

**Trabzon Yöresindeki Derelerden İzole Edilen Çoklu
Antibiyotik Dirençli Koliform Bakterilerde Sınıf 1 İntegron
Gen Kasetlerinin Moleküler Epidemiyolojisi**

Proje No: 105T315

Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI
Arş. Gör. Ali SEVİM

MAYIS 2009
RİZE

ÖNSÖZ

“Trabzon Yöresindeki Derelerden İzole Edilen Çoklu Antibiyotik Dirençli Koliform Bakterilerde Sınıf 1 İntegron Gen Kasetlerinin Moleküler Epidemiyolojisi” adlı bu çalışma TÜBİTAK-105T315 nolu projeden sağlanan destekle tamamlanmıştır. TÜBİTAK’a çalışmaya sağladığı desteklerinden dolayı proje ekibi olarak teşekkürlerimizi sunarız.

Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ

Dr. Cemal SANDALLI

Ali SEVİM

Rize, 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Su ve Hayat	2
2.2. Suların Kirlenme Nedenleri ve Kaynakları	2
2.3. Su Kirliliğini Gösteren İndikatör Organizmalar ve Koliform Bakteriler	2
2.4. Çevre Bakterileri ve Antibiyotikler	3
2.5. Bakterileri Arasında Direnç Yayılımı	4
2.6. Antibiyotik Direncinin Transferi ve İntegronlar	4
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	7
3.1. Bakteri Suşları, Rekombinant Suşlar, Standart Suşlar ve Kontrol Plazmitler	7
3.2. Antimikrobiyal Hassasiyet Testleri	7
3.2.1. Disk Difüzyon Testi	7
3.2.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tayini	8
3.3. Transfer Edilebilir Antibiyotik Direnci	8
3.3.1. Konjugasyon	8
3.3.2. Transformasyon	9
3.4. Plazmid DNA ve Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) İçin Toplam DNA İzolasyonu	9
3.5. Oligonükleotid Primer Çiftleri ve PZR'ler	9

3.5.1.	Sınıf 1 İntegron-Spesifik PZR	10
3.5.2.	Tetrasikline Direnç Genlerine Spesifik PZR	10
3.5.3.	Plazmit Aracılı Kinolon Direncinin PZR İle Tayini	11
3.6.	Sınıf 1 İntegron Amplikonlarının Klonlanması	11
3.7.	Sınıf 1 İntegronların DNA Dizi Analizi ve GenBank Giriş Numaraları	11
4.	BULGULAR.....	13
4.1.	Antimikrobiyal Hassasiyet Testi Sonuçları	13
4.2.	Transfer Edilebilir Antibiyotik Direnci	18
4.2.1.	Transfer Edilebilir Ampisilin Direnci	18
4.2.2.	Transfer Edilebilir Tetrasiklin Direnci	20
4.3.	Plazmit DNA Transformasyonları	22
4.3.1.	Ampisiline Direnç Kodlayan Non-Konjugatif Plazmitler	22
4.3.2.	Tetrasikline Direnç Kodlayan Non-Konjugatif Plazmitler	23
4.4.	Suşların Sınıf 1 İntegron Taşıyıcılıkları	24
4.5.	<i>tet</i> Genlerinin PZR İle Tiplendirilmesi	25
4.6.	İntegronların Biyoinformatik Analizi	27
4.7.	İntegron Taşıyan Direnç (R) Plazmitleri	29
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	31
6.	ÖNERİLER.....	37
7.	KAYNAKLAR.....	40
	EKLER.....	47
	PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	59

ÖZET

Bu çalışmada Trabzon'un 10 deresinden izole edilen koliformlardaki antibiyotik direncinin moleküler karakterizasyonu ve sınıf 1 integron gen kaset taşıyıcılığı araştırıldı. Toplam 183 izolatın antimikrobiyal hassasiyet testleri disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemiyle yapıldı. Ampisilin, streptomisin, trimetoprim, tetrasiklin ve kloramfenikole karşı sırasıyla %58, %51.9, %24, %28.4 ve %12.5 oranında dirence rastlandı. On iki (%6.5) farklı filogenetik orijinli koliformda moleküler büyüklükleri 52 ile >147 Kbp arasında değişen kendini transfer edebilen direnç plazmitleri tespit edildi. Ampisilin, tetrasiklin, trimetoprim, streptomisin ve nalidiksik asit dirençleri transfer edilebilen dirençler arasındaydı. Transfer edilebilir nalidiksik asit direncine *qnrS* geni aracılık etti ve Türkiye'de çevre orijinli bakteride gösterilen ilk plazmit aracılı kinolon direnci olarak belirlendi. On dört suşta PZR ile (%7.6) sınıf 1 integron tespit edildi ve bazılarının plazmit üzerinde kodlandığı tespit edildi. Sınıf 1 integronların DNA dizi analizleri integronları *dfrA1*, *dfr2d*, *dfrA7*, *dfrA16*, *dfrA17*, *aadA1*, *aadA5*, *bla_{OXA-30}* gibi gen kasetleri taşıdığını gösterdi. *dfrA16* geni taşıyan bir sınıf 1 integron ilk defa bir *Citrobacter koseri* izolatında bulundu. Tetrasiklin direnci doğal çevrelerde antibiyotik direncinin moniterazizasyonunda kullanılan anahtar bir belirteçtir. Toplam 52 tetrasikline dirençli koliformda PZR ile *tetA*, *tetB* ve *tetC* genleri tarandı ve sekiz suşta (%15.3) *tetA*, on (%19.2) suşta *tetB* ve bir (%1.9) suşta her iki gen tespit edildi. Trabzon'daki derelerin çoğul ilaç dirençli enterik bakterilerin ve çevrede antimikrobiyal direnç determinantları için bir rezervuarı olabileceği kanısındayız. Halk sağlığı açısından gerçek risk direnç genlerinin çevre bakterilerinden insane patojenlerine transferidir.

Anahtar Kelimeler: Dere suları, enterik bakteriler, çoğul antibiyotik direnci, sınıf 1 integron gen kasetleri.

ABSTRACT

In this study, the molecular mechanisms of antibiotic resistance and carriage of class 1 integron in coliforms isolated from ten rivers in northern region of Turkey were investigated. A total of 183 isolates were tested for antimicrobial susceptibility by disk diffusion and agar dilution methods. Resistance to ampicillin, streptomycin, trimethoprim, tetracycline, and chloramphenicol was detected in 58%, 51.9%, 24%, 28.4%, and 12.5%, respectively. Twelve (6.5%) phylogenetically distant organisms were detected to harbor self-transmissible plasmids ranging 52 to >147 kb in sizes. Resistances to ampicillin, tetracycline, trimethoprim, streptomycin, and nalidixic acid were commonly transferable traits. Transferable nalidixic acid-resistant strains harbored *qnrS* gene, which was the first report of plasmid-mediated quinolone resistance in bacteria of environmental origin in Turkey. Fourteen coliforms harbored class 1 integrons, and some of them were located on transferable plasmids. Sequence analyses of variable regions of the class 1 integrons showed that coliforms harbored various gene cassettes, *dfrA1*, *dfr2d*, *dfrA7*, *dfrA16*, *dfrA17*, *aadA1*, *aadA5*, *bla_{OXA-30}*. A gene cassette array, *dfrA16* has been demonstrated for the first time in a *Citrobacter koseri* isolate. Tetracycline resistance has been used as the key determinant to monitor resistance genes in natural environments. A total of 52 tetracycline-resistant enterobacteria were screened for the carriage of *tetA*, *tetB* and *tetC* genes by PCR. We are of the opinion that rivers in Trabzon may act as receptacle for the multi-drug resistant enterobacteria and can serve as reservoirs of the antimicrobial resistance determinants in the environment. The actual risk to public health is the transfer of resistance genes from the environmental bacteria to human pathogens.

Key Words: River waters, enterobacteria, multi-drug antibiotic resistance, class 1 integron gene cassettes.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Farmasötiklerin çevredeki akıbeti	3
Şekil 2. İntegronların genel yapısı	6
Şekil 3. 183 suşda toplam antibiyotik direnç sıklığı	18
Şekil 4. Transkonjugantlardan izole edilmiş, transfer edilebilir ampisilin direnci taşıyan konjugatif plazmidler	20
Şekil 5. Transkonjugantlardan izole edilmiş, transfer edilebilir ampisilin direnci taşıyan konjugatif plazmidler	20
Şekil 6. Transkonjugantlardan izole edilmiş, transfer edilebilir tetrasiklin direnci taşıyan konjugatif plazmidler	21
Şekil 7. Transformantlardan izole edilmiş, ampisiline direnç kodlayan non-konjugatif plazmidler	23
Şekil 8. Transformantlardan izole edilmiş, tetrasikline direnç kodlayan non-konjugatif plazmidler	24
Şekil 9. 5'-CS ve 3'-CS primerleriyle sınıf 1 integronların değişken bölgelerinin PZR amplifikasyonları	24
Şekil 10. Tetrasiklin direnç determinantlarının PZR analizi	26
Şekil 11. Çalışmada belirlenen sınıf 1 integronların şematik gen yapıları ve antibiyotik direnç genlerinin ekspresyon yönleri	29

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. PCR analizlerinde kullanılan primerler ve özellikleri	10
Tablo 2. Antibiyogramlar	13
Tablo 3. Antibiyotiklere dirençli koliform izolat sayıları	17
Tablo 4. Aktarılabılır ampisilin direnci taşıyan suşlar	19
Tablo 5. Tetrasikline direnç kodlayan konjugatif plazmitleri içeren suşlar	21
Tablo 6. Ampisiline direnç kodlayan non-konjugatif plazmitleri içeren suşlar	22
Tablo 7. Tetrasikline direnç kodlayan non-konjugatif plazmitleri içeren suşlar	23
Tablo 8. Sınıf 1 integron taşıyan suşların özellikleri	25
Tablo 9. Sınıf 1 integron taşıyan 14 suşta <i>tet</i> genlerinin tipleri	26
Tablo 10. Sınıf 1 integron içeren suşlar	27
Tablo 11. Sınıf 1 integron taşıyan transformant ve transkonjugantlara karşı bazı antibiyotiklerin MİK değerleri ve plazmitlerinin moleküler özellikleri	30

1. GİRİŞ

Antibiyotik direnci nehirler dahil farklı sucul çevrelerde tanımlanmıştır (ASH ve ark., 2002). Antimikrobiyal maddelerin tıbbi tedavi, ziraat ve hayvan bakımı gibi faaliyetler sonucu çevreye katılmaları bakteri popülasyonları üzerine baskı yapmaktadır (COL ve O'CONNOR, 1987).

Değişik çevrelerde ortaya çıkan çoğul antibiyotik dirençli bakteri suşları önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu durumun genellikle antimikrobiyal ilaç direnç determinantlarının transferi vasıtasıyla meydana geldiği rapor edilmektedir. Bu olaya integron, transpozon veya direnç plazmitleri gibi genetik yapıların aracılık ettiği belirtilmektedir (RECCHIA ve HALL, 1995; CARATTOLI, 2001; ROWE-MAGNUS ve MAZEL, 2002). İntegronlar bölgeye-spesifik rekombinasyon ve bir ekspresyon sistemi içeren genetik yapılardır. Tekli veya gruplar halinde mobil direnç gen kasetlerini entegre edebilme yeteneğindedirler (HALL ve COLLIS, 1995). Bu yapılar kromozomda bulunabilecekleri gibi transpozon ve plazmitlerde de taşınabilmektedir (HALL ve STOKES, 1993).

En sık rapor edilenleri sınıf 1 integronlardır ve koliform bakteriler arasında antibiyotik direncinin yayılmasına katkıda bulundukları belirtilmektedir (FLUIT ve SCHMITZ, 2004). Sınıf 1 integronlar civa direnci transpozonu *Tn21* gibi transpoze olabilen yapılarda gösterilmişlerdir (GRINSTED ve ark., 1990). Sınıf 1 integronlar *Enterobacteriaceae* üyesi klinik izolatlarında (LEVERSTEIN-VAN HALL ve ark., 2001), gıdalardan izole edilen bakterilerde (SUNDE, 2005) ve ayrıca sucul çevrelerden de (ROE ve ark., 2003) izole edilmektedirler, fakat nehir veya dere gibi sucul ortamları araştıran çok sınırlı çalışma (PETERSEN ve ark., 2000; MUKHERJEE ve CHAKRABORTY, 2006) vardır.

Sucul habitatlarda antibiyotik direncinin araştırılması fekal kökenli bakterilerle ilgilidir. Çünkü, bu bakteriler kirlilik göstergesi olarak kullanılırlar ve enfeksiyon hastalıklarıyla yakından ilişkilidirler (JONES ve ark., 1986).

Türkiye'de sucul koliformlarda integronlar ve direnç plazmitleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır (OZGUMUS ve ark., 2007a). Bu çalışmada, sınıf 1 integron ve direnç plazmitleri içeren sucul *Enterobacteriaceae* familyası üyesi bakterilerin çevrede antibiyotik direncinin bir rezervuarı olup olmadığı epidemiyolojik olarak incelenmiştir. Türkiye'nin en zengin doğal içme suyu kaynaklarına sahip kuzey bölgesinde yapılan bu çalışma ile ilk olarak nehirlerden izole edilen enterik bakterilerdeki antibiyotik direncinin moleküler karakterizasyonu detaylandırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Su ve Hayat

Bütün yaşamsal olaylar için gerekli olan suyun, içerisinde zararlı kimyasal maddeleri ve patojen mikroorganizmaları içermeyecek özellikte insanlara sağlanması gerekmektedir. İnsan ve sanayi kuruluşlarının atıklarının uzaklaştırılmasında da sudan yararlanılır. Bunların insanların toplu yaşadığı bölgelerden uzaklaştırılarak zararsız duruma getirilmesi gerekir. Bazı bölgelerde lağım atıkları doğrudan akarsulara, denize, hatta göllere akabilmesi mümkündür. Bu gibi elverişsiz alt yapıya sahip olan bölgelerde yüzeysel ve yeraltı suları kolayca kirlenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın 1999 yılı anlatımına göre, dünyada içme suyu ve yiyeceklere hastalık etkeni mikroorganizmaların bulaşı nedeniyle 5 yaşın altında 2 milyon çocuk yaşamını yitirmektedir (TIBBETS, 2000).

2.2. Suların Kirlenme Nedenleri ve Kaynakları

Su kaynaklarının kirlenmesine neden olan kaynaklar ve etmenler başlıca dört grupta toplanabilir:

1- Sınai atıkların neden olduğu kirlilik: Bir takım sanayi kuruluşlarının atıklarının sebep olduğu kirliliktir (TARCHER, 1991).

2- Kentsel atıkların neden olduğu kirlilik: Kirlenme etkenlerinin başında lağım ve çöpler gelir (GÜLER ve ÇOBANOĞLU, 1994).

3- Tarımsal çalışmaların neden olduğu kirlilik: Kimyasal ve hayvansal gübreler, böceklerle savaşmakta kullanılan bir takım kimyasal zehirler (GÜLER ve ÇOBANOĞLU, 1994).

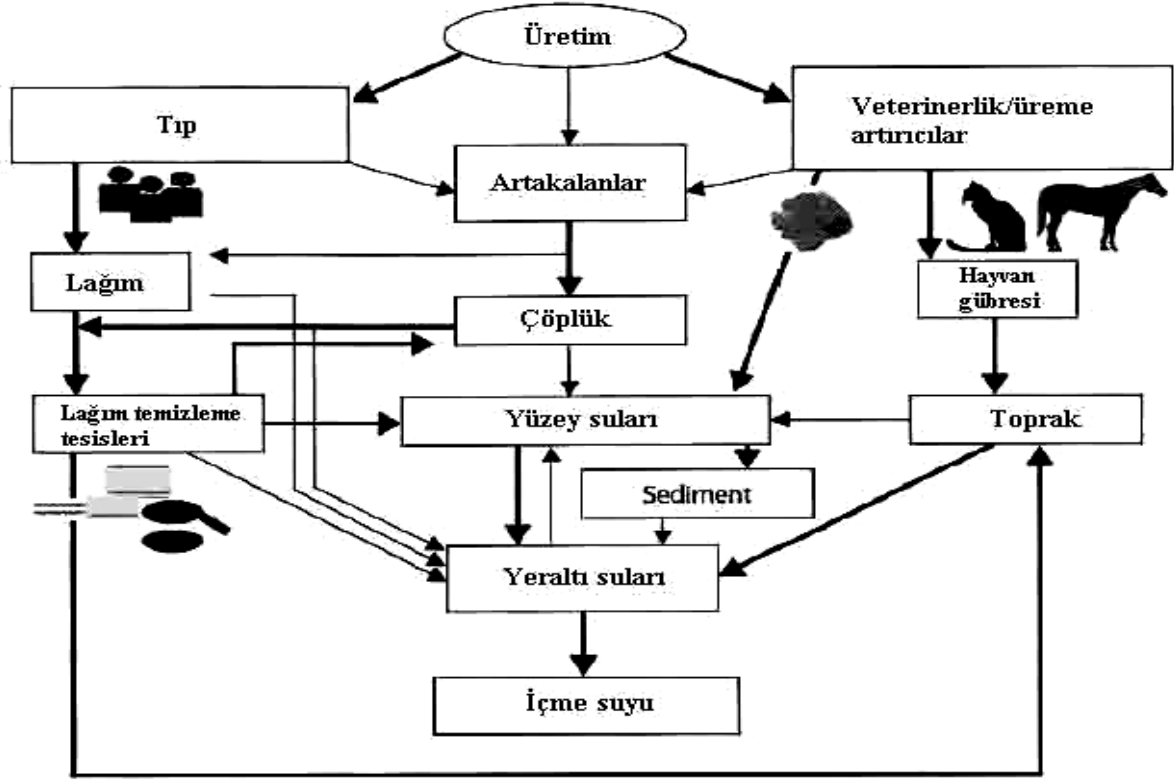
4- Biyolojik kirlilik: Sularda bulunan canlı organizma kirliliğine biyolojik kirlilik denmektedir (GÜLER ve ÇOBANOĞLU, 1994).

2.3. Su Kirliliğini Gösteren İndikatör Organizmalar ve Koliform Bakteriler

Bu organizmalar koliform bakteriler özellikle *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* ve Gram pozitif çomakçık olan *Clostridium perfringes* sporlarıdır. İndikatör organizmalar genelde suların dışkı kirlenmesine uğradığını ve sularda enfeksiyon etkeni olan hastalık oluşturan mikroorganizmaların olası varlığının izi olarak kabul edilir.

2.4. Çevre Bakterileri ve Antibiyotikler

Antibiyotikler doğaya çeşitli yollarla yayılırlar (Şekil 1).



Şekil 1. Farmasötiklerin çevredeki akıbeti (KÜMMERER, 2004).

İnsan ya da hayvanlara verilen antibiyotikler idrar ya da dışkı yoluyla kanalizasyon sistemlerine karışır. Bu antibiyotikler farmakolojik özelliklerine göre ya yapılarını aynen korurlar ya da yıkılarak lağım sularına karışırlar (HALLING-SORENSEN ve ark., 1998). Veterinerlik sahasında veya hayvan yetiştiriciliğinde büyüme artırıcı olarak kullanılan antibiyotiklerin bir kısmı bu hayvanlar tarafından gübre olarak dışarı atılır. Antibiyotikler tarımda da kullanılır. Bu kullanılan antibiyotiklerin bir kısmı kalıntı olarak toprağa geçer ve yeraltı sularına karışır. Bu şekilde lağım, toprağa ve diğer çevresel birimlere karışan antibiyotikler parçalanmazsa veya ortadan kaldırılmazsa yüzey ve yeraltı sularına, dolaylı olarak da içme sularına karışabilirler (RALOFF, 1998). Bu kirlenmeye bağlı olarak özellikle musluk suyundaki antibiyotik yoğunluğu çevredeki antibiyotik direncinin belirlenmesinde odak noktası olmuştur. Musluk suyunda da bu bileşiklerin görülmesinin başlıca nedeni antibiyotiğin suyun işlenmesi sırasında suya bulaşması ve içme suyu sağlanırken meydana gelen kirlenmelerdir (HEBERER ve ark., 1998).

2.5. Çevre Bakterileri Arasında Direnç Yayılımı

Antibiyotik direnci sadece hastalık oluşturan bakterilerde bulunmaz. Karasal ve sucul çevrelerde yaşayan çevre organizmalarında da mevcuttur.

Halk sağlığı için temel tehlike direnç ve hastalık oluşturan genlerinin çevre bakterilerinden insan patojeni bakterilere ve bu patojenlerden de hastalık oluşturmaya aktarılmasıdır. Direnç genlerinin dirençli bakteriler arasında bir ekosistemden diğerine taşındığı birçok araştırmada belgelendirilmiştir. İçme suyu ve banyo suyu, insanlarda dirençli bakterilerin kazanılması için kaynak olarak gösterilebilir (KRUSE, 1999).

Patojen bakteriler arasındaki antibiyotik direncinin yayılması büyük ölçüde konjugatif DNA transferiyle meydana gelmektedir (WATERS, 1999).

2.6. Antibiyotik Direncinin Transferi ve İntegronlar

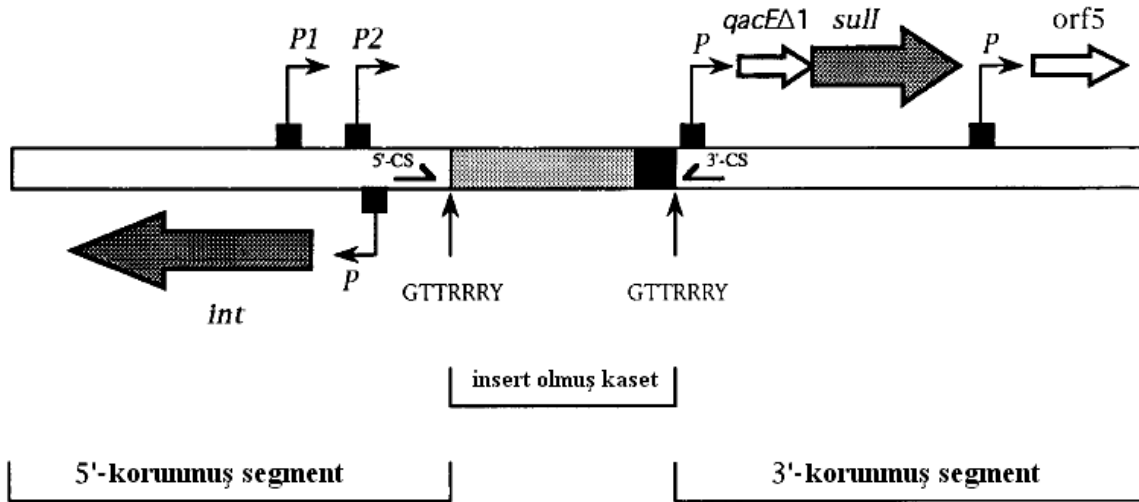
Günümüzde tüm dünyada bir yandan hızla yeni ilaçlar geliştirilmekteyken, öte yandan bunlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonlar bildirilmekte ve sorunun boyutları giderek büyümektedir (COHEN, 1992; TENOVER ve HUGLES, 1996).

Antibiyotik direnci doğal, kazanılmış ve çapraz direnç olarak 3 çeşitte sınıflandırılabilir. Bakteriler, antibiyotiklere doğal olarak dirençli olabilirler. Bu tür direnç bakterinin temel özelliğidir ve ilaç kullanımı ile ilişkisi yoktur. Kromozomal antibiyotik direnci bakteri kromozomunda kendiliğinden oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Kromozom dışı direnç, çeşitli yollarla aktarılan plazmit, transpozon ve integron denilen genetik elemanlara bağlı bir direnç çeşididir.

Plazmitler, bakterilerde antibiyotik uygulamasından da önce var olan ve kromozomdan bağımsız olarak çoğalabilen kromozom dışı DNA segmentleridir. Direnç etkenleri bir veya birkaç antimikrobiyal ilaca ve ağır metallerle karşı direnç genleri taşıyan plazmitlerdir. Plazmit genleri, genellikle ilaçları parçalayan enzimlerin üretilmesinden sorumludurlar. Transpozonlar, bakteri kromozomunun değişik yerlerine yerleşebilen veya kromozomdan plazmite, plazmitten plazmite, plazmitten DNA veya bakteriyofaja aktarılabilen, kendi kendilerini çoğaltamayan, o nedenle kromozomda, plazmitte veya bakteriyofajda bulunan DNA dizileridir. Direnç genlerini taşıyan genetik içeriği ve plazmitler bir bakteriden diğer bakteriye transdüksiyon, transformasyon, konjugasyon ve transpozisyon gibi mekanizmalarla aktarılırlar.

Kromozom veya plazmit üzerindeki direnç genleri, bakterinin bölünmesiyle yavru hücrelere aktarılır ki buna vertikal geçiş denir. Bu gene sahip hücrelerin çoğalması ile de dirençli süşun ve direnç genlerinin yayılımı gerçekleşir. Buna da klonal yayılım denir. Plazmitler konjugasyon ile de horizontal olarak aktarılabirler (BROOKS ve ark., 1995).

Çoğul ilaç dirençli plazmitlerin evolüsyonu genellikle antibiyotik direnç determinantlarının bölgeye spesifik entegrasyonu ile meydana gelmektedir. Bu rekombinasyon, integron denilen farklı bir DNA ailesi tarafından oluşturulmaktadır. İntegronlar antibiyotik direnç determinantlarını kodlayan, belirli gen kasetlerini entgre etme veya taşıma yeteneğine sahip genetik elemanlardır. Plazmitler veya transpozonlar tarafından taşındıklarından dolayı güçlü bir antibiyotik seçici baskısı, antibiyotik direnç determinantlarının taşınmasına ve yayılımına neden olmaktadır (DAVIES, 1994). Sınıf 1 integronun yapısında (Şekil 2) bir 5'- ve 3'- korunmuş segment (5'-CS ve 3'-CS) ve bir de değişken bölge vardır (STOKES ve HALL, 1989; LEVESQUE ve ark., 1995). 5'-korunmuş segment *intI* geni (integraz) ve insert olan gen/genlerin ekspresyonu için kullanılan bir promoter bölgeden oluşur (STOKES ve HALL, 1989). 3'-korunmuş segment defektif kuaterner amonyum direnç geni *quaE1* ve sülfonamide direnç sağlayan *sulI* geni içerir. İki korunmuş bölge arasında bulunan değişken bölge antibiyotik direnç gen kasetlerinin girmesi için rekombinasyon yeridir. Bu yüzden rekombinasyon mekanizmasına katılan ve 59-bp eleman olarak bilinen *attC* geni içerir. Sınıf 1 integronlar Tn21 gibi transpozonlar üzerinde tespit edilmişlerdir ve prototip sayılırlar (GRINSTED ve ark., 1990). Sınıf 2 integronlar Tn7'de bulunmuş olup, dihidrofolat redüktaz gen kaseti içermektedir (FLING ve RICHARDS, 1983; STOKES ve HALL, 1989). Çalışmalar integron yapılarının dünyadaki çeşitli hastanelerdeki infeksiyon etkeni *Enterobacteriaceae* üyesi türlerinde (MARTINEZ-FREIJO ve ark., 1999; LEVERSTEIN-van HALL ve ark., 2001; van LOON ve ark., 2004), non-fermentatif Gram negatif aerob bakterilerde (TURTON ve ark., 2005; FONSECA ve ark., 2005; OZGUMUS ve ark., 2007b) ve genişlemiş-spektrumlu β -laktamaz üreten enterobakterilerde (SOMPOLINSKY ve ark., 2005) sıklıkla ortaya çıktığını ve çoğul antibiyotik direncinden sorumlu olduklarını göstermiştir. Çalışılan integronların çoğu şimdiye kadar antibiyotik direnç genlerinin ortaya çıkma oranına ve yayılımına katkıda bulunan klinik kökenli bakterilerde belirlenmiştir. Fakat sularda (TENNSTEDT ve ark., 2003) ve yiyeceklerde (SINGH ve ark., 2005) bulunan, insan (INFANTE ve ark., 2005) veya hayvan dışkısı kökenli (ABBOTT ve ark., 2005) koliformlardaki sıklığı hakkındaki çalışmalar ise seyrek de olsa son zamanlarda yapılmaktadır.



Şekil 2. İntegronların genel yapısı. Oklar transkripsiyon yönlerini göstermektedir. Farklı promoterlerin (P) yerleşimi ve yönü gösterilmektedir. GTTRRRY, gen kasetlerinin bütünleşmesi için integronun '*croosing-over*' noktasıdır. 59-bp elemanlarıyla birlikte girmiş bir kaset, siyah bar olarak gösterilmektedir (LEVESQUE ve ark., 1995).

Roe ve ark (2003) sulama kanalları ve çöktülerinden izole ettikleri *E. coli*'lerin %13'ünde sınıf 1 integron yapıları göstermişler, çoğul antibiyotik dirençli bu suşlarda dört farklı yapı ve dizide integron gen kasetlerini tespit etmişlerdir. Park ve ark. (2003) Kore'de sucul çevrelerden izole ettikleri koliformlarda yüksek miktarda sulfametoksazol, aminoglikozid ve β -laktam direncine rastlamışlar, suşların %53,6'sının çoğul dirençli olduğunu saptamışlardır. Suşların %24'ünde ise *intI1* genini pozitif bulmuşlardır. Sınıf 1 integron taşıyan bu suşlarda *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA17*, *aaA2*, *aaA5* ve *aad(3')* olmak üzere integronla taşınan yedi farklı antibiyotik direnç geni tespit etmişlerdir. İlginç olarak, Waturangi ve ark. (2003) Endonezya'da doğada serbest yaşayan kertenkele türlerinden izole ettikleri 28 *E. coli* suşunda %75 tetrasikline, %71,4 streptomisine, %67,9 sülfametoksazole, %64,3 ampisiline direnç belirlerken, bu hayvanlardan izole ettikleri *E. coli* suşunda ise PCR'la 2 farklı yapıda sınıf 1 integron varlığı tespit etmişlerdir. DNA dizi analizi sonucu integronlar üzerinde *dfrA*, *dfrA5* ve *aadA1* olmak üzere 3 farklı integrone özel antibiyotik direnç genleri saptamışlardır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bakteri Suşları, Rekombinant Suşlar, Standart Suşlar ve Kontrol Plazmitler

Çalışmada, Trabzon ilinin doğusundaki 10 dereeden bir yıl içinde (Aralık 2003 – Kasım 2004) her ay bir kere alınan dere suyu örneği kültürlerinin fermentasyon gözlenen tüplerinden Eosine Methylene Blue (EMB) agar (Merck, Almanya) plaklarına alt kültürleri yapıp, farklı morfolojideki (koloni tipi, laktoz olumlu veya olumsuz, röfleli veya renkli) enterik bakteri kolonilerinin rasgele alınarak tür tayinleri yapılmış ve –35°C’de %20 gliserol ortamında stoklanmış toplam 183 koliform bakteri suşu kullanıldı. Suşlar, mevcut projenin araştırmacılarından Ali SEVİM’in yüksek lisans tezindeki bakteri koleksiyonundan sağlanmıştır (SEVİM, 2005).

Çalışmada, konjugasyon deneyleri için alıcı hücre olarak *E. coli* K-12 laboratuvar suşu J53-2 [*F⁻ met pro* Rif^r, Prof. Dr. Metin Otkun’dan (Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne) sağlanmıştır] ve antimikrobiyal hassasiyet deneyleri için *E. coli* ATCC 25922 suşu kontrol olarak kullanıldı. Plazmit büyüklüklerinin tahmin edilebilmesi için *E. coli* V517 suşundan (MACRINA ve ark., 1978) izole edilen plazmitler ve Dr. Luca Guardabassi’dan (Department of Veterinary Microbiology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark) sağlanan *E. coli* R39 şusundan izole edilmiş plazmit DNA markörleri kullanıldı. Sınıf 1 integronların tespitinde kullanılan polimeraz zincir reaksiyonlarında (PZR) pozitif kontrol olarak pCEm1 plazmit DNA’sı Prof. Dr. Andreas Schlueter’den (Fakultät für Biologie, Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, Bielefeld, Deutschland) sağlanmıştır.

3.2. Antimikrobiyal Hassasiyet Testleri

3.2.1. Disk Difüzyon Testi

Enterobacteriaceae familyasına ait 183 enterobakteri suşunun (88 *Escherichia coli*, 35 *Klebsiella pneumoniae*, 12 *K. oxytoca*, 23 *Enterobacter* spp., 20 *Citrobacter koserii*, 3 *C. freundii* ve 2 *Proteus vulgaris*) antimikrobiyal duyarlılık testleri *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003a)’de belirtilen standart agar disk difüzyon metodu ile yapıldı ve CLSI kitapçığındaki hassasiyet kriterleri ile karşılaştırılarak yorumlandı. Kullanılan diskler (Oxoid, İngiltere) tetrasiklin (TET), 30 µg; nalidiksik asid (NAL), 30 µg; gentamisin (GEN), 10µg; ofloksasin (OFX), 5 µg; neomisin (NE), 30 µg; netilmisin (NET), 30 µg; kanamisin (KAN), 30 µg; streptomisin (STR), 10 µg; ampisilin (AMP), 10 µg;

amikasin (AMK), 30 µg; trimetoprim (TMP), 5 µg; kloramfenikol (CHL), 30 µg. Bakteriler nütrient agarda (Merck, Almanya) canlandırılıp, titresi 0.5 MacFarland bulanıklığına (yaklaşık $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) ayarlandıktan sonra, dört milimetre kalınlığındaki Mueller-Hinton agar (Merck, Almanya) besiyeri plaklarına yüzeysel ekimleri yapıldı. Diskler yerleştirildikten sonra plaklar 35 C’de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülerek bu antibiyotiklere karşı hassasiyetleri CLSI (2003a) kitap ıındaki kriterlere göre hassas (H), orta hassas (OH) ve dirençli (D) olarak değerlendirildi. Direnç sıklığı hesaplamalarında orta hassas izolatlar hassas olarak kabul edildi.

3.2.2. Minimum Inhibitör Konsantrasyon (M K) Tayini

Antibiyotiklerin (ampisilin, tetrasiklin, trimetoprim, streptomisin, nalidiksik asit, gentamisin ve amikasin) transkonjugant ve transformantlara M K’leri CLSI’da (CLSI, 2003b) belirtilen standart yönteme göre mikrodilüsyon ile yapıldı ve değerlendirildi. Antibiyotiklerin toz halindeki etken maddeleri (Sigma, ABD) ticari firmalardan sağlandı. Üremenin gözlendiği ilk kuyucuktan önceki dilüsyon M K olarak belirlendi.

3.3. Transfer Edilebilir Antibiyotik Direnci

3.3.1. Konjugasyon

Suşların taşıdığı antibiyotik direncinin aktarılabilirli i sıvıda konjugasyon deneyleriyle test edilerek belirlendi (RICE ve ark., 1990). Plazmit aktarım deneylerinde verici hücre olarak, kullanılan antibiyotiklere dirençli enterobakteri izolatları, alıcı hücre olarak *E. coli* K-12 suş J53-2 (F^- *met pro* Rif^r) kullanıldı. Verici ve alıcı hücreler bir gece sallayıcı inkübatörde Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri (%1 tripton, %0.5 maya  z t , %0.5 NaCl, pH 7.4) kullanılarak üretildi. Eřit hacimlerde karıştırıldı ve sallanmadan bir gece inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda konjugasyon karışımının 10^{-3} ve 10^{-4} sulandırımıları 150µg/mL rifampisin (Hoecst, Almanya) + 30µg/mL ampisilin, tetrasiklin, streptomisin, nalidiksik asit, gentamisin, amikasin ve 25µg/mL trimetoprim içeren EMB agara yüzeyel ekimleri yapıldı ve bir gün inkübasyona bırakıldı. Elde edilen transkonjugantların (rifampisine ve kullanılan antimikrobiyala dirençli) antibiyotiklere karşı hassasiyetleri disk difüzyon testi (CLSI, 2003a) ile araştırıldı. Dirençli olduğu antibiyotikler, içerdiği plazmidin o antibiyotiğe karşı direnç determinantlarını kodladığını gösterdi.

3.3.2. Transformasyon

Ampisiline dirençli 137 ve tetrasikline dirençli 52 suşu olmak üzere 189 suşdan total plazmit DNA preparasyonlarının *E. coli* K-12 suşu DH5 α (*RecA*⁻) ile yapılan plazmit DNA transformasyonu protokollerde tarif edildiği şekilde soğuk CaCl₂'lü ortamda ısı şoku ile veya kompetan *E. coli* K-12 DH5 α hücrenin kullanıldığı elektroporator (BioRad, ABD) kullanılarak, elektroporasyon yöntemiyle (AUSUBEL ve ark., 1995) yapıldı (AUSUBEL ve ark., 1995).

3.4. Plazmid DNA ve Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) İçin Toplam DNA İzolasyonu

Bakteri suşlarından transkonjugantlarından ve transformantlarından plazmit DNA saflaştırma işlemleri için alkali lizis mini-preparasyon yöntemi (AUSUBEL ve ark., 1995) kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonları için kullanılan kalıp DNA eldesi için bakteri suşları 3 mL LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 20 saat 37° C' de sallayıcı inkübatörde (GFL, Almanya) üretildi. Kültürün 1,5 mL'si Eppendorf tüpüne alınarak 13.000 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Çökelti sıvısının üstü atıldı ve çökelti 500 μ L iyonsuz suda çözüldü. Hücreler 95°C' de 10 dk ısıtılarak parçalandı. Dipteki artık, 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Üst kısmın 1 μ L'si PCR' da kalıp DNA kaynağı olarak kullanıldı.

3.5. Oligonükleotid Primer Çiftleri ve PZR'ler

Sınıf 1 integronların ve tetrasikline karşı direnç determinantlarının belirlenmesinde kullanılan primerler Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. PCR analizlerinde kullanılan primerler ve özellikleri.

Primer	Hedef Gen	DNA dizisi	Referans
5'-CS	Sınıf 1 integron	5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3'	Levesque ve ark.
3'-CS	değişken bölge	5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'	(1995)
tet(A)-1	<i>tetA</i> geni	5'-GTAATTCTGAGCACTGTCGC-3'	Aarestrup ve ark.
tet(A)-2		5'-CTGCCTGGACAACATTGCTT-3'	
tet(B)-1	<i>tetB</i> geni	5'-CTCAGTATTCCAAGCCTTTG-3'	Aarestrup ve ark.
tet(B)-2		5'-ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG-3'	
tet(C)-1	<i>tetC</i> geni	5'-GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC-3'	Aarestrup ve ark.
tet(C)-2		5'-CCTCTTGCGGGAATCGTCC-3'	
qnrA-1A	<i>qnrA</i> geni	5'-TTCAGCAAGAGGATTTCTCA-3'	Wu ve ark.
qnrA-1B		5'-GGCAGCACTATTACTCCCAA-3'	
qnrB-CS-1A	<i>qnrB</i> geni	5'-CCTGAGCGGCACTGAATTTAT-3'	Wu ve ark.
qnrB-CS-1B		5'-GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA-3'	
qnrS-1A	<i>qnrS</i> geni	5'-CAATCATACATATCGGCACC-3'	Wu ve ark.
qnrS-1B		5'-TCAGGATAAACAACAATACCC-3'	

3.5.1. Sınıf 1 İntegron-Spesifik PZR

Sınıf 1 integronların PZR tanımlanmasında kullanılan oligonükleotidler Tablo 1’de gösterilmektedir. Standart PCR’lar 50µL hacimde yapıldı. Beş mikro-litre 10 x PCR tamponu (100mM Tris-HCl (pH 8.8), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, %1 Triton X-100), 5µL 10 x deoksiniükleotid trifosfat karışımı (her biri 2mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 2µL her bir primer kaynağı (25pmol/µL) (5'-CS/3'-CS), 34µL arınık iyonsuz su, 1µL *Taq* DNA polimeraz ve 1µL kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Çoğaltım için döngü koşulları: 5 dk 94°C, 1 dk 55°C, 3 dk 72 °C (bir döngü); 15 sn 94°C, 30 sn 55°C, 3 dk 72°C (24 döngü) ve son sentez 5 dk 72 °C (bir döngü) (SUSAN ve HILARY-KAY, 1999). PZR ürünleri için % 1 yoğunluğunda olacak şekilde agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırınında çözünmesi sağlandı. Soğuduktan sonra jele 0.5 µg/mL etidiyum bromür ilave edildi. 40 Volt doğru akımda 0,5 – 3 saat yürütüldü. Ultraviyole ışığı altında sınıf 1 integron DNA amplikonları gözlemlendi ve görüntüleme sistemi (UVP, DigiDoc-IT, İngiltere) ile görüntülendi.

3.5.2. Tetrasikline Direnç Genlerine Spesifik PZR

tetA, *tetB* ve *tetC* genleri Tablo 1’de gösterilen tetrasiklin direnç belirleyicilerine özgü primerler kullanılarak PZR ile tarandı. Tepkime oluşumu ve döngü değişkenleri AARESTRUP ve ark. (2003)’nın tanımları ile yapıldı. Standart PZR’ler 50µL hacimde yapıldı. Beş mikro-litre 10 x PZR tamponu (100mM Tris-HCl (pH 8.8), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, %1 Triton X-100), 5µL 10 x deoksiniükleotid trifosfat karışımı (her biri 2mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 2µL her bir primer kaynağı (25pmol/µL), 34µL arınık iyonsuz su, 1µL *Taq* DNA polimeraz ve 1µL kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Çoğaltım

için döngü koşulları: 2 dk 94°C, 1 dk 55°C, 3 dk 72 °C (bir döngü); 15 sn 94°C, 30 sn 55°C, 3 dk 72°C (24 döngü) ve son sentez 5 dk 72 °C ve en son olarak 4-10°C’de saklama şeklinde kullanıldı. PZR ürünleri için % 1 yoğunluğunda olacak şekilde agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırınında çözünmesi sağlandı. Soğuduktan sonra jele 0,5 µg/mL etidiyum bromür ilave edildi. 40 Volt doğru akımda 0.5 – 3 saat yürütüldü. Ultraviyole ışığı altında *tet* DNA amplikonları gözlemlendi ve görüntüleme sistemi (UVP, DigiDoc-IT, İngiltere) ile görüntülendi. *tetA* ve *tetB* spesifik PZR’ler sırasıyla 917 bp ve 375 bp ürün vermektedir.

3.5.3. Plazmit Aracılı Kinolon Direncinin PZR İle Tayini

Kinolon dirençli transkonjugant ve transformantlarda *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genleri Tablo 1’deki primerler kullanılarak tarandı. Standart PZR’ler 50µL hacimde yapıldı. Beş mikro-litre 10 x PZR tamponu (100mM Tris-HCl (pH 8.8), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, %1 Triton X-100), 5µL 10 x deoksinükleotid trifosfat karışımı (her biri 2mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 2µL her bir primer kaynağı (25pmol/µL), 34µL arınık iyonsuz su, 1µL *Taq* DNA polimeraz ve 1µL kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Çoğaltım için döngü koşulları: 2 dk 94°C, 1 dk 55°C (*qnrA* için) veya 1 dk 60°C (*qnrB* ve *qnrS* için), 1 dk 72 °C (34 döngü) ve son sentez 5 dk 72 °C ve en son olarak 4-10°C’de saklama şeklinde kullanıldı.

3.6. Sınıf 1 İntegron Amplikonlarının Klonlanması

Tam integron genlerinin çoğaltıldığı PZR ürünleri, pGEM-T klonlama vektörüne üretici firmanın (Promega, ABD) önerileri doğrultusunda ligasyonu sağlandı ve *E. coli* K-12 JM101 (*recA*⁺) kompetan hücrelerine aktarıldı. Aktarım sonrası hücreler, ampicilin, IPTG (Sigma, ABD) ve X-gal (Sigma, ABD) içeren seçici LB agar ekilerek mavi/beyaz koloni oluşumuna bakıldı ve beyaz kolonilerden plazmit saflaştırılarak pozitif klonlar belirlendi (AUSUBEL ve ark., 1995). İzole edilen bu plazmitler *Eco* RI (NEB, İngiltere) restriksiyon enzimi ile kesilerek ayrıca doğrulandı. Pozitif olduğu doğrulanan plazmitleri içeren rekombinant hücreler tekrar büyütülerek plazmit DNA saflaştırma kiti kullanılarak DNA dizi analizi için tekrar izole edildi.

3.7. Sınıf 1 İntegronların DNA Dizi Analizi ve GenBank Giriş Numaraları

PZR ürünlerinin DNA dizisi için, bu ürünleri içeren, klonlanmış rekombinant plazmitler *MacroGen* (Seul, Kore) firmasına gönderilerek universal primerleri (T7 ve SP6) yardımı ile sekansı belirlendi. Elde edilen dizi verileri daha önceden tanımlanan integronlara ait dizi

verileri ile karşılaştırılarak benzerlik oranları belirlendi. Bu amaçla, *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sitesinde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanımı bedava olan BLAST araştırma programı içindeki ileri QBLAST sistemi, *European Bioinformatics Institute* sitesindeki (<http://www.ebi.ac.uk/>) CLUSTALW, *University of British Columbia Bioinformatics Centre* sitesindeki (<http://bioinformatics.ubc.ca/>) CLUSTALX, vb. programlarından yararlanıldı. Biyoinformatiği yapılan sınıf 1 integron DNA dizileri NCBI sitesi altındaki BankIt: GenBank Submission by WWW (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>) sitesi kullanılarak GenBank'a gönderildi ve biyoinformatik verilerin hemen serbest bırakılması istendi. Bütün alınan GenBank giriş numaraları ve bilgileri raporun "EKLER" bölümünde verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Antimikrobiyal Hassasiyet Testi Sonuçları

İdentifikasyonları yapılan *Enterobacteriaceae* familyasına ait 183 suşun 12 farklı grup antimikrobiyal maddelere karşı hassasiyetleri hassas (H), orta hassas (OH) ve dirençli (D) olarak Tablo 2’de gösterilmektedir (SEVİM, 2005). Direnç sıklığı hesaplamalarında orta hassas izolatlar hassas olarak kabul edildi.

Tablo 2. Antibiyogramlar.

İzolat No	Tür	TET	NAL	GEN	OFX	NE	NET	KAN	STR	CHL	AMP	AMK	TMP
KD1	EN	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	H	D	H	OH
KD2	EC	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD3	CK	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD4	CK	D	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD5	EN	H	OH	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD6	EC	H	H	H	H	OH	H	OH	H	H	D	H	OH
KD7	KP	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	OH
KD8	EC	D	H	H	H	OH	H	H	D	D	D	H	D
KD9	EC	D	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	D
KD10	CK	D	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD11	EN	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD12	EC	D	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD13	CK	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	OH
KD14	EC	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD15	EN	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	OH	OH
KD16	EC	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD17	EC	D	H	H	H	OH	H	H	D	H	D	OH	OH
KD18	CF	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	OH	H	H
KD19	EC	OH	H	D	H	H	H	D	D	H	H	OH	H
KD20	EN	OH	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	OH	H
KD21	EC	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD22	KP	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD24	EN	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD25	EC	D	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD26	EN	D	H	H	H	H	H	H	OH	H	D	H	D
KD27	EC	D	H	H	H	H	H	H	H	H	D	H	D
KD28	EC	H	H	H	H	H	H	H	H	H	D	H	H
KD29	EN	H	H	H	H	OH	H	OH	H	H	D	H	OH
KD30	EC	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD31	EN	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	OH
KD32	EC	OH	H	D	H	D	H	OH	D	H	OH	D	H
KD33	EN	OH	H	D	H	D	H	OH	H	H	D	H	OH

KD34	EC	OH	H	D	H	D	D	D	D	H	D	D	H
KD35	EC	OH	H	D	H	D	D	D	D	H	D	OH	H
KD36	EC	D	D	D	D	D	D	OH	D	D	D	D	D
KD37	KP	OH	H	H	H	D	H	OH	H	OH	D	OH	OH
KD38	EC	OH	H	D	H	D	D	D	D	H	OH	OH	H
KD39	EC	D	H	D	H	D	D	OH	D	H	D	D	D
KD40	EC	H	H	D	H	D	D	OH	D	H	H	OH	OH
KD41	EC	H	H	H	H	D	D	OH	D	H	H	OH	H
KD42	CK	D	H	D	H	D	D	D	D	H	D	OH	OH
KD43	EC	D	H	D	H	OH	OH	OH	D	H	D	OH	H
KD44	CK	D	H	D	H	OH	H	H	OH	D	D	OH	OH
KD45	EC	OH	H	D	H	D	H	OH	D	H	D	OH	OH
KD46	EC	D	D	D	D	OH	D	D	D	H	D	OH	D
KD47	CK	D	H	D	H	D	H	H	H	H	D	OH	D
KD48	EC	D	D	D	D	D	D	D	D	H	D	OH	D
KD49	EC	OH	H	D	H	D	OH	OH	D	H	D	OH	H
KD50	EC	OH	H	D	H	D	D	OH	D	H	OH	OH	OH
KD51	KP	OH	H	D	H	D	H	OH	D	H	D	OH	D
KD52	EC	OH	H	D	H	D	H	OH	OH	H	H	OH	H
KD53	CK	OH	H	D	H	D	OH	OH	D	H	D	OH	H
KD54	EC	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	OH	D
KD55	EC	D	D	D	H	D	H	D	D	H	D	OH	D
KD55a	KO	D	D	D	H	D	H	D	D	H	D	OH	D
KD57	EN	OH	H	D	H	D	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD58	CK	OH	H	H	H	OH	H	H	D	H	D	H	OH
KD59	EC	OH	H	D	H	D	D	OH	D	H	OH	OH	OH
KD60	EC	OH	H	H	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	D
KD61	CK	OH	H	D	H	OH	H	OH	D	H	D	OH	D
KD62	EC	D	H	D	H	D	OH	OH	D	H	D	H	D
KD63	KP	OH	H	H	H	D	H	OH	D	H	D	OH	OH
KD64	EC	OH	H	D	H	D	OH	OH	D	H	OH	OH	H
KD65	KP	D	H	D	H	D	OH	OH	D	D	D	H	D
KD66	CK	OH	H	D	H	D	OH	OH	D	H	D	OH	H
KD67	KO	OH	H	H	H	D	OH	D	D	H	OH	OH	H
KD68	EC	OH	H	D	H	D	D	D	D	H	D	OH	OH
KD69	EC	H	OH	OH	H	D	OH	OH	D	H	OH	OH	H
KD70	KO	OH	H	H	H	OH	D	OH	D	H	D	OH	D
KD71	EC	OH	H	D	H	OH	H	OH	D	H	D	D	OH
KD72	CK	OH	H	D	H	D	OH	D	D	H	D	D	H
KD73	EC	OH	H	D	H	D	D	OH	D	H	D	D	OH
KD74	EC	OH	H	D	H	D	H	OH	D	H	D	OH	H
KD75	EC	H	H	D	H	D	D	OH	D	H	OH	OH	OH
KD76	KP	OH	H	D	H	D	D	D	D	H	D	OH	OH
KD77	KP	OH	H	D	OH	OH	H	D	H	H	D	OH	D
KD78	EC	H	H	D	H	D	OH	OH	D	H	H	OH	OH
KD79	EC	H	H	D	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD80	CK	H	H	D	H	D	D	OH	D	H	OH	OH	H
KD81	EC	D	H	D	H	D	OH	D	D	H	D	OH	OH
KD82	EC	OH	H	D	H	D	D	OH	D	OH	OH	OH	D

KD83	EC	D	H	D	H	D	H	OH	OH	H	H	OH	D
KD84	KO	D	OH	D	D	D	D	D	D	OH	D	OH	D
KD85	EC	H	H	D	H	D	D	OH	D	H	H	OH	OH
KD86	EC	OH	H	D	H	D	H	H	D	H	OH	OH	H
KD87	EC	OH	H	D	H	D	OH	OH	D	OH	OH	D	OH
KD88	CK	D	H	D	H	D	H	OH	D	H	D	OH	D
KD89	EC	D	D	D	D	D	D	D	D	H	D	OH	OH
KD90	EC	OH	H	D	H	D	D	D	D	H	H	OH	H
KD93	KP	D	OH	D	H	OH	H	H	H	D	D	H	D
KD94	EN	OH	H	D	H	OH	H	H	OH	D	D	OH	D
KD95	CK	D	H	D	H	OH	H	OH	H	H	D	OH	D
KD97	CK	D	D	D	H	OH	H	OH	D	D	D	OH	D
KD98	CK	D	D	D	OH	D	D	D	OH	D	D	H	D
KD99	KP	D	D	D	H	D	D	D	D	D	D	OH	D
KD100	KP	D	D	D	D	D	OH	D	D	H	D	D	OH
KD101	EC	D	OH	OH	H	D	H	D	D	OH	OH	OH	H
KD102	EC	D	H	H	H	D	H	OH	OH	H	OH	OH	H
KD103	EN	H	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD104	EC	D	H	H	H	D	H	OH	D	D	D	OH	H
KD105	KO	H	H	OH	H	OH	OH	OH	D	H	D	OH	H
KD106	KP	H	H	H	H	D	H	OH	D	H	D	OH	H
KD107	EC	OH	H	OH	H	D	H	OH	D	H	D	OH	H
KD108	EC	H	H	OH	H	D	H	OH	D	H	H	H	H
KD109	EC	OH	H	H	H	D	H	OH	D	H	OH	OH	H
KD110	KO	H	H	H	H	OH	H	OH	H	H	D	OH	H
KD111	EC	H	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	H
KD112	EC	H	H	H	H	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	H
KD113	KO	H	H	H	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD114	EN	H	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD115	EC	OH	H	OH	H	D	H	OH	OH	H	H	OH	H
KD116	KP	H	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD117	EC	OH	OH	D	H	D	OH	OH	D	H	D	D	H
KD118	KP	D	H	D	H	OH	H	D	D	H	D	D	H
KD119	EC	H	OH	D	H	D	H	D	D	OH	D	D	H
KD120	KP	OH	H	OH	H	OH	H	OH	D	H	D	OH	H
KD121	EC	D	OH	H	H	OH	H	OH	D	D	D	OH	D
KD122	EC	OH	H	H	H	D	H	OH	OH	OH	H	D	H
KD123	KP	H	H	OH	H	D	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD124	KP	OH	H	H	H	OH	H	OH	H	H	D	OH	H
KD125	EC	H	H	OH	H	D	H	OH	D	H	H	OH	H
KD126	EN	H	H	D	OH	D	D	D	D	H	D	D	H
KD127	EC	H	D	D	OH	D	D	D	D	H	H	D	H
KD128	KP	H	H	H	H	D	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD129	KO	H	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD130	KO	OH	H	H	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD131	CF	D	H	D	H	D	H	D	D	H	H	D	H
KD132	EC	OH	OH	H	H	OH	H	H	H	H	OH	OH	H
KD133	EN	H	H	OH	OH	D	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD134	EC	D	H	D	OH	D	D	D	D	OH	H	D	H

KD135	EN	H	H	H	H	OH	H	OH	D	H	D	OH	H
KD136	EC	OH	H	H	H	OH	H	OH	OH	H	H	OH	H
KD137	EC	H	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	OH	H	H
KD138	KP	H	H	D	H	D	D	D	D	H	D	D	H
KD139	KP	H	H	H	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD140	EC	H	H	H	H	D	H	OH	OH	H	H	OH	H
KD141	EN	H	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD143	KP	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	OH	H
KD144	EN	H	H	OH	H	D	H	OH	OH	H	D	OH	H
KD145	EC	OH	D	D	D	OH	OH	OH	D	H	D	OH	D
KD146	KP	OH	D	D	OH	D	D	D	D	D	D	D	D
KD147	KP	OH	H	D	OH	OH	D	D	D	H	D	D	H
KD148	KO	OH	H	OH	H	OH	D	D	D	D	D	D	D
KD149	EN	D	D	D	OH	D	D	D	D	H	D	D	D
KD150	EC	OH	D	OH	H	D	H	D	OH	H	H	OH	H
KD151	KP	OH	D	OH	H	OH	H	D	OH	H	D	OH	H
KD152	EC	D	D	OH	H	D	H	D	D	H	D	H	H
KD153	CK	D	D	D	OH	D	D	D	D	H	H	D	H
KD154	EN	D	D	D	H	D	D	D	D	D	D	D	H
KD155	EC	H	D	D	H	D	D	D	D	OH	OH	D	D
KD156	KP	H	D	D	H	OH	D	D	D	H	H	H	D
KD157	EN	H	D	H	H	D	H	D	H	H	D	OH	D
KD158	CK	H	D	D	H	OH	D	D	D	H	OH	D	D
KD159	EN	H	H	D	H	OH	D	D	D	H	H	D	H
KD160	EC	OH	OH	D	H	D	OH	D	D	H	D	D	H
KD161	KP	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD162	EC	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	OH	H	D
KD163	KO	H	H	H	H	OH	H	H	OH	H	D	H	H
KD164	EC	H	H	H	H	OH	D	H	H	H	H	OH	H
KD165	KP	H	H	H	H	OH	H	OH	OH	H	H	D	H
KD166	CF	D	H	H	H	H	H	H	H	OH	H	H	OH
KD167	EC	D	H	H	H	OH	H	H	H	D	D	H	H
KD169	KP	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	H	D	H
KD170	EC	OH	H	OH	H	D	OH	OH	D	D	D	OH	D
KD171	PV	D	D	D	D	D	OH	D	D	D	D	D	D
KD174	EC	D	H	H	H	OH	H	OH	D	D	D	OH	D
KD175	KP	D	H	OH	H	D	H	H	D	D	D	D	D
KD176	CK	D	H	D	H	D	D	D	D	D	H	D	D
KD177	EC	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	H	H	H
KD178	KP	H	H	H	H	OH	H	OH	H	H	D	H	H
KD179	KP	H	OH	H	H	OH	H	OH	H	H	D	H	H
KD180	EC	OH	H	H	H	OH	H	H	H	H	H	H	H
KD181	KP	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	D
KD182	KP	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	D
KD183	EC	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	H	H	H
KD184	EC	H	H	OH	OH	OH	D	D	OH	H	D	H	H
KD185	KO	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	D	H	H
KD186	EC	H	H	H	H	OH	OH	H	OH	H	H	D	H
KD187	KP	D	H	H	H	OH	H	OH	D	H	D	H	D

KD188	EC	H	H	H	H	OH	H	H	H	H	OH	H	H
KD189	EC	D	D	H	H	H	H	OH	D	D	D	H	D
KD190	KP	H	H	D	H	D	D	OH	D	H	D	D	H
KD191	PV	D	H	H	H	OH	H	H	H	D	D	H	D

EC: *Escherichia coli*, KP: *Klebsiella pneumoniae*, KO: *Klebsiella oxytoca*, EN: *Enterobacter* spp., CK: *Citrobacter koseri*, CF: *Citrobacter freundii*, PV: *Proteus vulgaris*, TET: Tetrasiklin, NAL: Nalidiksik asit, GEN: Gentamisin, OFX: Ofloksasin, NE: Neomisin, NET: Netilmisin, KAN: Kanamisin, STR: Streptomisin, CHL: Kloramfenikol, AMP: Ampisilin, AMK: Amikasin, TMP: Trimetoprim. H: Hassas, OH: Orta hassas, D: Dirençli.

Çalışmada, 183 suşun antibiyotiklere direnç oranları tespit edilmiştir. Tablo 3’de antibiyotiklere dirençli suş sayısı görülmektedir.

Tablo 3. Antibiyotiklere dirençli koliform izolat sayıları.

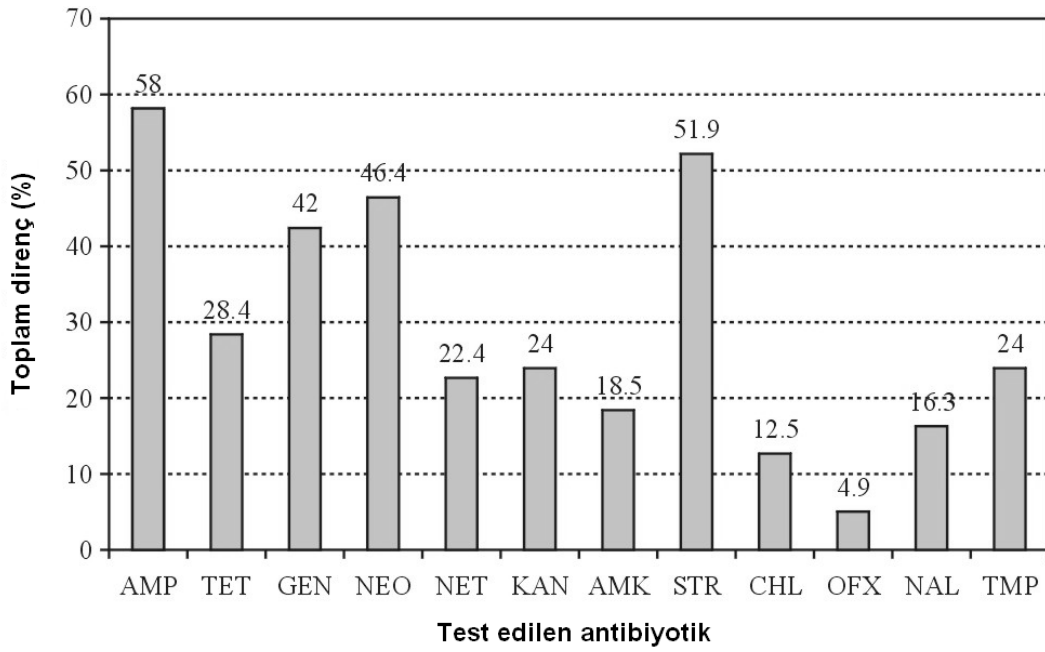
Tür*	Sayı (n)	Antibiyotiklere** Dirençli Suşların Sayısı (n)											
		AMP	TET	GEN	NE	NET	KAN	AMK	STR	CHL	OFX	NAL	TMP
EC	88	47	25	40	50	24	18	16	53	9	6	17	18
KP	35	35***	7	13	14	7	10	7	16	5	1	5	9
KO	12	12***	2	2	4	3	4	1	6	1	1	1	4
EN	23	23***	3	7	8	4	5	4	5	2	0	2	3
CK	20	17	11	13	9	5	5	4	13	4	0	4	8
CF	3	0	2	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
PV	2	2	2	1	1	0	1	1	1	2	1	1	2
Toplam (N)	183	66	52	77	85	41	44	34	95	23	9	30	44

*EC: *Escherichia coli*, KP: *Klebsiella pneumoniae*, KO: *Klebsiella oxytoca*, EN: *Enterobacter* spp., CK: *Citrobacter koseri*, CF: *Citrobacter freundii*, PV: *Proteus vulgaris*,

** Kısaltmalar için Tablo 2’nin dipnotuna bakınız.

*** Doğal (*intrinsic*) dirençli olduklarından, ampisiline direnç oranı belirlenirken hesaba katılmadı.

Ampisiline karşı direnç oranı hesaplanırken ampisiline doğal olarak (*intrinsic*) dirençli olan *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *Enterobacter* spp. suşları dikkate alınmamıştır (Tablo 3). Dolayısıyla direnç yüzdesi *E. coli*, *Citrobacter* spp.ve *Proteus* spp. suşlarının toplam sayısı (N=66) kullanılarak belirlenmiştir. En yüksek direnç oranı % 58 ile β -laktam grubundaki ampisiline karşı belirlenmiştir. Diğer direnç dağılımı aminoglikozidler arasında % 51,9 streptomisine, % 46,4 neomisine, % 42 gentamisine, % 22,4 netilmisine, % 18,5 amikasine ve % 24 kanamisine karşı direnç gözlenmiştir. Tetrasiklinlerden % 28,4 tetrasikline direnç gözlenirken, farklı bir antibiyotik grubu olarak % 24 oranında trimetoprime direnç saptanmıştır. Kinolon grubunda % 16,3 nalidiksik aside ve % 4,9 oranla ofloksasine karşı direnç tespit edilmiştir. Kloramfenikole karşı ise % 12,5 oranında direnç tespit edilmiştir. Şekil 3’de suşların antibiyotiklere karşı toplam direnç oranları görülmektedir. On (% 5,4) suş (KD18, KD111, KD112, KD132, KD136, KD137, KD177, KD180, KD183 ve KD188) testlerde kullanılan bütün antibiyotiklere hassas bulundu (Tablo 2).



Şekil 3. 183 suşda toplam antibiyotik direnç sıklığı. Kısaltmalar için Tablo 2'nin dipnotuna bakınız.

Suşların %57,9'u (106 suş) 3 ve daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli olarak belirlendi. Bu suşlar çoğul ilaç dirençli olarak nitelendirildi.

4.2. Transfer Edilebilir Antibiyotik Direnci

4.2.1. Transfer Edilebilir Ampisilin Direnci

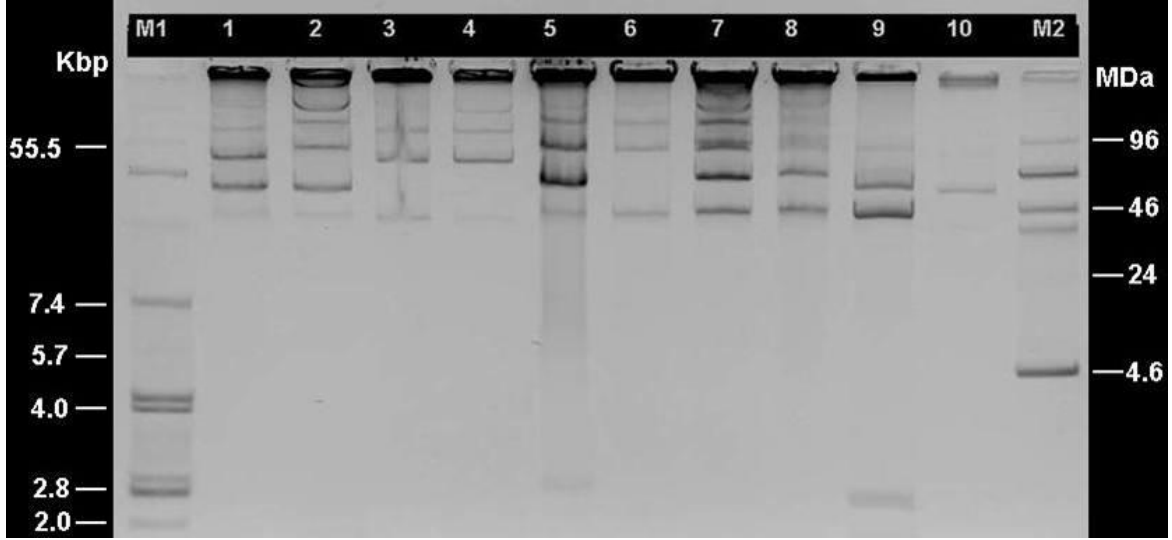
Yüzotuz yedi ampisiline dirençli suşun (*Klebsiella* spp. ve *Enterobacter* spp. dahil) ve verici olarak kullanıldığı konjugasyon deneylerinde 10 farklı transkonjugant elde edildi. Böylece 10 suшта transfer edilebilir ampisilin direnci olduğu belirlendi. Bunun yanında beraber transfer edilen (*co-transfer*) antibiyotik dirençleri de tespit edildi. Sonuçlar Tablo 4'te gösterilmiştir. Ayrıca transkonjugantlardan (R^+ suşlar) izole edilen, moleküler büyüklükleri 40Kbp ile >150 Kbp (1000 MDa = ~1500 Kbp) arasında değişen konjugatif plazmidler, orijinal suşların taşıdıklarıyla karşılaştırmalı olarak Şekil 4 ve 5' de açıkça görülmektedir.

Tablo 4. Aktarılabılır ampisilin direnci taşıyan suşlar.

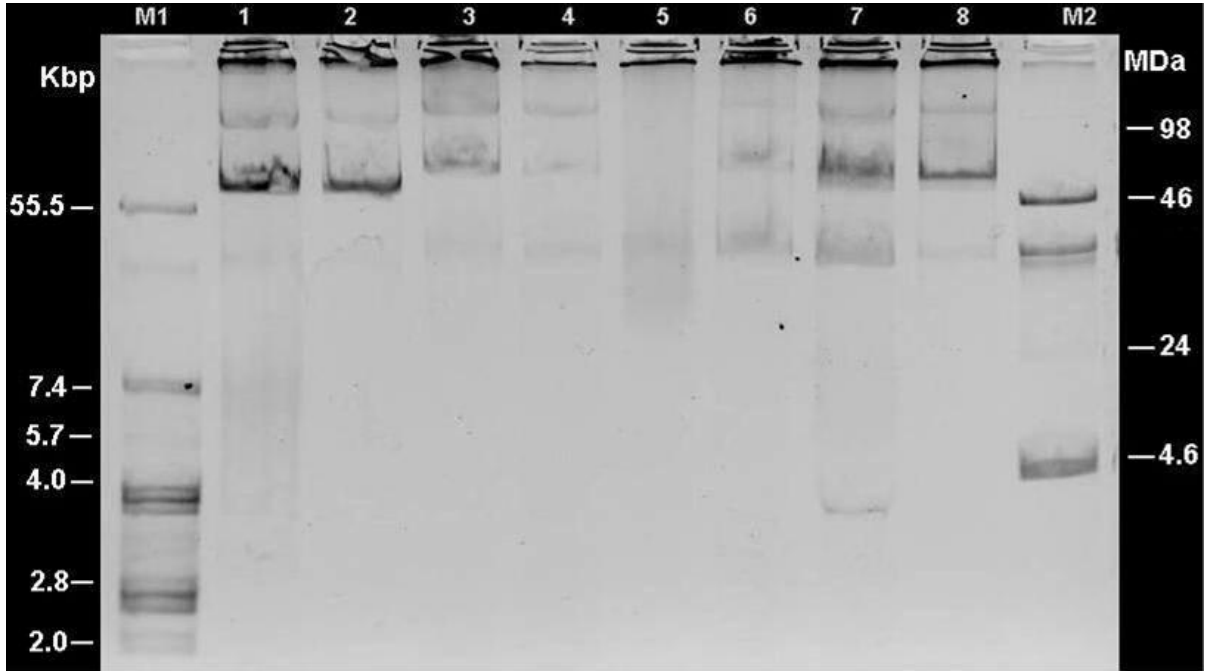
Suş	Tür	Direnç fenotipi*
KD 17	<i>Escherichia coli</i>	TET, STR, AMP
KD 18	<i>Citrobacter freundii</i>	AMP
KD 42	<i>Citrobacter koserii</i>	TET, GEN, NE, NET, KAN, STR, AMP
KD 48	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP , TMP
KD 55	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, NE, KAN, STR, AMP , TMP
KD 60	<i>Escherichia coli</i>	AMP , TMP
KD 66	<i>Citrobacter koserii</i>	GEN, NE, STR, AMP
KD 73	<i>Escherichia coli</i>	GEN, NE, NET, AMP , STR , AMK
KD 84	<i>Klebsiella oxytoca</i>	TET , GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP , TMP
KD 171	<i>Proteus vulgaris</i>	TET, NAL, OFX, NE, KAN, STR, CHL, AMP , AMK, TMP

* Bold işaretli olanlar direncinin aktarılabılır olduğunu göstermektedir. Kısaltmalar için Tablo 2'nin dipnotuna bakınız.

Ampisiline direnç, suşlardaki β -laktamaz enzimi üretiminin bir göstergesidir. Kromozomal veya plazmit aracılı olan bu enzimleri kodlayan genlerin antibiyotik baskısı altında nokta mutasyonlarıyla kısa zamanda evolusyona uğradığı, sonuçta substrat aralığının genişlediği bilinmektedir (genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar). Bu da β -laktam grubu antibiyotiklerin klinik kullanımlarını ciddi ölçüde kısıtlamaktadır. Sınıf A tipi β -laktamazlar olarak bilinen plazmit aracılı enzimler genellikle klinik orijinli bakterilerde sıklıkla rastlanmaktadır ve aminoglikozid, tetrasiklin, trimetoprim veya kloramfenikol gibi başka antibiyotik gruplarına karşı direnç determinantlarını da beraberinde taşıdığı (*co-transfer*) bilinmektedir.



Şekil 4. Transkonjugantlardan izole edilmiş, transfer edilebilir ampisilin direnci taşıyan konjugatif plazmidler. M1, *E. coli* V517 (Plazmit marker [Kbp]); 1, KD84; 2, R⁺(KD84); 3, KD171; 4, R⁺(KD171); 5, KD18; 6, R⁺(KD18); 7, KD73; 8, R⁺(KD73); 9, KD42; 10, R⁺(KD42); M2, *E. coli* R39 (Plazmit marker [MDa]).



Şekil 5. Transkonjugantlardan izole edilmiş, transfer edilebilir ampisilin direnci taşıyan konjugatif plazmidler. M1, *E. coli* V517 (Plazmit marker [Kbp]); 1, KD66; 2, R⁺(KD66); 3, KD17; 4, R⁺(KD17); 5, KD48; 6, R⁺(KD48); 7, KD60; 8, R⁺(KD60); M2, *E. coli* R39 (Plazmit marker [MDa]).

4.2.2. Transfer Edilebilir Tetrasiklin Direnci

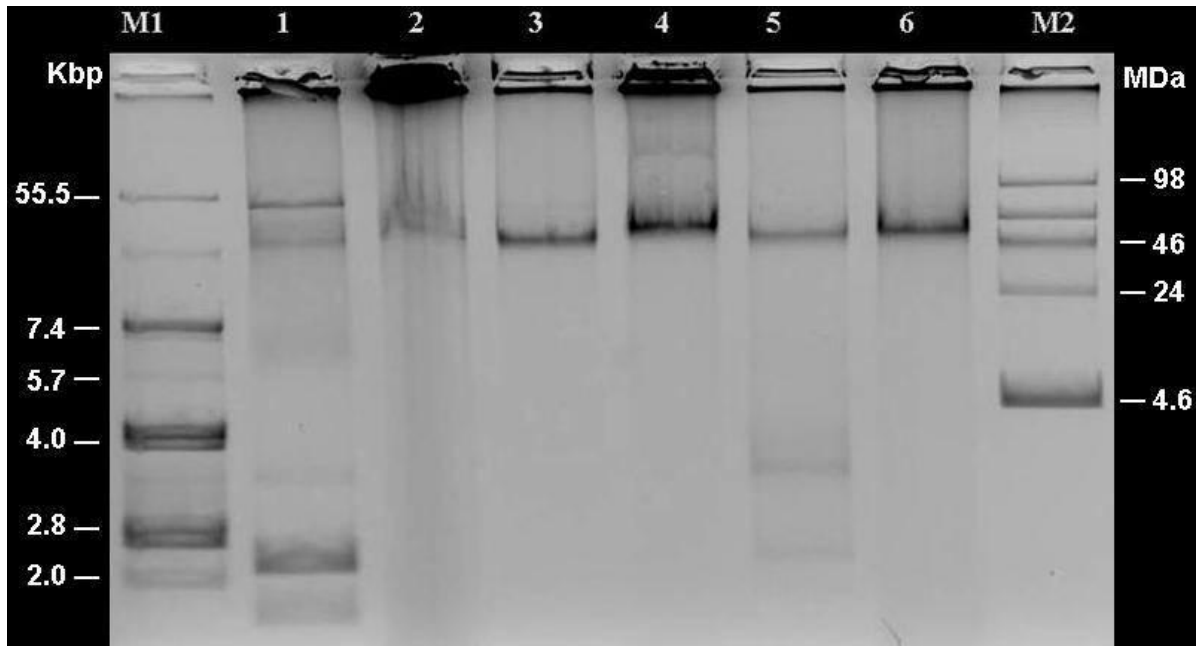
Elli iki tetrasikline dirençli suşun olarak verici olarak kullanıldığı konjugasyon testi sonucunda 9 suşun aktarılabılır tetrasiklin direnci taşıdığı belirlenmiştir. Böylece 9 suşun

tetrasikline karşı aktarılabılır dirence sahip olduğu belirlendi. Bunun yanında beraber transfer edilen (*co-transfer*) antibiyotik dirençleri de tespit edildi. Sonuçlar Tablo 5’te gösterilmiştir. Ayrıca transkonjugantlardan izole edilen, moleküler büyüklükleri 50 Kbp ile >150 Kbp arasında değişen konjugatif plazmidler (R⁺ suşlar), orijinal suşların taşıdıklarıyla karşılaştırmalı olarak Şekil 6’da açıkça görülmektedir.

Tablo 5. Tetrasikline direnç kodlayan konjugatif plazmitleri içeren suşlar.

Suş	Tür	Direnç fenotipi*
KD 8	<i>Escherichia coli</i>	TET , STR, CHL, AMP , TMP
KD 39	<i>Escherichia coli</i>	TET , GEN, NE, NET, STR, AMP , TMP, AMK
KD 42	<i>Citrobacter koserii</i>	TET , GEN, NE, NET, KAN, STR, AMP
KD 84	<i>Klebsiella oxytoca</i>	TET , GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP , TMP

* Bold işaretli olanlar direncinin aktarılabılır olduğunu göstermektedir. Kısaltmalar için Tablo 2’nin dipnotuna bakınız.



Şekil 6. Transkonjugantlardan izole edilmiş, transfer edilebilir tetrasiklin direnci taşıyan konjugatif plazmidler. M1, *E. coli* V517 (Plazmit marker [Kbp]); 1, KD42; 2, R⁺(KD42); 3, KD84; 4, R⁺(KD84); 5, KD88; 6, R⁺(KD88); M2, *E. coli* R39 (Plazmit marker [MDa]).

4.3. Plazmit DNA Transformasyonları

4.3.1. Ampisiline Direnç Kodlayan Non-Konjugatif Plazmitler

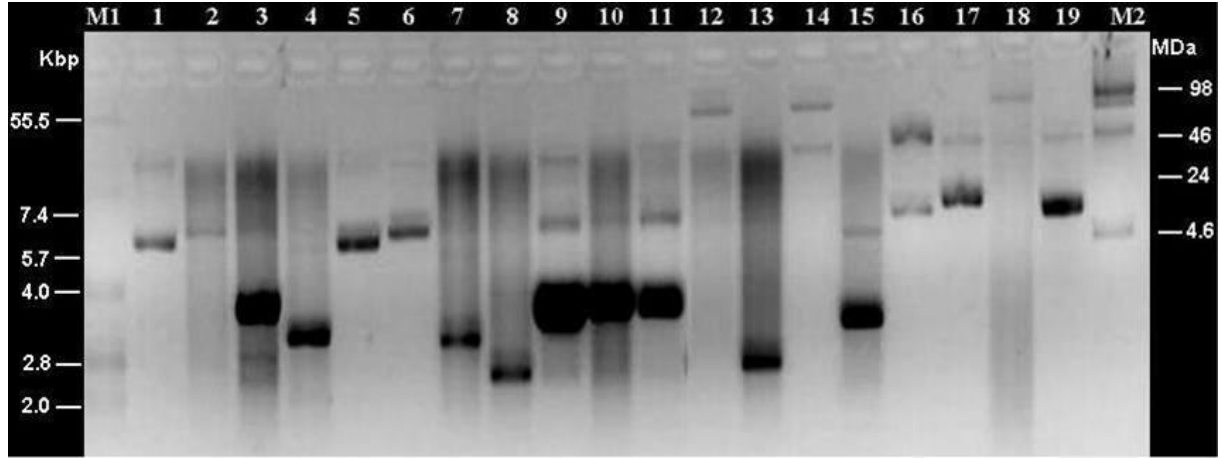
Ampisiline dirençli 137 suşdan saflaştırılan toplam plazmit preparasyonlarının *E. coli* suşu DH5α ile yapılan plazmit DNA transformasyonu sonucunda 19 transformant elde edildi. Bu da 19 suşun ampisiline direnç kodlayan non-konjugatif plazmitler içerdiğini gösterdi. Elde

edilen R⁺ transformantların test edilen antibiyotiklere karşı hassasiyetleri disk difüzyon testi ile araştırıldı. Dirençli olduğu antibiyotikler içerdiği plazmidin o antibiyotiğe karşı direnç determinantlarını kodladığını gösterdi. Sonuçlar Tablo 6’da gösterilmiştir. Ampisiline dirençli suşların taşıdığı, moleküler büyüklükleri 2 Kbp ile 10 Kbp arasındaki farklı non-konjugatif direnç plazmitleri (R⁺) Şekil 7’de görülmektedir.

Tablo 6. Ampisiline direnç kodlayan non-konjugatif plazmitleri içeren suşlar.

Suş kodu	Tür ismi	Direnç fenotipi*
KD 5	<i>Enterobacter</i> spp.	AMP
KD 9	<i>Escherichia coli</i>	TET, AMP, TMP
KD 16	<i>Escherichia coli</i>	AMP
KD 21	<i>Escherichia coli</i>	AMP
KD 34	<i>Escherichia coli</i>	GEN, NE, NET, KAN, STR, AMP, AMK
KD 36	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, STR, CHL, AMP, AMK, TMP
KD 39	<i>Escherichia coli</i>	TET, GEN, NE, NET, STR, AMP, TMP
KD 70	<i>Klebsiella oxytoca</i>	NET, STR, AMP, TMP
KD 74	<i>Escherichia coli</i>	GEN, NE, STR, AMP
KD 94	<i>Enterobacter</i> spp.	GEN, CHL, AMP, TMP
KD 95	<i>Citrobacter koserii</i>	TET, GEN, AMP, TMP
KD 100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, KAN, STR, AMP, AMK
KD 104	<i>Escherichia coli</i>	TET, NE, STR, CHL, AMP
KD 106	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NE, STR, AMP
KD 145	<i>Escherichia coli</i>	NAL, GEN, OFX, STR, AMP, TMP
KD 167	<i>Escherichia coli</i>	TET, CHL, AMP
KD 170	<i>Escherichia coli</i>	NE, STR, CHL, AMP, TMP
KD 171	<i>Escherichia coli</i>	GEN, STR, AMP, AK
KD 189	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, STR, CHL, AMP, TMP

* Bold işaretli olanlar transformantlardaki direnci göstermektedir. Kısaltmalar için Tablo 2’nin dipnotuna bakınız.



Şekil 7. Transformantlardan izole edilmiş, ampisiline direnç kodlayan non-konjugatif plazmidler. M1, *E. coli* V517 (Plazmit marker [Kbp]); 1, R⁺(KD5); 2, R⁺(KD9); 3, R⁺(KD16); 4, R⁺(KD21); 5, R⁺(KD34); 6, R⁺(KD36); 7, R⁺(KD39); 8, R⁺(KD70); 9, R⁺(KD74); 10, R⁺(KD94); 11, R⁺(KD95); 12, R⁺(KD100); 13, R⁺(KD104); 14, R⁺(KD106); 15, R⁺(KD145); 16, R⁺(KD167); 17, R⁺(KD170); 18, R⁺(KD171); 19, R⁺(KD189); M2, *E. coli* R39 (Plazmit marker [MDa]).

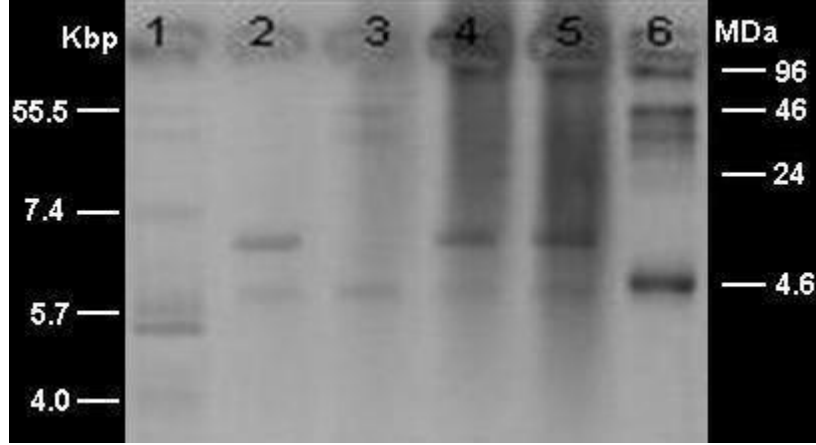
4.3.2. Tetrasikline Direnç Kodlayan Non-Konjugatif Plazmitler

Tetrasikline dirençli 52 suşdan saflaştırılan toplam plazmit preparasyonlarının *E. coli* suşu DH5α (*RecA*⁻) ile yapılan plazmit DNA transformasyonu sonucunda 4 transformant elde edildi. Bu da 4 suşun tetrasikline direnç kodlayan non-konjugatif plazmitler içerdiğini gösterdi. Elde edilen R⁺ transformantların test edilen antibiyotiklere karşı hassasiyetleri disk difüzyon testi ile araştırıldı. Dirençli olduğu antibiyotikler içerdiği plazmidin o antibiyotiğe karşı direnç determinantlarını kodladığını gösterdi. Sonuçlar Tablo 7’de gösterilmektedir. Tetrasikline dirençli suşların taşıdığı, moleküler büyüklükleri 4 Kbp ile 10 Kbp arasındaki non-konjugatif plazmitler Şekil 8’de görülmektedir.

Tablo 7. Tetrasikline direnç kodlayan non-konjugatif plazmitleri içeren suşlar.

Suş kodu	Tür ismi	Direnç fenotipi*
KD 43	<i>Escherichia coli</i>	TET , GEN, STR , AMP
KD 55	<i>Escherichia coli</i>	TET , NAL , GEN, NE, KAN, STR , AMP , TMP
KD 100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TET , NAL , GEN, OFX, NE, KAN, STR , AMP , AMK
KD 134	<i>Escherichia coli</i>	TET , GEN, NE, NET, KAN, STR , AMK

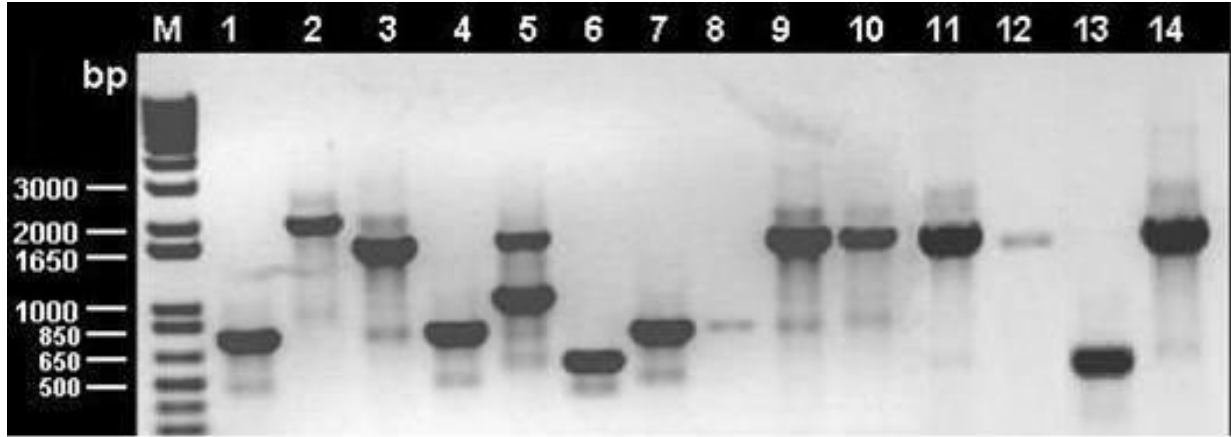
* Bold işaretli olanlar transformantlardaki direnci göstermektedir. Kısaltmalar için Tablo 2’nin dipnotuna bakınız.



Şekil 8. Transformantlardan izole edilmiş, tetrasikline direnç kodlayan non-konjugatif plazmidler. 1, *E. coli* V517 (Plazmit marker [Kbp]); 2, R^+ (KD55); 3, R^+ (KD100); 4, R^+ (KD43); 5, R^+ (KD134); 6, *E. coli* R39 (Plazmit marker [MDa]).

4.4. Suşların Sınıf 1 İntegron Taşıyıcılıkları

Tarama sonunda 14 (% 7,6) suшта (Tablo 8) çeşitli moleküler büyüklükte sınıf 1 integron gen kaseti tespit edildi (Şekil 9). Suşların integron büyüklükleri (Kbp) ve antibiyotik direnç fenotipi Tablo 8’de gösterilmektedir. Diğer 170 suшта sınıf 1 integrona spesifik PZR’ler negatifti.



Şekil 9. 5'-CS ve 3'-CS primerleriyle sınıf 1 integronların değişken bölgelerinin PZR amplifikasyonları. M: 1 Kbp DNA Ladder (MBI Fermentas, USA); 1: KD8; 2: KD36; 3: KD39; 4: KD46; 5: KD48; 6: KD54; 7: KD61; 8: KD62; 9: KD65; 10: KD84; 11: KD145; 12: KD171; 13: KD187; 14: KD191.

Sınıf 1 integron farklı enterik bakteri türlerinde tespit edildi. *Escherichia coli*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* gibi farklı türlerin bu gen kasetlerini taşıdığı belirlendi. Bu suşlar *Escherichia coli* KD8, *E. coli* KD36, *E. coli* KD39, *E. coli* KD46, *E. coli* KD48, *E. coli* KD54, *Citrobacter koseri* KD61, *E. coli*

KD62, *Klebsiella pneumoniae* KD65, *Klebsiella oxytoca* KD84, *E. coli* KD145, *Proteus vulgaris* KD171, *Klebsiella pneumoniae* KD187 ve *Proteus vulgaris* KD191 olarak belirlendi.

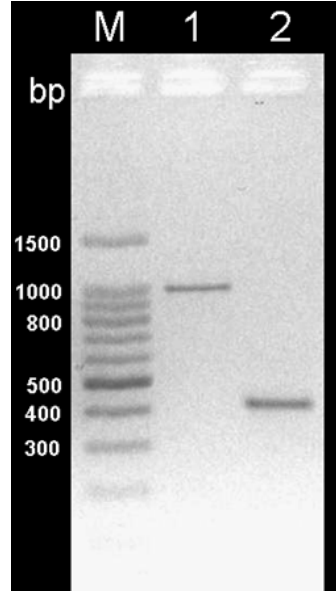
Tablo 8. Sınıf 1 integron taşıyan suşların özellikleri.

Suş	Tür	Antibiyotik direnç fenotipi*	İntegronun Yaklaşık büyüklüğü (Kbp)
KD8	<i>Escherichia coli</i>	TET, STR, CHL, AMP, TMP	0,7
KD36	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, STR, CHL, AMP, AMK, TMP	2,0
KD39	<i>Escherichia coli</i>	TET, GEN, NE, NET, STR, AMP, TMP, AMK	1,6
KD46	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NET, KAN, STR, AMP, TMP	0,7
KD48	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP, TMP	1,6
KD54	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, CHL, AMP, TMP	0,6
KD61	<i>Citrobacter koseri</i>	GEN, STR, AMP, TMP	0,7
KD62	<i>Escherichia coli</i>	TET, GEN, NE, STR, AMP, TMP	0,7
KD65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TET, GEN, NE, STR, CHL, AMP, TMP	1,6
KD84	<i>Klebsiella oxytoca</i>	TET, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP, TMP	1,6
KD145	<i>Escherichia coli</i>	NAL, GEN, OFX, STR, AMP, TMP	1,6
KD171	<i>Proteus vulgaris</i>	TET, GEN, NAL, OFX, NE, KAN, STR, CHL, AMP, AMK, TMP	1,6
KD187	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TET, STR, AMP, TMP	0,7
KD191	<i>Proteus vulgaris</i>	TET, NE, CHL, AMP, TMP	1,6

* Kısaltmalar için Tablo 2'nin dipnotuna bakınız.

4.5. *tet* Genlerinin PZR İle Tiplendirilmesi

184 suşun 52'si (26 *E. coli*, 9 *Klebsiella* spp., 2 *Enterobacter* sp., 13 *Citrobacter* sp., ve 2 *Proteus* sp.) (%28.4) tetrasikline dirençlidir. Bu suşlar *tetA*, *tetB* ve *tetC* gen taşıyıcılığı açısından PZR ile tarandı. Sadece *tetA* ve *tetB* genleri çoğaltıldı (Şekil 10). Tarama sonuçları Tablo 9'da gösterilmektedir. Hiçbir suшта *tetC* geni belirlenmedi.



Şekil 10. Tetrasiklin direnç determinantlarının PZR analizi. M, 100bp DNA Ladder (Promega, ABD); 1, *tetA* amplikon; 2, *tetB* amplikon.

Sınıf 1 integron taşıyan 14 suşta yüksek oranda tetrasikline direnç dikkati çekmektedir. Tablo 9’da bu suşlardaki tetrasikline direncin moleküler tiplendirmesi verilmektedir. Tetrasikline dirençli ve integron içeren iki *Proteus vulgaris* suşunda (KD171 ve KD191) taradığımız üç direnç genine de rastlanmadı.

Tablo 9. Sınıf 1 integron taşıyan 14 suşta *tet* genlerinin tipleri.

Suş	Tür	Antibiyotik direnç fenotipi*	<i>tet</i> geni
KD8	<i>Escherichia coli</i>	TET, STR, CHL, AMP, TMP	<i>tetA</i>
KD36	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, STR, CHL, AMP, AMK, TMP	<i>tetB</i>
KD39	<i>Escherichia coli</i>	TET, GEN, NE, NET, STR, AMP, TMP, AMK	<i>tetB</i>
KD46	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NET, KAN, STR, AMP, TMP	<i>tetA</i>
KD48	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP, TMP	<i>tetA, tetB</i>
KD54	<i>Escherichia coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, CHL, AMP, TMP	<i>tetB</i>
KD61	<i>Citrobacter koseri</i>	GEN, STR, AMP, TMP	–
KD62	<i>Escherichia coli</i>	TET, GEN, NE, STR, AMP, TMP	<i>tetB</i>
KD65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TET, GEN, NE, STR, CHL, AMP, TMP	<i>tetA</i>
KD84	<i>Klebsiella oxytoca</i>	TET, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP, TMP	<i>tetA</i>
KD145	<i>Escherichia coli</i>	NAL, GEN, OFX, STR, AMP, TMP	–

KD171	<i>Proteus vulgaris</i>	TET, GEN, NAL, OFX, NE, KAN, STR, CHL, AMP, AMK, TMP	?
KD187	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TET, STR, AMP, TMP	<i>tetA</i>
KD191	<i>Proteus vulgaris</i>	TET, NE, CHL, AMP, TMP	?

* Kısaltmalar için Tablo 2'nin dipnotuna bakınız; ?, *tetA*, *tetB* veya *tetC* belirlenmedi; –, tetrasikline hassas suşlar.

4.6. İntegronların Biyoinformatik Analizi

Çalışmada izole edilen dokuz adet sınıf 1 integrone “GenBank Accession Number” (=Gen Bankası Giriş Numarası) alındı (Tablo 10 ve EK’ler). Diğer iki integron tipi (*dfrA1-aadA1* ve *dfrA17-aadA5*) önceki bir çalışmamızda (OZGUMUS ve ark, 2007) tespit edilen integronlarla aynı veriye sahip olduğu için o yayındaki GenBank giriş numaraları (DQ875876 ve DQ875874) refere edildi (Tablo 11).

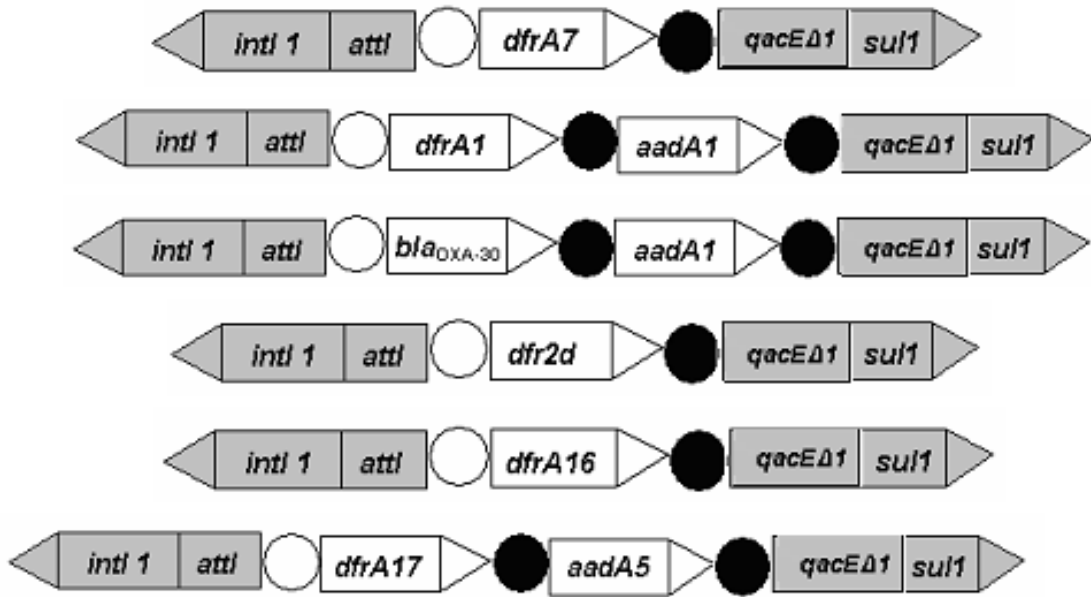
Tablo 10. Sınıf 1 integron içeren suşlar.

Suş	Organizma	Antibiyotik ^a fenotipi	direnç	Büyüklik (Bp)	Gen “array”	kaset	NCBI Giriş No.*
KD8	<i>E. coli</i>	TET, STR, CHL, AMP, TMP,		769	<i>dfrA7</i>		EU339236
KD36	<i>E. coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, STR, CHL, AMP, AMK, TMP		2013	<i>bla_{OXA-30}-aadA1</i>		EU339234
KD39	<i>E. coli</i>	TET, GEN, NE, NET, STR, AMP, TMP, AMK		1586	<i>dfrA1-aadA1</i>		^{-b}
KD46	<i>E. coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NET, KAN, STR, AMP, TMP		769	<i>dfrA7</i>		EU250576
KD48	<i>E. coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP, TMP		1663	<i>dfrA17-aadA5</i>		^{-c}
KD54	<i>E. coli</i>	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, CHL, AMP, TMP		561	<i>dfr2d</i>		EU339233
KD61	<i>Citrobacter koseri</i>	GEN, STR, AMP, TMP		741	<i>dfrA16</i>		EU158182
KD62	<i>E. coli</i>	TET, GEN, NE, STR, AMP, TMP		769	<i>dfrA7</i>		EU250577
KD65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TET, GEN, NE, STR, CHL, AMP, TMP		1586	<i>dfrA1-aadA1</i>		^{-b}
KD84	<i>Klebsiella oxytoca</i>	TET, GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP, TMP		1586	<i>dfrA1-aadA1</i>		^{-b}
KD145	<i>E. coli</i>	NAL, GEN, OFX, STR, AMP, TMP		1663	<i>dfrA17-aadA5</i>		^{-c}

KD171	<i>Proteus vulgaris</i>	TET, GEN, NAL, OFX, NE, KAN, STR, CHL, AMP, AMK, TMP	1586	<i>dfrA1-aadA1</i>	- ^b
KD187	<i>K. pneumoniae</i>	TET, STR, AMP, TMP	769	<i>dfrA7</i>	EU339235
KD191	<i>P. vulgaris</i>	TET, NE, CHL, AMP, TMP	1586	<i>dfrA1-aadA1</i>	- ^b
*Giriş	numaraları	NCBI/GenBank	veritabanı	içindir	
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&itool=toolbar).					
^a Kısaltmalar için Tablo 2'nin dipnotuna bakınız;					
^b Nükleotid olarak <i>dfrA1- aadA1</i> gen kaset array'I ile aynı (GenBank Giriş # DQ875876).					
^c Nükleotid olarak <i>dfrA17- aadA5</i> gen kaset array'I ile aynı (GenBank Giriş # DQ875874).					

Suşların içerdiği altı farklı yapıdaki sınıf 1 integronlar *dfr* ve *aadA* genlerinin alellerini ve türevlerini içeren gen kaset “array”ları şeklinde sınıf 1 integronların yapısına girdikleri belirlendi (Şekil 11). Dfr türevi genler dihidrofolat redüktaz enzimi kodlamaktadır ve trimetoprim antibiyotiğine direnç sağlamaktadır. AadA türevi genler ise aminoglikozid adenil transferaz enzimi kodlamaktadır ve streptomisin/spektinomisin antibiyotiklerine direnç sağlamaktadır. *bla_{OXA-30}* gen kaseti (= *bla_{OXA-1}*) β-laktamaz kodlamaktadır ve ampisilin gibi dar spektrumlu β-laktam antibiyotiklere direnç sağlamaktadır.

DfrA16 gen kaseti içeren 741 bp'lik bir sınıf 1 integron (GenBank Giriş# EU158182) literatürde ilk olarak bir *Citrobacter koseri* izolatında (KD61) bu çalışmada gösterildi. Ayrıca *dfrA7* içeren 769 bp'lik bir sınıf 1 integron da (GenBank Giriş# EU339235) ilk olarak bir *K. pneumoniae* suşunda (KD187) bu çalışmada gösterildi.



Şekil 11. Çalışmada belirlenen sınıf 1 integronların şematik gen yapıları ve antibiyotik direnç genlerinin ekspresyon yönleri. *intlI*, sınıf 1 integron integras gen; *attI*, sınıf integron rekombinasyon yeri (59 baz eleman); *qacEΔ1*, kuaterner amonyum iyonuna direnç geni; *sul1*, sülfonamide direnç geni.

4.7. İntegron Taşıyan Direnç (R) Plazmitleri

Suşların *E. coli* C600 transkonjugantlarına ve total plazmitlerinin kullanıldığı transformasyonlardan elde edilen *E. coli* JM101 transformantlarına uygulanan integron-spesifik PZR sonuçlarına göre integron içeren suşların yedi tanesinin R plazmitlerinin (konjugatif veya non-konjugatif) sınıf 1 integron taşıdıkları tespit edildi. Agar dilüsyon yönteminin kullanıldığı deney sonuçlarına göre, bazı antibiyotiklerin (ampisilin, tetrasiklin, trimetoprim, streptomisin, nalidiksik asit, gentamisin ve amikasin) bu suşlara karşı MİK'leri Tablo 11'de gösterilmektedir. Tablo 11'e göre suşlar yüksek MİK değerleriyle (MİK, 32 - >2048 µg/mL) antibiyotiklere karşı direnç sağlamaktadırlar.

Escherichia coli KD48 suşunda belirlenen plazmit aracılı nalidiksik asit direnci (MİK, 128µg/ml) plazmit aracılı kinolon direnci açısından PZR ile tiplendirildi. *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genleri tarandı. *Escherichia coli* KD48'deki kinolon direncinin *qnrS* geni tarafından kodlandığı tespit edildi. Bu sonuç, çevre bakterilerinde Türkiye'de belirlenen ilk plazmit aracılı kinolon direncini göstermektedir.

Tablo 11. Sınıf 1 integron taşıyan transformant ve transkonjugantlara karşı bazı antibiyotiklerin MİK değerleri ve plazmitlerinin moleküler özellikleri.

Verici	R ⁺ <i>E. coli</i> K-12 suşu*	Antibiyotik direnç fenotipi ^a	R ⁺ hücrelerdeki plazmit(ler) (Kbp)	R ⁺ <i>E. coli</i> K-12 JM101 veya C600 suşlarına karşı bazı antibiyotiklerin MİK (µg/mL) değerleri						
				AMP	TET	TMP	STR	NAL	GEN	AMK
<i>E. coli</i> KD8	C600	TET^b , STR, CHL, AMP , TMP	>147 ^d	>2048	128	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>E. coli</i> KD36	JM101	TET, NAL, GEN, OFX, NE, NET, STR, CHL, AMP , AMK , TMP	6.7	>2048	0.5	16	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>E. coli</i> KD39	C600	TET , GEN, NE, NET, STR, AMP , TMP , AMK	>147	>2048	128	512	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>E. coli</i> KD48	C600	TET, NAL^c , GEN , OFX, NE, NET, KAN, STR , AMP , TMP	88, 80	>2048	0.5	512	512	128	1024	0.5
<i>Klebsiella oxytoca</i> KD84	C600	TET , GEN, OFX, NE, NET, KAN, STR, AMP , TMP	>147, >147, 81, 61	>2048	64	64	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>E. coli</i> KD145	JM101	NAL, GEN, OFX, STR, AMP , TMP	7.3	>2048	0.5	512	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>P. vulgaris</i> KD171	C600	TET, GEN, NAL, OFX, NE, KAN, STR, CHL, AMP , AMK , TMP	>147, >147, 81,	>2048	0.5	512	256	0.5	2048	32
<i>E. coli</i> K-12 C600	-	RIF	-	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
<i>E. coli</i> K-12 JM101	-	-	-	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

* C600, konjugasyon alıcısı; JM101, transformasyon alıcısı.

^a Kısaltmalar için Tablo 2'nin dipnotuna bakınız; RIF, rifampisin.

^b Kalın yazılmış antibiyotik kısaltmaları direncin plazmit aracılı olduğunu göstermektedir.

^c Plazmit aracılı nalidiksik asit direnci *qnrS* geni tarafından kodlanmaktadır.

^d Kalın yazılmışlar kendini transfer edebilen plazmitlerdir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çoğul ilaç dirençli bakteri sayısındaki artış dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Özellikle klinik arenada tedavide kullanılacak yeni antibiyotiklerin sayısındaki azlık bu problemi alevlendirmektedir. Sucul çevrelerdeyse antibiyotiklere bakteriyal direnç sıklığı fazla ilgi çekmemektedir. Bu çalışmada, ülkemizin kuzey bölgesindeki on nehrinde antibiyotiklere dirençli koliformlar incelendi. Önceki çalışmalarımız (ALPAY-KARAOGLU ve ark., 2007; OZGUMUS ve ark., 2007a) bölgedeki halkın kullanımındaki içme sularının klorlama gibi işlemlerden geçmesine rağmen, çoğul ilaç dirençli koliformlarla kirlendiğini göstermiştir. Doğal çevrelerde antibiyotik dirençli mikroorganizmaların genellikle antropojenik kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (HU ve ark., 2008).

Yıl boyunca yapılan örneklemelerde, çoklu-tüp fermentasyon tekniği ile yapılan deneylerin sonucuna göre bütün nehirlerde en yüksek fekal koliform sayıları (en muhtemel sayı, >1110 CFU/mL) tespit edilmiştir (SEVİM, 2005). Çalışma sonuçları nehirlerimizde ciddi bir antropojenik kirlenmenin olduğunu göstermektedir. Muhtemelen bu kirlenme, nehirlerin etrafındaki yoğun insan yerleşimlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca birçok evin lağım atıkları bu derelere deşarj edilmektedir. Bu yüzden çoğu izolat yüksek antibiyotik direnci sergilemektedir. Bununla birlikte Toroğlu ve ark. (2005), Türkiye'nin güneyinden izole ettikleri koliformların %40'ında çoğul antibiyotik direnci göstermişlerdir. Diğer taraftan, Pathak ve Gopak (2008), işlenmiş içme sularında *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. ve *Citrobacter* sp. gibi koliformlar belirlemişlerdir. Bu çalışmada da nehir sularında aynı koliform paterni tespit edildi. Hindistan'da yapılan bir çalışmada (PATHAK ve GOPAK, 2008) insan dışkı ve içme sularından izole edilen fekal koliformlarda kanamisin, nalidiksik asit, tetrasiklin ve trimetoprim karşı direnç tespit edilmiştir. Benzer bir şekilde, Ürdün'deki içme suyu kaynaklarından izole edilen *E. coli*'lerde yüksek düzeyde ampisilin, trimetoprim/sulfametoksazol, gentamisin ve tetrasiklin direnci belirlenmiştir (SHEHABI ve ark., 2006). Bununla birlikte, tespit ettiğimiz bütün sınıf 1 integron içeren suşlar sulfametoksazole dirençli bulunmuşlardır (bilgiler gösterilmedi). Zira sulfametoksazol sülfonamid grubu bir antibiyotik olup, sınıf 1 integron menşeli olan *sulI* gen ürünü vasıtasıyla dirence neden olmaktadır (HALL ve COLLIS, 1995). Sonuçlarımız son iki yazarın çalışmalarıyla uyumludur.

Çalışmamızda, aminoglikozid grubu antibiyotiklere (streptomisin, gentamisin, neomisin, netilmisin, kanamisin ve amikasin) %52'lere kadar varan direnç oranı suşlarda sınıf 1

integron olabileceğini akla getiren bir veridir. Tablo 3'den de anlaşılacağı üzere, çoğu klinik kullanımda olan antibiyotik gruplarına karşı ortaya çıkan böylesine yüksek direnç oranları Trabzon'daki bu derelerin özellikle antropojenik kirlenmeye maruz kaldığının en önemli göstergelerinden biri olduğu kanısındayız. Örnekleme zamanında yaptığımız gözlemler bu hipotezi doğrulamıştır. Zira çoğu evsel atığın derelere bir şekilde ulaştığı ve yoğun mikrobiyal kontaminasyona yol açtığı düşünülmektedir.

Ampisiline ve diğer antibiyotik gruplarına karşı koliformlarda yüksek düzeyde direncin ortaya çıkması çevrede insan etkisinin olabileceğini göstermektedir (ANDERSEN ve SANDA, 1994). Çalışmamızda ampisiline karşı yüksek orandaki direnç (%58) Çin (HU ve ark., 2008), Avustralya (WATKINSON ve ark., 2007) ve Hindistan (PATHAK ve GOPAK, 2008)'daki araştırma sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir. Köksal ve ark. (2007)'nın Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada çok daha düşük seviyede direnç oranı (%48) belirlemişlerdir. Ampisiline direnç, genellikle suşlardaki β -laktamaz enzimi üretiminin bir göstergesidir. Kromozomal veya plazmit aracılı olan bu enzimleri kodlayan genlerin antibiyotik baskısı altında nokta mutasyonlarıyla kısa zamanda evolusyona uğradığı, sonuçta substrat aralığının genişlediği bilinmektedir (genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar). Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz üreten organizmalar bütün β -laktamlara karşı dirençli rapor edildiğinden dolayı, β -laktam grubu antibiyotiklerin klinik kullanımlarını ciddi ölçüde kısıtlanmaktadır. Sınıf A tipi β -laktamazlar olarak bilinen plazmit aracılı enzimler genellikle klinik orijinli bakterilerde sıklıkla rastlanmaktadır ve aminoglikozid, tetrasiklin, trimetoprim veya kloramfenikol gibi başka antibiyotik gruplarına karşı direnç determinantlarını da beraberinde taşıdığı (*co-transfer*) bilinmektedir (LIVERMORE, 1995; OZGUMUS ve ark., 2008). Plazmit aracılı antibiyotik direnci (kromozomal dirençten farklı olarak) çabuk yayılım göstermeleri ve yüksek inhibitör konsantrasyonu ile dirence neden oldukları için, antimikrobik kemoterapötiklerin kullanımında problemlere neden olmaktadır. Çevre orijinli bakterilerde bu konuda çok fazla araştırma bulunmamaktadır. Verilerimiz, ampisiline dirençli bakterilerin bu enzim tipleri açısından taranmasının gerekli olduğunu düşündürmektedir. Fakat projemizin asıl odaklandığı konu β -laktamaz tiplendirmesinden çok, ilginç genetik yapılar olan integron gen kasetlerinin varlığı ve ayrıntılı genetik haritalarının ortaya çıkarılmasıdır. Beta-laktamaz araştırması ayrı bir altyapı ve deneysel arkaplan gerektirdiğinden bu konu gelecek bir zamana bırakılmıştır.

Mikrobiyal ekolojide transfer edilebilir antibiyotik direncinin, özellikle su orijinli bakterilerde insanların dahil olduğu ekolojik dengeleri nasıl etkileyeceğinin, araştırılması

gereken konuların başında geldiğine inanmaktayız. Trabzon yöresindeki 10 su akımında rastlanan transfer edilebilir dirence aracılık eden genetik yapılar yakın ve akraba türlerde kolayca ekspres olabilmektedir. Bu özellik direnç genlerinin yayılımını kolaylaştırabilmektedir. Transkonjugant ve transformantlara karşı antibiyotiklerin yüksek MİK değerleri nehir koliformlarının antibiyotik direnç determinantları için iyi bir havuz olabileceğini düşündürmektedir ve bu havuzun transpozon ve/veya integronlar gibi hareketli genetik yapıları içerebileceği, hatta mevcut bakterilerle insan patojenleri arasında antibiyotik direnç elemanlarının paylaşılabilceği düşünülmektedir. Sonuçlarımız Hindistan'daki nehirlerde yapılan çalışmalarla (MUKHERJEE ve CHAKRABORTY ve ark., 2007) ve Güney Afrika'daki araştırmalarla (BIYELA ve ark., 2004) epidemiyolojik olarak benzerlik göstermektedir.

Bir *E. coli* suşu (KD48)'nin *E. coli* C600 transkonjugantı yüksek düzey nalidiksik asit direnci gösterdi (128 µg/mL). Bu suşta PZR ile plazmit aracılı *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genleri tarandı ve dirence *qnrS* geninin sebep olduğu tespit edildi. Plazmit aracılı kinolon direncinin düşük düzey dirence neden olduğu rapor edilmektedir (NORDMANN ve POIREL, 2005), fakat Latin Amerika'da izole edilmiş bazı suşların 128 µg/mL MİK düzeyinde nalidiksik aside direnç sağladığı bildirilmiştir (CASTANHEIRA ve ark., 2007). Bu suşlarda yüksek düzey dirence çoklu kopyalı plazmitlerin ve aşırı gen ekspresyonunun neden olduğu ve böylece yüksek MİK değerlerine sebep olduğu önerilmektedir. Bizim suşumuzda da bu gibi bir mekanizmanın olabileceği düşünülmektedir.

Non-konjugatif direnç plazmitlerinin direncin yayılımında direkt bir katkısının olmadığı bilinmektedir. Fakat bu gibi genomların taşıdığı genetik yapıların hızlı evolusyonu ve çevredeki baskılara verdikleri hızlı cevap göz önüne alındığında, bu tür plazmitleri içeren suşların taşıdığı başka bir konjugatif plazmit ile rekombinasyona uğrayarak sekonder bir yolla taşınabileceği unutulmamalıdır (ÖZGÜMÜŞ ve ark., 2005). İşte burada iki genomun birbirleriyle rekombinasyonunu sağlayan genetik yapılar, integronları da taşıdığı bilinen transpozon yapılarıdır. Mikrobiyal genetiğin bu ilginç genetik yapıları, antibiyotik direncinin moleküler epidemiyolojisinin çalışılmasında takip edilmesi gerekli genetik elemanlardır. Bunun yanında, non-konjugatif plazmitler birlikte bulunduğu konjugatif bir plazmitle bir hücreden diğerine mobilizasyon mekanizmasıyla aktarılabilmektedir. Böylece direnç epidemiyolojisi ve direncin önlenmesiyle ilgili çalışmalar için yararlı bilgiler sağlanmaktadır (ÖZGÜMÜŞ ve ark., 2002).

Çevresel suşlarımızdaki yaklaşık %8 integron içeriği, dünyada klinik suşlardaki integron içirme oranlarına sahip raporlarla karşılaştırıldığında düşüktür, fakat sınırlı sayıda yapılan çevre çalışmaları raporları ile uyumlu olduğu düşünülmektedir. Bu prevalans, sulama kanalları ve sedimanlarında %16 oranında sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren *E. coli*'lerin izole edildiği çalışmadan (ROE ve ark., 2003) ve Ürdün'deki içme sularından izole edilen *E. coli*'lerin %36'sında gösterildiği çalışmadan (SHEHABI ve ark., 2006) azdır. Çalışmamız Mukherjee ve Chakraborty (2007) tarafından rapor edilen sınıf 1 ve 2 integron taşıyan R plazmitleriyle ilgili çalışmasındaki bulgularla benzerlik göstermektedir. İntegronların R plazmitleriyle taşınması antibiyotik direncinin horizontal yayılımına geniş ölçüde katkı sağlamaktadır. Bu da sucül ortamlar ve klinik ortamlar gibi farklı seviyede antibiyotik baskılarının olduğu çevrelerde çoğul direncin kazanılmasıyla ilgili mekanizmaların aydınlatılmasına önemli bilgiler sağlamaktadır. Sınıf 1 ve/veya sınıf 2 integronlar klinik *E. coli* izolatlarında (SOLBERG ve ark., 2006), insan ve hayvan kaynaklı dirençli koliformlarda (VAN ESSEN-ZANDERBERGEN ve ark., 2007), non-koliform patojen bakterilerde (CHANG ve ark., 2007), insan dışkısından izole edilen *E. coli*'lerde (PHONGPAICHIT ve ark., 2008), gıdalardan izole edilen bakterilerde (SUNDE, 2005), kuşlarla taşınan patojen *E. coli*'lerde (KIM ve ark., 2007) ve sucül çevrelerde (ROE ve ark., 2003) gösterilmiştir. Antropojenik kirlenmeye maruz kalmış Trabzon derelerinden izole edilen koliformlardaki sınıf 1 integronları farklı enterik bakteri türlerinin (*Escherichia coli*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*) taşıdığı tespit edildi (Tablo 11). Sonuçlar halk sağlığı açısından düşündürücüdür. Trabzon yöresindeki 10 derenin rekreasyon veya içme suyu amaçlı kullanımlarında bu veriler göz önüne alınmalıdır.

Üç koliformda *dfrA7* gen kaseti taşıyan 767 bp'lik integron belirlendi. Bu gen kasetleri nehir suyundan izole edilmiş *K. pneumoniae* suşlarında ilk kez gözlenmiştir. Ayrıca, bir *Citrobacter koseri* izolatında ilk kez *dfrA16* gen kaseti (GenBank giriş numarası EU158182) taşıyan 741 bp'lik bir sınıf 1 integron tespit edildi. Bu iki sonucun epidemiyolojik önemi vardır.

Çevre bakterilerindeki antibiyotik direncinde indikatör olarak kullanılan antibiyotik genellikle tetrasiklin olup, moniterizasyonda bu antibiyotiğe karşı direncin oransal verileri kullanılır. Çünkü insan tıbbı, veterinerlik ve bitki ziraatındaki enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve çiftlik tavuklarında büyüme artırıcı olarak kullanımında flora ve çevre bakterileri bol miktarda tetrasikline maruz kalmaktadır. Bu da bakteriyel populasyonlardaki antibiyotik direnç evrimini hızlandırmaktadır (CHOPRA ve ROBETS, 2001). Enterik

bakterilerde tetrasikline karşı direncin tiplendirilmesinde genellikle A-E arasındaki sınıflar taranmaktadır fakat *tetA*, *tetB* ve *tetC* genleri tetrasikline dirençli *Enterobacteriaceae* familyasında sık rastlanmaktadır. Tablo 10'da bu suşlardaki tetrasikline direncin tiplendirilmesi verilmektedir. Elli iki tetrasikline dirençli izolat arasında yalnızca *tetA* ve *tetB* aracılı dirence yaklaşık aynı oranda (%32.6) rastlandı ve çoğunun R plazmitleri üzerinde taşındığı tespit edildi. Üç direnç geninin tespit edilemediği diğer suşlarda ve integron içeren suşlarda başka genlerin neden olabileceği (*tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetK*, *tetL*, *tetO*, *tetM*, *tetP(A)*, *tetQ*, *tetS* veya *tetX* gibi enterik bakterilerde ender görülen determinantlar), eflüks mekanizması veya dış membran kompozisyonlarındaki modifikasyonlar vasıtasıyla direnç kazanabileceği düşünülmektedir. Tetrasikline dirençli ve integron içeren iki *Proteus vulgaris* suşunda (KD171 ve KD191) taradığımız üç direnç genine de rastlanmadı. Aynı bölgede içme sularından izole edilen fekal koliformları kullanarak yaptığımız başka bir çalışmada (OZGUMUS ve ark., 2007) *tetA* aracılı direncin yaygın olduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışmamızda (Çolakoğlu F., Ozgumus O.B., Sandallı C., Alpay-Karaoğlu Ş., Class 1 and class 2 integrons in antibiotic resistant coliforms isolated from seawater. *Turkish J Med Sci*, hakem incelemesinde) bölgedeki deniz suyundan izole edilmiş tetrasikline dirençli *E. coli*'lerde *tetB* aracılı direncin yaygın olduğu gösterilmiştir. *tetA* ve *tetB* genlerinin her ikisi de eflüks mekanizması kodlamaktadır ve hem insan hem de hayvan orijinli enterik bakterilerde en sık rastlanan tetrasikline direnç mekanizmaları arasındadır (DOMINGUEZ ve ark., 2002; LANZ ve ark., 2003). Tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasikline karşı direnç sağlayan *tetA* geninin tersine *tetB* ek olarak doksisisikline karşı da direnç sağlar. *tetA* ve *tetB* bulundukları *E. coli*'lerin orijinine göre değişebilir. *tetB*'ye Kore'de yeni doğanların barsak mikrobiyotasında sık rastlanırken, *tetD* geni Çin'deki deniz balık çiftliklerinde sık rastlanmaktadır (DANG ve ark., 2007). Danimarka'da bir balık çiftliğindeki aeromonadlarda *tetA* aracılı tetrasiklin direncinin baskın olduğu rapor edilmiştir ve konjugatif R plazmitleriyle *tetA* arasında oksitetrasiline dirençli izolatlar arasında bağlantı kurulmuştur (SCHIMDT ve ark., 2001).

Balık patojeni *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerdeki tetrasikline direncin moleküler analizinin, birçok balık çiftliğinin ve deniz balık çiftliklerinin bulunduğu yöremizde enterik bakterilerin neden olduğu balık hastalıklarının tedavi protokollerinde temel bilgi ve etkili stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunacağı kanısındayız.

Farklı türdeki *Enterobacteriaceae* ailesinde integronların varlığı çevre orijinli bakterilerde direnç genlerinin transferi ve yayılımı, bunun yanında insan normal mikrobiyotasına direnç taşınımı açısından önem taşımaktadır. Sonuçlarımız integronların

sucul enterik bakteriler arasında yaygın olduğunu göstermektedir. Bu bakterilerin antibiyotik direnç determinantlarının rezervuarları olabileceği ve çevrede bakteriyel antibiyotik direnç genlerini yayabileceği kanısındayız.

6. ÖNERİLER

1. Trabzon derelerinden izole edilen koliformlarda yüksek oranda antibiyotik direncine rastlanmıştır. Literatür taraması, antibiyotik direnç oranlarının dünyadaki örneklerinin çoğundan fazla olduğunu göstermiştir. Yüksek direnç oranı, bakterilerin insan kaynaklı olabileceğini işaret etmektedir. Lokal yönetimlerin gerekli önlemleri alması için bu konuya dikkatleri çekilmelidir.
2. İçme suyu olarak kullanılan derelerin çoğul dirençli patojenleri içirme olasılığı yüksek olduğundan, halk sağlığı takipçilerinin acilen önlem stratejilerini belirlemesi ve geliştirmesi gerekmektedir. Suyla bulaşan bakteriyal patojenlerin salgın yaptığı ve çoğul antibiyotik dirençli olanlarının etken olduğu enfeksiyonların tedavilerinde problemler yaşandığı bilinen bir gerçektir. Plazmit aracılı antibiyotik direncinin çevre bakterilerinden insan patojenlerine transferi mümkündür. Bu da halk sağlığını tehdit eden başka bir ciddi sorundur.
3. Ampisilin ve tetrasiklin gibi hem insan tedavisinde hem de hayvan ve bitki ziraatındaki enfeksiyonların tedavisinde kullanılan, bir indikatör mahiyetindeki bu antibiyotiklere karşı belirlenen yüksek direnç oranı, bakteriyal populasyonların kirliliğe verdiği önemli bir cevap olarak düşünülebilir.
4. Antibiyotiklere karşı ortaya çıkan direnç oranlarının takibi ulusal strateji haline getirilmeli, yurt çapında çevredeki bakteriyal populasyonlarda ortaya çıkan antibiyotik direnç oranları ve mekanizmalarının moniterizasyonu moleküler epidemiyolojik yöntemlerle sürveyan edilmelidir (gelişmiş ülkelerin çoğunda bakanlıklar çapında ciddi sürveyan çalışmaları vardır ve bu çalışmaların direnç evolusyonunun yavaşlatılması için değerli bilgiler sağladığı bilinmektedir). Konu, halk sağlığı merkezleri, Sağlık Bakanlığı ve üniversiteler üçgeninde kollaboratif olarak incelenmeli, tartışılmalı ve çözüm önerileri getirilmelidir.
5. İçme sularıyla ilgili yaptığımız bölgesel çalışmalarda da bazı noktalarda hem şehir şebeke hem de bazı pınar sularından izole ettiğimiz koliform bakterilerde yüksek oranda ve transfer edilebilir antibiyotik direncine, bunun yanında sınıf 1 integron gen kasetlerine rastlandı (OZGUMUS ve ark., 2007a). Bu bulgular derelerde de benzer genetik yapılarla rastlama olasılığının yüksek olduğunu işaret etmektedir.

6. Klinik dışı bakteriler olarak bu koliformlarda rastlanan yaklaşık %8'lik integron taşıyıcılığının halk sağlığı açısından büyük risk taşıdığı aşikârdır. Derelerin antropojenik atıklarla (kanalizasyon deşarjları) kontaminasyonu engellenmelidir.
7. Fekal koliformların (*E. coli*) antibiyotik direnç analizi gibi fenotipik yöntemler dışında, genotipik yöntemlerle tiplendirilmesinde “bakteriyal iz takibi (Bacterial Source Tracking)” için kullanılan yöntemlerle (ERIC-PZR [Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence Repeats-PZR], BOX-PZR, Ribotiplendirme veya PFGE [Pulsed Field Gel Electrophoresis] analizi gibi yöntemler) bakterilerin insan, evcil hayvan veya yabanıl hayvanların barsaklarından kaynaklandığı tespit edilebilir. Proje sonuçlarımızın makale haline getirildiği yayınında (OZGUMUS ve ark., 2009) integron içeren *E. coli*'lerde BOX-PZR yöntemiyle parmak izi analizi yapıldı.
8. İntegronlar bakterilerde özellikle aminoglikozidlere, trimetoprime, kloramfenikole ve sulfanomidlere karşı direnç genleri taşıdığı için klinik kullanımdaki birçok antibiyotiğin kullanımında problemlere yol açmaktadır. Özellikle hastanelerdeki nozokomiyal etkenlerde ortaya çıkması tedavide güçlükler neden olmaktadır. Çevre bakterilerinde integronların konjugatif direnç plazmitleri tarafından taşınması, antibiyotik direnç genlerinin çevreden insan patojenlerine aktarılma olasılığını artırmaktadır. Çalışmamız integronların konjugatif plazmitlerin bazılarında taşındığını göstermiştir.
9. DfrA16 gen kaseti içeren 741 bp'lik bir sınıf 1 integronun (GenBank Giriş# EU158182) literatürde ilk olarak bir *Citrobacter koseri* izolatında (KD61) gösterilmesi, ayrıca *dfrA7* içeren 769 bp'lik bir sınıf 1 integronun da (GenBank Giriş# EU339235) ilk olarak bir *K. pneumoniae* suşunda (KD187) bu çalışmada gösterilmesi, yalnızca yoğun antibiyotik baskılarının olduğu hastane ortamlarının değil derelerin dahi direnç genleri açısından önemli bir kaynak olabileceğini göstermektedir. Bu genetik determinantların başka bakterilere, oradan da insan florasına ve patojenlerine ulaşabileceği gerçeği göz ardı edilmemelidir. “Akan su kir tutmaz” atasözü arkasına saklanmadan dere ve nehirlerimizin ev ve hastane kanalizasyonu veya fabrika deşarjları ile kirlenmemesi gerekmektedir. Yaptığımız saha gezisinde su örnekleri alınan bütün derelerimizin bu gibi atıklarla yoğun bir şekilde kontamine edildiğini gözledik.
10. Klinik dışı bir bakteri olmasına rağmen, bir *Escherichia coli* suşunda (KD48) belirlenen plazmit aracılı nalidiksik aside direnç, yine derelerin yoğun antropojenik kontaminasyonunu göstermektedir. Ayrıca bu sonuç Türkiye’de ilk olarak çevresel orijinli bir bakteride plazmit aracılı kinolon direncinin varlığını göstermektedir (yayında).

belirtildi). Normalde klinik bir bakteride gözlenmesi daha muhtemel olan bu tür sıra dışı direncin bir çevre bakterisinde ortaya çıkması epidemiyolojik anlamda düşündürücü olup, ülke çapında acilen antibiyotik direnç evrimi ile ilgili tedbirlerin alınması gerekliliğini göstermektedir. Zira birçok enfeksiyon hastalığının tedavisinde sıklıkla kullanılan kinolon grubuna karşı bakteriyel direnç stratejilerinin ülke çapında moleküler epidemiyolojik yöntemlerle izlenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Araştırma grubumuz projenin sağladığı altyapı imkânlarıyla bu çalışmaları hem çevre hem de klinik orijinli bakterilerde devam ettirecek bilgi, teknoloji ve yetişmiş bilim insanına sahip olmuştur.

11. Çevresel ve klinik bakterilerdeki antibiyotik direncinin moleküler karakterizasyonu ve epidemiyolojisinin ülke çapında takibinin, direncin önlenmesi için yapılacak diğer temel ve klinik çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

- AARESTRUP F. M., Lertworapreecha M., Evans M. C., Bangtrakulnonth A., Chalermchaikit T., Hendriksen R. S., Wegener H. C., Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *J Antimicrob Chemother*, 52: 715–718 (2003).
- ABBOTT Y., O'Mahony R., Leonard N., Quinn P. J., van der Reijden T., Dijkshoorn L., Fanning S., Characterization of a 2.6 kbp variable region within a class 1 integron found in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated from a horse. *J Antimicrob Chemother*, 55, 367 – 370, (2005).
- ALPAY-KARAOGLU S., Ozgumus O. B., Sevim E., Kolayli F., Sevim A., Yesilgil P., Investigation of antibiotic resistance profile and TEM-type β -lactamase gene carriage of ampicillin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from drinking water. *Ann Microbiol*, 57, 281-288, (2007).
- ANDERSEN, S. R., Sanda R.A., Distribution of tetracycline resistance among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 60, 908-912, (1994).
- ASH R. J., Mauck B., Morgan M., Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg Infect Dis*, 8, 713-716, (2002).
- AUSUBEL, F. M., Brient R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., *Short Protocols in Molecular Biology* 2nd ed: John Wiley & Sons, New York, (1995).
- BIYELA P. T., Lin J., Bezuidenhout C. C., The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water Sci Technol*, 50, 45-50. 2004.
- BROOKS, G. F., Butel J. S., Morse S.A., 23rd ed: Jawetz, Melnick. & Adelberg's Medical Microbiology, McGraw-Hill Companies, Appleton & Lange, USA, (2004).
- CARATTOLI, A., Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res*, 32, 243-259, (2001).
- CHANG L. L., Lin H. H., Chang C. Y., Lu P. L., Increased incidence of class 1 integrons in trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*, 59, 1038-1045, (2007).

- CHOPRA, I., Roberts M., Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65, 232–260, (2001).
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)., Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 6th ed., Approved standard M7-A6., CLSI, Wayne, PA, USA, (2003b).
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)., Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; 8th ed., Approved standard M2-A8., CLSI, Wayne, PA, USA, (2003a).
- COHEN, M. L., Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*, 257, 1050-1055, (1992).
- DANG H., Zhang X., Song L., Chang Y., Yang G., Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *J Appl Microbiol*, 103, 2580 – 2592, (2007).
- DAVIES, J., Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264, 375–82, (1994).
- DOMINGUEZ E., Zarazaga M., Saenz Y., Brinas L., Torres C., Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain. *Microb Drug Resist*, 8, 321–327, (2002).
- FLING, M. E., Richards C., The nucleotide sequence of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase gene harbored by Tn7. *Nucleic Acids Res*, 11, 5147–5158, (1983).
- FLUIT, A. C., Schmitz F. J., Resistance integrons and superintegrons. *Clin Microbiol Infect*, 10, 272-288, (2004).
- FONSECA E., Vieira V. V., Cipriano R., Vicente A. C. P., Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immun Med Microbiol*, 44, 303–309, (2005).
- GRINSTED J., de la Cruz F., Schmitt R., The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid*, 24,163–89, (1990).

- GUARDABASSI L., Dijkshoorn L., Collard J.-M., Olsen J. E., Dalsgaard A., Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol*, 49: 929–36, (2000).
- GÜLER, Ç., Çobanoğlu, Z., *Su kirliliği, çevre sağlığı temel kaynak dizisi*, ed: No:12, Ankara, (1994).
- HALL, R. M., Collis C. M., Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*, 15, 593-600, (1995).
- HALLING-SØRENSEN B., Nors N. S., Lanzky P. F., Ingerslev F., Holten L. H. C., Jørgensen S. H., Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review. *Chemosphere*, 36, 357-393, (1998).
- HEBERER T., Schmidt B. K., Stan H. J., Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part I.: Drug residues and other polar contaminants in Berlin surface and groundwater. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 26, 272-278, (1998).
- HU J., Shi J., Chang H., Li D., Yang M., Kamagata Y., Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin. *Environ Sci Technol*, 42, 3415-3420, (2008).
- INFANTE B., Grape M., Larsson M., Kristiansson C., Pallecchi L., Rossolini G. M., Kronvall G., Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *Int J Antimicrob Agents*, 25, 308–12, (2005).
- JONES J. G., Gardener S., Simon B. M., Pickup R.W., Antibiotic resistant bacteria in Windermere and two remote upland tarns in the English Lake district. *J Appl Bacteriol*, 60, 443-453, (1986).
- KIM T. E., Jeong Y. W., Cho S. H., Kim S. J., Kwon H. J., Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol*, 45, 3309-3315, (2007).
- KOKSAL F., Oguzkurt N., Samasti M., Atlas K., Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* strains isolated from drinking water samples in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy*, 53, 30-35, (2007).
- KRUSE, H., Indirect transfer of antibiotic resistance genes to man. *Acta Vet Scand*, 92, 59-65, (1999).
- KÜMMERER, K., *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*, 2nd ed: Springer-Verlag, Berlin (2004).

- LANZ R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol*, 91, 73–84, (2003).
- LEVERSTEIN-van HALL M. A., Blok H. E. M., Donders A. R. T., Paauw A., Fluit Ad C., Verhoef J., Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis*, 187, 251–59, (2001).
- LEVESQUE C., Piche L., Larose C., Roy P. H., PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 185–91, (1995).
- LIVERMORE, D. M., β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 8, 557–584, (1995).
- MACRINA F. L., . Kopecko D. J, Jones K. R., Ayers D. J., McCowen S.M., A multiple plasmid containing *Escherichia coli* strain: convention source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*, 1, 417–420, (1978).
- MARTINEZ-FREIJO P., Fluid Ad. C., Schmitz F.-J., Verhoef J., Jones M. E., Many class 1 integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 686–89, (1999).
- MUKHERJEE, S., Chakraborty R., Conjugation potential and class 1 integron carriage of resident plasmids in river water copiotrophs. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 54, 379–397, (2007).
- MUKHERJEE, S., Chakraborty R., Incidence of class 1 integrons in multiple antibiotic-resistant Gram-negative copiotrophic bacteria from the River Torsa in India. *Res Microbiol*, 157, 220–226, (2006).
- OZGUMUS O. B., Caylan R., Tosun I., Sandalli C., Aydin K., Koksall 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*, 13, 191–198, (2007b).
- OZGUMUS O. B., Celik-Sevim E., Alpay-Karaoglu S., Sandalli C., Sevim A., Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. *J Microbiol*, 45, 379–387, (2007a).

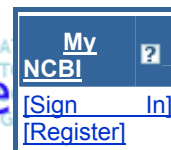
- OZGUMUS O. B., Sandalli C., Sevim A., Celik-Sevim E., Sivri N., Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. *J Microbiol*, 47, 19–27, (2009).
- OZGUMUS O. B., Tosun I., Aydin F., Kilic A. O., Horizontal dissemination of TEM- and SHV-type β -lactamase genes-carrying resistance plasmids amongst clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Brazilian J Microbiol*, 39, 636-643, (2008).
- ÖZGÜMÜŞ O. B., Tosun İ., Aydın F., Kılıç A. O., Non-conjugative plasmids encoding TEM-type β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*. *İnfek Derg*, 16, 329-333, (2002).
- ÖZGÜMÜŞ O. B., Tosun İ., Aydın F., Yılmaz Ş. N., Kılıç A. O., Ertürk M., Enterobakterilerde TEM-tipi β -laktamaz geni taşıyan direnç plazmitlerinin moleküler analizi. *İnfek Derg*, 19, 205–210 (2005).
- PARK J. C., Lee J. C., Oh J. Y., Jeong Y. W., Cho J. W., Joo H. S., Lee W. K., Lee W. B., Antibiotic selective pressure for the maintenance of antibiotic resistant genes in coliform bacteria isolated from the aquatic environment. *Water Sci Technol*, 47, 249-53, (2003).
- PATHAK, S. P., Gopak K., Prevalence of bacterial contamination with antibiotic-resistant and enterotoxigenic fecal coliforms in treated drinking water. *J Toxicol Environ Health A*, 71, 427-433, (2008).
- PETERSEN A., Guardabassi L., Dalsgaard A., Olsen J.E., Class 1 integrons containing a dhfrI trimethoprim resistance gene cassette in aquatic *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiol Lett*, 182, 73-76, (2000).
- PHONGPAICHIT S., Wuttananupan K., Samasanti N., Class 1 integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* isolates from human stools. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 39, 279-287, (2008).
- RALOFF, J., Drugged waters. *Science News*, 153, 187–189, (1998).
- RECCHIA, G. D., Hall R. M., Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, 141, 3015-3027, (1995).
- ROE M. T., Vega E., Pillai S. D., Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis*, 9, 822-826, (2003).
- ROWE-MAGNUS, D. A., Mazel D., The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol*, 292, 115-125, (2002).

- SCHIMDT A. S., Bruun M.S., Dalsgaard I., Larsen J. L., Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl Environ Microbiol*, 67, 5675 – 5682, (2001).
- SEVİM, A., *Trabzon'daki Derelerin Fekal Koliform Kirliliği ve Koliform Bakterilerin Antibiyotik Direnç Profiline Araştırılması*, (Yüksek Lisans Tezi), Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, (2005).
- SHEHABI A. A., Odeh J. B., Fayyad M., Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integron found in *Escherichia coli* isolates from human stools and drinking water sources in Jordan. *J Chemother*, 18, 468-472, (2006).
- SINGH R., Schroeder C. M., Meng J., White D. G., McDermott P. F., Wagner D. D., Yang H., Simjee S., DebRoy C., Walker R. D., Zhao S., Identification of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from humans and food animals. *J Antimicrob Chemother*, 56, 216–219, (2005).
- SOLBERG O. D., Ajiboye R. M., Riley L. W., Origin of Class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 44, 1347-1351, (2006).
- SOMPOLINSKY D., Nitzan Y., Tetry S., Wolk M., Vulikh I., Kern M. B., Sandvang D., Hershkovits G., Katcoff D. J., Integron-mediated ESBL resistance in rare serotypes of *Escherichia coli* causing infections in an elderly population of Israel. *J Antimicrob Chemother*, 55, 119–122, (2005).
- STOKES, H. W., Hall R. M., A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*, 3, 1669–83, (1989).
- SUNDE, M., Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *J Antimicrob Chemother*, 56, 1019-1024, (2005).
- SUSAN, J., Hilary-Kay Y., Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother*, 44: 11-18, (1999).
- TARCHER, A. B., *Principles and practice of environmental medicine*, ed: Plenum medical Book Company, New York and London, (1991).
- TENNSTEDT T., Szczepanowski R., Braun S., Pühler A., Schlüter A., Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol*, 45, 239-52, (2003).

- TENOVER, F. C., Hugles J. M., The challenges of emerging infectious diseases development and spread of multiply resistant bacterial pathogens. *JAMA*, 275, 300-304, (1996).
- TIBBETS, J., Water world 2000, *Environmental Health Perspectives*, 108, 2, (2000).
- TOROGLU S., Dincer S., Korkmaz H., Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from Aksu River in (Kahramanmaras) Turkey. *Ann Microbiol*, 55, 229-233, (2005).
- TURTON J. F., Kaufmann M. E., Glover J., Coelho J. M., Warner M., Pike R., Pitt T.L., Detection and typing of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*, 43, 3074–3082, (2005).
- VAN ESSEN-ZANDERBERGEN A., Smith H., Veldman K., Mevius D., Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother*, 59, 746-750, (2007).
- VAN LOON H. J., Box A. T. A., Verhoef J., Fluit A. C., Evaluation of genetic determinants involved in β -lactam- and multiresistance in a surgical ICU. *Int J Antimicrob Agents*, 24, 130–34, (2004).
- WATERS, V. L., Conjugative transfer in the dissemination of β -lactam and aminoglycoside resistance. *Frontiers in Bioscience*, 4, 416–439, (1999).
- WATKINSON A. J., Micalizzi G. R., Bates J. R., Costanzo S. D., Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use modified chromogenic agar. *Appl Environ Microbiol*, 73, 2224-2229, (2007).
- WATURANGI D. E., Suwanto A., Schwarz S., Erdelen W., Identification of class 1 integrons-associated gene cassettes in *Escherichia coli* isolated from *Varanus* spp. in Indonesia. *J Antimicrob Chemother*, 51, 175-177, (2003).
- WU J-J., Ko W-C., Tsai S-H., Yan J-J., Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* among clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 1223-1227, (2007).

EKLER

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nuccore>



All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy Books

SearchDatabase name forSearch term GoClear

GenBank: EU339236.1

Escherichia coli strain KD8 class 1 integron dihydrofolate reductase type I (dfrA7) gene, complete cds

LOCUS EU339236 769 bp DNA linear BCT 02-MAR-2009
DEFINITION Escherichia coli strain KD8 class 1 integron dihydrofolate reductase type I (dfrA7) gene, complete cds.
ACCESSION EU339236
VERSION EU339236.1 GI:164429819
KEYWORDS .
SOURCE Escherichia coli
ORGANISM [Escherichia coli](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 769)
AUTHORS Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
TITLE Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey
JOURNAL J. Microbiol. 47 (1), 19-27 (2009)
PUBMED [19229487](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 769)
AUTHORS Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-DEC-2007) Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Rize University, Milli Piyango Egitim Kampusu, Rize 53100, Turkey
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..769
/organism="Escherichia coli"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="KD8"
/isolation_source="river"
/db_xref="taxon:[562](#)"
[repeat region](#) 1..769
/mobile_element="integron:class 1"
[misc feature](#) 1..97
/note="5' conserved region"
[gene](#) 119..592
/gene="dfrA7"
[CDS](#) 119..592
/gene="dfrA7"
/note="DFRA7; confers resistance to trimethoprim"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)

```

        /product="dihydrofolate reductase type I"
        /protein_id="ABY55285.1"
        /db_xref="GI:164429820"
        /translation="MKISLISATSENGVIGNGPDI PWSAKGEQLLFKALTYNQWLLVG
        RKTFDMSGVLPNRKYAVVSRKGISSNENVLVFPSEIALQELSKITDHLVYVSGGGQI
        YNSLIEKADIIHLSTVHVEVEGDINFPKIPENFNLVFEQFFLSNINYTYQIWKKG"
misc_feature 738..769
              /note="3' conserved region"
ORIGIN
1  ggcattccaag cagcaagcgc gttacgccgt gggtcgatgt ttgatgttat ggagcagcaa
61  cgatgtttacg cagcagggca gtcgccctaa aacaaagtta gccattacgg gggttgaatt
121  gaaaattttca ttgatttctg caacgtcaga aaatggcgta atcggtaatg gccctgatat
181  cccatgggtca gcaaaaagggtg agcagttact ctttaaagcg ctcacatata atcagtggtc
241  ccttggttga aggaaaacat ttgactctat ggggtgttctt ccaaatacga aatatgcagt
301  agtgtcgagg aaaggaattt caagctcaaa tgaaaatgta ttagtctttc cttcaataga
361  aatcgctttg caagaactat cgaaaattac agatcattta tatgtctctg gtggcgggtc
421  aatctacaat agtcttattg aaaaagcaga tataattcat ttgtctactg ttcacgttga
481  ggttgaagggt gatatcaatt ttcttaaaat tccagagaat ttcaatttgg tttttgagca
541  gttttttttt tctaataata attacacata tcagatttgg aaaaaaggct aacaagtcgt
601  tccagcacca gtcgctgcgc tccttgga gtttttaagt cgcggtttta tgggtttgct
661  gcgcaaaagt attccataaa accacaactt aaaaactgcc gctgaactcg gcgttagatg
721  cactaagcac ataattgctc acagccaaac tatcagggtc agtctgctt

```

GenBank: EU339234.1

Escherichia coli strain KD36 class 1 integron oxacillinase (blaOXA-30) and aminoglycoside adenylyltransferase A (aadA1) genes, complete cds

```

LOCUS      EU339234                2013 bp    DNA        linear    BCT 02-MAR-2009
DEFINITION Escherichia coli strain KD36 class 1 integron oxacillinase
            (blaOXA-30) and aminoglycoside adenylyltransferase A (aadA1) genes,
            complete cds.
ACCESSION  EU339234
VERSION    EU339234.1  GI:164429814
KEYWORDS   .
SOURCE     Escherichia coli
  ORGANISM Escherichia coli
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
            Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE  1 (bases 1 to 2013)
  AUTHORS  Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
  TITLE    Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic
            resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey
  JOURNAL  J. Microbiol. 47 (1), 19-27 (2009)
  PUBMED   19229487
REFERENCE  2 (bases 1 to 2013)
  AUTHORS  Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (08-DEC-2007) Department of Biology, Faculty of Arts and
            Sciences, Rize University, Milli Piyango Egitim Kampusu, Rize
            53100, Turkey
FEATURES   Location/Qualifiers
     source          1..2013
                     /organism="Escherichia coli"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="KD36"
                     /isolation_source="river"
                     /db_xref="taxon:562"
     repeat_region   1..2013
                     /mobile_element="integron:class 1"
     misc_recomb     1..103
                     /note="59 bp element"
     misc_feature     96..103

```

```

/feature="attI site"
168..998
/feature="blaOXA-30"
168..998
/feature="blaOXA-30"
/feature="beta-lactamase; confers resistance to beta-lactam"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="oxacillinase"
/protein_id="ABY55282.1"
/db_xref="GI:164429815"
/translation="MKNTIHINF AIFLIANIYSSASASTDISTVASPLFEGTEGCF
LLYDASTNAEIAQFNKAKCATQMAPDSTFKIALSLMAFDAEIIDQKTIFKWDKTPKGM
EIWNSNHTPKTWMQFSVWVVSQEITQKIGLNKIKNYLKDFDYGNQDFSGDKERNNGLT
EAWLESSLKISPEEQIQFLRKIINHNLVPKNSAIENTIENMYLSDLGYSTKLYGKTGA
GFTANRTLQNGWFEGFIISKSGHKYVVFVSALTGNLGSNLTSSIKAKKNNAITILNTLNL"
misc_recomb
1017..1024
/feature="OXA-30 inverse core site"
misc_recomb
1100..1107
/feature="aadA1 recombination core site"
gene
1111..1902
/feature="aadA1"
CDS
1111..1902
/feature="aadA1"
/feature="nucleotidyltransferase; confers resistance to
streptomycin and spectinomycin"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="aminoglycoside adenylyltransferase A"
/protein_id="ABY55283.1"
/db_xref="GI:164429816"
/translation="MREVVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKP
HSDIDLLVTVTVRLDETTRRALINDLLETSPGSEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYP
AKRELQFGWQRNDILAGIFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQ
DLFEALNETLTLWNSPPDWAGDERNVVLTLRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPA
QYQPVILEARQAYLQGEEDRLASRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK"
misc_recomb
1903..1910
/feature="aadA1 inverse core site"
misc_recomb
1957..1964
/feature="recombination core site"
ORIGIN
1  ggcatccaag  cagcaagcgc  gttacgcgct  gggctcgatgt  ttgatgttat  ggagcagcaa
61  cgatgttacg  cagcagggca  gtcgcacctaa  aacaaagttg  ggcgaaacccg  gagcctcatt
121  aattgtttacg  cggtaaaatt  aagcccttta  ccaaaccaat  acttattatg  aaaaacacaa
181  tacatatcaa  cttcgctatt  tttttaataa  ttgcaaatat  tatctacagc  agcgccagtg
241  catcaacaga  tatctctact  gttgcatctc  cattatttga  aggaactgaa  ggttggtttt
301  tactttacga  tgcattccca  aacgctgaaa  ttgctcaatt  caataaagca  aagtgtgcaa
361  cgcaaatggc  accagattca  actttcaaga  tcgcattatc  acttatggca  tttgatgcgg
421  aaataataga  tcagaaaacc  atattcaaat  gggataaaac  ccccaaagga  atggagatct
481  ggaacagcaa  tcatacacca  aagacgtgga  tgcaattttc  tgttggttgg  gtttcgcaag
541  aaataaccca  aaaaattgga  ttaaataaaa  tcaagaatta  tctcaaagat  tttgattatg
601  gaaatcaaga  cttctctgga  gataaagaaa  gaaacaacgg  attaacagaa  gcatggctcg
661  aaagtagctt  aaaaatttca  ccagaagaac  aaattcaatt  cctgcgtaaa  attattaatc
721  acaatctccc  agttaaaaac  tcagccatag  aaaaacccat  agagaacatg  tatctatcag
781  atctgggata  tagtacaaaa  ctgtatggga  aaactgggtg  aggatccaca  gcaaatagaa
841  ccttacaaaa  cggatgggtt  gaaggggtta  ttataagcaa  atcaggacat  aaatatgttt
901  ttgtgtccgc  acttacagga  aacttggggt  cgaatttaac  atcaagcata  aaagccaaga
961  aaaatgcgat  caccattcta  aacacactaa  atttataaaa  aatctaattg  caaaatcgcc
1021  caacccttca  atcaagtcgg  gacggccaaa  agcaagcttt  tggctcccct  cgctggcgct
1081  cggcgcccct  tatttcaaac  gttaaacatc  atgagggaag  tggatgatcg  cgaagtatcg
1141  actcaactat  cagaggtagt  tggcgctatc  gagcgccatc  tcgaaccgac  gttgctggcc
1201  gtacatttgt  acggctccgc  agtggatggc  ggcctgaagc  cacacagtga  tattgatttg
1261  ctggttacgg  tgaccgtaag  gcttgatgaa  acaacgcggc  gagctttgat  caacgacctt
1321  ttggaaactt  cggcttcccc  tggagagagc  gagattctcc  gcgctgtaga  agtcaccatt
1381  gttgtgcacg  acgacatcat  tccgtggcgt  tatccagcta  agcgcgaaat  gcaatttggg
1441  gaatggcagc  gcaatgacat  tcttgcaggt  atcttcgagc  cagccacgat  cgacattgat
1501  ctggctatct  tgctgacaaa  agcaagagaa  catagcggtg  ccttggttag  tccagcggcg

```

```

1561 gaggaactct ttgatccggt tcctgaacag gatttatttg aggcgctaaa tgaaacctta
1621 acgctatgga actcgccgcc cgactgggct ggcgatgagc gaaatgtagt gcttacgttg
1681 tcccgcattht ggtacagcgc agtaaccggc aaaatcgcgc cgaaggatgt cgctgccgac
1741 tgggcaatgg agcgctgcc ggcccagtat cagcccgtca tacttgaagc tagacaggct
1801 tatcttgac aagaagaaga tcgcttgcc tcgcgcgcag atcagttgga agaatttgtt
1861 cactacgtga aaggcgagat caccaaggta gtcggcaaat aatgtctaac aattcggtca
1921 agccgacgcc gcttcgcggc gcggcttaac tcaagcgta gatgcactaa gcgcataatt
1981 gctcacagcc aaactatcag gtcaagtctg ctt
//

```

GenBank: EU250576.1

Escherichia coli isolate KD46 class 1 integron dihydrofolate reductase type I (dfrA7) gene, complete cds

LOCUS EU250576 769 bp DNA linear BCT 02-MAR-2009

DEFINITION Escherichia coli isolate KD46 class 1 integron dihydrofolate reductase type I (dfrA7) gene, complete cds.

ACCESSION EU250576

VERSION EU250576.1 GI:160714713

KEYWORDS .

SOURCE Escherichia coli

ORGANISM [Escherichia coli](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 769)

AUTHORS Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.

TITLE Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey

JOURNAL J. Microbiol. 47 (1), 19-27 (2009)

PUBMED [19229487](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 769)

AUTHORS Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-OCT-2007) Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Rize University, Milli Piyango Egitim Kampusu, Rize 53100, Turkey

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..769

/organism="Escherichia coli"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="KD46"

/isolation_source="river"

/db_xref="taxon:[562](#)"

[repeat_region](#) 1..769

/mobile_element="integron:class 1"

[misc feature](#) 1..97

/note="5' conserved region"

[gene](#) 119..592

/gene="dfrA7"

[CDS](#) 119..592

/gene="dfrA7"

/note="DFRA7"

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="dihydrofolate reductase type I"

/protein_id="[ABX47160.1](#)"

/db_xref="GI:160714714"

/translation="MKISLISATSENGVIGNGPDIPWSAKGEQLLFKALTYNQWLLVGRKTFDSMGVLPNRKYAVVSRKGISSNENVLVFPSEIALQELSKITDHLVVSQGGQIYNSLIEKADIIHLSTVHVEVEGDINFPKIPENFNLVFEQFFLSNINYTYQIWKKG"

[misc feature](#) 738..769

/note="3' conserved region"

ORIGIN

```

1  ggcatccaag cagcaagcgc gttacgccgt gggtcgatgt ttgatgttat ggagcagcaa
61  cgatgttacg cagcagggca gtcgccttaa aacaaagtta gccattacgg ggggtgaatt
121  gaaaatttca ttgatttctg caacgtcaga aaatggcgta atcggtaatg gccctgatat
181  cccatgggtca gcaaaaagtg agcagt tact ctttaaagcg ctacatatata atcagtggct
241  ccttggttga aggaaaacat ttgactctat ggggtgttctt ccaaactgaa aatatgcagt
301  agtgtcgagg aaaggaattt caagctcaaa tgaaaatgta ttagtctttc cttcaataga
361  aatcgctttg caagaactat cgaaaattac agatcattta tatgtctctg gtggcgggtca
421  aatctacaat agtcttattg aaaaagcaga tataattcat ttgtctactg ttcacgttga
481  gggtgaaggt gatatcaatt ttcctaaaat tccagagaat ttcaatttgg tttttgagca
541  gttttttttg tctaataataa attacacata tcagatttgg aaaaaaggct aacaagtcgt
601  tccagcacca gtcgctgcgc tccttgga gtttttaagt cgcggtttta tggttttgct
661  gcgcaaaagt attccataaa accacaactt aaaaactgcc gctgaactcg gcgttagatg
721  cactaagcac ataattgctc acagccaaac tatcagggtca agtctgctt
//

```

GenBank: EU339233.1

Escherichia coli strain KD54 class 1 integron dihydrofolate reductase type 2 (dfr2d) gene, complete cds

LOCUS EU339233 561 bp DNA linear BCT 02-MAR-2009
 DEFINITION Escherichia coli strain KD54 class 1 integron dihydrofolate reductase type 2 (dfr2d) gene, complete cds.
 ACCESSION EU339233
 VERSION EU339233.1 GI:164429812
 KEYWORDS .
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 561)
 AUTHORS Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
 TITLE Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey
 JOURNAL J. Microbiol. 47 (1), 19-27 (2009)
 PUBMED [19229487](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 561)
 AUTHORS Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-DEC-2007) Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Rize University, Milli Piyango Egitim Kampusu, Rize 53100, Turkey
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..561
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="KD54"
 /isolation_source="river"
 /db_xref="taxon:[562](#)"
[repeat_region](#) 1..561
 /mobile_element="integron:class 1"
[gene](#) 165..401
 /gene="dfr2d"
[CDS](#) 165..401
 /gene="dfr2d"
 /note="DFR2D; confers resistance to trimethoprim"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="dihydrofolate reductase type 2"
 /protein_id="[ABY55281.1](#)"
 /db_xref="GI:164429813"
 /translation="MNEGKNEVSTSAAGRFAFPSNATFALGDRVVRKKSGAAWQGRIVG WYCTTLTPEGYAVESESHPDVSVQIYPM TALERVA"
 ORIGIN

```

1  ggcatccaag cagcaagcgc gttacgccgt gggtcgatgt ttgatgttat ggagcagcaa
61  cgatgttacg cagcagggca gtcgccttaa aacaaagttg ggcttcacca gagtatcaag
121 ttgccgagct ggcgataacc taaaacatta aaaagagggt tgaaatgaat gaaggaaaaa
181 atgaggtcag tacttcagct gctggccggt tcgcattccc atcaaacgcc acgtttgcct
241 tgggggatcg cgtacgcaag aagtctggcg ctgcttggca ggggcgcatt gtcgggtggt
301 actgcacaac acttaccctt gaaggctacg ccgtcagatc cgaatctcac ccagactcag
361 tccagattta tcccatgact gcgcttgaac ggggtggcctg aagtcacggt tgaaatgcac
421 cgctgacgga ccaaatcatg cggcaccgtc cacagcccaa ctagtcgctc cagcggatgg
481 cttcgccgcc cgctgagcta attcgtaga tgcactaagc acataattgc tcacagccaa
541 actatcaggt caagtctgct t
//

```

GenBank: EU158182.1

Citrobacter koseri isolate KD61 class 1 integron dihydrofolate reductase (dfrA16) gene, complete cds

LOCUS EU158182 741 bp DNA linear BCT 04-MAR-2009

DEFINITION Citrobacter koseri isolate KD61 class 1 integron dihydrofolate reductase (dfrA16) gene, complete cds.

ACCESSION EU158182

VERSION EU158182.1 GI:157956074

KEYWORDS .

SOURCE Citrobacter koseri

ORGANISM [Citrobacter koseri](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Citrobacter.

REFERENCE 1 (bases 1 to 741)

AUTHORS Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.

TITLE Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey

JOURNAL J. Microbiol. 47 (1), 19-27 (2009)

PUBMED [19229487](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 741)

AUTHORS Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-SEP-2007) Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Rize University, Milli Piyango Egitim Kampusu, Rize 53100, Turkey

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..741

/organism="Citrobacter koseri"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="KD61"

/isolation_source="river"

/db_xref="taxon:545"

[repeat region](#) 1..741

/mobile_element="integron:class 1"

[misc feature](#) 1..116

/note="5' conserved segment"

[gene](#) 117..590

/gene="dfrA16"

[CDS](#) 117..590

/gene="dfrA16"

/note="DFRA16; confers resistance to trimethoprim"

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="dihydrofolate reductase"

/protein_id="[ABW06431.1](#)"

/db_xref="GI:157956075"

/translation="MKLSLMAAKSKNGIIGNGPDIPWSAKGEQLLFKAITYNQWLLVG RKT FESMGALPNRKYAVVTRSNFSTNDEGVMVFSSIQDALINLEEITGHVIVSGGGEI YKSLISKVDTLHISTVDIERDGDIVFPEIPDTFKLVFEQDFESNINICYQIWQKS"

[misc feature](#) 591..741

```

                                /note="3' conserved segment"
ORIGIN
    1 ggcattccaag cagcaagcgc gttacgccgt gggtcgatgt ttgatgttat ggagcagcaa
   61 cgatgtttacg cagcagggca gtcgccctaa aacaaagtta actcgaggga gaaatcgtga
  121 agttatcact aatggctgcc aagtcgaaga acggtattat cggtaatgga ccagatattc
  181 catggagcgc caaaggcgag caacttctat ttaaggcaat tacatataat caatggcctt
  241 tagttggacg caaaactttt gagtcaatgg gcgctctccc aaatcgaaag tatgcagttg
  301 taactcgtc taatttttct acgaatgatg aggggtgtaat ggttttctcc tcaattcagg
  361 atgccttaat aaatttagag gaaatcacgg gtcattgtat cgtttctggt ggtggtgaaa
  421 tatacaaaaag cttgatttcc aaagtagata ctttgcataat ttcaacagtc gacatcgagc
  481 gagatggaga catagttttt cctgaaatcc cagatacatt caagttggta tttgagcaag
  541 atttcgagtc taacattaac tattgttatc aaatctggca aaagagttaa caagcgctg
  601 caatctgacc tccggtact gtcactttt tttgcggtgg agctgcaaaa aaggcgccat
  661 taacctccgg cagttgaggc gggcgttaga tgcactaagc acataattgc tcacagccaa
  721 actatcaggt caagtctgct t
//

```

GenBank: EU250577.1

Escherichia coli isolate KD62 class 1 integron dihydrofolate reductase type I (dfrA7) gene, complete cds

```

LOCUS      EU250577              769 bp    DNA     linear   BCT 02-MAR-2009
DEFINITION Escherichia coli isolate KD62 class 1 integron dihydrofolate
            reductase type I (dfrA7) gene, complete cds.
ACCESSION  EU250577
VERSION    EU250577.1  GI:160714715
KEYWORDS   .
SOURCE     Escherichia coli
  ORGANISM Escherichia coli
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
            Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE  1 (bases 1 to 769)
  AUTHORS  Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
  TITLE    Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic
            resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey
  JOURNAL  J. Microbiol. 47 (1), 19-27 (2009)
  PUBMED   19229487
REFERENCE  2 (bases 1 to 769)
  AUTHORS  Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (27-OCT-2007) Department of Biology, Faculty of Arts and
            Sciences, Rize University, Milli Piyango Egitim Kampusu, Rize
            53100, Turkey
FEATURES   Location/Qualifiers
            source             1..769
                                /organism="Escherichia coli"
                                /mol_type="genomic DNA"
                                /isolate="KD62"
                                /isolation_source="river"
                                /db_xref="taxon:562"
            repeat\_region       1..769
                                /mobile_element="integron:class 1"
            misc feature       1..97
                                /note="5' conserved region"
            gene                119..592
                                /gene="dfrA7"
            CDS                119..592
                                /gene="dfrA7"
                                /note="DFRA7"
                                /codon_start=1
                                /transl_table=11
                                /product="dihydrofolate reductase type I"
                                /protein_id="ABX47161.1"

```

```

/db_xref="GI:160714716"
/translation="MKISLISATSENGVIGNGPDIPWSAKGEQLLFKALTYNQWLLVG
RKTFDSMGVLPNRKYAVVSRKGISSNENLVFSPSIEIALQELSKITDHLVYVSGGGQI
YNSLIEKADIIHLSTVHVEVEGDINFPKIPENFNLVFEQFFLSNINYTYQIWKKG"
misc feature 738..769
/note="3' conserved region"

ORIGIN
    1 ggcatccaag cagcaagcgc gttacgccgt gggtcgatgt ttgatgttat ggagcagcaa
    61 cgatgttacg cagcagggca gtcgccctaa aacaaagtta gccattacgg gggttgaatt
   121 gaaaatttca ttgatttctg caacgtcaga aaatggcgta atcggtaatg gccctgatat
   181 cccatgggtc gcaaaagggt agcagttact ctttaaagcg ctccatatata atcagtggct
   241 ccttggttga aggaaaacat ttgactctat ggggtgttctt ccaaactgaa aatatgcagt
   301 agtgttcgag aaaggaattt caagctcaaa tgaaaatgta ttagtctttc cttcaataga
   361 aatcgctttg caagaactat cgaaaattac agatcattta tatgtctctg gtggcggtca
   421 aatctacaat agtcttattg aaaaagcaga tataattcat ttgtctactg ttcacgttga
   481 ggttgaaggt gatatacaatt ttcctaaaaat tccagagaat ttcaatttgg tttttgagca
   541 gttttttttg tctaataataa attacacata tcagatttgg aaaaaaggct aacaagtcgt
   601 tccagcacca gtcgctgcgc tccttggaac gtttttaagt cgcggtttta tggttttgct
   661 gcgcaaaagt attccataaa accacaactt aaaaactgcc gctgaactcg gcgttagatg
   721 cactaagcac ataattgctc acagccaaac tatcagggtca agtctgctt

//

```

GenBank: EU339235.1

Klebsiella pneumoniae strain KD187 class 1 integron dihydrofolate reductase type I (dfrA7) gene, complete cds

```

LOCUS      EU339235                769 bp    DNA        linear    BCT 02-MAR-2009
DEFINITION Klebsiella pneumoniae strain KD187 class 1 integron dihydrofolate
            reductase type I (dfrA7) gene, complete cds.
ACCESSION  EU339235
VERSION    EU339235.1  GI:164429817
KEYWORDS    .
SOURCE      Klebsiella pneumoniae
  ORGANISM  Klebsiella pneumoniae
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
            Enterobacteriaceae; Klebsiella.
REFERENCE  1  (bases 1 to 769)
  AUTHORS  Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
  TITLE    Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic
            resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey
  JOURNAL  J. Microbiol. 47 (1), 19-27 (2009)
  PUBMED   19229487
REFERENCE  2  (bases 1 to 769)
  AUTHORS  Ozgumus,O.B., Sandalli,C., Sevim,A., Celik-Sevim,E. and Sivri,N.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (08-DEC-2007) Department of Biology, Faculty of Arts and
            Sciences, Rize University, Milli Piyango Egitim Kampusu, Rize
            53100, Turkey
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..769
                       /organism="Klebsiella pneumoniae"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /strain="KD187"
                       /isolation_source="river"
                       /db_xref="taxon:573"
     repeat_region     1..769
                       /mobile_element="integron:class 1"
     misc feature       1..97
                       /note="5' conserved region"
     gene              119..592
                       /gene="dfrA7"
     CDS               119..592
                       /gene="dfrA7"
                       /note="DFRA7; confers resistance to trimethoprim"

```

```

/codon_start=1
/transl_table=11
/product="dihydrofolate reductase type I"
/protein_id="ABY55284.1"
/db_xref="GI:164429818"
/translation="MKISLISATSENGVIGNGPDIPWSAKGEQLLFKALTYNQWLLVG
RKTFDYMGVLPNRKYAVVSRKGISSENENLVFSPSIEIALQELSKITDHLVSGGGQI
YNSLIEKADIIHLSTVHVEVEGDINFPKIPENFNLVFEQFFLSNINYTYQIWKKG"
misc feature 738..769
/note="3' conserved region"
ORIGIN
    1 ggcattcaag cagcaagcgc gttacgccgt gggtcgatgt ttgatgttat ggagcagcaa
   61 cgatgttacg cagcagggca gtcgccctaa aacaaagtta gccattacgg gggttgaatt
  121 gaaaatttca ttgatttctg caacgtcaga aaatggcgta atcggtaatg gccctgatat
  181 cccatggtca gcaaaaggtg agcagttact ctttaaagcg ctcacatata atcagtggct
  241 ccttgttgga aggaaaacat ttgactatat ggggtgttctt ccaaatcgaa aatatgcagt
  301 agtgtcgagg aaaggaattt caagctcaaa tgaaaatgta ttagtctttc cttcaataga
  361 aatcgctttg caagaactat cgaaaattac agatcattta tatgtctctg gtggcgggtca
  421 aatctacaat agtcttattg aaaaagcaga tataattcat ttgtctactg ttcacgttga
  481 ggttgaaggt gatatcaatt ttcctaaaaa tccagagaat ttcaatttgg tttttgagca
  541 gttttttttg tctaataata attacacata tcagatttgg aaaaaaggct aacaagtcgt
  601 tccagacca gtcgctgtgc tccttgga gtttttaagt cgcggtttta tggttttgct
  661 gcgcaaaagt attccataaa accacaactt aaaaactgcc gctgaactcg gcgttagatg
  721 cactaagcac ataattgtc acagccaaac tgtcaggtca agtctgctt
//

```

GenBank: DQ875876.1

Escherichia coli isolate Rs5a class 1 integron dihydrofolate reductase (dhfr1) and aminoglycoside-3'-adenylyltransferase (aadA1) genes, complete cds

```

LOCUS       DQ875876               1586 bp    DNA     linear   BCT 05-NOV-2007
DEFINITION  Escherichia coli isolate Rs5a class 1 integron dihydrofolate
             reductase (dhfr1) and aminoglycoside-3'-adenylyltransferase (aadA1)
             genes, complete cds.
ACCESSION   DQ875876
VERSION     DQ875876.1  GI:111661610
KEYWORDS    .
SOURCE      Escherichia coli
  ORGANISM  Escherichia coli
             Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
             Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1586)
  AUTHORS   Ozugumus,O.B., Celik-Sevim,E., Alpay-Karaoglu,S., Sandalli,C. and
             Sevim,A.
  TITLE     Molecular Characterization of Antibiotic Resistant Escherichia coli
             Strains Isolated from Tap and Spring Waters in a Coastal Region in
             Turkey
  JOURNAL   J. Microbiol. 45 (5), 379-387 (2007)
  PUBMED   17978796
REFERENCE   2  (bases 1 to 1586)
  AUTHORS   Ozgumus,O.B., Alpay Karaoglu,S., Sevim,E., Sandalli,C., Sevim,A.
             and Yesilgil,P.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (01-AUG-2006) Department of Biology, Karadeniz Technical
             University, Rize Faculty of Arts and Sciences, Milli Piyango
             Kampusu, Fener Mahallesi, Rize 53100, Turkey
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1586
                       /organism="Escherichia coli"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /isolate="Rs5a"

```

```

/db_xref="taxon:562"
repeat_region 1..1586
/mobile_element="integron:class 1"
misc_recomb 97..103
/note="recombination core site"
gene 133..591
/gene="dhfr1"
CDS 133..591
/gene="dhfr1"
/note="DHFR1; resistance to trimethoprim"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="dihydrofolate reductase"
/protein_id="ABH12146.1"
/db_xref="GI:111661611"
/translation="MVAISKNGVIGNGPDIPWSAKGEQLLFKAITYNQWLLVGRKTFE
SMGALPNRKYAVVTRSSFTSDNENVVIFPSIKDALTNLKKITDHVIVSGGGEIYKSLI
DQVDTLHISTIDIEPEGDVYFPEIPSNFRPVFTQDFASNLNYSYQIWQKG"
misc_recomb 674..680
/note="putative inverse recombination core site"
gene 684..1475
/gene="aadA1"
CDS 684..1475
/gene="aadA1"
/note="AadA1; confers resistance to streptomycin and
spectinomycin"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="aminoglycoside-3'-adenylyltransferase"
/protein_id="ABH12147.1"
/db_xref="GI:111661612"
/translation="MREAVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKP
HSDIDLLVTVTVRLDETTRRALINDLLETSPGSEILRAVEVTIVHDDIIPWRYP
AKRELQFGWQRNDILAGIFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAEELFDPVPEQ
DLFEALNETLTLWNSPPDWAGDERNVVLTLSRIWYSAVTGRIAPKDVAAADWAMERLPA
QYQPVILEARQAYLQGEEDRLASRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK"
misc_recomb 1477..1483
/note="inverse recombination core site"
misc_recomb 1573..1579
/note="putative recombination core site"
ORIGIN
1 ggcattccaag cagcaagcgc gttacgcctg gggatcgatgt ttgatgttat ggagcagcaa
61 cgatgttacg cagcagggca gtcgccttaa aacaaagtta acctctgagg aagaattgtg
121 aaactatcac taatggtagc tatatcgaag aatggagtta tcgggaatgg ccctgatatt
181 ccattggagt ccaaagggtg acagctcctg tttaaagcta ttacctataa ccaatggctg
241 ttggttggac gcaagacttt tgaatcaatg ggagcattac ccaaccgaaa gtatgctggtc
301 gtaacacggt caagtgtttac atctgacaat gagaacgtag tgatctttcc atcaattaaa
361 gatgctttta ccaacctaaa gaaaataacg gatcatgtca ttgtttcagg tgggtgggag
421 atatacaaaa gcctgatcga tcaagtagat aactacata tatctacaat agacatcgag
481 ccggaagggt atgtttactt tctgaaatc ccagcaatt ttaggccagt tttacccaa
541 gacttcgcct ctaacctaaa ttatagttac caaatctggc aaaagggtta acaagtggca
601 gcaacggatt cgcaaacctg tcacgccttt tgtaccaaaa gccgcgccag gtttgcgatc
661 cgctgtgccg ggcgttaaac atcatgaggg aagcgggtgat cgccgaagta tcgactcaac
721 tatcagaggt agttggcgtc atcagagcgc atctcgaacc gacgttgctg gccgtacatt
781 tgtacggctc cgagtggtat ggcgcctga agccacacag tgatattgat ttgctgggta
841 cggtagcctg aaggcttgat gaaacaacgc ggagagcttt gatcaacgac cttttggaaa
901 cttcgcttcc ccctggagag agcgagattc tccgcgctgt agaagtcacc attgttgtgc
961 acgacgacat cattccgtgg cggtatccag ctaagcgaga actgcaattt ggagaatggc
1021 agcgcaatga cattcttgca ggtatcttcg agccagccac gatcgacatt gatctggcta
1081 tcttgctgac aaaagcaaga gaacatagcg ttgccttggt aggtccagcg gcggaggaaac
1141 tctttgatcc ggttcctgaa caggatctat ttgagcgctt aaatgaaacc ttaacgctat
1201 ggaactcgcc gcccgactgg gctggcgatg agcgaaatgt agtgcttacg ttgtcccgca
1261 tttggtacag cgcagtaacc ggcagaatcg cgccgaagga tgtcgctgcc gactgggcaa
1321 tggagcgctt gccggcccag tatcagcccg tcatacttga agctagacag gcttatcttg
1381 gacaagaaga agatcgcttg gcctcgcgcg cagatcagtt ggaagaattt gttcactacg
1441 tgaaaggcga gatcaccgaag gtagtcggcg aataatgtct aacaattcgt tcaagccgac
1501 gccgcttcgc ggcgcgctt aactcaagcg ttagatgcac taagcacata attgctcaca

```

1561 gccaaactat caggtcaagt ctgctt

//GenBank: DQ875874.1

Escherichia coli isolate Rs411b class 1 integron dihydrofolate reductase (dhfr17) and aminoglycoside-3'-adenylyltransferase (aadA5) genes, complete cds

LOCUS DQ875874 1663 bp DNA linear BCT 05-NOV-2007
DEFINITION Escherichia coli isolate Rs411b class 1 integron dihydrofolate reductase (dhfr17) and aminoglycoside-3'-adenylyltransferase (aadA5) genes, complete cds.
ACCESSION DQ875874
VERSION DQ875874.1 GI:111661581
KEYWORDS .
SOURCE Escherichia coli
ORGANISM [Escherichia coli](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1663)
AUTHORS Ozugumus,O.B., Celik-Sevim,E., Alpay-Karaoglu,S., Sandalli,C. and Sevim,A.
TITLE Molecular Characterization of Antibiotic Resistant Escherichia coli Strains Isolated from Tap and Spring Waters in a Coastal Region in Turkey
JOURNAL J. Microbiol. 45 (5), 379-387 (2007)
PUBMED [17978796](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1663)
AUTHORS Ozgumus,O.B., Alpay Karaoglu,S., Sevim,E., Sandalli,C., Sevim,A. and Yesilgil,P.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (01-AUG-2006) Department of Biology, Karadeniz Technical University, Rize Faculty of Arts and Sciences, Milli Piyango Kampusu, Fener Mahallesi, Rize 53100, Turkey
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1663
/organism="Escherichia coli"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Rs411b"
/db_xref="taxon:[562](#)"
[repeat region](#) <1..>1663
/mobile_element="integron:class 1"
[misc feature](#) 1..97
/note="5' conserved segment"
[misc feature](#) 98..714
/note="dhfr17 gene cassette"
[gene](#) 119..592
/gene="dhfr17"
[CDS](#) 119..592
/gene="dhfr17"
/note="confers resistance to trimethoprim"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="dihydrofolate reductase"
/protein_id="[ABH12142.1](#)"
/db_xref="GI:111661582"
/translation="MKISLISAVSENGVIGSGPDIPWSVKGEQLLFKALTYNQWLLVG
RKTFDSMGVLPNRKYAVVSKNGISSNENVLVFPSEIENALKELSKVTDHVVVSGGGQI
YNSLIEKADIIHLSTVHVEVEGDIKFPIMPENFNLVFEQFFMSNINYTYQIWKKG"
[misc recomb](#) 587..714
/note="putative 59 base element"
[misc feature](#) 715..1607
/note="aadA5 gene cassette"
[gene](#) 724..1512

```

CDS
    /gene="aadA5"
    724..1512
    /gene="aadA5"
    /note="AadA5; confers resistance to streptomycin and spectinomycin"
    /codon_start=1
    /transl_table=11
    /product="aminoglycoside-3'-adenylyltransferase"
    /protein_id="ABH12143.1"
    /db_xref="GI:111661583"
    /translation="MGEFFPAQVFKQLSHARAVIERHLAATLDTIHLFGSAIEGGLKP
DSDIDLLVTVSAAPNDSLRLQALMLDLLKVSSPPGDGGTWRPLELTVVARSEVVPWRYP
ARRELQFGEWLRHDILSGTFEPVLDHDLAILLTKARQHSALLGPSAATFFEPVPKE
HFSKALFDITIAQWNAESDWKGDERNVVLALARIWYSASTGLIAPKDVAWAWSERLPA
EHRPLICKARAAYLGSEDDDLAMRVEETAAFVRYAKATIERILR"
misc_recomb
    1559..1607
    /note="putative 59 base element"
misc_feature
    1608..1663
    /note="3' conserved segment"
ORIGIN
    1  ggcatccaag  cagcaagcgc  gttacgccgt  gggtcgatgt  ttgatgttat  ggagcagcaa
    61  cgatgttacg  cagcagggca  gtcgccctaa  aacaaagtta  gccattaagg  gagttaaatt
    121  gaaaatatca  ttgatttctg  cagtgtcaga  aaatggcgta  atcggtagtg  gtctgatata
    181  cccgtgggtc  gtaaaagggt  agcaactact  ctttaaagcg  ctcatatata  atcaatggct
    241  ccttgtcgga  agaaaaacat  ttgactctat  gggcgttctt  ccaaatcgca  aatatgcagt
    301  agtgtcaaa  aacggaattt  caagctcaaa  tgaaaacgtc  ctagtttttc  cttcaataga
    361  aaatgctttg  aaagagctat  caaaagttac  agatcatgta  tatgtctctg  gcgggggtca
    421  aatctataat  agccttattg  aaaaagcaga  tataattcat  ttgtctactg  ttcacgttga
    481  agtcgaaggt  gatatacaat  tccctataat  gcctgagaat  ttcaatttgg  tttttgaaca
    541  gttttttatg  tctaataata  attatacata  ccagatttgg  aaaaaaggct  aacaatgcgt
    601  tgcagacca  gtcgcttcgc  tccttgga  gctttttaag  tcgctgtctt  gtggttttgc
    661  tgcgcaaaag  tattccacaa  agccgcaact  taaaagctgc  cgctgaactt  aacgttaggc
    721  atcatgggtg  aatttttccc  tgcacaagtt  ttcaagcagc  tgtcccacgc  tcgcgcggtg
    781  atcgagcgcc  atctggctgc  gacactggac  acaatccacc  tggtcggatc  tgcgatcgag
    841  ggagggctga  agccggacag  cgacatagac  ttgctcgtga  ccgtcagcgc  cgcacctaac
    901  gattcgctcc  ggacggcgct  aatgctcgat  ttgctgaaag  tctcatcacc  gccaggcgat
    961  ggcggaacat  ggcgaccgct  ggagctaact  gttgtcgctc  gaagcgaagt  agtgccttgg
    1021  cgctatccgg  cgcgcgctga  gcttcagttc  ggtgagtggc  tccgccacga  catcctttcc
    1081  ggaacgttcg  agcctgcccgt  tctggatcac  gatcttgcca  ttttgctgac  caaggcgagg
    1141  caacacagcc  ttgcgcttct  aggcccatcc  gcagccacgt  ttttcgagcc  ggtgccgaag
    1201  gagcatttct  ccaaggcgct  tttcgacact  attgccaggt  ggaatgcaga  gtcggattgg
    1261  aagggtgacg  agcggaacgt  cgttcttgct  cttgctcgca  tttggtacag  cgcttcaact
    1321  ggtctcattg  ctccctaagga  cgttgctgcc  gcatgggtat  cggagcggtt  gcctgccgag
    1381  catcggtccc  tcatctgcaa  ggacgcgcgc  gcgtacctgg  gtacgcagga  cgacgacctc
    1441  gcaatgcgcg  tcgaagagac  ggccgcgttc  gttcgatatg  ccaaagcaac  gattgagaga
    1501  atcttgcggt  gagcggcatg  tgcgaaaagt  gcacgcaccc  gcgccgaggg  catctgatgc
    1561  ctaactcggc  gttcaagcgg  ctgagccgcc  cgccgctcaa  ctatgcgtta  gatgcactaa
    1621  gcacataatt  gctcacagcc  aaactatcag  gtcaagtctg  ctt

```

//

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 105T315
Proje Başlığı: Trabzon Yöresindeki Derelerden İzole Edilen Çoğul Antibiyotik Dirençli Koliform Bakterilerde Sınıf 1 İntegron Gen Kasetlerinin Moleküler Epidemiyolojisi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ, Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI, Arş. Gör. Ali SEVİM
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Rize Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Milli Piyango Eğitim Kampusu, 53100 Rize.
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.08.2007 – 01.05.2009
Öz (en çok 70 kelime) Trabzon'un 10 deresinden bir yıl boyunca izole edilmiş 183 koliform, sınıf 1 integronlar açısından PZR ile tarandı. Konjugatif antibiyotik direnç plazmitleri yanında %7.6 oranında sınıf 1 integron taşıyıcılığı tespit edildi. Türkiye'de ilk defa çevre orijinli bir bakteride <i>qnrS</i> geni belirlendi. DNA dizi analizleri, integronların <i>dfrA1</i> , <i>dfr2d</i> , <i>dfrA7</i> , <i>dfrA16</i> , <i>dfrA17</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA5</i> ve <i>bla_{OXA-30}</i> gibi gen kasetleri taşıdığını gösterdi. Bu bakteriler çevre bakterileri ile insan patojenleri arasında direnç genlerini yayabilecek potansiyelindedirler.
Anahtar Kelimeler: Dere suları, enterik bakteriler, çoğul antibiyotik direnci, sınıf 1 integron gen kasetleri.
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet ☐ Gerekli Değil ☒ Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: 1. Ozgumus O. B., Sandalli C., Sevim A., Celik-Sevim E., Nuket S., Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. <i>Journal of Microbiology</i>, 47, 19-27, (2009). 2. Ozgumus O.B., Sandalli C., Caylan R., Tosun I., Aydin K., Koksall I., Sevim A., Celik-Sevim E., Alpay-Karaoglu S., Colakoglu F., Sivri N., Kolayli F., Yesilgil-Atasoy P., A molecular perspective on integron-associated and transferable antibiotic resistance in clinical and aquatic isolates of Gram-negative bacteria in northern region of Turkey. <i>EHRlich-II-2nd World Conference on Magic Bullets</i>, pA244, October 3-5, Nürnberg, Germany, 2008 (oral presentation). 3. Özgümüş O.B., Sandalli C., Sevim A., Typing of tetracycline resistance genes in tetracycline-resistant <i>Enterobacteriaceae</i> obtained from a coliform collection. <i>Turkish Journal of Biology</i> (under review).