tahmini antimikrobiyal direnç kaynaklı ölüm oranları (O'Neil 2014)



Şekil 11: 2050 yılı için tahmin edilen antimikrobiyal direnç kaynaklı ölüm oranlarının kıtalara göre dağılımı (O'Neil, 2014)

2.18. Antimikrobiyal Direncin İzlenmesi

Antimikrobiyal direnç, fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak tanımlanabilir. Fenotipik yöntem, *in vitro* koşullarda antimikrobiyalin bakteri gelişimi üzerindeki etkisi izlenerek duyarlılığın belirlenmesi temeline dayanır. Elde edilen sonuçlar, klinik antimikrobiyal duyarlılık sınır değerleri ile karşılaştırılır ve bakteri duyarlı (susceptible: S), orta derecede duyarlı (intermediate: I) veya dirençli (resistant: R) olarak sınıflandırılır (Lee ve ark., 2013). Bakteri duyarlılığını tanımlamak amacıyla en yaygın olarak broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılır (CLSI). Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde rutin olarak kullanılan kontrol suşları *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Haemophilus influenzae* NCTC 8468, *Haemophilus influenzae* ATCC 49766, *Campylobacter jejuni* ATCC 33560'dır.

2.18.1. Fenotipik Yöntemler

Fenotipik yöntemler, bakterilerin spesifik antimikrobiyal direnç özelliklerini tanımlamak için kullanılır. Moleküler yöntemlere göre daha ucuz ve pratik olmaları ve antimikrobiyal direnç özelliklerini kantitatif olarak tanımlamaları nedeniyle sıklıkla tercih edilen yöntemlerdir (Chao, 2013). Bu yöntemlerden sıklıkla kullanılanlar disk difüzyon, gradient difüzyon, agar dilüsyon, broth mikrodilüsyon, MÖK, MF, MSA ve zamana bağlı doz-yanıt deneyleridir.

2.18.1.1. Disk Difüzyon (EUCAST v 5.0, 2015)

En eski ve rutin olarak yaygın kullanılan antimikrobiyal duyarlılık testlerinden biridir. Disk difüzyon yönteminde MH (Mueller Hinton) agar kullanılır ve 9 cm'lik steril petrilere yaklaşık 25 ml agar eklenir. Bakteri kültürü 0.5 McFarland'a eşit bulanıklığa ayarlanır. Hazırlanan inokülümün 15 dakika içinde kullanılması gerekir. İnokülüm agar plakanın tüm yüzeyine yayılır ve antimikrobiyal diskleri 15 dakika içinde yerleştirilir.

Genel olarak 9 cm'lik bir agar plakaya 6 adet disk yerleştirilebilir. Disklerin yerleştirilmesinden sonra agar plakalar ters çevrilir ve 15 dakika içinde 35±1 °C'de 16-20 saat inkübe edilir. Değerlendirme için, agar plakalarda oluşan zon sınırları 30 cm'lik göz mesafesinden görülebilmelidir. Zon çapları ölçülür ve antimikrobiyal duyarlılık sınır değerlerine göre sınıflandırılır.

2.18.1.2. Gradient Difüzyon

Gradient difüzyon yönteminde agar besi yerinde antimikrobiyal konsantrasyon gradienti kullanılır. E testi[®] (bioMerieux AB BIODISK) gradient difüzyon yönteminin ticari versiyonudur ve alt tarafına antimikrobiyal konsantrasyon gradienti emdirilmiş ve üst tarafında konsantrasyon skalası bulunan plastik test striplerinden oluşur. Genellikle 15 cm'lik agar plaka yüzeyine 5-6 adet strip yerleştirilebilir. MİK, oluşan eliptik zonun alt sınırı olarak belirlenir (Jorgensen ve Ferraro, 2009).

2.18.1.3. Agar Dilüsyon (EUCAST E.Def. 3.1, 2000)

MH agar kullanılarak gerçekleştirilen agar dilüsyon yönteminde genellikle 9 cm çap ölçülerine sahip steril petriler kullanılır. Petrilere 20 ml agar konulur ve her 20 ml agar antimikrobiyal dilüsyon serisinden 1 ml içerir. Bakteri kültürü 0.5 McFarland'a eşit bulanıklığa ayarlanır. Bakteri süspansiyonu agar plakalara aktarılır ve agar plakalar inkübasyondan önce kurumaları için oda sıcaklığında bekletilir. Agar plakalar 35-37 °C 18 saat inkübe edilir ve MİK gözle görülebilir üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon olarak kaydedilir.

2.18.1.4. Broth Dilüsyon (EUCAST E.Dis 5.1, 2003)

Broth mikrodilüsyon, 500 µl ve daha düşük kapasiteli mikro dilüsyon plakalarında geometrik olarak artan konsantrasyonda antimikrobiyal içeren eşit miktardaki broth'a belirli sayıda bakteri inoküle edilerek uygulanan bir tekniktir. Bakteriler genellikle Mueller-Hinton Broth'a (MHB) inoküle edilir ve 35-37 °C'de 16-20 saat inkübe edilir. Bakteri kültürü, PBS (Phosphate Saline Buffer: PBS) veya broth

kullanılarak 0.5 McFarland'a eşit bulanıklığa ayarlanır. Bunun amacı testin tekrarlanabilirliği için önemli olan inokulum yoğunluğunu standardize etmektir. Broth dilüsyon yönteminde saf toz haldeki antimikrobialler kullanılır. Stok solüsyonun konsantrasyonu 1 mg/ml veya daha fazla olmalıdır. Gerekli hallerde stok solüsyon membran filtrasyonu ile sterilize edilir. Antimikrobiyal ve mikroorganizmaya bağlı olarak antimikrobiyalin test edilecek dilüsyonları oluşturulur. Eşit miktardaki bakteri süspansiyonu ile antimikrobiyal solüsyon mikro plakaya konulur ve 35-37 °C'de 16-20 saat inkübe edilir. MİK bakteri üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon olarak kaydedilir.

2.18.1.5. Mutant Önleyici Konsantrasyon Testi

Yüksek bakteri yoğunluğunun bulunduğu bir ortamda mutant alt-popülasyonların ortaya çıkma olasılığını belirlemek amacıyla uygulanır. Test edilecek bakteri suşu 100-500 ml sıvı broth'a inoküle edilir ve 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilir. Broth kültür santrifüjlenir, pelet yeniden taze broth'la çözdürülür ve antimikrobiyal içeren agar plakalara inoküle edilir. Agar plakalar 24 ve 48 saat sonra değerlendirilir ve üremeyi önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu MÖK olarak kaydedilir (Blondeau, 2009).

2.18.1.6. Mutant Frekansı

MİK ve MÖK'ün testlerinden sonra ilgili antimikrobiyal ajanın mutant oluşumunu önleme potansiyelini belirlemek amacıyla MF belirlenir. MF antimikrobiyal ajanın MÖK'ten daha düşük konsantrasyonda kullanılması halinde oluşmasına izin verdiği mutant bakteri sayısının antimikrobiyal uygulanan bakteri popülasyonundaki toplam bakteri sayısına oranı ile hesaplanır.

2.18.1.7. Mutant Seçim Penceresi

Antimikrobiyalin belirli bir mikroorganizmaya karşı MİK ve MÖK değerleri arasında kalan konsantrasyonu olarak tanımlanır. Etkin bir kemoterapi oluşturmak ve dirençli mutantların oluşma riskini minimuma indirmek için kemoterapi süresince

antimikrobiyal konsantrasyonunun MSP sınırları üzerinde tutulması hedeflenmelidir (Drilica ve Xilin., 2007).

Yukarıda açıklanan yöntemlerle fenotipik olarak belirlenen direncin oluşumundan sorumlu olan genetik etmenlerin ve bu etmenlerin direnç üzerindeki etkisinin saptanması, direnç ilişkili mutant ve gen varyantların tanımlanması ile ekspresyon oranlarının belirlenmesi için moleküler teknikler kullanılır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler konvensiyonel ve eş zamanlı PCR (Polymerase Chain Reaction: PCR), dizi analizi, klonlama ve transformasyon deneyleridir.

2.18.2. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler, antimikrobiyal direncin oluşumundan sorumlu olan genetik yapıları, mekanizmaları ve direnç genlerinin ekspresyon oranlarını tanımlamak amacıyla kullanılan yüksek seçiciliğe sahip yöntemlerdir. Antimikrobiyal direncin varlığını hızlı ve doğru olarak tanımlaya olanak sağlar, En sık kullanılan moleküler yöntemler PCR, dizi analizi ve moleküler klonlamadır.

2.18.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)

PCR, spesifik DNA fragmanlarının eksponansiyel olarak çoğaltılmasını sağlayan siklus tekrarları esasına göre gerçekleşen bir reaksiyondur. PCR’da kullanılan primerler belirli diziler için özel olarak sentezlendiği için hassas ve özgün bir tekniktir (Aarts ve ark., 2001). PCR, florokinolon direnci genetik etmenlerinin belirlenmesi için de kullanılabilir.

2.18.2.2. Dizi Analizi

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

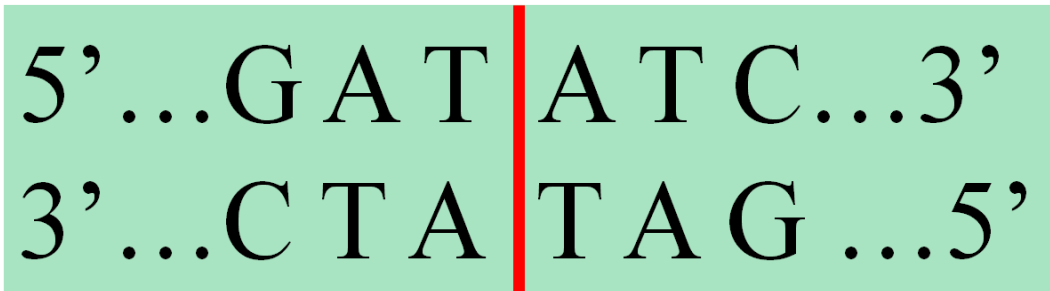
ile karşılaştırılarak analiz edilir. Karşılaştırma için yaygın kullanılan veri tabanlarından biri The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)'dir.

2.18.2.3. Klonlama ve Transformasyon

Moleküler klonlama, rekombinant DNA fragmanlarının türler arası aktarımından sorumlu genlerin etkilerini hedef organizmada izlenmesi işlemi olarak tanımlanır. PCR ve dizi analizi ile varyasyonları veya mutasyonları tanımlanmış olan direnç genlerinin ve kullanılan vektörün spesifik RE (Restriksiyon Endonükeaz: RE) enzimleri ile kesilmesi ve DNA ligaz enzimi aracılığı ile ticari veya doğal vektöre (plazmid) entegre edilmesi işlemidir.

Hazırlanan vektör termal şok veya elektrik akımıyla transforme edilir ve test edilen genlere sahip olmayan kontrol suşlarında oluşan duyarlılık değişimleri izlenir. Bu yöntem tanımlı genlerin hedef mikroorganizmanın duyarlılığı üzerindeki potansiyel etkisini belirlemeye de yardımcı olur.

RE enzimleri genetik materyalleri kesme karakteristiklerine göre 2 alt gruba ayrılır. Birinci grupta *EcoRV* gibi genetik materyalleri dikey olarak keserek simetrik parçalar oluşturan RE enzimleri yer alır (Şekil 12). Bu enzimler tarafından kesilmiş olan DNA parçaları vektöre ters bağlanabilir. DNA transkripsiyon yönü her zaman 3' → 5' yönüne doğru gerçekleştiği için ters bağlanmış bir gen fonksiyonunu kaybederek moleküler klonlama çalışmalarda hatalı sonuçlara neden olabilir.



Şekil 12: *EcoRV* restriksiyon endonükeaz enziminin DNA kesim şeması

İkinci grupta ise *HindIII* gibi DNA'yı diagonal olarak keserek asimetric parçalar oluşturan RE enzimleri yer alır (Şekil 13). Asimetric DNA parçaları yapı özellikleri nedeniyle vektörlere çok daha spesifik olarak bağlanır ve bu nedenle moleküler çalışmalarda sıklıkla tercih edilirler.

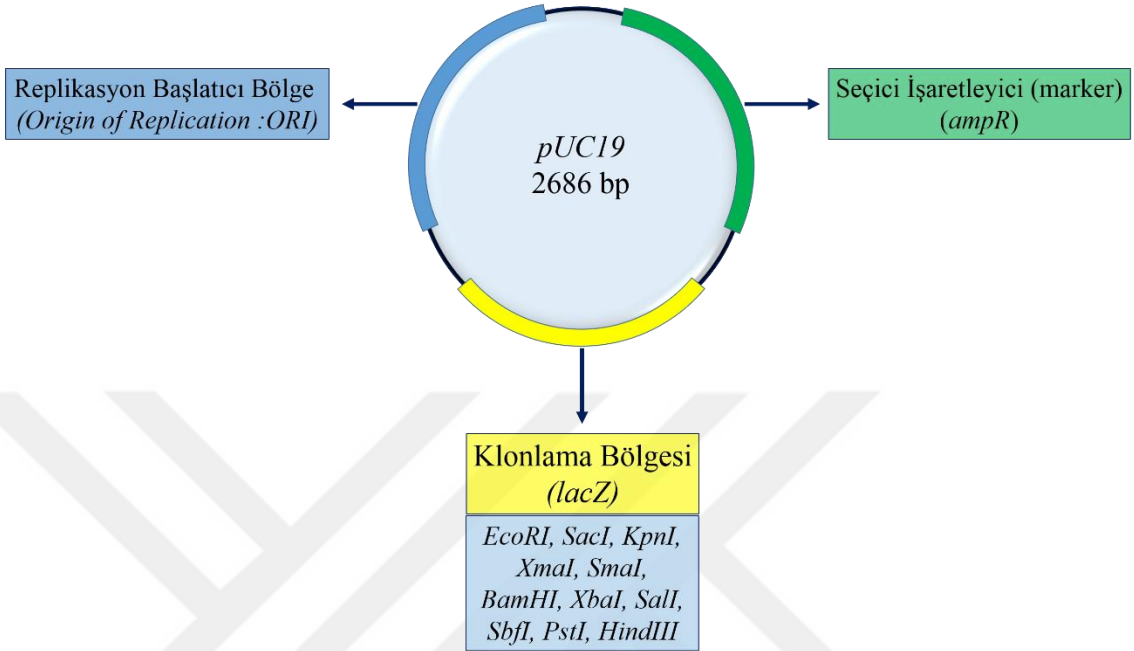


Şekil 13: *HindIII* restriksiyon endonükleaz enziminin DNA kesim şeması

Klonlama için doğal veya özel olarak oluşturulmuş ticari vektörler kullanılır. Ticari vektörler yapılarına ve fonksiyonlarına göre konjugatif, non-konjugatif, ekspresif ve non-ekspresif olarak sınıflandırılır. *Konjugatif vektörler* doğal eşey plazmidler baz alınarak oluşturulur ve konjugasyon yoluyla bakteriler arasında aktarılabilir. Bakteriler arasında aktarılamayan vektörler ise *non-konjugatif vektör* olarak adlandırılır. *Ekspresif vektörler* yapılarında bakteriler için tasarlanmış özel replikasyon bölgeleri taşır. Normal şartlarda test edilecek geni eksprese edemeyen bakteri suşları vektörün yapısı sayesinde ekspresif hale gelebilir. *Non-ekspresif vektörlerde* ise bakteriye özel replikasyon bölgeleri bulunmaz. Böylece ilgili genin ekspresyonu aktarıldığı bakterinin doğal şartlarda o geni eksprese edebilme özelliğine bağlıdır (Brosius, 1984; Kovach ve ark., 1995; Minton, 1984; Takeshita ve ark., 1987; Vieira, 1982.)

Klonlama çalışmalarında sıklıkla tercih edilen ticari vektörlerden biri *pUC19* vektörüdür. Bu vektörün yapısında replikasyon başlatıcı bölge (origin of replication: ori), seçici işaretleyici (selective marker) ve klonlama bölgesi bulunur. *pUC19* vektörü yaklaşık 2686 baz çiftinden oluşur. Replikasyon başlatıcı bölge potansiyel hedef mikroorganizmalarda replikasyonun başlaması için gerekli olan nükleotid dizilerini içerir. Ticari plazmidler hedef bakteri sayılarına göre birden fazla fonksiyonel dizi içeren replikasyon başlatıcı bölgeye sahip olabilirler. *pUC19* vektöründe seçici işaretleyici

bölgeyi *ampR* geni oluşturur. Bu genin görevi hedef bakteride ampisilin direnci oluşturarak bakteriye ampisilin içeren besi yerinde üreme kazandırmasıdır. Bu sayede *pUC19* plazmidi aktarılan bir bakteri ampisilinli besi yerinde çoğalırken plazmidin aktarılamadığı bakteriler elimine edilmiş olur. Direnç özelliği klonlamanın ilk kontrol basamağıdır. Klonlama ve transformasyon başarılı ise bakteri klonu hem test edilecek olan genin hem de işaretleyici genin kodladığı direnç özelliklerini taşır ve dirençli olunan antimikrobiyalın varlığında hücresel faaliyet gösterir. Son fonksiyonel bölge ise hedef gen veya genlerin yerleştirildiği klonlama bölgesidir. Klonlama bölgesi genellikle bakteri hücre ölümünü kodlayan veya hedef hücrede renk değişimine sebep olan bir genidir. Test edilecek gen klonlama bölgesindeki fonksiyonel gen içerisine yerleştirilir. Bu işlem sonrasında klonlama bölgesinde yer alan fonksiyonel genin bütünlüğü bozulduğu için fonksiyonunu kaybeder. Test edilecek genin başarılı bir şekilde klonlama bölgesine yerleştirilmesi halinde hücre ölümü tetiklenmez veya hücre renk değiştirmez. Klonlamanın başarısız olması halinde ise hücre ölümü gerçekleşir veya spesifik renk oluşumu gözlenir. Kısaca moleküler klonlamanın ikinci kontrol basamağı klonlama bölgesinde yer alan genin fonksiyonu baz alınarak gerçekleştirilir. *pUC19* plazmid vektörünün içerisinde yer alan klonlama bölgesi galaktozu parçalayan β -galaktosidaz enzimini kodlayan *lacZ* genidir. Plasmid tarafından β -galaktosidaz üretilip galaktoz hidroliz edildiğinde hücrelerin rengi kromatografik özelliklerinden dolayı maviye döner. Test edilecek gen *lacZ* geni içerisine yerleştirildiğinde enzim üretilmez ve renk değişimi gerçekleşmez. Böylece mavi renk oluşturmayan koloniler klonlamanın başarılı olarak gerçekleştiği bakteriler tarafından oluştururlar. *pUC19* vektörünün yapısı şekil 14'te gösterilmiştir. Moleküler klonlama işlemi sonunda yeniden izole edilen bakteriler de test edilen genin PCR amplifikasyonu ile tespit edilmesi ise klonlama işleminin üçüncü ve son kontrol basamağını oluşturur (Brosius, 1984; Kovach ve ark., 1995; Minton, 1984; Takeshita ve ark., 1987; Vieira, 1982).



Şekil 14: pUC 19 ticari vektörünün moleküler yapısı

Antimikrobiyal direncin yaygınlaşması ve dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı etkili tedavi araçlarının kısıtlı olması insan ve hayvan sağlığı için önemli bir sorundur. Direnç, hızlı/doğru bir tanımlama ve antimikrobiallerin optimize edilmiş dozlarıyla önlenabilir. Ancak doz optimizasyonu dirençli patojenlerin inhibisyonunu her zaman sağlamayabilir. Bu durumda yeni moleküllerin geliştirilmesi ihtiyacı doğar. Optimize doz veya kombinasyonların başarısı direnç fenotipi ve moleküler mekanizmasının karakterizasyonuna bağlıdır. Direnç fenotipinin karakterizasyonu için standart yöntemler bulunmasına rağmen, direncin kompleks mekanizmaları nedeniyle moleküler karakterizasyon yöntemleri değişkendir.

2.19. Farmakokinetik/Farmakodinamik (FK/FD) Araştırmalar

FK/FD araştırmalar antimikrobiyal ajanların patojenler üzerindeki etkilerini konsantrasyon ve zamana bağlı olarak *in vitro* ve *in vivo* olarak inceler. *In vitro* çalışmalarda, antimikrobiyalin etkileri mikroorganizmanın metabolizmasından bağımsız olarak incelenir. *In vivo* çalışmalarda ise antimikrobiyal, patojen ve konakçı arasındaki

karmaşık etkileşimle ilgili veri toplanabilir (Vaddady 2010). FK/FD parametreler, antimikrobiyal kemoterapi için en uygun ilaç seçiminin yapılması, en etkin doz rejiminin ve tedavi süresinin belirlenmesi, mevcut tedavi protokollerinin değerlendirilmesi ve revizyonu, antimikrobiyal direncin azaltılması ve yeni kombinasyonların geliştirilmesi amacıyla kullanılır. FK/FD veriler, minimum miktarda ilaç kullanarak patojen ajanın dirençli alt-populasyon oluşturmaya izin vermeden ortamdaki uzaklaştırmasını ve böylece kommensal bakterileri antimikrobiyal ilacın etkisine daha az maruz bırakıp direnç oluşumunu önlenmesini sağlar (McKellar ve ark., 2004; Petersen ve ark., 2006). Ayrıca fazla ilaç kullanılmasına bağlı oluşan istenmeyen etkilerin ortaya çıkması önlenir (Marcusson, 2005).

Bir antimikrobiyal ajanın FK/FD profili, belirli dozlarının zamana bağlı olarak bakteri gelişimi üzerindeki etkisi değerlendirilerek belirlenir. Direnç mekanizması bakterisidal aktiviteyi belirleyen önemli bir faktördür (Cengiz ve ark., 2013). Esas olarak FK/FD veriler, bileşiklerin farmakolojik etkinliğinin gösterilmesi için kullanılır. FK/FD araştırmalar (1) MİK, (2) MBK, (3) post antibiyotik etki (PAE), (4), post antibiyotik sub-MİK etki (PA-SME), (5) MÖK, (6) MSP, (7) MF, (8) uygulama sonrasında ulaşılan maksimum ilaç konsantrasyonu (C_{max}), (9) ilaç konsantrasyonunun MİK'un üzerinde kaldığı süre ($T > MİK$), (10) ilaç konsantrasyonunun MÖK'un üzerinde kaldığı süre ($T > MÖK$), (11) mutant önleme indeksi ($MÖK/MİK = MÖİ$), ilaç konsantrasyonunun MSP aralığında kaldığı süre (TMSP), (12) zaman-konsantrasyon eğrisi altında kalan alan (EAA), (13) zaman-konsantrasyon eğrisi altında kalan alanın MİK'a oranı ($EAA/MİK$), (14) zaman-konsantrasyon eğrisi altında kalan alanın MÖK'a oranı ($EAA/MÖK$), (15) ulaşılan maksimum ilaç konsantrasyonunun MÖK'a oranı ($C_{max}/MÖK$) ve (16) zamana bağlı doz-yanıt deneylerini kapsar (Drilica ve Xilin.,2007; Drilica, 2003; EMA/CVMP/261180/2012; Mouton ve ark., 2002, Mouton ve ark 2005).

2.19.1. MİK Bazlı FK/FD Araştırmalar

Antimikrobiyal kemoterapinin ilkelerinden biri optimal etki için enfeksiyon bölgesinde MİK'a bağlı konsantrasyonun sağlanmasıdır. Örneğin penisilin ve

sefalosporinler zamana bağlı bakterisidal etki gösterir ve FK/FD karakteristik MİK'a bağlı olarak yorumlanır (Blondeau, 2009). MİK ve MBK, ilaçların bakteriler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılan temel parametrelerdendir. MİK, bakteri gelişimini durduran en düşük ilaç konsantrasyonudur. Genel olarak antimikrobiyal ajanların etkili olabilmeleri için enfeksiyon bölgesindeki konsantrasyonlarının tedavi süresince MİK'un üzerinde olması gerekir (Craig, 2007). Bakterilerin % 99'unu öldüren ilaç konsantrasyonu MBK olarak tanımlanır. PAE, antimikrobiyalın uygulanmasından kısa bir süre sonra mikroorganizma üzerinde oluşan kalıcı inhibitör etkiyi veya mikroorganizma üzerindeki etkisinin sona ermesi için geçen süreyi tanımlar (Mouton ve ark., 2005). Ancak inhibitör veya üzerindeki ilaç konsantrasyonu ile başlayan tedavi *in vivo* koşullarda ilacın metabolize edilmesine bağlı olarak sub-inhibitör konsantrasyona düşer. Bu kapsamda PAE'nin yanı sıra PA-SME süresinin dikkate alınması klinik açıdan önemlidir (Odenholt ve ark., 2000). PAE ve PA-SME, *in vitro* olarak ilacın uzaklaştırılmasından sonra bakteriyel büyüme kinetiğinin izlenmesiyle hesaplanır ve antimikrobiyalın doz aralığının belirlenmesine olanak sağlar. Örneğin, yüksek düzeyde bakteriyel inhibisyon sağlayan ve PAE ile PA-SME süresi uzun olan bileşikler için doz aralığı daha geniştir (Lorian, 1996; Craig, 1998; Coulet ve ark., 2002).

Ancak MİK ve MBK ile elde edilen sonuçlar ilacın bakteriyel aktivitesinin statik bir göstergesidir ve zaman veya konsantrasyona bağlı olarak ilacın etkinliğinde meydana gelen değişikliklerin değerlendirilmesi mümkün değildir (Craig 1998, Dalhoff ve ark., 2003). Bu nedenle, MİK ve MBK testine ilave olarak direnç mekanizmasına dayalı FD modeller antimikrobiyal ajanların dirençli bakteriler üzerindeki etkisini gözlemek için kullanılabilir (Cengiz ve ark., 2013a). Kronik bakteriyel enfeksiyonlarda mikroorganizma yoğunluğu 10^8 , akut enfeksiyonlarda ise 10^{10} - 10^{12} cfu/ml düzeyindedir. Bu durumda MİK esaslı elde edilen veriler antimikrobiyalın bakteri poplasyonu üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için yetersiz kalır. Bakteri yoğunluğu yüksek olan bir enfeksiyonda, antimikrobiala daha az duyarlı mutant sub-poplasyon bulunabilir. Sadece duyarlı patojenlerin inhibisyonu ve eliminasyonu ilkelerine dayanan konvensiyonel antimikrobiyal kemoterapi uygulamaları duyarlı patojenleri baskımlarken

mutant patojenler çoğalmaya devam edebilir (Drlica 2003, Drlica ve Xilin, 2007; Marcusson 2005.). Bu nedenle klinik prognoz kötüleşebilir (Marcusson 2005). Bunu önlemek ve etkin bakteriyel eliminasyonu sağlamak için florokinolon ve aminoglikozit gibi konsantrasyona bağlı bakterisit etki gösteren ve mutasyona bağlı direnç gelişen antimikrobiyaller için MÖK, MSA ve MF verisinin değerlendirilmesi önemlidir (Smith, 2003).

2.19.2. MÖK Bazlı FK/FD Araştırmalar

Antimikrobiyal direncin önlenmesi için çözüme yönelik yaklaşımlardan biri MÖK esaslı FK/FD araştırmalardır. Bu kapsamda mevcut bileşiklerin terapötik etkinliklerinin artırılması için yeni doz-etkinlik deneylerinin yapılması ve FK/FD verilerinin elde edilmesi dirençle mücadelede önemli ve gereklidir (Pankey ve Ashcraft, 2005; Nielsen ve Friberg, 2013). MÖK bazlı FK/FD araştırmalar konvansiyonel doz optimizasyon araştırmalarından daha doğru veriler sunar (Smith 2003).

MÖK ve MSP'nin belirlenmesi, özellikle florokinolon ve aminoglikozid gibi konsantrasyona bağlı bakterisit etki gösteren antimikrobiyal ajanlar için oldukça önemlidir. MÖK ve MSP çalışmaları dirençli suşların yaygınlaşmasını önlemek için geliştirilen FK/FD yaklaşımlardır. MÖK, uygulandığı bakteri popülasyonunda birinci jenerasyon mutantların oluşumuna izin vermeden bakterilerin eliminasyonunu sağlayan ilaç konsantrasyonudur ve MİK'un katları halinde uygulanan antimikrobiyalın yoğun bakteri popülasyonu üzerinde meydana getirdiği morfolojik ve sayısal değişikliklerin değerlendirilmesi temeline dayanır (Marcusson ve ark., 2005, Blandeau, 2009). MİK ile MÖK arasında kalan aralık MSP ile ifade edilir. MSP konsantrasyonları mutant bakterilerin gelişmesi için risk oluşturur (Baquero ve ark., 1997). Bu risk MF'nin belirlenmesi ile ortaya konabilir. MF, antimikrobiyal bileşiğin MSP içinde kalan ilaç konsantrasyonlarında kullanılması durumunda bakteri popülasyonunda mutant oluşturma sıklığı olarak ifade edilir. Florokinolon ve aminoglikozitler için, tedavi süresince uygulanan ilaç konsantrasyonunun MÖK'nin üzerinde olduğu sürenin ($T > MÖK$) artırılması ve ilacın MSP'de kalma süresinin azaltılması gerekir. Etkin doz

belirlenirken $T > MİK$ yerine, $T > MÖK$ 'nin kullanılması ile mutant oluşumu önlenebilir (Xu ve ark., 2013).

Antimikrobiyal direnç gelişiminin etkili bir şekilde önlenmesi için direncin oluşumundan sorumlu olan genetik etmenlerin, antimikrobiyal direnç üzerindeki potansiyel etkilerinin iyi bilinmesi gereklidir (Dawis ve ark., 2003). Konsantrasyona bağlı bakterisit etkili florokinolonlar *qnr* genlerinin varlığında aynı anda hem doza hem de zamana bağlı etki gösterebilir. Direnç etmenine bağlı bu değişiklik enfeksiyonun tedavi başarısını etkileyebilir ve dirençli sub-popülasyonların ortaya çıkmasına neden olabilir (Briales ve ark., 2014). Florokinolonlar geniş terapötik indeks ve düşük MÖK/MİK oranına sahiptir (Blondeau 2001).

Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency: EMA) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration: FDA) her yeni bileşik için FK/FD değerlendirme yapılmasını önermektedir (Gloede ve ark., 2010).

FK/FD araştırma ile elde edilen veri antimikrobiyal ajanların spesifik bir patojen üzerinde oluşturduğu etki özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesini sağlar. Dolayısıyla başarılı bir antimikrobiyal terapi oluşturabilmek için gerekli olan optimum antimikrobiyal, süre ve doz seçiminin yapılabilmesini kolaylaştırır. Ayrıca enfeksiyona neden olan patojenin hızlı ve dirençli sub-populasyon oluşturmasına izin vermeden elimine edilmesi için gerekli olan doz miktarı ve süre belirlenmiş olur. FK/FD araştırmadan elde edilen verinin klinik pratiğe uyarlanabilmesi için zamana bağlı doz-yanıt deneylerine dayalı deney modelleri geliştirilmiştir.

2.19.3. *In vivo* Modeller

In vivo FK/FD model ile laboratuvar hayvanlarında oluşturulan deneysel enfeksiyonlarda antimikrobiyallerin etkileri konsantrasyon ve zaman ile konakçı metabolizmasına bağlı olarak incelenir. *In vivo* modellerde antimikrobiyal ajanların FK'i (emilim, dağılım, biyotransformasyon ve atılım) ve bağışıklık sisteminin

enfeksiyon üzerindeki etkisi gibi konakçıya bağılı faktörler de değerlendirilir. Bu sayede antimikrobiyal, patojen ve konakçı arasındaki karmaşık ilişkiyle ilgili veri elde edilir (Vaddady ve ark., 2013). *In vivo* deneylerden elde edilen verilerin diğere hayvan türlerine ve insanlara uyarlanabilirliği değerlendirilir. Ancak antimikrobiyal ajanın patojen üzerindeki etkisinin belirlenmesi için daha spesifik olan *in vitro* modeller kullanılır (White ve ark., 2011).

2.19.4. *İn vitro* Modeller

İn vitro modeller antimikrobiyal ve patojen ilişkisinin daha detaylı olarak incelenmesini sağlar. Bu sayede optimal doz rejiminin belirlenmesi ve yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesiyle ilgili araştırmalar daha kontrollü ortamda yürütülebilir. *In vitro* modellerle elde edilen veri pahalı klinik deneyler yapmadan *in vivo* sonuçları tahmin etmeyi kolaylaştırır (Vaddady ve ark., 2010). Dinamik ve statik olmak üzere iki *in vitro* FD model mevcuttur.

2.19.4.1. Dinamik *İn vitro* Modeller

Dinamik *in vitro* modeller doku dağılımı, proteinlere bağlanma ve eliminasyon gibi konakçıda meydana gelen olayların hareketli sistem ve filtrelerle taklit edilerek değişen antimikrobiyal konsantrasyonlarının patojen üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla kullanılır. Bakteriler değişen antimikrobiyal konsantrasyonlarından farklı etkilenir. Dinamik modellerde antimikrobiyal konsantrasyonuyla bakteri davranışı ve etkilenme şekli arasındaki ilişki incelenir. Antimikrobiyal etkinlik, zaman ve konsantrasyonun fonksiyonu olarak tanımlanır. Elde edilen sonuçlar *in vivo* modellere uyarlanır. Daha pahalı ve iş gücü gerektiren klinik araştırmalar için ön veri olarak değerlendirilir (Gloede, 2009; Vaddady ve ark., 2010).

2.19.4.2. Statik *İn vitro* Modeller

Statik *in vitro* modeller düşük maliyeti, kolay uygulanabilmesi ve hızlı veri sağlanması nedeniyle FK/FD araştırmaların temelini oluşturur (Gloede, 2009). Statik

model antimikrobiyal direncin belirlenmesi, izlenmesi ve önlenmesini kolaylaştıran FK/FD parametrelerden olan MİK, MBK ve MÖK verisinin elde edilmesi için kullanılan en kolay yaklaşımdır. Antimikrobialların sabit konsantrasyon ve çevre koşullarında patojen üzerindeki özgün etkileri detaylı olarak incelenebilir (Mueller, 2013; Vaddady ve ark., 2010). Statik *in vitro* modelde dinamik modelde olduğu gibi filtrasyon sistemi bulunmadığından filtrasyon nedeniyle oluşan bakteri kaybı gerçekleşmez ve antimikrobiyal etkinlik daha doğru bir şekilde incelenebilir. Statik modellerle antimikrobiyal konsantrasyon ve zaman ilişkisi incelenir. Bu sayede etkin bir antimikrobiyal kemoterapi için gerekli olan optimal bileşik seçimi, doz ve tedavi süresi belirlenir. Statik *in vitro* modellerden elde edilen veriler intravenöz infüzyon tedavileri için değiştirilmeden uyarlanabilir. Yeni antimikrobiyal geliştirilme sürecinde verilerin hızlı toplanması ve bunun düşük maliyetle sağlanması amaçlanır. Statik *in vitro* model bunu da mümkün hale getirir. Ayrıca deney hayvanları ve insanların istenmeyen etkilerle maruz kalması önlenir (Gloede ve ark., 2009).

Florokinolonlar üzerinde yapılan FK/FD araştırmalar zaman ve konsantrasyon eğrisi altında kalan alanın MÖK'a oranının (EAA/MÖK) direnç gelişimi engelleme potansiyeli açısından önemli olduğunu göstermektedir (Olofson, 2006; Homma, 2007). Ayrıca MÖK verilerinin diğer FK/FD parametreler ile entegrasyonu sayesinde oluşturulan tedavi protokollerinin dirençli sub-popülasyon oluşumunu önleme bakımından konvansiyonel protokollere göre daha etkili olduğu bilinmektedir (Blondeau, 2001; Blondeau, 2009). MÖK/MİK oranları, antimikrobiyal ajanları potenslerine göre sınıflandırmak için kullanılan özellikler arasındadır. Fakat genetik altyapının özellikle de PMQR genlerinin ve QRDR mutasyonlarının MÖK, MF ve MSP değerleri üzerindeki etkileri ile ilgili veriler yetersizdir. Florokinolonların klinik etkinliklerinin korunabilmesi ve daha etkili moleküllerin geliştirilebilmesi için genetik etmenlerin bu parametreler üzerindeki etkilerinin detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir (Blondeau, 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmalarında Kullanılan İzolat ve Suşlar

Tez projesi kapsamında enrofloksasin duyarlılığının ve *aac-(6')-Ib-cr* ve *qnrS1* genlerinin prevalansının belirlenmesi çalışmalarında 1100478 numaralı COST projesinin koleksiyonunda yer alan 311 adet hayvansal kökenli *E. coli* izolatı kullanıldı. İzolatlar Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi, Hayvansal Üretim Araştırma Uygulama Merkezi ile Mikrobiyoloji Anabilim Dalına gelen sığır, keçi, koyun köpek ve kedi örneklerinden elde edildi. Florokinolon direnç genetik etmenlerinin (QRDR mutasyonlarının ve PMQR genlerinin) enrofloksasinin baskılayıcı özellikleri üzerindeki etkilerini detaylı olarak inceleyebilmek için tez projesi kapsamında MÖK, MF, MSP ve zaman-yanıt deneyleri uygulandı. Bu deneylerde kontrol suşu olarak antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında sıklıkla kullanılan *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG 100 suşları kullanıldı. *aac-(6')-Ib-cr* ve *qnrS1* genlerinin tek başlarına ve birlikte bulunmalarının etkilerinin belirlenmesi amacıyla *E. coli* ATCC 25922'ye *aac-(6')-Ib-cr* geninin moleküler yöntemler ile aktarılması sonucu oluşturulan MtX, *E. coli* ATCC 25922'ye *qnrS1* geninin aktarılması ile oluşturulan MtS ve *E. coli* ATCC 25922'ye *aac-(6')-Ib-cr* ve *qnrS1* genlerinin aktarılması ile oluşturulan MtSX klon suşları oluşturuldu. MÖK, MF, MSP ve zaman-yanıt deneyleri için QRDR mutasyonları ve PMQR genlerinden en az bir tanesini içeren suşlar seçildi. *E. coli* E248 *qnrS1* genine, *E. coli* E101 *qnrA1* ve *aac (6')-Ib-cr*, *E. coli* E103 *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* PMQR genlerine sahipti. *E. coli* E247 *qnrS1* ile *oqxB*, *gyrA* Ser83→Leu ve *parC* Ser80→Ile QRDR mutasyonlarına, *E. coli* E308 ise *gyrA* Asp87→Asn, *parC* Ser80→Ile ve *parE* ser458→Ala QRDR mutasyonlarına ve *qnrS1* PMQR genine sahipti.

3.2. Tez Projesinde Kullanılan Gereçler

Deneyler Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Laboratuvarında (MFL) yapıldı. Deneyler kapsamında kullanılan ekipman, sistem ve sarf malzemeler tablo 1 ve 2’de verilmiştir.

Tablo 1: Tez projesinde kullanılan ekipman-sistem listesi

Adı/modeli	Projede kullanım amacı
TECHNE TC-3000 Thermal Cycler	PCR Amplifikasyonu
UVITEC CAMBRIDGE Jel Görüntüleme Sistemi	Görüntüleme
CLEAVER MULTISUB CHOICE Elektroforez	Görüntüleme
WWR 300V Güç Kaynağı	Görüntüleme
WWR GALAXY 16HD Mikro Santrifüj	DNA ve Plazmid İzolasyonu
LABNETACCUBLOCK Kuru Blok Isıtıcı	DNA ve Plazmid İzolasyonu
NÜVE ES120 Soğutmalı İnkübatör	Örnek İnkübasyonu
NÜVE EN055 İnkübatör	Kültür İnkübasyonu
BIOSAN OS-10 Orbital Karıştırıcı	Bakteri İzolasyonu
CLEAVER CSL omniSPIN Mini Santrifüj	PCR Ürün Boyama
VELP CLASSIC Multi Vorteks	DNA ve Plazmid İzolasyonu
SARTORIUS BA210S Hassas Terazî	Antibakteriyal Tartım
THERMO FINPIPETTE F1 Pipet Seti	PCR Reaktif Karışımı Hazırlama
THERMO FINPIPETTE C1 Otomatik Pipetleyici	Sıvı Kültürlerin Pipetlenmesi
NÜVE MN120 Laminar Hava Kabini	İzolasyon ve İdentifikasyon
VESTEL BC130 Soğutucu	Örnek ve Reaktiflerin Saklanması
BOSH Derin Dondurucu	Örnek ve Reaktiflerin Saklanması
VESTEL MV17 Mikrodalga Fırın	Agaroz Jel Hazırlama
ELGA PURELAB FLEX Ultra Saf Su Cihazı	Sıvı Besi Yeri Hazırlama
BAECO TS-100 Termal Karıştırıcı	DNA izolasyonu
BIOSAN DEN-1B Dansitometre	Bakteri kültürü standardizasyonu

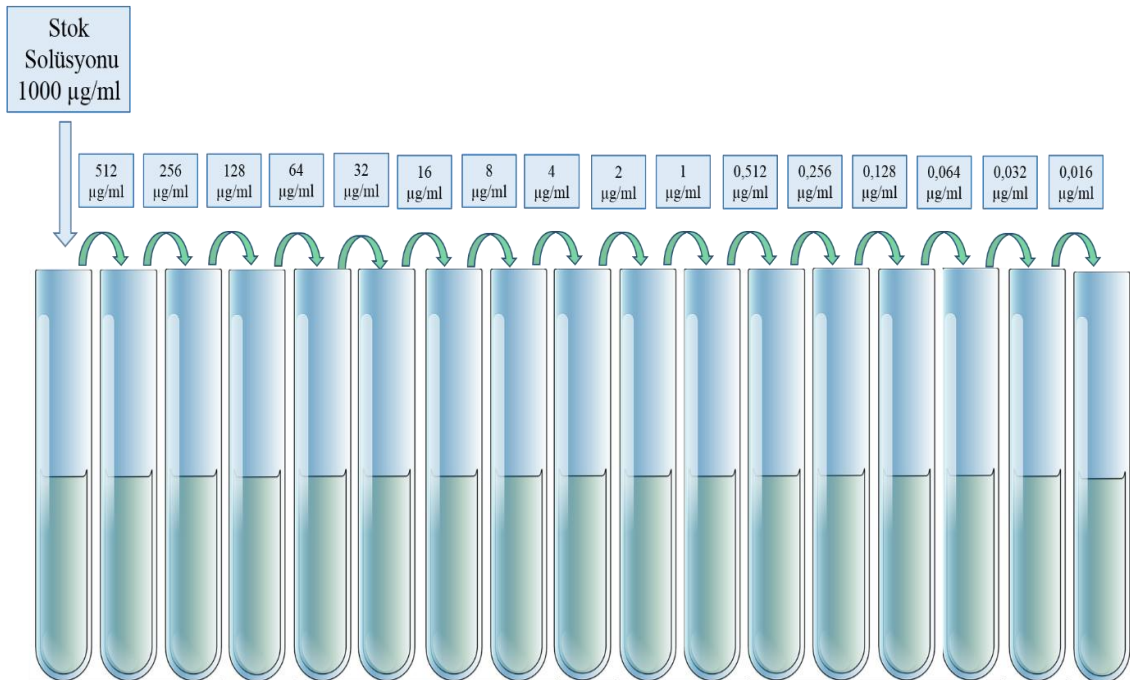
Tablo 2: Tez projesinde kullanılan sarf malzeme listesi

Adı/modeli	Projede kullanım amacı
Luria-Bertani Broth	Kültür İnkübasyonu
Mueller-Hinton Broth	Kültür İnkübasyonu
Plate Count Agar	Kültür İnkübasyonu
Luria-Bertani Agar	Kültür İnkübasyonu
Metanol	Antimikrobiyal çözöcü
Enrofloksasin	Doz-yanıt deneyleri
Ministart, Sartorius Stendim Biotech 0,20 µm	Sıvı sterilizasyonu
Steril Mikroplaka	MİK belirleme
Taq DNA polymerase	PCR
40 µM dNTP mix	PCR
pUC19 Plasmid	Klonlama
HindIII RE	KLonlama
<i>E. coli</i> ATCC 25022	Kontrol suşu
<i>E. coli</i> AG100	Kontrol suşu
Clone Jet cloning kit	Klonlama
Transform aid kit	Transformasyon
Ethidium Bromide	Agaroz Jel Hazırlama
100 bp DNA ladder	Jel elektroforez
6X loading dye	Jel elektroforez
Agarose	Agaroz Jel Hazırlama
Molecular water	PCR
Ampisilin	Klonlama
Krayojenik vial	Bakteri saklama
Santrifüz tüpleri	Bakteri yoğunlaştırma
Steril Petri	Bakteri ekimi
Serolojik pipet	Solüyon hazırlama
50XTAE	Jel elektroforez

3.3. Duyarlılık Testi

MIK, CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute: CLSI) broth-mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi.

Broth-mikrodilüsyon testi, CLSI M7-A7 tarafından tanımlanan mikrodilüsyon yöntemine göre Mueller-Hinton sıvı besi yerinde uygulandı. Bu yöntemde, toz haldeki antimikrobiyal, stok çözelti hazırlamak için her test öncesi taze olarak % 20/80 oranında metanol/PBS'de çözdürüldü. Stok çözelti 0,20 µm çapındaki filtreden (Sartorius Stendim Biotech) geçirilerek sterilize edildi. Ana stok çözültiden sırasıyla 0,016; 0,032; 0,064; 0,128; 0,256; 0,512; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 ve 512 µl/ml seri dilüsyon hazırlandı (Şekil 15). Steril mikroplakaya (Corning) son konsantrasyonlar 0,008; 0,016; 0,032; 0,064; 0,128; 0,256; 0,512; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 µl/ml olacak şekilde 50 µl antimikrobiyal çözültisi ve 50 µl bakteri kültürü konularak 37 °C'de 16-20 saat inkübe edildi (Şekil 16). İnkübasyonun ardından 595 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek üremenin olmadığı değer MİK olarak belirlendi.



Şekil:15 Broth-mikrodilüsyon testlerinde kullanılan seri dilüsyon

	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>MtX</i>			<i>MtS</i>			<i>MtSX</i>		
	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

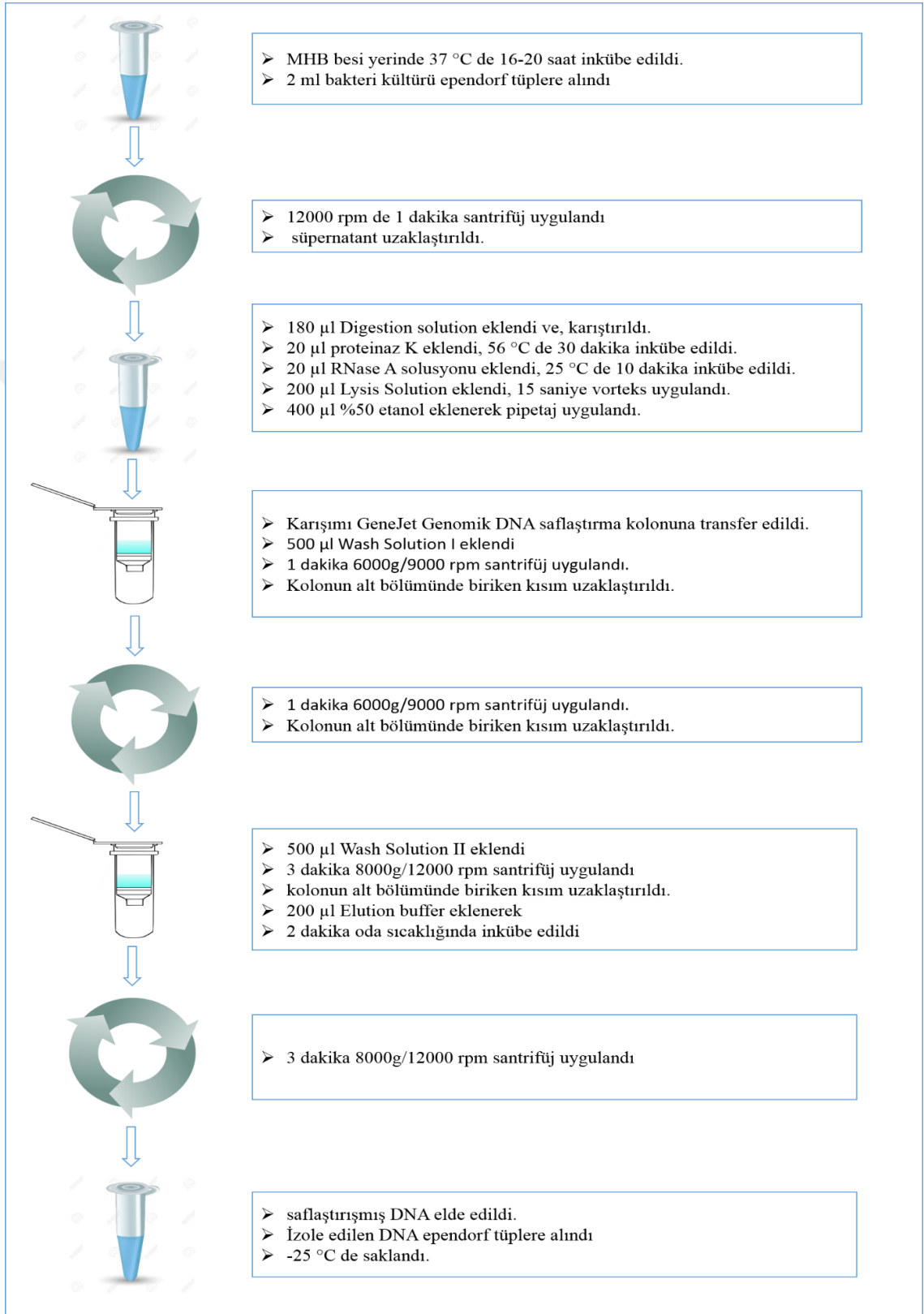
Şekil:16 Broth-mikrodilüsyon testlerinde kullanılan antimikrobiyal konsantrasyonları ve bakteri yerleşim planı.

3.4. DNA İzolasyonu

Bakteri kültürlerinden DNA izolasyonu için Genomic DNA Purification® (Fermentas, K0722) ticari kiti kullanıldı. DNA izolasyonu için seçilen bakteriler MHB besi yerinde 16-20 saat 37 °C de inkübe edildi. 2 ml bakteri kültürü eppendorf tüplere alındı, 10 dakika 5000 g/8000 rpm 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 dakika thermoshaker'da inkübe edildi. Daha sonra 20 µl RNase A solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ve 200 µl Lysis Solution eklenerek 15 saniye vorteks uygulandı. Üzerine 400 µl % 50 etanol eklenerek pipetaj uygulandı. Oluşan karışım GeneJet Genomik DNA Purification kolonuna alınarak 500 µl Wash Solution I eklendi ve 1 dakika 6000 g/9000 rpm'de santrifüj uygulandı. Kolonun alt bölümünde biriken kısım uzaklaştırıldı. Ardından 500 µl Wash Solution II eklendi ve 3 dakika 8000 g/12000 rpm'de santrifüj uygulandı ve kolonun alt bölümünde biriken kısım uzaklaştırıldı. Son aşamada 200 µl Elution buffer eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 3 dakika 8000

g/12000 rpm'de santrifüj uygulanarak saflaştırılmış DNA elde edildi. İzole edilen DNA'lar nano drop moleküler spektrofotometrik sistemde ölçülerek yoğunlukları belirlendi ve 50ng/ml konsantrasyonun altındaki DNA lar yeniden izole edildi. Uygun yoğunlukta (50 ng/ml ve üstü) bulunan DNA örnekleri ise kodlanarak hemen kullanıldı veya -25 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı. DNA izolasyon methodunun basamakları şelil 17' de verilmiştir.





Şekil:17 DNA izolasyonunda kullanılan ticari kit (Fermentas, K0722) prosedürü

3.5. PCR-Amplifikasyonu ve Görüntüleme

3.5.1. *qnrS* Geninin PCR-Amplifikasyonu

qnrS geni, Wang ve arkadaşları (2009) tarafından tanımlanan yöntemle göre amplifiye edildi. PCR karışımı (toplam 25 µl) 2,5 µl reaksiyon buffer (Fermentas), 0,2 µM oligonükleotidler (Alpha DNA-HPLC Grade) (tablo 3), 40 µM dNTP miks (Fermentas), 3 µM MgCl₂ (Fermentas), 1,5 U Taq polimeraz (Fermentas) ve 1 µl DNA kullanılarak hazırlandı. *qnrS* geninin PCR amplifikasyon programı tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 3. *qnrS* ve *aac (6’)-Ib-cr* genleri için kullanılan oligonükleotidler

Bölge	Oligonükleotid	bp	Kaynak
<i>qnrS</i>	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	716	Wang ve ark., 2009
	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG		
<i>aac (6’)-Ib-cr</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	Yue ve ark., 2008
	CTCGAATGCCTGGCGTGT		

Tablo 4: *aac (6’)-Ib-cr* ve *qnrS1* genleri için kullanılan PCR-amplifikasyon programları

Aşama	<i>aac (6’)-Ib-cr</i>		<i>qnrS</i>	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	5 dk	96 °C	1 dk
Denatürasyon	94 °C	45 sn	96 °C	1 dk
Bağlanma	59 °C	45 sn	60 °C	1 dk
Uzama	72 °C	45 sn	72 °C	1 dk
Son uzama	72 °C	5 dk	72 °C	5 dk

3.5.2. *aac (6’)-Ib* Geninin PCR-Amplifikasyonu

aac (6’)-Ib geni, Park ve arkadaşları (2006) tarafından tanımlanan yöntemle göre amplifiye edildi. PCR karışımı (25 µl toplam hacim) 2,5 µl reaksiyon buffer (Fermentas), 0,2 µM oligonükleotidler (Alpha DNA-HPLC Grade), 40 µM dNTP miks (Fermentas), 3 µM MgCl₂ (Fermentas), 1,5 U Taq polimeraz (Fermentas) ve 1 µl DNA olarak hazırlandı. *qnrS* geninin PCR amplifikasyon programı tablo 4’de gösterilmiştir.

PCR amplifikasyonu ile elde edilen amplikonların dizilenmesi yaptırıldı (Macrogen Inc. Kore) ve ilgili genlerin dizileri BLAST ile analiz edildi.

3.6. Jel Elektroforez ve Görüntüleme

3.6.1. Agaroz Jel Hazırlama (%1)

PCR'la elde edilen amplikonların görüntülenebilmesi için % 1'lik agaroz jel hazırlandı. Amplikon sayısına bağlı olarak küçük (55 ml), orta (75 ml) veya büyük boy agaroz tepsileri kullanıldı. Toz haldeki agaroz (Marka) hassas terazide (SARTORIUS BA210S) tartıldı ve 1xTAE'de (Tris Asetat EDTA) çözdürüldü. Homojen çözünme için mikrodalga (VESTEL MV17) fırın kullanılarak yüksek ısıda 3 dakika ısıtma/kaynakma işlemi uygulandı. Homejenize agaroz çözeltisine % 0,01'lik etidyum bromid (Vivantis Biochemical) eklendi ve 10 sn karıştırıldı. Son olarak çözelti agaroz tepsisine boşaltıldı ve katılaşması için oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Daha sonra agaroz jel elektroforez kuvetine yerleştirildi.

Amplikonun 5 µl'sine 2 µl yükleme boyası (Bio-Rad) eklendi ve pipetajla karıştırıldıktan sonra jelde oluşturulan kuyucuklara konuldu. Amplikon büyüklüğünü belirlemek amacıyla 100 bp'lik DNA marker (Fermentas) kullanıldı. Elektorforez 120 volt ve 30 dakika olarak uygulandı.

3.6.2. Görüntüleme

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

3.7. Klonlama ve Transformasyon

Tez projesinde *aac (6)-Ib-cr* ve *qnrS1* genleri enrofloksasin direnci üzerindeki etkilerini tanımlamak amacıyla klonlanarak kontrol suşu olan *E. coli* ATCC 25922'ye transformasyon yöntemi ile yerleştirildi. Klonlama ve transformasyon çalışmalarında

sırasıyla *aac (6)-Ib-cr* ve *qnrS1* genlerinin PCR reaksiyonu ile klonlanması, ampikon ve vektör olarak kullanılan pUC19 plazmidinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi, *aac (6)-Ib-cr* ve *qnrS1* genlerinin ligasyon ile vektöre yerleştirilmesi ve transformasyon işlemi ile hedef hücreye aktarılması çalışmaları gerçekleştirildi.

3.7.1. *aac (6')-Ib-cr* Geninin Klonlanması

aac (6)-Ib-cr geninin klonlama işlemi için Ruiz ve arkadaşlarının (2009) tanımladığı yöntem kullanıldı. Klonlama işleminde pUC19 plazmidi vektör olarak kullanıldı ve klonlama iki aşamada gerçekleştirildi.

Birinci aşamada; *E. coli* E69 izolatu DNA'sından *aac (6)-Ib-cr* geni PCR reaksiyonu ile amplifiye edildi. PCR amplifikasyonu için tablo 4'de verilen oligonükleotidler kullanıldı. PCR karışımı (25 µl toplam hacim) 2,5 µl reaksiyon buffer (Fermentas), 0,2 µM oligonükleotidler (Alpha DNA-HPLC Grade), 40 µM dNTP miks (Fermentas), 3 µM MgCl₂ (Fermentas), 1,5 U Taq polimeraz (Fermentas) ve 1 µl DNA olarak hazırlandı. PCR amplifikasyon programı denatürasyon basamağında 96 °C'de 1 dakika, bağlanma basamağında 60 °C'de 1 dakika ve uzama basamağında 72 °C'de 1 dakika olacak şekilde toplam 30 siklus olarak gerçekleştirildi. Başlangıç denatürasyon basamağı 96 °C'de 5 dakika ve son uzama basamağı 72°C'de 5 dakika olacak şekilde uygulandı. Kullanılan PCR amplifikasyon programı tablo 5'de verilmiştir. Elde edilen ampikon jel elektroforez ile değerlendirildi ve doğruluğu teyid edildi. *aac (6)-Ib-cr* geni ve pUC19 (Fermentas) plazmidinin kesimi *HindIII* (Fermentas) restriksiyon enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra *aac (6)-Ib-cr* geni pUC19 plazmidinin *HindIII* kesim bölgesine T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak yerleştirildi.

İkinci aşamada; yeni oluşturulan rekombinant plazmid PCR reaksiyonu ile amplifiye edildi. Kullanılan PCR amplifikasyon programı denatürasyon basamağında 96 °C'de 90 saniye, bağlanma basamağında 60 °C'de 90 saniye ve uzama basamağında 72 °C'de 90 saniye olacak şekilde toplam 30 siklus olarak gerçekleştirildi. Başlangıç denatürasyon basamağı 96 °C'de 5 dakika ve son uzama basamağı 72 °C'de 10 dakika

olacak şekilde uygulandı. Elde edilen ampikon etidium bromid ile agaroz jelde görüntülendi. Doğruğu teyid edilen ampikon transformasyon için kullanıldı. Kullanılan PCR amplifikasyon programı tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 4: *aac (6)-Ib-cr* geninin klonlanması için kullanılan oligonükleotidler

Bölge	Oligonükleotid	bp	Kaynak
<i>aac (6’)-Ib-cr</i>	ATACAAGCTTGACAAAAGTTAGGCATCACAAAAGT	585	Ruiz ve ark., 2009
	ACTATAAGCTTTT TAGGCATCACTGCGTGTTTC		
<i>aac(6’)-IbΔlacZ</i>	CTTTGTGATGCCTAACTTTGTTTTTCGTTGCTCATAGCTGTTTCCTGTGTG	3269	Ruiz. Ve ark., 2009
	AAATTG ACAAAGTTAGGCATCACAAAAGTACAGCATCGTGACCAACAGC		

Tablo 5: *aac (6)-Ib-cr* geninin klonlanması için kullanılan birinci PCR-amplifikasyon programı

<i>aac (6)-Ib-cr</i>		
Aşama	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	96 °C	5 dk
Denatürasyon	96 °C	1 dk
Bağlanma	60 °C	1 dk
Uzama	72 °C	1 dk
Son Uzama	72 °C	5 dk

Tablo 6. *aac (6)-Ib-cr* geninin klonlanması için kullanılan ikinci PCR-amplifikasyon programı

<i>pUC19+ aac (6)-Ib-cr</i>		
Aşama	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	96 °C	5 dk
Denatürasyon	96 °C	90 sn
Bağlanma	60 °C	90 sn
Uzama	72 °C	90 sn
Son Uzama	72 °C	10 dk

3.7.2. *qnrS1* Geninin Klonlanması

qnrS1 geninin klonlama işlemi için Ruiz ve arkadaşlarının (2009) tanımladığı yöntem kullanıldı. Klonlama işleminde pUC19 plazmidi vektör olarak kullanıldı.

E. coli E101 izolatu DNA’sından *qnrS1* geni PCR reaksiyonu ile amplifiye edildi. PCR amplifikasyonu için tablo 7’de verilen oligonükleotidler kullanıldı. PCR karışımı (25 µl toplam hacim) 2,5 µl reaksiyon buffer (Fermentas), 0,2 µM oligonükleotidler (Aplha DNA-HPLC Grade), 40 µM dNTP miks (Fermentas), 3 µM MgCl₂ (Fermentas), 1,5 U Taq polimeraz (Fermentas) ve 1 µl DNA olarak hazırlandı. Kullanılan PCR amplifikasyon programı denatürasyon basamağında 96 °C’de 90 saniye, bağlanma

basamağında 60 °C’de 90 saniye ve uzama basamağında 72 °C’de 90 saniye olacak şekilde toplam 30 siklus olarak gerçekleştirildi. Başlangıç denatürasyon basamağı 96 °C’de 5 dakika ve son uzama basamağın 72°C’de 10 dakika olacak şekilde uygulandı. PCR amplifikasyon programı tablo 8’de verilmiştir. Elde edilen ampikon jel elektroforez ile değerlendirildi ve doğruluğu teyid edildi. *qnrSI* geni ve pUC19 (Fermentas) plazmidinin kesimi *HindIII* (Fermentas) restriksiyon enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra *qnrSI* geni pUC19 plazmidinin *HindIII* kesim bölgesine T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak yerleştirildi. Doğruluğu teyid edilen ampikon transformasyon için kullanıldı.

Tablo 7. *qnrSI* geninin klonlanması için kullanılan oligonükleotid.

Bölge	Oligonükleotid	bp	Kaynak
<i>aac (6')-Ib-cr</i>	ATACAAGCTTGATGGAAACCTACAATCATACA ATACAAGCTTTTAGTCAGGATAAACAACAAT	657	Ruiz ve ark., 2009

Tablo 8. *qnrSI* geninin klonlanması için kullanılan PCR-amplifikasyon programı

<i>qnrSI</i>			
Aşama	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç Denatürasyonu	96 °C	1 dk	
Denatürasyon	96 °C	1 dk	
Bağlanma	60 °C	1 dk	30 siklus
Uzama	72 °C	1 dk	
Son Uzama	72 °C	5 dk	

3.7.3. Ampikon ve Vektörün *HindIII* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

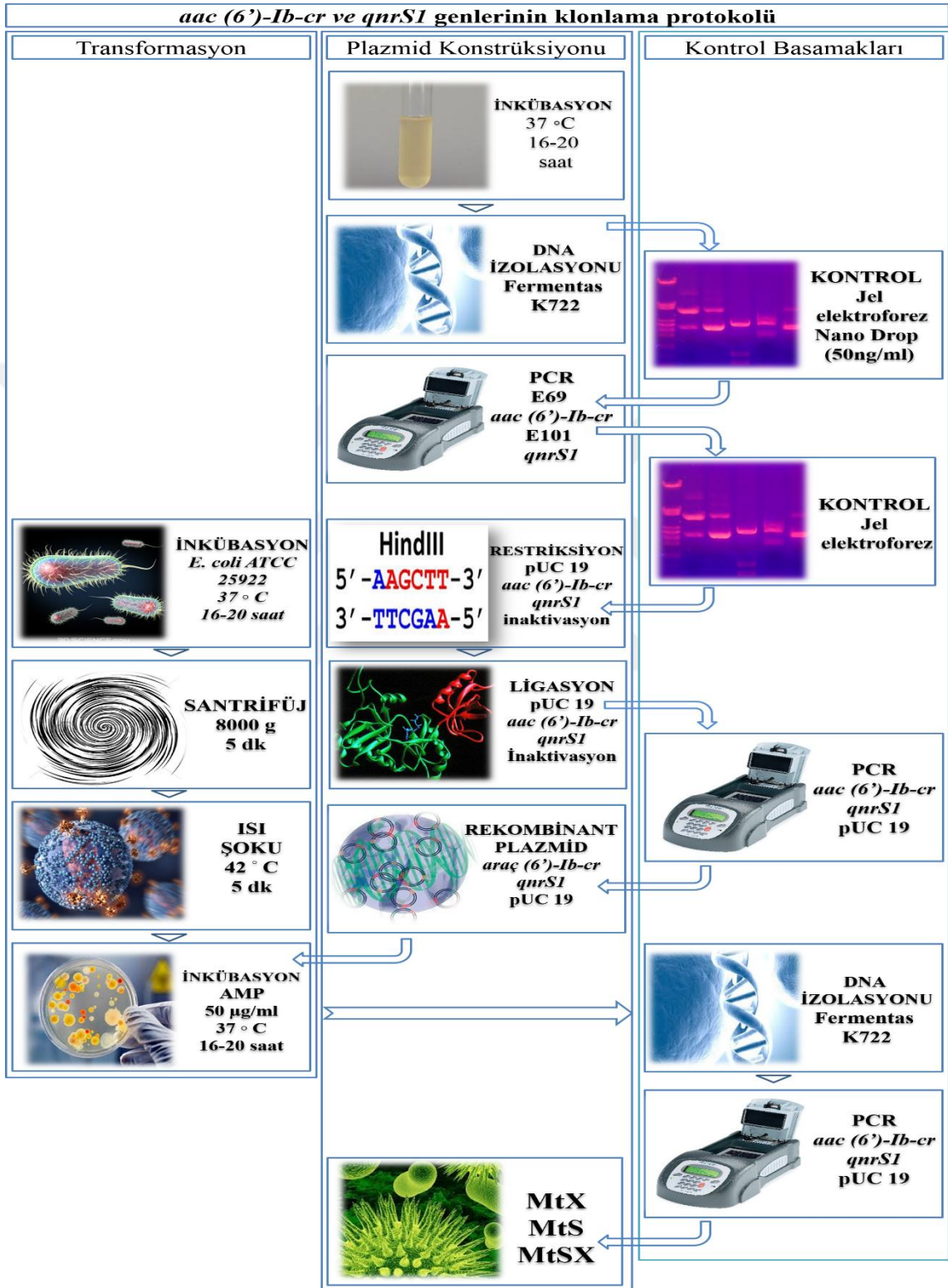
1 µl Ampikon ve 1 µl vektöre ayrı ependorf tüplere alınarak 1 µl *HindIII* enzimi ve 3 µl moleküler su ve 1 µl reaksiyon tampon çözeltisi eklendi, 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi ve 80 °C’de 10 dakika bekletilerek enzimatik aktivite durduruldu. *aac (6)-Ib-cr* geni için birinci aşamada elde edilen ampikon kullanıldı.

3.7.4. Ligasyon

Restriksiyon enzimiyle kesilen ampikonun vektöre (pUC19) ligasyonu T4 DNA ligaz enzimi kullanıldı, 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi ve 80 °C’de 10 dakika bekletilerek enzimatik aktivite durduruldu.

3.7.5. Transformasyon

aac (6)-Ib-cr ve *qnrS1* genlerinin *E.coli* ATCC 25922 suşuna transformasyonu ticari kit kullanılarak (Fermentas TransformAid # K2710) gerçekleştirildi. Transformasyon işlemi için hedef bakteri olan *E. coli* ATCC 25922 LB (Laura-Bertani) sıvı besi yerine inoküle edilerek 37 °C’de 16-20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bakteri kültürüne 30 saniye vorteks uygulandı ve 150 µl kültür önceden 37 °C’ye ısıtılmış 1,5 ml C-Medium besi yerine inoküle edildi ve orbital karıştırıcıda (Biosan S 10) 150 rpm de karıştırılarak 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 1 dakika 8000 rpm/dakika santrifüj uygulandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bakteri peleti vorteks üzerinde 300 µl T-Çözeltisinde süspanse edildi. Tekrar 1 dakika 8000 rpm/dakika santrifüj uygulandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bakteri peleti vorteks üzerinde 120 µl T-Çözeltisinde süspanse edildi. 50 µl Bakteri kültürüne önceden 0 °C’ye soğutulmuş 5µl ligasyon karışımı eklenerek buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi. Bakteri kültürü ve ligasyon karışımı 5 dakika boyunca 42 °C’de inkübe edildi ve buz üzerine alınarak 5 dakika soğutuldu. Son aşamada bakteriler 50 µg/ml ampisilin içeren LB (Laura-Bertani) agara inoküle edildi ve 37 °C’de 12 saatlik inkübasyondan sonra gelişen koloniler saklanarak daha sonraki deneylerde kullanıldı. *aac (6)-Ib-cr* ve *qnrS1* genlerinin klonlama ve transformasyon metodlarının aşamaları şekil 18’de şematize edilmiştir.



Şekil 18: *aac (6')-Ib-cr* ve *qnrS1* genlerinin klonlama protokolü

3.8. Mutant Önleyici Konsantrasyon

MÖK, Blondeau ve arkadaşları (2001)'nın tanımladığı agar dilüsyon yöntemine göre belirlendi. Kullanılacak suşlar 100 ml MHB içerisinde 37 °C'de 16-20 saat inkübe edildi. Bakteri kültürünün 100 ml'si 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra 3 ml MHB'de çözüldürüldü ve böylece yüksek yoğunluğa sahip ($\sim 10^9$ - 10^{10}) bakteri kültürü elde edildi. Yoğun *E. coli* kültürü 0,5; 1, 2, 4, 8, 16 ve 32xMİK konsantrasyonlarında enrofloksasin içeren PCA katı besi yerine spiral hücre yayıcı sistem (WASP; Don Whitley Scientific) yardımıyla inoküle edildi. 96 saatlik inkübasyondan sonra üremenin olmadığı konsantrasyon MÖK olarak belirlendi.

3.9. Mutant Frekansı

MF enrofloksasin içeren ve içermeyen besi yerinde üreyen *E. coli* sayısının birbirine oranlanmasıyla belirlendi. Yüksek yoğunluklu her bir bakteri homojenatından ($\sim 10^9$ - 10^{10} cfu/ml) 100 µl ve 0,5; 1, 2 ve 4xMİK konsantrasyonlarında enrofloksasin içeren PCA katı besi yerine spiral hücre yayıcı sistem (WASP; Don Whitley Scientific) yardımıyla inoküle edildi ve bakteriler 96 saat inkübe edildi. Mutant koloniler her 24 saatte bir sayıldı. Deney süresi sonunda elde edilen toplam mutant sayısı aşağıda verilen formül yardımı ile MF kansını hesaplamak için kullanıldı.

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

3.10. Mutant Seçim Penceresi

Enrofloksasinine ait MSP değeri agar dilüsyon yöntemi ile belirlenen MÖK ve broth-mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerlerinin arasında kalan konsantrasyon aralığı olarak hesaplandı.

Örneğin: *E. coli* E308 izolatu için hesaplanan MÖK değeri 1024 µg/ml, MİK değeri ise 128 µg/ml'dir. *E. coli* E308 izolatu için MSA 1024-128=896 µg/ml olur.

MÖİ ise MÖK ve MİK değerlerinin oranlanması ile hesaplandı.

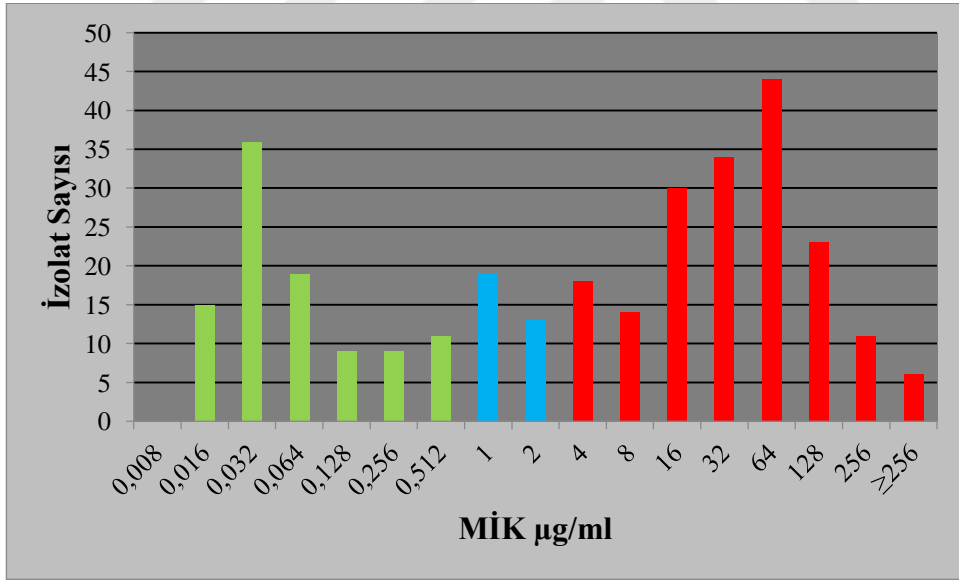
3.11. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri

Zamana bağlı doz-yanıt deneyleri Booker ve arkadaşları (2005) ile Begic ve arkadaşları (2009) tarafından tanımlanan yöntemlere göre uygulandı. *E. coli* Mueller-Hinton Broth'da (MHB) (Becton, Dickinson and Company) 37°C'de 16-20 saat inkübe edildi. Bakteri kültürünün yoğunluğu taze MHB kullanılarak optik dansitometre (Biosan) ile 10⁶ cfu/ml olacak şekilde standardize edildi. Bakteri süspansiyonundan 100 µl MİKx0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 kat enrofloksasin içeren MHB'a konuldu ve 37°C'de inkübe edildi. Ardından 0, 8 ve 24. saatlerde PCA'a (Becton, Dickinson and Company) spiral hücre yayıcı sistem (WASP; Don Whitley Scientific) yardımıyla inokülasyon yapıldı. Koloniler 37°C'de 16-20 saatlik inkübasyondan sonra görüntüleme sistemi (UVITECH Cambrige) yardımıyla sayıldı.

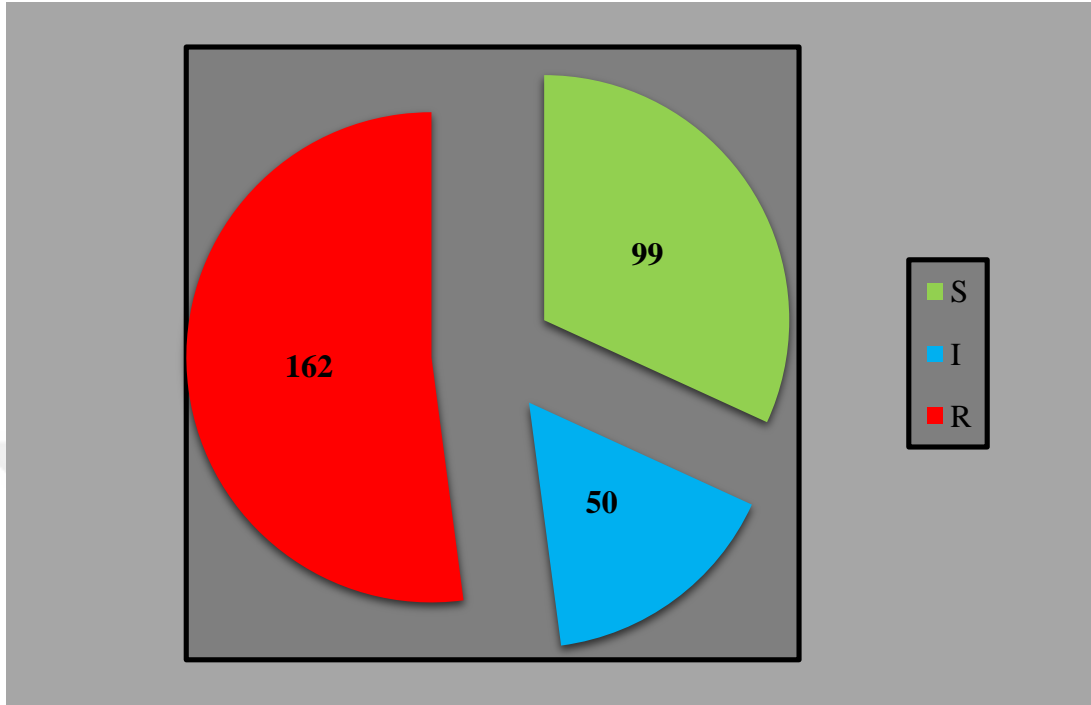
4. BULGULAR

4.1. Enrofloksasin Duyarlılığının Belirlenmesi

Toplam 311 *E. coli* izolatının enrofloksasin MİK'ları belirlendi. CLSI kriterlerine göre 99 tanesi duyarlı (% 31,8), 50 tanesi orta derecede duyarlı (% 16,1), 162 tanesi ise dirençli (% 52,1) olarak sınıflandırıldı. *E. coli* izolatlarının MİK dağılımları ve direnç yüzdeleri şekil 19, şekil 20 ve tablo 9'da gösterilmiştir. Buna göre en sık 64 µg/ml MİK 44 izolat için kaydedildi. *E. coli* izolatlarının 6 tanesi için en yüksek MİK değeri olan 256 µg/ml belirlendi ve MİK'u 0,008 µg/ml olan hiçbir *E. coli* izolatına rastlanamadı.



Şekil 19: *E. coli* izolatlarının ENR MİK dağılımları.



Şekil 20: *E. coli* izolatlarının ENR MİK dağılımları ve CLSI kriterlerine göre dirençlilik sınıflandırılması.

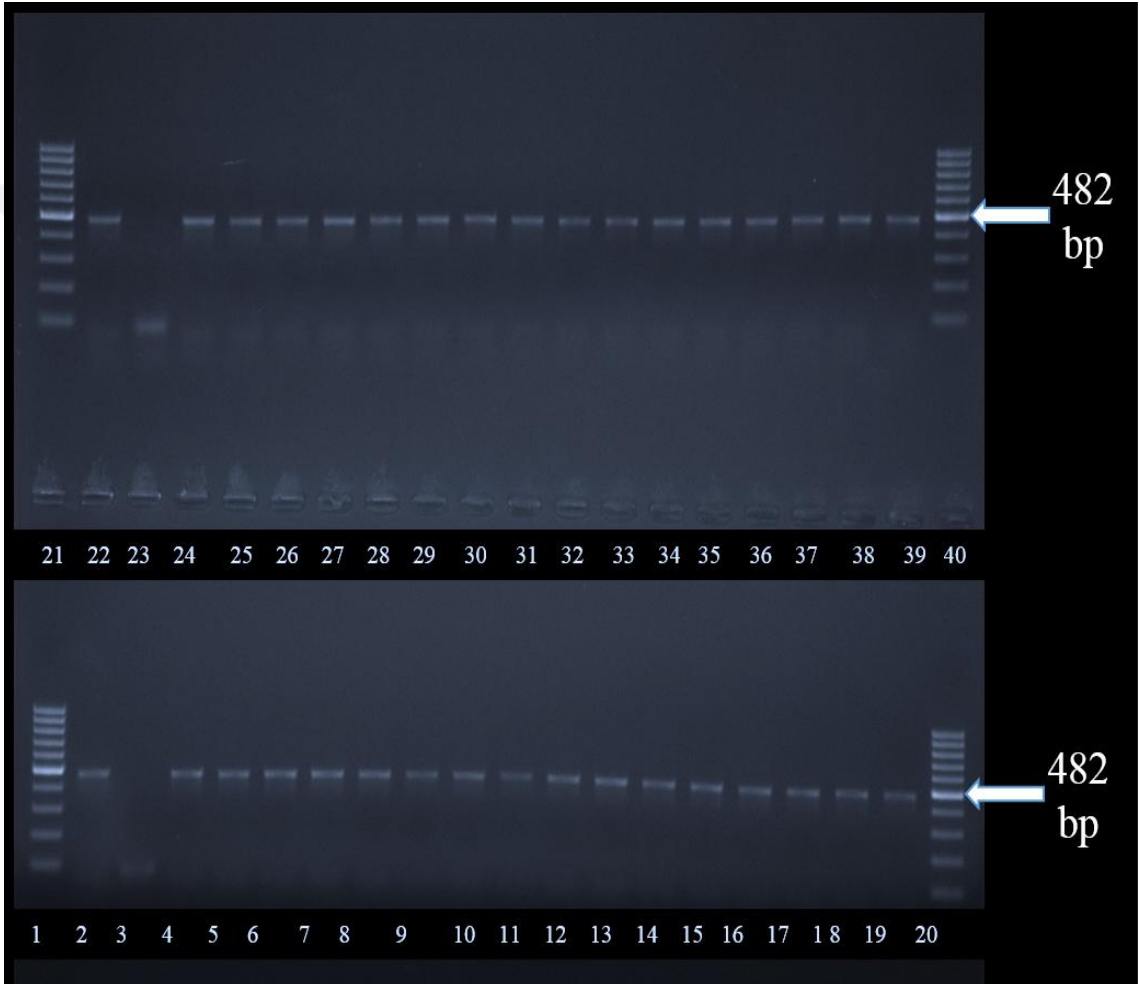
Tablo 9: *E. coli* izolatlarının ENR MİK dağılımları oranları.

MİK _{ENR} g/ml	İzolasyon Sayısı	Oran (%)
0,008	0	0
0,016	15	4,82
0,032	36	11,57
0,064	19	6,10
0,128	9	2,89
0,256	9	2,89
0,512	11	3,53
1	19	6,10
2	13	4,18
4	18	5,78
8	14	4,50
16	30	9,64
32	34	10,93
64	44	14,14
128	23	7,39
256	11	3,53
≥256	6	1,92

4.2. PCR-Amplifikasyonu ve Görüntüleme

PCR sonuçlarına göre *E. coli* izolatlarında 10 adet *qnrS* ve 32 adet *aac (6')-Ib* geni tespit edildi. *aac (6')-Ib-cr* ve *qnrS1* pozitif izolatlar şekil 21 ve 22'deki jel-elektroforez görüntüsünde izlenebilir. Tespit edilen genlerin dizilenmesi ve dizi analizinden sonra bu genlerin *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* varyantı olduğu doğrulandı. İki

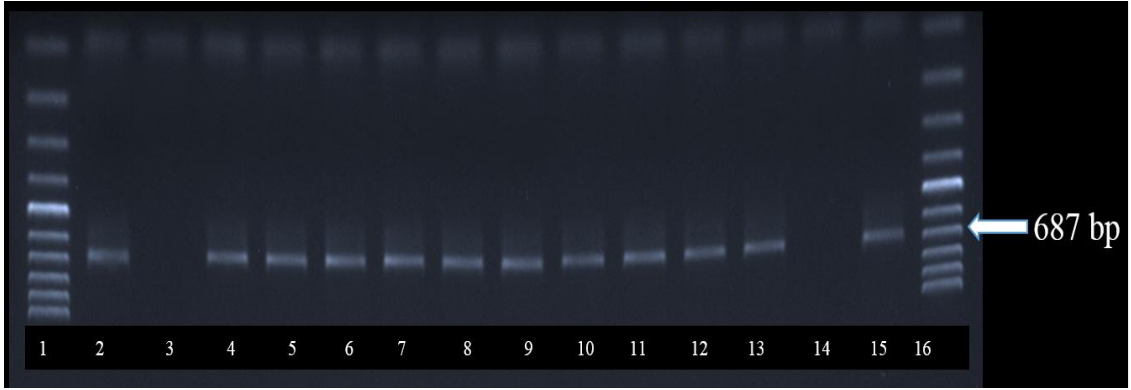
adet *E. coli* izolatının (E67 ve E101) *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerini birlikte taşıdığı belirlendi. Bu veriler doğrultusunda *qnrS1* geninin prevalansı % 3,3; *aac (6')-Ib-cr* geninin prevalansı % 10,3 ve her iki gene sahip *E. coli* izolatı prevalansı ise % 0,6 olarak belirlendi.



Şekil 21 *aac (6')-Ib-cr* pozitif izolatlara ait PCR görüntüsü.

1:Ladder, **2:** Pozitif kontrol, **3:** Negatif kontrol, **4:** E67, **5:** E68, **6:** E69, **7:** E70, **8:** E71, **9:** E72, **10:** E72, **11:** E73, **12:** E73, **13:** E74, **14:** E75, **15:** E76, **16:** E77, **17:** E78, **18:** E81, **19:** E88, **20:** Ladder.

21:Ladder, **22:** Pozitif kontrol, **23:** Negatif kontrol, **24:** E67, **25:** E68, **26:** E69, **27:** E70, **28:** E71, **29:** E72, **30:** E72, **31:** E73, **32:** E73, **33:** E74, **34:** E75, **35:** E76, **36:** E77, **37:** E78, **38:** E81, **39:** E88, **40:** Ladder.



Şekil 22 *qnrS* pozitif izolatlarla ait PCR görüntüsü.

1:Ladder, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif kontrol, 4: E67, 5: E68, 6: E69, 7: E70, 8: E71, 9: E72, 10: E72, 11: E73, 12: E73, 13: E74, 14: E75, 15: E76, 16: E77

4.3. Klonlama ve Transformasyon

4.3.1. Duyarlılık

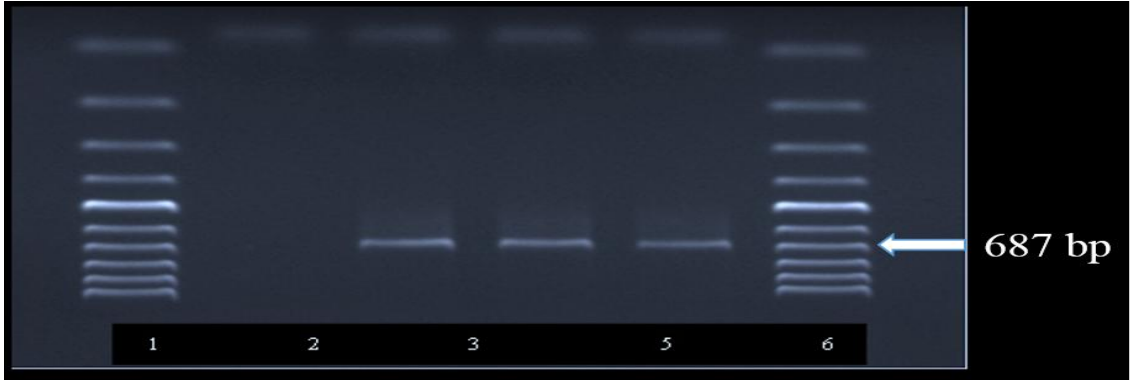
E. coli ATCC 25922 kontrol suşunun enrofloksasin MİK'u 0,032 g/ml olarak tespit edildi. *E. coli* ATCC 25922 suşuna *aac (6)-Ib-cr* geninin aktarılmasından sonra enrofloksasin MİK'nu 1 g/ml, *qnrS1* geninin aktarılmasından sonra 0,512 g/ml, hem *aac (6)-Ib-cr* hem de *qnrS1* geninin aktarılmasından sonra ise 1 g/ml'ye yükseldi. Klonlama çalışmalarına ait PCR kontrol görüntüleri şekil 23 ve 24'de sunulmuştur.

4.3.2. MÖK

E. coli ATCC 25922 kontrol suşunun enrofloksasin MÖK'u 0,128 g/ml olarak tespit edildi. *E. coli* ATCC 25922 suşuna *aac (6)-Ib-cr* geninin aktarılmasından sonra enrofloksasin MÖK'nu 4 g/ml, *qnrS1* geninin aktarılmasından sonra 2 g/ml, hem *aac (6)-Ib-cr* hem de *qnrS1* geninin aktarılmasından sonra ise 4 g/ml'ye yükseldi.

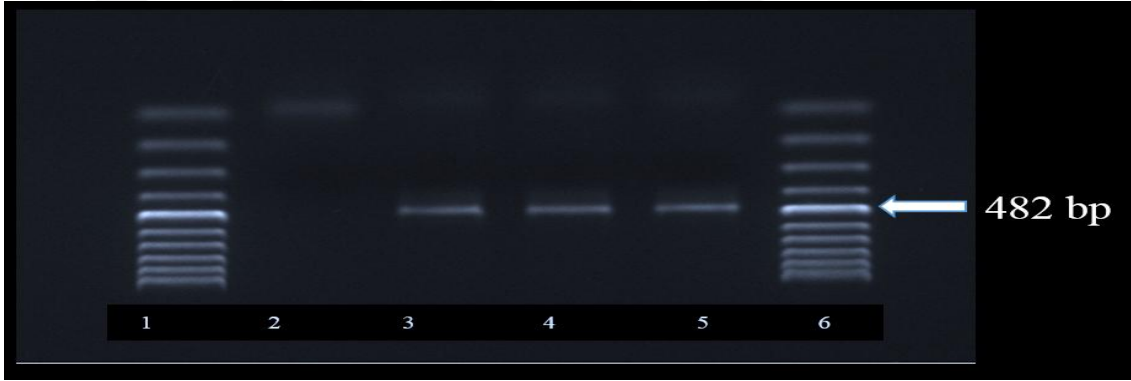
4.3.3. Mutant Frekansı

aac (6)-Ib-cr geninin aktarımı *E. coli* MF'nı 8,9 kat arttırdı. *qnrS1* geninin aktarımı *E. coli* MF değerini 92 kat arttırdı. Her iki genin aktarımı ise 209 katlık bir artışa neden oldu.



Şekil 23 *E. coli* ATCC 25922 kontrol suşuna *qnrS1* geni aktarılarak oluşturulan MtS ve MtSX klon suşlarının PCR kontrol görüntüsü.

1:Ladder, 2: Negatif kontrol, 3: Pozitif kontrol, 4: MtS, 5: MtSX, 6: Ladder.



Şekil: 24 *E. coli* ATCC 25922 kontrol suşuna *aac(6)-Ib-cr* geni aktarılarak oluşturulan MtX ve MtSX klon suşlarının PCR kontrol görüntüsü.

1:Ladder, 2: Negatif kontrol, 3: Pozitif kontrol, 4: MtX, 5: MtSX, 6: Ladder.

4.4. Mutant Önleyici Konsantrasyonun Belirlenmesi

Kontrol ve klon suşlar ile klinik *E. coli* izolatlarının MÖK'ları tablo 11'de verilmiştir. Bu verilere göre enrofloksasinin MÖK'u kontrol ve klon suşları için MİK'un 4, klinik *E. coli* izolatları için ise MİK'un 8 katı olarak belirlendi.

Tablo 11: Kontrol suşları ve izolatlar için belirlenen MÖK değerleri.

Bakteri	MİK _{ENR} g/ ml	MÖK _{ENR} µg/ ml
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,032	0,128
<i>E. coli</i> AG 100	0,032	0,128
MtS	0,512	2
MtX	1	4
MtSX	1	4
E248	1	4
E101	32	256
E103	128	1024
E247	128	1024
E308	128	1024

Kontrol ve klon suşlar ile klinik *E. coli* izolatlarının MÖK değerleri genetik özellikleri ile karşılaştırıldığında (tablo 12) *E. coli* ATCC 25922'ye *qnrS* geninin aktarılması MÖK'da 16 katlık bir artış sağladı. *aac (6')-Ib-cr* ve *qnrS1* genlerinin birlikte aktarımı ise 32 katlık bir artışa neden oldu.

Tablo 12: Kontrol ve klon suşları ve izolatlar için elde edilen MÖK verilerinin ve genetik özelliklerinin değerlendirilmesi

<i>E. coli</i>	<i>QRDR</i>	<i>PMQR</i>	Duyarlılık (ENR µg/ ml)			
			MİK	MÖK	MÖİ	MÖKX
ATCC	-	-	0,032	0,128	4	-
AG 100	-	-	0,032	0,128	4	-
MtS	-	<i>SI</i>	0,512	2	4	16
MtX	-	<i>cr</i>	1	4	4	32
MtSX	-	<i>SI, cr</i>	1	4	4	32
E101	-	<i>AI, cr</i>	32	256	8	2000
E103	-	<i>SI, cr</i>	128	1024	8	8000
E247	++(*)	<i>SI, oqxB</i>	128	1024	8	8000
E248	-	<i>SI</i>	1	8	8	64
E308	+++(**)	<i>SI</i>	128	1024	8	8000

*: E247 *gyrA* Ser83→Leu ve *parC* Ser80→Ile

** : E308 *gyrA* Asp87→Asn, *parC* Ser80→Ile ve *parE* ser458→Ala

MÖKX: Kontrol suşuna göre MÖK artışı

4.5. Mutant Frekansının Belirlenmesi

MF deneylerinin sonuçları tablo 12’de sunuldu.

Tablo 12: MF çalışmalarından elde edilen sonuçlar.

ENR µg/ml	MF									
	AG 100	ATCC	MtS	MtX	MtSX	E101	E103	E247	E248	E308
0,5xMİK	7,1x10 ⁻¹⁰	4,8x10 ⁻¹⁰	4,4x10 ⁻⁸	4,3x10 ⁻⁹	2,3x10 ⁻⁸	4,1x10 ⁻¹⁰	6,3x10 ⁻⁹	4,1x10 ⁻¹²	8,1x10 ⁻⁸	3,3x10 ⁻⁸
1xMİK	4,8x10 ⁻¹⁵	5,1x10 ⁻¹⁶	3,8x10 ⁻¹⁰	5,5x10 ⁻¹¹	4,2x 0 ⁻¹²	6,1x10 ⁻¹²	7,8x10 ⁻¹²	6,1x10 ⁻¹⁵	4,0x10 ⁻¹³	7,2x10 ⁻¹¹
2xMİK	6,3x10 ⁻¹⁸	5,2x10 ⁻¹⁸	5,2x10 ⁻¹⁴	4,9x10 ⁻¹⁴	3,1x10 ⁻¹³	2,4x10 ⁻¹⁴	4,9x10 ⁻¹⁶	3,9x10 ⁻¹⁷	6,6x10 ⁻¹⁵	5,7x10 ⁻¹⁴
4xMİK	0	0	0	0	0	6,0x10 ⁻¹⁵	1,2x10 ⁻¹⁸	5,9x10 ⁻¹⁸	2,4x10 ⁻¹⁶	6,2x10 ⁻¹⁸

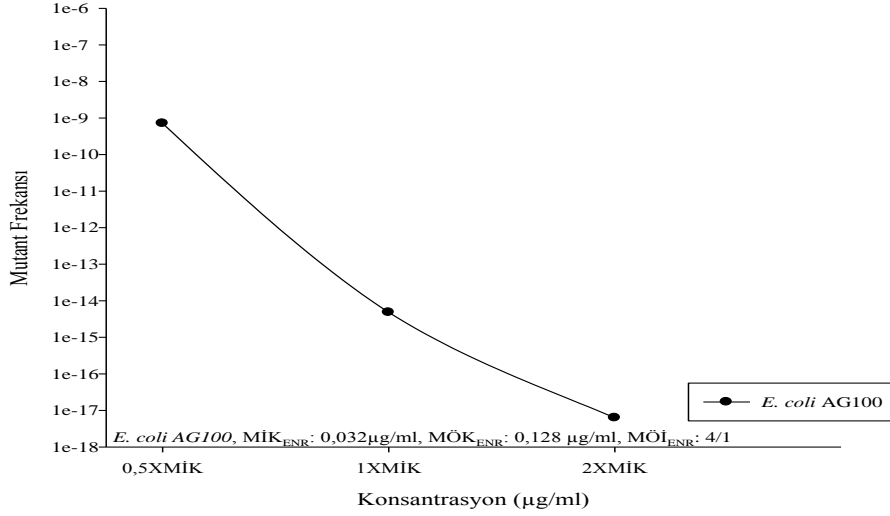
Bu verilere göre *E. coli* AG 100 ve *E. coli* ATCC 25922 kontrol suşları için hesaplanan MF değerleri sırasıyla 0,5xMİK, 1xMİK ve 2xMİK için 7,1x10⁻¹⁰; 4,8x10⁻¹⁵; 6,3x10⁻¹⁸ ve 4,8 x 10⁻¹⁰; 5,1 x 10⁻¹⁶ ve 5,2 x 10⁻¹⁸ cfu/ml’ydi. Kontrol suşları 4xMİK konsantrasyonunda tamamen inhibe edildi ve bu nedenle MF hesaplanmadı.

Moleküler yöntemler ile *E. coli* ATCC 25922 kontrol suşuna *aac (6’)-Ib-cr* geninin aktarımı ile oluşturulan MtX, ve *qnrS1* geninin aktarımı ile oluşturulan MtS klon suşları için hesaplanan MF değerleri sırasıyla 0,5xMİK, 1xMİK ve 2xMİK için 4,3 x 10⁹; 5,5 x 10⁻¹¹; 4,9 x 10⁻¹⁴ ve 4,4 x 10⁻⁸; 3,8 x 10⁻¹⁰; 5,2 x 10⁻¹⁴ cfu/ml’dir. Her iki genin aktarımı ile oluşturulan MtSX klon suşu için hesaplanan MF değerleri ise 2,3 x 10⁻⁸; 4,2 x 10⁻¹² ve 3,1 x 10⁻¹³ cfu/ml’dir. Klon suşlar 4xMİK konsantrasyonunda tamamen inhibe edildi ve bu nedenle MF hesaplanmadı.

Sadece bir adet PMQR genine (*qnrS1*) sahip olan *E. coli* E248 izolatu için hesaplanan MF değerleri sırasıyla 0,5xMİK, 1xMİK, 2xMİK ve 4xMİK için 8,1 x 10⁻⁸; 4,0 x 10⁻¹³; 6,6 x 10⁻¹⁵ ve 2,4 x 10⁻¹⁶ cfu/ml’dir. İki adet PMQR genine sahip *E. coli* E101 (*qnrA1* ve *aac (6’)-Ib-cr*) ve *E. coli* E103 (*qnrS1* ve *aac (6’)-Ib-cr*) izolatlarının MF değerleri sırasıyla 0,5xMİK, 1xMİK, 2xMİK ve 4xMİK için 4,1 x 10⁻¹⁰; 6,1 x 10⁻¹²; 2,4 x 10⁻¹⁴; 6,0 x 10⁻¹⁵ ve 6,3 x 10⁻⁹; 7,8 x 10⁻¹²; 4,9 x10⁻¹⁶; 1,2 x 10⁻¹⁸ cfu/ml’dir. PMQR gen/genleri ve QRDR mutasyonlarına sahip olan *E. coli* E247 (PMQR: *qnrS1* ve *oqxB*, QRDR: *gyrA* Ser83→Leu ve *parC* Ser80→Ile) ve *E. coli* E308 (PMQR: *qnrS1*, QRDR: *gyrA* Asp87→Asn, *parC* Ser80→Ile ve *parE* ser458→Ala) izolatlarının MF değerleri sırasıyla 0,5xMİK, 1xMİK, 2xMİK ve 4xMİK için 4,1 x 10⁻¹²; 6,1 x 10⁻¹⁵; 3,9 x 10⁻¹⁷;

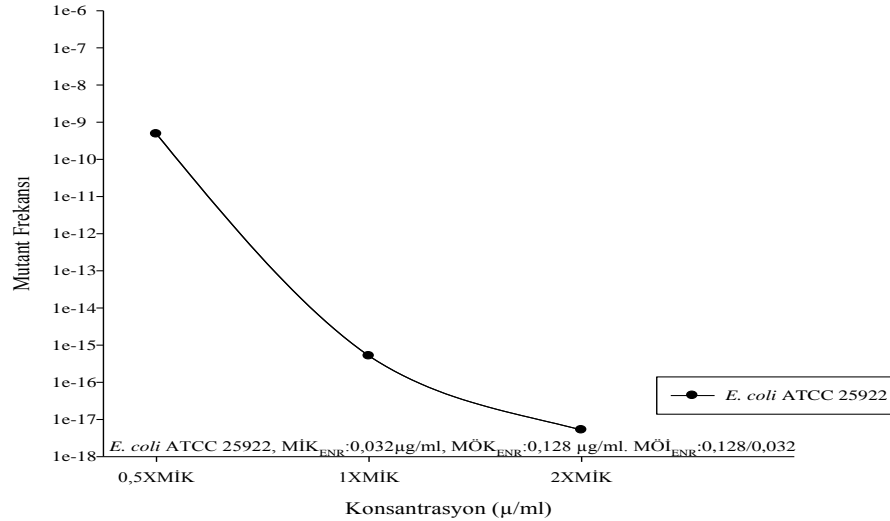
$5,9 \times 10^{-18}$ ve $3,3 \times 10^{-8}$; $7,2 \times 10^{-11}$; $5,7 \times 10^{-14}$, $6,2 \times 10^{-18}$ cfu/ml'dir. Kontrol, klon suşlar ve izolatlara ait MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi şekil 25-34'de verilmiştir.

E. coli AG100

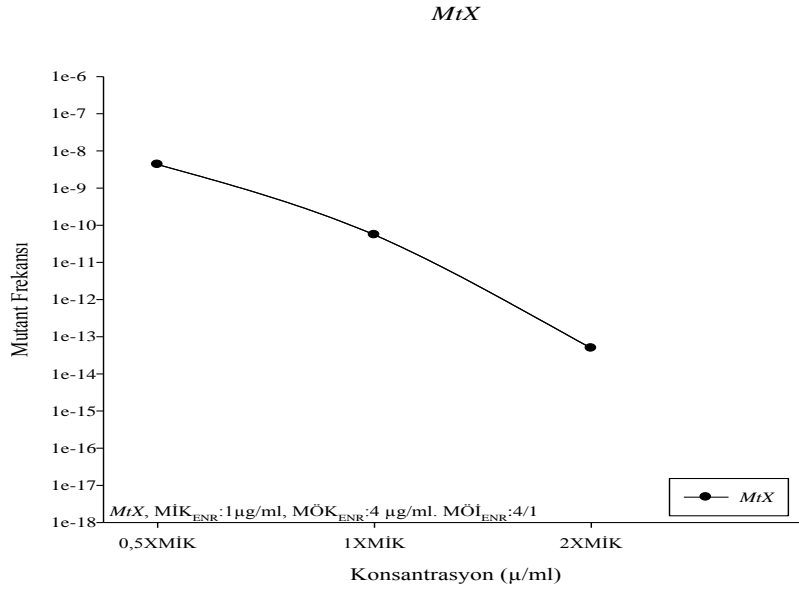


Şekil 25: *E. coli* AG 100 kontrol suşuna ait MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.

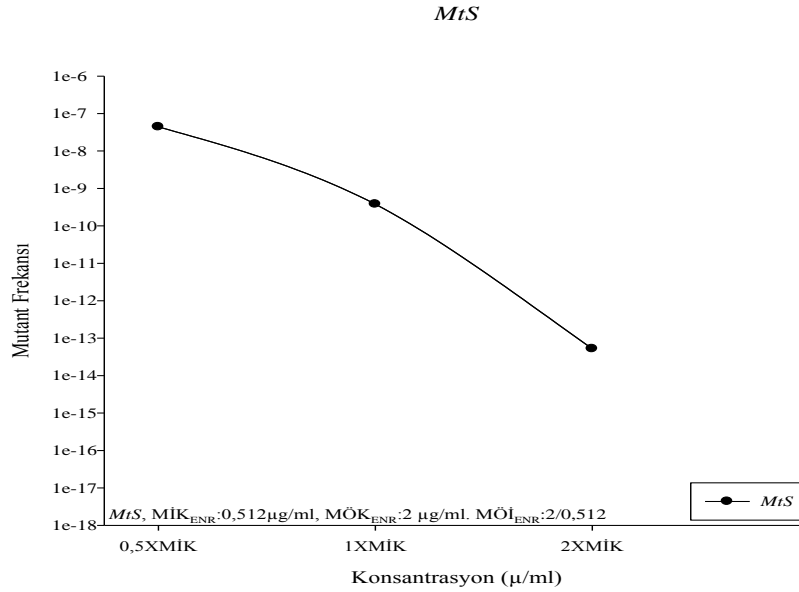
E. coli ATCC 25922



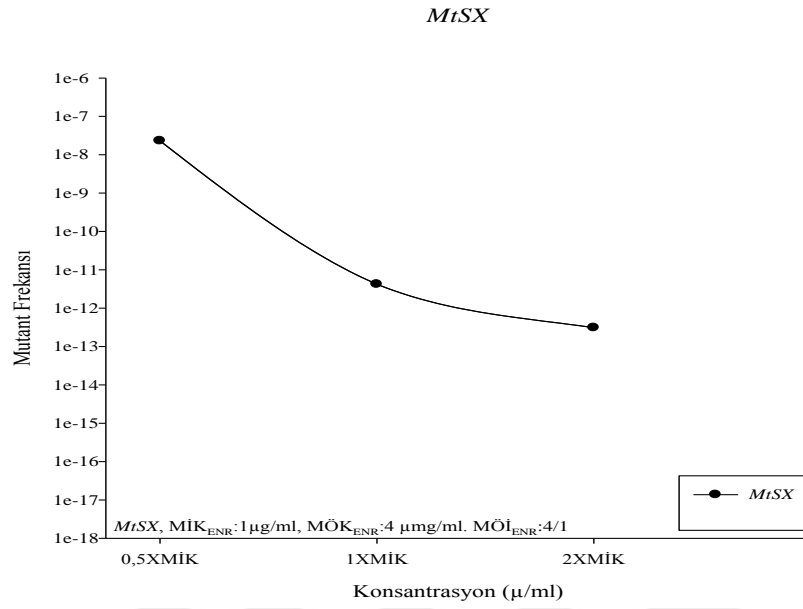
Şekil 26: *E. coli* ATCC 25922 kontrol suşuna ait MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.



Şekil 27: *MtX* suşuna ait MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.

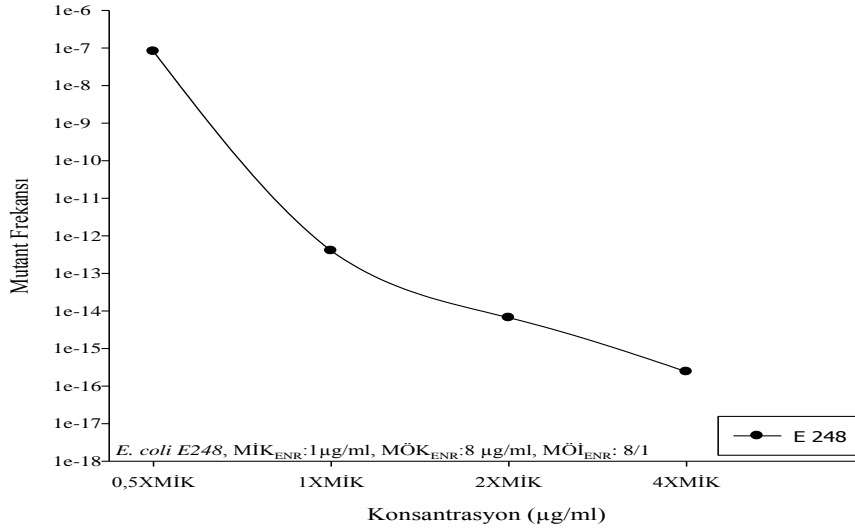


Şekil 28: *MtS* suşuna ait MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.



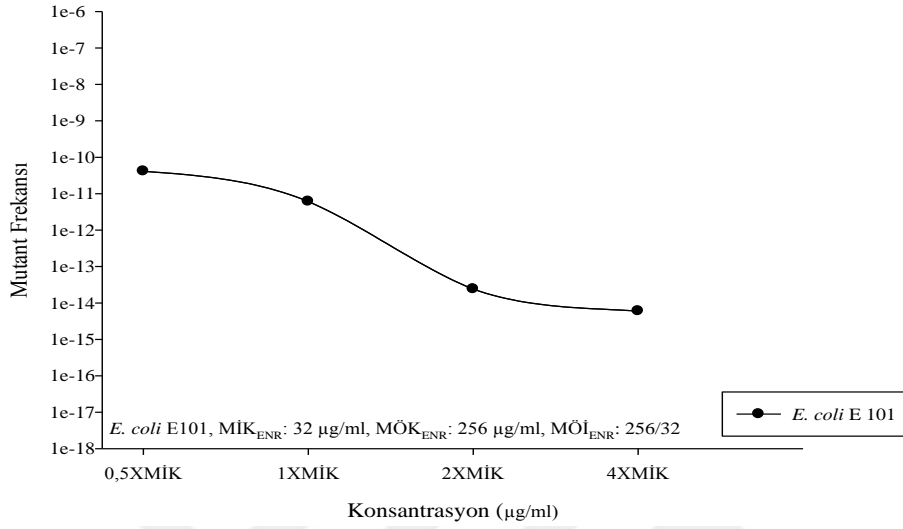
Şekil 29: *MtSX* suşununun MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.

E. coli E 248



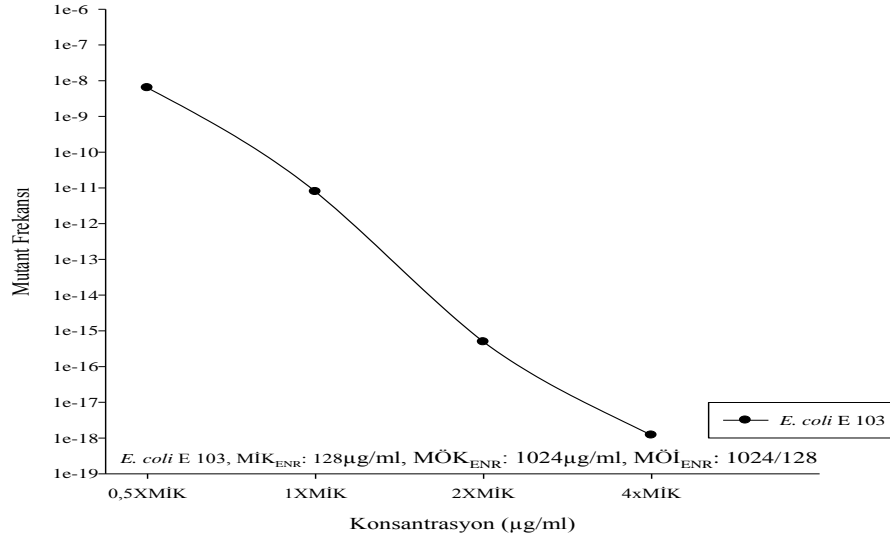
Şekil 30: *E. coli* E248 izolatının MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.

E. coli E 101



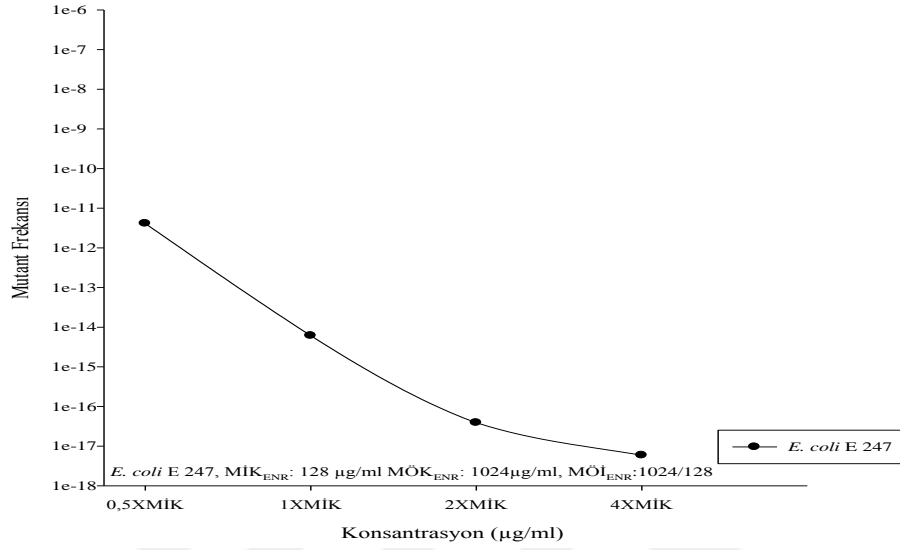
Şekil 31: *E. coli* E248 izolatına ait MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.

E. coli E 103



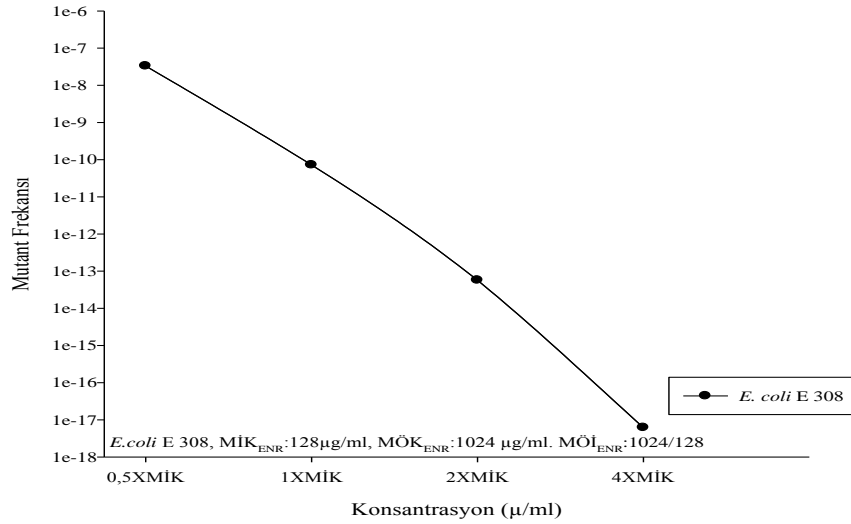
Şekil 32: *E. coli* E 103 izolatına ait MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.

E. coli E 247



Şekil 33: *E. coli* E 247 izolatına ait MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.

E. coli E 308



Şekil 34: *E. coli* E 308 izolatına ait MF değerlerinin enrofloksasin konsantrasyonlarına göre değişimi.

4.6. Mutant Seçim Penceresi

E. coli izolatları ile kontrol ve klon suşlarına ait MSP ve MÖİ verileri tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13: Hayvansal kökenli *E. coli* izolatlarının, kontrol ve klon suşları için belirlenen MSA ve MÖİ verileri.

Bakteri	MİK _{ENR} g/ ml	MÖK _{ENR} µg/ ml	MÖİ _{ENR}
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,032	0,128	0,128/0,032
<i>E. coli</i> AG 100	0,032	0,128	0,128/0,032
MtS	0,512	2	2/0,512
MtX	1	4	4/1
MtSX	1	4	4/1
E248	1	4	4/1
E101	32	256	256/32
E103	128	1024	1024/128
E247	128	1024	1024/128
E308	128	1024	1024/128

4.7. Zamana Bağlı Doz-Yanıt Deneyleri

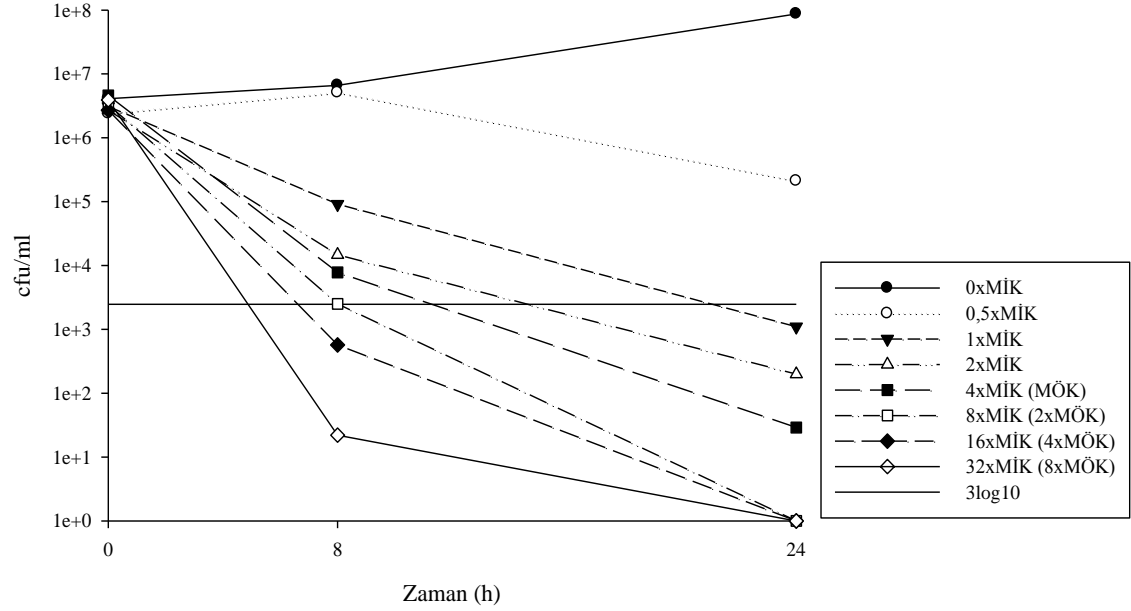
4.7.1. Kontrol Suşları

Enrofloksasin, kontrol suşlarına (*E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG 100) karşı konsantrasyona bağlı bakterisidal etki gösterdi. MİK'un 8 katı ve üzeri konsantrasyonlarda bakterisidal etki gözlemlendi.

4.7.1.1. *E. coli* ATCC 25922

E. coli ATCC 25922'ye karşı enrofloksasinin doz-yanıt grafiği şekil 35'de verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10^6 - 10^7 cfu/ml düzeyindeyken 8. saatin sonunda $8 \times \text{MİK} / 2 \times \text{MÖK}$ 'de bakteri sayısında $\geq 3 \log_{10}$ (% 99,9), $16 \times \text{MİK} / 4 \times \text{MÖK}$ ve $32 \times \text{MİK} / 8 \times \text{MÖK}$ 'de ise $\geq 4 \log_{10}$ düzeyinde bir azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde MİK'da bakteri sayısında $\geq 3 \log_{10}$, $2 \times \text{MİK}$ 'da $\geq 4 \log_{10}$, $4 \times \text{MİK} / \text{MÖK}$ 'da $\geq 5 \log_{10}$, $8 \times \text{MİK} / 2 \times \text{MÖK}$, $16 \times \text{MİK} / 4 \times \text{MÖK}$ ve $32 \times \text{MİK} / 8 \times \text{MÖK}$ 'de ise $\geq 6 \log_{10}$ düzeyinde bakterisit etki gözlemlendi.

E. coli ATCC 25922



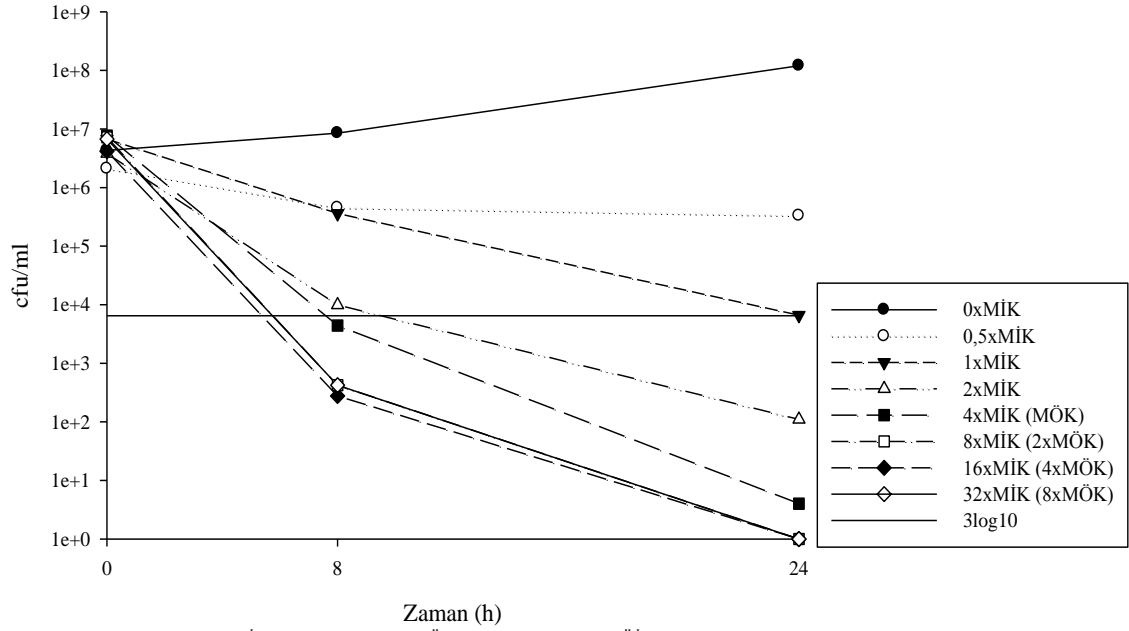
E. coli ATCC 25922, MİK_{ENR}: 0,032 µg/ml, MÖK_{ENR}: 0,128 µg/ml, MÖI_{ENR}: 0,128/0,032

Şekil 35: Enrofloksasin için *E. coli* ATCC 25922'ye ait zaman-yanıt grafiği.

4.7.1.2. *E. coli* AG 100

Kontrol suşu olan *E. coli* AG 100'ye karşı enrofloksasinin doz-yanıt grafiği şekil 36'da verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10⁶-10⁷ cfu/ml düzeyindeyken 8. saatin sonunda 4xMİK/MÖK'da bakteri sayısında $\geq 3 \log_{10}$ (% 99,9), 8xMİK/2xMÖK, 16xMİK/4xMÖK ve 32xMİK/8xMÖK'da $\geq 4 \log_{10}$ azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde MİK'da $\geq 3 \log_{10}$, 2xMİK'da $\geq 4 \log_{10}$, 4xMİK/MÖK'da $\geq 5 \log_{10}$, 8xMİK/2xMÖK, 16xMİK/4xMÖK ve 32xMİK/8xMÖK'da ise mutlak bakterisidal etki görüldü ($\geq 6 \log_{10}$).

E. coli AG100



E. coli AG100, MİK_{ENR}: 0,032 µg/ml, MÖK_{ENR}: 0,128 µg/ml, MÖİ_{ENR}: 0,128/0,032

Şekil 36: Enrofloksasin için *E. coli* AG 100'e ait zaman-yanıt grafiği.

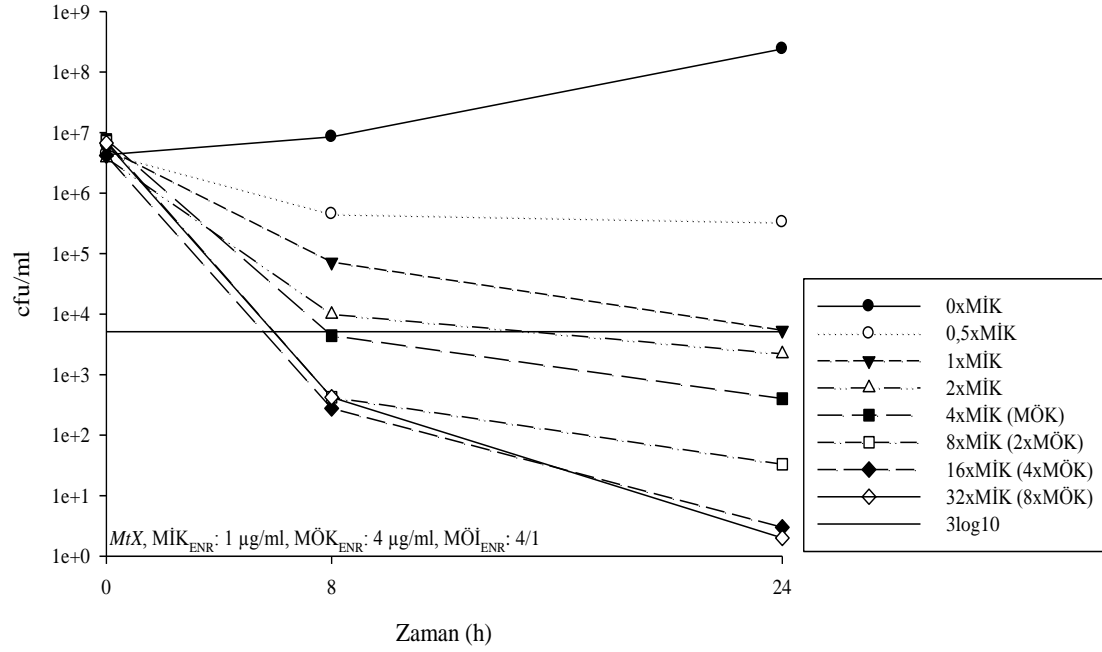
4.7.2. Klon Suşlar

Enrofloksasin klon suşlar üzerinde konsantrasyona bağlı bakterisidal etki göstermesine rağmen MtX, MtS, MtSX klon suşlarında deneyin 24. saatinde mutlak eliminasyon görülmedi.

4.7.2.1. MtX

E. coli ATCC 25922'ye *aac (6')-Ib-cr* geni transfer edilerek oluşturulan MtX klon suşuna karşı enrofloksasinin doz-etkinlik grafiği şekil 37'de verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10^6 - 10^7 cfu/ml düzeyindeyken 8. saatin sonunda 4xMİK/MÖK'da $\geq 3 \log_{10}$, 8xMİK/2xMÖK, 16xMİK/4xMÖK ve 32xMİK/8xMÖK'da $\geq 4 \log_{10}$ azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde 1xMİK ve 2xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$, 4xMİK/MÖK'da $\geq 4 \log_{10}$, 8xMİK/2xMÖK, 16xMİK/4xMÖK ve 32xMİK/8xMÖK'da $\geq 5 \log_{10}$ azalma belirlendi. MtX klonu için hiçbir konsantrasyon ve zamanda mutlak bakterisit etki gözlenmedi.

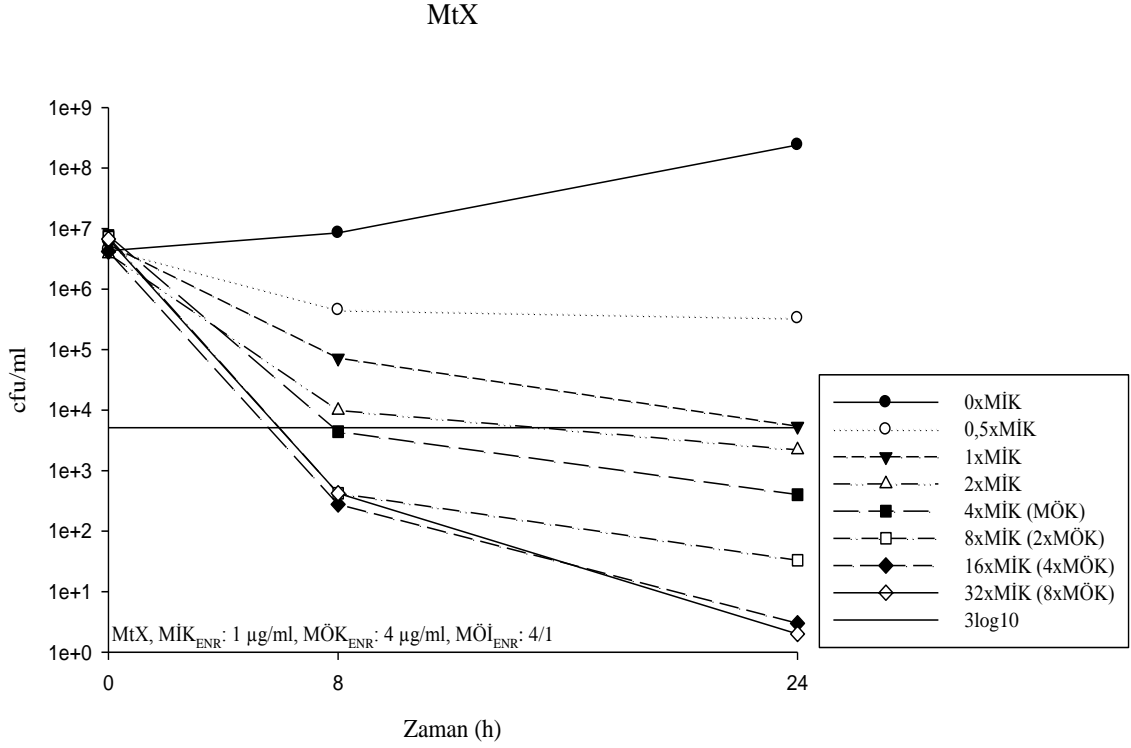
MtX



Şekil 37: Enrofloksasin için MtX'e ait zaman-yanıt grafiği.

4.7.2.2. MtS

E. coli ATCC 25922'ye *qnrS1* geni transfer edilerek oluşturulan MtS klon suşuna karşı enrofloksasinin doz-yanıt grafiği şekil 38'de verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10^6 - 10^7 cfu/ml düzeyindeyken 8. saatin sonunda 4xMİK/MÖK'da $\geq 3 \log_{10}$, 8xMİK/2xMÖK ve 16xMİK/4xMÖK'da $\geq 4 \log_{10}$, 32xMİK/8xMÖK'da ise $\geq 5 \log_{10}$ azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde 2xMİK'de $\geq 3 \log_{10}$, 4xMİK/MÖK'da $\geq 4 \log_{10}$, 8xMİK/2xMÖK, 16xMİK/4xMÖK ve 32xMİK/8xMÖK'da $\geq 6 \log_{10}$ azalma kaydedildi. MtS klonu için mutlak bakterisit etki gözlemlendi.

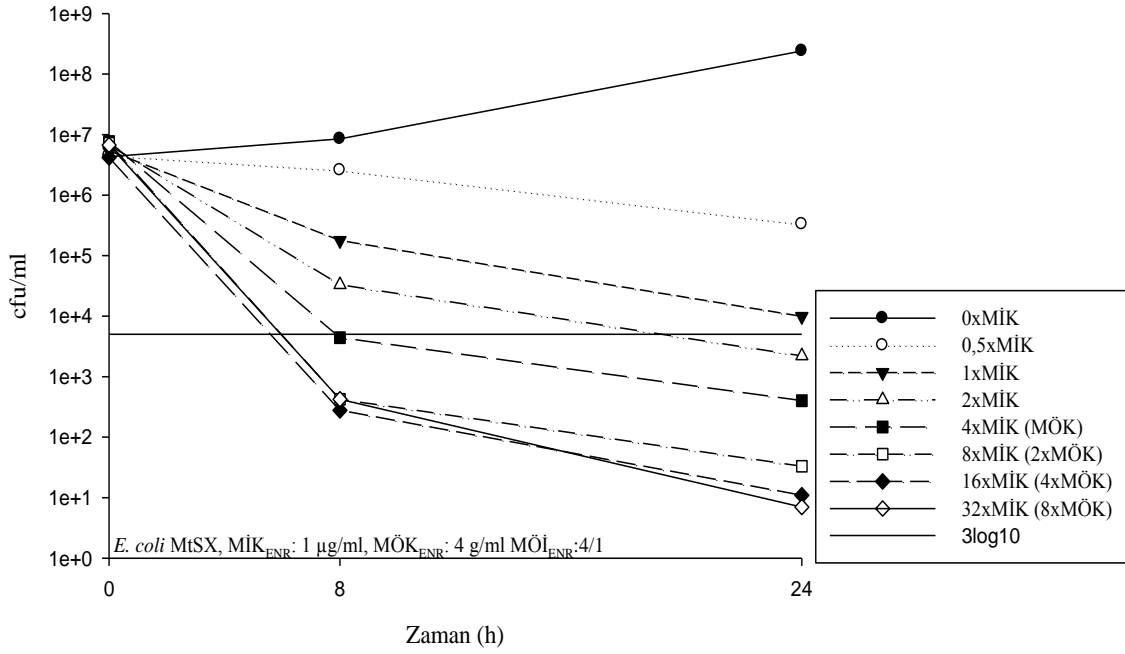


Şekil 38: Enrofloksasin için MtS'ye ait zaman-yanıt grafiği.

4.7.2.3. MtSX

E. coli ATCC 25922'ye *aac (6')-Ib-cr* ve *qnrS1* geni transfer edilerek oluşturulan MtSX klon suşuna karşı enrofloksasinin doz-yanıt grafiği şekil 39'da verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10^6 - 10^7 cfu/ml düzeyindeyken 8. saatin sonunda 4xMİK/MÖK'da $\geq 3 \log_{10}$ (% 99,9), 8xMİK/2xMÖK, 16xMİK/4xMÖK ve 32xMİK/8xMÖK'da $\geq 4 \log_{10}$ azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde 2xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$, 4xMİK/MÖK'da $\geq 4 \log_{10}$, 8xMİK/2xMÖK, 16xMİK/4xMÖK ve 32xMİK/8xMÖK'da $\geq 5 \log_{10}$ azalma kaydedildi. MtSX klonu için hiçbir konsantrasyon ve zamanda mutlak bakterisidal etki gözlenmedi.

MtSX



Şekil 39: Enrofloksasin için MtSX'e ait zaman-etkinlik grafiği.

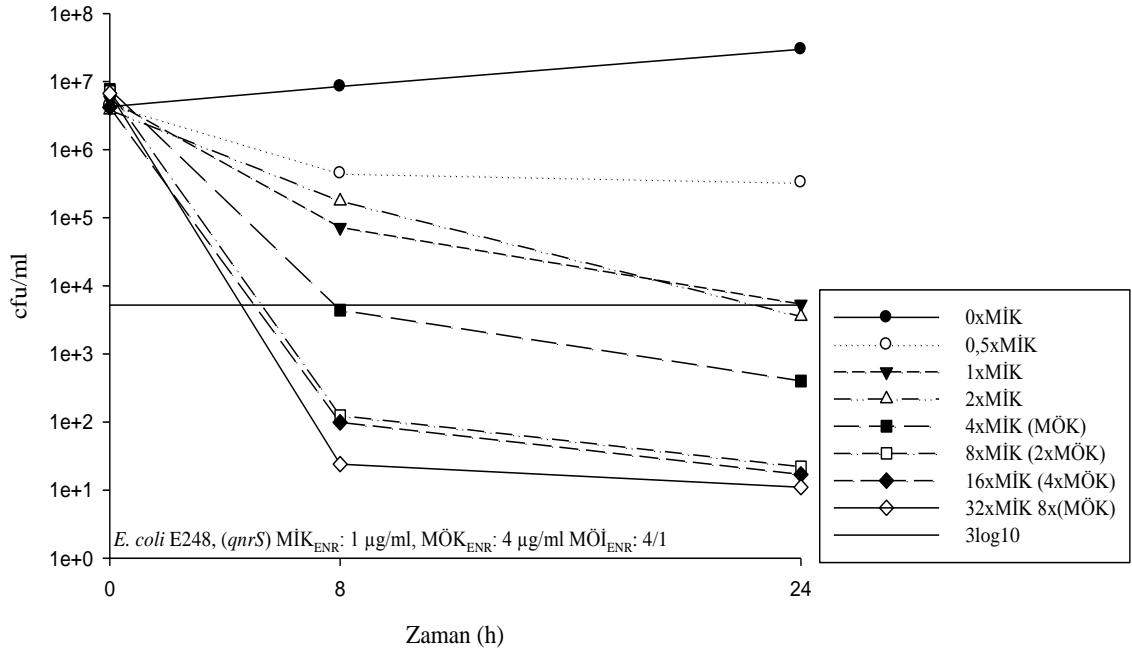
4.7.3. E. coli İzolatları

E. coli izolatlarının üzerinde enrofloksasinin klasik konsantrasyona bağlı bakterisit etkisi zamana bağlı doz yanıt deneylerinde belirlenemedi ve 24. saatin sonunda mutlak bakterisidal etki saptanamadı.

4.7.3.1. E. coli E248

E. coli E248 izolatına karşı enrofloksasinin ait doz-yanıt grafiği şekil 40'da verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10^6 - 10^7 cfu/ml düzeyindeyken 8. saatin sonunda 4xMİK/MÖK'da $\geq 3 \log_{10}$, 8xMİK/2xMÖK, 16xMİK/4xMÖK'de $\geq 4 \log_{10}$, 32xMİK/8xMÖK'da $\geq 5 \log_{10}$ azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde 1xMİK ve 2xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$, 4xMİK/MÖK'da $\geq 4 \log_{10}$, 8xMİK/2xMÖK, 16xMİK/4xMÖK ve 32xMİK/8xMÖK'da $\geq 5 \log_{10}$ azalma kaydedildi. *E. coli* E248 izolatı için mutlak bakterisit etki gözlenmedi.

E. coli E248

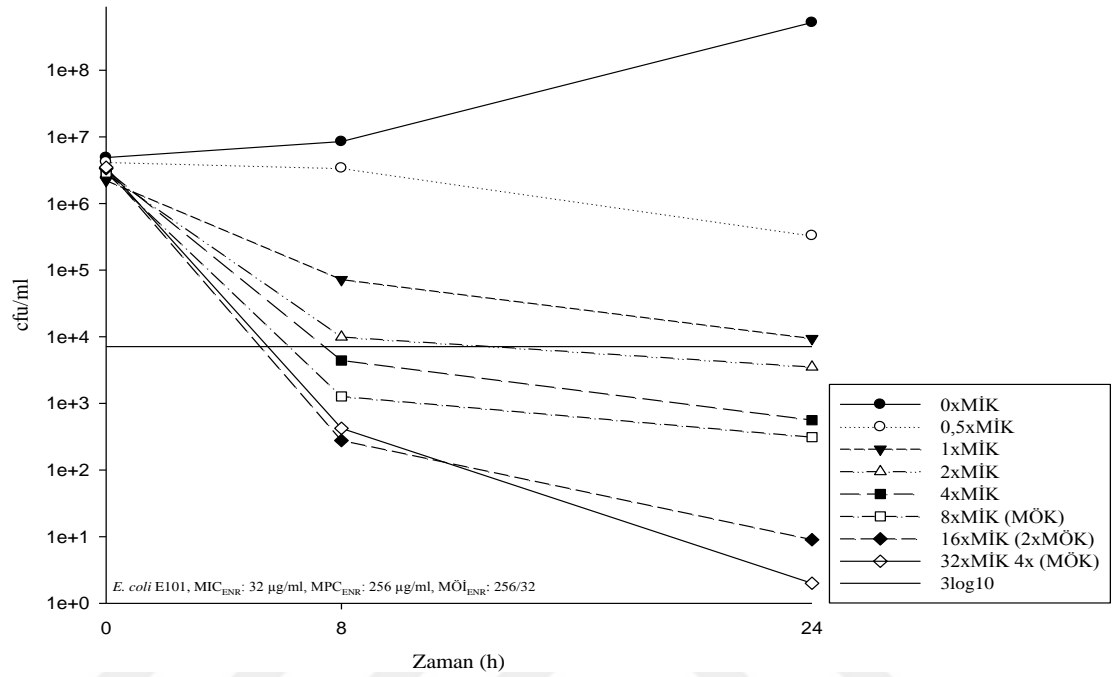


Şekil 40: Enrofloksasin için E 248'e ait zaman-etkinlik grafiği.

4.7.3.2. *E. coli* E101

E. coli E101 izolatına karşı enrofloksasine ait doz-yanıt grafiği şekil 41'de verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10^6 - 10^7 cfu/ml düzeyindeyken 8. saatin sonunda 2xMİK ve 4xMİK/MÖK'da ≥ 3 log₁₀, 8xMİK/2xMÖK'da ≥ 4 log₁₀, 16xMİK/4xMÖK ve 32xMİK/8xMÖK'da ≥ 5 log₁₀ azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde 1xMİK ve 2xMİK'da ≥ 3 log₁₀, 4xMİK/MÖK ve 8xMİK/2xMÖK'da ≥ 4 log₁₀, 16xMİK/4xMÖK'da ≥ 5 log₁₀, 32xMİK/8xMÖK'da ise ≥ 6 log₁₀'luk azalma kaydedildi. *E. coli* E101 izolatı için mutlak bakterisit etki gözlenmedi.

E. coli E101

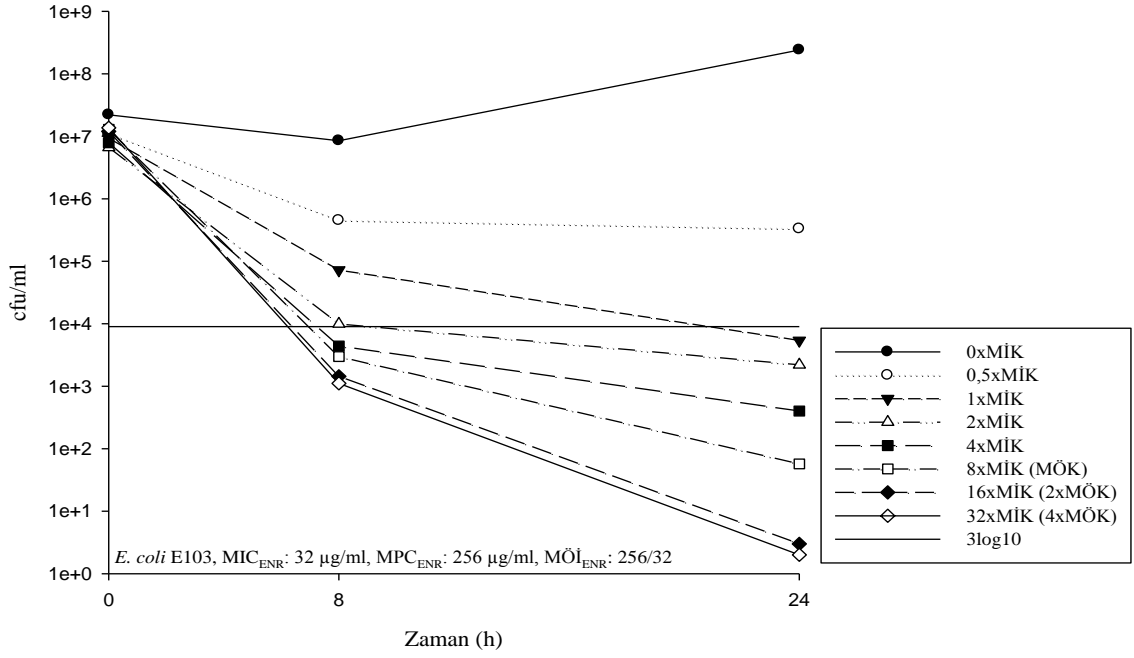


Şekil 41: Enrofloksasin için E 101'e ait zaman-etkinlik grafiği.

4.7.3.3. *E. coli* E103

E. coli E103 izolatına karşı enrofloksasine ait doz-yanıt grafiği şekil 42'de verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10^7 - 10^8 cfu/ml düzeyindeyken 8. saat sonunda MİK'da $\geq 1 \log_{10}$, 2xMİK ve 4x MİK'da $\geq 2 \log_{10}$, 8xMİK/MÖK'de $\geq 4 \log_{10}$, 8xMİK/MÖK, 16xMİK/2xMÖK ve 32xMİK/4xMÖK'de $\geq 5 \log_{10}$ azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde 1xMİK ve 2xMİK'de $\geq 3 \log_{10}$, 4xMİK ve 8xMİK/MÖK'da $\geq 4 \log_{10}$, 16xMİK/2xMÖK'de $\geq 5 \log_{10}$, 32xMİK/4xMÖK'de ise $\geq 6 \log_{10}$ 'luk azalma kaydedildi. *E. coli* E103 izolatı için mutlak bakterisit etki gözlenmedi.

E. coli E 103

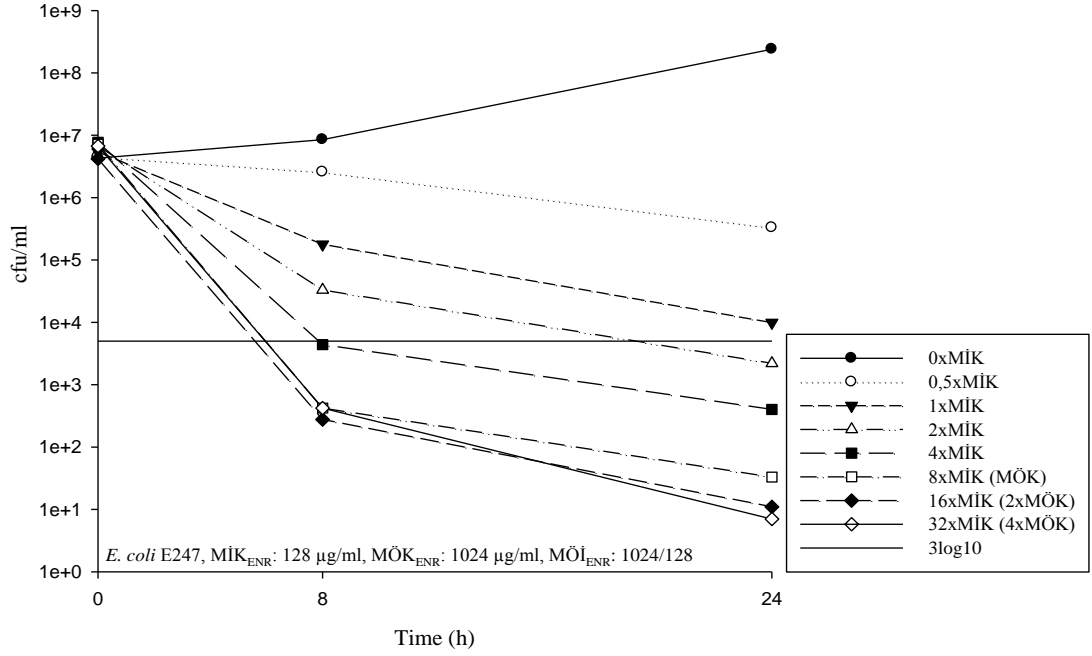


Şekil 42: Enrofloksasin için E 103'e ait zaman-etkinlik grafiği.

4.7.3.4. *E. coli* E247

E. coli E247 izolatına karşı enrofloksasine ait doz-yanıt grafiği şekil 43'de verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10^7 - 10^8 cfu/ml düzeyindeyken 8. saat sonunda MİK'da $\geq 1 \log_{10}$, 2xMİK'da $\geq 2 \log_{10}$, 4xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$, 8xMİK/MÖK'da $\geq 4 \log_{10}$, 16xMİK/2xMÖK ve 32xMİK/4xMÖK'da $\geq 5 \log_{10}$ azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde 1xMİK ve 2xMİK'de $\geq 3 \log_{10}$, 4xMİK ve 8xMİK/MÖK'da $\geq 4 \log_{10}$, 16xMİK/2xMÖK'da $\geq 5 \log_{10}$ ve 32xMİK/4xMÖK'de ise $\geq 6 \log_{10}$ 'luk azalma kaydedildi. *E. coli* E247 izolatı içi mutlak bakterisit etki gözlenmedi.

E. coli E 247

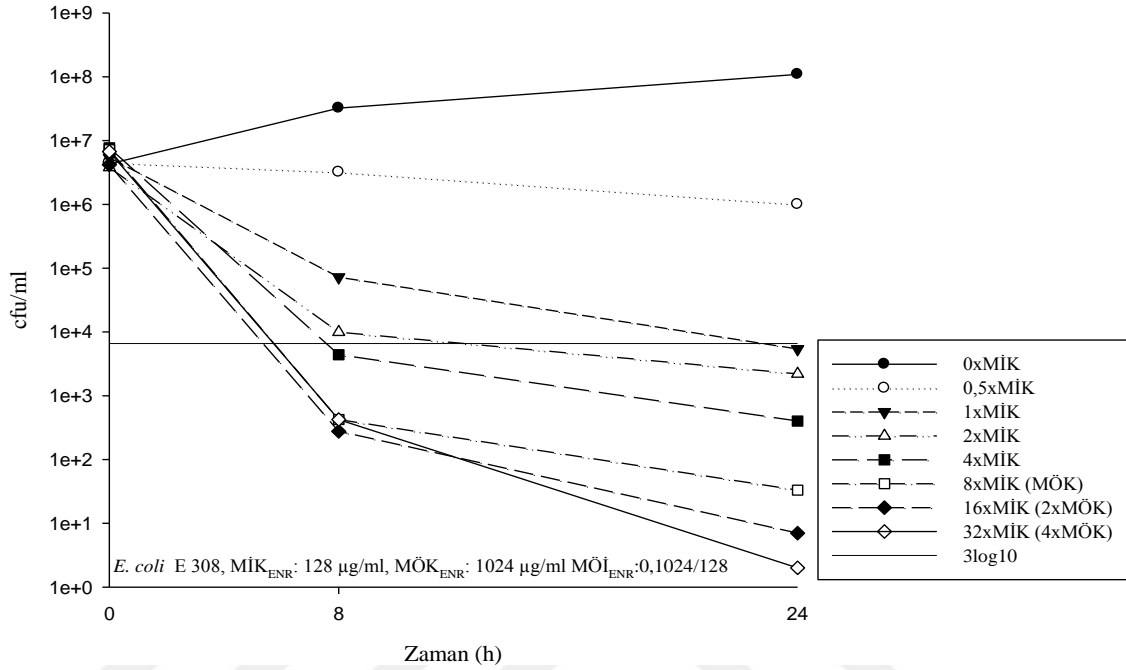


Şekil 43: Enrofloksasin için E 247'ye ait zaman-etkinlik grafiği.

4.7.3.5. *E. coli* E308

E. coli E308 izolatına karşı enrofloksasine ait doz-yanıt grafiği şekil 44'de verilmiştir. Deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda toplam bakteri sayısı 10^6 - 10^7 cfu/ml düzeyindeyken 8. saatin sonunda MİK'da $\geq 1 \log_{10}$, 2xMİK ve 4xMİK'da $\geq 2 \log_{10}$, 8xMİK/MÖK, 16xMİK/2xMÖK ve 32xMİK/4xMÖK'da $\geq 4 \log_{10}$ azalma belirlendi. Deneyin 24. saatinde 1xMİK ve 2xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$, 4xMİK'da $\geq 4 \log_{10}$, 8xMİK/MÖK, 16xMİK/2xMÖK, 32xMİK/4xMÖK'da ise $\geq 5 \log_{10}$ 'luk azalma kaydedildi. Mutlak bakterisit etki görülmedi.

E. coli E 308



Şekil 44: Enrofloksasin için E 308'e ait zaman-etkinlik grafiği.

Zamana bağlı doz-yanıt verileri tüm suşlar için karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde kontrol suşları olan *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG 100 için elde edilen veriler birbirine paraleldi. Deneyin 24. saatinde *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG 100 için MİK'da bakteri sayısı $\geq 3 \log_{10}$ kadar azaldı. Deneyin 24. saatinin sonunda enrofloksasin 8xMİK ve daha yüksek konsantrasyonlarda her iki suş için de mutlak bakterisit etki gözlemlendi.

Kontrol suşları ve klon suşlara ait veriler karşılaştırıldığında, *qnrS1* geninin varlığı 24. saatte 1xMİK'da etkin inhibisyonu önlemiştir. Kontrol suşları ve MtS için deneyin 24. saatinde 8xMİK/2xMÖK'dan daha yüksek konsantrasyonlarda mutlak bakterisit etki gözlenirken, MtX ve MtSX için hiçbir konsantrasyonda bu etki izlenmedi. *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin birlikte bulunması 24. saatte inhibisyonu önledi.

qnrS1 geni taşıyan klon ve izolat *E. coli* (E248)'a ait zaman-yanıt verileri karşılaştırıldığında, her iki suş için de deneyin 8. saati için elde edilen veriler paraleldir. Deneyin 24. saatinde MtS suşu için 8xMİK/2xMÖK'da tam eliminasyon sağlanırken *E.*

coli E248 için hiçbir konsantrasyonda tam bir eliminasyon gözlenmedi. Enrofloksasin MtS'ye karşı konsantrasyona bağlı etki gösterirken aynı etki *E. coli* E248 için belirlenemedi.

MtSX (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve *E. coli* E103 (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*)'ün doz-yanıt grafikleri şekil 32 ve 35'de verilmiştir. Deneyin 0. saatinde tüm konsantrasyonlar için bakteri sayısı MtSX için 10^6 - 10^7 cfu/ml, *E. coli* E103 için 10^7 - 10^8 cfu/ml olarak bulundu. Deneyin 8. saatinde MtSX için 4xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$ (% 99,9) kadar bir azalma belirlenirken, aynı etki *E. coli* E103 için 2xMİK'da gözlendi. Deneyin 24. saatinde elde edilen sonuçlar her iki suş için de benzerdir. MtSX ve *E. coli* E103 için tam bir inhibisyon oluşmadı.

MtSX (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve *E. coli* E101 (*qnrA1* ve *aac (6')-Ib-cr*)'in doz-yanıt grafikleri şekil 32 ve 34'de verilmiştir. Her iki bakteri için elde edilen sonuçlar benzerdir. MtSX ve *E. coli* E101 için tam bir eliminasyon sağlanamadı.

Deneyin 8. saatinde *E. coli* E101 (*qnrA1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve *E. coli* E103 (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) için 2xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$ (% 99,9) kadar bir azalma gözlenmiştir. Aynı etki *E. coli* E247 (*gyrA* Ser83→Leu, *parC* Ser80→Ile/*qnrS1*, *oqxB*) ve *E. coli* E308 (*gyrA* Asp87→Asn, *parC* Ser80→Ile ve *parE* ser458→Ala) için 4xMİK'da gözlendi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Florokinolon dirençli bakteriler, kinolon grubu antimikrobiklerin kullanıma başlanmasından kısa süre sonra gözlenmiş ve 2000'li yılların başından itibaren yoğun kullanımına bağlı olarak yaygınlaşmaya başlamıştır (Khan ve ark., 2005; Shaheen ve ark., 2009; Dalhof 2012). NAUTICA (North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance: NAUTICA), ECDC, EARSS (European Antimicrobial Surveillance System: EARSS), NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System: NARMS) gibi küresel izleme programları florokinolon direncinin tüm bakteri türlerinde arttığını göstermektedir (Cengiz, 2010; Dalhoff 2012). Aynı zamanda birçok araştırma sonucuna göre son yıllarda *Enterobacteriaceae* türleri, özellikle de *E. coli* gibi toplum kaynaklı enfeksiyon etmenleri arasında florokinolon direncinin küresel olarak arttığı belirlenmiştir (Chambau ve ark., 2006; Dalhof, 2012; Strahilevitz ve ark., 2009; Wang ve ark., 2008). WHO'nun 2015 verilerine göre florokinolon dirençli *E. coli* prevalansı Afrika kıtasında % 14-71, Amerika kıtasında % 8-58, Doğu Akdeniz ülkelerinde % 21-62, Avrupa ülkelerinde % 8-48, Güney Doğu Asya ülkelerinde % 32-64 ve Batı Pasifik ülkelerinde % 3-96 arasında değişmektedir (WHO, 2015). Önemli saptamalardan biri daha önce florokinolon tedavisi görmemiş sağlıklı bireylerde sık bir şekilde florokinolon dirençli *E. coli* izolatlarına rastlanmasıdır. Florokinolonların pediatrik kullanımı olmamasına rağmen İspanya'da çocuklardan elde edilen sindirim sistemi florası kaynaklı *E. coli* izolatlarında florokinolon direnci prevalansı % 26, Çin'de ise % 73,7 olarak rapor edilmiştir. Her iki araştırma sonucuna göre florokinolon dirençli *E. coli* prevalansı yetişkinlerde saptanan orandan daha yüksektir (Lingren ve ark., 2003; Huang, 2015). Global izleme programları ve bağımsız raporlarına göre florokinolon direncinin özellikle Orta ve Güney Avrupa, Asya, Güney Amerika ülkelerinde yüksek olduğu ve hızla artmaktadır. Bu nedenle bu bölgeler riskli olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak florokinolon direncinin insan yoğunluğunun fazla olduğu sıcak ülkelerde daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Florokinolon direnci Kuzey Avrupa ülkeleri,

Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde daha düşüktür, ancak göz ardı edilmemesi gereken bir risktir (ECDC, 2009; ECDC, 2010; ECDC, 2011; ECDC, 2012; ECDC, 2013, ECDC, 2014; Dalhof, 2012; WHO, 2015).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalar florokinolon dirençli *E. coli* prevelansının % 5,5-20 arasında değiştiğini göstermektedir. Bu oranlar Asya ve Avrupa ülkelerine göre daha düşüktür ve yavaş bir artış gösterir (BCCDC, 2009; Dalhof, 2012; Karlowsky ve ark., 2002; Karlowsky ve ark., 2001; Gupta ve ark., 1999; Zhanel ve ark., 2002). Antimikrobiyal kullanma sıklığı direnç olasılığını artırır. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılan primer antimikrobiyal siprofloksasin 1999 yılından sonra levofloksasin yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmış ve levofloksasinin reçete edilme oranı 4 kat artmıştır. Bunun sonucunda levofloksasin dirençli *E. coli* prevelansı % 1'den % 9'a yükselmiştir (Dalhof 2012; Lin ve ark., 2008; Rattanaumpawan ve ark., 2010; Rattanaumpawan ve ark., 2011; Van Der Starre ve ark., 2011; Vasquez ve ark. 2009). Kanada'da üriner sistem enfeksiyonu kaynaklı *E. coli* izolatları ile yapılan yapılan bir araştırmada florokinolon dirençli *E. coli* prevelansı % 9 olarak bildirilmiştir (Dalhof, 2012; Jhonson, 2009). Güney Amerika ülkelerinde yapılan araştırmaların sonuçlarına göre florokinolon dirençli *E. coli* prevelansı % 7 ile % 70 arasında değişmektedir. Şili'de insan ve hayvan kaynaklı *E. coli* izolatlarında nalidiksik asit dirençli *E. coli* oranı %7 olarak bulunmuştur ve bu Güney Amerika ülkelerinde bildirilen en düşük değerdir. ARSEC'in (Antimicrobial Resistance Epidemiological Survey on Cystitis: ARSEC) 2003-2006 yılları arasında yaptığı izleme çalışmasında Brezilya'da florokinolon dirençli *E. coli* prevelansı % 10 olarak rapor edilmiştir (Schito ve ark., 2009). Üriner sistem enfeksiyonu kaynaklı *E. coli* izolatları ile yapılan çalışmalar Arjantin'de bu oranın % 25 olduğunu göstermektedir (Dalhof, 2012; Hernandez ve ark., 2013). Meksika'da çocuklardan toplanan fekal *E. coli* örneklerinde florokinolon direnç prevelansı en yüksek değere sahiptir ve bu oran % 61- % 70 düzeyindedir (Amabile-Cuevas, 2010; Hernandez ve ark., 2013; Marchisio ve ark., 2015; Zaidi ve ark., 2003)

Florokinolon dirençli *E. coli* kaynaklı enfeksiyonlar özellikle Asya ve Avrupa'da önemli bir sorun haline gelmiştir (ECDC, 2009; ECDC, 2010; ECDC, 2011; ECDC, 2012; ECDC, 2013, ECDC, 2014, Dalhof 2012). Florokinolon dirençli *E. coli* prevalansı Avrupa ülkelerinde yüksektir. Kargalarda yapılan bir araştırmada direnç prevalansının % 92'ye ulaşabildiği bildirilmiştir (Halova ve ark., 2014). 2003-2006 yılları arasında Avrupa ülkelerinde yapılan araştırmalar florokinolon dirençli *E. coli* prevalansının Rusya, İspanya ve İtalya'da % 10'un üzerinde olduğu rapor edilmiştir (Dalhof 2012; Naber ve ark., 2008; Neuzillet ve ark., 2012; Schito 2009). Çek Cumhuriyeti'nde 2001-2006 yılları arasında florokinolonların reçete edilme oranı dört kat artmış ve bunun sonucunda florokinolon dirençli *E. coli* prevalansı % 1'den % 11'e yükselmiştir (Zemkova ve ark., 2007). ECDC'nin (European Center for Disease Control: ECDC) 2009-2014 yılları arasındaki inceleme raporlarına göre Avrupa ülkelerinde florokinolon dirençli *E. coli* prevalansı % 11 ile % 52 arasında değişmektedir. En düşük direnç prevalansına sahip olan ülke Norveç'ken prevalansın en yüksek olduğu ülke Güney Kıbrıs'tır. florokinolon direnç prevalansı Norveç, İsveç, Estonya, Danimarka, Finlandiya ve Hollanda gibi kuzey ülkelerinde %15'in altındadır ve bu nedenle bu ülkeler düşük direnç riski olan ülkeler olarak sınıflandırılır. İngiltere, Fransa, Letonya, Çek Cumhuriyeti, Avusturya, Almanya, Belçika, İrlanda, Polonya ve Lüksemburg'da ise florokinolon dirençli *E. coli* prevalansı % 15-% 30 arasında değişmektedir. Malta, Macaristan, Yunanistan, Romanya, Portekiz, İspanya, Bulgaristan, Slovakya, İtalya ve Kıbrıs ise florokinolon dirençli *E. coli* prevalansının % 30'un üzerinde olduğu ülkelerdir ve ECDC bu ülkeleri yüksek direnç riski olan ülkeler olarak sınıflandırır (ECDC, 2009; ECDC, 2010; ECDC, 2011; ECDC, 2012; ECDC, 2013, ECDC, 2014,).

Asya ve Uzakdoğu ülkeleri için değişen prevalans oranları rapor edilmektedir. İran'da yapılan bir çalışmada daha önce florokinolon tedavisi uygulanmamış broilerlerden toplanan *E. coli* izolatlarında florokinolon direnç prevalansının % 100 varan düzeyde olabileceği bildirilmiştir (Moniri ve Dastehgoli, 2005). Japonya'da ticari bir laboratuardan elde edilen *E. coli* izolatlarında florokinolon direnç prevalansı % 34

olarak saptanmıştır (Yokota ve ark., 2012). Hindistan'da hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen *E. coli* izolatlarında florokinolon direnci % 70 olarak bildirilmiştir (Rath ve Padhyr, 2013). Endonezya'da yapılan populasyon bazlı geniş bir taramada florokinolon dirençli *E. coli* prevalansı % 23 olarak saptanmıştır (Kuntaman ve ark., 2005). Çinde hayvansal kaynaklı *E. coli* izolatlarında florokinolon direncinin % 95, insan kaynaklı izolatlarda ise % 74'e ulaşabildiği rapor edilmiştir (Yang ve ark., 2004; Huang ve ark., 2015). Bu tezin araştırmalarında duyarlılık testi sonuçlarına göre toplanan havansal kaynaklı *E. coli* izolatlarının % 52,1'i enrofloksasine dirençli bulunmuştur. Bu veriler diğer ülkelerde yapılan araştırmalarla karşılaştırılınca Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, ve tüm Avrupa ülkelerine göre daha yüksektir. Belirlenen dirençlilik düzeyine en yakın olan Avrupa ülkeleri Güney Kıbrıs (% 51,9), İtalya (% 42) ve Slovakya (% 40)'dır. Güney Amerika ülkeleri ile karşılaştırıldığında ise dirençlilik düzeyi Brezilya ve Arjantin'den yüksek, Meksikadan düşüktür. Uzakdoğu ülkelerinden (Japonya hariç) elde edilen veriler florokinolon dirençli *E. coli* prevalansının bu tezin araştırmalarında belirlenen dirençlilik düzeyinden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ülkemizde yapılan sınırlı sayıdaki araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Cengiz ve ark.; 2012). Örneğin Muştak ve arkadaşları (2013) tavuklarda florokinolon dirençli *E. coli* prevalansını % 50 olarak bildirmiştir. Global raporlara göre florokinolon dirençli patojenlerin prevalansları insan ve hayvan popülasyonu, hareketliliği ve etkileşim oranı, bağıl nem, sıcaklık, ekonomi, eğitim ve farkındalık oranları gibi faktörlere bağlı olarak artmaktadır. Bursa çevresindeki florokinolon dirençli *E. coli* prevalansının Avrupa ülkeleri için bildirilen değerlerden daha yüksek ve Güney Amerika ülkelerindeki değerlerden daha düşük olması bu faktörlere göre açıklanabilir.

qnr genleri ilk identifiye edilen ve en çok çalışılmış olan florokinolon direnç genleridir. Global olarak sıklıkla izole edilen *qnr* genleri *qnrA*, *B* ve *S*'dir. Bu genlerin yaygın bir şekilde bulunabildiğini gösteren birçok rapor yayınlanmıştır (Martinez ve ark., 1998; Strahilevitz ve ark., 2009). *qnrA*, *B* ve *S* genleri sıklıkla *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Salmonella enterica* klinik izolatlarında tespit edilmektedir (White ve ark., 2000). Bu genlerin prevalanslarının suş özelliklerine göre % 0,2 ile % 94 arasında

değişiklik gösterebildiği rapor edilmiştir (Rodríguez-Martínez 2011; Strahilevitz ve ark., 2009). *qnrA*, *B* ve *S* genlerinin prevalansı Amerika Birleşik Devletleri'nde % 26,5; İspanya'da % 3,7; Belçika'da % 18,8; Kanada'da % 0,8; Kore'de % 57, Çin'de % 34,7; Nijerya'da % 20, Japonya'da % 23,2; Arjantin'de % 33,2 Fransa'da % 2,7; Jameika'da % 32,5 olarak bildirilmiştir. (Briales ve ark., 2012; Cruz ve ark., 2013; Fortini ve ark., 2011; Halova ve ark., 2014; Kanamori ve ark., 2011; Ma ve ark., 2009; Liu ve ark., 2008; Park ve ark., 2010; Pitout ve ark., 2008; Poriel ve ark., 2006; Stephenson ve ark., 2010). İnsan ve hayvan kaynaklı *E. coli* izolatlarında en sık karşılaşılan *qnr* genleri *qnrB* ve *S*'dir (Briales ve ark., 2012; Cattoir ve ark., 2012; Fortini ve ark., 2011; Halova ve ark., 2014; Jiang, 2012; Kim ve ark., 2009; Sana ve ark., 2015; Tausova ve ark., 2012; Yang ve ark., 2009). Türkiye'de yapılan sınırlı sayıdaki araştırmaların sonuçlarına göre *qnrA* geni prevalansı % 0,6-% 5,3'tür (Cengiz ve ark., 2012; Muştak ve ark., 2012). *qnrB* geni prevalansı ise % 0,2' dir (Cengiz ve ark., 2012, Mustak ve ark., 2012). *qnrC* geni Çin'de *Proteus mirabilis* izolatında tanımlanmış ve prevalansı çok düşük bir gendir (Cattoir ve ark., 2012, Wang ve ark., 2009,). *qnrD* geni ise İspanya, İtalya, Danimarka ve Çin'de hem insan hem de hayvan suşlarında tespit edilebilmiştir ve prevalansı % 2 düzeyindedir (Cattoir ve ark., 2012; Veldman ve ark., 2011,). *qnrC* ve *D* genlerinin yaygınlığının şu an için tanımlandıkları ülkelerle sınırlı olduğu düşünülmektedir (Cattoir ve ark., 2012; Veldman ve ark., 2011). *qnrS* geni 2005 yılında Japonya'da gıda zehirlenmesine neden olan *Shigella flexneri* izolatında tanımlanmıştır. Günümüze kadar insan, domuz, kanatlı, sığır, at ve egzotik hayvan kaynaklı *E. coli* ve *Salmonella* izolatlarında bu gen tespit edilebilmiştir (Briales ve ark., 2012; ; Cattoir ve ark., 2012; Hata 2005; Veldman ve ark., 2011). *qnrS* geni prevalansının % 1,2 ile % 78 arasında değiştiği bildirilmiştir (Ahmed ve ark., 2007; Dolejska ve ark., 201; Gay ve ark., 2006; Halova ve ark., 2014; Jiang ve ark., 2012; Kim ve ark., 2009; Sana ve ark., 2015; Szmolka ve ark., 2011; Tausova 2012; Yang ve ark., 2009; Yue ve ark., 2011; Vien ve ark., 2009). *qnrS* geni coğrafik olarak yaygın bir dağılım gösterir (Cattoir ve ark., 2012, Strahilevitz ve ark., 2009; Veldman ve ark., 2011). *qnrS* geni prevalansı Amerika Birleşik Devletleri'nde % 1, Kanada'da % 0,8; Jameika'da % 9,6; İran'da % 1,2; Çin'de % 18, Kore'de % 2,1; Fransa'da % 1,6; Tunus'da % 6,4; Çek

Cumhuriyeti'nde % 7,2; Vietnam'da % 78,8 olarak bildirilmiştir (Goudarzi ve ark., 2015; Halova ve ark., 2014; Kim ve ark., 2013; Poriel ve ark., 2006; Pitout ve ark., 2008; Sana ve ark., 2015; Stephenson ve ark., 2010; Tausova ve ark., 2012; Vien ve ark., 2009; Wang ve ark., 2012). *qnrS* çevreden ve hayvanlardan izole edilen bakterilerde en sık identifiye edilen *qnr* genidir. (Cattoir ve ark., 2012). Ayrıca *qnrS* geni Avrupa'da *Salmonella* türleri arasında % 25 gibi yüksek bir oranda tespit edilmiştir. Bu durum gıda kaynaklı enfeksiyonlarda *qnrS* geninin florokinolon direnci açısından önemini gösterir (Cattoir ve ark., 2012, Veldman ve ark., 2011). *qnrS* geni ülkemizde ilk olarak insan kaynaklı *Enterobacteraceae* izolatlarında 2008 yılında identifiye edilmiş ve prevalansı % 0,4 olarak bildirilmiştir (Nazik ve ark., 2008). Türkiye'de *qnrS* geni hayvan kaynaklı *E. coli* izolatlarında ilk olarak 2012 yılında tanımlanmış ve prevalansı % 3,2 olarak bulunmuştur (Cengiz 2012). Daha sonra 2014 yılında kanatlı kaynaklı *Salmonella* izolatlarında *qnrS* geni tespit edilmiş ve bu genin prevalansı yine % 2,4 olarak bildirilmiştir (Ata ve ark., 2015). Bu araştırmada belirlenen prevalans değeri diğer ülkelerde bildirilen raporlarla karşılaştırıldığında minimum prevalans değerlerine yakındır ve buna göre Türkiye'de *qnrS* geninin hayvansal izolatlarda görülme sıklığı insan kaynaklı izolatlara göre daha yüksektir.

aac(6)-Ib-cr geni, ilk olarak 2004 yılında Çin'de *qnrA* pozitif bir *E. coli* klinik izolatında tespit edilmiştir. Çoğunlukla *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında rastlanmasına rağmen *Salmonella* ve *Aeromonas* türlerinde de bulunabildiği belirtilmiştir. (Ahmed ve ark., 2013; Liu ve ark., 2011; Robicsek ve ark., 2006). *aac(6)-Ib-cr* geninin bölgesel olarak *qnr* genlerinden daha sık görülebileceğini, prevalansının % 0,4 ile % 68 arasında değiştiğini ve coğrafik olarak geniş bir dağılım gösterdiği bildirilmiştir (Cattoir ve ark., 2012; Cruz ve ark., 2013; Robicsek ve ark., 2006; Yang ve ark., 2008). *aac(6)-Ib-cr* geni prevalansı Amerika Birleşik Devletleri'nde % 28, Kanada'da % 13, Arjantin'de % 42,4 (Cruz ve ark., 2013), Meksika'da % 15,1 (Silva-Sanchez ve ark., 2013), İspanya'da % 16,2, İtalya'da % 10, Belçika'da % 12,5; Slovenya'da % 50, İsrail'de % 13, Kore'de % 52,3; Çin'de % 37 ve İran'da % 68,8 (Doudarzi 2015) olarak rapor edilmiştir (Park ve ark., 2006, Pitout ve ark., 2008,

Briales ve ark., 2012; Veldman ve ark., 2011; Chmelnitsky ve ark., 2009, Avgustin ve ark., 2007, Kang ve ark., 2009, Lui ve ark., 2008, Ma ve ark., 2009; Yue ve ark., 2011). Türkiye’de *aac (6’)-Ib-cr* geni hayvan kaynaklı *E. coli* izolatlarında ilk olarak 2012 yılında tanımlanmış ve prevalansı % 10,5 olarak bulunmuştur (Cengiz ve ark., 2013). Bu tezin araştırma sonuçlarına göre *aac (6’)-Ib-cr* geninin prevalansı % 10,3 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç *aac (6’)-Ib-cr* geni prevalansının Avrupa ülkelerinde bildirilen değerlere yakın olduğunu gösterir.

aac(6’)-Ib-cr geninin özellikle *qnr* genleri ile birlikte bulunduğu sıklıkla rapor edilmektedir (Jiang ve ark., 2009, Ma ve ark., 2009; Yue ve ark., 2008, Strahvilheitz ve ark., 2009, Cengiz ve ark., 2013, Yang ve ark., 2010, Pitout ve ark., 2008). Fakat iki genin birlikte bulunma oranı *aac(6’)-Ib-cr* veya *qnrS* geninin tek başına bulunma oranlarına kıyasla oldukça düşüktür. *aac(6’)-Ib-cr* geni prevalansı Amerika’da % 3,2 (Halova ve ark., 2014) Kore’de % 0,4 (Yue ve ark., 2008) Kanada’da % 0,2 (Pitout ve ark., 2008) ve Çin’de % 0,1’dir (Yang ve ark., 2010). Bu tezin araştırmaları kapsamında *aac (6’)-Ib-cr* ve *qnrS1* genlerinin birlikte bulunma prevalansı % 0,643 olarak belirlenmiştir. Daha önceki raporlarda sunulan veriler ile karşılaştırıldığında bu oran ortalama değerler (%0,1; % 3,4) içerisindedir. Araştırma sonucunda *aac(6’)-Ib-cr* ve *qnrS1* geni prevalansı ortalama değerler arasında bulunmuş olmasına rağmen florokinolon dirençli *E. coli* prevalans değerinin yüksek oluşu başka direnç etmenlerinin varlığına bağlı olabilir.

Birçok araştırma sonucuna göre *qnr* genlerinin *in vitro* koşullarda bakteriler arasında aktarımı florokinolonların MİK değerlerinde 2-125 kat artışa neden olur (Wang ve ark., 2003, wang ve ark., 2004 Chowhury ve ark., 2011, Strahilevitz ve ark., 2009, Robiscek ve ark., 2006, Briales ve ark., 2011). Chowhury ve arkadaşları (2011) *qnr* genlerinin aktarıldığı *E. coli* transkonjugatlarının siprofloksasin, norfloksasin ve ofloksasin MİK değerlerini 10-75 kat arttırdığını belirlemiştir (Chowhury ve ark., 2011). Wang ve arkadaşları (2004) araştırmalarında *qnr* genlerinin siprofloksasin MİK değerini 32 kat arttırdığını bildirmiştir (Wang 2004). Cambau ve arkadaşları *qnrA* geninin *E. coli* BM13 suşuna aktarılması sonucu, nalidiksik asit, ofloksasin, levofloksasin,

siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerlerini sırasıyla 2, 15, 10, 24 ve 12 kat arttırdığını rapor etmiştir (Cambau ve ark., 2007). Gay ve arkadaşları *Salmonella* kaynaklı *qnrB2* ve *qnrB5* ile *qnrS1* ve *qnrS2* genlerinin *E. coli* J53 suşuna aktarılması sonucu nalidiksik asit MİK değerinin 8 ve siprofloksasin MİK değerinin ise 125 kat arttığını gözlemiştir. Jacoby ve arkadaşları (2006) *qnrA* ve *qnrB* genlerinin *E. coli* J53 suşuna aktarılması sonucu nalidiksik asit, siprofloksasin, gatifloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin MİK değerlerinin sırasıyla 8, 67, 33, 33 ve 34 kat artabileceğini göstermiştir (Jacoby ve ark., 2006a; Jacoby ve ark., 2006b). Cattoir ve arkadaşları (2006) *qnrS1* geninin *E. coli* DH10B suşuna aktarılması sonucu nalidiksik asit, siprofloksasin ve ofloksain MİK değerlerinin sırasıyla 8, 83 ve 24 kat artabileceğini bildirmiştir (Cattoir 2006). Briaies ve arkadaşları (2011) araştırmalarında *E. coli* ATCC25922 suşuna *qnrA1*, *B1* ve *S1* genlerini aktarmış ve siprofloksasin, moksifloksasin, levofloksasin, norfloksasin MİK'u ile MBK değerlerinin değişimi izlenmiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre *qnrA1* geninin aktarılması sonucu MİK siprofloksasin (0,002 µg/ml → 0,125 µg/ml), moksifloksasin (0,008 µg/ml → 0,5 µg/ml) ve levofloksasin (0,008 µg/ml → 0,5 µg/ml) için 62,5 kat, norfloksasin (0,015 µg/ml → 0,5 µg/ml) için ise 33,3 kat artmıştır. MBK ise siprofloksasin için 8,3 kat (0,015 µg/ml → 0,125 µg/ml), levofloksasin için 17 kat (0,03 µg/ml → 0,5 µg/ml), moksifloksasin için 33,3 kat (0,015 µg/ml → 0,5 µg/ml), norfloksasin için ise 33,3 (0,03 µg/ml → 0,1 µg/ml) kat artmıştır. *qnrB1* geninin *E. coli* ATCC 25922 suşuna *in vitro* aktarımı sonucunda belirlenen MİK değişimleri siprofloksasin için 62,5 (0,002 µg/ml → 0,125 µg/ml), moksifloksasin için 32 (0,008 µg/ml → 0,25 µg/ml), levofloksasin için 16 (0,008 µg/ml → 0,125 µg/ml), norfloksasin için 33 (0,015 µg/ml → 0,5 µg/ml) kattır. MBK, siprofloksasin için 8,3 (0,015 µg/ml → 0,125 µg/ml), levofloksasin için 83 (0,03 µg/ml → 0,25 µg/ml), moksifloksasin için 67 (0,015 µg/ml → 1 µg/ml), norfloksasin için ise 16,6 kat (0,03 µg/ml → 0,5 µg/ml) artmıştır. *qnrS1* geninin *E. coli* ATCC 25922 suşuna *in vitro* aktarımı sonucunda belirlenen MİK değişimleri siprofloksasin için 62,5 (0,002 µg/ml → 0,125 µg/ml), moksifloksasin için 32 (0,008 µg/ml → 0,25 µg/ml), levofloksasin için 62,5 (0,008 µg/ml → 0,5 µg/ml), norfloksasin için 32 (0,015 µg/ml → 0,5 µg/ml) kattır. MBK, siprofloksasin için 16.6 (0,015 µg/ml → 0,25 µg/ml),

levofloksasin için 166 (0,03 µg/ml → 0,5 µg/ml), moksifloksasin için 16 (0,015 µg/ml → 0,25 µg/ml), norfloksasin için ise 33 kat (0,03 µg/ml → 1 µg/ml) artmıştır (Briales ve ark., 2011). Bu tezin araştırmalarında *qnrS1* geninin *E. coli* ATCC 25922'ye *in vitro* olarak aktarılmasından sonra MİK 16 kat (0,032 µg/ml → 0,512 g/ml) artmıştır. Daha önce yapılan araştırma sonuçlarıyla karşılaştırıldığında *qnrS1* geni *E. coli* ATCC25922 suşunun enrofloksasin duyarlılığını belirtilen aralıklarda değiştirmiştir.

Genel olarak *aac (6')-Ib-cr* geni *qnr* genlerine göre daha düşük karakterli florokinolon direnci kodlar. Bu genin *E. coli*'ye *in vitro* aktarımı sonucu florokinolonların MİK değerlerinde 2-75 kat artış oluştuğu bildirilmiştir (Strah 2009, Chowhury 2011 ve ark., Robiscek ve ark., 2006a, Robiscek ve ark., 2006b, Emrich ve ark., 2010). Chowdhury ve arkadaşları (2011) *Vibrio flovialis* kaynaklı *aac (6')-Ib-cr* genini *E. coli* XL-1 suşuna aktarmış ve sonuç olarak nalidiksik asit, siprofloksasin, norfloksasin ve ofloksasin MİK değerlerinde sırasıyla 2, 21, 75 ve 21 kat artış gözlemiştir (Chowhury ve ark 2011). Robiscek ve arkadaşları *aac (6')-Ib-cr* geninin *E. coli* J53 suşuna aktarımı sonucu siprofloksasin ve norfloksasin MİK değerlerinde 2-4 kat artış oluştuğunu bildirmiştir (Robiscek 2006c). Nadine ve arkadaşları *aac (6')-Ib-cr* geninin siprofloksasin MİK değerini ortam pH'sına bağlı olarak 2-4 kat arttığını belirlemiştir (Nadine ve ark., 2010). *aac (6')-Ib-cr* geni florokinolon MİK değerleri üzerinde düşük düzeyli artışlara sebep olsa da MİK değerlerinde 10 kata kadar artış oluşturabilir (Robiscek ve ark., 2006). Bu tezin araştırmalarında *aac (6')-Ib-cr* geninin *E. coli* ATCC 25922'ye *in vitro* olarak aktarılmasından sonra MİK 32 kat (0,032 µg/ml → 1 g/ml) artmıştır. Daha önce yapılan araştırma sonuçlarıyla karşılaştırıldığında *aac (6')-Ib-cr* geni *E. coli* ATCC 25922 suşunun enrofloksasin duyarlılığını daha fazla azaltmıştır. Bu sonuç, Chowhury ve arkadaşlarının (2011) araştırma sonuçlarıyla benzerdir.

qnrA ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin aynı bakteriye ticari vektör aracılığıyla aktarılması ve bu aktarım sonucunda oluşabilecek etki ile ilgili bilimsel rapor bulunmamaktadır. Ancak *qnrA* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin ikisini birden taşıyan doğal plazmidlerle yapılan araştırmalarda ilgili plazmidin aktarımı sonucu elde edilen

duyarlılık değişiminin sadece 1 gen ile elde edilen değişime göre 16 kata kadar daha fazla olduğu bildirilmiştir (Xu ve ark., 2007, Robiscek ve ark., 2006c). Bu tezin araştırmaları kapsamında her iki genin *E. coli* ATCC 25922'ye *in vitro* aktarımı sonucu MİK değeri 32 kat artmıştır (0,032 µg/ml → 1 g/ml). Sadece *qnrS1* geninin aktarımı ile elde edilen duyarlılık değişimi 16, sadece *aac (6')-Ib-cr* geninin aktarımı ile elde edilen duyarlılık değişimi ise 32 kat olarak belirlenmiştir. Cattoir ve arkadaşları (Cattoir ve ark., 2007) *qnrB4* ve *qnrS1* genlerinin eşzamanlı olarak *E. coli* TOP10 suşuna aktarılması sonucu oluşan duyarlılık değişimi ile genlerin ayrı ayrı aktarılması ile oluşan değişiminin aynı olduğunu bildirmiştir. Belirgin bir değişiklik oluşmamasının nedeni olarak hedef mikroorganizmanın gen ekspresyon özellikleri gösterilmektedir (Cattoir ve ark., 2007).

Florokinolonların MÖK'ü test edilen mikroorganizmaya, mikroorganizmanın genetik yapısına ve seçilen ilacın özelliklerine bağlı olarak MİK'un 2 ile 136 katı arasında değişmektedir (Blondeau ve ark., 2012; Li ve ark., 2007, Randall ve ark., 2004, Olofson ark., 2007; Weitzel ve ark., 2005). Enrofloksasinin MÖK'ü ise mikroorganizmaya ve mikroorganizmanın genetik yapısına bağlı olarak MİK'un 2-32 katıdır (Balaje ve ark., 2013; Gebru ve ark., 2011; Ramalingam ve ark., 2015). Enrofloksasinin hayvansal kökenli *E. coli* izolatları üzerindeki MÖK'ü ise incelenen *E. coli* izolatının genetik yapısına bağlı olarak MİK değerinin 2-16 katıdır (Berl ve ark., 2015; Ozawa ve ark., 2013). Bu sonuçlardan farklı olarak Briaies ve arkadaşları (2011) *in vitro* koşullarda PMQR geni aktarılmış ve QRDR mutasyonu oluşturulmuş *E. coli* klon suşlarında MÖK'un mutasyonsuz suşların MÖK'una göre 8000 kata kadar artabildiğini rapor etmiştir (Briaies ve ark., 2011). Bu araştırmada *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG 100 için enrofloksasin MÖK'ü MİK'un 4 katı olarak belirlenmiştir. Linde ve arkadaşları (2004) araştırmalarında *E. coli* ATCC 25922'nin 20-37 °C'de, aerobik ve anaerobik üreme koşullarında siprofloksasin, norfloksasin ve ofloksasin MÖK'unun MİK'un 4 katı olduğunu bildirmiştir. Pasquali ve arkadaşlarına (2007) göre siprofloksasin ve enrofloksasinin *E. coli* ATCC 25922 için MÖK'ü MİK'un 8 ve 16 katıdır. Jacoby ve arkadaşları (2005) *E. coli* J53 için, MÖK'unun MİK'un 8 katı

olduğunu belirlemiştir. Martinez ve arkadaşları (2007) *E. coli* DH10B için siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin MÖK'ü MİK'un sırasıyla 8, 4 ve 30, *E. coli* J53 için ise 15, 8 ve 17 katı olarak tespit etmiştir. Shimizu ve arkadaşları (2013) PMQR geni ve QRDR mutasyonuna sahip olmayan (sokak suşu) *E. coli* izolatları için orbifloksasin MÖK'ünü MİK'un 4 ile 16 katı arasında değişebildiğini bildirmiştir. Briales ve arkadaşları (2011) başka bir araştırmada *E. coli* ATCC 25922 için MÖK'ü MİK'un 500 katı olarak belirlemiştir.

PMQR genlerinin kontrol suşlarının MÖK değerlerini 10-2000 kat arttırabileceği bilinmektedir (Briales ve ark., 2011; Jacoby ve ark., 2005, Martinez ve ark., 2007, Wong ve ark., 2014). Jacoby ve arkadaşları (2005) *qnrA* geninin *E. coli* J53 suşuna aktarılmasıyla siprofloksasin MÖK'unun 10 kat arttığını bildirmiştir. Martinez ve arkadaşları (2007) *qnrA* geninin *E. coli* J53 suşuna aktarılması sonucu oluşturulan klon suşun siprofloksasin ve levofloksasin MÖK'unun 67, moksifloksasin MÖK'unun ise 32 kat arttığını rapor etmiştir. Aynı çalışmada *qnrA* geninin *E. coli* DH10B suşuna aktarılmasıyla siprofloksasin ve levofloksasin MÖK'u133, moksifloksasin MÖK'u ise 33 kat artmıştır (Martinez ve ark., 2007). Briales ve arkadaşları (2011) *qnrA* geni *E. coli* ATCC 25922 suşuna aktarılınca MÖK siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve norfloksasin MİK'a göre sırasıyla 4000, 1000, 1000 ve 533; *qnrB* geni aktarılınca 1000, 500, 500 ve 523; *qnrS* geni aktarılınca ise 2000, 500, 500 ve 533 kat arttığını bildirmiştir. Jacoby ve arkadaşları (2005) *aac (6')-Ib-cr* geninin *E. coli* J53 suşunun MÖK'ünü 16 kat arttırdığını rapor etmiştir. *aac (6')-Ib-cr* ve *oqxA* geninin *Salmonella*'ya aktarılmasıyla MÖK 80 kata kadar artabilir (wong 2014). Bu tezin araştırmaları kapsamında, *E. coli* ATCC 25922'ye *qnrS* geninin aktarılmasıyla oluşturulan MtS klon suşunun MÖK değeri *E. coli* ATCC 25922' nin MÖK değerine göre 16 kat artmıştır. *E. coli* ATCC 25922'ye *aac (6')-Ib-cr* geninin aktarılmasıyla oluşturulan MtX klon suşunun MÖK'u *E. coli* ATCC 25922'nin MÖK'una göre 32 kat artmıştır. *E. coli* ATCC 25922'ye *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* geninin birlikte aktarılmasıyla oluşturulan MtSX klon suşunun MÖK değeri ise *E. coli* ATCC 25922'nin MÖK'una göre 32 kat artmıştır. *qnrS* genine sahip *E. coli* E248 izolatının MÖK'ü kontrol suşuna

göre 64, MtS klon suşuna göre ise 4 kat fazladır. *qnrA1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerine sahip olan *E. coli* E101 izolatının MÖK'u kontrol suşuna göre 2000, MtX ve MtSX suşlarına göre göre 128 kat fazladır. *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerine sahip olan *E. coli* E103 izolatının MÖK'u kontrol suşuna göre 8000, MtS suşuna göre 512, MtX ve MtSX suşlarına göre ise 256 kat fazladır. Sınırlı sayıdaki araştırma sonucuna göre florokinolon direnci ile ilişkili başka bir genetik faktör olmaması halinde QRDR mutasyonlarının MÖK'u 10-4000 kat arttırabileceği rapor edilmiştir (Jacoby 2005, Briales ve ark., 2011; Pasquali ve ark., 2007). Jacoby ve arkadaşları (2005) *E. coli* J53 suşunda oluşturulan *gyrA* mutasyonunun siprofloksasin MÖK'unu 10 kat arttırdığını bildirmiştir. Briales ve arkadaşları (2011) *E. coli* ATCC 25922 suşunda oluşturulan *gyrA* Ser83→Leu mutasyonunun siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin MÖK'unu 2000 norfloksasin MÖK'unu ise 4000 kat arttırdığını belirlemiştir. PMQR genleri ve QRDR mutasyonlarının MÖK üzerindeki kümülatif etkileri sayesinde florokinolonların MÖK'u MİK'a göre 8000 kata kadar artabilir (Briales ve ark., 2011). Briales ve arkadaşları (2011) *E. coli* ATCC 25922 suşunda oluşturulan *gyrA* Ser83→Leu mutasyonunun ve *qnrA* geni aktarımının siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve norfloksasin MÖK'unu kontrol suşuna göre sırasıyla 8000, 16000, 8000 ve 4000 kat arttırdığını belirlemiştir. Aynı QRDR mutasyonu ile *qnrB* geni ise bu bileşiklerin MÖK'unu sırasıyla 4000, 8000, 16000 ve 8000 kat artırır. *qnrS* geni ve *gyrA* Ser83→Leu mutasyonu birlikte sırasıyla 4000, 8000, 16000 ve 16000 katlık bir atış oluşturur (Briales ve ark., 2011). Bu tezin araştırma sonuçlarına göre hayvansal kökenli *E. coli* izolatlarının enrofloksasin MÖK'u MİK'un 8 katıdır. MÖK, *E. coli* ATCC 25922 ile karşılaştırıldığında *gyrA* Ser83→Leu ve Asp87→Tyr mutasyonları ile *qnrS1* ve *oqxB* genlerine sahip olan *E. coli* E247 izolatının enrofloksasin MÖK'u 8000 kat daha fazladır. *gyrA* Asp87→Asn, *parC* Ser80→Ile ve *parE* ser458→Ala mutasyonları ile *qnrS1* genine sahip olan *E. coli* E308 izolatının enrofloksasin MÖK'u kontrol suşuna göre 8000 kat fazladır ve bu veri daha önce yapılan araştırmaların sonuçları ile uyumludur. Daha önemli olarak *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin *E. coli*'ye aktarımı MÖK/MİK oranını değiştirmemiş olsa bile her iki parameterenin artan sayısal değeri, MÖK ve MİK konsantrasyonları arasındaki fark ile tanımlanan MSP aralığının

artmasına neden olmuştur. MSP değerinin artması enrofloksasin ile gerçekleştirilen antimikrobiyal kemoterapi uygulamalarında enrofloksasin plazma konsantrasyonunun mutant suşların oluşması için riskli olan MSP aralığında kalma süresini (TMSP) uzatarak dirençli alt-populasyonların oluşma potansiyelini arttır.

MF bir bakteri popülasyonunda mutasyon oluşma sıklığını gösterir. Antimikrobiyal direnç ilişkili MF ise belirli bir konsantrasyonda antimikrobiyal içeren *in vitro* koşullarda oluşan mutasyon sıklığıdır. Bakteri mutasyonu antimikrobiyale bağlı olarak *in vitro* koşullarda oluşabilse bile mutasyon oranını etkileyen başka faktörler de vardır. Bu faktörlerin bazıları: bakteri suşu, antimikrobiyal ajanın özellikleri, bakteri popülasyonu üzerindeki genel stres, kültür ortamının fiziksel ve kimyasal özellikleri ile mutasyonun gerçekleştiği gen bölgesinin karakteridir. Stabil koşullarda MF aynı suş için 10000 kata kadar değişebilir. Daha önemli olarak *in vitro* koşullardaki MF enfeksiyon bölgesinden daha düşük kabul edilir (Martinez ve ark., 2000). Bakteri kültürlerinde spontan tekli mutasyonların frekansı bakteri türüne ve genetik yapısına bağlı olarak 10^{-6} - 10^{-8} , ikili mutasyonların oluşma sıklığı ise genellikle 10^{-12} - 10^{-16} arasında değişmektedir (Monero ve ark., 2011; Zao ve Drilica, 2001). β -laktam ve florokinolon gibi antimikrobiyal ajanlar dirençli mutant oluşumunu hızlandırabilir. Florokinolonlar DNA hasarı oluşturarak etki gösterir ve buna bağlı olarak SOS yanıtını tetikleyerek MF'ni arttırabilir (Gillespie ve ark., 2005). Lopez ve arkadaşları (2009) siprofloksasinin 0,25; 0,5; 1 ve 2xMİK'da *E. coli* rekombinasyon oranlarını sırasıyla 2, 2,2; 5,8 ve 14 kat arttırdığını belirlemiştir. Birçok araştırma florokinolonların subinhibitor konsantrasyonlarda MF'ni arttırdığını, MİK'dan yüksek konsantrasyonlarda ise dramatik olarak azalttığını vurgulamaktadır (Browne ve ark., 2002; Cebrian ve ark., 2007; Drago ve ark., 2010; Kim ve ark., 2003.). Zhou ve arkadaşları (2000) siprofloksasinin subinhibitor konsantrasyonlarının *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* bakterilerinde MF'ni 10 kat arttırabileceğini göstermiştir. Henderson-Begg ve arkadaşları (2006) siprofloksasinin 0,5xMİK ve 0,75xMİK'da *Streptococcus pneumoniae* MF'ni 2-5 kat arttırabileceği rapor etmiştir. Test edilen ilacın kimyasal yapısı da MF'ni etkiler. Li ve arkadaşları (2002) *Streptococcus*

pneumoniae ile yaptıkları çalışmada moksifloksasinin MF'nı levofloksasine göre 100 kat azalttığını belirlemiştir. Test edilen ilacın konsantrasyonu da MF'nı etkileyen diğer bir faktördür. Gilespe ve arkadaşları (2005) siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin subinhibitor konsantrasyonlarının (0,5 x MİK) *Mycobacterium fortuitum*'un MF'nı sırasıyla 89, 95 ve 120 kat arttırdığını bildirmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda ise (0,125xMİK ve 0,25xMİK) MF artışını sırasıyla 3,1-5,6 kat olarak belirlenmiştir.

QRDR mutasyonları ve PMQR genlerinin bakterileri florokinolonların bakterisit etkisinden koruyarak florokinolon direncinin oluşmasını hızlandırabileceği ve bakterileri florokinolonların seçici baskısından koruyarak yaşamlarını sürdürmelerine önemli katkı sağlayabilir (Briales ve ark., 2011; Wong ve ark., 2014.). Wong ve arkadaşları (2009) *oqx* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin *Salmonella typhimurium*'da siprofloksasin dirençli alt popülasyonların oluşumunu hızlandığını bildirmiştir. Briales ve arkadaşları (2011) *qnrA1*, *qnrB1* ve *qnrS1* genleri ile *gyrA* ve *parC* mutasyonlarının siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve norfloksasin MÖK'ünü arttırarak dirençli bakterilerin oluşumuna katkı sağladığını göstermiştir. Bu tezin araştırma sonuçlarına göre *E. coli* ATCC 25922'nin 0,5xMİK'da MF $4,8 \times 10^{-10}$ cfu/ml'dir. *qnrS1* geninin aktarımı ile oluşturulan MtS suşu için aynı konsantrasyonda MF $4,4 \times 10^{-8}$ cfu/ml'dir. Buna göre *qnrS1* geni MF'nı yaklaşık 100 kat arttırmıştır. Aynı konsantrasyonda *aac (6')-Ib-cr* geninin aktarımı ile oluşturulan MtX suşu için belirlenen MF değeri ise $4,3 \times 10^{-9}$ cfu/ml olarak hesaplanmıştır ve bu veriye göre *aac (6')-Ib-cr* geni MF'nı 10 kat arttırmıştır. Her iki genin aktarımı ile oluşturulan MtSX suşu için hesaplanan MF değeri ise $2,3 \times 10^{-8}$ cfu/ml'dir ve bu değer yaklaşık 200 katlık bir artışı gösterir. *qnrS1* geni taşıyan *E. coli* E248 izolatu için mutant frekansı $8,1 \times 10^{-8}$ 'dir ve bu değer MtS klon suşuna göre yaklaşık 2 kat daha yüksektir. *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerini taşıyan *E. coli* E103 izolatının 0,5xMİK'da belirlenen MF değeri $6,3 \times 10^{-9}$ cfu/ml'dir. Bu değer her iki geni taşıyan klon suşa göre 30 kat daha düşüktür. *qnrA1* ve *aac (6')-Ib-cr* genine sahip olan *E. coli* E101 suşu için belirlenen MF değeri $4,1 \times 10^{-10}$ cfu/ml'dir ve yine bu değer MtSX klonuna göre yaklaşık 200 kat daha düşüktür. *gyrA* Ser83→Leu ve *parC* Ser80→Ile mutasyonları ile *qnrS1* ve *oqx* genlerine sahip olan *E. coli* E247 izolatu için MF değeri

$4,1 \times 10^{-12}$ cfu/ml'dir. *gyrA* Asp87→Asn, *parC* Ser80→Ile ve *parE* ser458→Ala mutasyonları ile *qnrS1* genine sahip olan *E. coli* E308 için MF değeri $3,3 \times 10^{-8}$ cfu/ml'dir. İzolatlara ait MF değerlerinin klon suşlara göre daha düşük olması ekspresyon kapasitelerinin daha düşük olmasından kaynaklanabilir. MF 1xMİK'da bütün suşlar için $0,5 \times \text{MİK}$ 'a göre çok daha düşüktür. En büyük azalma *E. coli* ATCC 25922 suşunda meydana gelmiştir ve MF değeri yaklaşık olarak 10^6 kadar azalmıştır. MtS suşu için azalma yaklaşık 10^2 'dir. Kontrol suşu ile karşılaştırıldığında *qnrS1* geni MİK'da MF değeri üzerinde 10^6 kadar bir artışa neden olmuştur. MtX suşunun MF değeri 10^3 kadar azalmıştır. *aac (6')-Ib-cr* geni mutant frekansını kontrol suşuna göre 10^3 kadar arttırmıştır. MtSX suşu için MF değerinde yaklaşık 10^4 kadar azalmış ve kontrol suşu ile karşılaştırıldığında MF'nı 10^5 kadar daha fazladır. *E. coli* E101, *E. coli* E103, *E. coli* E247, *E. coli* E248 ve *E. coli* E308 izolatları için belirlenen değerler sırasıyla 10^2 , 10^3 , 10^3 , 10^5 ve 10^3 kadar oluşan azalmalardır. MF 2xMİK'da kontrol suşları için $6,3 \times 10^{-18}$ ve $5,2 \times 10^{-18}$ cfu/ml'dir. MtS ve MtX suşları için MF değerleri $5,2 \times 10^{-14}$ ve $4,9 \times 10^{-14}$ cfu/ml'dir. *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genleri 2xMİK'da MF yaklaşık 10^4 kat arttırmıştır. MtSX suşunun MF değeri ise $3,1 \times 10^{-13}$ cfu/ml olarak hesaplanmıştır. Her iki genin birlikte MF'na etkileri yaklaşık 10^5 olarak belirlenmiştir. *qnrS1* içeren izolatın MF değeri $6,6 \times 10^{-15}$ cfu/ml'dir ve bu değer klon suşlara göre 10 kat daha düşüktür. *gyrA* Asp87→Asn, *parC* Ser80→Ile ve *parE* ser458→Ala mutasyonları ile *qnrS1* genine sahip olan *E. coli* E308, *qnrA1* ve *aac (6')-Ib-cr* genine sahip olan *E. coli* E101 suşlarının MF değerleri sırasıyla $5,7 \times 10^{-14}$ ve $2,4 \times 10^{-14}$ cfu/ml'dir. Bu değerler klon suşların MF değerlerine çok yakındır. *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerini taşıyan *E. coli* E103 ile *qnrS1* ve *oqxB* genlerini taşıyan *E. coli* E247 izolatlarının MF değerleri ise klon suşlardan sırasıyla 10^2 ve 10^3 kat daha düşüktür. Kontrol suşları ve klon suşlar 4xMİK konsantrasyonunda tamamen elimine edilmiştir. *E. coli* izolatları ise 10^{-15} ve 10^{-18} cfu/ml arasında değişen çok düşük oranlarda mutant oluşturabilmişlerdir. Bu durum QRDR mutasyonları ve PMQR genlerinin bakterileri florokinolonların bakterisit etkilerinden koruyarak dirençli bakterilerin oluşmasına katkısı olarak değerlendirilebilir (Briales ve ark., 2011). Gillespie ve arkadaşları (2005) siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin ile yaptıkları araştırmada

Mycobacterium fortuitum'un MF ortalamasını her üç florokinolon için 0.125xMİK ve 0.25xMİK için 10^{-8} 0.5xMİK için ise 10^{-9} cfu/ml olarak saptamışlardır. Drago ve arkadaşları (2010) subinhibitor konsantrasyonlarda *E. coli* için MF değerini yaklaşık 10^{-11} olarak bildirmiştir. Bu araştırmada subinhibitor konsantrasyonlarda elde edilen mutant frekansları araştırmaya dahil edilen tüm bakteriler için 10^{-8} - 10^{-12} cfu/ml arasında değişmektedir. *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin MF değerinde artış sağlayan etkisinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca doğal *E. coli* izolatlarının MF değerleri klon ve kontrol suşlarına göre yüksek bulunmuştur. Bu durum doğal izolatların tez projesi kapsamında araştırılmayan genetik etmenlere sahip olmasından kaynaklanabilir ve MDR ile diğer direnç etmenlerinin akümülatif karakteristik gösteren florokinolon direnci üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tezin araştırma sonuçlarına göre enrofloksasin *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG100'e karşı konsantrasyona bağlı bakterisit etki göstermiştir. MİK'un 8 katı ve üzeri konsantrasyonlarda da bakterisit etki gözlenmiştir. Bu verilere göre deneyin 0. saatinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda her iki kontrol suşu için toplam bakteri sayısı 10^6 - 10^7 cfu/ml bulunmuştur. *E. coli* ATCC 25922 için 8. saatin sonunda 8xMİK/2xMÖK'da bakteri sayısında $\geq 3 \log_{10}$ (% 99,9) kadar bir azalma gözlenmiştir. Wang ve arkadaşları (2016) 8. saatin sonunda 8xMİK'da aynı etkiyi $4 \log_{10}$ olarak tanımlamıştır. *E. coli* AG 100 için ise aynı etki 4xMİK/MÖK'da tespit edilebilmiştir. Deneyin 24. saatinde *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG 100 için MİK'da bakteri sayısı $\geq 3 \log_{10}$ kadar azalmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda (8xMİK/2xMÖK) ise mutlak bakterisit etki gözlendi. Birçok araştırma florokinolonların konsantrasyona bağlı olarak artan bakterisit etki gösterdiğini ve 8-10xMİK'un dirençli alt popülasyonları engellemek için yeterli olduğunu bildirmiştir (wang 2016, Dalhoff 2003, Levison 2004, Craig 1998, Coulet 2002). Bu bakımdan değerlendirildiğinde *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* AG 100 için elde edilen veriler daha önce yapılan araştırmaların sonuçlarıyla uyumludur. Kontrol ve klon suşlarından elde edilen verilere göre deneyin 8. saatinde MtS için 32xMİK/8xMÖK'da $\geq 6 \log_{10}$ kadar bir azalma gözlenirken diğer suşlar için aynı etki belirlenememiştir. *E. coli* ATCC25922 için deneyin 24. saatinde 1xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$ (%)

99,9) kadar bir azalma tespit edilmiştir ve MtS ile MtSX suşları için bu etki oluşmamıştır. *qnrS1* geninin varlığı 24. saatte 1xMİK'da etkin inhibisyonu önlemiştir. *E. coli* ATCC 25922 ve MtS için deneyin 24. saatinde 8xMİK/2xMÖK'dan daha yüksek konsantrasyonlarda mutlak bakterisidal etki gözlenirken, MtX ve MtSX için hiçbir konsantrasyonda bu etki izlenmemiştir. *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin birlikte bulunması 24. saatte inhibisyonu önlemiştir. *qnrS1* geni taşıyan klon ve izolat (*E. coli* E248)'a ait zaman-yanıt verilerine göre her iki suş için de deneyin 8. saati için elde edilen veriler aynıdır. Deneyin 24. saatinde MtS suşu için 8xMİK/2xMÖK'da tam eliminasyon sağlanmışken *E. coli* E248 için hiçbir konsantrasyonda tam eliminasyon sağlanamamıştır. Enrofloksasin MtS ye karşı konsantrasyona bağlı etki gösterirken aynı etki *E. coli* E248 için oluşmamıştır.

MtSX (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve *E. coli* E103 (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*)'ün doz-yanıt verilerine göre deneyin 0. saatinde tüm konsantrasyonlar için bakteri sayısı MtSX için $10^6 - 10^7$ cfu/ml, *E. coli* E103 için $10^7 - 10^8$ cfu/ml olarak bulunmuştur. Deneyin 8. saatinde MtSX için 4xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$ (% 99,9) kadar bir azalma belirlenirken, aynı etki *E. coli* E103 için 2xMİK'da gözlenmiştir. Deneyin 24. saatinde elde edilen sonuçlar her iki suş için benzerdir. MtSX ve *E. coli* E103 için tam bir inhibisyon oluşmamıştır. MtSX (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve *E. coli* E101 (*qnrA1* ve *aac (6')-Ib-cr*)'in doz-yanıt verilerine göre her iki bakteri için elde edilen sonuçlar benzerdir. MtSX ve *E. coli* E101 için tam bir eliminasyon sağlanamamıştır. Deneyin 8. saatinde *E. coli* E101 (*qnrA1* ve *aac (6')-Ib-cr*) ve *E. coli* E103 (*qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr*) için 2xMİK'da $\geq 3 \log_{10}$ (% 99,9) kadar bir azalma gözlenmiştir. Aynı etki *E. coli* E247 (*gyrA* Ser 83→Leu, *parC* Ser80→Ile *qnrS1*, *oqxB*) ve *E. coli* E308 (*gyrA* Asp87→Asn, *parC* Ser80→Ile ve *parE* ser458→Ala) için 4xMİK'da gözlenmiştir. Bu farklılık *E. coli* E247 ve *E. coli* E308'in QRDR mutasyonlarına sahip olmasına bağlı olabilir.

Benzer sonuçlar Cengiz ve arkadaşları (2012) tarafından raporlanmıştır ve *qnrS* genine sahip klinik *E. coli* izolatu için deneyin 24. saatinde 32xMİK konsantrasyonunda tam eliminasyon sağlanamamıştır. Olofson ve arkadaşları (2006) iki mutant *E. coli* (Nul14 ve Nul 18) ve kontrol suşu *E. coli* ATCC 25922 ile yaptıkları çalışmada 32xMİK

konsantrasyonunda enrofloksasin ile deneyin 24. saatinde kontrol suşunun tamamen elimine edilirken mutant suşlar üzerinde tam eliminasyon sağlanamamıştır. Wang ve arkadaşları (2016) *E. coli* O101/K99 suşu ile gerçekleştirdikleri çalışmada 2xMİK konsantrasyonda bakteri üreme hızının düştüğünü fakat 24. saat sonunda 32xMİK konsantrasyonunun tam eliminasyon için yeterli olmadığını ve etkin bir bakteriyel eliminasyon için 28xMİK konsantrasyonunun 72 saat boyunca korunması gerektiğini belirtmiştir. Strukova ve arkadaşları (2015) florokinolon dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşları ile yaptıkları çalışmada 4xMİK siprofloksasin konsantrasyonlarının 72 saat sonunda inhibisyon sağlamakta yetersiz kaldığını ve mutant alt populasyonların oluştuğunu vurgulamıştır. Haritova ve arkadaşları (2010) enrofloksasinin in vitro farmakodinamik etkilerini broiler cinsi tavuklardan izole edilen klinik izolat *E. coli* O78/H12 suşunu kullanarak belirlemişler ve deneyin 8. saatinde 32 ve 64xMİK konsantrasyonlarında $3 \log_{10}$, 128xMİK konsantrasyonunda ise $4 \log_{10}$ olarak tanımlamıştır. Deneyin 24. saatinde tam eliminasyon sadece 128xMİK konsantrasyonunda gerçekleşmiştir.

Enrofloksasinin konsantrasyona bağlı etkisinin özellikle 16xMİK ve üzeri konsantrasyonlarda doğrusal artış göstermeyip daha çok zamana bağlı etki gösterdiği daha önceki çalışma sonuçları ile gösterilmiştir (Cengiz ve ark., 2011). Deneyin 24. saatinde elde edilen sonuçlar tüm izolatlar için benzerdir. MtSX klon suşu ve tüm *E. coli* izolatları için tam bir eliminasyon sağlanamamıştır. Bu durum PMQR genlerinin ve QRDR mutasyonlarının bakterileri florokinolonların bakterisit etkisinden koruduğu ve florokinolon direncinin gelişimi üzerindeki pozitif etkilerini desteklemektedir. Ayrıca florokinolon direnci ilişkili genetik etmenlerin bakterileri florokinolonların inhibisyonundan korudukları daha önce yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Briales ve ark., 2011). Direnç genotipinin florokinolonların farmakodinamik karakteristiklerini değiştirerek konsantrasyona-bağlı bakterisit etkiyi zamana-bağlı veya ko-etkiye dönüştürebileceği ve etkili bir eliminasyon sağlamak için florokinolon dozlarının revize edilmesi gerekliliği daha önce yapılan araştırmalarda bildirilmiştir (Cengiz ve ark.,

2013). PMQR geni aktarılmasıyla oluşturulan klon suşlar ve QRDR mutasyonlarına sahip olan izolatlar için elde edilen sonuçlar bu önerinin doğruluğunu kanıtlamıştır.

Bu tez projesinin sonuçlarına göre Bursa ve çevresinden toplanan hayvansal kaynaklı *E. coli* izolatlarının %31,8'i enrofloksasine duyarlı, %16,1'i orta derecede duyarlı, %52,1'i ise dirençlidir. Aynı izolatlarda *qnrS1* geninin prevalansı % 3,3; *aac (6')-Ib-cr* geninin prevalansı % 10,3 ve her iki gene sahip *E. coli* izolatı prevalansı ise % 0,6'dır. *qnrS1* ve *aac (6')-Ib-cr* genlerinin transferi *E. coli*'de enrofloksasinin MİK, MÖK ve MF değerlerini ve dirençli alt populasyonların oluşma oranını farkedilebilir düzeyde arttırır. Her iki genin aynı *E. coli* suşuna aktarılması ise çok daha belirgin bir artışa sebep olarak *E. coli*'yi florokinolonların inhibisyonundan korur. Zamana bağlı doz yanıt deneyleri sonucunda sadece *qnrS1* veya *aac (6')-Ib-cr* genlerinden birine sahip olan klon suşlarda enrofloksasinin farmakokinetik karakteristikleri değişmezken aynı özellikteki klinik izolatlar ve her iki gene sahip olan klon suşlar üzerinde etkili bir eliminasyon gerçekleştirmek için doz optimizasyonu yapılması gereklidir. QRDR mutasyonları ve PMQR genlerine sahip *E. coli* izolatları ve klon suşlarında enrofloksasinin farmakodinamik karakteristikleri değişerek konsantrasyona-bağlı bakterisidal etkinlik zamana-bağlı veya ko-etkiye dönüşür.

6. KAYNAKLAR

Aarts HJ, Josten RG, Stegeman H et al (2001) Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Journal of Microbiological Methods* 47: 209-217.

Abd el Rahim KA, Hassanein AM, Abd el Azeiz HAEH et al (2015) Prevalence, plasmids and antibiotic resistance correlation of enteric bacteria in different drinking water resources in Sohag, Egypt. *Jundishapur Journal of Microbiology* DOI: 10.5812/jjm.18648

Akiyama T, Khan AA (2012) Molecular characterization of strains of fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar *Schwarzengrund* carrying multidrug resistance isolated from imported foods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67: 101-110.

Ahmed A M, Shimamoto T (2013) Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 475–483.

Alekshun M, Levy S (1999) The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends in Microbiology* 10: 410-413.

Allen HK, Cloud-Hansen KA, Wolinski JM et al (2009) Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. *DNA and Cell Biology* 28: 109-117.

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.

Amabile-Cuevas CF (2010) Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *The Journal of Infection in Developing Countries* 4: 126-131.

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.

Ata Z, Yibar A, Arslan E et al (2014) Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella* serotypes isolated from chicken carcasses in Turkey. *Acta Veterinaria Brno* 83: 281-286.

Avgustin JA, Keber R, Zerjavic K et al (2007) Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum-lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 4171-4173.

Bach SJ, McAllister TA, Veria DM et al (2002) Transmission and control of *Escherichia coli* O157:H7: A review. *Canadian Journal of Animal Science* 2002: 475-490.

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.

Ball P (2000) Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46: 17-24.

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.

Bast D, Low D, Duncan C, Kilburn L et al (2000) Flouroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Contributions of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 3049-3054.

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

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

BCDC 2009, AMR Trends Report Epidemiological services. British Columbia Centre for Disease Control, Antimicrobial resistance trends in the province of British Columbia, AMR Trends Report.

Begic D, Eiff C, Tsuji B (2009) Daptomycin pharmacodynamics against *Staphylococcus aureus hemB* mutants displaying the small colony variant phenotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63: 977-981.

Bengtsson-Palme J, Larsson DGJ (2016) Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation *Environment International* 86: 140-149.

Beri S, Sidhu PK, Kaur G et al (2011) Comparative mutant prevention concentration and antibacterial activity of fluoroquinolones against *Escherichia coli* in diarrheic buffalo calves. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 27: 312-316.

Beyer R, Pestova E, Millichap JJ et al (2000) Convenient assay for estimating the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: Evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin efflux. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 798-801.

Blair JMA, Piddock LJV, La Ragione RM et al (2009) Periplasmic adaptor protein AcrA has a distinct role in the antibiotic resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64: 965-72.

Blair J M, Webber MA, Bayley AJ et al (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 13: 42-51.

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, Zhao X, Hansen G et al (2001) Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 452: 433-438.

Booker B, Smith P, Forrest A et al (2005) Application of an in vitro infection model and simulation for reevaluation of fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype *typhi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 1775-1781.

Briales A, Rodriguez-Martinez 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: 1266-1269.

Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C et al (2012) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39: 431-434.

Brosius J (1984) Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27: 151-160.

Brown D, Macgowan A (2010) Harmonization of antimicrobial susceptibility testing breakpoints in Europe: Implications for reporting intermediate susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 183-185.

Browne FA, Clark C, Bozdoğan B et al (2002) Single and multi-step resistance selection study in *Streptococcus pneumoniae* comparing ceftriaxone with levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 20: 93-99.

Buckley AM, Webber MA, Cooles S et al (2006) The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiology* 8: 847-856.

Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S et al (2003) Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22: 205-210.

Cambau E, Lascols C, Sougakoff W et al (2006) Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clinical Microbiology and Infections* 2006; 12: 1013-1020.

Cattoir V, Poriel L, Nordman P (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 3801-3804.

Cattoir V, Varca A, Greub G et al (2010) *In vitro* susceptibility of *Acinobaculum schaalii* to 12 antimicrobial agents and molecular analysis of fluoroquinolone resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 2514-2517.

Cavaco L, Hasman H, Xia S, Aarestrup F (2009) *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar *Kentucky* and *bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53: 603-608.

Cebrian L, Rodriguez JC, Escribano I et al (2007) Evaluation of several fluoroquinolones and beta-lactams in terms of their capability to restrict the selection of fluoroquinolone-resistant *Salmonella*: in vitro models. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2007. 115:1376-82.

Cecchetti V, Filipponi E, Fravolini A, et al (1997) Chemometric methodologies in a quantitative structure-activity relationship study: The antibacterial activity of 6-aminoquinolones. *Journal of Medicinal Chemistry* 40: 1698-1706.

Cecchetti V, Fravolini A, Lorenzini MC et al (1997) Studies on 6-aminoquinolones: Synthesis and antibacterial evaluation of 6-amino-8-methylquinolones. *J Journal of Medicinal Chemistry* 39: 436-445.

Cengiz M (2010) Bakterilerde kinolon direncinin genetiği. *Uludag University Journal of Veterinary Medicine* 29: 55-60.

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

Cengiz M, Buyukcangaz E, Arslan E et al (2012) Molecular characterization of quinolone resistance in *Escherichia coli* from animals in Turkey. *Veterinary Record* 171: 155-159.

CDC (2013) Antibiotic resistance threats in the United States: Threat Report, 2013.

Chmelnitsky I, Hermesh O, Navon-Venezia S et al (2009) Detection of *aac(60)-Ib-cr* in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64: 718-722.

Chao Q, Charles WS, Zheng X (2013) Phenotypic Testing of Bacterial Antimicrobial Susceptibility. Editors: YI-WEI T, STRATTON CW, *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Second Edition, Springer Science, Business Media, New York, pp:63-66.

Chodhury G, Pazhani GP, Nair GB et al (2011) Transferable plasmid-mediated quinolone resistance in association with extended spectrum β -actamases and fluoroquinolone-acetylating aminoglycoside-6-N acetyltransferase in clinical isolates of *Vibrio fluvialis*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38: 169-173.

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.

CLSI 2010 Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Sixth Edition. Approved standard M7-A6. CLSI, Wayne, PA, USA.

Coldham NG, Webber MA, Woodward MJ et al (2010) A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 1655-1663.

Cole D, Drum DJ, Stalknecht DE et al (2005) Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases* 11: 935-938.

Coulet M, Van Borssum Waalkers M, Cox P et al (2002) *In vitro* and *in vivo* pharmacodynamic properties of the fluoroquinolone. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 25: 401-411.

Craig AW (1998) Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 26: 1-12.

Cruz GR, Radice M, Sennati S et al (2013) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108: 924-927.

Dalhoff A (2012) Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012: 976273.

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.

Davison J (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42: 73-91.

Dolejska M, Villa L, Hasman H et al (2013) Characterization of IncN plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68: 333-339.

Domagala JM (1994) Structure-activity and structure side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 33: 685-706.

Drago L, Nicola L, Mattina R et al (2010) *In vitro* selection of resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. at *in vivo* fluoroquinolone concentrations. *BMC Microbiology* 10: 119-116.

Drlica K (2003) The mutant selection window and antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 11-17.

ECDC 2009 Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

ECDC 2010 Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

ECDC 2011 Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

ECDC2012 Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) .

ECDC2013 Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

ECDC2014 Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

EMA (2006) Reflection paper on the use of flouoroquinolones in food-producing animals in the european union: Devellopment of resistance and impact on human and animal health, 184651.

EMA, (2012) European Medicines Agency. Guideline for the demonstration of efficacy for veterinary medicinal products containing antimicrobial substances. EMA/ CVMP/ 261180/ 2012.

EMA 1997 Danofloxacin summary report 2 EMEA/MRL/254/97-FINAL.

EMA 1998 Enrofloxacin summary report 2 EMEA/MRL/388/98-FINAL.

EMA 1999 Marbofloxacin summary report 2 EMEA/MRL/692/99-FINAL.

EMA 2011 Veterinary Medicines and Product Data Management
EMA/142130/2011.

Emmerson AM, Jones AM (2003) The quinolones: Decades of development and use. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51: 13-20.

Emrich NC, Heisig A, Stubbings W et al (2010) Antibacterial activity of finafloxacin under different pH conditions against isogenic strains of *Escherichia coli* expressing combinations of defined mechanisms of fluoroquinolone resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 65: 2530-2533.

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.

Ewers C, Bethe A, Semmler T et al (2012) Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion

animals, and their putative impact on public health: A global perspective. *Clinical microbiology and infections* 18: 646-655.

Ferran A, Dupouy V, Toutain P et al (2007) Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 4163-4166.

Ferreira S, Toleman M, Ramalheira E et al (2010) First description of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates carrying both *qnrA* and *qnrB* genes in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35: 584-586.

Finch RG, Metlay JP, Davey PG et al (2004) Educational interventions to improve antibiotic use in the community: report from the International Forum on Antibiotic Resistance (IFAR) colloquium, 2002. *Lancet Infectious Diseases* 4: 44-53.

Fortini D, Fashae K, Fernandez AG et al (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance and β -lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66: 1269-1272.

Gandara A, Mota LC, Flores C et al (2006) Isolation of *Staphylococcus aureus* and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from residential indoor bioaerosols. *Environmental Health Perspectives* 114: 1859-1864.

Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J et al (2006) Plasmid-mediated quinolone resistance in non-typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases* 43: 297-304.

Geburu E, Choi MJ, Lee SJ, et al (2011) Mutant-prevention concentration and mechanism of resistance in clinical isolates and enrofloxacin/ marbofloxacin-selected mutants of *Escherichia coli* of canine origin. *Journal of Medical Microbiology* 60: 1512-1522.

Gibson JS, Rowland NC, Kyaw-Tanner MT et al (2010) Fluoroquinolone resistance mechanisms in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections in dogs. *Veterinary Microbiology* 146:161-166.

Giguere S, Prescott JF, Dowling FM (2013) *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, John Wiley & Sons, London, pp 3-11.

Gillespie SH, Basu S, Dickens AI et al (2005) Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 344-348.

Gourdazi M, Azad M, Sadat S (2015) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and oqxab efflux pumps among extended-spectrum - lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with nosocomial urinary tract infection in tehran, Iran. *Scientifica* 2015: 518167-518174.

Gouvea R, Santos FF, Aquino MHC et al (2014) Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a Review. *Brazilian Journal of Poultry Science* 17: 1-10.

Grave K, Greko C, Kvaale MK et al (2012) Sales of veterinary antibacterial agents in nine European countries during 2005-09: Trends and patterns. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67: 3001-3008.

Gupta K, Scholes D, Stamm WE (1999) Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *Journal of the American Medical Association* 281: 736-738.

Hall RM (1997) Mobile gene cassettes and integrons: Moving antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria. *Ciba Foundation Symposium* 207: 192-202.

Halova D, Papousek I, Jamborova I et al (2014) Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* from American crows: High prevalence of bacteria with variable *qnrB*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 1257-1258.

Haritova AM, Russeova NV (2010) *In vitro* antibacterial effect of enrofloxacin determined by time-killing curves analysis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 13: 218-226.

Hansen LH, Jensen LB, Sorensen 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.

Hata M, Suzuki M, Matsumoto M et al (2005) Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49: 801-803.

Heal RD, Parsons AT (2002) Novel intercellular communication system in *Escherichia coli* that confers antibiotic resistance between physically separated populations. *Journal of Applied Microbiology* 92: 1116-1122.

Henderson-Begg SK, Livermore DM, Hall LMC (2006) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 849-854.

Hernandez J, Johansson A, Stedt J et al (2013) Characterization and comparison of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile. Plos One 8: e76150.

Herrera-Leon S, Gonzalez-Sanz R, Herrera-Leon L et al (2010) Characterization of multidrug-resistant enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 66: 287-290.

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.

Hooper DC (1998) Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and antitopoisomerase resistance. Clinical and Infectious Diseases 27: 54-63.

Hooper DC (2002) Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. The Lancet Infectious Diseases 2: 530-538.

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

Hou Z, Fink RC, Black EP et al (2012) Gene expression profiling of *Escherichia coli* in response to interactions with the lettuce rhizosphere. Journal of Applied Microbiology 113: 1076-1086.

<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.64439.html> (23.02.216).

<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.54631.html> (23.02.216).

<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7978646.html> (23.02.216).

<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.54663.html> (23.02.216).

<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.64326.html> (23.02.216).

<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4268.html> (23.02.216).

<https://www.oehha.ca.gov/search/content/nalidixic%20acid> (23.02.216).

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Danofloxacin> (23.02.216).

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enrofloxacin> (23.02.216).

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Marbofloxacin> (23.02.216).

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/orbifloxacin> (23.02.216).

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9802884> (23.02.216).

Huang Y, James O, Gu OJ et al (2015) Comparative analysis of quinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Chinese children and adults. *BioMed Research International* 2015: 168292-168298.

Huddleston JR (2014) Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance* 7: 167-176.

Hughes VM, Datta N (1983) Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature* 302: 725-726.

Ibrahim EH, Sherman G, Ward S et al (2000) The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 118:146-55.

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

Ishii S, Sadowsky MJ (2008) *Escherichia coli* in the environment: Implications for water quality and human health. *Microbes and Environment* 23: 101-108.

Jacoby GA (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases* 41: S120-126.

Jang J, Luo Y, Li J et al (2010) Characterization of clinical *Escherichia coli* isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 453-459.

Jiang Y, Zhou Z, Qian Y et al (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac (6')-Ib-cr* in extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61: 1003-1006.

Jorgensen JH, Ferraro MJ (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases* 49: 1749-1755.

Kadavy DR, Hornby JM, Haverkost T Et al (2000) Natural antibiotic resistance of bacteria isolated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei* Applied Environmental Microbiology 66: 4615-4619.

Kahn AA, Araujo FA, Brightly KE et al (1999) Anti- *Toxoplasma gondii* activities and structure-activity relationships of novel fluoroquinolones related to trovafloxacin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43: 1783-1787.

Kanamori H, Yano H, Hirakata Y et al (2011) High prevalence of extended-spectrum β -lactamases and *qnr* determinants in *Citrobacter* species from Japan: Dissemination of CTX-M-2. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 66: 2255-2262.

Karlowsky JA, Kelly LJ, Thornsberry C et al (2002) Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46: 2540-2545.

Karlowsky JA, Thornsberry C, Peterson DE et al (2001) Antimicrobial resistance among *Escherichia coli* urinary tract isolates in the United States: a current view provided by electronic surveillance. Infectious Diseases in Clinical Practice 10: 87-92.

Khan A, Nawaz M, West C et al (2005) Isolation and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from poultry litter. Poultry Science 84: 61-66.

Kim JH, Cho JK, Kim KS (2013) Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Salmonella* isolated from poultry in Korea. Avian Pathology 42: 221-229.

Kim, HB, Park CH, Kim CJ et al (2009) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53: 639-645.

Kim MJ, Yun HJ, Kang JW et al (2003) *In vitro* development of resistance to a novel fluoroquinolone, DW286, in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51: 1011-1016.

Kiranmanyi CB, Krishnaiah N, Mallika EN (2010) *Escherichia coli* O157:H7 - An emerging pathogen in foods of animal origin. Veterinary World 3: 382-389.

Kollef MH (2003) The importance of appropriate initial antibiotic therapy for hospital-acquired infections. American Journal of Medicine 115: 582-584.

Koutsolioutsou A, Pena-Lopis S, Demple B (2005) Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 2746-2752.

Kovach ME, Elzer PH, Hill DS et al (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.

Kuntaman K, Lestari ES, Severin JA et al (2005) Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*, Indonesia. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1363-1368.

Kruse, H (1994) Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4015-4021.

Lee CR, Cho IH, Jeong BC et al (2013) Strategies to minimize antibiotic resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10: 4274-4305.

Lee Y, Cho J, Kim K et al (2005) Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. *The Journal of Microbiology* 5: 391-397.

Linde HM, Lehn N (2004) Mutant prevention concentration of nalidixic acid, ciprofloxacin, clinafloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin or trovafloxacin for *Escherichia coli* under different growth conditions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53: 252-257.

Lingren PK, Karlsson, Hughes D (2003) Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3222-3232.

Liu JH, Deng YT, Zeng ZL et al (2008) Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qepA*, *qnr*, and *aac(6')-Ib-cr* among 16S rRNA Methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 2992-2993.

Lopez E, Basquez J (2009) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 3411-3415.

Lu K, Asano R, Davies J (2004) Antimicrobial resistance gene delivery in animal feeds. *Emerging Infectious Diseases* 10: 679-683.

Ma J, Zeng Z, Chen Z et al (2009) High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant

Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53: 519-524.

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: 268-281.

Marchisio M, Porto A, Joris R et al (2015) Susceptibility to β -lactams and quinolones of *Enterobacteriaceae* isolated from urinary tract infections in outpatients. Brazilian Journal of Microbiology 46: 1155-1159.

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.

Martinez J, Briales A, Velasco C et al (2011) Discrepancies in flouoroquinolone clinical categories between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI for *Escherichia coli* harbouring *qnr* genes and mutations in *gyrA* and *parC*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 66: 1405-1413.

Martinez M, Mcdermott P, Walker R (2006) Pharmacology of flouoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. The Veterinary Journal 172: 10-28.

Martinez L, Pascual A, Jacoby G (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. The Lancet 351: 797-799.

Martins M, McCusker MP, Viveiros M et al (2013) A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. Open Microbiology Journal 7: 72-82.

Mazaheri Nezhad Fard R, Barton MD, Heuzenroeder MW (2011) Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in *Enterococci*. Letters in Applied Microbiology 52: 559-564.

McEwen SA, Fedorka-Cray PJ (2002) Antimicrobial use and resistance in animals. Clinical Infectious Diseases 34 Suppl 3: S93-S106.

McKellar QA, Bruni SFS, Jones DG (2004) Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 27: 503-514.

Mindlin SZ, Petrova MA, Bass IA et al (2006) Origin, evolution, and migration of drug resistance genes. Genetika 42: 1495-1511.

Minton NP (1984) Improved plasmid vectors for the isolation of translational *lac* gene fusions *Gene* 31: 269-273.

Moniri R, Dastehgoli K (2005) Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy broilers with previous exposure to fluoroquinolones: Is there a link? *Microbial Ecology in Health and Disease* 17: 69-74.

Moon CD, Seol SY, Gurung M et al (2010) Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35: 76-79.

Mouton JW, Dudley MN, Cars O et al (2002) Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs. *International Journal of Antimicrobial Agents* 19: 355-358.

Mouton JW, Dudley MN, Cars O et al (2005) Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 601-607.

Morero RN, Monti RM, Arganana CE (2011) Effect of ciprofloxacin concentration on the frequency and nature of resistant mutants selected from *Pseudomonas aeruginosa mutS* and *mutT* hypermutators. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 3668-3676.

Morrissey I, Hoshino K, Sato K, et al Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1775–84.

Morero NR, Mont, MR, Argarana CE (2011) Effect of Ciprofloxacin Concentration on the Frequency and Nature of Resistant Mutants Selected from *Pseudomonas aeruginosa mutS* and *mutT* Hypermutators. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 55: 3668-3676.

Moyaert H, Jong A, Simjee S et al (2014) Antimicrobial resistance monitoring projects for zoonotic and indicator bacteria of animal origin: Common aspects and differences between EASSA and EFSA. *Veterinary Microbiology* 171: 279-283.

Mueller M, Pena A, Derendorf H (2004) Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 369-377.

Mustaev M, Malik M, Zhao et al (2013) Fluoroquinolone-gyrase-DNA complexes: Two Modes Of Drug Binding. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 12300-12312.

Müştak HK, İça T, Çiftçi A et al (2012) Plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* strains isolated from animals in Turkey. *Journal of Ankara University Faculty of Veterinary Medicine* 59: 255-258.

Naber KG, Schito G, Botto H et al (2008) Surveillance study in Europe and Brazil on clinical aspects and antimicrobial resistance epidemiology in females with cystitis (ARESC): implications for empiric therapy, *European Urology* 54: 1164-1178.

Nazik H, İlktac B, Öngen B (2013) Prevalence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* (in *qnr*-Positive Isolates) Among ESBL-positive and/or Ciprofloxacin-Resistant Isolates in Turkey. *Journal of Chemotherapy* 2: 219-221.

Nelson J, Chiller T, Powers J et al (2007) Fluoroquinolone -resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clinical and Infectious Diseases* 44: 977-980.

Neuzillet Y, Naber KG, Schito G et al (2012) French results of the ARESC study: Clinical aspects and epidemiology of antimicrobial resistance in female patients with cystitis. Implications for empiric therapy. *Medecine et Maladies Infectieuses* 42: 66-75.

Nielsen EI, Friberg LE (2013) Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Antibacterial Drugs *Pharmacological Reviews* 65: 1053-1090.

Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 313-339.

Nikaido H (1998) Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology* 1: 516-523.

Nishino K, Latifi T, Groisman EA (2006) Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Molecular Microbiology* 59: 126-141.

Norman A, Hansen LH, Sorensen SJ Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364: 2275-2289.

Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.

Oethinger M, Podglajen I, Kern WV et al (1998) Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2089-2094.

Ogbolu D, Daini O, Ogunledun A et al (2011) High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria, *International Journal of Antimicrobial Agents* 37: 62-66.

OIE (2007) The list of antimicrobials of veterinary importance.

Olofsson S, Marcusson L, Störmback A et al (2007) Dose-related selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60: 795-801.

Ozawa M, Asai T (2013) Relationships between mutant prevention concentrations and mutation frequencies against enrofloxacin for avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Journal of Veterinary Medicinal Sciences* 75: 709-713.

Pallo-Zimmerman L, Byron J, Graves T (2010) Fluoroquinolones: then and now. *Compendium Continuing Education for Veterinarians* 32: 1-9.

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

Park CH, Robicsek A, Jacoby GA et al (2006) Prevalence in the United States of *aac(6')Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 3953-3955.

Park Y, Yu J, Kim S et al (2010) Prevalence and characteristics of *qnr* determinants and *aac(6')-Ib-cr* isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 2041-2053.

Park YH, Yoo JH, Huh DH et al (1998) Molecular analysis of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* on the aspect of gyrase and multiple antibiotic resistance (*mar*) genes. *Yonsei Medicinal Journal* 39: 534-540.

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.

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.

Peterson LR (2011) Quinolone Molecular Structure-Activity Relationships: What We Have Learned about Improving Antimicrobial Activity. *CID* 2001: 33.

Piddock LJV, Johnson M, Ricci V et al (1998) Activities of new fluoroquinolones against fluoroquinolone-resistant pathogens of the lower respiratory tract. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 2956-2960.

Pitout JDD, Weil Y, Church DL et al (2008) Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')-Ib-cr*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61: 999-1002.

Poirel L, Cattoir V, Nordmann P (2012) Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Frontiers in Microbiology* 3: 24.

Poirel L, Leviandier C, Nordman P (2006) Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA* and *qnrS* in *Enterobacteriaceae* isolates from a french university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 3992-3997.

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.

Poole K (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 20-51.

Ramalingam B, Sidhu PK, Kaur G et al (2015) Mutant prevention concentration, pharmacokinetic-pharmacodynamic integration, and modeling of enrofloxacin data established in diseased buffalo calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 38: 529-536.

Randall LP, Cooles SW, Piddock LJV et al (2004) Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin and enrofloxacin for *Salmonella enterica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 688-691.

Randall LP, Woodward MJ (2002) The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Research in Veterinary Sciences* 72: 87-93.

Rath S, Padhy RN (2015) Prevalence of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in an Indian teaching hospital and adjoining communities. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 10: 504-508.

Rattanaumpawan P, Tolomeo PC, Bilker WB et al (2010) Risk factors for fluoroquinolone-resistance in nosocomial urinary tract infections caused by Gram-negative bacilli. In Proceedings of the 5th Decennial International Conference Health-Associated Infections, Abstract no. 317, Atlanata, Ga, USA, March 2010.

Rattanaumpawan P, Tolomeo PC, Bilker WB et al (2010) Risk factors for fluoroquinolone resistance in *Enterococcus* urinary tract infections in hospitalized patients. *Epidemiology and Infection* 139: 955- 961.

Ricci V, Tzakas P, Buckley A et al (2006) Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains are difficult to select in the absence of *AcrB* and *TolC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 38-42.

Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF et al (2006) *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 2872-2874.

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

Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA et al (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine* 12: 83-88.

Rosas I, Salinas E, Martiez L et al (2006) Urban dust fecal pollution in Mexico City: antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209: 461-470.

Ruiz C, Levy SB (2014) Regulation of *acrAB* expression by cellular metabolites in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69: 390-399.

Saga T, Yamaguchi K (2009) History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. *Japan Medical Association Journal* 52: 103-108.

Sana F, Mabrouka S, Slim A et al (2015) Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in a Tunisian hospital. *Microbial Drug Resistance* 21: 158-166.

Savaşan S, Çiftçi A, Diker K (2004) Emergence of quinolone resistance among chicken isolates of *Campylobacter* in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 28: 391-397.

Savaşan S, Kaya O, Kırkan Ş et al (2008) Balık kökenli *Enterococcus faecalis* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 55: 107-110.

Schito GC, Naber KG, Botto H et al (2009) The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34: 407-413

Seppala H, Klaukka T, VuopioVarkila J et al (1997) The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A *Streptococci* in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *The New England Journal of Medicine* 337: 441-446.

Shaheen BW, Wang C, Johnson CM et al (2009) Detection of Fluoroquinolone resistance level in clinical canine and feline *Escherichia coli* pathogens using rapid real-time PCR assay *Veterinary Microbiology* 139 (2009) 379-385.

Shallcross LJ, Davies SC (2014) The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69: 2883-2885.

Shem-Tov M, Ziv G, Glickman A et al (1997) Pharmacokinetics and penetration of marbofloxacin from blood into the milk of cows and ewes. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* 44: 511-519.

Shem-Tov M, Ziv G, Glickman A et al (1997) Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from blood into the milk of cows and ewes *Veterinary Research* 28: 571-579.

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* 2013: 55-57.

Silva-Sanchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H et al (2013) Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. *Bacterial Resistance Consortium, PLOS ONE* 8: e77968.

Silley P (2012) Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* 31: 33-41.

Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV et al (2010) Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 434-452.

Stephenson S, Brown Pd, Holness A et al (2010) The Emergence of *Qnr*-Mediated Quinolone Resistance among *Enterobacteriaceae* in Jamaica. *West Indian Medicinal Journal* 59: 241-244.

Stavoe AKH (2006) Plasmid-mediated quinolone and fluoroquinolone resistance. *MMG 445 Basic Biotech J* 2: 154-159.

Stephenson S, Brown PD, Holness A et al (2010) The emergence of *qnr*-mediated quinolone resistance among *enterobacteriaceae* in Jamaica. *West Indian Medicinal Journal* 59: 241-244.

Strahilevitz J, Jacoby G, Hooper D et al (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 664-689.

Strukova EN, Yury A, Portnoy AV et al (2016) Searching for the optimal predictor of ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* by using *In vitro* dynamic models. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 60: 1208-1215.

Sukul P, Spittler M (2007) Fluoroquinolone antibiotics in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 191: 131-162.

Sulavik MC, Houseweart C, Cramer C et al (2001) Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1126-1136.

Szmolka A, Fortini D, Villa L et al (2011) First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe. *Microbial Drug Resistance* 17: 567-573.

Tamber S, Hancock RE (2003) On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*. *Frontiers in Bioscience* 8: s472-483.

Takenouchi T, Tabata F, Iwata Y et al (1996) Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factor for decreased activity in efflux-mediated resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 1835-1842.

Takeshita S, Sato M, Toba M (1987) High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* α -complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* 61: 63-74.

Tausova D, Dolejska M, Cizek A et al (2012) *Escherichia coli* with extended-spectrum *b*-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67: 1103-1107.

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

- Tillotson GS (1996) Quinolones: Structure-activity relationships and future predictions. *Journal of Medicinal Microbiology* 44: 320.
- Tran JH, Jacoby GA (2002) Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 5638-5642.
- Vaddady PK, Lee RE, Meibohm B (2010) *In vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic models in anti-infective drug development: focus on TB. *Future Med Chem* 2: 1355-1369.
- Van Elas JD, Semenov AV, Costa R et al (2011) Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME Journal* 5: 173-83.
- Van Der Starre W E, Van Nieuwkoop C, Paltansing S et al (2011) Risk factors for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in adults with community-onset febrile urinary tract infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66: 650-656.
- Van Boeckel, TP, Gandra S, Ashok A et al (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases* 14: 742-750.
- Vasquez GA, Siu HR, Luna EM et al (2009) Risk factors for quinolone-resistant *Escherichia coli* urinary tract infection. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 17: 309-313.
- Veldman K, Cavaco L, Mevius D et al (2011) International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in salmonella enterica and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and environment in 13 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66: 1278-1286.
- Venglovsky J, Sasakova N, Placha I (2009) Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioscience Technology* 100: 5386-5391.
- VetCAST, (2014) Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (VetCAST), 2014-12-09.
- Vien LTM, Baker S, Thao LTP et al (2009) High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in commensal members of the *Enterobacteriaceae* in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of Medical Microbiology* 58: 1585-1592.
- Vieira J, Messing J (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.

- Von-Wintersdorf CJ, Penders J, Van-Niekerk JM et al (2016) Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology* 7: 00173.
- Wang M, Schmitz F (2003) *In vitro* antibacterial activity and pharmacodynamics of new quinolones. *European Journal of Clinical and Microbiological Infectious Diseases* 22: 203-221.
- Wang M, Tran JH, Jacoby GA et al (2003) Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 2242-2248.
- Wang M, Sham DF, Jacoby GA et al (2004) Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 1295-1299.
- Wang M, Guo O, Xu X, et al (2009) New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 1892-1897.
- Wang Y, He T, Han J et al (2012) Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Veterinary Microbiology* 159: 53-59.
- Wasteson Y (2001) Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 95: 79-84.
- Webber MA, Piddock LJV (2001) Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* 45: 1550-1552.
- Webber M, Piddock JLV (2001) Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Veterinary Research* 32: 275-284.
- WHO (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance, World Health Organization.
- White DG, Maneewannakul K, Von Hofe E et al (1997) Inhibition of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli* by antisense DNA analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 2699-2704.
- White DG, Piddock LJV, Maurer JJ et al (2000) Characterization of fluoroquinolone resistance among veterinary isolates of avian *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 2897-2899.

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

Wong MH, Chan EW, Liu LZ et al (2012) PMQR genes *oqxAB* and *aac(6')Ib-cr* accelerate the development of fluoroquinolone resistance in *Salmonella typhimurium*. *Frontiers in Microbiology* 00521.

Wozniak RA, Waldor MK (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews in Microbiology* 8: 552-563.

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, Wachio J, Suzuki S et al (2008) Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1564-1566.

Yang J, Luo Y, Li J et al (2010) Characterization of clinical *Escherichia coli* isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 453-459.

Yokota S, Sato T, Okubo T et al (2012) Prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* O25:H4-ST131 (CTX-M-15-nonproducing) strains isolated in Japan *Chemotherapy* 58: 52-59.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al (2009) Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla* (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 5046-5054.

Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M et al (1990) Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34: 1271-1272.

Yoshida T, Yamamoto Y, Orita H, et al (1996) Studies on quinolone antibacterials. IV. Structure-activity relationships of antibacterial activity and side effects for 5- or 8-substituted and 5,8-disubstituted-7(3- amino-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3- carboxylic acids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 44: 1074-1085.

Yu D, Yi X, Ma Y, et al (2009) Effects of administration mode of antibiotics on antibiotic resistance of *Enterococcus fecalis* in aquatic ecosystems. *Chemosphere* 76: 915-920.

Yu F, Chen Q, Yu X et al (2011) High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *aac(6')-Ib-cr* amongst *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* isolates from hospitalised paediatric patients with diarrhoea in China. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37: 152-155.

Yue L, Jiang H, Liao X et al (2008) Prevalance of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 132: 414-420.

Zaidi MB, Zamora E, Diaz P et al (2003) Risk factors for fecal quinolone-resistant *Escherichia coli* in Mexican children *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 6: 1999-2001.

Zeller V, Janoir C, Kitzis MD et al, Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1973-1978.

Zemkova M, Kotlarova J, Merka V et al (2007) Emergence of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates at the Department of Clinical Hematology. *New Microbiologica* 30: 423-430.

Zhanel GG, Hisanaga TL, Laing NM et al (2006) Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: Final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA) *International Journal of Antimicrobial Agents* 27: 468-475.

Zhanel GG, Roberts D, Waltky A et al (2002) Pharmacodynamic activity of fluoroquinolones against ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49: 807-812.

Zhao X, Drilica K, (2001) Restricting the Selection of Antibiotic-Resistant Mutants: A General Strategy Derived from Fluoroquinolone Studies. *New York Clinical Infectious Diseases* 33: 146-156.

Zhou J, Dong Y, Zhao X et al (2000) Selection of antibiotic-resistant bacterial mutants: Allelic diversity among fluoroquinolone-resistant mutations. *The Journal of Infectious Diseases* 182: 517-525.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A

aac (6')-Ib : Aminoglikozid Asetil Transferaz

ampR : Ampicilin Resistance

AIEC : Adherent invazif *E. coli*

APEC : Avian Patojenik *E. coli*

Arg : Arjinin

Asn : Asparjin

Asp : Aspartik asit

B

BCCDC : British Colombia Center for Disease Control

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

C

°C : Santigrat

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

CLSI : Clinical and Laboratory Standarts Institute

C_{max} : Uygulama sonrasında ulaşılan maksimum ilaç konsantrasyonu.

$C_{max}/MÖK$: Ulaşılan maksimum ilaç konsantrasyonunun MÖK'a oranı

D

DAEC : Diffuz adherent *E. coli*

dH₂O : Distile su

dk : Dakika

DNA : Deoksiribo Nükleik asit

dNTP : Deoksi Nükleotit Trifosfat

E

EAA : Zaman-konsantrasyon eğrisi altında kalan alan.

EAA/MİK : Zaman-konsantrasyon eğrisi altında kalan alanın MİK'a oranı.

EAA/MÖK	: Zaman-konsantrasyon eğrisi altında kalan alanın MÖK'a oranı.
EAEC	: Enteroagregatif <i>E. coli</i>
EARSS	: European Antimicrobial Surveillance System
EASSA	: European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals
ECDC	: European Centre for Disease Prevention and Control
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EFSA	: European Food Safety Authority
EHEC	: Enterohemarojik <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvazif <i>E. coli</i>
EMA	: European Medicine Agency
ENR	: Enrofloksasin
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<u>F</u>	
FAO	: Food and Agriculture Organization:
FDA	: Food and Drug Administration
FK/FD	: Farmakokinetik/farmakodinamik
F primer	: Forward primer
<u>G</u>	
GLASS	: Global Antimicrobial Resistance Surveillance System
<i>gyr</i>	: Giraz A
<u>H</u>	
<i>HindIII</i>	: <i>Haemophilus influenzae</i> tip III Restriksiyon Endonükleaz
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HUS	: Hemolitik üremik sendrom
<u>I</u>	
Ile	: İzolöysin
I	: Orta derecede duyarlı (Intermediate)

IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
Ile	: İzolöysin
<u>L</u>	
<i>LacZ</i>	: β-galaktosidaz
LB	: Laura-Bertani
Leu	: Löysin
<u>M</u>	
Mar	: Multiple Antibiotic Resistance
MBK	: Minimal Bakterisitdal Konsantrasyon
MDR	: Multiple Drug Resistance
MF	: Mutant frekansı
MFL	: Moleküler Farmakoloji Laboratuvarı
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
MHB	: Mueller-Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	: Mililitre
MÖİ	: Mutant önleme indeksi (MÖK/MİK).
MÖK	: Mutant Önleyici Konsantrasyon
MSP	: Mutant seçim penceresi
μl	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
<u>N</u>	
NARMS	: National Antimicrobial Resistance Monitoring System
NAUTICA	: North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance
NMEC	: Neonatal menenjit <i>E. coli</i>
<u>O</u>	
OEHHA	: Office of Environmental Health Hazard Assessment

OIE : World Organisation for Animal Health

Omp : Outer Membrane Protein

ORI : Origin of Replication

P

PAE :Post Antibiyotik Etki

PA-SME : Post antibiyotik sub-MİK etki.

PBP : Penicilin Binding Protein

PBS : Phosphate Saline Buffer

PCA : Plate Count Agar: PCA

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction)

PDR : Tam ilaç dirençli (Pandrug-resistant)

PMQR : Plasmid-mediated Quinolone Resistance

pUC : Plasmid of University of California

Q

qep : Quinolone Efflux Pump

qnr : Quinolone resistance

QRDR : Quinolone Resistance Determining Region

R

R : Dirençli (Resistant:)

RE : Restriksiyon Endonükeaz

RNase : Ribonükleaz

RND : Resistance Nodulation Division

R primer : Reverse primer

S

S : Duyarlı (Susceptible)

Ser : Serin

sn : Saniye

T

TAE : Tris Asetat EDTA

TATFAR : The Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance

TE	: Tris EDTA
T>MİK	: İlaç konsantrasyonunun MİK'un üzerinde kaldığı süre.
T>MÖK	: İlaç konsantrasyonunun MÖK'un üzerinde kaldığı süre.
TMSP	: İlaç konsantrasyonunun MSP aralığında kaldığı süre.
Trp	: Triptofan
Tyr	: Tirozin
<u>U</u>	
UPEC	: Üropatojenik <i>E. coli</i>
UV	: Ultra Viyole
<u>W</u>	
WHO	: World Health Organization
<u>X</u>	
XDR	: Yaygın ilaç dirençli (Extensively-Drug Resistant)

8. EKLER

EK:1 Tablolar

Tablo Ek1: *aac (6')-Ib-cr* pozitif *E. coli* izolatlarına ait enrofloksasin MİK değerleri

<u>aac (6')-Ib-cr pozitif izolat</u>	<u>MİK_{ENR} µg/ml</u>
E67	64
E69	32
E71	32
E72	32
E73	32
E74	64
E75	16
E76	128
E77	128
E78	32
E79	32
E80	64
E81	32
E82	64
E84	32
E85	64
E89	16
E90	32
E92	32
E93	32
E94	64
E95	16
E96	32
E97	64
E98	32
E99	32
E100	32
E101	32
E102	32
E104	32
E177	32
E285	32

Tablo Ek2: ECDC verilerine göre 2009-2013 yılları arasında Avrupa ülkelerinde florokinolon dirençli *E. coli* prevalans değerleri

Yıl	2009			2010			2011			2012			2013		
	N	R	%	N	R	%	N	R	%	N	R	%	N	R	%
Ülkeler															
Norveç	18	160	8.7	226	197	8,7	250	225	9.0	284	321	11.	2975	234	10.
İsveç	30			7			5			3			3		
Estonya	15	131	8.2	213	230	10.	329	260	7.9	554	620	11.	7356	853	11.
	96			0			5			0			2		
Danimarka	30	26	8.3	263	22	8.4	312	31	9.9	304	43	14.	338	40	11.
	2									1			1		
Finlandiya	34	450	13.	316	434	13.	358	505	14.	392	553	14.	3963	491	12.
	06			2			3			1			1		
Hollanda	22	205	9.2	255	235	9.2	242	261	10.	316	370	11.	3594	478	13.
	23			0			0			8			2		
İzlanda	23	262	11.	340	464	13.	442	633	14.	469	728	15.	4730	667	14.
	77			0			6			3			5		
Litvanya	99	7	7.1	95	10	10.	121	17	14.	134	13	9.7	116	17	14.
							5			0			7		
İngiltere	29	44	14.	333	45	13.	381	49	12.	456	67	14.	431	69	16.
	5			6			5			9			7		
Fransa	41	745	18.	481	833	17.	556	974	17.	624	103	16.	6998	114	16.
	30			0			3			5			6		
Letonya	83	155	18.	900	157	17.	869	1556	17.	947	168	17.	1006	168	16.
	53			4			6			9			0		
Çek C.	85	20	23.	97	14	14.	131	22	16.	152	22	14.	134	25	18.
				5			4			8			5		
Avusturya	27	640	23.	248	563	22.	268	630	23.	280	590	21.	2953	614	20.
	58			2			2			5			9		
Almanya	26	536	20.	292	611	20.	316	705	22.	361	744	20.	4279	941	22.
	16			5			2			3			0		
Belçika	27	652	23.	301	748	24.	363	862	23.	418	884	21.	5254	116	22.
	86			4			8			7			1		
İrlanda	15	299	19.	178	383	21.	354	763	21.	351	780	22.	4113	946	23.
	04			9			9			5			2		
Polonya	20	435	21.	211	485	22.	215	493	22.	238	578	24.	2478	600	24.
	05			7			3			0			3		
Lüksemburg	56	131	23.	691	178	25.	114	312	27.	103	303	29.	1035	283	27.
	7			1			8			3			3		
Malta	30	77	25.	49	13	26.	353	85	24.	334	80	24.	295	82	27.
	0			7			5			1			0		
Macaristan	15	49	30.	192	66	34.	219	70	32.	214	67	31.	248	74	29.
	9			8			4			0			3		
Yunanistan	10	319	30.	136	500	36.	121	378	31.	139	403	28.	1432	434	30.
	46			5			6			3			9		
Romanya	18	423	23.	151	370	24.	143	381	26.	137	399	29.	1240	383	30.
	06			4			3			6			2		
Portekiz	53	12	22.	33	8	24.	46	14	30.	133	36	27.	300	93	31.
				6			2			4			1		
İspanya	19	547	27.	808	192	23.	191	521	27.	215	654	30.	2685	97	31.
	73			7			8			2			8		
Bulgaristan	38	120	31.	569	186	32.	559	1931	34.	565	191	33.	5926	206	34.
	10			0			5			4			7		
Slovakya	19	54	28.	151	50	33.	179	54	30.	223	76	34.	187	70	37.
	3			0			1			2			1		
İtalya	78	148	18.	136	264	19.	737	309	41.	695	287	41.	808	326	40.
	3			9			3			9			3		
Kıbrıs	86	312	36.	243	956	39.	189	769	40.	291	122	42.	3928	165	42.
	3			2			2			5			7		
	13	59	43.	138	59	42.	137	65	47.	176	32	42.	162	84	51.
	6			4			8			4			0		

9. TEŞEKKÜR

Doktora eğitim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan ve her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam ve hayat boyu arkadaşım olan sayın Doç. Dr. Murat CENGİZ başta olmak üzere Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Songül SONAL ve Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ'a teşekkür ederim. Bu tez projesinde kullanılan *E. coli* izolatlarını sağlayarak projenin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ayşin ŞEN ve Doç. Dr. Esra BÜYÜKCANGAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimimde her zaman yanımda olan ve dertlerimi paylaşan değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Sena ARDIÇLI, Araş. Gör. Dr. Deniz DİNÇEL, Araş. Gör. Dr. Pelin TUNCER ve Araş. Gör. Dr. Ali SORUCU ve Araş. Gör. Pınar ŞAHİNTÜRK'e; hayatın sorunları ile sonuna kadar dalga geçen ŞURDAN-BURDAN topluluğuna; laboratuvar çalışmalarında bana eşlik eden Dok. Öğr. Meltem Çelik ve Lab. Tuğba TAŞOVAYA'ya ve 1100478 COST projesini finanse ederek bu araştırmanın gerçekleştirilmesini sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na 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 ve benim için dünyadaki en değerli ve saygı değer insanlar olan sevgili annem Mehalat ARSLAN, babam Turan ARSLAN'a; koşulsuz sevgisi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ablam Özlem ARSLAN'a sonsuz minnetimi ve teşekkürlerimi sunarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

Ankarada'da 1982 yılında dünyaya gelen Erdem ARSLAN, ilköğretimi Muğla Dumlupınar İlkokulu, ortaöğretim ve lise öğrenimini Muğla Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2008 yılında mezun olarak üniversite eğitimini tamamlamış ve Veteriner Hekim ünvanını almaya hak kazanmıştır. 2009 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi olarak eğitimine başlamıştır. 2011-2015 yılları arasında Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmış 2016 yılında ise Deva Holding A.Ş'de Uluslararası Pazarlar Ruhsatlandırma Uzmanı olarak çalışmaya başlamıştır.