

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Sınıf 1 ve 2 İntegron Taşıyıcılığı ve Yeni Bir Gen Kaseti Birlikteliği: $bla_{OXA-11}-cmlA7$

Carriage of Class 1 and 2 Integrons in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical Specimens and a Novel Gene Cassette Array: $bla_{OXA-11}-cmlA7$

Fırat Zafer MENGELOĞLU¹, Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK², Esra KOÇOĞLU¹, Cemal SANDALLI³, Emine Esra BUDAK³, Osman Birol ÖZGÜMÜŞ²

¹ Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bolu.

¹ Abant İzzet Baysal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bolu, Turkey.

² Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize.

² Recep Tayyip Erdogan University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Rize, Turkey.

³ Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize.

³ Recep Tayyip Erdogan University Faculty of Arts and Sciences, Department of Medical Biology, Rize, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 24.09.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.11.2013

ÖZET

Antibiyotik direnç genlerinin bakteriler arasındaki yayılımı, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Son zamanlarda bu genlerin integronlarda da taşındığı gösterilmiştir. Ülkemizde, *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatlarında sınıf 1 ve sınıf 2 integron taşıyıcılığıyla ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hastanesinde, klinik örneklerden izole edilen *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarında, sınıf 1 ve 2 integron taşıyıcılığının araştırılması ve antibiyotik direnç gen kasetlerinin dizi analiziyle karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Mart 2010-Aralık 2012 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden (%56 balgam, %19 yara, %11 idrar, %11 kan, %3 kateter) izole edilen 77 *A.baumannii* ve 60 *P.aeruginosa* olmak üzere toplam 137 suş dahil edilmiştir. İzolatların tanımlanması ve antibiyogramları Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) ve BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, ABD) sistemleriyle yapılmıştır. Suşlarda integron varlığı, sınıf 1 (*intI1*) ve sınıf 2 (*intI2*) integraz bölgeleri için özgül primer çiftleri kullanılarak PCR yöntemiyle araştırılmış; integron amplifikasyonunun gerçekleştirildiği tüm örnekler, hem klonlanarak hem de PCR ürünü olarak DNA dizi analizine tabi tutulmuştur. Çalışmada, *A.baumannii* suşlarında en yük-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Osman Birol Özgümüş, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 464 212 3009, **E-posta (E-mail):** ozgumus.ob@erdogan.edu.tr

sek duyarlılık kolistin (%96) ve tigesiklin (%78), *P.aeruginosa* suşlarında ise piperasilin-tazobaktam (%97) ve piperasiline (%93) karşı saptanmış; buna karşın *A.baumannii* suşlarında en yüksek direnç oranı (%95) piperasilin/tazobaktama karşı gözlenmiştir. *A.baumannii* suşlarının %33 (26/77)'ünde, *P.aeruginosa* suşlarının ise %10 (6/60)'unda *intl1* geni tespit edilmiş; *intl1* pozitif suşlarda değişken bölgeler PCR ile çoğaltıldığında sekiz (8/77, %10) *A.baumannii* ve üç (3/60, %5) *P.aeruginosa* suşunun antibiyotik direnç gen kaseti taşıdığı belirlenmiştir. Suşların hiçbirisinde *intl2* geni saptanmamıştır. İntegron pozitif olan tüm *A.baumannii* suşlarında piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefepim, seftriakson ve ampisilin/sulbaktama karşı, integron pozitif tüm *P.aeruginosa* suşlarında ise seftazidim, gentamisin ve siprofloksasine karşı ortak direnç paterni tespit edilmiştir. İntegronların DNA dizi analizleri, *A.baumannii* [*aacC1-aadA1* ve *aac(3)-1*] ve *P.aeruginosa* (*bla_{OXA-30}-aadA1* ve *bla_{OXA-11}-cmlA7*) suşlarının ikiye farklı gen kaset dizisi taşıdığını göstermiştir. Ulaşabildiği kadarıyla, *P. aeruginosa* integron gen kaseti içerisinde tanımlanan *bla_{OXA-11}-cmlA7* gen dizilimi ilk kez bu çalışma ile tanımlanmış ve yeni bir gen dizilimi olarak literatüre sunulmuştur.

Anahtar sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; integron; gen kaseti.

ABSTRACT

The dissemination of antibiotic resistance genes between bacteria leads to serious problems in the treatment of infectious diseases. It has been shown that resistance genes can also be carried by the integrons. There are limited studies regarding the carriage of class 1 and 2 integrons in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in Turkey. The aims of this study were to investigate the carriage rates of class 1 and class 2 integrons in *A.baumannii* and *P.aeruginosa* strains isolated from clinical samples in Abant İzzet Baysal University Hospital, and to characterize the antibiotic resistance gene cassettes in these integrons by sequence analyses. A total of 137 strains (77 *A.baumannii* and 60 *P.aeruginosa*) isolated from various clinical specimens (56% were sputum, 19% wound, 11% urine, 11% blood, 3% catheter), between March 2010–December 2012, were included in the study. The identification and antibiotic susceptibility tests of the isolates were performed by Vitek 2 Compact (bioMérieux, France) and BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, USA) systems. The presence of integrons were screened by PCR method using specific primer pairs targeting class 1 (*intl1*) and 2 (*intl2*) integrase regions. All the samples that revealed integron amplification were subjected to DNA sequence analysis, both in the forms of cloned products and PCR amplicons. In the study, the highest susceptibility rates were found against colistin (96%) and tigecycline (78%) in *A.baumannii*, and against piperacillin/tazobactam (97%) and piperacillin (93%) in *P.aeruginosa* isolates. The highest resistance rate was determined for piperacillin/tazobactam (95%) in *A.baumannii* strains. The presence of *intl1* gene was detected in 33% (26/77) of *A.baumannii* and 10% (6/60) of *P.aeruginosa* isolates. When variable regions in *intl1* positive strains were amplified by PCR, eight (8/77, 10%) *A.baumannii* and three (3/60, 5%) *P.aeruginosa* strains were found to harbor antibiotic resistance gene cassettes. *Intl2* gene was not detected in any of the isolates. Resistance to piperacillin/tazobactam, ceftazidime, cefepime, ceftriaxone and ampicillin/sulbactam was detected as the common resistance pattern in all integron-positive *A.baumannii* strains, whereas resistance to ceftazidime, gentamicin and ciprofloxacin was the common pattern in all integron-positive *P.aeruginosa* strains. DNA sequence analysis of variable regions of integrons indicated that two separate gene cassette arrays (*aacC1-aadA1* and *aac(3)-1*) were carried by *A.baumannii* strains, and two types of gene cassette arrays (*bla_{OXA-30}-aadA1* and *bla_{OXA-11}-cmlA7*) were carried by *P.aeruginosa* strains. To our best knowledge, this is the first report of the gene sequence of *bla_{OXA-11}-cmlA7* defined in an integron gene cassette of *P.aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; integron; gene cassette.

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa ve *Acinetobacter baumannii*, yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere hastane enfeksiyonlarında en sık izole edilen bakteriler olup, tedavilerinde en önemli problem, çoğul dirençli suşların sayısında artış ve bunun sonucunda tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerinde azalmadır¹⁻⁶. Antimikrobiyal ilaç direncinin, bakteriler arasında yayılmasında en etkili mekanizmalardan biri konjugasyondur. Konjugasyonda direnç genlerini taşıyan R-plazmidleri diğer DNA molekülleri gibi, transpozon veya integronları da taşıyabilirler. Transpozon ve integronlar, bir DNA molekülünden diğerine, homolog olmayan bölgelere integre olmak suretiyle transloke olabilen (yer değiştirebilen) DNA elementleridir. Son yıllarda dikkatler, bakterilerde genetik birimlerin transferine, yani mobil gen kasetleri ve integronlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Gen kasetleri, genelde konak hücre DNA'sına integre olmuş gen topluluklarıdır^{7,8}. Antibiyotik direnç integronları terimi ise ilk kez Rowe-Magnus ve arkadaşları⁹ tarafından kullanılmıştır. Direnç genlerini taşıyan plazmidler bakteriler arasında transdüksiyon, transformasyon, konjugasyon ve transpozisyon gibi mekanizmalarla aktarılırlar. Bu rekombinasyon, integron denilen farklı bir DNA ailesi tarafından oluşturulmaktadır. İntegronlar antibiyotik direnç determinantlarını kodlayan, belirli gen kasetlerini entegre etme veya taşıma yeteneğine sahip genetik elemanlardır. Sınıf 1 integronun yapısında bir 5'- ve 3'- korunmuş segment (5'-CS ve 3'-CS) ve bir de değişken bölge vardır. 5'-CS, *intl* geni (integraz) ve eklenen gen(ler)in ekspresyonu için kullanılan bir promoter bölge içerirken, 3'-CS defektif kuaterner amonyum direnç geni *qacED1* ve sülfonamide direnç sağlayan *sull* geni içerir^{10,11}. İki korunmuş bölge arasında bulunan değişken bölge, antibiyotik direnç gen kasetlerinin girmesi için rekombinasyon yeridir. Sınıf 2 integronlar ise dihidrofolat redüktaz gen kaseti içermektedir ve sırasıyla trimetoprim, streptotrisin ve streptomisin/spektinomisine direnç sağlayan *dfra1*, *sat2* ve *aadA1* gibi üç klasik gen kaseti taşımaktadır.

İntegronların tek başlarına hareket yetenekleri yoktur ve aynı zamanda içlerinde bir ya da daha fazla gen kaseti taşıyabilirler. Bir bakteride birden fazla integron bulunabilir; gen kasetlerinin düzeyi ve ekspresyonu, bakteride bulunan integron sayısına ve 5' bölgesinde bulunan promotor bölgesinin aktif olmasına bağlıdır^{12,13}. İntegronlar, plazmid veya transpozonların içerisinde bulduklarından dolayı, bir bakteriden diğerine, hatta integronlar içerisinde yer alan gen kasetleri bir integrondan diğerine geçebilme özelliğine sahiptirler. Bu durum, antibiyotik direnç determinantlarının yayılmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının sınıf 1 ve sınıf 2 integronlar yönünden taranması ve taşıdıkları gen kasetlerinin karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde, Mart 2010-Aralık 2012 tarihleri arasında mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 77 *A.baumannii* ve 60 *P.aeruginosa* suşu dahil edildi. İzolatların tanımlanması ve antibiyogramları Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) ve BD Phoenix 100 (Becton

Dickinson, ABD) otomatize sistemleri kullanılarak yapıldı. Antimikrobiyal duyarlılık deneyleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine uygun olarak değerlendirildi¹⁴. *Acinetobacter* suşlarının tigesiklin ve kolistine duyarlılıkları BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) kriterlerine göre yorumlandı¹⁵.

P.aeruginosa suşları için amikasin (AK), gentamisin (GN), siprofloksasin (CİP), seftazidim (CAZ), piperasilin (PRL), piperasilin-tazobaktam (TZP), aztreonam (ATM), meroopenem (MEM), sefepim (FEP) ve imipenem (İPM) duyarlılığı; *A.baumannii* için AK, GN, CİP, CAZ, TZP, FEP, İPM, tetrasiklin (TE), seftriakson (CRO), sulbaktam/ampisilin (SAM), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT), tobramisin (TOB), kolistin (CT) ve tigesiklin (TGC) duyarlılığı değerlendirildi. Kalite kontrol suşu olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

Total DNA İzolasyonu ve Integrona Özgül Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kalıp DNA eldesi için bakteri suşları 3 ml Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerine (%1 tripton, %0.5 maya ekstraktı, %0.5 NaCl, pH 7.4) inoküle edildi ve 16 saat 37°C'de çalkalamalı inkübatörde üretildi. Kültürün 1.5 ml'si ependorf tüpüne alınarak 10.000 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Çökelti sıvısının üst kısmı atıldı; çökeltideki hücreler 500 µl deiyonize suda çözüldü ve 95°C'de 10 dk ısıtılarak parçalandı. Preparat, 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Üst kısmın 1-3 µl'si PCR'de kalıp DNA olarak kullanıldı¹⁶.

Bütün izolatlar, öncelikle korunmuş sınıf 1 (*int1*) ve sınıf 2 (*int2*) integraz bölgeleri için araştırıldı. Bu amaçla, *int1* için int11F (ACATGTGATGGCGACGCACGA) ve int11R (ATTCTGTCCTGGCTGGCGA); *int2* için int21F (CACGGATATGCGACAAAAAGGT) ve int21R (GTAGCAAACGAGTGACGAAATG) primer çiftleri kullanıldı. *int1* bölgesi için pozitif sonuç alındığında, 5'-CS ileri primeri (GGCATCCAAGCAGCAAG) ve 3'-CS geri primeri (AAGCAGACTTACCTGA) kullanılarak değişken bölgeler çoğaltıldı¹⁰. Standart PCR karışımları 50 µl son hacim olacak şekilde; 1.5 ünite DNA polimeraz I (GoTaq, Promega), 5 µl DNA, 10 µl 5X DNA polimeraz tamponu (Promega), 3 µl 1.5 mM MgCl₂, 5 µl 2 mM her bir dNTP ve 2 µl her bir primer stoğu (25 pmol/µl) ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon koşulları; 5 dk 96°C, 1 dk 55°C, 3 dk 70°C (bir döngü); 15 sn 96°C, 30 sn 55°C, 3 dk 70°C (24 döngü) ve son sentez 5 dk 70°C (bir döngü) olacak şekilde programlandı¹⁰. Amplifikasyon ürünleri %1.4'lük agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi. Integron amplifikasyonunun gerçekleştirildiği tüm örnekler, hem klonlanarak hem de PCR ürünü olarak baz dizisi analizine tabi tutuldu.

Agaroz Jel Elektroforezi ve DNA Klonlama

Plazmidler ve PCR ürünleri agaroz jel elektrofrezinde yürütülerek UV'de görüntülendi. Plazmidler için %1'lik, PCR ürünleri için ise %1.4'lük agaroz jel (0.5 µg/ml etidyum bromür katkılı) kullanıldı. Yürütme, 100V doğru akım altında 45 dakika olarak gerçekleştirildi. Tam integron genleri çoğaltıldı ve üretilen PCR ürünlerinin, pGEM-T klonlama vektörüne ligasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda sağlandı. Ligasyon ürünleri, *E.coli* DH5α kompetan hücrelerine ısı şoku ile transforme edildi. Transformasyon sonrası hücreler ampisilin, IPTG ve X-gal içeren seçici LB agar ekilerek mavi/beyaz koloni oluşumuna bakıldı ve beyaz kolonilerden plazmid izole edilerek pozitif klonlar belirlendi¹⁷. İzole edilen bu plazmidler *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilerek ayrıca doğrulandı. Pozitif

olduğu doğrulanan plazmidleri içeren rekombinant hücreler tekrar çoğaltılarak plazmid DNA saflaştırma kiti kullanılarak DNA dizi analizi için tekrar izole edildi. İzole edilen plazmid DNA örnekleri baz dizisi analizi için MacroGen firmasına (Amsterdam, Hollanda) gönderildi ve hem T7 promotor hem de SP6 bölgelerinden dizi analizi gerçekleştirildi. PCR ürünlerinden de teyit amaçlı dizi analizi yapıldı ve PCR ürünlerinin baz dizisi analizi, değişken bölgeleri çoğaltmak için kullanılan 5'CS ve 3'CS primerleri ile gerçekleştirildi¹⁸. Dizileme sonuçları NCBI biyoinformatik sitesi kullanılarak analiz edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 77 *A.baumannii* suşunun %49.4'ü balgam, %20.8'i yara, %18.2'si kan, %9.1'i idrar ve %2.6'sı kateter örneklerinden; 60 *P.aeruginosa* suşunun ise %62.7'si balgam, %16.9'u yara, %13.6'sı idrar ve %3.4'ü kan örneklerinden izole edilmiştir. İzolatların antibiyotiklere karşı duyarlılık oranları Tablo I'de görülmektedir. Buna göre *A.baumannii* suşlarında en yüksek duyarlılık kolistin (%96.1) ve tigesikline (%78), *P.aeruginosa* suşlarında ise piperasilin-tazobaktam (%96.6) ve piperasiline (%93.2) karşı saptanmıştır (Tablo I).

Tablo I. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Oranları

Antibiyotik	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n= 77)			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n= 60)		
	Duyarlı n (%)	Orta duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Orta duyarlı n (%)	Dirençli n (%)
PRL	-	-	-	56 (93.2)	1 (1.7)	3 (5.1)
TZP	3 (3.9)	1 (1.3)	73 (94.8)	58 (96.6)	0	2 (3.4)
SAM	5 (6.5)	5 (6.5)	67 (87)	-	-	-
CAZ	4 (5.2)	2 (2.6)	71 (92.2)	50 (83.1)	1 (1.7)	9 (15.3)
FEP	6 (7.8)	0	71 (92.2)	52 (86.4)	4 (6.8)	4 (6.8)
CRO	4 (5.2)	1 (1.3)	72 (93.5)	-	-	-
ATM	-	-	-	42 (69.5)	12 (20.3)	6 (10.2)
IPM	13 (16.9)	8 (6.5)	59 (76.6)	50 (83.1)	1 (1.7)	9 (15.3)
MEM	-	-	-	54 (88.1)	1 (1.7)	5 (8.5)
TOB	45 (58.4)	0	32 (41.6)	-	-	-
AK	11 (14.3)	3 (3.9)	63 (81.8)	52 (86.4)	1 (1.7)	7 (11.9)
GN	35 (45.5)	6 (7.8)	36 (46.8)	47 (78)	5 (8.5)	8 (13.6)
SXT	16 (20.8)	2 (2.6)	59 (76.6)	-	-	-
TE	17 (22.1)	8 (10.4)	52 (67.5)	-	-	-
TGC	70 (77.9)	17 (22.1)	0	-	-	-
CiP	5 (6.5)	0	72 (93.5)	49 (81.4)	1 (1.7)	10 (16.9)
CT	74 (96.1)	0	3 (3.9)	-	-	-

AK: Amikasin; ATM: Aztreonam; CAZ: Seflazidim; CiP: Siprofloksasin; CRO: Seftriakson; CT: Kolistin; FEP: Sefepim; GN: Gentamisin; IPM: İmipenem; MEM: Meropenem; PRL: Piperasilin; SAM: Sulbaktam/ampisilin; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; TE: Tetrasiklin; TGC: Tigesiklin; TOB: Tobramisin; TZP: Piperasilin-tazobaktam; (-): Test edilmedi.

A.baumannii suşlarının %33 (26/77)'ünde *int11* geni tespit edilmiş; *int11* pozitif suşlarda değişken bölgeler PCR ile çoğaltıldığında 8 (%30.7) suşun antibiyotik direnç gen kaseti taşıdığı belirlenmiştir. Tüm suşlarda ise %10.1 oranında gen kaseti taşıyan integron saptanmıştır. DNA dizi analizleriyle gen kasetlerinin *aacC1-aadA1* ve *aac(3)-I* diziliminde iki farklı tipte olduğu belirlenmiştir. *aacC1* geni aminoglikozid N(3') asetiltransferaz enzimi kodlamaktadır ve gentamisine direnç sağlamaktadır. *aadA1* geni aminoglikozid adeniltransferaz enzimi kodlamaktadır ve streptomisin/spektinomisine direnç sağlamaktadır. *aac(3)-I* geni ise aminoglikozid 3-N-asetil transferaz enzimini kodlamaktadır ve gentamisin, sisomisin ve fortimisine direnç sağlamaktadır. Yedi *Acinetobacter* suşunun *aacC1-aadA1* dizilimine sahip sınıf 1 integron taşıdığı belirlenirken, bir *Acinetobacter*'in *aac(3)-I* kaseti içeren sınıf 1 integron taşıdığı belirlenmiştir (Tablo II). Tespit edilen sınıf 1 integronların genetik yapıları Şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir. Bakteri suşlarının hiçbirinde *int12* integraza rastlanmamıştır.

P.aeruginosa suşlarının %10 (6/60)'unda *int11* geni belirlenmiş; *int11* pozitif suşlarda değişken bölgeler PCR ile çoğaltıldığında 3 (%50) suşun antibiyotik gen kaseti taşıdığı belirlenmiştir. Tüm suşlarda ise %5 oranında gen kaseti taşıyan integron saptanmıştır. Gen kasetlerinin *bla_{OXA-30}-aadA1* ve *bla_{OXA-11}-cmlA7* diziliminde iki farklı tipte olduğu izlenmiştir. İki örneğin *bla_{OXA-30}-aadA1* dizilimine, bir örneğin *cmlA17-bla_{OXA-11}* dizilimine sahip olduğu saptanmıştır (Tablo II). *bla_{OXA-11}-cmlA7* gen kaset dizilimi yeni bir kombinasyon olup, genetik yapısı Şekil 1'de şematik olarak gösterilmektedir. *bla_{OXA-11}* geni grup 1 okzasilinaz enzimleri, *bla_{OXA-30}* geni ise grup 3 okzasilinaz enzimleri kodlamaktadır ve beta-laktamlara direnç sağlamaktadır. *cmlA7* geni kloramfenikol direnç proteini kodlamaktadır ve kloramfenikole enzimatik olmayan bir yolla direnç sağlamaktadır.

Suşların epidemiyolojik özellikleri Tablo II'de görülmektedir. Üç *Pseudomonas* suşu (P23, P44 ve P60) aynı hastanın farklı zaman ve klinik materyallerinden izole edilmiş, farklı fenotip ve genotipteki etkeni olarak tespit edilmiştir (Tablo II). Örneklerin hiçbirinde *int12* geni saptanmamıştır. İntegron pozitif olan tüm *A.baumannii* suşlarında piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefepim, seftriakson ve ampicilin/sulbaktam antibiyotiklerine karşı, integron pozitif tüm *P.aeruginosa* suşlarında ise seftazidim, gentamisin ve siprofloksasin antibiyotiklerine karşı direnç ortak olarak gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Bakteriler arasında beta-laktamlar, kinolonlar, karbapenemler ve aminoglikozidlere direncin hızlı yayılımı, enfeksiyon hastalıklarında ciddi ve artan bir sorundur. Son çalışmalar direnç genlerinin integronlar ile yayılabileceğini göstermektedir^{1,2}. İntegron gen kasetlerinde çok sayıda farklı direnç genleri bulunabilir. Farklı sınıftan beta-laktamaz genleri (A, B ve D sınıfı) ile aminoglikozid direnç genleri integron gen kasetleri içerisinde bulunabilir. Aminoglikozid modifiye edici enzimlerin (AMEs) üretimi, bakterilere antibiyotiklerin amino ve hidroksil fonksiyonlarını modifiye etme yeteneği kazandırır. Bu yetenek bakterilerin aminoglikozidlere direnç göstermesinin en önemli yoludur. AMEs, aminoglikozid asetiltransferaz (AAC), aminoglikozid adeniltransferaz (AAD), aminoglikozid fosfotransferaz (APH) ve bu enzimlerin izoenzimlerini kapsar¹⁹. Sunulan bu çalışma-

Tablo II. A.baumannii ve P.aeruginosa Susularının Epidemiyolojik Özellikleri

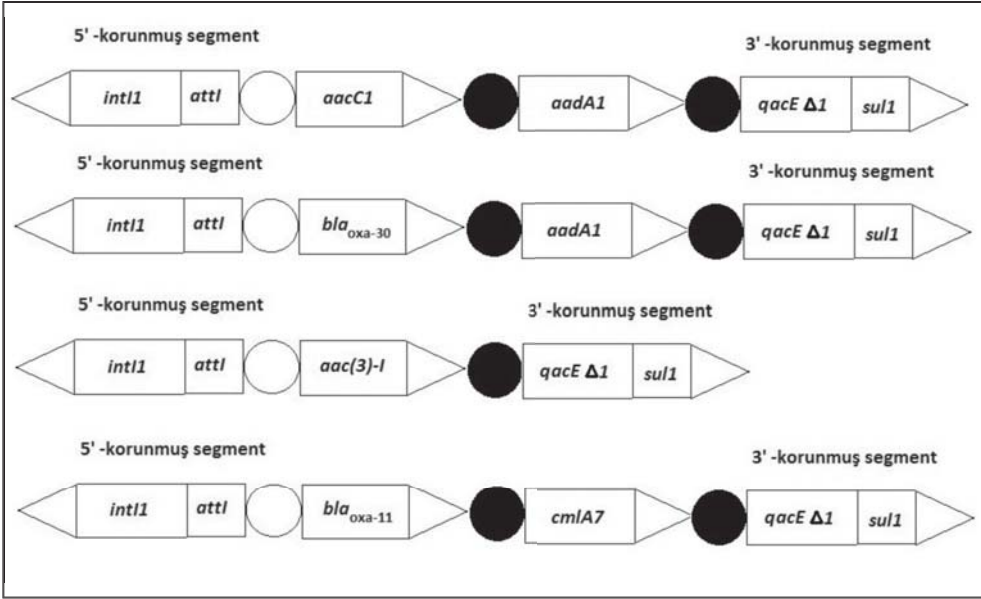
Suş tarihi	İzolasyon tarihi	Hastane ünitesi	Klinik örnek	Antibiyotik direnç paterni	int1	int2	5' - 3' DB	Gen kaseti dizilimi
A16 Ocak 2012	KBB	Yara	Yara	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, GN, TE, İPM, CİP	+	-	+	<i>aacC1-aadA1</i>
A25 Kasım 2010	AR	Yara	Yara	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A39 Eylül 2010	Nöroloji	Balgam	Balgam	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, CİP	+	-	+	<i>aacC1-aadA1</i>
A43 Temmuz 2010	Üroloji	İdrar	İdrar	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, CİP	+	-	+	<i>aacC1-aadA1</i>
A44 Ağustos 2010	Üroloji	Yara	Yara	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, CİP	+	-	+	<i>aacC1-aadA1</i>
A48 Mayıs 2011	KDC	Yara	Yara	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A50 Kasım 2010	AR	Balgam	Balgam	TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A54 Mart 2012	AR	Kan	Kan	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, GN, TE, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A56 Ekim 2010	AR	Balgam	Balgam	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A59 Mart 2012	AR	Balgam	Balgam	TOB, AK, TzP, CAZ, FEP, CRO, SAM, GN, TE, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A62 Ağustos 2010	Üroloji	Yara	Yara	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, GN, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A64 Haziran 2011	İH	Yara	Yara	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A66 Eylül 2010	GC	Yara	Yara	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A67 Mart 2011	AR	Balgam	Balgam	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A70 Nisan 2011	BC	Kan	Kan	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A72 Nisan 2010	Üroloji	İdrar	İdrar	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, İPM, CİP	+	-	+	<i>aacC1-aadA1</i>
A74 Şubat 2011	KDC	Yara	Yara	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A78 Haziran 2012	KDC	Balgam	Balgam	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, CİP	+	-	-	Boş integron
A80 Ocak 2012	AR	Yara	Yara	TOB, AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, İPM, CİP	+	-	+	<i>aacC1-aadA1</i>
A83 Eylül 2011	AR	Kan	Kan	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A85 Ağustos 2011	K	Balgam	Balgam	TOB, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A88 Mart 2011	AR	Kan	Kan	AK, TzP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, İPM, CİP	+	-	+	<i>aacC1-aadA1</i>

Tablo II. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* Suşlarının Epidemiyolojik Özellikleri (Devamı)

Suş	İzolasyon tarihi	Hastane ünitesi	Klinik örnek	Antibiyotik direnç paterni	int1	int2	5' - 3' DB	Gen kaseti dizilimi
A90	Ocak 2012	AR	Kan	TOB, AK, TZP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, İPM, CİP	+	-	+	<i>aac(3)-I</i>
A92	Nisan 2012	Acil	Kan	AK, TZP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A98	Ekim 2010	İH	İdrar	AK, TZP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
A99	Ocak 2012	AR	Kan	AK, TZP, SXT, CAZ, FEP, CRO, SAM, TE, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
P11	Haziran 2012	GH	Balgam	-	+	-	-	Boş integron
P23*	Ocak 2012	Acil	İdrar	MEM, CAZ, GN, İPM, CİP	+	-	-	Boş integron
P44*	Mayıs 2012	Acil	Balgam	CAZ, FEP, GN, İPM, CİP, AK	+	-	+	<i>bla_{OXA-30}-acaA1</i>
P45	Ocak 2012	AR	Balgam	AK, GN, CİP	+	-	-	Boş integron
P49	Temmuz 2012	İH	Balgam	PRL, AK, TZP, ATM, MEM, CAZ, FEP, GN, İPM, CİP	+	-	+	<i>bla_{OXA-30}-acaA1</i>
P60*	Ocak 2012	Nöroloji	Balgam	MEM, CAZ, GN, İPM, CİP	+	-	+	<i>bla_{OXA-11}-cmIA7</i>

*: Aynı kişiye ait suşlar.

A: *A.baumannii*; AK: Amikasin; AR: Anestezi ve reanimasyon; ATM: Aztreonam; BC: Beyin ve sinir cerrahi; CAZ: Siprofloksasin; CRO: Seftriakson; CT: Kolistin; DB: Değişken bölge; EH: Enfeksiyon hastalıkları; FEP: Sefepim; GC: Genel cerrahi; GH: Göğüs hastalıkları; GN: Gentamisin; İH: İç hastalıkları; İPM: İmipenem; K: Kardiyoloji; KBB: Kulak burun boğaz hastalıkları; KDC: Kalp damar cerrahi; MEM: Meropenem; P: *P.aeruginosa*; PRL: Piperasilin; SAM: Sulbaktam/ampisilin; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; TE: Tetrasiklin; TGC: Tigesiklin; TOB: Tobramisin; TZP: Piperasilin-tazobaktam.



Şekil 1. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarında tespit edilen sınıf 1 integronların genetik yapılarının şematik gösterimleri [Siyah daireler integronun 59-baz elemanlarını (rekombinasyon bölgeleri), beyaz daireler ise integraz (*attI*) bölgesini göstermektedir. *qacEΔ1* kuaterner amonyum maddelerine direnç geni, *sul1* ise sülfamidlere direnç genidir].

da, *A.baumannii*'de AAC ve AAD varyantlarının baskın olarak bulunduğu, *P.aeruginosa*'da ise AAD varyantının bulunduğu gösterilmiştir. Her iki türde aminoglikosidaz enzimlerinin üretilmesi, bu türlere ait suşlarda aminoglikozid direncinin nedenini ve aktarılabilmek potansiyelini göstermektedir. Beta-laktamaz genlerinden D sınıfına ait oksasilinaz kodlayan OXA-11 ve OXA 30 alelleri ise sadece *P.aeruginosa*'da integron gen kasetleri içerisinde belirlenmiştir. OXA-tipi beta-laktamazlar oksasilin ve kloksasilini parçalayarak direnç oluştururlar. İki *P.aeruginosa* suşunda OXA-tipi beta-laktamaz kodlayan genlerin integronlar üzerinde bulunması, bu genin *P.aeruginosa* suşundan başka suş veya türlere aktarılmasına aracılık edebilir.

Bakterilerde bulunan *cmI* direnç genleri, kloramfenikol antibiyotiğine karşı direnç oluşturmaktadır. Türkiye'den bildirilen daha önceki bir çalışma, *P.aeruginosa* suşunda *aac(3)-1c-cmIA5* gen diziliminin integron 1 gen kaseti içerisinde olduğunu göstermiştir²⁰. Literatür incelendiğinde, *P.aeruginosa* integron gen kaseti içerisinde bulunan *bla*_{OXA-11}-*cmIA7* gen diziliminin, daha önceden tespit edilemediğini ve ilk kez bu çalışma ile tanımlandığını göstermektedir.

İran'da 50 *A.baumannii* suşu ile yapılan bir çalışmada, integron pozitifliği %88 olarak bulunmuş; integron pozitif 44 örneğin 21'inde sınıf 1, 41'inde ise sınıf 1 ve sınıf 2 integron birlikte çoğaltılmıştır²¹. *A.baumannii* suşlarında integron varlığının araştırıldığı başka bir çalışmada, sınıf I integron pozitifliği %92.5 oranında saptanmış, sınıf 2 integron pozitifliğine rastlanmamıştır²². Ülkemizden yapılan çok merkezli bir çalışmada, Çiçek

ve arkadaşları²³ 281 *A.baumannii* suşundan sadece 18'inde sınıf 1 integron saptanırken, hiçbir suşta sınıf 2 integron tespit etmemişlerdir. Kiddee ve arkadaşları²⁴, *P.aeruginosa* suşlarında yaptıkları integron tarama çalışmalarında, %82 oranında sınıf 1 integron saptamışlar, integron gen kasetlerinde aminoglikozidlere direnç sağlayan birkaç farklı gen tespit etmişlerdir. İzmir'de yapılan bir çalışmada da, 163 gram-negatif bakterinin %52.7'sinde sınıf 1 integron varlığı saptanmış; bu oranlar *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* için sırasıyla %49.3 ve %57.8 olarak belirlenmiş, ancak sınıf 2 integron gen kasetine rastlanmamıştır²⁵. Sınıf 2 integronlar 2009 yılına kadar *Pseudomonas* suşlarında ortaya çıkmamıştır. Çin'deki bir hastanede üç klinik *Pseudomonas* suşunun ilk defa hem sınıf 1 hem de sınıf 2 integron taşıdığı tespit edilmiştir²⁶. Bizim çalışmamızda da 77 *A.baumannii* ve 60 *P.aeruginosa* suşunda, önce *int1* ve *int2* genleri taranmış ve pozitif gözlenen suşların değişik bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. Çalışmamızda tespit edilen yeni gen kaset dizilimindeki *cmIA7* geni her ne kadar klinik kullanımı sınırlı olan kloramfenikole karşı direnç sağlasa da, mobil direnç gen yapılarından olan integronların klinik kullanımdaki birçok antibiyotiğe karşı farklı direnç genlerini kazanarak plazmidlere geçişiyle yayılıma neden olabilecek potansiyelde olduklarını göstermektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde yeni gen kaseti dizilimlerinin ortaya çıkması bakteriyel popülasyonların devamlı antibiyotik baskısına maruz kaldığını ve direnç gelişiminin artan bir şekilde karşımıza çıkacağını göstermektedir.

Toplam örnek sayısı (n= 137) dikkate alındığında *Acinetobacter* suşlarında gen kasetleri taşıyan integron pozitifliği %10.1, *Pseudomonas* suşlarında ise %5 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında hem *A.baumannii* hem de *P.aeruginosa* için integron gen kaseti taşıyıcılık oranı düşük bulunmuştur^{26,27}. Sonuç olarak, ulaşabildiğimiz kadarıyla, *P.aeruginosa* integron gen kaseti içerisinde tanımlanan *bla*_{OXA-11}-*cmIA7* gen dizilimi ilk kez bu çalışma ile tanımlanmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde sınırlı bir koleksiyonda bile yeni gen dizilimlerinin ve kombinasyonlarının belirlenebileceği gözlenmektedir. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarında mobil direnç genlerinden olan integronların bulunması, gelecekteki antimikrobiyal tedavilerin etkinliğine yönelik ciddi bir tehdit oluşturduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla, integron gen kasetlerindeki genlerin antibiyotik direncinin yayılmasına olan etkisinin dikkate alınması ve ülke genelinde çok merkezli takip çalışmalarının yürütülmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa*- a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 2009; 58(9): 1133-48.
2. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect 2009; 73(4): 355-63.
3. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis 2008; 46(8): 1254-63.
4. Yıldırım Mİ, Tuğrul HM. Assessment of efficacies of imipenem, cefoperazon-sulbactam and sefepime in rats with experimental thigh abscess model *Acinetobacter baumannii* strains. Mikrobiyol Bul 2011; 45(3): 422-9.
5. Hosoglu S, Hascuhadar M, Yasar E, Uslu S, Aldudak B. Control of an *Acinetobacter baumannii* outbreak in a neonatal ICU without suspension of service: a devastating outbreak in Diyarbakir, Turkey. Infection 2012; 40(1): 11-8.

6. Asık G. Current approaches to explain the virulence of *Acinetobacter baumannii*. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 371-80.
7. Hall RM. Mobile gen cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol 1995;15(4): 593-600.
8. Fluit AC, Schmitz FJ. Class I integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. Eur J Microbiol Infect Dis 1999; 18(11): 761-70.
9. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. Mol Microbiol 2002; 43(6): 1657-79.
10. Lévesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(1): 185-91.
11. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. J Antimicrob Chemother 1999; 43(1): 1-4.
12. Patridge S, Brown H, Hall R. Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(5): 1288-94.
13. Solberg OD, Ajiboye RM, Riley LW. Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2006; 44(4): 1347-51.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22nd Informational Supplement, M100-S22, 2012. CLSI, Wayne, PA.
15. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing. Version 12 May 2013. Available at: http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013_final.pdf
16. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al (eds). Short Protocols in Molecular Biology. 1995, 2nd ed. John Willey & Sons, New York.
17. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. App Environ Microbiol 2001; 67(1): 22-32.
18. Bunny KL, Ruth, MH, Stokes HW. New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, *aacA7*, and a chloramphenicol resistance gene, *catB3*, in an integron in pBWH301. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(3): 686-93.
19. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Update 2010; 13(6): 151-71.
20. Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksali I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying the IMP-1 metallo-β-lactamase gene in a University Hospital in Turkey. Microb Drug Resist 2007; 13(3): 191-8.
21. Mirnejad R, Mostofi S, Masjedian F. Antibiotic resistance and carriage class 1 and 2 integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Tehran, Iran. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3(2): 140-5.
22. Peymani A, Farajnia S, Nahaei MR, et al. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, Northwest of Iran. Polish J Microbiol 2012; 61(1): 57-60.
23. Çiçek AÇ, Düzgün AÖ, Saral A, et al. Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3(9): 743-7.
24. Kiddee A, Henghiranyawong K, Yimsabai J, Tiloklurs M, Niumsup PR. Nosocomial spread of class 1 integron-carrying extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Thai hospital. Int J Antimicrob Agents 2013; 42(4): 301-6.
25. Erač B, Hoşgör-Limoncu M, Ermertcan Ş, Taşlı H, Aydemir Ş. Prevalence of blaPER-1 and integrons in ceftazidime-resistant gram-negative bacteria at a university hospital in Turkey. Jpn J Infect Dis 2013; 66(2): 146-8.
26. Xu Z, Li L, Shirliff ME, et al. Occurrence and characteristics class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Southern China. J Clin Microbiol 2009; 47(1): 230-4.
27. Gu B, Tong M, Zhao W, et al. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. J Clin Microbiol 2007; 45(1): 241-3.