

Klinik *Stenotrophomonas maltophilia* İzolatlarında Sınıf 1, 2, 3 İntegron Varlığının ve Antibiyotik Direnci ile İlişkilerinin Araştırılması*

Investigation of the Presence of Class 1, 2, 3 Integrons and Their Relationships with Antibiotic Resistance in Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates

Egemen USTA¹, Cafer EROĞLU², Kerametdin YANIK², Adil KARADAĞ², Akif Koray GÜNEY³, Murat GÜNAYDIN⁴

¹ Halk Sağlığı Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Samsun.

¹ Public Health Microbiology Laboratory, Samsun, Turkey.

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

² Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Samsun, Turkey.

³ Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

³ Atatürk Chest Diseases and Chest Surgery Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

⁴ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ Istanbul University Cerrahpasa Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından PYO.TIP.1904.12.029 proje numarası ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 23.07.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.10.2014

ÖZ

Stenotrophomonas maltophilia, hastane enfeksiyonu etkeni olarak giderek artan sıklıkla karşılaşılan fırsatçı bir patojendir. Birçok farklı mekanizmaya bağlı olarak geniş spektrumlu antibiyotiklerin çoğuna dirençlidir ve bu durum klinikte tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Direnç genlerinin aktarımında rol oynayan mobil genetik elemanlar olan integronların, farklı gram-negatif bakterilerde antibiyotik direnci ile olan ilişkisi irdelenmiş olmasına rağmen, özellikle *S.maltophilia* için ülkemizdeki veriler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, klinik *S.maltophilia* izolatlarında farklı sınıf integronların ve plazmid varlığının araştırılması ve bunların antibiyotik direnç profili ile ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2011-Eylül 2012 tarihleri arasında mikrobiyoloji laboratuvarında klinik örneklerden (32 balgam, 25 trakeal aspirat, 9 idrar ve kan, 7 eksuda ve kateter, 4 steril vücut sıvısı ve yara, 2 BOS, 1 konjunktiva) izole edilen 100 *S.maltophilia* suşu dahil edilmiştir. İzolatlar, VITEK2 Compact (BioMerieux, Fransa) veya Phoenix 100 (BD, ABD) otomatize sistemleri ile tanımlanmış; seftazidim, trimetoprim/sülfametoksazol

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Kerametdin Yanık, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 55139 Kurupelit, Samsun, Türkiye **Tel (Phone):** +90 362 312 1919, **E-posta (E-mail):** keramettinyanik@gmail.com

(SXT), levofloksasin ve kloramfenikole karşı duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Tüm suşlarda sınıf 1 (*intl-1*), sınıf 2 (*intl-2*), sınıf 3 (*intl-3*) integron gen kasetleri ve integron 5'-3' korunmuş gen bölgeleri (*intl-5'-3'CS*), özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Pozitiflik saptandığında PCR ürünlerinin nükleotid dizi analizi yapılmış, aynı zamanda bu suşlarda plazmid varlığı araştırılmış ve bulunan plazmidlerin büyüklükleri belirlenmiştir. İzolatların seftazidim, kloramfenikol, SXT ve levofloksasine karşı duyarlılık oranları sırasıyla %24, %66, %93 ve %95 olarak saptanmış; MIC_{50} ve MIC_{90} değerleri ise sırasıyla 64-128 µg/ml, 8-16 µg/ml, 1/19-2/38 µg/ml ve 1-2 µg/ml olarak bulunmuştur. PCR yönteminde, *intl-1*, *intl-2* ve *intl-3* primerleri ile yapılan amplifikasyonda, suşların sırasıyla %12, %2 ve %10'unda şüpheli bantlar elde edilmiştir. Amplifiye edilen ürünlerin dizi analizleri yapıldığında, beş izolatin *intl-1* geni içerdiği, ancak hiçbirisinde sınıf 2 ve 3 *intl* geni bulunmadığı görülmüştür. *Intl-5'CS* ve 3'CS primerleri ile yapılan amplifikasyonda ise 20 suş şüpheli bant vermiş, dizi analizinde bunların ikisinde kuarterner amonyum direnç protein geni (*qacl*), birinde aminoglikozid adeniltransferaz geni (*aadA*) ve beşinde integronla ilişkili rekombinasyon bölgesi (*attI1*) geninin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca suşların 9 (%9)'unda plazmid varlığı saptanmış, ancak bu suşların hiçbirinde integron pozitifliği izlenmemiştir. Plazmidlerin boyutları 17200, 2340, 1350, 2760, 18600, 20000, 3570-2540, 2510 ve 5000-2540 baz çifti olarak tespit edilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılık profili ile *intl* gen bölgesi varlığı karşılaştırıldığında, antibiyotik direnç durumu ve gen bölgesi varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p > 0.05$). Sonuç olarak çalışmamızda, klinik *S.maltophilia* suşlarında integron sınıf 1 geni ve plazmid varlığının gösterilmiş olması, hastanemizde dirençli suşların yayılımının artabileceği konusunda uyarıcı bir veri olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Stenotrophomonas maltophilia*; sınıf 1,2,3 integronlar; plazmid; dizi analizi.

ABSTRACT

Stenotrophomonas maltophilia is an opportunistic emergent pathogen causing hospital-acquired infections. It is resistant to majority of the broad spectrum antibiotics due to several mechanisms which significantly limit the treatment options. Although the relationship between integrons, mobile genetic elements which play role in transferring resistance genes, and the antibiotic resistance in different gram-negative bacteria have been investigated, the data are limited in Turkey especially for *S.maltophilia*. The aims of this study were to detect the presence of different classes of integrons and plasmids in clinical isolates of *S.maltophilia* and to investigate the antibiotic resistance profiles of those isolates. One hundred *S.maltophilia* strains isolated from various clinical samples (32 sputum, 25 tracheal aspirates, 9 urine and blood, 7 exudates and catheters, 4 sterile body fluids and wounds, 2 CSF, 1 conjunctiva) in our microbiology laboratory during January 2011-September 2012, were included in the study. The isolates were identified by VITEK2 Compact (BioMerieux, France) or Phoenix 100 (BD, USA) automated systems, and the susceptibilities of the strains to levofloxacin, chloramphenicol, ceftazidime and trimethoprim/sulfamethoxazol (SXT) were evaluated via broth microdilution method according to the CLSI recommendations. Class 1 (*intl-1*), class 2 (*intl-2*), class 3 (*intl-3*) integron gene cassettes and integron 5'-3' conserved gene regions (*intl-5'-3'CS*) were investigated by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers in all of the strains. Nucleotide sequence analysis of PCR products was performed in case of positive result, and the presence and size of plasmids were further investigated. The susceptibility rates of *S.maltophilia* strains to ceftazidime, chloramphenicol, SXT and levofloxacin were found as 24%, 66%, 93% and 95%, respectively, while MIC_{50} and MIC_{90} values were 64-128 µg/ml, 8-16 µg/ml, 1/19-2/38 µg/ml and 1-2 µg/ml, respectively. In PCR amplification with *intl-1*, *intl-2* and *intl-3* primers, 12%, 2% and 10% of the isolates yielded expectative bands, respectively. DNA sequence analysis of the amplified products revealed five isolates to harbour *intl-1* gene, while *intl* class 2 and class 3 genes were not detected in any of the strains. Furthermore in PCR amplification with *intl-5'CS* and 3'CS primers, 20% of the strains yielded expected bands. Sequence analysis of these amplicons revealed the presence of quaternary ammonium compound resistance protein genes (*qacl*) in two, aminoglycoside adenyltransferase gene (*aadA*) in one and integron-associated recombination site (*attI1*) genes in five

strains. Additionally, the presence of plasmids have been detected in 9 (9%) of the strains, however all of them was integron-negative. The sizes of plasmids were 2340, 1350, 2760, 18600, 20000, 3570-2540, 2510 and 5000-2540 base pairs, respectively. When the antibiotic susceptibility patterns of strains were compared with the presence of *intl* gene regions, no statistically significant relationship was observed ($p > 0.05$). In conclusion, the demonstration of integron class 1 genes and plasmids among clinical *S.maltophilia* strains is regarded as a warning data to indicate the potential for spread of those resistant strains in our hospital.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*; class 1,2,3 integrons; plasmid; sequence analysis.

GİRİŞ

Stenotrophomonas maltophilia son on yılda önemli bir nozokomiyal patojen olarak dikkati çeken fermentatif olmayan bir bakteridir. *S.maltophilia*'ya bağlı enfeksiyonlar, özellikle kateteri bulunan veya mekanik solunum aletine bağlı yoğun bakım hastalarında ve immünsüpresif hastalarda görölmektedir. Uzun süreli hastanede yatış ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, bu mikroorganizmaya bağlı enfeksiyon riskini artırmaktadır¹. Biyofilm oluşturabilme özelliği nedeniyle *S.maltophilia*'nın etken olduğu hastane enfeksiyonlarının çoğu kateterle ilişkili olup, bu enfeksiyonlar genellikle komplikasyonlarla seyreden ve ölümlü sonuçlanan bakteriyemi ve pnömonilerdir. *S.maltophilia*, beta-laktamaz, aminoglikozid asetil transferaz ve eritromisini inaktive eden enzim ve atım pompaları kodlayan genleri nedeniyle birçok antibiyotiğe intrensek olarak dirençlidir. Karbapenemler dahil pek çok geniş spektrumlu antibiyotiğe de direnç gösterebildiğinden, *S.maltophilia* enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır². Bu bakteride, bu mekanizmaların yanında mutasyonla veya türler arasında genetik materyal aktarımı yoluyla da antibakteriyellere direnç gelişmektedir³. Bakteriler arasındaki dirence neden olan DNA transferi, transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon gibi fiziksel yollarla veya plazmidler, transpozonlar, gen kasetleri ve integronlar gibi mobil genetik elementlerin neden olduğu DNA eklenmesi sayesinde olmaktadır^{4,5}. İntegronlar, farklı bakterilere entegre olabilen ve entegre olduğu bakterilerde yabancı DNA'yı eksprese ederek horizontal gen transferine olanak sağlayan yapılardır⁵. Bugüne kadar beş farklı mobil integron sınıfı tanımlanmıştır. İlk üç integron sınıfı çoğul direnç fenotiplerinin dağılımıyla daha çok iliřkilendirilmiştir⁶. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *S.maltophilia* suşlarında farklı sınıflardaki integronların ve ilişkili gen kasetlerinin araştırılması, bunların antibakteriyel direnç ile ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşların Seçimi ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmaya, Ocak 2011-Eylül 2012 tarihleri arasında mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen suşlar arasından rastgele seçilen 100 *S.maltophilia* suşu dahil edildi. Suşların 32'si balgam, 25'i trakeal aspirat, 9'u idrar ve kan, 7'si eksuda ve kateter, 4'ü steril vücut sıvısı ve yara, 2'si BOS ve 1'i konjunktivadan izole edilmişti.

Suşların izole edildiği örneklerin 12'si yenidoğan yoğun bakım, 12'si iç hastalıkları, 10'u göğüs hastalıkları, 7'si onkoloji, 6'sı hematoloji, 5'i genel cerrahi, 4'ü üroloji, 3'ü yoğun bakım ünitesi, 3'ü ortopedi, 3'ü nefroloji, 3'ü enfeksiyon hastalıkları ve 32'si diğer kliniklerden gönderilen örneklerdi.

Suşların tür düzeyinde tanımlanması VITEK2 Compact (BioMerieux, Fransa) veya Phoenix 100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemleri ile yapıldı. İn vitro duyarlılık çalışması için "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" M100-S23'de *S.maltophilia* duyarlılık test bildirim grubu A olarak belirtilen trimetoprim/sülfametoksazol (SXT) ve B olarak belirtilen seftazidim, levofloksasin ve kloramfenikol seçildi⁷. Çalışmaya dahil edilen suşların antibiyotik duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi ve CLSI M100-S23 önerileri doğrultusunda değerlendirildi. Çalışmada kalite kontrol için *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 standart suşları kullanıldı.

DNA Ekstraksiyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA ekstraksiyonu Mueller Hinton agar (MHA) plaklarında üreyen saf kolonilerden Norgen Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.

Ekstraksiyonu yapılan DNA'lardan sınıf 1, 2, 3 integron ve 5'-3' korunmuş bölge varlığı özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile araştırıldı (Tablo I)^{8,9}. PCR'de integron 1-3 için pozitif kontrol olarak tarafımızdan dizayn edilen 200 bazlık sentetik pozitif kontrol DNA (sPK) ve integron 1 ve 2 geni taşıyan *E.coli* suşu kullanıldı. Her PCR çalışmasına iki adet pozitif kontrol (sPK ve int 1 taşıyan suş) eklendi. PCR döngüsü termal döngü cihazında (SensoQuest Labcycler, Almanya) kaynaklarda^{8,9} belirtildiği şekilde uygulandı. PCR ürünleri %1.5 agaroz jelde 100 bç DNA Ladder (Biolabs, ABD) ile birlikte yürütüldü ve Gel Doc XR (Bio-Rad, ABD) cihazında görüntüldü.

Tablo I. İntegron Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

Primer adı	Primer dizisi	Gen	Baz çifti (bç)	Kaynak no
intl-1U	5'-GTT CGG TCA AGG TTC TG-3'	<i>intl-1</i>	923	8
intl-1D	5'-GCC AAC TTT CAG CAC ATG-3'			
intl-2U	5'-GTG CAA CGC ATT TTG CAG G-3'	<i>intl-2</i>	403	8
intl-2D	5'-CAA CGG AGT CAT GCA GAT G-3'			
intl-3U	5'-CAT TTG TGT TGT GGA CGG C-3'	<i>intl-3</i>	717	8
intl-3D	5'-GAC AGA TAC GTG TTT GGC AA-3'			
5'CS	5'-GGC ATC CAA GCA GCA AG-3'	5'-3'CS	Değişken	9
3'CS	5'-AAG CAG ACT TGA CCT GA-3'			

İntegron Sınıf 1, 2, 3 ve 5'-3' Korunmuş Bölgelerinin Dizi Analizi

Dizi-PCR öncesi ve sonrası saflaştırma kiti ile saflaştırılan PCR ürünleri, üretici firmanın önerileri doğrultusunda Big Dye™ Terminator Kit (Cycle sequencing kit v3.1, Applied Biosystems, ABD) kullanılarak dizi-PCR uygulandı. Sonra ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, ABD) cihazına yerleştirilerek dizileme işlemi uygulandı. Elde edilen DNA dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) internet sitesindeki (www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankasında bulunan dizilerle karşılaştırılarak değerlendirildi.

Plazmid Varlığının Araştırılması

S.maltophilia izolatlarının %5 koyun kanlı agarda saf olarak üretilmesinden sonra, 5 ml Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine tek koloni pasajları yapıldı ve çalkalamalı etüvde 250 rpm hızında 16-18 saat 37°C'de inkübe edildi. Bu süspansiyondan 2 ml alınıp QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda plazmid ekstraksiyonu yapıldı. %0.9'luk agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüledi. BioNumerics Programı (Bio-Rad, ABD) kullanılarak plazmidlerin büyüklükleri hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS 13.0 programı kullanılarak ki-kare testi ile ve niteliksel veriler sayı ve yüzde olarak sunuldu.

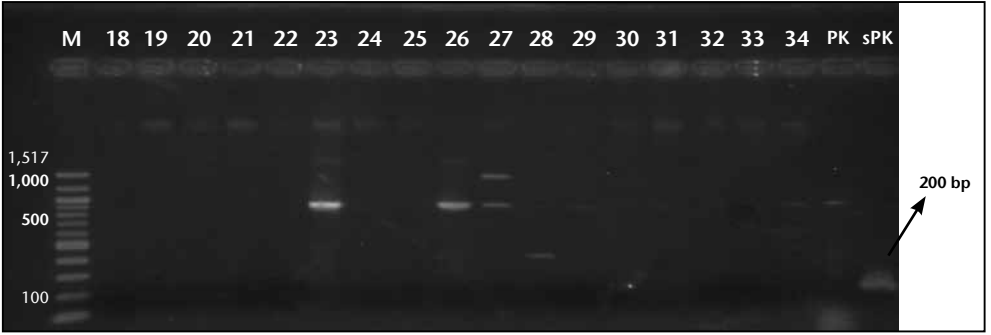
BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 100 *S.maltophilia* izolatının en duyarlı (%95) olduğu antibiyotik levofloksasin olarak saptanmış, onu SXT ve kloramfenikol izlemiştir. İzolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları ile MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin dağılımları Tablo II'de verilmiştir.

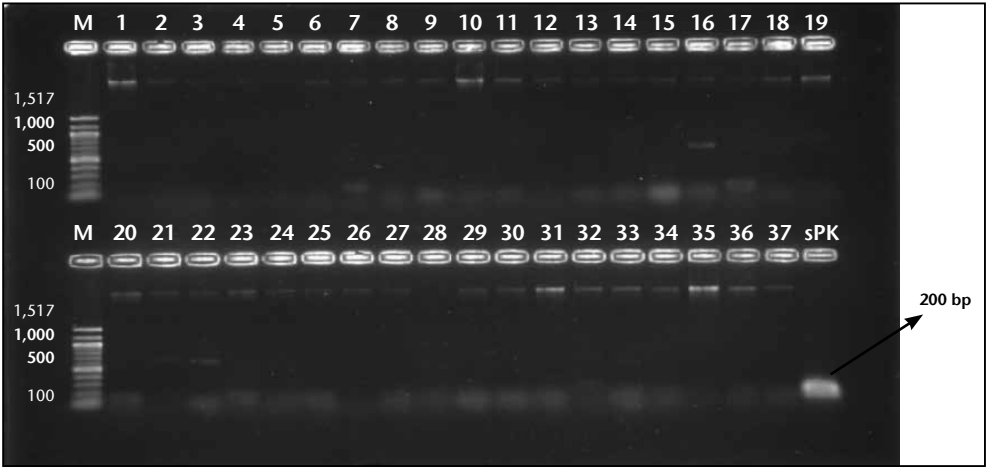
PCR'da intl-1 primeri ile yapılan amplifikasyonda 12 izolatta (no. 23, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 45, 52 ve 62) *intl* sınıf 1 geni olduğu düşünölen bantlar saptanmıştır (Resim 1). Benzer olarak, intl-2 ve intl-3 primerleri ile yapılan amplifikasyonlarda da sırasıyla 2 (17 ve 58 no'lu suşlarda farklı büyüklükte) ve 10 izolatta (no. 16, 21, 22, 43, 46, 47, 51, 55, 64 ve 96) şüpheli bantlar gözlenmiştir (Resim 2). Intl-5'CS ve 3'CS primerleri ile yapılan amplifikasyonda ise toplam 20 suşta *intl* 5'-3'CS geni olduğu düşünölen bantlar tespit edilmiştir (Resim 3).

Tablo II. *S.maltophilia* İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları

Antibiyotik	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı (µg/ml)	Duyarlı (%)	Orta duyarlı (%)	Dirençli (%)
Seftazidim	64	128	1 - > 128	24	3	73
SXT	1/19	2/38	< 0.125/2.375 - > 128/2432	93	-	7
Kloramfenikol	8	16	4 - > 128	66	25	9
Levofloksasin	1	2	< 0.125-32	95	2	3



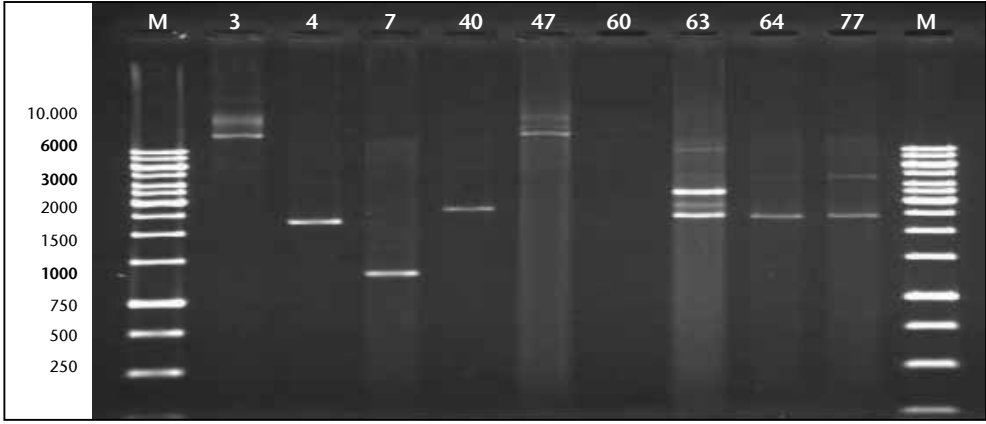
Resim 1. 18-34 no'lu izolatların *intI-1* primeri ile yapılan PCR jel görüntüsü (M: Belirteç; PK: *intI1* pozitif *E.coli*; sPK: Sentetik pozitif kontrol; Hat 23, 26-32 ve 34: Pozitif olduğu düşünülen bantlar).



Resim 2. 1-37 no'lu izolatların *intI-3* primeri ile yapılan PCR jel görüntüsü (M: 100 bç DNA belirteci; sPK: *intI-3* sentetik pozitif kontrol; Hat 16, 21 ve 22: Şüpheli pozitif bantlar).



Resim 3. 13-23 no'lu izolatların *intI-5'CS* ve *3'CS* primeri ile yapılan PCR sonrası jel görüntüsü (M: Belirteç; PK: Pozitif kontrol; Hat 14, 16 ve 23: Şüpheli pozitif bantlar).



Resim 4. Plazmid saptanan suşların jel görüntüsü (M: 1 kb belirteç).

Tablo III. Antibiyotik Duyarlılıklarına Göre İntegron Gen Bölgesi Dağılımı

Antibiyotik		Suş sayısı	İntegron pozitif, sayı (%)
Seftazidim	S	24	3 (12.5)
	I	3	0
	R	73	9 (12.3)
SXT	S	92	10 (10.9)
	R	8	2 (25)
Levofloksasin	S	95	10 (10.5)
	I	2	1 (50)
	R	3	1 (33.3)
Kloramfenikol	S	66	5 (7.6)
	I	25	5 (20)
	R	9	2 (22.2)
Toplam		100	12 (12)

S: Duyarlı; I: Orta duyarlı; R: Dirençli; SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol.

Dizi analizi sonuçları incelendiğinde; *intl-1* primeri ile yapılan amplifikasyonda pozitif bant veren 12 suştan 5'inin (no. 23, 26, 29, 31 ve 62) *intl* sınıf 1 geni içerdiği görülmüştür. Buna karşın, *intl-2* ve *intl-3* primerleri ile yapılan amplifikasyonda pozitif bant veren sırasıyla 2 ve 10 suşun dizi analizi, bu suşların hiçbirisinin sınıf 2 ve 3 *intl* geni içermediğini göstermiştir. *Intl-5'CS* ve *3'CS* primerleri ile yapılan amplifikasyonda ise, pozitif bant saptanan 2 suşun (no. 23 ve 25) kuarternere amonyum direnç protein geni (*qacL*); bir suşun (no 32) aminoglikozid adeniltransferaz geni (*aadA*); beş suşun (no. 27, 33, 52, 59 ve 60) da integronla ilişkili rekombinasyon bölgesi (*attI*) genini içerdiği görülmüştür.

İzolatların plazmid profili incelendiğinde; sadece 9 suşta (3, 4, 7, 40, 47, 60, 63, 64 ve 77 no'lu suşlar) plazmid saptanmış, 63 ve 77 no'lu suşların ikişer adet plazmid içerdiği gözlenmiştir (Resim 4). BioNumerics programı ile plazmidlerin boyutları sırasıyla; 17200, 2340, 1350, 2760, 18600, 20000, 3570-2540, 2510 ve 5000-2540 bç olarak hesaplanmıştır.

Suşların antibiyotik duyarlılıklarına göre *intl* gen bölgesi varlığının dağılımı Tablo III'te gösterilmiştir. Her bir antibiyotiğin duyarlılık profili ile *intl* gen bölgesi varlığı karşılaştırılmıştır. Hesaplanan p değerleri seftazidim, SXT, levofloksasin ve kloramfenikol için sırasıyla 1.000, 0.245, 0.108 ve 0.100 olarak bulunmuştur. Antibiyotik direnç durumu ve gen bölgesi varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

TARTIŞMA

S.maltophilia insanlarda solunum yolları başta olmak üzere birçok sistemde özellikle immünsüpresif ve yoğun bakım hastalarında mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olmaktadır¹⁰. *S.maltophilia*'nın birçok antibiyotiğe intrinsek direnç göstermesi ve diğer antimikrobiyallere karşı geliştirdiği kazanılmış direncin artması, ampirik tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır¹¹. Bu direnç artışında türler arasında genetik materyal aktarımı da rol oynamaktadır⁶.

Son zamanlarda *S.maltophilia* suşlarında SXT gibi ampirik tedavide sıklıkla tercih edilen antibiyotiklere karşı dirençte de artış söz konusudur¹¹. Çalışmamızda elde ettiğimiz seftazidim ve SXT için dirençlilik oranları ve MİK₉₀ değerleri yurt dışındaki bazı çalışmalara göre daha yüksek bazılarına göre ise düşük bulunmuştur¹¹⁻¹³. Ülkemizde yapılan çalışmalarda SXT ve seftazidim için değişken sayılar olmasına rağmen, çalışmamızla karşılaştırıldığında MİK₉₀ değeri ve direnç oranları benzerdir¹⁴⁻¹⁶. Levofloksasin ve kloramfenikol için yurt içi çalışmalarda herhangi bir veri bulunmamaktadır (MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri levofloksasin için < 0.125-32 µg/ml ve kloramfenikol için < 0.125-32 µg/ml). Bu sonuçlar yurt dışında yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında her iki antibiyotik için MİK₉₀ ve direnç oranları daha düşüktür^{9,12,13}. Çalışmalarda görüldüğü üzere *S.maltophilia*'ya karşı farklı coğrafik bölgelerden, aynı bölgedeki farklı hastanelerden ve hatta aynı hastaneden farklı zamanlarda tespit edilen antibiyotik duyarlılık profilleri değişiklik göstermektedir. Bu veriler ışığında *S.maltophilia*'nın gösterdiği antibakteriyel direncin ve tedavide kullanılacak antimikrobiyallerin kısıtlılığının, hem dünya da hem de ülkemizde önemli bir problem olduğu görülmektedir. Çalışmamızın sonuçları levofloksasinin tedavide alternatif olabileceğini düşündürmektedir.

S.maltophilia'nın sahip olduğu çoklu antibiyotik direnci, enzim üretimi ve atım pompaları gibi birçok nedene bağlı olabilir. Türlerin bu özelliklerinin plazmidler, integronlar ve transpozonlar gibi mobil genetik elemanlarla da gelişebilmesi ve diğer bakterilere aktarılması ciddi tehlike oluşturmaktadır. Bunlardan biri olan integronlar, direnç genlerinin yakalanmasında ve özellikle gram-negatif bakterilerde antibiyotik direncinin yayılımında önemli rol oynamaktadır⁴. Çalışmamız *S.maltophilia*'da integron gen bölgeleri, plazmid profili ve antimikrobiyal duyarlılığın beraber değerlendirildiği ilk ulusal çalışma olması bakımından önemlidir.

En yaygın ve klinik olarak en önemli integron grubu olan sınıf 1 integronların (*intl-1*), trimetoprim ve kloramfenikol direnç genleri de dahil olmak üzere 60'tan fazla farklı antibiyotik direnç gen kaseti taşıdığı gösterilmiştir^{17,18}. Sınıf 1 integronların gram-negatif bakterilerde antibiyotik direnç genlerinin yayılımındaki rolü irdelenmiş ve kabul edilmiştir. Barbolla ve arkadaşları¹⁹, 31 *S.maltophilia* suşundan 3 (%0.9)'ünde *intl-1* geni saptamışlar ve SXT direnciyle ilişkili bulmuşlardır. Çin'de yapılan bir çalışmada da, 103 suşun %25'i SXT'ye dirençli bulunmuş; dirençli suşların %69'unda *intl-1* ve %81'inde *su1* geni saptanmıştır. Toleman ve arkadaşları²¹, SENTRY çalışması kapsamında toplanan 1744 suş arasında, 25'i SXT'ye dirençli toplam 55 *S.maltophilia* izolatında *intl* varlığını araştırmışlar; dirençli suşların 17'sinde *intl-1* ve *su1* geninin birlikteliğini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca, yedisi büyük plazmidlerin üzerinde olmak üzere dokuz suşta da *su2* geninin varlığını tespit etmişlerdir. Sınıf 1 integronların dizi analizi yapıldığında Almanya ve Brezilya suşlarında *su1* ve *gac* genleri, ABD ve Şili suşlarında *aacA4* geni, Meksika suşlarında ise *aacA7* ve *aadA5* genleri saptanmıştır. Aynı çalışmada sınıf 1 integronların ve *su2* geni taşıyan ISCR elemanlarının, SXT direncine sebep olabileceği gösterilmiştir²¹. Liaw ve arkadaşlarının²² çalışmasında, *S.maltophilia* suşlarının %60 (42/70)'unda *intl-1* saptanmış; integronlarda saptanan gen kasetlerinin *aacA4*, *aadB*, *aacC4*, *aacA6'-Ib*, *smr*, *smr/aacA4*, *gac*, *cmlA*, *catB2* ve *bla_{IMP-8}/aac6-II/aadA5* bölgelerini içerdiğini gösterilmiş; böylece sınıf 1 integronların çoklu ilaç direnci ile ilişkisi açıkça ortaya konmuştur. Hu ve arkadaşlarının¹³ Çin'de yaptığı çalışmada, 102 *S.maltophilia* suşunun %30.4'ü SXT'ye dirençli bulunmuş ve %64.7'sinde de *intl-1* pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmada, SXT'ye dirençli 31 suşun 29'unun *intl-1* taşıdığı tespit edilmiş ve sınıf 1 integronların içinde *dfrA17-aadA5*; *dfrA12-aadA2*; *aacA4-catB8-aadA1*; *aadB-aac(6')-II-bla_{CARB-8'}*; ve *arr-3-aacA4* gen kasetlerinin birlikteliği gösterilmiştir. Ülkemizde *intl-1* varlığı çeşitli gram-negatif bakterilerde gösterilmiştir. Hastanemizde daha önce Öpüş²³ tarafından yapılan çalışmada, 100 *P.aeruginosa* klinik suşunun PER-1 enzimi taşıyan 40'ında %62.5 oranında *intl-1* saptanmıştır. Özkaya ve arkadaşları²⁴ Trabzon'da yaptıkları çalışmada, SXT'ye dirençli 32 klinik *S.maltophilia* suşunun birinde *intl-1* geni tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, *intl-1* primerleri ile 12 suşta pozitif bant saptanmış; bu suşlara yapılan dizi analizi sonucunda beş suşun *intl-1* geni içerdiği görülmüştür. Bir integronu oluşturan birimlerden biri olan rekombinasyon bölgesi (*attI*), integrazı kodlayan gen (*intl*) bölgesinin hemen yanındadır. Bizim beş suşta saptadığımız sınıf 1 *intl* bölgesi ve integronla ilişkili rekombinasyon bölgesi geni (*attI*) integron varlığını göstermektedir.

Wang ve arkadaşları²⁵, *S.maltophilia* suşlarının %10.5 (2/19)'ünde *qacED1* geni varlığını saptamışlar; bu genin sülfonamidler gibi birçok antimikrobiyal ajana direnç oluşumunda etkili olduğunu ve birçok farklı direnç geni ile birlikte bulunduğunu ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda tespit edilen *qacL* geni taşıyan iki suşun antimikrobiyal duyarlılık durumunun, içerdikleri gen bölgeleri ile ilişkisi ileri çalışmalarda değerlendirilebilir. Bir suşta saptanan *aadA* geni başka benzer çalışmalarda da tespit edilmiştir^{13,19,20}. Bu gen bölgesi aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı direnci göstermektedir²⁶.

Sınıf 2 integronların (*intl-2*) varlığı da çeşitli gram-negatif bakterilerde gösterilmiş ve bazı antibiyotiklere karşı dirence neden olan gen kasetlerini taşıdıkları belirtilmiştir²⁶⁻²⁸. Sınıf 3 integronların (*intl-3*) varlığı ise henüz birkaç gram-negatif izolatta gösterilmiş ve geniş spektrumlu beta-laktamaz enziminin genetik determinantlarını içerdiği saptanmıştır^{29,30}. Ülkemizde sınıf 3 integronlar ile ilgili henüz bir veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda, *S.maltophilia* suşlarında *intl-2* ve *intl-3* varlığı da araştırılmış; ancak PCR sonrası jel elektroforezinde sınıf 2 ve 3 *intl* için şüpheli bantlar saptanmasına rağmen, nükleotid dizi analizinde anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır. Ayrıca şu ana kadar yurtiçi ve yurtdışı yayınlarda *S.maltophilia*'da *intl-2* ve *intl-3* varlığı ile ilgili herhangi bir veriye de rastlanmamıştır.

*Intl-5'*CS ve *3'*CS primerleri ile yapılan amplifikasyonda 20 suшта pozitif bant saptanmış; bu suşların dizi analizi sonucunda ikisinin *qacL*, birinin *aadA* ve beşinin *attI* genini içerdiği görülmüştür. PCR sonrası bant saptanan diğer 13 suшта nükleotid dizi analizi incelendiğinde anlamlı bir veriye ulaşılamamıştır.

Plazmidler, transfer kolaylığından dolayı, farklı bakteri cins ve türleri arasında antimikrobiyal direnç yayılımına en çok katkıda bulunan genetik elemanlardır. *S.maltophilia* direnç genlerinin plazmidler ile nehir suyu bakterilerine ve *Pseudomonas putida* SM1443'ün farklı genler taşıyan plazmidlerinin *S.maltophilia*'ya aktarıldığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir^{31,32}. Hu ve arkadaşları¹³ *intl-1* tespit edilen 66 suшта yedi değişik plazmid profili tanımlamışlar ve tüm suşlarda 7.3 kb büyüklüğünde bir plazmid ile farklı büyüklüklerde başka plazmidlerin varlığını göstermişlerdir. Bu plazmidler ile horizontal gen transferinin sonucu olarak *intl-1* içeren *S.maltophilia* suşlarının prevalans artışının ciddi bir problem olabileceği yorumu yapılmıştır¹³. Liaw ve arkadaşları²² ise, *intl-1* taşıyan 42 suştan ikisinin plazmid içerdiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda, dokuz suшта plazmid tespit edilmiş, ancak bu suşların hiçbirinde integron pozitifliği saptanmamıştır.

Çalışmamızda, integron gen bölgesi tespit edilen 12 suşun izole edildiği servislere bakıldığında; üçünün iç hastalıkları servisinden, diğer dokuz örneğin her birinin farklı servislere izole edildiği görülmüştür. Bu 12 suşun dokuzu seftazidim, ikisi SXT, ikisi kloramfenikol ve biri levofloksasine dirençli bulunmuştur. Suşların antibiyotik direnç durumu ile gen bölgesi varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamış; bu durum, test edilen antibiyotiklere karşı direnç genlerinin *intl* dışındaki bölgelerde taşınabiliyor olabileceğini düşündürmüştür. Sonuç olarak, antibiyotik direnci ile ilişkili birçok gen bölgesinin *intl* gibi hareketli genetik elemanlarla yayılımı, sadece *S.maltophilia*'da değil farklı türlerdeki bakterilerin tedavisinde de önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamız *S.maltophilia*'da *intl* gen bölgeleri, plazmid profili ve antimikrobiyal duyarlılığın beraber değerlendirildiği ilk ulusal çalışmadır. Çalışmada tespit ettiğimiz gen bölgeleri integronun taşıdığı moleküler direnç mekanizmaları hakkındaki ileri çalışmalara hem bir zemin hem de veri sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lipuma JJ, Currie BJ, Lum GD, Vandamme P. *Burholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupravidus*, *Pandora*, *Brovindomonas*, *Commamonas*, *Delftia* and *Acidovorax*, pp: 749-62. In: Murray PR, Rosental KS, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Valdezate S, Vindel A, Loza E, Baquero F, Canton R. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(5): 1581-4.
3. Nemergut DR, Robeson MS, Kysela RF, Martin AP, Schmidt SK, Knight R. Insights and inferences about integron evolution from genomic data. BMC Genomics 2008; 9: 261.
4. Partridge SR, Thomas LC, Ginn AN, Wiklendt AM, Kyme P, Iredell JR. A novel gene cassette, *aacA43*, in a plasmid-borne class 1 integron. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(6): 2979-82.
5. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis 2003; 36(1): 11-23.
6. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. Annu Rev Genet 2010; 44: 141-66.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 23th Informational Supplement. M100-S23, 2013. CLSI, Wayne, PA.
8. Su J, Shi L, Yang L, Xiao Z, Li X, Yamasaki S. Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. FEMS Microbiol Lett 2006; 254(1): 75-80.
9. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(1): 185-91.
10. Aktaş F. Gram negatif bakterilerin hastane infeksiyonlarındaki rolü ve epidemiyolojisi, s: 221-52. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (ed), Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları. 2012, 2. baskı. Bilimsel Tip Yayınevi, Ankara.
11. Looney WJ, Narita M, Mühlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. Lancet Infect Dis 2009; 9(5): 312-23.
12. Wu H, Wang JT, Shiau YR, Wang HY, Lauderdale TL, Chang SC; TSAR Hospitals. A multicenter surveillance of antimicrobial resistance on *Stenotrophomonas maltophilia* in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2012; 45(2): 120-6.
13. Hu LF, Chang X, Ye Y, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfra* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. Int J Antimicrob Agent 2011; 37(3): 230-4.
14. Türk Dağı H, Arslan U, Tuncer İ. Kan kültürlerinden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik direnci. Ankem Derg 2011; 25(1): 27-30.
15. Gülmez D, Hasçelik G. *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. Clin Microbiol Infect 2005; 11(11): 880-6.
16. Tatman-Otkun M, Gürcan S, Ozer B, Aydoslu B, Bukavaz S. The antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates using three different methods and their genetic relatedness. BMC Microbiol 2005; 5: 24.
17. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol 2006; 4(8): 608-20.
18. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18(11): 761-70.
19. Barbolla R, Catalano M, Orman BE, et al. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(2): 666-9.
20. Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM, Wu WJ. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 2004; 53(3): 518-21.

21. Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(4): 559-65.
22. Liaw SJ, Lee YL, Hsueh PR. Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(2): 126-30.
23. Öpüş A. Seftazidime dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında Per-1 enziminin sınıf-1 integronlarla ilişkisinin moleküler yöntemlerle araştırılması. Uzmanlık Tezi, 2009. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.
24. Özkaya E, Aydın F, Bayramoğlu G, Buruk CK, Sandalli C. Klinik örneklerden izole edilen trimetoprim-sülfametoksazole dirençli *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında integron, *sul1-2* ve *dfr* genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(2): 201-12.
25. Wang C, Zhan Q, Mi Z, Huang Z, Chen G. Distribution of the antiseptic resistance gene *qacEDelta1* in 283 clinical isolates of Gram-negative bacteria in China. *J Hosp Infect* 2008; 69(4): 394-6.
26. Roe MT, Vega E, Pillai SD. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(7): 822-6.
27. Radstrom P, Skold O, Swedberg G, Flensburg J, Roy PH, Sundstrom L. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol* 1994; 176(11):3257-68.
28. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, et al. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3): 723-6.
29. Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* 2002; 184(11): 3017-26.
30. Correia M, Boavida F, Grosso F, et al. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(9): 2838-43.
31. Bathe S, Lebuhr M, Ellwart JW, Wuertz S, Hausner M. High phylogenetic diversity of transconjugants carrying plasmid pJP4 in an activated sludge-derived microbial community. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 235(2): 215-9.
32. Shintani M, Fukushima N, Tezuka M, Yamane H, Nojiri H. Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. *Biotechnol Lett* 2008; 30(1): 117-22.