

Enterobacteriaceae Üyelerinde Plazmid Aracılı Kinolon Direnç Determinantlarının Araştırılması: Çok Merkezli Bir Çalışma

Investigation of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in *Enterobacteriaceae*: A Multicenter Study

Ahmet Yılmaz ÇOBAN¹, Okan Kadir NOHUT², Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI¹, Gülçin BAYRAMOĞLU³, Müjgan PİRİNÇÇİLER⁴, Ebru ÇETİNKAYA⁵, Çiğdem ÇEKİÇ CİHAN⁶, Bülent BOZDOĞAN⁷, Belma DURUPINAR¹

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 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun.

² Ondokuz Mayıs University Faculty of Science and Literature, Department of Biology, Samsun, Turkey.

³ Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

³ Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.

⁴ Çanakkale Devlet Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Çanakkale.

⁴ Canakkale State Hospital, Clinical Microbiology Laboratory, Canakkale, Turkey.

⁵ Dr. Nafiz Kören Sincan Devlet Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

⁵ Dr. Nafiz Koren Sincan State Hospital, Clinical Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

⁶ Çorum Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Çorum.

⁶ Corum Chest Diseases Hospital, Clinical Microbiology Laboratory, Corum, Turkey.

⁷ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

⁷ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 18.11.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.02.2012

ÖZET

1986 yılından beri kullanımda olan florokinolonlar hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere etkili ajanlardır. Kinolonlar, DNA giraz ve topoizomeras IV enziminin inhibisyonu sonucu bakterisidal etki gösterir. Kinolonlara direnç gelişmesinde başlıca mekanizmalar bu enzimlerde meydana gelen kromozomal mutasyonlar ve atım pompaları veya dış zar geçirgenliğinde azalma nedeniyle hücre içinde ilaç birikiminin azalmasıdır. Ancak son yıllarda bu direnç mekanizmalarına ek olarak ortaya çıkan bir mekanizma da plazmid aracılı kinolon direncidir. Bu direnç genleri *qnr* olarak adlandırılmıştır. *Qnr* genleri tek baş-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 362 457 6070, **E-posta (E-mail):** cobanay2003@yahoo.com.tr

larına kinolon direncine neden olmasa da kinolon duyarlılığında azalmaya ve minimum inhibitör konsantrasyonu değerlerinde artmaya neden olmaktadır. Günümüzde tanımlanmış beş *qnr* gen bölgesi (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* ve *qnrS*) mevcuttur. Bu çalışmada plazmid aracılı kinolon direncini saptamak amacıyla, Türkiye'nin dört farklı bölgesinden toplanan *Enterobacteriaceae* ailesine ait klinik izolatlarda *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrS* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Çalışmaya, Mayıs 2009-Temmuz 2009 tarihleri arasında dört farklı merkezden [Trabzon (n= 387), Çanakkale (n= 82), Ankara (n= 96), Tokat (n= 82)] toplanmış olan *Enterobacteriaceae* ailesine ait 647 bakteriyel izolat dahil edilmiş ve bu suşlarda *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrS* genleri multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmamızda, 2 izolatta *qnrA*, 12 izolatta *qnrB*, 4 izolatta *qnrC* ve 10 izolatta *qnrS* pozitifliği saptanmış ve pozitifliklerin doğrulanması amacıyla dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda pozitif izolat sayısı azalmış; iki izolatta *qnrA1* [*Enterobacter cloacae* (kod no. 796), *Salmonella* grup B (kod no. 491)], iki izolatta *qnrB1* [*Salmonella* grup B (kod no. 491), *Citrobacter freundii* (kod no. 768)], bir izolatta *qnrB6* [*Escherichia coli* (kod no. CC1800)], bir izolatta *qnrB9* [*E.coli* (kod no. CC1873)], bir izolatta *qnrB24* [*Citrobacter koseri* (kod no. MP5200)], bir izolatta *qnrB27* [*C.freundii* (kod no. 842)], iki izolatta *qnrS1* [*E.coli* (kod no. CC1705), *E.coli* (kod no.159)] ve bir izolatta *qnrB2* [*E.coli* (kod no. 843)] pozitifliği saptanmıştır. *Qnr* geni saptanan izolatlardan biri siprofloksasine, ikisi nalidiksik aside dirençli bulunmuştur. Mutasyona bağlı kinolon direncinin klinik suşlar arasında artmasının yanı sıra, aktarılabir kinolon direncinin yaygınlaşması klinik açılarından önemli sonuçlar doğurabilecektir. Bu nedenle aktarılabir kinolon direncinin izlenmesi ve yayılım oranlarının saptanması, alınacak önlemlerin belirlenmesi için önemlidir.

Anahtar sözcükler: *Qnr*; plazmid; *Enterobacteriaceae*; florokinolon; direnç; Türkiye.

ABSTRACT

Fluoroquinolones which are in use since 1986, are effective agents both against gram-positive and gram-negative bacteria. Quinolones show bactericidal effect as a result of inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV enzymes. Main quinolone resistance mechanisms are chromosomal mutations in these enzymes and decreased intracellular accumulation due to efflux pumps or decreased membrane uptake. Recently a new quinolone resistance mechanism mediated by plasmids has been defined. These plasmids carry genes called as *qnr*. *Qnr* genes do not cause quinolone resistance but they cause decreased quinolone susceptibility and lead to higher minimum inhibitory concentrations. Currently there are *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* and *qnrS* genes. This study was aimed to investigate the presence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* isolates collected from four different centers in Turkey. A total of 647 isolates (387 from Trabzon, Black Sea region; 82 from Canakkale, Trace region; 96 from Ankara, Central Anatolia region; 82 from Tokat, Black Sea region) belonging to the *Enterobacteriaceae* family collected between May-July 2009, were included in the study. Presence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *qnrC* genes were investigated by multiplex polymerase chain reaction (PCR) method and confirmed by gene sequencing. The results of the PCR amplification revealed that 2 isolates were positive for *qnrA*, 12 isolates were positive for *qnrB*, 4 isolates were positive for *qnrC* and 10 isolates were positive for *qnrS*. However, the number of positive strains decreased with the use of gene sequencing, and this method led to the identification of *qnrA1* in two isolates [*Enterobacter cloacae* (code. 796), *Salmonella* group B (code. 491)], *qnrB1* in two isolates [*Salmonella* group B (code. 491), *Citrobacter freundii* (code. 768)], *qnrB6* in one isolate [*Escherichia coli* (code. CC1800)], *qnrB9* in one isolate [*E.coli* (code. CC1873)], *qnrB24* in one isolate [*Citrobacter koseri* (code. MP5200)], *qnrB27* in one isolate [*C.freundii* (code. 842)], *qnrS1* in two isolates [*E.coli* (code. CC1705), *E.coli* (code.159)] and *qnrB2* in one isolate [*E.coli* (code. 843)]. One of the isolates that carried the *qnr* gene was ciprofloxacin-resistant and two isolates were nalidixic-acid resistant. Transferable quinolone resistance due to the dissemination of *qnr* genes may have important impacts in terms of infection control and treatment problems. Survey of plasmid mediated quinolone resistance will help to determine the size of the issue and guide the measures that should be taken to avoid escalation of resistance and dissemination problem.

Key words: *Qnr*; plasmid; *Enterobacteriaceae*; fluoroquinolone; resistance; Turkey.

GİRİŞ

Florokinolonlar uzun yıllardır hem tıpta hem de veterinerlikte kullanılan antimikrobiyal ajanlardır¹. 1962 yılında ilk keşfedilen kinolon olan nalidiksik asidin, sadece üriner sistem enfeksiyonu etkeni olan gram-negatif basiller üzerine etkili olması kullanımını sınırlandırmıştır². Zaman içerisinde yapılan çalışmalarla altıncı atoma florun eklenmesiyle aktiviteleri artmış ve etki spektrumları genişlemiştir. Siprofloksasin özellikle *Pseudomonas aeruginosa* üzerine olan etkinliği nedeniyle gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlarda, levofloksasin de *Streptococcus pneumoniae* ve atipik pnömoni etkenleri olan *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* ve *Legionella pneumophila* üzerine olan etkinliği nedeniyle solunum yolu enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılmaktadır^{3,4}. Yaygın kullanıma bağlı olarak kinolonlara karşı direnç gelişimi de hızla artmaktadır.

Kinolonlara karşı direnç gelişiminde en önemli mekanizmalardan biri DNA giraz (*gyrA* ve *gyrB*) ve topoizomeraz IV'te (*parC* ve *parE*) meydana gelen mutasyonlardır. Buna ilave olarak dışa atım pompalarıyla ilacın dışarı atımı ve dış membran geçirgenliğinde azalma da kinolonlara karşı önemli direnç gelişim mekanizmalarıdır⁴. Bu direnç mekanizmalarına, ilk kez 1998 yılında bir *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatında tespit edilen yeni bir direnç mekanizması daha eklenmiş; bu direncin plazmidler aracılığıyla aktarıldığı saptanmış ve bu gen bölgesi *qnr* olarak adlandırılmıştır⁵. Ayrıca, yine plazmidle aktarılan kinolon atım pompası *qepA*, çoklu ilaç direnci atım pompası *oqxAB* ve modifiye aminoglikozid asetil transferaz geni *aac(6')-Ib-cr* tanımlanmıştır^{4,6,7}. Plazmidle aktarılan *qnr* genlerinin ilk tespitinden bugüne kadar farklı alt tipler (yedi adet *qnrA*, 27 adet *qnrB*, dört adet *qnrS*, birer adet *qnrC* ve *qnrD* geni) bildirilmiştir^{7,8}.

Qnr determinantları florokinolonlara karşı sadece duyarlılıkta azalmaya yol açmakta ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinde 16-32 kat artışa neden olabilmektedir⁹. Plazmid aracılı kinolon direnci, *Enterobacteriaceae* ailesinde giderek artan sıklıkta dünyanın farklı bölgelerinden bildirilmektedir¹⁰. Bu çalışmada plazmid aracılı kinolon direncini saptamak amacıyla, Türkiye'nin dört farklı bölgesinden gelen *Enterobacteriaceae* ailesine ait klinik izolatlarda *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrS* genlerinin varlığı araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel İzolatlar

Çalışmaya, Mayıs 2009-Temmuz 2009 tarihleri arasında dört farklı merkezden (Trabzon, Çanakkale, Ankara, Tokat) toplanmış olan *Enterobacteriaceae* ailesine ait 647 bakteriyel izolat dahil edildi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından gelen 387 izolat Vitek2 Compact cihazı (bioMérieux, Fransa); Çanakkale Devlet Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından gelen 82 izolat Trek Diagnostic Sensititre (Trek Diagnostic Systems, ABD) cihazı; Ankara Dr. Nafiz Kören Sincan Devlet Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından gelen 96 izolat BBL Crystal ID (BD, ABD) cihazı; Tokat Doğumevi Hastanesinden gelen 82 izolat ise konvansiyonel yöntemler ile tanımlandı. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle test edildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve sekans işlemi sonucunda *qnr* geni taşıdığı tespit edilen izolatların siprofloksasin ve nalidiksik asit MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA ekstraksiyonu kaynatma yoluyla yapıldı. Bu işlemde; bir gün öncesinden Mueller-Hinton agar besiyerinde üretilen bakterilerden birkaç koloni alınıp, 500 µl steril distile su içinde süspansiyon edildi ve 100°C'de 15 dakika kaynatıldı. Daha sonra 15000xg'de 20 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant, PCR'de kalıp DNA olarak kullanılmak üzere alındı. PCR yönteminde kontrol olarak; *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrS* genlerini taşıyan pozitif suşlar (Tablo I) ve ayrıca DNA içermeyen bir negatif kontrol kullanıldı.

PCR işleminde *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrS* gen bölgeleri multipleks olarak çalışıldı. PCR'de Kim ve arkadaşları¹¹ tarafından daha önce tanımlanan primer çiftleri kullanıldı (Tablo II). Amplifikasyon programı; 95°C'de 1 dakika; 35 siklusa oluşan 95°C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika ve son uzama aşaması olarak 72°C'de 10 dakika olacak şekildeydi. PCR ürünlerine %2 agaroz jelde 120V, 60 dakika 1xTBE tamponunda elektroforez işlemi uygulandı. Daha sonra 20 dakika 0.05 mg/L etidyum bromür ile

Tablo I. Çalışmada Kullanılan Pozitif Kontrol Suşları

Suş	Taşıdığı gen	Kaynak*
<i>E.coli</i> J53 pMG252	<i>qnrA1</i>	G. A. Jacoby
<i>E.coli</i> J53 pMG252	<i>qnrS1</i>	G. A. Jacoby
<i>K.pneumoniae</i> ref: 15	<i>qnrB</i>	P. Nordmann
<i>E.cloacae</i> ref: 287	<i>qnrS</i>	P. Nordmann
<i>E.coli</i> ref: 20	<i>qnrA</i>	P. Nordmann
PHS11 plazmid	<i>qnrC</i>	M. Wang

* Prof. George A. Jacoby: Lahey Clinic, Burlington, Massachusetts, USA; Prof. Partice Nordmann: Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914 "Emerging Resistance to Antibiotics", Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpital de Paris, Faculté de Médecine et Université Paris-Sud, K.-Bicêtre, France; Prof. Minggui Wang: Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, 12 M. Wulumuqi Rd., Shanghai 200040, People's Republic of China.

Tablo II. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri

Gen	Primer	Dizi	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>qnrA</i>	<i>qnrAF</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516
	<i>qnrAR</i>	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	
<i>qnrB</i>	<i>qnrBF</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	476
	<i>qnrBR2</i>	ATGAGCAACGATGCCTGGTA	
<i>qnrC</i>	<i>qnrCF</i>	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	307
	<i>qnrCR</i>	CACCTACCCATTTATTTCA	
<i>qnrS</i>	<i>qnrSmF</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
	<i>qnrSmR</i>	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	

boyanarak görüntüledi. PCR işlemi sonunda pozitif olduğu düşünülen izolatlar tekrar tek primer ile PCR uygulandı.

Tekrarlanan PCR sonrası pozitif gen bölgesi saptanan izolatlar dizi analizi ile doğrulandı. Bunun için ampikonlar Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderildi. Dizi analizi sonuçları NCBI Nucleotide Blast programı kullanılarak Gen Bankasıyla karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan bakteriyel izolatların tür ve merkezlere göre dağılımı Tablo III'de verilmiştir. *E.coli* izolatlarının %35.3 (163/462)'ünde, *Klebsiella* spp. izolatlarının ise %50 (51/102)'sinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitifdir. *Qnr* geni saptanan izolatlardan ise sadece *qnrS1* saptanan 159 no'lu *E.coli* izolatında GSBL pozitif saptanmıştır. *Qnr* geni saptanan izolatların siprofloksasin ve nalidiksik asit MİK değerleri Tablo IV'te görülmektedir.

Multipleks PCR işlemi sonunda 99 izolatta *qnrA*, 157 izolatta *qnrB*, 17 izolatta *qnrC* ve 46 izolatta *qnrS* şüpheli pozitif olarak belirlenmiş; ancak sonrasında pozitif olan izolatlarda tekrarlanan PCR ile 2 izolatta *qnrA*, 12 izolatta *qnrB*, 4 izolatta *qnrC* ve 10 izolatta *qnrS* pozitifliği saptanmıştır. Doğrulama amacıyla yapılan dizi analizi sonucunda ise pozitif bulunan izolat sayısı 10'a düşmüş, bir izolatın (491 no) hem *qnrA1* hem de *qnrB1* geni taşıdığı izlenmiştir (Tablo IV). İzolatlarda tespit edilen *qnr* tipleri Tablo IV'te, *qnr* gen bölgesi saptanan izolatlar ve pozitif kontrol suşlarına ait görüntü ise Resim 1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışmada saptanan *qnr* oranları sırasıyla; *qnrA* %0.3, *qnrB* %0.9, *qnrS* %0.4'tür.

TARTIŞMA

Kinolonlar bakterisidal etkiye sahip sentetik kemoterapötik ajanlardır. 1960'lı yıllarda kullanıma giren nalidiksik asitten günümüze kimyasal yapılarında yapılan değişikliklerle

Tablo III. Dört Merkezden Gönderilen İzolatların Türlerine ve Gönderilen Merkezlere Göre Dağılımı

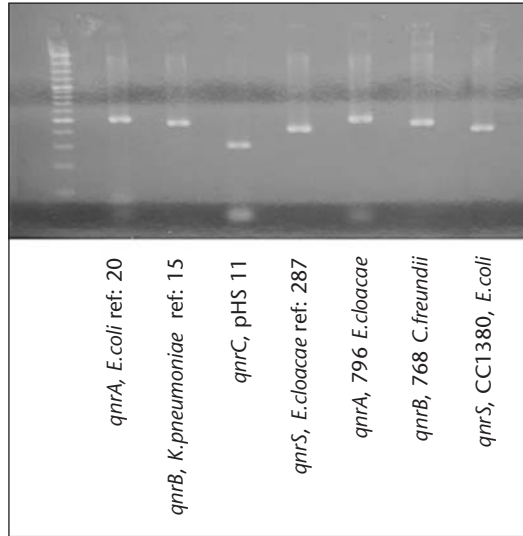
İzolatlar	Trabzon	Çanakkale	Ankara	Tokat	Toplam
<i>E.coli</i> (GSBL +/-)	262 (138/124)	49 (25/24)	87	64	462
<i>Klebsiella</i> spp. (GSBL +/-)	70 (40/30)	11 (11/0)	9	12	102
<i>Serratia</i> spp.	14	4	-	-	18
<i>Citrobacter</i> spp.	5	2	-	-	7
<i>Hafnia</i> spp.	1	-	-	-	1
<i>Enterobacter</i> spp.	13	6	-	1	20
<i>Proteus</i> spp.	13	8	-	4	25
<i>Salmonella</i> spp.	5	-	-	1	6
<i>Morganella</i> spp.	4	1	-	-	5
<i>Providencia</i> spp.	-	1	-	-	1
Toplam	387	82	96	82	647

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz.

Tablo IV. Qnr Geni Saptanan İzolatların Türü, Örnek Kaynağı, Taşıdığı qnr Geni, Dirençli Olduğu Antimikrobiyaller, Siprofloksasin ve Nalidiksik Asit MİK Değerleri

Suş no	Tür	Kaynak	Merkez	Qnr geni	Direnç fenotipi	MİK (µg/ml)	
						SİP	NA
796	<i>E.cloacae</i>	Kan	Trabzon	<i>qnrA1</i>	AM, AMC, CZ, CXM, GN, SXT, ER, CAZ, FOX, FEP	0.5	16
491	<i>Salmonella</i> serogrup B	Kan	Trabzon	<i>qnrA1/qnrB1</i>	AMI, CZ, CXM, GN, FOX	0.25	64
768	<i>C.freundii</i>	İdrar	Trabzon	<i>qnrB1</i>	AMC, AM, CXM, GN, SXT, FOX	4	256
842	<i>C.freundii</i>	Apse	Trabzon	<i>qnrB27</i>	AMC, AM, CZ, CXM, FOX	1	256
843	<i>E.coli</i>	Kan	Trabzon	<i>qnrS2</i>	AM, SXT	0.25	8
159	<i>E.coli</i>	İdrar	Trabzon	<i>qnrS1</i>	AM, CXM, SXT, CAZ, FEP	0.25	4
CC1800	<i>E.coli</i>	İdrar	Tokat	<i>qnrB6</i>	-	0.25	1
CC1873	<i>E.coli</i>	İdrar	Tokat	<i>qnrB9</i>	-	0.25	1
CC1705	<i>E.coli</i>	İdrar	Tokat	<i>qnrS1</i>	AM, SXT	0.5	4
MP5200	<i>C.koseri</i>	Apse	Çanakkale	<i>qnrB24</i>	AM	0.5	16

AM: Amikasin; AMC: Amoksisilin-klavulanik asit; CAZ: Sef tazidim; CXM: Sefuroksim; CZ: Sefazolin; ER: Ertapenem; FEP: Sefepim; FOX: Sefoksitin; GN: Gentamisin; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; SİP: Siprofloksasin; NA: Nalidiksik asit.



Resim 1. Qnr pozitif kontrol ve qnr geni taşıdığı saptanan klinik izolatlar.

hem antimikrobiyal etki spektrumu genişlemiş hem de farmakodinamik özellikleri değişmiştir. Bugün hem gram-pozitif hem gram-negatif hem de anaeroplara üzerine etkilidirler. Kinolonların zaman içerisinde meydana gelen bu değişikliklerle birlikte kullanımları da yaygınlaşmıştır⁴. Yaygın kullanım direnç sorununu da birlikte getirmiştir. Kinolon grubu antibiyotiklere başlıca direnç gelişimi iki mekanizmayla olmaktadır; i) kinolonların hedefindeki değişim ve ii) membran geçirgenliğinde azalma veya atım pompalarının varlığına bağlı olarak hücre içinde ilaç birikiminin azalmasıdır¹². Bu direnç mekanizmalarının ikisi de kromozomal kaynaklıdır. Ancak ilk kez 1998 yılında bir *K.pneumoniae* izolatından 218 aminoasitten oluşan tekrarlayan pentapeptid ailesine ait olan ve *qnr* olarak adlandırılan plazmidle aktarılan yeni bir gen bölgesi saptanmış ve bu gen bölgesi *qnrA* olarak adlandırılmıştır⁹. *Qnr* determinantlarının akuatik bakteri türlerinden, *Aeromonas* spp., *Shewanella algae* ve *Vibrio splendidus*'tan orijin almış olabileceği düşünülmektedir^{9,13}.

Türkiye'de daha önce farklı merkezlerde *Enterobacteriaceae* ailesinde *qnr* genleri araştırılmıştır. Ülkemizde 2005 yılında yapılan bir çalışmada, 49 izolatta *qnrA* gen bölgesi araştırılmış ve bir *E.cloacae* bir de *C.freundii* izolatında *qnrA* geni tespit edilmiştir¹⁴. Daha sonra Öktem ve arkadaşları¹⁵ tarafından yapılan çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen 356 *Enterobacteriaceae* üyesinde *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genlerinin varlığı araştırılmış, 61 izolatta *qnrA*, 3 izolatta *qnrS* geni saptanmıştır. *QnrA* saptanan izolatların ikisinin ve *qnrS* saptanan izolatların birinin GSBL pozitif olduğu gözlenmiştir. Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada, yoğun bakım hastalarından izole edilen toplam 460 gram-negatif bakteride *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* genleri araştırılmış, 3 (%0.65) *E.cloacae* izolatının birinde *qnrB1* ve ikisinde *qnrS1* saptanmıştır¹⁶. Türkiye'de farklı hastanelerden izole edilen ve toplam 248 *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatında *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* genlerinin sıklığının araştırıldığı bir çalışmada da, bir *K.pneumoniae* izolatında farklı plazmidler üzerinde *qnrB1* ve *aac(6')-Ib-cr* genleri saptanmıştır¹⁷. Mevcut literatür bulgularına göre çalışmamız, Türkiye'de çok merkezli olarak dört *qnr* gen ailesinin de araştırıldığı ve farklı *qnrB24* ve *qnrB27* alt tiplerinin de belirlendiği ilk çalışmadır. İspanya'da yapılan çok merkezli bir çalışmada, 19.010 izolat (18.624 *Salmonella* spp., 285 *E.coli*, 68 *Shigella* spp., 29 *K.pneumoniae*, 2 *C.freundii* ve 2 *Proteus mirabilis*) kinolon direnci açısından araştırılmış ve azalmış siprofloksasin duyarlılığı (MİK 0.12- 0.5 mg/L) gösteren ancak nalidiksik aside duyarlı olan 123 izolatta *qnr* genleri araştırılmış ve iki *Salmonella* spp. izolatında *qnrB*, 25 *Salmonella* spp. ve bir *E.coli* izolatında *qnrA*, dört *Salmonella* spp. izolatında *qnrS* gen varlığı saptanmıştır⁷. Yine 13 Avrupa ülkesinden toplanan insan, hayvan, besin ve çevreden izole edilen 485 *Salmonella* spp. ve 133 *E.coli* izolatında plazmidle aktarılan kinolon direnç genlerinin varlığı araştırılmış ve *Salmonella* spp. izolatlarının %59 (288/485)'unda, *E.coli* izolatlarının %15 (20/133)'inde pozitiflik saptanmıştır. *QnrA* üç *Salmonella* spp. izolatında, *qnrB* 138 *Salmonella* spp. ve bir *E.coli* izolatında, *qnrS* 125 *Salmonella* spp. ve 19 *E.coli* izolatında tespit edilmiştir¹⁸.

Qnr gen ailesi alt varyantlarla genişlemekte ve *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* ve *qnrC* genlerinin tüm alt varyantlarının multipleks PCR yöntemiyle tanımlanması güçlükle arz etmektedir. Multipleks PCR işlemiyle çalışmamızda da olduğu gibi pozitiflik oranları çok yüksek bulunmuş ve sonrasında tek primer ile pozitif bulunan izolatlar için tekrar PCR yapılmak zo-

runda kalınmıştır. Tek primerle yapılan PCR ile pozitiflik oranları önemli ölçüde azalmış olup bu izolatlarda *qnr* varlığı sekanslamayla doğrulanmıştır. Çalışmada çok fazla sayıda izolata yapılan multipleks PCR işleminin zaman, iş yükü ve maliyet açısından çok etkin olmadığı gözlenmiştir. Guillard ve arkadaşları¹⁹ yaptıkları çalışmada, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD* ve *qepA* genlerini gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırmışlar ve plazmid aracılı kinolon direncinin tespitinde hızlı bir yöntem tanımlamışlardır.

Çalışmamızda, dört farklı merkezden toplanan *Enterobacteriaceae* ailesine ait 647 klinik izolatta *qnr* genleri araştırılmıştır. İlk aşamada pozitif suş sayısı çok görülmekle birlikte tekrar tek primerle yapılan PCR işlemi ve sonrasında sekans işlemi sonucunda pozitif izolat sayısı oldukça azalmıştır. Yapılan çalışmalarda *qnr* genlerinin sıklığının değişkenlik göstermesi, farklı duyarlılık paternine sahip izolatların çalışmalara dahil edilmesi olabilir^{7,20}. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* gen sıklığının düşük olduğunu göstermektedir. Ayrıca, çalışmamız ülkemizde *qnrC* geninin araştırıldığı ilk çalışmadır ve çalışmada *qnrC* pozitifliği saptanmamıştır. Sonuç olarak, günümüzde hızla direnç gelişimi birçok antibakteriyel ajan gibi kinolon kullanımını da sınırlamaktadır. Bu nedenle direnç gelişim yollarının tespit edilip, bunlarla ilgili çalışma sayılarının artırılması ve dünya çapındaki yayılımın belirlenmesi tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde yardımcı olacaktır.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızda kullanılmak üzere gönderdikleri *qnr* pozitif suşlar dolayısıyla sayın Prof. G. A. Jacoby, Sayın Prof. P. Nordmann ve Sayın Prof. M. Wang'a teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* 2009; 16(8):1028-46.
2. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(5): 1109-17.
3. 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. 2009, 7th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
4. Wolfson JS, Hooper D. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microb Rev* 1989; 2(4): 378-424.
5. Martinez LM, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351(9105): 797-9.
6. Yamane K, Wochino J, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated quinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(9): 3354-60.
7. Herrera-Leon S, Gonzalez-Sanz R, Herrera-Leon L, Echeita MA. Characterization of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(2): 287-90.
8. Garcia-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, et al. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the pediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(8): 1725-9.
9. Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(2): 231-7.

10. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper D, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microb Rev* 2009; 22(4): 664-89.
11. 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.
12. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41(Suppl 2): S120-6.
13. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8):3523-5.
14. Nazik H, Öngen B. Türkiye’de plazmid aracılı kinolon direnci. *ANKEM* 2010; 24(1): 46-54.
15. Öktem MA, Biçmen M, Gülay Z. Kan kültürlerinden soyutlanan *Enterobacteriaceae* izolatlarında plazmid ile ilişkili kinolon direnci genlerinin saptanması. 8. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, 2-4 Nisan 2008, İstanbul. Program ve Özet Kitabı, P28.
16. 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.
17. Poirel L, Gür D, Minarini L, Arslan U, Nordmann P. Molecular epidemiology of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in extended spectrum beta-lactamase producing *E.coli* and *K.pneumoniae* isolates from Turkey. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 19-22 April 2008, Barcelona. Abstract Book, P1527.
18. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, et al. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(6): 1278-86.
19. Guillard T, Moret H, Brasme L, et al. Rapid detection of qnr and qepA plasmid-mediated quinolone resistance genes using real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70(2):253-9.
20. 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.