

Kistik Fibrozisli Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Plazmid Aracılı Kinolon Direncinin Araştırılması*

Investigation of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cystic Fibrosis Patients

Ahmet Yılmaz ÇOBAN¹, Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI¹, Tuba YILDIRIM², Zayre ERTURAN³, Belma DURUPINAR¹, Bülent BOZDOĞAN⁴

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

¹ Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Samsun, Turkey.

² Amasya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Amasya.

² Amasya University Faculty of Science, Department of Biology, Amasya, Turkey.

³ İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

³ Istanbul University Faculty of Istanbul Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

⁴ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

⁴ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

* Bu çalışma, XV. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (23-27 Mart 2011, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 08.04.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 15.07.2011

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa doğada yaygın olarak bulunan ve ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan bir bakteridir. Birçok antibakteriyel ajana karşı intrinsek dirence sahip olması nedeniyle *P.aeruginosa* ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır. Kinolonlar, özellikle siprofloksasin, tedavide kullanılan önemli ajanlardandır. Ancak kinolonlara da direnç gelişmesi önemli bir sorundur. Kinolonlara direnç sıklıkla kromozomal mutasyon ve dışa-atım pompaları aracılığıyla olmaktadır. Son yıllarda *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde plazmid aracılı kinolon direnci de saptanmış; bu dirence neden olan gen ailesi *qnr* olarak adlandırılmıştır. Ayrıca yine plazmid ile aktarılan ve aminoglikozid direnci ile birlikte kinolon direncine de neden olan *aac(6')-Ib-cr* gen bölgesi de *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakteriyel izolatlarda tespit edilmiştir. Yapılan sınırlı sayıda çalışmada, *P.aeruginosa* izolatlarında *qnr* gen bölgesinin varlığı ve *aac(6')-Ib-cr* gen bölgesi henüz gösterilememiştir. Bu çalışmada, kistik fibrozisli olgulardan izole

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 55139 Samsun, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 362 3121919/3526, **E-posta (E-mail):** cobanay2003@gmail.com

edilen *P.aeruginosa* suşlarında plazmid aracılı florokinolon direncinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, hastaların solunum yolu örneklerinden izole edilen 110 *P.aeruginosa* suşu dahil edilmiş ve izolatların siprofloksasin duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle çalışılmıştır. Suşlarda *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS* ve *aac(6')-Ib-cr* gen bölgelerinin varlığı, bu bölgeler için özgül primer çiftleri kullanılarak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak *Escherichia coli* J53 pMG252 (*qnrA*₁ pozitif), *E.coli* J53 pMG252 (*qnrS*₁ pozitif), *E.coli* J53 pMG258 (*qnrB*₁ ve *aac(6')-Ib-cr* pozitif), *Klebsiella pneumoniae* ref.15 (*qnrB* pozitif), *Enterobacter cloacae* ref.287 (*qnrS* pozitif), *E.coli* ref.20 (*qnrA* pozitif) ve pHS11 plazmidinin (*qnrC* pozitif) konjugasyon yoluyla aktarıldığı *E.coli* DH10 suşu kullanılmıştır. *P.aeruginosa* klinik izolatlarının 13'ü siprofloksasine dirençli, yedisi orta duyarlı ve 90'ı duyarlı olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda test edilen toplam 110 *P.aeruginosa* izolatında hem *qnr* gen bölgesi hem de *aac(6')-Ib-cr* gen bölgesi tespit edilememiştir. Bununla birlikte bu bulgunun daha çok klinik izolat içeren araştırmalarla desteklenmesi *P.aeruginosa* izolatlarında kinolon direncinin belirlenmesi ve önlenmesinde önemli olacaktır.

Anahtar sözcükler: Kistik fibrozis; *Pseudomonas aeruginosa*; kinolon; direnç; *qnr* gen bölgesi.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa which is widely found in the environment, may lead to serious nosocomial infections. Due to its intrinsic resistance to many antibacterial agents, treatment of *P.aeruginosa* infections usually present difficulty. Quinolones, especially ciprofloxacin, are crucial antibiotics for the treatment of *P.aeruginosa* infections. However resistance developing to quinolones may become an important problem. Resistance to quinolones is often a result of chromosomal mutations and by the effect of efflux pumps. Recently plasmid-mediated quinolone resistance have been reported in the members of *Enterobacteriaceae* family. The gene responsible for this resistance is called *qnr*. In addition to *qnr* genes there is also another gene called *aac(6')-Ib-cr* responsible for plasmid-mediated quinolone resistance and aminoglycoside resistance. Limited studies which to screen *P.aeruginosa* strains for the presence of *qnr* gene region, revealed no positivity. The aim of this study was to investigate the plasmid-mediated quinolone resistance in *P.aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. A total of 110 *P.aeruginosa* strains isolated from respiratory tract specimens from the patients were included in the study. Ciprofloxacin susceptibilities of the isolates were detected by Kirby-Bauer disk diffusion method according to CLSI guidelines. The presence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* genes were searched by multiplex polymerase chain reaction (PCR) with the use of specific individual primer pairs. As positive control strains, *Escherichia coli* J53 pMG252 (*qnrA*₁ positive), *E.coli* J53 pMG252 (*qnrS*₁ positive), *E.coli* J53 pMG258 (*qnrB*₁ and *aac(6')-Ib-cr* positive), *Klebsiella pneumoniae* ref.15 (*qnrB* positive), *Enterobacter cloacae* ref.287 (*qnrS* positive), *E.coli* ref.20 (*qnrA* positive) and *E.coli* DH10 conjugated with pHS11 plasmid (*qnrC* positive) were used. Of 110 *P.aeruginosa* clinical isolates, 13 were found resistant to ciprofloxacin, while 7 were intermediate. However multiplex PCR yielded no positivity in terms of *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* gene regions. In conclusion, although our results indicated that none of the tested *P.aeruginosa* strains harboured those genes, further multicenter studies with large numbers of isolates are needed to confirm these results.

Key words: Cystic fibrosis; *Pseudomonas aeruginosa*; quinolone; resistance; *qnr* genes.

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa doğada yaygın olarak bulunabilen gram-negatif bir basil olup, immün sistemi baskılanmış, AIDS'li, yanıklı ve kistik fibrozisli hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır¹. Bu enfeksiyonların antibiyotikler ve dezenfektanlarla

kontrolü oldukça zordur². *P.aeruginosa* bazı antibiyotiklere (ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, nalidiksik asit, trimetoprim) karşı intrensek dirence sahiptir³. Bu bakterinin antibiyotiklere yüksek oranda direnç göstermesine neden olan mekanizmalar arasında; dış membran geçirgenliğinde azalma, dışa atım pompa sistemleri, beta-laktamaz enzimleri, direnci düzenleyen genlerde kromozomal mutasyonlar ve plazmid, transpozonlar ve bakteriyofajlarla direnç genlerinin aktarımı yer almaktadır².

Florokinolonlar *P.aeruginosa*'nın tedavisinde kullanılan önemli ajanlardandır. Florokinolonlara karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri, DNA giraz (*gyrA* ve *gyrB*) ve topoizomerez IV (*parC* ve *parE*)'te meydana gelen mutasyonlar ve atım pompa sistemlerinde hiperaktivasyon sonucu artmaktadır. Son yıllarda bunlara ek olarak *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde plazmid aracılı kinolon direnci de tanımlanmış olup, buna neden olan *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr* ve *qepA* genlerinin varlığının da florokinolon MİK değerlerinde artışa neden olabildiği saptanmıştır⁴. Ancak günümüze kadar yapılan çalışmalarda *P.aeruginosa* izolatlarında *qnr* gen ailesinin varlığı gösterilememiştir. Bu çalışmanın amacı, kistik fibrozisli hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* klinik izolatlarında plazmid aracılı florokinolon direncinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel İzolatlar

Çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalının kistik fibrozis laboratuvarına gelen solunum yolu örneklerinden izole edilen 110 *P.aeruginosa* suşu test edildi. Tüm izolatların siprofloksasin duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle çalışıldı⁵.

Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile *qnr* Genlerinin Araştırılması

Bir gün öncesinden Mueller-Hinton agar besiyerine ekilen bakterilerden birkaç koloni alınıp, 500 µl steril distile su içine süspanse edildi ve 100°C'de 20 dakika kaynatıldı. Ardından 15000 x g'de 20 dakikalık santrifüj işleminden sonra süpernatant, PCR'de kalıp DNA olarak kullanılmak üzere alındı ve çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı.

PCR optimizasyonu için *qnr* genlerini taşıyan suşlar her PCR işleminde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu amaçla; *Escherichia coli* J53 pMG252 (*qnrA*₁ pozitif), *E.coli* J53 pMG252 (*qnrS*₁ pozitif) ve *E.coli* J53 pMG258 (*qnrB*₁ ve *aac(6')-Ib-cr* pozitif) suşları Prof. G. A. Jacoby (Lahey Clinic, Burlington, ABD)'den; *Klebsiella pneumoniae* ref.15 (*qnrB* pozitif), *Enterobacter cloacae* ref.287 (*qnrS* pozitif) ve *E.coli* ref.20 (*qnrA* pozitif) suşları Prof. P. Nordmann (Hôpital de Bicêtre, Faculté de Médecine et Université Paris-Sud, Bicêtre, Fransa)'dan; pHS11 plazmidi (*qnrC* pozitif) ise Prof. M. Wang (Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, PRC)'dan temin edildi.

PCR yönteminde Kim ve arkadaşları⁶ tarafından daha önce tanımlanan primer çiftleri kullanıldı (Tablo I). *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS* ve *aac(6')-Ib* multipleks PCR yöntemiyle çalışıldı. Her multipleks PCR'de 2 µl DNA, 1 x PCR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM deoksidinükleotid trifosfat, 20 pmol her bir primerden ve 2.5U Taq DNA polimeraz içeren toplam 50 µl PCR karışımı kullanıldı. Amplifikasyon programı; 95°C'de 1 dakika; 35 dön-

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri

Gen	Primer	Dizi	Amplikon büyüklüğü	Kaynak
<i>qnrA</i>	<i>qnrAF</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516	22
	<i>qnrAR</i>	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
<i>qnrB</i>	<i>qnrBF</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	476	6
	<i>qnrBR2</i>	ATGAGCAACGATGCCTGGTA		
<i>qnrC</i>	<i>qnrCF</i>	GGGTTGTACATTATTGAATCG	307	6
	<i>qnrCR</i>	CACCTACCCATTTATTTTCA		
<i>qnrS</i>	<i>qnrSmF</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	7
	<i>qnrSmR</i>	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aacIbF</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	23
	<i>aacIbR</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGT		

güden oluşan 95°'de 1 dakika, 54°'de 1 dakika ve 72°'de 1 dakika ve son uzama olarak 72°'de 10 dakika olacak şekilde uygulandı⁷. PCR ürünlerine %2 agaroz jelde 120v, 60 dakika 1 x TBE tamponunda elektroforez yapıldı. Daha sonra 30 dakika 0.05 mg/L etidyum bromürle boyanarak görüntülendi.

Plazmid Konjugasyonu

Bu amaçla *qnrC* gen bölgesi içeren plazmid konjugasyon yoluyla *E.coli* bakterisine aktarıldı. Bir gün önceden hazırlanan *E.coli* DH10B kültüründen 1 ml alınarak 50 ml Brain Heart Infusion (BHI) buyyonuna eklendi ve 600 nm'de OD 0.5-0.8'e ulaşınca kadar çalkalanarak 37°C'de inkübe edildi. Bakteriler +4°C'de 10 dakika 5000 rpm'de santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı ve daha önceden soğutulmuş 10 ml distile steril suda homojen hale getirildi. Bu işlemten sonraki bütün aşamalar soğuk zincir koşullarında yapıldı. Bakterilerin yoğunlaştırılmasından sonra soğuk su ile yıkama işlemi yapıldı. Buna ek olarak, önceden soğutulmuş %10 gliserol ilave edilmiş su ile iki kez yıkama yapıldı. Çökelti %10 gliserollü 2 ml suda homojenize edildikten sonra 0.1 ml'lik hacimlere ayrılıp -80°C'de saklandı. Transformasyon için tüp -80°C'den alınıp buz içine konuldu ve çözülmesi beklendi. Ardından tüp içerisine 1-2 µl DNA (su veya TE içerisinde) eklendi. DNA kompetan bakteri karışımı uygun şekilde ayarları yapılmış olan (15 µF, 335Ω ve 2.5 KV) elektroforez aletinin (Cellject Duo, Thermo) 0.2 cm'lik elektroporasyon kabı içine konarak elektropore edildi. Daha sonra bu karışıma hemen 1 ml BHI besiyeri eklendi ve 225 rpm'de çalkalanarak 37°C'de bir saat bekletildi. Inkübasyon süresinin sonunda karışımdan 100 µl alınarak antibiyotikli seçici besiyerine yayıldı. Konjugasyon yoluyla *E.coli* DH10 suşuna aktarılan *qnrC* plazmidi çalışmada *qnrC* pozitif kontrol izolatu olarak kullanıldı.

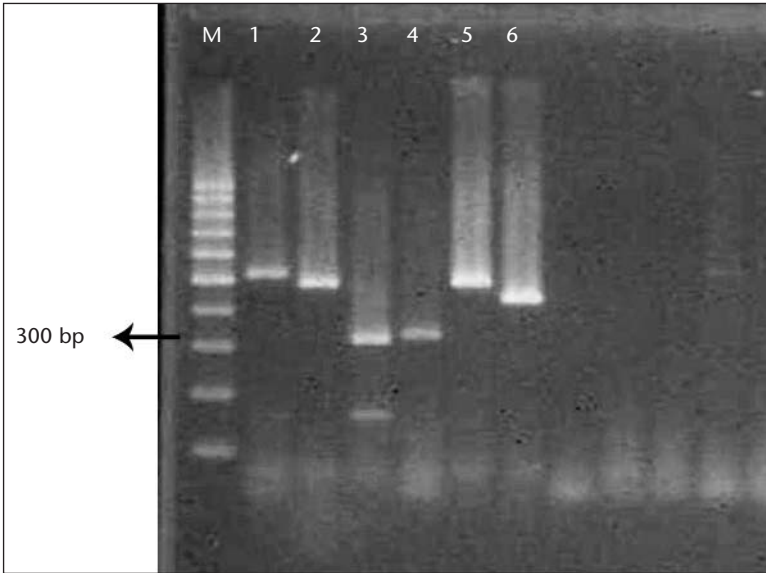
BULGULAR

Çalışmaya alınan 110 *P.aeruginosa* klinik izolatının 90'ı siprofloksasine duyarlı, 13'ü dirençli ve yedisi orta duyarlı olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda, multipleks PCR ile *qnrC* pozitif olduğunu düşündüğümüz üç *P.aeruginosa* klinik izolatu (izolat no: 24, L ve K1G7) saptanmıştır (Resim 1). Her üçü de siprofloksasine duyarlı olan bu isolatlarla yapılan multipleks PCR'de, *qnrC* bandına denk gelen 300 baz çifti (bp) bölgesinde bant görülmüştür. Bu isolatların sadece *qnrC* içeren primer ile tekrar PCR yapıldığında herhangi bir bant görülmemiştir. Gözlenen bandın multipleks PCR'ye bağlı yalancı bağlanma olduğuna karar verilmiştir.

TARTIŞMA

P.aeruginosa fırsatçı nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenleri arasındadır. Antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç gösteren bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde, antipsödomonal penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve özellikle siprofloksasin olmak üzere florokinolonlar kullanılmaktadır². Kinolonlardan ilk kullanıma giren nalidiksik asittir. Nalidiksik asidin etkisi üriner sistem enfeksiyonlarıyla sınırlı kalması nedeniyle yeni kinolon grubu antibiyotikler araştırılmaya başlanmış ve altıncı karbona bir flor atomu eklenmesiyle florokinolonlar sentezlenmiştir. Daha sonra florokinolonlara farklı bileşiklerin katılmasıyla etki spektrumu genişletilmiştir. Kinolon grubu antibiyotiklerin hedefi topoizomerez-DNA kompleksidir. Bu şekilde DNA sentezini hızla inhibe ederek bakterisidal etki gösterirler⁸⁻¹⁰. Kinolonların etki spektrumu günümüzde gram-pozitif, gram-negatif ve anaerob bakteriler olmak üzere oldukça geniştir. Kinolon direnci sıklıkla hedef enzimde değişiklik oluşturan ya da ilacın hücre içine girişinin azalmasına neden olan kromozomal mutasyonlarla oluşmaktadır. Direnç gelişiminde her iki mekanizma da etkili olabilmektedir¹¹.



Resim 1. Multipleks PCR'de kullanılan *qnr* pozitif suşlar ve şüpheli pozitif bulunan klinik izolat [M: DNA ladder; Hat 1: *qnrA* pozitif *E.coli* ref. 20; Hat 2: *qnrB* pozitif *K.pneumoniae* ref. 15; Hat 3: *qnrC* pozitif pHS11 suşu; Hat 4: Klinik izolat K1G7; Hat 5: *qnrB*₁ ve *aac(6')*-Ib-cr pozitif *E.coli* J53 pMG298; Hat 6: *qnrS* pozitif *E.coli* ref. 287].

Son yıllarda kinolonlara karşı plazmid aracılı direnç görülmeye başlanmıştır. İlk olarak 1998 yılında siprofloksasine dirençli bir *Klebsiella pneumoniae* suşunda plazmid aracılı kinolon direnci gösterilmiştir^{12,13}. Plazmidin tekrarlayan pentapeptid ailesine ait proteini kodladığı anlaşılmış ve bu gen bölgesi *qnr* olarak adlandırılmıştır. Zaman içinde farklı *qnr* determinantları tanımlanmış olmakla birlikte, ilk tanımlanan gen bölgesi *qnrA* olarak adlandırılmış; yeni bulunan diğer gen bölgelerine de *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD* isimleri verilmiştir¹². Ayrıca yine plazmid aracılı kinolon direnciyle ilişkili *aac(6')-Ib-cr* ve *qepA* determinantları tanımlanmıştır^{6,14}. Günümüzde dünyanın birçok farklı bölgesinde *qnr* taşıyan izolatlar tespit edilmiştir¹⁵⁻¹⁷. *qnr* gen ailesi siprofloksasin MİK değerlerinde yükselmele- re neden olsa da CLSI kriterlerine göre siprofloksasin direncine neden olmamaktadır¹³. Yapılan bir çalışmada, *K.pneumoniae* izolatlarında siprofloksasin MİK değeri ≤ 1 µg/ml olan izolatlarda *qnr* ve *aac(6')-Ib-cr* determinantlarının varlığı araştırılmış ve yüksek oran- da pozitiflik saptanmıştır¹⁸.

P.aeruginosa izolatlarında kinolon direnci sıklıkla DNA giraz enziminde mutasyon ve- ya atım pompa sisteminde hiperaktivasyon sonucu oluşmaktadır². Bu çalışmada, kistik fibrozisli hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarında *qnr* gen bölgeleri ve *aac(6')-Ib-cr* varlığı araştırılmış; ancak bu gen bölgelerinden herhangi birisini taşıyan izolata rast- lanmamıştır. Daha önce yapılan az sayıdaki çalışmalarda da *P.aeruginosa* izolatlarında po- zitif suş bulunamamıştır¹⁹⁻²¹. Çalışma sırasında multipleks PCR ile üç izolatın *qnrC* po- zitif olabileceğinden şüphelenilmiş; buna karşın yalnızca *qnrC* primeri ile yapılan PCR yön- teminde bunların hiçbirisinde pozitiflik saptanmamıştır. Benzer şekilde, *Enterobacteriace- ae* üyelerinde *qnr* gen bölgesinin araştırıldığı bir çalışmada Kim ve arkadaşları⁶ PCR so- nuçlarına göre 65 izolatta pozitiflik saptarken, dizi analizi sonucu bunlardan yalnız 37 ta- nesinin *qnr* determinanı taşıdığını doğrulamıştır. Bugüne kadar *P.aeruginosa*'da plazmid aracılı kinolon direnç bölgesi (PMQR) saptanamamış olsa da Martinez-Martinez ve arka- daşları²² *qnr* gen bölgesi taşıyan plazmidi *P.aeruginosa* PU21 suşuna konjugasyon yolu- la aktarabilmişlerdir.

Plazmid aracılı kinolon direnci *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde hızla artmaktadır²⁴. Bugüne kadar *P.aeruginosa* izolatlarında böyle bir gen bölgesi saptanamamış olsa da, bir- çok direnç mekanizmasına sahip olan bu bakteride bu tip bir direnç mekanizmasının saptanmasının, antimikrobiyal kemoterapiyi nasıl etkileyeceği yapılacak daha ileri çalış- malarla açıklığı kavuşacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada *qnr* pozitif suşların teminini sağlayan Prof. George A. Jacoby, Prof. Pat- rice Nordmann ve Prof. Minggui Wang'a teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Erdem B. *Pseudomonas*'lar, s: 551-8. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş (ed), Temel ve Klinik Mikro- biyoloji. 1999, 1. Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara.
2. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med 2002; 95(41): 22-6.

3. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanism from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001; 1(48): 87-102.
4. Nazik H, Ongen B. Türkiye’de plazmit aracılı kinolon direnci. Ankem Derg 2010; 24(1): 46-54.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M2-A9. 2006, 9th ed. CLSI, Wayne, PA.
6. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(2): 639-45.
7. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy J, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. J Antimicrob Chemother 2007; 60(2): 394-7.
8. Hooper DC, Strahilevitz J. Quinolones, pp: 487-510. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010, 7th ed. Elsevier Chirchill Livingstone, Philadelphia.
9. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis 2006; 6(10): 629-40.
10. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother 2003; 51(5): 1109-17.
11. Işık Y. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde kinolon direncinin moleküler olarak saptanması. Yüksek Lisans Tezi, 2008. Gazi Üniversitesi, Ankara.
12. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, et al. Qnr gene nomenclature. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(7): 2297-9.
13. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2005; 56(3): 463-9.
14. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *qepA* found in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(4): 3354-60.
15. Jonas D, Biehler K, Hartung D, Spitzmüller B, Daschner FD. Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in German intensive care units. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(2): 773-5.
16. Wu JJ, Ko WC, Wu HM, Yan JJ. Prevalence of *qnr* determinants among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwanese hospital, 1999-2005. J Antimicrob Chemother 2008; 61(6): 1234-9.
17. Iabedene H, Messai Y, Ammari H, et al. Dissemination of ESBL and *qnr* determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. J Antimicrob Chemother 2008; 62(1): 133-6.
18. Park YJ, Yu JK, Kim SY, Lee S, Jeong SH. Prevalence and characteristics of *qnr* determinants and *aac(6’)-Ib-cr* among ciprofloxacin-susceptible isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Korea. J Antimicrob Chemother 2010; 65(9): 2041-3.
19. Nazik H, Ongen B, Kuvat N. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance among isolates obtained in a Turkish intensive care unit. Jpn J Infect Dis 2008; 61(4): 310-2.
20. Shin JH, Jeong HS, Jung HJ, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and its association with extended-spectrum lactamases in clinical isolates in Korea. 19th ECCMID Congress, 16-19 May 2009, Helsinki, Finland. Abstracts book, Abstract no. P1478.
21. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(2): 559-62.
22. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 1998; 352(9105): 797-9.
23. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm FD, Jacoby GA, Hooper DC. Qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(8): 2872-4.
24. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6’)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(11): 3953-5.