

T.C. ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ KESİN RAPORU

Proje Başlığı:

Efluks Pompa İnhibitörünün, Çok İlaç Dirençli *Escherichia coli* İzolatlarında Kinolon , Makrolid ve Nalidiksik Asit MIC Değerlerine Etkisi

Proje Yürütücüsünün İsmi

Halil Kurt

Proje Numarası

2005-08-09-003-HPD

Başlama Tarihi

1/09/2005

Bitiş Tarihi

1/03/2006

Rapor Tarihi

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Ankara - " 2007 "

I.Projenin Türkçe Adı:

Efluks Pompa İnhibitörünün, Çok İlaç Dirençli *Escherichia coli* İzolatlarında Kinolon , Makrolid ve Nalidiksik Asit MİK Değerlerine Etkisi

Projenin İngilizce Adı:

The Effect of Efflux Pump Inhibitor on MIC values of Nalidixic Acid, Flouroquinolones and Macrolide of Multidrug Resistant *Escherichia coli*

II.Amaç ve Kapsam:

Çok ilaç dirençli *E. coli* izolatlarında nalidiksik asit, kinolon ve makrolid MİK değerleri üzerine MC-207,110' un (PAβN) değişen konsantrasyonlarda etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda çalışma kapsamında, izole edilen çok ilaç dirençli *E. coli* suşlarında efluks pompa inhibitörünün etkisine bakılması hedeflenmiştir.

III:Materyal ve Yöntem:

Çalışma süresi bakterilerin izole edilmesinden sonra 6 aylık bir periyodu kapsamaktadır. AÜTF Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları ABD, Klinik Bakterioloji laboratuvarına gelen klinik örneklerden konvansiyonel, gerekirse enteric/nonfermenter ID kit gibi yöntemlerle tespit edilen *E. coli* izolatlarına disk difüzyon yöntemi uygulanarak antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Ocak 2004 – Mayıs 2004 tarihleri arasında farklı klinik örneklerden izole edilen ve çok ilaç direnç paterni gösteren (yapısal olarak farklı 3 antibiyotiğe direnç) *Escherichia coli* olarak raporlanan 100 suş çalışmaya dahil edildi.

Efluks pompası yönünden incelenmek üzere organik solvent tolerans testi yapıldı. Toleran suşlar üzerinde araştırılacak olan antibiyotikler (nalidiksik asit, siprofloksasin, levofloksasin, eritromisin,) için MIC değerleri agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi. Sonraki aşamada 20µ/ml'dan başlayıp, değişen konsantrasyonlarda MC-207,110 (PAβN) varlığında, aynı antibiyotiklerin MIC değerleri broth mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı.

MIC değerlerinde 2 veya daha fazla kat azalmalar çalışmanın primer sonlanım noktası olarak kabul edildi..

MIC değerleri mikrodilüsyonla belirlenirken ATCC 25922 kontrol suşu olarak kullanılmıştır. Çalışmada izole edilen suşlarda organik solvent toleransı gösteren suşların AcrAB –TolC pompasını overeksprese etmesinden yola çıkarak bu suşların çalışılacak antibiyotikler ile olan MIC değerlerinin pompa inhibitör varlığında 2 veya daha fazla kat azalması çalışmanın sonucunun başarı ölçütü olarak değerlendirilmiştir..

IV:Analiz ve Bulgular:

Araştırmaya dahil edilen 100 suşun, 56'sı idrar, 18'i abse-yara, 12'si kan, 8'i trakeal aspirat ve 6'sı gayta kültüründen elde edildi.

Çalışmaya başlamadan önce bütün izolatın çok ilaç direnç fenotipi, disk difüzyon yöntemi ile tekrar değerlendirildi. 100 suşun 48'i seftriakson, 86'sı gentamisin ve hepsi ampicilin, siprofloksasin, levofloksasin, nalidiksik asit ve trimetoprim- sulfametaksazole dirençliydi. Yani çalışılan tüm izolatlar çok ilaç direnç fenotipi gösteriyordu.

İkinci aşamada tüm suşların agar dilüsyonla nalidiksik asit, siprofloksasin, levofloksasin ve eritromisin MİK değerleri çalışıldı. Siprofloksasin için çalışılan tüm suşların MİK değerleri 16 µg/ml'nin üzerinde ölçüldü. Nalidiksik asit için 2 suşun MİK değeri 32µg/ml, 13 suşun 64 µg/ml, diğerlerinin ise 128 µg/ml ve üzeriydi. Levofloksasin için ise 81 suşun MİK değeri 32 µg/ml ve üzerinde idi. Kalan 17 suşun MİKdeğeri 16 µg/ml ve 2 izolatın 8 µg/ml'di. Eritromisin için 65 suşun MİK değeri 204.8 µg/ml ve üzeri iken, 25 suşda 102.4µg/ml, 7'de 51.2 µg/ml ve 3'de 25.6 µg/ml olarak bulunmuştur.

Organik solvent tolerans (OST) testinde, farklı heksen- sikloheksen oranlarındaki toleransa bakılmış olsa da, basitleştirmek için 1:1 oranındaki karışımda 5×10^3 koloni üremesi organik solvent toleransı olarak tanımlandı. Daha önce de bahsedildiği gibi tolerans normalin üstünde efluks yapan *AcrAB-TolC* efluks pompa göstergesi olarak kabul edildi .

Organik solvent toleransı pozitif bulunan ve bulunmayan suşların başlangıç konsantrasyonları 4 kat artmış şekilde hesaplanarak broth dilüsyonla MİK değerleri, inhibitör madde eklenmiş ve eklenmemiş şekilde tekrar çalışılmıştır. Broth dilüsyonla MİK değerleri nalidiksik asitte, 2 suşda 512 µg/ml ve üzeri, 39 suşda 256 µg/ml, 44 suşda 128 µg/ml bulunurken, kalan 13 suşun MİK değeri 64 µg/ml, 2 suşun ise 32µg/ml olarak ölçülmüştür. Siprofloksasin için 87 suşun MİK değeri 128 µg/ml ve üzeri ölçülmüştür. Kalan 11 suşun MİK değeri 64 µg/ml ve diğer 2'sinininki ise 32 µg/ml olarak bulunmuştur. Levofloksasin için daha önce agar dilüsyonla 32 µg/ml ve üzerinde MİK değeri ölçülen 81 suşun, 4'de broth dilüsyon yöntemi ile 128 µg/ml ve üzeri, 49'da 64 µg/ml, 28'de 32 µg/ml değerleri bulunmuştur. Kalan suşların broth dilüsyonla ölçülen değerleri ise, agar dilüsyon yöntemi ile tespit edilenler gibiydi. Eritromisin için 11 suşda MİK değeri 819.2µg/ml ve üzeri iken, 26 suşda 409.6 µg/ml, 28 suşda 204.8 µg/ml ve 25 suşda 102.4µg/ml olarak ölçülmüştür. Kalan 10 suşdan 7'de MİK değeri 51.2 µg/ml ve 3'de 25.6 µg/ml olarak bulunmuştur.

Çalışma kapsamındaki 100 suşdan 55'inde organik solvent tolerans testi pozitif bulunurken, kalan 45 suşda tolerans saptanmamıştır. Bunların yüzde değişimleri üzerinden, araştırmada kullanılan antibiyotiklerin MİK değerleri üzerine, inhibitörün etkisi Mann-Whitney U testi ile çalışılmıştır. Hesaplamalar sonucunda p değeri 0.001'den küçük bulunan sonuçlar anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Organik solventlere karşı toleran suşların, nalidiksik asit MİK değerleri inhibitör eklendiğinde p değeri 0.232 olarak bulunmuştur. Siprofloksasin için ise 0.351 hesaplandığından söz konusu iki antibiyotik için inhibitör olarak eklenen maddenin MİK değerleri üzerine etkisi gözlenmemiştir.

Yine organik solventlere tolerans gösteren suşlar, göstermeyenlerle karşılaştırılıp, levofloksasin ve eritromisine inhibitör eklendiğinde MİK değerleri hesaplanmış, aradaki ilişkinin anlamlı olup olmadığına bakılmıştır. Mann-Whitney U testi ile levofloksasin ve eritromisinin her ikisine inhibitör eklenmesiyle hesaplanan MİK değerleri için p değeri 0.000 bulunmuş olup, söz konusu iki antibiyotik için inhibitör etkisinin anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

V: Sonuç ve Örnekler:

Çok ilaç direnci görülen 100 *Escherichia coli* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. İncelenen 100 suşun agar dilüsyon yöntemi ile nalidiksik asit, siprofloksasin, levofloksasin ve eritromisin MİK değerleri tespit edildikten sonra tüm suşların organik solvent toleransına bakılmıştır.

100 suşdan 55'nin organik solventlere karşı tolerans gösterdiği bulunmuştur. Yani çalışmaya dahil edilen suşların %55'inde efluks pompasının aşırı aktivasyonu gözlenmiştir. Toleran ve toleran olmayan suşlar inhibitör madde olarak PAβN eklendiğinde oluşan MİK değerleri broth dilüsyon yöntemi ile tekrar çalışılmıştır.

İnhibitör eklendiğinde siprofloksasin ve nalidiksik asit için MİK değerlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmazken, eritromisin ve levofloksasin için tam tersi gözlenmiştir.

Sonuç olarak, PAβN eklendiğinde eritromisin ve levofloksasinin, çok ilaç direnç fenotipi gösteren klinik izolatlarda duyarlılıklarının arttığı gözlenmiştir.

Çalışma sonucunda yüksek düzey levofloksasin direnci ile AcrAB efluks pompasının artmış ekspresyonu arasındaki ilişki, yüksek düzey direnç için efluks pompa katkısının gerektiği yönde olmuştur

PAβN-duyarlı efluks mekanizmasının *Escherichia coli*'de makrolid direncine de katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Ayrıca levofloksasin ve eritromisin için, çalışmada kullanılan inhibitörün, farklı iki veya daha fazla efluks pompası üzerinde etkili olabileceği kanısına varılmıştır. Bu nedenle söz konusu iki ilaç için çalışmanın sonucu anlamlı bulunmuş olabilir düşüncesindeyiz.

Ancak siprofloksasin ve nalidiksik asit için aynı sonuçların elde edilemeyişinin nedenlerinden biri suşlarda gözlenen yüksek düzey direncin (yani ≥ 32 µg/ml), hedef genlerde iki veya daha fazla mutasyon gibi ek başka mekanizmaları gerektirmesidir. Ya da substratı PAβN olmayan başka efluks pompalarının bu dirence sinerjik veya aditif katkılarının söz konusu olmasıdır. Çünkü, farklı yapısal özellikteki efluks pompaları aynı hücrede birleştiğinde, her bir pompanın tek başına gösterdiği etkiden daha yüksek antimikrobiyal direnç gösterir. Ayrıca birkaç yayında çok ilaç dirençli klinik izolatlarda, efluks mekanizmasına, dış membran permeabilitesinde değişiklik ya da membrandaki major porin kaybının da eşlik ettiğine dair bildirimler yapılmıştır. Bizim çalışmamızda da siprofloksasin ve nalidiksik asitte MİK değerlerinde anlamlı düşüşler kaydedemeyişimizin sebebi bunlardan biri veya hepsi olabilir .

Ayrıca, PAβN'nin farklı konsantrasyonları, organik solvent toleransı gösteren suşlarda tekrar çalışılmış ve 20 µg/ml ile elde edilen sonuçlardan farklı değerler elde edilmemiştir. Bu nedenle phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide'in etkisinin çalışılan konsantrasyonlar için homojen olduğu ve doza bağlı etki göstermediği söylenebilir .

Sonuç olarak, dünyadan ve ülkemizden çok ilaç dirençli gram negatif bakterilerde hedef ya da enzimatik modifikasyonun etkileri çok geniş bir alanda raporlanırken, çoklu ilaç efluks pompalarının bu çok ilaç direncine katkısı nadiren bildirilmiştir. Bu ve benzeri çalışmalarla efluks pompalarının her biri için özgül inhibitörlerin belirlenmesi ile, beta laktam / beta laktamaz inhibitör kombinasyonları gibi bu ilaçların da klinikte kullanımı için önemli

bir adım olacak, böylelikle dirençli olan antibiyotiklerin duyarlı hale gelebilmesi mümkün olabilecektir.

VI: Kaynaklar:

1. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press: 2005: 654-659.
2. Gür D. Hastane enfeksiyonunun etkeni çoklu dirençli gram-negatif mikroorganizmalar. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi* 2003; 7(3): 111-117.
3. Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44:9, 2233-2241.
4. Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram positive bacteria and mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44:10, 2595-2599.
5. Webber MA, Piddock LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51:9-11.
6. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51:1109-1117.
7. Çoban AY, Birinci A, Ekinçi B, Durupınar B. Yüksek düzey florokinolon dirençli *Escherichia coli* klinik izolatlarında efluks pompa inhibitörlerinin siprofloksasin MİK değerleri üzerine etkilerinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2004; 38: 21-25.
8. Saenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixido M, Torres C, Vila J. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide on the MIC values of the quinolone, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 53: 544-545.
9. Chollet R, Chevalier J, Bryskier A, Pages JM. The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 3621-3624.
10. Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. Novel macrolide specific ABC-Type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2001; 183(19): 5639-5644.
11. Töreci K. *Escherichia* türleri. Topçu-Willke A, Söyletir G, Doğanay M, eds. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi'nde*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 1564-1575.
12. Donnenberg MS. Enterobacteriaceae. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone. 2005:2567-2578.
13. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Review Microbiology* 2004; 2: 123-140.
14. Kaper JB. Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 2005; 295: 355-356.
15. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(1): 142-201.

16. Isenberg DH, D'Amato RF. Enterobacteriaceae. Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. Eds. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia 2004: 1662-1672.
17. Bilgehan H. Escherichia. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir: Barış yayınları Fakülteler Kitabevi, 2000: 3-17
18. Willke A. Kinolonlar Topçu-Willke A, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi'nde. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 234-243.
19. Hogan D, Kolter R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? Current Opinion in Microbiology 2002; 5: 472-477.
20. Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. Journal of Applied Microbiology 2002; 92(Suppl 1): 65S-71S.
21. Blackmore CG, McNaughton PA, Van Veen HW. Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanism. Molecular Membrane Biology 2001; 18: 97-103.
22. Gür D. Gram negatif bakterilerde antibakteriyel direnç mekanizmaları Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. Eds. Gram Negatif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2004:69-83.
23. Gür D. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S eds. Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi;2003:31-41.
24. Hooper DC. Quinolones Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone. 2005:451-473.
25. Sivapalasingam S, Steigbigel NH. Macrolides, Clindamycin and Ketolides Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone. 2005:396-411.
26. Çokça F. Makrolidler azalidler, Streptograminler Topçu-Willke A, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi'nde. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:227-234.
27. Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003; 51 (Suppl S1): 29-35.
28. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003; 51: 1109-1117.
29. Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005 update. Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2005; 11: 256-280.
30. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of resistance elements and their clinical implications. Clinical Infectious Diseases 2002; 34: 482-492.
31. Kobayashi N, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi. Membrane topology of ABC type macrolide antibiotic exporter MacB in *Escherichia coli*. A.FEBS Letters. 2003; 546(2-3): 241-246.
32. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in gram negative bacteria. Clinical Microbiology and Infection 2004; 10(1): 12-26.
33. Lynch SA Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention? An industry view . Biochemical Pharmacology 2005 Article in press.

34. Pages JM, Muriel M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in gram-negative bacteria. *Trends in Molecular Medicine* 2005; 11(8): 382-389.
35. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens P. Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology* 2000; 60: 457-470.
36. Stratton C. Emphasis on efflux. 2002 .42th. ICAAC conference coverage.
37. Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pump inhibitors *Biochimie* 2005; 87: 1137-1147.
38. Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44: 2233-2241.
39. Chan YY, Chua KL. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. *Journal of Bacteriology* 2005; 187: 4707-4719.
40. Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N. Enhancement of the MexAB-OprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT of the mexEF-OprN efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 1320-1328.
41. Aendekerk S, Diggle SP, Song Z, Hoiby N, Cornelis P, Williams P, Camara M. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology* 2005; 151: 1113-1125 (Abstract).
42. Van Dyk TK, Templeton LJ, Cantera KA, Sharpe PL, Seriaslani FS. Characterization of the *Escherichia coli* AcrAB: Efflux pump: a metabolic relief valve? *Journal of Bacteriology* 2004; 186: 7196-7204.
43. Hirakata Y, Srikumar R, poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, Kamihira S, Hancock REW, Speert DP. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196: 109-118.
44. Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H. Active efflux of bile salts in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1997; 179: 2512-2518.
45. Van Bambeke F, Glupezynski Y, Plesiat P, Pechere JC, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 1055-1065.
46. Van Bambeke F, Michot JM, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics and toxicodynamics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 1067-1077.
47. Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 2001; 4: 500-508 .
48. Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 51: 9-11
49. Poole K. Efflux mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56: 20-51.

50. Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44(12): 3441-3443.
51. Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Applied Microbiology* 2002; 92 (Supl): 55S-64S.
52. Gilbert P, McBain AJ. Potential impact of increased use of biocide in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 2003;16: 189-208.
53. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Overexpression of *marA*, *soxS* or *AcrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letter* 1998;166: 305-309.
54. Moken MC, McMurry LM, Levy SB. Selection of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the *mar* and *AcrAB* loci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41: 2770-2772.
55. Oethinger M, Kern WV, Jellen-Ritter AS, McMurry LM, Levy SB. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the *AcrAB* efflux pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:10-13).
56. Patel Mv, De Souza NJ, Gupte SV, Jafri MA, Bhagwat SS, Chugh Y, Kharakiwala HF, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antistaphylococcal activity of WCK 771, a tricyclic fluoroquinolone, in animal infection models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 4754-4761.
57. Rikiza Aono, Takacki Negishi, Harushi Nakajima. Cloning of organic solvent tolerance gene *OstA* that determines n-hexane tolerance level in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; :4624-4626
58. Wang H, Dzink-Fox JL, Chen M, Levy SB. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: Role of *acrR* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45(5): 1515-1521.
59. Kern WV, Oethinger M, Jellen-Ritter AS, Levy SB. Non target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44(4): 814-820.
60. Shimizu K, Hayashi S, Koko T, Suzuki M, Tsukogoshi N, Doukyu N, Koboyashi T, Honda H. Discovery of *glpC*, an organic solvent tolerance –related gene in *Escherichia coli*, using gene expression profiles from DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(2): 1093-1096.
61. Oethinger M, Podglajen I, Kern WV, Levy SB. Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42(8): 2089-2094.
62. Webber MA, Piddock LV. Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB* overexpressing fluoroquinolone –resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45(5): 1550-1552.
63. Lindgren PK, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47(10):3222-3232.

64. Asoko H, Nakajima H, Kobayashi K, Kobayashi M, Aono R. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63(4): 1428-1433.
65. Oethinger M, Kern WV, Goldman JD, Levy SB. Association of organic solvent tolerance and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998;41:111-114.
66. Hirato T, Saito A, Nishino K, Tamuro N, Yamaguchi A. Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escherichia coli* to tigecycline (GAR 936). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48(6): 2179-2184.
67. Wright GD. Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. *Chemical Biology*. 2000; 7: R127-R132.
68. Zloh M, Kaatz GW, Gibbons S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. *Bioorganic Medical Chemistry Letters* 2004; 14: 881-885.
69. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS, Boyer E, Chamberland S, Lee VJ. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999;43: 1340-1346.
70. Kristiansen J, Amaral L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 40: 319-327.
71. Nelson ML, Levy SB. Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistant determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 43: 1719-1724.
72. Nelson ML, Park BH, Levy SB. Molecular requirements for the inhibition of the tetracycline antiport protein and the effect of potent inhibitors on the growth of the tetracycline resistant bacteria. *Journal of Medical Chemistry*. 1994; 37: 1355-1361.
73. Nelson ML, Park BH, Andrews JS, Georgian VA, Thomas RC, Levy SB. Inhibition of the tetracycline efflux antiport protein by 13-thio substituted 5-hydroxy-6-deoxytetracyclines. *Journal of Medical Chemistry* 1993; 36: 370-377.
74. Hsieh PC, Siegel SA, Rogers B, Davis D, Lewis K. Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6602-6605.
75. Chevalier J, Bredin J, Mahamoud A, Mallea M, Barbe J, Pages JM. Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 1043-1046.
76. Bohnert JA, Kern WV. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49: 849-852.
77. Schmitz F, Fluit A, Luckefahr M, Engler B, Hofmann B, Verhof J, Heinz H, Hadding U, Jones M. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998;42:807-810.
78. Brenwald N, Gill M, Wise R. The effect of reserpine, an inhibitor of the multi-drug efflux pumps, on the in-vitro susceptibilities of fluoroquinolone-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* to norfloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997;40:458-460.

79. Markham P, Neyfakh A. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40: 2673-2674.
80. Markham PN. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 43: 988-999.
81. Markham PN, Westhaus E, Klyachko K, Johnson ME, Neyfakh AA. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 43: 2404-2408.
82. Renau TE, Leger R, Flamme EM, Sangalang J, She MW, Yen R, Gannon CL, Griffith d, Chamberland S, Lomovskaya O, Hecker SJ, Lee VJ, Ohta T, Nakayama K. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. *Journal of Medical Chemistry*. 1999; 42: 4928-4931.
83. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45: 105-116.
84. Mamelli L, Amoros JP, Pages JM, Bolla JM. A Phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide sensitive multidrug efflux pump involved in intrinsic and acquired resistance of *Camylobacter* to macrolides. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003; 22: 237-241.
85. Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Effect on an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 49: 697-698.
86. Sanchez P, Le U, Martinez JL. The efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide does not abolish the activity of the *Stenotrophomonas maltophilia* SmeDEF multidrug efflux pump. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 1042-1045.
87. Determination of minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Agar Dilution. European Committee for Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST) Discussion Document. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol 6 Number 5 May 2000.
88. Gür D. Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onbeşinci Bilgi Eki . 2005;25(1):102-108.
89. Fluka Mikrobiyoloji Manuel. 2003: 113-114 .
90. Li XZ, Nikaido H. Efflux mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 64(2): 159-204.
91. Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: An overview. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 33(Suppl 3): 108-115.
92. Waterer GW, Wunderink RG. Increasing threat of gram negative bacteria. *Critical Care Medicine*. 2001, 29: N75-N81 .
93. Nikaido H. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology* 1998; 1: 516-523.
94. Akalın H. Çoğul dirençli gram negatif bakteriler. *Hastane Enfeksiyonları* 2003 Ankara 269-288.

95. Günseren F, Mamıkođlu L, Öztürk S A surveillance study of antimicrobial resistance of gram negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999; 43: 373-378.
96. Yücesoy M, Yuluđ N, Kocagöz S, Ünal S, Çalangu S and study group. Antimicrobial resistance of gram negative isolates from intensive care units in Turkey: comparison the previous three years. *Journal of Chemotherapy*. 2000; 12: 294-298 .
97. Alekshun MN, Levy SB. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The mar regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41: 2067-2075.
98. Mazzariol A, Cornaglia G, Nikaido H. Contributions of the AmpC β -lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to β -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44: 1387-1390.
99. Karaca Y, Coplu N, Gozalan A, Oncul O, Citil BE, Esen B. Co-trimoxazole and quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections over the last ten years. *International Antimicrobial Agents* 2005; 26(1): 75-77 .
100. Rosenberg EY, Bertenthal D, Nilles ML, Bertrand KP, Nikaido H. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory proteins. *Molecular Microbiology* 2003; 48(6): 1609-1619.
101. Webber MA, Piddock LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 9-11
102. Gunseren F, Mamikoglu L, Ozturk S. A surveillance study of antimicrobial resistance of gram negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999; 43: 373-378.
103. Koseoglu O, Kocagoz S, Gur D, Akova M. Nosocomial bloodstream infections in a Turkish university hospital: study of gram negative bacilli and their sensitivity patterns. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 17: 477-478.
104. Hasdemir UO, chevalier J, Nordmann P, Pages JM. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(6): 2701-2706 .

VII: Ekler:

a)Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje için BAP'dan temin edilen bütçe ile aşağıdakiler temin edilirken gelir 4356YTL gider ise 3033YTL'dir.

1. BBL Crystal Enteric Non fermentative ID kit 1 kutuda 20 adet olmak üzere toplam 100 suş için 5 kutu,
2. 25 mg. 'lik birimlerde sunulan Phe-Arg- β -naphthylamidedihydrochloride 'den 50 mg
3. Erythromycin, ciprofloxacin ve nalidixic acid baz maddeleri 25 gramlık birimlerden 1'er adet
4. Levofloxacin baz maddesi 30 gr (10 gramlık birimlerden 3 adet)
5. LB Broth agar (organik solvent tolerans test ve broth dilüsyon için kullanılmıştır) da aynı firmadan 500 gramlık birimlerinden 2 adet

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İleride Kullanımına Dair Açıklamalar (BAP Demirbaş numaraları dahil)

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

Organik Solvent Tolerans Testi:

Test için -20°C 'de saklanan suşlar çalışma günü için %5'lik koyun kanı içeren kanlı agarda canlandırıldı.

Bir gece Luria Broth'da (LB; bakterilerin üremesi için sıvı ortam) üreyen suşlar, yine LB'de 10^6 ve 10^7 cfu/ml olacak şekilde dilüe edildi. Hazırlanan bu dilüsyondan her biri toplam 5 µml. olacak şekilde beş farklı LBGMg'lu agara dökülerek ekim yapıldı. Büyüme kontrol plağına ek madde konmazken, kalan dört plak 5 mililiterlik saf heksen ya da 3:1, 1:1, 1:3 oranlarında karışımı yapılmış heksen-sikloheksen ile kaplandı. Buharlaşmayı önlemek için parafinlenmiş plaklarda 30°C 'de 20-48 saat inkübe edildiler. Ekimler farklı solvent konsantrasyonlarında skorlandı. Böylelikle farklı heksen-sikloheksen oranlarındaki toleransına bakılmış olsa da, basitleştirmek için 1:1 oranındaki karışımda 5×10^3 hücre üremesi organik solvent toleransı olarak tanımlandı. Çalışmada pozitif tolerans normalin üstünde efluks yapan *AcrAB-TolC* efluks pompa göstergesi olarak değerlendirilmiştir .

d) Sunumlar (Bildiriler ve teknik raporlar)

17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
and 25th International Congress of Chemotherapy
Munich/Germany, 31 March - 3 April 2007 'da 2073 Numara ile poster olarak sunulmuştur.
Clinical Microbiology and Infectious Diseases april 2007 Vol :13 P: 490

e) Yayınlar (Hakemli bilimsel dergiler) ve tezler