

# Kan Akımı Enfeksiyonu Etkeni Olan Kinolona Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Plazmid Aracılı Kinolon Direnç Genlerinin Araştırılması

## Investigation of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Quinolone-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Isolates from Bloodstream Infections

Celal Kurtuluş BURUK, Hikmet ÖZTEL OCAK, Gülçin BAYRAMOĞLU, Faruk AYDIN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.  
Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 04.12.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.02.2016

### ÖZ

Sepsiste en sık karşılaşılan gram-negatif fırsatçı patojenlerden olan *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonların tedavi seçeneklerinden biri de kinolonlardır. DNA sentezini bozarak etki gösteren kinolonlara karşı direnç giderek artmaktadır. Direncin yayılmasında plazmid aracılı kinolon direnç (plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR) genlerinin horizontal aktarımı önemli rol oynamaktadır. PMQR genlerinin prevalansı ile ilgili ülkemize ait veriler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen kinolona dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında, bugüne kadar PMQR genleri olarak tanımlanan *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA* ve *oqxAB*'nin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakterioloji Biriminde, Ocak 2012 - Ağustos 2013 tarihleri arasında 187 hastaya ait 193 kan örneğinden üretilen 127 *E. coli* ve 66 *Klebsiella* spp. izolatından, fenotipik yöntemlerle nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen izolatlar dahil edilmiştir. PMQR genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmış; *aac(6′)-Ib-cr* varyantının belirlenmesinde PCR sonrası restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi kullanılmıştır. Pozitif bant içeriği dizilerek, daha önce tanımlanmış direnç gen dizileri ile karşılaştırılmış ve doğrulanmıştır. Çalışmamızda, *E.coli* izolatlarının %56.7'si (72/127) ve *Klebsiella* spp. izolatlarının %19.7'si (13/66) olmak üzere izolatların toplam %44'ü (85/193) fenotipik olarak dirençli bulunmuştur. Dirençli 13 *Klebsiella* izolatından 11'i *K.pneumonia*, ikisi *K.oxytoca*'dır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten suşlarda, kinolon direncinin (50/80, %62.5), GSBL negatiflere (35/113, %30.9) göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Direnç gen prevalansları, kinolona dirençli *E.coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında

**İletişim (Correspondence):** Doç. Dr. Celal Kurtuluş Buruk, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 61080, Trabzon, Türkiye. Tel (Phone): +90 462 377 5124, E-posta (E-mail): kburuk@ktu.edu.tr

sırasıyla, *qnrA*, %1.4 ve %15.4; *qnrB*, %4.2 ve %61.5; *qnrS*, %1.4 ve %7.7; *qepA*, %1.4 (sadece *E.coli*); *aac(6')-Ib-cr*, %38.9 ve %92.3; ve *oqxAB*, %1.4 ve %84.6 olarak belirlenmiştir. *qnrC* ve *qnrD* genleri tespit edilmemiştir. Dirençli *Klebsiella* izolatlarında çoklu gen taşıyıcılığı *E.coli*'ye göre daha sık gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, kinolona dirençli *E.coli* ve *Klebsiella* spp. kan izolatlarında, aktarılabılır genlerin dirence katkısının araştırıldığı bu çalışmada, bölgesine hizmet veren üniversitemiz hastanesi izolatlarında PMQR genlerinin prevalanslarının ülkemiz verilerinden yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca, bu çalışma ile ülkemizde klinik örneklerde ilk defa prevalansları sorgulanan genlerden *qnrD* geni saptanamazken, *oqxAB* genlerinin sıklıklarına ait ilk veriler sunulmuştur. Bununla birlikte *oqxAB* genlerinin genetik konumları, konjugasyon veya hibridizasyon yöntemleri ile doğrulanmaya gereksinim göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Escherichia coli*; *Klebsiella* türleri; kan kültürü; plazmid aracılı kinolon direnç genleri.

## ABSTRACT

One of the treatment options of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. infections which are the most common opportunistic pathogens of gram-negative sepsis is quinolones. Resistance to quinolones which act by disrupting DNA synthesis has been increasing. Horizontal transfer of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes play an important role in the spread of resistance. The data about the prevalence of PMQR genes in our country is quite limited. The aim of this study was to investigate the presence of known PMQR genes namely *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB* amongst quinolone-resistant *E. coli* and *Klebsiella* spp. strains isolated from blood cultures. One hundred twenty seven *E.coli* and 66 *Klebsiella* isolates detected as nalidixic acid- and/or ciprofloxacin-resistant by phenotypical methods, from 193 blood samples of 187 patients admitted to Karadeniz Technical University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bacteriology Unit of Patient Service Laboratory between January 2012 to August 2013 were included in the study. The presence of PMQR genes were investigated by polymerase chain reaction (PCR) and for the detection of *aac(6')-Ib-cr* variants PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used. The positive bands were sequenced using the same primers, and aligned with formerly defined resistance gene sequences, and confirmed. In the study, 56.7% (72/127) of *E.coli* and 19.7% (13/66) of *Klebsiella* spp. isolates, with a total of 44% (85/193) of all the isolates were found to be phenotypically resistant to quinolones. Of the 13 resistant *Klebsiella* isolates, 11 were *K.pneumoniae*, and two were *K.oxytoca*. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing isolates showed higher resistance (50/80, 62.5%) to quinolones than the negative ones (35/113, 30.9%). The prevalence of quinolone resistance genes among resistant *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates was determined as *qnrA*, 1.4% and 15.4%; *qnrB*, 4.2% and 61.5%; *qnrS*, 1.4% and 7.7%; *qepA*, 1.4% (only *E.coli*); *aac(6')-Ib-cr*, 38.9% and 92.3%; and *oqxAB*, 1.4% and 84.6%, respectively. *qnrC* and *qnrD* genes were not detected. Carriage of multiple resistance genes were observed more frequently among resistant *Klebsiella* isolates than *E.coli* strains. As a result, in this study investigating the contribution of transferrable genes to quinolone resistance, prevalence of PMQR genes in quinolone-resistant and blood isolates of *E.coli* and *Klebsiella* in our university hospital serving the region were found to be higher than the current data reported from the other studies in our country. Furthermore, this study presented the initial data for the first time in our country on the prevalence of *qnrD* which was undetected, and the frequency of *oqxAB* gene in clinical samples. However, location of *oqxAB* gene needs to be confirmed by conjugation or hybridization methods.

**Keywords:** *Escherichia coli*; *Klebsiella* species; blood culture; plasmid-mediated quinolone resistance genes.

## GİRİŞ

*Escherichia coli* ve *Klebsiella* türleri sepsiste en sık izole edilen gram-negatif bakterilerdendir<sup>1</sup>. Uygun antibiyoterapi ile mortalite oranlarının azaltılabılmesine karşın, antibiyotiklere

direncin artması tedaviyi zorlaştırmaktadır<sup>2</sup>. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine karşı etkinliği yüksek olan ve tedavide sıklıkla kullanılan kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç artışı da önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. DNA sentezini bozarak bakterisidal etki gösteren kinolonlara karşı direnç, kromozomal (DNA giraz ve/veya topoizomeras IV'ü kodlayan genlerde ya da dışa-atım pompalarının ekspresyonunu ve zar geçirgenliğini düzenleyen genlerde mutasyon oluşumu) veya plazmid aracılı (plazmid kaynaklı kinolon direnç [PMQR] genlerinin varlığı) olabilmektedir<sup>3,4</sup>.

PMQR, bakteriler arasında konjugasyon yoluyla horizontal geçiş göstererek acil bir klinik problem olmuştur. PMQR genlerinin aktarılabilişliğinin yanı sıra bir diğer önemi, florokinolonun terapötik seviyelerinin varlığında dahi, klinik olarak dirençli suşların ortaya çıkma olasılığını artırmasıdır<sup>5,6</sup>. PMQR genlerinin tek başlarına varlıkları bakterilerde küçük minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) yükselmesine neden olsa da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre hassas olarak yorumlanabilmektedir<sup>7</sup>. Bununla birlikte bu küçük değişimler hastada daha yüksek düzey dirence sahip mutantların seçimi için yeterli olmaktadır<sup>8</sup>. Kinolonlara direncin plazmidle ilişkili olabildiği, *qnr* genlerinin gösterilmesiyle gündeme gelmiştir. Plazmidle aktarılan *qnr* genlerinin ilk tespitinden bugüne kadar farklı alt tipler (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS* ve *qnrD*) tanımlanmıştır<sup>5</sup>. Qnr proteinleri, DNA giraz ve topoizomeras IV'e bağlanarak bu enzimleri kinolonun inhibisyonundan korumaktadır<sup>9</sup>. Ayrıca plazmidle aktarılan kinolon atım pompa geni *qepA*, çoklu ilaç direnci atım pompa geni *oqxAB* ve modifiye aminoglikozid asetil transferaz geni *aac(6')-Ib-cr*'nin tanımlanması ile PMQR genlerinin önemi daha da artmıştır<sup>8,10</sup>.

Plazmid aracılı kinolon direnç genlerinin prevalansının takibi, hastanelerde direnç aktarımının önlenmesi ve kinolon grubu antibiyotiklerin tedavi protokollerindeki yerine ışık tutması açısından önemlidir. Bununla birlikte PMQR genlerini taşıyan suşların in vitro olarak kinolonlara duyarlı bulunabilmesi, fenotipik testlerle saptanamaması, tedavi protokollerinin uygulanmasında ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasında güçlükler neden olmaktadır. PMQR genlerinin prevalansı ile ilgili dünya genelinde birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte, bu konu ile ilgili olarak ülkemize ait veriler oldukça sınırlıdır<sup>6,8</sup>. Ülke sağlık politikası planlayıcılarına sağlayacağı katkısının yanında hastanemizde izole edilen suşlarda direnç oranlarının bilinmesi, bölgesel klinisyenlerin enfeksiyon kontrolündeki yaklaşımlarını etkileyebilecektir. Bu nedenle planlanan bu çalışmada, 2012-2013 yıllarında kan örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında kinolon direnç oranlarının belirlenmesi, aktarılabiliş kinolon direnç mekanizmalarından PMQR genleri olan *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* ve *oqxAB* varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi (KTÜTF) Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'nın onayı ile (Protokol: 2013/175) gerçekleştirilen bu çalışmaya, KTÜTF Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakteriyoloji Biriminde, Ocak 2012 - Ağustos 2013 tarihleri arasında 187 hastaya ait kan örneklerinden izole edilen 193 *Escherichia coli* ve *Klebsiella* izolatları dahil edildi. Bu izolatlardan

nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen 81 hastaya ait 85 izolat PMQR genlerinin araştırılması için kullanıldı. Dört hastanın iki epizotu tespit edilmiş olup her epizotun ilk izolatu çalışmaya alındı<sup>11</sup>.

Laboratuvarımıza, kan kültür vasatına inoküle edilmiş olarak gönderilmiş olan kan örnekleri, BACTEC 9240 otomatize kültür sisteminde (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, ABD) inkübe edildi. Üreme sinyali izlenildiğinde kan kültür vasatından alınan bir miktar örnek %5 koyun kanlı agar, EMB agar ve çikolatamsı agara inoküle edildi ve uygun koşullarda inkübe edildi<sup>12,13</sup>. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. (*K.pneumoniae* veya *K.oxytoca*) olarak tiplendirilen suşların direnç paternleri NMIC/ID-55 panellerinin kullanıldığı BD Phoenix sisteminde MİK yöntemiyle incelendi. CLSI kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi<sup>7</sup>. Nalidiksik asit ve/veya siprofloksasine dirençli olarak saptanan suşlar, Kirby-Bauer metoduna göre standart disk difüzyon metodu ile tekrar test edilerek dirençleri CLSI kriterlerine göre doğrulandı<sup>7</sup>. GSBL üretiminin fenotipik tespiti için kombine disk yöntemi kullanıldı<sup>7</sup>. Suşlar DNA izolasyonu yapıncaya kadar %15 gliserol (Riedel-de Haën AG, Almanya) içeren triptik soy buyyon besiyerinde (Biolife, İtalya) -80°C'de saklandı.

PMQR genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırılması için, izolatlardan kaynatma yöntemiyle nükleik asit izolasyonu yapıldı ve alikotlanarak kullanıncaya kadar -80°C'de saklandı. Negatif kontrol olarak *E.coli* ATCC25922 ve *K.pneumonia* ATCC13883 suşları kullanıldı. Çoban ve arkadaşlarının<sup>14</sup> P. Nordmann'dan sağladığı *qnrA* (*E.coli* ref: 20), *qnrB* (*K.pneumoniae* ref: 15), *qnrS* (*E.cloacae* ref: 287) pozitif suşlar ve M. Wang'dan sağladığı *qnrC* pozitif plazmid (pHS11) pozitif kontrol olarak kullanıldı. *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* ve *aac(6')-Ib* genleri için birer; *oqxAB* dışa-atım pompa genleri için ise iki çift primer kullanıldı<sup>15-20</sup> (Tablo I).

Her gen amplifikasyonu için tekli PCR işlemi uygulandı. Çalışılan tüm gen bölgeleri için aynı karışım hazırlama protokolü ve termal döngü cihazı programı kullanıldı. Tüm direnç gen amplifikasyonlarında reaksiyon karışımı standart olarak 50 µl'lik hacmin içinde; 0.2 µM her bir primer, 0.2 mM her bir dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U taq polimeraz enzimi ve 2 µl hedef DNA olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon tüpü otomatik termal döngü cihazına (Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700, ABD) yerleştirildi. Termal döngü cihaz ayarları Robicsek ve arkadaşları<sup>15</sup> tarafından uygulanan protokol esas alınarak bantların net olması ve ekstra bant oluşmaması bağlamında modifiye edildi. Reaksiyonun sıcaklık ve zaman ayarları; 94°C'de 5 dk başlangıç denatürasyonu sonrası, her döngü için 94°C'de 60 sn denatürasyon, 55°C'de 60 sn primer birleşmesi, 72°C'de 60 sn polimerizasyon aşamalarını içeren 30 döngü ve sonrasında 72°C'de 10 dk son uzama süresi olarak düzenlendi<sup>15</sup>. PCR ürünlerinin varlığı %2'lik agaroz jel elektroforezini takiben ultraviyole ilüminatörde gözlemlendi. Karar verilirken, 100 baz çifti (bç) adimli DNA belirteci (GelPilot 100 bp Ladder, Qiagen, Almanya) ve pozitif kontroller ile uyumları karşılaştırıldı. Kinolon direnci ile ilişkili aminoglikozid asetil transferaz geni *aac(6')-Ib-cr'*'nin diğer *aac(6')-Ib* genlerinden ayırımı PCR sonrası restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile yapıldı. Bunun için *aac(6')-Ib* pozitif çıkan PCR ürünleri (482 bç), 55°C'de 4 saat *BseGI* (Thermo Scientific, Litvanya) enzim kesimine tabi tutuldu. Kesim işlemi sonunda %2'lik agaroz jel elektroforezinde 206 ve 276 bazlık iki

**Tablo 1.** PMQR genlerinin araştırılmasında kullanılan primerler

Primer	Dizi (5'-3')	Ürün uzunluğu (baz çifti)	Kaynak no.
QnrA F	ATTCTCACGCCAGGATTTG	516	15
QnrA R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
QnrB F	GATCGTAAAAGCCAGAAAGG	469	15
QnrB R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
QnrC F	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	307	16
QnrC R	CACCTACCCATTTATTTTCA		
QnrD F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	582	17
QnrD R	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
QnrS F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	16
QnrS R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
QepA F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	199	18
QepA R	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG		
Aac(6')-Ib F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	19
Aac(6')-Ib R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
oqxA F	CTTGCACTTAGTTAAGCGCC	868	20
oqxA R	GAGGTTTTGATAGTGGAGGTAGG		
oqxB F	GCGGTGCTGTCGATTTTA	787	20
oqxB R	TACCGGAACCCATCTCGAT		

bant görülmeyen (enzim kesim bölgesi olmayan) ürünler olarak *cr* varyantı olarak kaydedildi<sup>21</sup>. Her izolat için yukarıda belirtilen işlemler en az iki defa tekrarlanarak PMQR PCR pozitiflikleri doğrulandı.

PCR pozitif olarak belirlenen ürünlerin içeriklerini doğrulamak amacıyla aynı primerler kullanılarak dizileme yapıldı. Elde edilen DNA dizileri daha önce tanımlanmış dizi verileriyle BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programında araştırıldı, karşılaştırıldı ve doğrulandı (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?>).

## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 187 hastaya ait 193 *E.coli* ve *Klebsiella* izolatından, nalidiksik asit ve/veya siprofloksasin direnci tespit edilen 81 hastaya ait 85 izolatta (%44) PMQR genlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu izolatların 72'si (%84.7) *E.coli*, 13'ü (%15.3) *Klebsiella* spp. (11 *K.pneumonia*, 2 *K.oxytoca*) olarak tanımlanmıştır. İzolatların 13'ü (%15.3) yoğun bakım, 42'si (%49.4) erişkin dahili bölüm, 12'si (%14.1) cerrahi bölüm ve 3'ü (%3.5) pediatri servislerinde; 15'i (%17.6) ise acil polikliniklerinde takip edilen hastalardan izole edilmiştir. Erişkin dahili bölüm servislerinden gelen örneklerden üretilen 42 izolatın 22'sinin (toplam izolatların %25.9'u) kemik iliği transplant alıcılarına ait olduğu belirlenmiştir.

İzolatların tümü (n= 193) dikkate alındığında, kinolon direnci *E.coli* (n= 72, %56.7) izolatlarında *Klebsiella* spp. (n= 13, %19.7) izolatlarına göre daha yüksek bulunmuştur

(Tablo II). Kinolon direncinin, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten izolatlarda (50/80, %62.5), GSBL negatiflere (35/113, %30.9) oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Fenotipik olarak kinolon direncine sahip 85 izolata 47'sinde (%55.3) plazmidle aktarılabilir potansiyeli olan en az bir direnç genine rastlanmıştır; *qnrC* ve *qnrD* genleri ise saptanmamıştır (Tablo III). *aac(6')-Ib* geni 30 *E.coli* ve 12 *Klebsiella* spp. suşunda pozitif bulunmuş ve PCR-RFLP sonucu 2 *E.coli* izolata haricindekilerin *cr* varyantı olduğu tespit edilmiştir (Tablo III).

PMQR genlerinden birinin bulunması, izolata karşı kinolonların MİK değerinin yükselmesine neden olurken, birden fazlasının birikimi fenotipik dirençli suş olarak saptanmasına yol açan etkenlerden biridir. Bu nedenle önemsenen, çalışmamızda araştırılan direnç genlerinin izolatlarda birlikte bulunma durumlarına ait veriler Tablo IV'de sunulmuştur. *E.coli* suşlarında sadece *qnrB* ve *aac(6')-Ib-cr* birlikteliği görülürken, *Klebsiella* suşlarında diğer genlerin de birlikte olabildikleri saptanmıştır (Tablo IV).

## TARTIŞMA

*E.coli* ve *Klebsiella* türleri sepsisin en sık saptanan etkenlerinden olup, immün sistemi baskılanmış hasta sayısının artışı bu fırsatçı patojenlerin enfeksiyonlara katkısını artırmaktadır<sup>1,2</sup>. Bu nedenle sepsis etkeni *E.coli* ve *Klebsiella* suşları, immün süpresif hastaların takip edildiği dahili bölüm servislerinden gönderilen kan kültürlerinden daha sık izole edilmektedir<sup>22,23</sup>. Çalışmamızın verileri de (%49.4) bu durumu desteklemektedir. Bu durum, doğal veya terapötik amaçlı immün süpresif hasta artışının (AIDS hastaları ve trans-

**Tablo II.** Tüm izolatlarda GSBL ile kinolon direnç durumu

Bakteri		Çalışılan suş sayısı (%)*	Kinolona dirençli suş sayısı (%)**
<i>E.coli</i>	GSBL (+)	52 (40.9)	41 (78.8)
	GSBL (-)	75 (59.1)	31 (41.3)
	Toplam	127 (65.8)	72 (56.7)
<i>Klebsiella</i> spp.	GSBL (+)	28 (42.4)	9 (32.1)
	GSBL (-)	38 (57.6)	4 (10.5)
	Toplam	66 (34.2)	13 (19.7)
Genel toplam		193 (100)	85 (44.0)

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; \* Sütun yüzdesidir; \*\* Satır yüzdesidir.

**Tablo III.** PMQR genlerinin izolatlara göre dağılımı

İzolat (n)	<i>qnrA</i> n (%)	<i>qnrB</i> n (%)	<i>qnrC</i> n (%)	<i>qnrD</i> n (%)	<i>qnrS</i> n (%)	<i>qepA</i> n (%)	<i>aac(6')-Ib-cr</i> n (%)	<i>oqxAB</i> n (%)
<i>E.coli</i> (72)	1 (1.4)	3 (4.2)	0	0	1 (1.4)	1 (1.4)	28 (38.9)	1 (1.4)
<i>Klebsiella</i> spp. (13)	2 (15.4)	8 (61.5)	0	0	1 (7.7)	0	12 (92.3)	11 (84.6)
Toplam (85)	3 (3.5)	11 (12.9)	0	0	2 (2.4)	1 (1.2)	42 (47.1)	12 (14.1)

**Tablo IV.** İzolatlardaki PMQR genlerinin birlikte bulunma durumları

	<i>E.coli</i> (n= 72) Sayı (%)	<i>Klebsiella</i> spp. (n=13) Sayı (%)	Toplam (n= 85) Sayı (%)
<i>qnrA+aac(6')-Ib-cr</i>	0	2 (15.4)	2 (2.4)
<i>qnrB+aac(6')-Ib-cr</i>	3 (4.2)	0	3 (3.5)
<i>qnrB+oqxAB</i>	0	1 (7.7)	1 (1.2)
<i>aac(6')-Ib+oqxAB</i>	0	2 (15.4)	2 (2.4)
<i>qnrB+aac(6')-Ib-cr +oqxAB</i>	0	7 (53.9)	7 (8.3)
<i>qnrS+aac(6')-Ib-cr +oqxAB</i>	0	1 (7.7)	1 (1.2)

plantasyon hastalarındaki artışın sonucu olarak), ülkemizde de *E.coli* ve *Klebsiella* spp. enfeksiyonlarında artış olarak karşımıza çıkacağını düşündürmektedir. Buna paralel olarak tedavi seçeneklerinin de korunmuş olması önemlidir. *E.coli* ve *Klebsiella* spp. enfeksiyonlarının, tedavi seçeneklerinden olan kinolonlara karşı direncinin belirlenmesi ve horizontal yayılımının takibi, kontrolleri açısından önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalarda, GSBL pozitif suşlarda fenotipik kinolon direncinin GSBL negatiflere göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir<sup>5,8,24</sup>. Çalışmamıza ait bulgular da (%62.5'e karşı %30.9), bölgemiz izolatlarının benzer nitelikte olduğunu göstermektedir (Tablo II).

Ülkemizde plazmid aracılı kinolon direnç genlerinden *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* ve *aac(b)-1b-cr* varlığı, ilk kez 2005 yılında Nazik ve arkadaşları<sup>25</sup> tarafından gösterilmiştir. Sonrasında yapılan çeşitli çalışmalarda, *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genlerinin varlığı hakkında bilgiler artmaya başlamış, çevresel örneklerde de bu genlerin varlıkları gösterilmiştir<sup>26-29</sup>. Çalışmamızda, fenotipik olarak kinolona dirençli izolatlarda, bugüne kadar plazmid aracılığı ile kodlandığı ve aktarılabildiği gösterilen genler araştırılmış, *qnrC* ve *qnrD* dışındakiler saptanmıştır (Tablo III). *qnr* gen pozitifliği %18.8 gibi yüksek prevalansta bulunmuştur. Öktem ve arkadaşları<sup>27</sup> bu oranı %5.4 olarak belirlemiştir. Verilerimiz, yapılan HİTİT-1 ve HİTİT-2 sürveyans çalışmalarında<sup>30-33</sup> belirlenen *qnr* prevalansından (sırasıyla, %6.4 ve %14.5) daha yüksek olup, bölgemizde *qnr* genlerinin kinolon direncine katkısının azımsanmayacak düzeyde olduğunu göstermektedir.

Aktepe ve arkadaşları<sup>21</sup>, kinolona dirençli 112 *E.coli* suşunun hiçbirinde *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* ve *qepA* geni saptamazken, *aac(6')-1b* gen varlığını %59.8 oranında bulmuşlar ve tamamının *aac(6')-1b-cr* varyantı olduğunu göstermişlerdir. Ülkemizdeki HİTİT-1 sürveyans çalışmasında *aac(6')-1b-cr* geninin varlığının %32.4; HİTİT-2 çalışmasında ise %69.5 oranında yüksek olduğu bulunmuştur<sup>30-33</sup>. Poirel ve arkadaşları<sup>34</sup> Türkiye'de farklı hastanelerde kandan izole edilen GSBL oluşturan *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-1b-cr* genlerinin sıklığını araştırmışlar ve *aac(6')-1b-cr* geninin GSBL oluşturan 50 izolatın 39'unda (%78) bulunduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da *aac(6')-1b-cr* geninin prevalansı diğer PMQR genlerinden daha sık olmak üzere %47.1 olarak bulunmuştur. Bu veri, *aac(6')-1b-cr*'nin aktarılabildiği kinolon direncine en sık katkı sağlayan gen olduğu fikrini desteklemektedir.

Yeni keşfedilen PMQR pompası QepA'nın ülkemizdeki varlığı hakkında daha az bilgi mevcuttur. HİTİT-1 süveyans çalışmasında *qepA* geni bulunmamasına karşın, HİTİT-2'de ülkemizde iki *E.coli* izolatında *qepA* varlığı ilk kez rapor edilmiştir<sup>31-33</sup>. Nazik ve arkadaşları<sup>35</sup>, GSBL pozitif 61 adet üriner *E.coli* izolatını incelemişler ve *qepA* gen prevalansını %3.3 olarak bildirmişlerdir. Limoncu ve arkadaşları<sup>36</sup> nalidiksik asit ve/veya siprofloksasine dirençli 106 *E.coli* izolatında *qepA* gen oranını %0.9 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızda benzer şekilde bir *E.coli* izolatında (%1.2) *qepA* genine rastlanmıştır.

Çoklu ilaç dışa-atım pompası olan OqxAB'nin, ilk kez 2009 yılında Güney Kore'de klinik *E.coli* izolatında plazmid aracılı kodlandığı gösterilmiştir<sup>37</sup>. Kim ve arkadaşları<sup>37</sup> 461 *Enterobacteriaceae* üyesinde *oqxAB* genlerini araştırmış ve bir (%0.4) *E.coli* izolatında plazmidik *oqxAB* genini saptamışlardır. Kromozomal *oqxAB* geni ise *E.cloacae* için %4.6 ve *K.pneumoniae* için %74.1 oranında tespit edilmiş; *oqxAB* genlerinin, *K.pneumoniae*'da daha çok kromozomal olduğu ifade edilmiştir<sup>37</sup>. İspanya'da GSBL pozitif *K.pneumoniae* izolatlarında yapılan hibridizasyon deneyleri, *oqxA*'nın %16 ve *oqxB*'nin %13 oranında kromozom üzerinde ve büyük plazmidler üzerinde aynı anda mevcut olduğunu göstermiştir<sup>38</sup>. Bu araştırmacılar, kromozomal ve/veya plazmidik *oqxA* ve *oqxB* prevalansının ise toplamda sırasıyla %76 ve %75 olduğunu belirtmişlerdir<sup>38</sup>. Çalışmamızda, kinolon direncine neden olduğu bilinen *oqxAB* gen prevalansı, ülkemizde klinik örneklerde ilk kez araştırılmış ve kinolona dirençli *E.coli* izolatlarının %1.4'ünde (1/72), *Klebsiella* spp. izolatlarının ise %84.6'sında (11/13) olmak üzere, toplam izolatların %14.1'inde (12/85) pozitif olarak bulunmuştur. Kim ve arkadaşlarının<sup>37</sup> bulguları göz önüne alındığında, *E.coli* izolatının muhtemelen plazmid aracılı, *Klebsiella* spp. izolatlarının ise muhtemelen kromozomal kökenli *oqxAB* geni taşıdığı düşünülmüştür. *E.coli* izolatındaki *oqxAB* geninin olası plazmidik konumunun doğrulanması, horizontal yayılımı açısından ülkemize ait önemli bir bulgu olacaktır.

PMQR proteinleri, tek başına nalidiksik asit direncine ve norfloksasin, siprofloksasin, levofloksasin gibi florokinolonların duyarlılığında azalmaya neden olmasına rağmen, kromozomal mutasyonların ve direnç genlerinin birlikteliği ile yüksek düzey kinolon direncine yol açabilmektedir<sup>5,6,8,10</sup>. Literatürde PMQR genlerinin birlikte olma prevalansları ile ilgili veri oldukça sınırlıdır. Nazik ve arkadaşları<sup>35</sup>, *aac(6')-1b-cr* pozitif *E.coli* izolatlarında *qnrA*, *qnrS* ve *qepA* birlikteliğini rapor etmiştir. Çalışmamızda da, *qnr* genlerinin birlikteliği saptanmazken; *E.coli* izolatlarında *qnrB* ve *aac(6')-1b'nin* birlikte olabileceği görülmüş; ayrıca *Klebsiella* izolatlarında, yanına *oqxAB*'nin dahil olduğu ikili ve üçlü gen pozitiflikleri belirlenmiştir (Tablo IV).

Sonuç olarak bu çalışmada, kinolona dirençli *E.coli* ve *Klebsiella* spp. kan izolatlarında, aktarılabılır genlerin dirence katkısı araştırılmış ve direnç genlerinin prevalansı, bu bakteriler için sırasıyla; *qnrA*, %1.4 ve %15.4; *qnrB*, %4.2 ve %61.5; *qnrS*, %1.4 ve %7.7; *qepA*, %1.4 (sadece *E.coli*); *aac(6')-1b-cr*, %38.9 ve %92.3; *oqxAB*, %1.4 ve %84.6 olarak belirlenmiştir. Kinolona dirençli *Klebsiella* spp. izolatlarında *E.coli*'ye göre hem direnç genlerinin oranları hem de direnç genlerinin birlikte olma olasılığı daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışma ile ülkemizde ilk defa klinik örneklerde prevalansları sorgulanan genlerden *qnrD* geni saptanamazken, *oqxAB* genlerinin sıklıklarına ait ilk veriler sunulmuştur. Bununla birlikte, saptanan *oqxAB* genlerinin PMQR olarak sınıflandırılabilmeleri için bakteri



kromozomu veya plazmid üzerindeki varlıkları konjugasyon veya hibridizasyon yöntemleri ile belirlenmelidir. Çalışma, genel bağlamda benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında, kinolon direncine katkı sağlayan aktarılabılır direnç genlerinden *aac(6')-Ib-cr*'nin duran görünümüne karşın *qnr* tiplerinin artış trendinde olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Muñoz P, Cruz AF, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E. Gram-negative bloodstream infections. Int J Antimicrob Agents 2008; 32 (Suppl 1): S10-4.
2. Huh K, Kim J, Cho SY, et al. Continuous increase of the antimicrobial resistance among gram-negative pathogens causing bacteremia: a nationwide surveillance study by the Korean Network for Study on Infectious Diseases (KONSID). Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 76(4): 477-82.
3. Hooper DC, Strahilevitz J. Quinolones, pp: 487-510. In: Mandell GL, Bennett, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010, 7<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
4. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry 2014; 53(10): 1565-74.
5. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother 2011; 17(2): 149-82.
6. Nazik H, Öngen B. Türkiye'de plazmit aracılı kinolon direnci. ANKEM Derg 2010; 24(1): 46-54.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Third Informational Supplement, M100-S23, 2013. CLSI, Wayne, PA.
8. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. Clin Microbiol Rev 2009; 22(4): 664-89.
9. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis 2005; 41(2): 120-6.
10. Briaies A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain. Int J Antimicrob Agents 2012; 39(5): 431-4.
11. Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Gísladóttir AL, Gottfredsson M. Molecular epidemiology of late recurrent candidaemia: a population-based study in Iceland. Clin Microbiol Infect 2012; 18(2): 195-201.
12. Şenses Z. Bakteriyolojik örneklerin toplanması, taşınması ve işleme alınması, s. 291-333. Başustaoglu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M (çev.ed.), Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology). 2009, 9. Baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara.
13. Nolte FS, Williams JM, Jerris RC, et al. Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240). J Clin Microbiol 1993; 31(3): 552-7.
14. Çoban AY, Nohut OK, Tanrıverdi Çaycı Y, et al. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae*: a multicenter study. Mikrobiyol Bul 2012; 46(3): 366-74.
15. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(8): 2872-4.
16. 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.
17. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(2): 603-8.
18. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(4): 1564-6.
19. 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.

20. Liu BT, Wang XM, Liao XP, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *oqxAB* and *aac(6')-Ib-cr* and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene *bla*CTX-M-24 co-located on the same plasmid in one *Escherichia coli* strain from China. J Antimicrob Chemother 2011; 66(7): 1638-58.
21. Aktepe OC, Aşık G, Cetinkol Y, Biçmen M, Gülay Z. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* strains. Mikrobiyol Bul 2012; 46(1): 9-16.
22. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US Hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 2004; 39(3): 309-17.
23. Lautenbach E, Fishman NO, Bilker WB, et al. Risk factors for fluoroquinolone resistance in nosocomial *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections. Arch Intern Med 2002; 162(21): 2469-77.
24. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003; 47(4): 273-95.
25. Nazik H, Poirel L, Nordmann P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(5): 2146-7.
26. Avsaroglu MD, Helmuth R, Junker E, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by *qnrS1* in *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin. J Antimicrob Chemother 2007; 60(5): 1146-50.
27. Öktem IMA, Biçmen M, Gülay Z. Kan kültürlerinden soyutlanan *Enterobacteriaceae* izolatlarında plazmit ile ilişkili kinolon direnci genlerinin saptanması. 8. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, 2-4 Nisan 2008, İstanbul. Program ve Özet Kitabı, s: 28, P57.
28. Ozgumus OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N. Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in Northern Turkey. J Microbiol 2009; 47(1): 19-27.
29. Onuk EE, Tanrıverdi Çaycı Y, Çoban AY, et al. Detection of the first *qnrS* gene positivity in aquatic *Aeromonas* spp. isolates in Turkey. Mikrobiyol Bul 2015; 49(1): 114-23.
30. Gulay Z, Bicmen M, Gur D. Prevalence and diversity of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum beta-lactamase positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: first report of *qepA* from Turkey. Clin Microbiol Infect 2010; 16 (Issue Supplement s2): S193, P763.
31. Gülay Z. *Enterobacteriaceae* üyelerinde direnç epidemiyolojisi. Antimikrobik Kemoterapi Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. Gülhane Mikrobiyoloji Günleri, 20-22 Nisan 2010, İstanbul. [http://www.tmc-online.org/userfiles/file/gulhane\\_gunleri\\_sunumlar/Zeynep\\_Gulay.pdf](http://www.tmc-online.org/userfiles/file/gulhane_gunleri_sunumlar/Zeynep_Gulay.pdf)
32. Oktem IM, Gulay Z, Bicmen M, Gur D; HITIT Project Study Group. *qnrA* prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. Jpn J Infect Dis 2008; 61(1): 13-7.
33. Gur D, Hascelik G, Aydın N, et al. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. J Chemother 2009; 21(4): 383-9.
34. 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. 18<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 19-22 April 2008, Barcelona. Abstract Book, p. 1527.
35. Nazik H, Bektöre B, Öngen B, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* urinary isolates from two teaching hospitals in Turkey: coexistence of TEM, SHV, CTX-M and VEB-1 type  $\beta$ -lactamases. Trop J Pharm Res 2011; 10(3): 325-33.
36. Hoşgör-Limoncu M, Eraç B, Yurtman AN, Aydemir S. Plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in ESBL positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains at a tertiary-care hospital in Turkey. J Chemother 2012; 24(3): 144-9.
37. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. OqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(8): 3582-4.
38. Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A, et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2013; 68(1): 68-73.