

PAPER DETAILS

TITLE: Bakterilerde Kinolon Direncinin Genetigi

AUTHORS: Murat CENGİZ

PAGES: 55-60

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/144421>

Bakterilerde Kinolon Direncinin Genetiği

Murat CENGİZ*

Geliş Tarihi: 13.04.2010

Kabul Tarihi: 24.06.2010

Özet: Bakteriyel direnç, tür çeşitliliği ve biyolojik etkileşim dolayısıyla genetik değişimlerin kolayca oluşabildiği genetik reaktörlerde ortaya çıkar. Son yıllarda kinolon direnci ve kalıntıları, bu gruptaki antibiyotiklerin yaygın kullanımı nedeniyle yoğun ilgi toplayan bir alandır. Kinolon direncinin oluşmasından sorumlu olan birkaç mekanizma vardır. Bu genetik mekanizmalar: kinolon direnci belirleyici bölgede meydana gelen *gyrA* ve *ParC* mutasyonları, *qnr* ve analogları tarafından plazmid aracılı direncin kodlanması ve bakteri membran proteinlerinin sayısını azaltarak düşük etkili bir direncin oluşmasına neden olan *mar* mutasyonlarıdır. Direncin aktarılabilir niteliğinin de olması dolayısıyla insan ve hayvan sağlığı genetik reaktörlerde kinolon direnç etmenlerinin çoğalmasından olumsuz etkilenir. Ayrıca, henüz somut bir kanıt sunulamamış olsa da çevrede bulunan kinolon kalıntıları direncin gelişmesine neden olabilir. Direncin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki istenmeyen etkilerini ortadan kaldırmak için koruyucu önlemler alınmalıdır. Bunun için kinolon direncinin karakterize edilmesi önemlidir ve mevcut tedavi protokolleri *in vitro* farmakodinamik yöntemler yardımıyla geliştirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Kinolon, direnç, genetik.

Genetic Bases of Quinolone Resistance

Abstract: Bacterial resistance emerges in genetic reactors in which genetic exchange may easily be taken place due to high bacterial diversity and biological interaction. Quinolone resistance and residues are taking more attention recently due to the wide use of these compounds. There are several mechanisms which are responsible for the emergence of quinolone resistance. These genetic mechanisms are mainly *gyrA* and *ParC* mutations on quinolone resistance determining region, plasmid-mediated quinolone resistance which is encoded by *qnr* and its analogues, and *mar* mutations which may cause low level resistance by decreasing the number of bacterial membrane porins. Human and animal health is adversely affected by increasing the quinolone resistance determinants in the genetic reactors, since this resistance can be transferred between human and animal. In addition, quinolone residues in the environment can cause the emergence of resistance due to the selective pressure, even clear results could not be submitted to support those antibiotic residues play a role for the emergence of bacterial resistance, until recently. In order to eliminate unwanted effects of resistance on human and animal health, some preventive measures should be taken immediately. For this, characterization of quinolone resistance is important and *in vitro* pharmacodynamic models could be used to improve the available treatment protocols.

Key Words: Quinolone, resistance, genetic.

* Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji A.D., Görükle Kampüsü, 16059, Bursa.
cengizm@uludag.edu.tr

Giriş

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde özenli bir seçim yapılmadan antibiyotik kullanılması, bakterilerin direnç kazanmasına neden olabilir. Son yıllarda önemli bir halk sağlığı sorununa dönüşen direnç, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde antimikrobiyal direnç izleme programları (European Antimicrobial Surveillance System: EARSS, National Antimicrobial Resistance Monitoring System: NARMS) sayesinde izlenebilmektedir²³.

Direnç, yüksek biyolojik ilişki ve bakteriyel tür çeşitliliği nedeniyle genetik değişimlerin sık meydana geldiği alanlarda oluşur. Bu alanlar dört ana birime ayrılır ve genetik reaktör olarak adlandırılır. Genetik reaktörlerin ilki (I) insan ve hayvan mikrobiyal topluluğu tarafından oluşturulur ve antibiyotiğe duyarlı 500'den fazla bakteri türünü içerir. İkinci reaktör (II), uzun süreli tedavilerin uygulandığı hastane ve hayvan yaşam alanları ile bakteri temasına maruz kalan duyarlı bireylerin bulunduğu diğer alanları kapsar. Üçüncü reaktör (III), atık su, bakterilerin genetik olarak etkileşebilecekleri hayvansal gübre depoları, arıtma üniteleri veya tuvalet kompostları gibi ikincil reaktörlerden köken alan biyolojik herhangi bir kalıntıdır. Dördüncü reaktör (IV) ise çevredeki organizmalarla etkileşebilen ve diğer reaktörlerden gelen bakterileri içeren toprak, yüzey ve zemin sularıdır³.

İnsan ve hayvanlarda, antimikrobiyal ajanların koruyucu veya tedavi amacıyla kullanılması, bakteriler üzerinde seçici bir etki oluşturarak direncin gelişmesini sağlar. Bu kapsamda, tıp hekimliğinde yaygın bir şekilde kinolon grubu antibiyotiklerin kullanılması direnç bakımından bir risk faktörüdür. Bu riskin önemli bir belirteci, daha önce florokinolon tedavisi uygulanmamış bireylerden dirençli gram negatif bakteri izole edilmesidir. Veteriner hekimliğinde antimikrobiyal ilaçların yaygın bir şekilde kullanılması direncin gelişmesi için etkili diğer bir faktördür. Bunun belirteci ise, aynı coğrafik bölgede yaşayan insan ve hayvanlardan yüksek genetik benzerliğe sahip dirençli *Escherichia coli* suşlarının izole edilmesidir^{7,8}.

Kinolonlar, geniş etki spektrumları nedeniyle tıp ve veteriner hekimliği alanında yaygın bir şekilde kullanılan sentetik yapıli antimikrobiyal ajanlardır ve biyoyararlanım ile etki özelliklerine göre dört farklı kuşağa ayrılır. *Birinci kuşakta*, nalidiksik asit, oksolinik asit ve sinoksasin; *ikinci kuşakta* florokinolon olarak

nitelendirilen, siprofloksasin, enrofloksasin, marbofloksasin, danofloksasin, difloksasin, norfloksasin ve enoksasin; *üçüncü kuşakta* orbifloksasin, levofloksasin, sparfloksasin ve grepafloksasin; *dördüncü kuşakta* ise travofloksasin, gatifloksasin, moksifloksasin, gemifloksasin ve sitafloksasin yer alır. Veteriner hekimliğinde kullanılan başlıca florokinolonlar, enrofloksasin, danofloksasin ve sarofloksasin-dir^{11,12,15,24}.

Hayvan intestinal florası, bakteri çeşitliliği ve yoğunluğu nedeniyle direncin gelişmesi için ideal bir ortamdır. Çiftlik hayvanlarında enrofloksasin kullanılması zoonoz bakterilerde siprofloksasin duyarsızlaşmasına neden olabilir. Dirençli bakteriler hayvansal besinler aracılığıyla insanlara geçebilir ve böylece bu bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde siprofloksasinin etkinliği azalabilir^{7,12}. Hayvan türlerine göre değişmekle birlikte florokinolon direncinin yaygınlığı %5 ile %75 arasında değişmektedir^{17,19}.

Direnç, tıp ve veteriner hekimliği alanında yaygın bir şekilde antimikrobiyal ilaç kullanılması sonucu gelişebildiği gibi, antimikrobiyal ilaç kirliliğine bağlı olarak çevrede de gelişebilir ve yaygınlaşabilir. Antimikrobiyal ilaç kirliliği sonucu direnç, ilk üç gün içinde %85 oranında artar ve yaklaşık dört ay varlığını sürdürebilir. Çevresel direnç sürecini belirleyen faktörler ortamdaki besin maddesi miktarı ile bazı fiziksel (pH ve nem gibi) parametrelerdir^{23,27,30}.

Hastane veya hayvansal üretim atıklarının antibiyotik kalıntısı ile direnç etmeni içermesi halinde insan ve hayvan sağlığı ile çevrenin mikrobiyal yapısı olumsuz etkilenir¹⁶. Dirençli bakterilerin çevreye ulaşmasını sağlayan en önemli kaynak hayvan gübresidir. Hayvan gübresi insan sağlığı için risk oluşturan *Salmonella sp.*, *E. coli* 0157, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* ve *Clostridium perferinges* gibi önemli bazı bakterileri içerir. Çevrede en yaygın bulunan bakteriler *Salmonella* ve *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleridir^{4,7}.

Kinolon direnci, 2000'li yılların başından itibaren ilaç kullanımına bağlı olarak yaygınlaşmaya başlamıştır^{11,24}. Daha geniş etki spektrumlu florokinolon grubu yeni kuşak ilaçların kullanılmaya başlanması ve kullanılmakta olan ilaçların etkinliğinin yeniden değerlendirilmesi gerekliliği kinolonlara karşı ilginin artmasına neden olmuştur. Bu makalede, son yapılan çalışmaların sonuçlarını da içerecek şekilde günümüzde önemli bir soruna dönüşen ve üzerinde

birçok araştırmanın yürütüldüğü kinolon direncinin mekanizmalarını sunmak amaçlanmıştır. Bu mekanizmalar, kromozomal veya aktarılabılır niteliğine göre farklı başlıklar altında açıklanmıştır.

Kinolon Hedef Enzim Bölgelerinin Yapısal Değişimi

Kinolonların hedef bölgesi DNA giraz ve topoizomera IV enzimleridir. Bu enzimleri kodlayan bölgede meydana gelen mutasyonlar direncin oluşmasından sorumludur. DNA giraz, *gyrA* ve *gyrB* alt birimlerine sahip tetramerik bir enzimdir. Bu enzim, *gyrA* alt birimi aracılığıyla DNA molekülünün fosfat grupları ile kovalent bağ meydana getirir. Benzer şekilde iki alt birimden (ParC ve ParE) meydana gelen topoizomera IV de tetramerik bir enzimdir. Topoizomera IV, florokinolonların gram pozitif bakterilerde birincil, gram negatif bakterilerde ise ikincil hedef bölgesidir. Gatifloksasin, moksifloksasin ve trovafloksasin gibi yeni kuşak florokinolonlar ikili olarak bağlandıklarından hem DNA giraz hem de topoizomera IV enzimini eş zamanlı olarak inhibe eder. Böylece florokinolonlar, DNA giraz ve topoizomera IV'ün oluşturduğu kırılmaları durdurarak DNA'nın sentezlenmesini baskılar^{6,7,9,10}.

DNA giraz

Florokinolon direncine aracılık eden mutasyonların büyük çoğunluğu kinolon direncini belirleyici bölge (Quinolone Resistance Determining Region: QRDR) olarak tanımlanan *gyrA* ve *gyrB* birimlerinde meydana gelir. Mutasyon lokalizasyonu sıklıkla *gyrA* biriminde Ala 67-Gln 106, *gyrB* biriminde ise Asp 426-Lys 447 bölgesi amino asitleridir. Mutasyonun sık görüldüğü bu amino asitler, DNA girazın aktif bölgesine yakın olarak konumlanmış 83 ve 87 numaralı kodonlara karşılık gelir. Mutasyon sonucu florokinolonların bağlandığı aktif bölgelerin yapısı değişir ve buna bağlı olarak direnç gelişir^{6,7,12}.

GyrA biriminde meydana gelen bir mutasyon *E. coli*'de nalidiksik aside karşı yüksek etkili bir dirence neden olurken, aşamalı olarak *gyrA* ve/veya topoizomera IV bölgesinde meydana gelen ilave mutasyonlar diğer florokinolonlara karşı yüksek etkili bir direnç oluşturur. 83. Kodonda meydana gelen nükleotid değişimi laboratuvar ve klinik olarak en yaygın karşılaşılan *gyrA* mutasyonudur. *E. coli* izolatlarının nalidiksik asit ve diğer florokinolonlara karşı sergilediği yüksek etkili direnç bu kodonda serin amino asidinin lösinle

yer değiştirmesinin bir sonucudur. Buna yanında Asp 87 kodonunda meydana gelen ilave bir mutasyon direncin etkisini artırır. Ser 83 kodonunda meydana gelen bir mutasyon, Asp 87 kodonunda meydana gelen mutasyondan daha etkili bir direnç oluşturur. Bu durum yüksek etkili florokinolon direncinde Ser 83 mutasyonuna daha sık rastlanmasının nedenini açıklar. *GyrA* biriminin daha nadir rastlanan mutasyonları Ala 67, Gly 81, Ala 84, Gln 106'dır. Bu mutasyonlar sadece *in vitro* mutant suşlarda görülebilir. QRDR dışı mutasyonlar Ala 196'nın glutaminle ve Ala 51'in valinle yer değiştirmesi şeklindedir. Genel olarak *gyrA* birimi mutasyonları *gyrB* birimi mutasyonlarından daha yaygındır^{6,7,28}.

Topoizomera IV

Topoizomera IV, DNA giraz kadar kinolonlara karşı duyarlı olmadığından florokinolonların gram negatif bakterilerde ikincil hedef bölgesidir. ParC ve ParE birimlerindeki mutasyonlar sıklıklar *gyrA* birimi mutasyonları ile birlikte meydana gelir. Bu nedenle ParC biriminde meydana gelen bir mutasyon tek başına bakterinin florokinolon duyarlılığını değiştirmez. Buna rağmen, ParC ve ParE birimlerindeki mutasyonlar yüksek etkili direncin oluşması bakımından önemlidir⁶.

E. coli için minimum inhibe edici konsantrasyonun (MIK) ≥ 1 mg/L olduğu durumda ParC birimi (Ser 80 ve Glu 84) mutasyonu oluşur. 80. Kodonda serin izölösine, 84. kodonda ise glutamik asit glisin, lizin veya valinle yer değiştirir⁷. ParE birimindeki mutasyonlar bakteri duyarlılığında herhangi bir değişim oluşturmadığından, florokinolon direnci ile ilişkilendirilmez^{6,7}.

E. coli izolatlarında *gyrA* biriminin 83 ve 87 numaralı kodonlarında eş zamanlı mutasyon görülme olasılığı yaklaşık % 60, ParC biriminin 80 ve 84 numaralı kodonlarında eş zamanlı mutasyon görülme olasılığı yaklaşık % 10'dur¹². Dirençli hiçbir klinik izolatta ne *gyrA* ne de ParC biriminde tek başına bir mutasyon meydana gelmez²⁸.

Aktarılabılır Kinolon Direnci

İlk olarak 1998 yılında *Klebsiella pneumoniae*'de varlığı bildirilen aktarılabılır kinolon direncinden pMG252 plazmidi üzerinde yer alan *qnr* geni sorumludur¹⁴. *Qnr*, 218 amino asitten oluşan penta peptid yapıları bir proteindir ve *E. coli*'de DNA girazı florokinolonların etkisinden korur. Bu genin analogları *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* ve *qnrS*'dir^{7,29}.

Qnr geni, düşük etkili bir kinolon direnci kodlayıcısı olduğundan bu gene sahip bakteri suşları fenotipik olarak direnç göstermeyebilir. Bu durum klinik olarak *qnr* geni taşıyıcısı olan bakteri suşlarını tespit etmeyi güçleştirir^{7,29}.

pMG252, bakterilerin ampisilin, kloramfenikol, nalidiksik asit ve tetrasiklin gibi birçok antibiyotige karşı direnç göstermesini sağlayan bir plazmidir. Bu plazmid, dış membran proteinlerinin sayısını, kinolonların hücre içi birikimi ve etkinliğini değiştirmeyip, *gyrA* birimindeki mutasyonların etki potansiyelini artırır²⁶. pMG252, konjugasyon yoluyla *qnr* geninin diğer bakterilere aktarılmasını ve düşük etkili bir bakteri direncinin oluşmasını sağlar. Bu durum kromozomal mutasyon için fırsat yaratır. Erken aşamada meydana gelen kromozomal mutasyon MIK'da önemli bir artışa neden olmasa da, bakterinin canlı kalma şansını artırır ve sonraki süreçte daha etkili bir direncin gelişmesi kolaylaşır^{25,29}. Hayvanlardan izole edilen bakterilerde *qnr* geninin yaygınlığı % 6, florokinolonlara dirençli suşların yaygınlığı %95'e ulaşabilmektedir ve MIK yaklaşık 512 mg/L olarak bildirilmiştir²⁹.

Qnr geni dışında, aktarılabilir nitelikteki kinolon direncinden sorumlu olan aminoglikozid asetiltransferaz geni [*aac(6')-Ib*] tobramisin, amikasin ve kanamisine; bu genin *aac(6')-Ib-cr* varyantı ise siprofloksasin ve norfloksasine karşı direnci kodlar. *aac(6')-Ib-cr* coğrafik olarak yaygındır ve uzun süre stabilitesini korur²². Aktarılabilir dirençten sorumlu olan diğer bir etmen de *qepA* genidir ve bu gen bir geri çıkartım pompası kodlayıcısıdır²⁹.

Çoklu Antibiyotik Direnci

Çeşitli nedenlerle bakterinin kromozomlarında yerleşik *mar* geninin aktivasyonu birçok ilaca karşı direncin (Multiple Drug Resistance: MDR) oluşmasına neden olur. Temel varsayım genetik rekombinasyon ve mutasyona bağlı olarak direncin oluştuğu ve doğal seçim sonucu yaygınlaştığıdır. Bu aşamadan sonra direnç sayısal olarak çoğalır ve bakteriler aracılığıyla insan ve hayvanlara aktarılır^{1,4,8,20}.

Florokinolon direnci, DNA giraz ve topoizomeraz IV mutasyonlarının yanı sıra membran proteinlerinin yapısal değişimine bağlı olarak ilacın hücre içi birikiminin azaltılması sonucu da gelişebilir^{11,22,25}. Bu yapısal değişime *mar* bölgesi aracılık eder. *Mar* bölgesi, operatör bir birim olan *marO* bölgesi üzerinde ayrı konumlanmış iki alt birimden (*marC* ve *marRAB*)

oluşur. *MarC* 221 amino asitten oluşan, fonksiyonu bilinmeyen ve transkripsiyonel bir birim tarafından kodlanan bir iç membran proteindir. Diğer transkripsiyonel birim olan *marRAB*, 144 amino asitten oluşan represör *marR*, 127 amino asitten oluşan transkripsiyonel aktivatör *marA* ve 72 amino asitten oluşan *marB*'yi temsil eder^{2,21}.

MarR, *marRAB* ekspresyonunu negatif yönde düzenlemek için *marO* operatör bölgesine bağlanır. *MarO* iki ana mekanizma ile *marRAB* ekspresyonu oluşturur. Birincisi, represör bölgenin inaktivasyonuna neden olan *marR* bölgesinin mutasyonudur. İkinci mekanizma, bakterinin *marR* represyonunu azaltan yapısal olarak birbirinden farklı bileşiklere maruz kalmasıdır. *MarR* represyonunun azalması *marRAB* bölgesi aktivasyonuna neden olur²¹.

MarA, altmıştan fazla kromozomal genin ekspresyonunu değiştiren ve tetrasiklin, kloramfenikol, ampisilin, nalidiksik asit, siprofloksasin, norfloksasin, puromisin, rifampisin ve bazı dezenfektanlara karşı direnç gelişiminden sorumlu olan bölgedir^{1,4,20,21}. *Mar* ekspresyonu antibiyotiklerin etkinliğini azaltarak bakterisid etkinin bakteriostatik etkiye dönüşmesine neden olur ve MIK yaklaşık üç kat artar²¹.

MIK'un yükselmesi *E. coli* gibi yüksek dış membran geçirgenliğine sahip bakterilerde tedavi bakımından anlamlı olmayabilir. Ancak, bu durum ilaç hedef bölgelerinde bir mutasyon oluşuncaya veya plazmid transferine bağlı bir direnç gelişinceye kadar bakterinin canlı kalmasını sağlar^{6,18}. Nitekim florokinolon içeren bir besi yerinde klinik olarak duyarlı bir *E. coli* suşunun pasajlanması sonucu öncelikle *gyrA* mutasyonu, ardından *marA* ve/veya *soxS* ekspresyonunu artıran *mar* tipi mutantlar oluştuğu; ilk aşamada siprofloksasin için MIK 0.06-0.5 mg/L iken *gyrA* ve *mar* mutasyonu sonucu bu değer 0.5-32 mg/L'ye yükseldiği bildirilmiştir²¹.

E. coli ve *Salmonella typhimurium*'da direnç primer olarak *acrAB-tolC* çoklu ilaç sisteminin sentezinin artması sonucu oluşur. *AcrB*, bir iç membran proteindir ve bir dış membran kanalı olan *tolC* aracılığıyla ilaçların hücre dışına çıkartılmasından sorumludur. *AcrB* ve *tolC*, bir membran bağlayıcı proteini olan *acrA* sayesinde birbirine bağlanır^{1,5}. *E. coli*'de *acrAB-tolC* proteinleri ile bu proteinlerin *Pseudomonas aeruginosa*'daki homoloğu olan *mexAB-oprM* proteinleri çok sayıda ilacın hücre dışına çıkartılmasını sağlar. *AcrAB-tolC* ve *mexAB-oprM*

Neisseria gonorrhoeae ve *Haemophilus influenzae* gibi gram negatif bakterilerde yaygın olarak bulunur. *AcrAB* primer olarak *marA* ve *marA*'nın homoloğu olan *soxS* ve *robA* proteinleri tarafından kontrol edilir. Hücresel geri çıkartım aktivitesi *arcAB* fonksiyonel biriminin transkripsiyonuna bağlı olarak artar ve *marA/soxS* komplementer RNA (*micF*) üretimini artırarak dış membran proteini (OmpF) sentezini azaltır. Her iki mekanizma sinerjik bir etki meydana getirir. *E. coli*'de *acrAB* üretimi *marA* düzenleyici biriminin yüksek miktarda üretilmesi veya *marR* represör bölgesinde meydana gelen mutasyon sonucu artar^{5,18}.

Mar fenotipine çevrede daha sık rastlanır. Bunun nedeni çevre sıcaklığının (30°C) vücuttakinden (37°C) daha düşük olması ve *mar* bölgesinin düşük sıcaklığa daha kolay uyum sağlayabilmesidir¹³.

Sonuç

Kinolon direnci, başlıca QRDR ve *mar* bölgesinde kromozomal mutasyon veya *qnr* geni ile bu genin analoglarının başka bakterilere aktarılması sonucu oluşur. Kinolon direncinin oluşması ve aktarabilmesi enfeksiyon hastalıklarının tedavisini güçleştirebilir. İnsan ve hayvan sağlığını korumaya yönelik çözüm önerilerinin üretilebilmesi direncin doğru bir şekilde karakterize edilmesine bağlıdır. Doğru doz ve tedavi süresinin seçimini kapsayan akılcı antimikrobiyal kullanımı direncin oluşmasını ve hijyen şartlarının sağlanması ise direncin yayılmasını önleyebilir. Ayrıca, üzerinde henüz tam uzlaşma sağlanamayan ve Avrupa Birliği normlarına göre antimikrobiyal risk değerlendirmesi için eşik değer olarak kabul edilen 0.100 mg kg⁻¹ ve buna yakın değerler farklı çevre matrislerinde direnç bakımından test edilebilir. Bu alanda yapılacak araştırmaların sonuçlarına göre ise risk değerlendirmesi için yeni bir eşik değeri belirlenebilir. Ayrıca, farklı mekanizmalarla oluşmuş her tip kinolon direnci için *in vitro* farmakodinamik yöntemler kullanılarak daha etkin bir antimikrobiyal tedavi geliştirilebilir.

Kaynaklar

- Alekshun, M.N., Levy, S.B., 1999. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. Trends Microbiol., 7(10), 410-413.
- Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell, 128, 1037-1050.
- Baguero, F., Martinez, J.L., Canton, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr. Opin. Biotech., 19, 260-265.
- Castiglioni, S., Romati, F., Miller, K., Burns, B.P., Zuccato, E., Calamari, D., Neilan, B.A., 2008. Novel homologs of the multiple resistance regulator *marA* in antibiotic-contaminated environments Water Res., 42, 4271-4280.
- Gambino, L., Gracheck, S.J., Miller, P.F., 1993. Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 175(10), 2888-2894.
- Hooper, D., 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. Drug Resist. Update, 2, 38-55.
- Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. Int. J. Antimicrob. Ag., 25, 358-373.
- Hunter, P.A., Dawson, S., Frech, G.L., Goossens, H., Hawkey, P.M., Kuijper E.J., Nathwani, D., Taylor, D.J., Teale, C.J., Warren, R.E., Wilcox, M.H., Woodford, N., Wulf, M.W., Piddock, L.J.V., 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing practices and policies. J. Antimicrob. Chemother., 65 (Suppl. 1), i3-i17.
- Intorre, L., Vanni, M., Di Bello, D., Pretti, C., Meucci, V., Tognetti, R., Soldani, G., Cardini, G., Jousson, O., 2007. Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. J. Vet. Pharmacol. Therap., 30, 464-469.
- Kato, J.I., Suzuki, H., Ikeda, H., 1992. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 267, 25676-25684.
- Khan, A.A., Nawaz, M.S., West, C.S., Khan, S.A., Lint, J., 2005. Isolation and molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* from poultry litter. Poultry Sci., 84, 61-66.
- Lee, Y.J., Cho, J.K., Kim, K.S., Tak, R.B., Kim, A.R., Kim, J.W., Im, S.K., Kim, B.H., 2005. Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. J. Microbiol., 43(5), 391-397.
- Litran-Maria, T., Allison, D.G., Gilbert, P., 2000. Expression of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. J. Appl. Microbiol., 88, 243-247.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A., 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet, 351, 797-799.

15. Martinez, M., McDermott, P., Walker, R., 2006. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Brit. Vet. J.*, 172, 10-28.
16. Martinez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.*, 157, 2893-2902.
17. Miles, T.D., McLaughlin, W., Brown, P.D., 2006. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Vet. Res.*, 2, 7-9.
18. Nikaido, H., 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 516-523.
19. Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., Diez, R., Martinez, S., de la Fuente, R., 2001. Quinolone resistance in potentially pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy ruminants. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 48, 421-424.
20. Park, Y.H., Yoo, J.H., Huh, D.H., Cho, Y.K., Choi, J.H., Shin, W.S., 1998. Molecular analysis of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* on the aspect of gyrase and multiple antibiotic resistance (*mar*) genes. *Yonsei Med. J.*, 39(6), 534-540.
21. Randall, L.P., Woodward, M.J., 2002. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res. Vet. Sci.*, 72, 87-93.
22. Robicsek, A., Jacoby, G.A., Hooper, D., 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.*, 6, 629-640.
23. Servais, P., Passerat, J., 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci. Total Environ.*, 408, 365-372.
24. Shaheen, B.W., Wang, C., Johnson, C.M., Kaltenboeck, B., Boothe, D.M., 2009. Detection of fluoroquinolone resistance level in clinical canine and feline *Escherichia coli* pathogens using rapid real-time PCR assay. *Vet. Microbiol.*, 139, 379-385.
25. Stavoe, A.K.H., 2006. Plasmid-mediated quinolone and fluoroquinolone resistance. *MMG 445 Basic Biotech. eJ.*, 2, 154-159.
26. Tran, J.H., Jacoby, G.A., 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *PNAS*, 99(8), 5638-5642.
27. Venglovsky, J., Sasakova, N., Placha, I., 2009. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technol.*, 100, 5386-5391.
28. Werner, G., Fleige, C., Ewert, B., Lavarde-Gornez, J.A., Klare, I., Witte, W., 2010. High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 35, 119-125.
29. Yang, J., Luo, Y., Li, J., Ma, Y., Hu, C., Jin S., Ye, L., Cui, S., 2010. Characterization of clinical *Escherichia coli* isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.*, 478, 1-7.
30. Yu, D., Yi, X., Ma, Y., Yin, B., Zhuo, H., Li, J., Huang, Y., 2009. Effects of administration mode of antibiotics on antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* in aquatic ecosystems. *Chemosphere*, 76, 915-920.