

Klinik *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Florokinolon Direnç Mekanizmalarının Araştırılması

Investigation of Fluoroquinolone Resistance Mechanisms in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates

Gülşah GÜLER, Bayrı ERAÇ

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
Ege University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Izmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 30.12.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.03.2016

ÖZ

Acinetobacter baumannii fırsatçı bir patojen olup, nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biridir. Birçok antibiyotiğe dirençli oluşu, neden olduğu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. Florokinolonlar hastane ve toplum kaynaklı birçok enfeksiyonun tedavisinde kullanılan antibiyotikler olup, direnç gelişiminde rol oynayan mekanizmaların belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada, hastane kaynaklı *A.baumannii* izolatlarının siprofloksasin (CIP) ve levofloksasin (LEV) minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi, klonal ilişkilerinin incelenmesi, florokinolonlara direnç gelişiminden sorumlu olan DNA giraz ve topoizomerez IV enzimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda farklı klinik örneklerden izole edilen CIP'e dirençli 79 ve duyarlı iki izolat olmak üzere toplam 81 *A.baumannii* kökeni alınmıştır. CIP ve LEV MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Kökenlerin klonal yakınlıkları ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polimeraz zincir reaksiyonu*) yöntemi ile araştırılmıştır. Her farklı klon ve alt tipi temsilen seçilen 16 kökende *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonlar dizi analizi ile belirlenmiştir. Seçilen kökenlerde dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu, pompa inhibitörleri varlığında gerçekleştirilen sıvı mikrodilüsyon ve florometrik akümülyasyon deneyleri ile araştırılmıştır. İncelenen *A.baumannii* kökenlerinde MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin CIP için sırasıyla 256 µg/ml ve ≥256 µg/ml; LEV için sırasıyla 32 µg/ml ve 128 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Genel olarak CIP MİK değerlerinin LEV MİK değerlerine göre yüksek olduğu saptanmıştır. İzolatların altı ana grup (I-VI) ve 10 farklı klon (A-J) altında toplandığı saptanmış (A klonunda 39, B'de 20, C'de 13, I ve J'de ikişer, D-H'de ise birer suş); ancak bunların büyük çoğunluğunun klonal olarak ilişkili oldukları gözlenmiştir. Seçilen temsilci kökenlerin *gyrA* geninde en sık rastlanan önemli mutasyonların Ser83Leu ve Asp87Glu, *parC* geninde ise Ser80Leu olduğu saptanmıştır. Temsilci kökenlerden yedisinde sadece mikrodilüsyon yöntemiyle, 11'inde sadece florometrik olarak aşırı pompa ekspresyonu gözlenirken, beş kökende her iki yöntemle de olumlu sonuç elde edilmiştir. Mikrodilüsyon

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Bayrı Eraç, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova 35100, İzmir, Türkiye. Tel (Phone): +90 232 311 4083, E-posta (E-mail): eracb@yahoo.com

yöntemiyle aşırı ekspresyonu saptamada CIP'in LEV'den daha iyi olduğu görülmüştür. İncelenen hastane kaynaklı ve klonal olarak ilişkili *A.baumannii* izolatlarında gözlenen yüksek florokinolon MİK değerlerine, hedef bölge mutasyonlarının yanı sıra, dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonunun yol açtığı, ayrıca Qnr gibi plazmid kaynaklı mekanizmaların da rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*; florokinolon direnci; dışa atım pompası; ERIC-PCR.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen which is one of the most important agents of nosocomial infections. Being resistant to many antibiotics, complicates the treatment of the infections caused. Fluoroquinolones are used in the treatment of nosocomial and community-acquired infections and it is important to determine the mechanisms of resistance to these antibiotics. The aims of this study were to investigate ciprofloxacin (CIP) and levofloxacin (LEV) minimum inhibitor concentrations (MIC), clonal relationships, mutations that occur in DNA gyrase and topoisomerase IV genes and overexpression of efflux pumps in nosocomial *A.baumannii* isolates. A total of 81 *A.baumannii* strains, 79 CIP-resistant and two CIP-susceptible, isolated from different clinical samples in Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology were included in the study. CIP and LEV MIC values were determined by broth microdilution method. Clonal relationship among the strains was investigated by ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction). Mutations that occur in *gyrA* and *parC* genes were detected by DNA sequence analysis in 16 strains representing each clone and subtype. Overexpression of the efflux pumps was evaluated by broth microdilution and fluorometric accumulation experiments were carried out in the presence of pump inhibitors, among the representative strains. MIC₅₀ and MIC₉₀ values for CIP were 256 µg/ml and ≥ 256 µg/ml, while the values were 32 µg/ml and 128 µg/ml for LEV, respectively. Overall, CIP MIC values were found to be higher than that of LEV among the *A.baumannii* strains studied. Isolates were grouped into six main groups and 10 different clusters (39 strains in cluster A, 20 in B, 13 in C, two of each in I and J, one of each in D-H clusters), but it was observed that the majority of them were clonally related. The most common and important mutations detected in the *gyrA* and *parC* genes of the representative isolates were, Ser83Leu, Asp87Glu and Ser80Leu, respectively. While the overexpression of efflux pumps was observed in seven of the representative strains by microdilution method, in 11 by fluorometric assay and the results were positive in five of the strains by both methods. CIP was found to be better than LEV for detecting the overexpression of pumps by the use of microdilution method. It was concluded that, the reason of high fluoroquinolone MIC values of the studied nosocomial and clonally related *A.baumannii* strains were related to target mutations and overexpression of efflux pumps besides the plasmid-mediated mechanisms, such as Qnr might also have played a role.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; fluoroquinolone resistance; efflux pump; ERIC-PCR.

GİRİŞ

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda, dirençli patojenler ile oluşan hastane enfeksiyonları artan sıklıkta karşımıza çıkmaktadır. Nozokomiyal enfeksiyonlarda rol oynayan önemli fırsatçı patojenlerden olan *Acinetobacter baumannii*, özellikle yoğun bakım ünitelerinde ciddi salgınlara yol açmaktadır^{1,2}. *A.baumannii* ayrıca, endokardit, menenjit, cilt ve yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, ventilatör ile ilişkili pnömoni ve alkol bağımlılarında toplum kökenli pnömoni gibi çeşitli enfeksiyonlardan da sorumludur^{1,3}. Enfeksiyonların tedavisi, bakterinin sahip olduğu doğal ve kazanılmış direnç mekanizmalarından dolayı güçtür. Direnç, beta-laktamaz enzimleri, aminogliko-

zid değiştirici enzimler, dışa atım pompa aktivitesi ve hedef bölge mutasyonu gibi mekanizmalar ile ortaya çıkmaktadır^{4,5}. *Acinetobacter*'lerde son yıllarda kinolonlara karşı direnç gelişimi de görülmekte ve bu durum hedef enzimlerde mutasyon, dışa atım pompası ile ilacın hücre dışına atılması ve Qnr proteinlerinin sentezinden kaynaklanmaktadır. Qnr proteinleri tarafından topoizomeraz enzimlerinin korunması, plazmid kaynaklı kinolon direnç mekanizmalarından biridir. Qnr tek başına düşük düzey kinolon direncine neden olurken, kromozomal mutasyonların varlığında kliniğe yansiyacak düzeyde yüksek kinolon direncine yol aabilmektedir^{6,7}. Etkin antibiyotiklere karşı gelişen direnç, bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kombine antibiyotik kullanımını da gündeme getirmiřtir⁸. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *A.baumannii* suşlarının kinolon direnç profilinin belirlenmesi, moleküler düzeyde tiplendirilmesi, florokinolon grubu antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumlu olan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Aralık 2011-Mart 2012 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde farklı klinik örneklerden izole edilen ve her hastadan bir izolat olacak Şekilde, toplam 81 *A.baumannii* suşu alındı. Kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suşları kullanıldı.

Siprofloksasin (CIP) ve Levofloksasin (LEV) için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

İzolatların CIP ve LEV'in MİK değeri, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI kriterlerine göre belirlendi⁹. Antibiyotikler 0.06-256 µg/ml konsantrasyonları arasında test edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu, MİK değeri olarak belirlendi.

İzolatların Klonal Yakınlıklarının Belirlenmesi

Bu amaçla, ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi kullanıldı¹⁰. İzolatlar arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için bant paternleri kullanılarak "Jaccard" katsayıları (S_j) hesaplandı¹¹. Bu katsayılar ile "MEGA version 4" programında "Unweighted Pair Group Match Average (UPGMA)" yöntemi kullanılarak dendogram oluřturuldu¹². Çalışmaya alınan tüm izolatları temsil edecek Şekilde seçilen 16 köken ve ayrıca seçilen duyarlı bir izolat ile aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

Dışa Atım Pompasının Aşırı Ekspresyonunun Belirlenmesi

Mikrodilüsyon yöntemi

Tüm izolatları temsilen seçilen kökenlerin florokinolon MİK değerleri hem pompa inhibitörü varlığında hem de yokluğunda değerlendirildi. Eklenen pompa inhibitörlerin son konsantrasyonları 100 µg/ml olacak Şekilde ayarlandı. Dışa atım pompa inhibitörleri [1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) (0.4 mM) veya carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) (0.5 mM)] varlığında antibiyotik MİK değerinde en

az 4 katlık azalma olması, dışa atım pompasının aşırı eksprese olduğu şeklinde değerlendirildi¹³.

Florometrik akümülyasyon deneyi

Florometrik akümülyasyon deneyleri Lopes ve arkadaşlarının¹⁴ uyguladığı yöntemle göre üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Elde edilen absorbands değerlerindeki 4 katlık azalma, dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu olarak değerlendirildi¹⁴.

GyrA ve ParC genlerindeki mutasyonların saptanması

Seçilen izolatlarda ilgili genlerinin "Kinolon Direncini Belirleyen Bölge (KDBB)"leri PCR ile çoğaltıldı. *gyrA* geni için *gyrA* F (5'-AAA TCT GCT CGT GTC GTT GG-3') ve *gyrA* R (5'-GCC ATA CCT ACA GCA ATA CC-3') primerleri; *parC* geni için *parC* F (5'-AAG CCC GTA CAG CGC CGT ATT-3') ve *parC* R (5'-AAA GTT ATC TTG CCA TTC GCT-3) primerleri kullanıldı¹³. *GyrA* ve *parC* genleri için Valentine ve arkadaşlarının¹³ kullandığı yöntem esas alınarak, bağlanma sıcaklığı olarak, sırasıyla, 55°C ve 58°C uygulandı.

DNA dizi analizi

PCR ürünlerinin çift yönlü olarak DNA dizi analizi yaptırıldı. Analiz sonuçları hem nükleotid hem de aminoasit dizisi olarak "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" ve "European Bioinformatics Institute (EBI)"nin web tabanlı uygulamaları kullanılarak her iki gen için *E.coli* K12 MG1655 referans dizisi ile karşılaştırıldı.

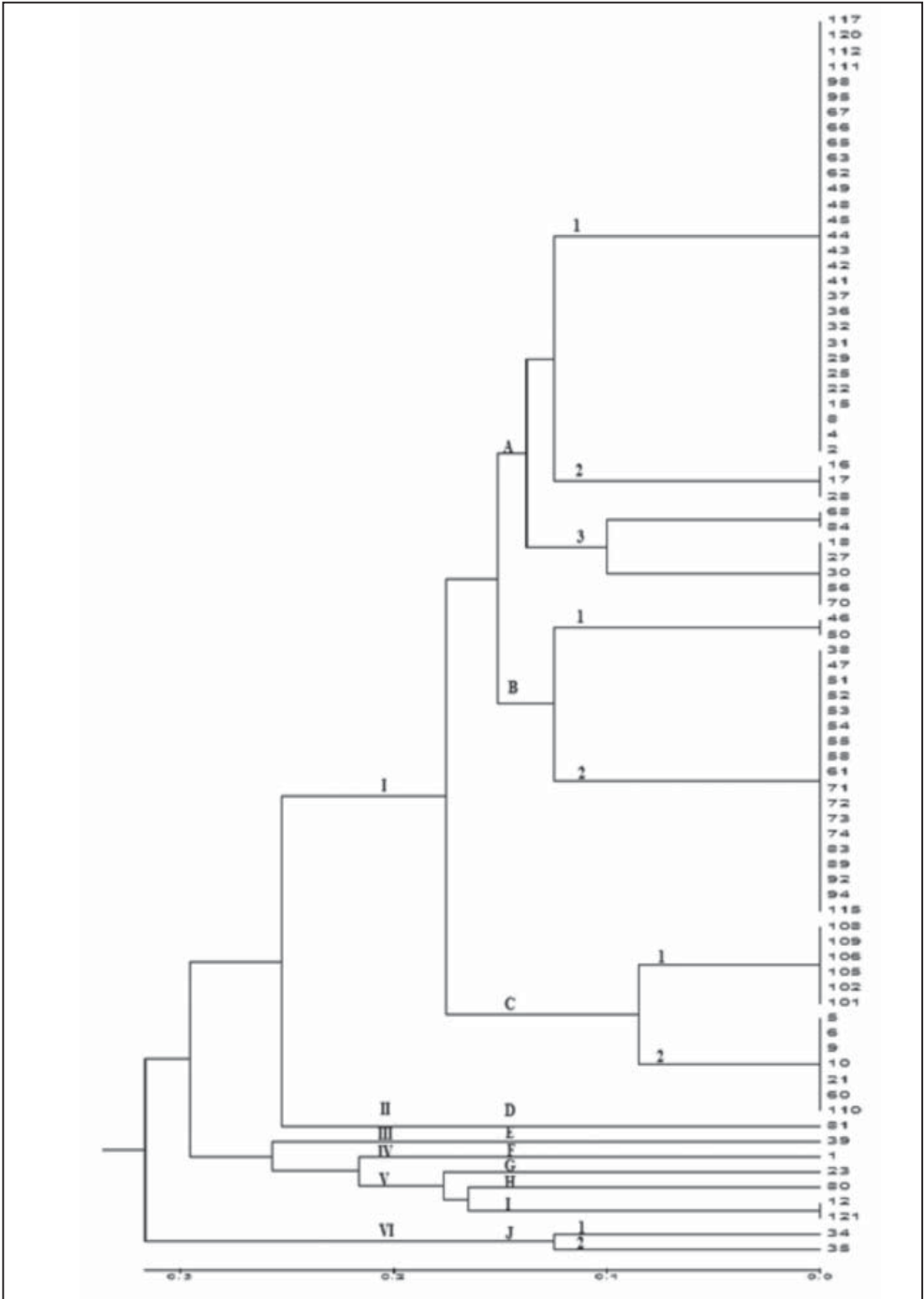
BULGULAR

Çalışmamızda, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle 81 *A.baumannii* izolatının 79'u CIP'e dirençli ve 2'si duyarlı bulunmuştur. LEV'e karşı ise 3 izolatın duyarlı, 10 izolatın orta duyarlı ve 68 izolatın dirençli olduğu belirlenmiştir. CIP MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla, 256 µg/ml ve ≥ 256 µg/ml; LEV MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla, 32 µg/ml ve 128 µg/ml olarak saptanmıştır.

ERIC-PCR sonuçlarına göre, kökenlerde çoğunlukla 3 ila 6 bant olduğu gözlenmiştir. Kökenlerin hepsinde 300 baz çift (bç)'lik bant saptanırken, 76 kökende 550 bç, 74 kökende 475 bç ve 52 kökende 400 bç'lik bantlar belirlenmiştir.

İzolatların 6 ana grup (I-VI) ve 10 farklı klon (A-J) altında toplandığı saptanmıştır. A klonu 39 üye ile en büyük klon olmuş ve 3 alt tipe (1-3) ayrıldığı gözlenmiştir. A1 alt tipinin en fazla üyeye sahip olduğu, ayrıca alt tiplerin hepsinin kendi içinde %100 bant profil benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. B klonu 20 üye ve 2 alt tipe; C klonu 13 üye ve 2 alt tipe ayrılmıştır. I ve J klonlarında ikişer üye bulunurken, 5 klonda (D,E,F,G,H) ise tek üye bulunmuştur (Şekil 1).

Her klon ve alt tipi temsil edecek şekilde seçilen 16 izolatla yapılan değerlendirmede, NMP ile 5, CCCP ile 7 izolatın MİK değerinde en az 4 katlık azalma görülmüştür. Duyarlı izolatta azalma saptanmamıştır (Tablo I). Seçilen izolatlarla yapılan florometrik akümülyasyon deneyinde dışa atım pompa inhibitörü NMP'nin EtBr absorbands değerleri üzerine etkisi incelenmiş ve 11 izolatın absorbands değerinde 4 kat ve üzeri azalma görülmüştür.



Şekil 1. *A.baumannii* izolatlarına ait dendrogram (Ana gruplar: I-VI, Klonlar: A-J).

Tablo I. Seçilen *A.baumannii* izolatlarının pompa inhibitörleri NMP ve CCCP'nin varlığı ve yokluğunda CIP ve LEV'in MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

Suş no.	NMP				CCCP			
	Yok		Var		Yok		Var	
	CIP	LEV	CIP	LEV	CIP	LEV	CIP	LEV
1	256	256	128	256	256	256	64	256
6	16	32	32	16	16	16	16	32
12	32	64	16	32	32	32	32	64
16	32	128	16	64	32	64	32	64
23	32	64	16	64	32	64	4	32
30	128	256	32	32	128	128	64	64
34	128	128	16	128	128	128	64	256
35	128	256	128	256	128	256	128	256
39	256	> 256	256	> 256	256	> 256	64	> 256
45	128	64	64	64	128	64	128	32
50	16	64	16	128	16	128	16	64
58	32	128	32	64	32	64	8	128
68	128	128	16	32	128	64	8	32
80	16	32	32	32	16	32	16	32
81	32	128	32	64	32	64	32	64
105	64	64	32	32	64	32	32	64

NMP: Naphthylmethyl-piperazine; CCCP: Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; CIP: Siprofloksasin; LEV: Levofloksasin.

GyrA geninde Ser83Leu mutasyonu 14 izolatta gözlenmiştir. Duyarlı izolatta bu mutasyona rastlanmamış, ancak Asp87Glu mutasyonu belirlenmiştir. KDBB'ye dahil olan Asp87Glu, Pro95Asp, Met101Leu mutasyonları tüm izolatlarda saptanmıştır. *ParC* geninde Ser80Leu mutasyonu 13 izolatta görülmüş; duyarlı izolatta bu mutasyona rastlanmamıştır. Yine KDBB'de yer alan Val100Ile ve Asp101Glu mutasyonları tüm izolatlarda saptanmıştır. Seçilen *A.baumannii* izolatlarının kinolon duyarlılıkları, dışa atım pompa aktiviteleri ve saptanan mutasyonlar Tablo II'de görülmektedir.

TARTIŞMA

A.baumannii izolatlarında görülen florokinolon direnci, tedavide sorunlara yol açmaktadır. Çalışmamızda incelenen izolatların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin CIP için sırasıyla 256 $\mu\text{g/ml}$ ve $\geq 256 \mu\text{g/ml}$; LEV için sırasıyla 32 $\mu\text{g/ml}$ ve 128 $\mu\text{g/ml}$ olduğu saptanmıştır. Bu dağılım, incelenen izolatlarda genel olarak CIP MİK değerlerinin LEV MİK değerlerine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo I).

Hastane enfeksiyonu etkeni olan bakteriler arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması amacıyla, ayırım gücü yüksek ve güvenilir sonuç veren genotipik yöntemler tercih edilmektedir. Çalışmamızda *A.baumannii* izolatlarının klonal ilişkisinin belirlenmesinde, hızlı sonuç veren, kolay uygulanan ve düşük maliyetli ERIC-PCR yöntemi kullanılmış olup, bu yöntemin, altın standart kabul edilen değişken alanlı jel elektroforezi (Pulsed-field gel

Tablo II. Seçilen *A.baumannii* izolatlarının kinolon duyarlılıkları, dışa atım pompa aktivitesi ve saptanan mutasyonlar

Suş no.	Duyarlılık (CIP/LEV)	Dışa atım pompa aktivitesi**	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
1	R/R	-	D87E, P95D, M101L	V100I, D101E
6	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
12	R/R	+	D87E, P95D, M101L	V100I, D101E
16	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
21*	S/S	-	D87E, P95D, M101L	V100I, D101E
23	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	V100I, D101E
30	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
34	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
35	R/R	-	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
39	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
45	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
50	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
58	R/R	-	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
68	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
80	R/R	-	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
81	R/R	-	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E
105	R/R	+	S83L, D87E, P95D, M101L	S80L, V100I, D101E

* Duyarlı izolat; ** Hem mikrodilüsyon hem de spektrofotometrik akümülyasyon yöntemi ile pozitif sonuç veren izolatlar alınmıştır. CIP: Siprofloksasin; LEV: Levofloksasin; R: Dirençli; S: Duyarlı; S: Serin; L: Lösin; D: Aspartat; E: Glutamat; P: Prolin; M: Metionin; V: Valin; I: İzölösin.

electrophoresis; PFGE) ile çok yakın sonuçlar verdiği belirtilmektedir^{15,16}. Çalışmamızda, izolatların altı ana grup ve 10 farklı klona ayrıldığı belirlenmiş ve çoğunun aynı ana gruba (A) dahil olması, klonal yakınlık içinde olduklarını göstermiştir (Şekil 1). Daha önce yapılan çalışmalarda, Eriş ve arkadaşları¹⁰ 65 izolatta yedi klon, Eser ve arkadaşları¹⁷ ise 51 izolatta dokuz klon saptadıklarını ve bakterilerin klonal yayılım gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

A.baumannii'de önemli direnç mekanizmalarından biri, RND (Resistance Nodulation Division) ailesine ait dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonudur. Çalışmamızda, sadece MİK değerinde anlamlı azalmaya bağlı olarak dışa atım pompa aktivitesi bulunan yedi izolat, sadece florometrik olarak aktivitesi belirlenen 11 izolat ve her iki yöntem ile beş izolatta aşırı ekspresyon saptanmıştır. Bu beş izolat dikkate alındığında, aşırı ekspresyonun saptanmasında en iyi sonuç veren antibiyotiğin CIP olduğu belirlenmiştir. Bazı izolatlarda NMP, bazı izolatlarda CCCP ve bazı izolatlarda da her iki inhibitör ile azalma görülmesi, bu iki inhibitörün farklı mekanizmalar ya da RND dışında farklı dışa atım pompaları üzerine de etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca, bu inhibitörlerin değişik tip pompalar üzerine farklı oranda etkinlik gösterdiği ileri sürülmüştür^{13,18}. Çalışmamızdaki veriler ışığında, NMP ve CCCP'nin dışa atım pompa aşırı ekspresyonunu göstermek

açısından aralarında bir fark olmadığı görülmüştür.

Florokinolonlara karşı gelişen direnç mekanizmalarından biri de, kromozomal genlerde görülen mutasyonlardır. Öncelikle *gyrA* geninde görülen mutasyonlar, direnç gelişimine neden olurken, tek başına *parC* geninde olan mutasyonlar direnç gelişiminde rol oynamaz. İncelediğimiz 16 izolatın tümünde *gyrA* geninde, 13 izolatta ise *parC* geninde direnç gelişimine neden olabilecek önemli mutasyonlar saptanmıştır (Tablo II). *GyrA* geninde Ser83Leu mutasyonu görülen 14 kökenin 13'ünde aynı zamanda *parC* bölgesinde de Ser80Leu mutasyonu saptanmıştır. Benzer şekilde Valentine ve arkadaşları¹³ 20 izolatın tamamında *gyrA*, 19 izolatta hem *gyrA* hem de *parC* mutasyonu bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki izolatlarda en sık rastlanan mutasyonlardan; *gyrA*'da Ser83Leu, Asp87Glu ile *parC*'de Ser80Leu mutasyonu görülmüştür. Benzer çalışmalarda, *gyrA* geninde Asp87Val/Gly şeklinde ortaya çıkan mutasyon, tüm izolatlarımızda Asp87Glu olarak bulunmuştur. Bu mutasyonun duyarlı izolatımızda da bulunması, florokinolon direnç gelişiminde tek başına yeterli olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca, aynı mutasyonu gösteren izolatlarda farklı MİK değerlerinin saptanmış olması ve dirençli olan izolatlardan ikisinde (no: 1, 12), literatürde belirtilen *gyrA* Ser83Leu ve *parC* Ser80Leu mutasyonlarının görülmemesi, bu izolatlarda kinolon direncinde Qnr gibi farklı mekanizmaların görev aldığı göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, CIP'e dirençli 79, duyarlı iki izolat olmak üzere toplam 81 *A.baumannii* izolatı incelenmiş, genel olarak CIP MİK değerlerinin LEV MİK değerlerine göre yüksek olduğu saptanmıştır. Kökenlerin 10 farklı klonu ayrıldığı belirlense de, büyük çoğunluğunun klonal olarak ilişkili oldukları gösterilmiştir. Her klon ve alt tipi temsilen seçilen 16 izolatın tümünün *gyrA* geninde, 13 izolatın ise *parC* geninde önemli mutasyonlar saptanmıştır. Temsilci izolatlarda mikrodilüsyon yöntemiyle yedi, florometrik olarak 11 ve her iki yöntemle beş suşta aşırı pompa ekspresyonu saptanmıştır. Mikrodilüsyon yöntemi ile aşırı ekspresyonu saptamada en iyi sonuç veren antibiyotiğin CIP olduğu belirlenmiştir. İncelenen *A.baumannii* izolatlarında gözlenen yüksek florokinolon MİK değerlerine, hedef bölge mutasyonlarının yanı sıra, dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonunun yol açtığı, ayrıca Qnr gibi plazmid kaynaklı mekanizmaların da rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

İzolatların temin edilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Şöhret Aydemir'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Aşık G. Current approaches to explain the virulence of *Acinetobacter baumannii*. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 371-80.
2. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9(2): 148-65.
3. Copur Cicek A, Karagoz A, Koksal E, et al. A single clone *Acinetobacter baumannii* outbreak in a state hospital in Turkey. Jpn J Infect Dis 2013; 66(3): 245-8.

4. Cortez-Cordova J, Kumar A. Activity of the efflux pump inhibitör phenylalanine-arginine β -naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 2011; 37(5): 420-4.
5. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. J Antimicrob Chemother 2006; 57(5): 970-4.
6. Aktepe OC, Aşık G, Çetinkol Y, Biçmen M, Gülay Z. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* strains. Mikrobiyol Bul 2012; 46(1): 9-16.
7. Çoban AY, Nohut OK, Tanrıverdi Çaycı Y, et al. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae*: a multicenter study. Mikrobiyol Bul 2016; 46(3): 366-74.
8. Liu Y, Kuo S, Lee Y, et al. Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. J Microbiol Immunol Infect 2012; 45(2): 108-12.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. CLSI Document M100-S20, 2010. CLSI, Wayne PA.
10. Erač B, Yılmaz FF, Hoşgör Limoncu M, Öztürk I, Aydemir Ş. Investigation of the virulence factors of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Mikrobiyol Bul 2014; 48(1): 70-81.
11. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000; 13(2): 332-70.
12. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24(8): 1596-9.
13. Valentine SC, Contreras D, Tan S, Real LJ, Chu S, Xu HH. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. J Clin Microbiol 2008; 46(8): 2499-507.
14. Lopes BS, Amyes SGB. Insertion sequence disruption of *adeR* and ciprofloxacin resistance caused by efflux pumps and *gyrA* and *parC* mutations in *Acinetobacter baumannii*. Int J of Antimicrob Ag 2013; 41(2): 117-21.
15. Ece G, Erac B, Cetin HY, Ece C, Baysak A. antimicrobial susceptibility and clonal relation between *Acinetobacter baumannii* strains at a tertiary care center in Turkey. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(2): e15612.
16. Wilson LA, Sharp PM. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. Mol Biol Evol 2006; 23(6): 1156-68.
17. Köseoğlu Eser Ö, Ergin A, Tunçkanat F, Haşçelik G. In vitro activity of tigecycline as a therapeutic option against multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. New Microbiologica 2008; 31(4): 535-42.
18. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(3): 219-26.