

---

## ÖZGÜN ARAŞTIRMA

---

# \*Deniz Suyu Kökenli Koliformlarda Sınıf 1 ve Sınıf 2 Integron Gen Kasetleri ve Antibiyotik Direncinin Karakterizasyonu

## *Class 1 and Class 2 Integron Gene Cassettes and Characterization of Antibiotic Resistance in Coliforms of Sea Water Origin*

Feyza Çolakoğlu<sup>1</sup>, Osman Birol Özgümüş<sup>1,2</sup>, Cemal Sandallı<sup>1</sup>,  
Elif Çelik Sevim<sup>1</sup>, Şengül Alpay Karaoğlu<sup>1</sup>

Rize Üniversitesi <sup>1</sup>Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı,  
<sup>2</sup>Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize

\*Bu çalışma XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi'nde (23-27 Haziran 2008 Trabzon) poster olarak sunulmuştur.

---

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada Karadeniz'in doğu sahilinden izole edilen 43 koliform bakterideki antibiyotik direncinin moleküler karakterizasyonu amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Suşların disk difüzyon metoduyla çeşitli antibiyotiklere dirençleri tarandı. Ampisiline dirençli suşlarda TEM tipi  $\beta$ -laktamaz geni, sınıf 1 ve sınıf 2 integron gen kasetleri ve tetrasikline dirençli suşlarda tetrasiklin direnç determinantları polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırıldı. Plazmid transformasyon deneyleri ısı şok metoduyla yapıldı.

**Bulgular:** On yedi (%39.5) suşun bir veya daha fazla sayıda antibiyotiğe dirençli olduğu bulundu. Bir ampisiline dirençli *Escherichia coli*'nin TEM-1 tip  $\beta$ -laktamaz geni içerdiği ve tetrasikline dirençli suşlar arasında tet(B) geninin yaygın olduğu tespit edildi. Bir *E. coli* suşu 2.0-kb sınıf 1 integron, diğer bir *E. coli* suşunun ise 2.2-kb sınıf 2 integron taşıdığı ve DNA dizi analizi ile sınıf 1 ve sınıf 2 integronların sırasıyla blaOXA-30 – aadA1 ve dfrA1-sat2-aadA gen kasetlerini içerdiği gösterildi. Ampisiline, tetrasikline ve streptomisine karşı dirençlerin transfer edilebilir özellikler olduğu bulundu.

**Sonuç:** Deniz ortamında, antibiyotiklere dirençli koliformların bulunması halk ve çevre sağlığı açısından risk taşıyabilir ve bu çalışma, deniz suyundan izole edilmiş koliformlarda sınıf 1 ve sınıf 2 integronların gösterildiği ilk çalışma olması açısından önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Deniz suyu, koliform bakteriler, sınıf 1 ve sınıf 2 integronlar.

## SUMMARY

**Objective:** The aim of this study was molecular characterization of the antibiotic resistance in 43 coliforms isolated from the east coastal zone of Black Sea, Turkey.

**Materials and Methods:** All strains were screened for resistance to certain antibiotics by disk diffusion method. TEM-type  $\beta$ -lactamase gene in ampicillin-resistant strains, class 1 and class 2 integron gene cassettes and tetracycline resistance determinants in tetracycline-resistant strains were investigated by polymerase chain reaction. Plasmid transformation experiments were performed by heat shock method.

**Results:** We found that 17 (39.5%) strains were resistant to one or more antibiotics. One ampicillin-resistant *Escherichia coli* strain harbored a TEM-1 type  $\beta$ -lactamase gene. *tet(B)* gene was common among tetracycline-resistant strains. One *E. coli* strain carried a 2.0-kb class 1 integron, and one *E. coli* carried a 2.2-kb class 2 integron. DNA sequencing results demonstrated that class 1 and class 2 integrons contained *bla*OXA-30-*aadA1* and *dfrA1-sat2-aadA* gene cassette arrays, respectively. Resistance to ampicillin, tetracycline or streptomycin was transferable traits.

**Conclusion:** We are of the opinion that there are antibiotic resistance determinants in coliforms of human origin in marine environment, carrying a risk for public and environmental health. To our knowledge, this is the first report for class 1 and class 2 integrons in coliform bacteria isolated from sea water in Turkey.

**Key Words:** Sea water, coliform bacteria, class 1 and class 2 integrons.

## GİRİŞ

Klinik ortamlar olmamalarına rağmen, okyanus sularında, sahillerde, nehirlerde, yüzey suları ve çökeltilerinde, göllerde ve içme sularında antibiyotiklere karşı dirençli bakteriler tespit edilmiştir (1). İnsan tıbbi ve veterinerlikte antibiyotiklerin yoğun kullanımları, bakteriler üzerinde seçici bir baskı oluşturmakta ve bu baskının antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına ve yayılmasına neden olduğuna inanılmaktadır (2).

Çevre kökenli direnç genlerinin takibinde tetrasikline karşı direnç oranının anahtar role sahip olması, özellikle veterinerlikte ve ziraatta bu antibiyotiklerin sık kullanımından kaynaklanmaktadır. Akılcı olmayan reçeteler, uygunsuz kullanım ve antibiyotik artıklarının çevreye karışmasından dolayı antibiyotiklere karşı hem çevresel hem de klinik kökenli bakterilerdeki artan direncin, toplum sağlığını tehdit eden tıbbi sorunlar olarak karşımıza çıktığı bilinmektedir (3). Antibiyotik direnç genleri, direnç (R) plazmidleri, transpozonlar ve integronların horizontal transferleri vasıtasıyla aktarılır ve kazanılır (4).

Beta-laktamların klinik kullanıma girmesinin en önemli sonuçlarından biri de plazmid aracılı  $\beta$ -laktamazların yayılmasıdır. Plazmid aracılı  $\beta$ -laktamazlardan en sık bulunanı TEM-1'dir. TEM-1 geni (*bla*<sub>TEM-1</sub>) Tn3 transpozonuyla taşınır ve *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin % 20-60'ına yayılmış durumda olduğu rapor edilmektedir (5).

İntegronlar; tetrasiklinler, trimetoprim, aminoglikozidler, kloramfenikol ve hatta  $\beta$ -laktamlar gibi antibiyotiklere karşı direnç kodlayan gen kasetlerini taşıyabilme veya entegre edebilme yeteneklerine sahiptirler. Sınıf 1 integronlar Tn21 gibi transpozonlar üzerinde tespit edilmişlerdir ve prototip sayılırlar (6). Sınıf 1 integronun yapısında bir 5'- ve 3'- korunmuş segment (5'-CS ve 3'-CS) ve bir de değişken bölge vardır (7,8). 5'-korunmuş segment *intI* geni (integraz) ve insert olan gen/genlerin ekspresyonu için kullanılan bir promotor bölgeden oluşur (7). 3'-korunmuş segment defektif kuaterner amonyum direnç geni *qacE $\Delta$ I* ve sülfonamidlere direnç

sağlayan *sull* geni içerir. İki korunmuş bölge arasında bulunan değişken bölge antibiyotik direnç gen kasetlerinin girmesi için rekombinasyon yeridir. Bu yüzden rekombinasyon mekanizmasına katılan ve 59-baz çifti (bç) eleman olarak bilinen *attC* geni içerir. Sınıf 2 integronlar ise Tn7'de bulunmuş olup, dihidrofolat redüktaz gen kaseti içermektedir (7,9) ve sırasıyla trimetoprime, streptotrisine ve streptomisin/spektinomisine direnç sağlayan *dfrA1*, *sat2* ve *aadA1* gibi üç klasik gen kasetleri taşımaktadır (10). Sınıf 1 ve sınıf 2 integronların, gıdalardan, sulama kanallarından ve nehirlerden izole edilen koliform bakterilerde taşınabildiği rapor edilmiştir (4,11-14). Ancak, fiziksel özellikleri bakımından hayatta kalabilmenin zor olduğu ortamlar olarak bilinen deniz ve okyanusların insan kaynaklı kirlenmeye maruz kalmış sularından izole edilen koliform bakterilerdeki antibiyotik direnç durumu ve moleküler mekanizmaları ile ilgili detaylı çalışmalara rastlanmamıştır. Bu çalışmada, Doğu Karadeniz'in insan kaynaklı kirlenmeye maruz kalmış kıyılarından izole edilmiş koliform bakterilerdeki antibiyotik direncinin moleküler analizleri yapıldı. Bunun yanında, integron gen kaset içerikleri tarandı ve bu genetik yapıların moleküler yapıları aydınlatıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Koliform bakteriler.** Rize ili sahilinde dokuz istasyondan Kasım 2000 ile Ağustos 2001 arasında 10 ay boyunca ayda bir kere deniz suyu örneği toplandı. Deniz suyu örnekleri Lactose Peptone Water (Oxoid, İngiltere) besiyerine ekilerek fakültatif anaerop üreme takip edildi. İzole edilen fakültatif anaerop gram-negatif koliformlar, Rize Üniversitesi'nin Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı Bakteri Koleksiyonu'nda %20 gliserol ortamın-

da -35°C'de, yapılması planlanan çalışmalar için stoklandı. Çalışma yapılacağı zaman, bakteriler Nutrient agar (Merck, Almanya) besiyerinde canlandırıldı ve biyokimyasal reaksiyonlarına göre tür seviyesinde tanımlamaları ve doğrulamaları yapıldı (15).

**Antimikrobik duyarlılık ve çift disk sinerji (ÇDS) testleri.** Koliform bakteriler ve transformantların antimikrobik duyarlılık testleri "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" rehberindeki standart disk difüzyon metoduyla yapıldı. Sonuçlar, aynı rehberdeki standart zon çapı ölçütleriyle mukayese edilerek yorumlandı (16). Duyarlılık testlerinde ampisilin (10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), netilmisin (10 µg), kanamisin (30 µg), streptomisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), nalidiksik asit (30 µg), sulfametoksazol (100 µg) ve trimetoprim (5 µg) standart antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanıldı. Sulfametoksazol (100 µg) diskinin inhibisyon zon çaplarının değerlendirilmesi Blahna ve arkadaşlarının (17) çalışmasında belirtilen referans değere ( $R \leq 12$  mm) göre yapıldı. *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kalite kontrol suşu olarak kullanıldı.

Suşlardaki genişlemiş spektrumlu β-laktamaz (GSBL) enzimi varlığına, ÇDS testi ile standart disk difüzyon metodu kullanılarak, Mueller-Hinton agar (Merck, Almanya) besiyerinde bakıldı (16,18). Seftazidim antibiyotik diski (30 µg) (Oxoid, İngiltere) etrafındaki inhibisyon zonu nun amoksisilin-klavulanik asit diski (20 µg/10 µg) (Oxoid, İngiltere) tarafından artırılması muhtemel GSBL varlığını gösterdi. Dr. George A. Jacoby (Lahey Clinic, Massachusetts, USA) tarafından hediye edilen *Escherichia coli* J53-2 (SHV-3 tip GSBL enzimi kodlayan pUD18 plazmidini içeriyor) suşu, ÇDS testlerinde GSBL pozitif kontrol olarak kullanıldı.

### **Plazmid izolasyonu ve transformasyon deneyi.**

Toplam plazmid DNA'ları alkalen ekstraksiyon metodu ile antibiyotiklere dirençli suşlardan izole edildi ve kompetan *E. coli* JM101 (*RecA*) hücrelerine ısı şoku metoduyla aktarıldı (19,20). Transformantlar 50 µg/ml ampisilin (Fisher Scientific, ABD) içeren Luria-Bertani (LB) agar (%1 tripton, %0.5 sodyum klorür, %0.5 maya özütü, %1.5 agar; pH 7.4) besiyerinde seçildi. Seçici besiyerinde üreyen transformantların, 50 µg/ml ampisilin (Fisher Scientific, New Jersey, ABD) içeren LB sıvı besiyerine tekrar ekimleri yapıldı. Üreyen bakterilerden tekrar plazmid DNA'ları saflaştırılarak 0.5 µg/ml etidiyum bromür (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD) içeren %0.7'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV transilüminatöründe incelendi.

**Antibiyotik direnç genleri ve integronlar için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).** Koli-formlar ve transformant suşlar 3 ml LB sıvı besiyerine ekildiler ve 37°C'de 20 saat çalkalanarak enkübe edildiler. Sıvı bakteri kültürününün 1.5 ml'si mikro-santrifüjasyonla çöktürüldü. Süpernatant atıldıktan sonra çökelti 500 µl steril deiyonize su ile yeniden çözüldü. Hücreler daha sonra 10 dk kaynatılarak parçalandı. Tekrar mikro-santrifüjasyonla çöktürüldü ve süpernatantın 1 µl'si tüm PZR deneylerinde kalıp DNA kaynağı olarak kullanıldı. Tüm PZR reaksiyonlarında MBI Fermentas'ın (Vilnius, Litvanya) *Taq* polimeraz enzimi, nükleotidler ve tamponları kullanıldı. Isı döngüleri Mastercycler Personal thermal cycler (Eppendorf, ABD)'da yapıldı.

Ampisiline dirençli suşlarda TEM-tipi β-laktamaz genleri, Arlet ve Philippon'un (21) tarif ettiği gen içi OT1/OT2 primerleri (Tablo 1), reaksiyon karışımı ve döngü parametreleri kullanılarak araştırıldı. Tetrasikline dirençli suşlarda *tet(A)*, *tet(B)* ve *tet(C)* genleri Tablo 1'de gösterilen primer çiftleri kullanılarak tarandı. Ampli-

fikasyonların reaksiyon kompozisyonları ve döngü parametreleri Aarestrup ve arkadaşlarının (22) tariflerine göre yapıldı. Tablo 1'de listelenen integron spesifik primerler (5'-CS/3'-CS ve hep51/hep74), antibiyotiklere dirençli suşlardaki sınıf 1 ve sınıf 2 integronların değişken bölgelerini çoğaltılmak için kullanıldı. Reaksiyon kompozisyonları ve döngü parametreleri sınıf 1 integronlar için Lévesque ve arkadaşlarının (8), sınıf 2 integronlar için White ve arkadaşlarının (23) tariflerine göre yapıldı. Amplifikasyon ürünleri daha sonra 0.5 µg/mL etidiyum bromür (Sigma-Aldrich, ABD) içeren %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışığı altında incelendi.

**DNA dizi analizi ve biyoinformatik.** İntegronların değişken bölgelerinin PZR ürünleri QIAQuick® Purification Kits (QIAGEN, İngiltere) kullanılarak agaroz jelden saflaştırıldılar ve pGEM-T Easy vector (Promega, ABD) plazmidine üretici firmanın önerileri doğrultusunda klonlandılar. Elde edilen rekombinant plazmidler, sekans analizi için Macrogen Enstitüsüne (Seul, Kore) gönderildi. pGEM-T plazmid vektörünün DNA dizisine komplementer iki universal primer (SP6/T7 promotor primerler) kullanılarak klonlanmış fragmanların DNA dizileri belirlendi. Tablo 1'de DNA dizisi verilen OT3/OT4 primerleri ile Arlet ve arkadaşlarının (24) tarif ettiği reaksiyon karışımı ve döngü parametreleri kullanılarak TEM-tipi β-laktamaz genlerinin tamamı çoğaltıldı. Saflaştırılıp temizlenen ampikonlar OT3/OT4 primerleri ile birlikte DNA dizilerinin belirlenmesi için Macrogen Enstitüsüne (Seul, Kore) gönderildiler. Elde edilen nükleotid dizileri ve varsayılan proteininin amino asit dizilerinin <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> sitesindeki BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) analizi ve <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> sitesindeki ClustalW (Multiple Sequence Alignment) programları kullanılarak

**Tablo 1.** PZR deneylerinde kullanılan oligonükleotid primerler

Primer	Hedef	Nükleotid dizisi	Amplikon (bç)	Kaynak
OT-1 OT-2	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (gen içi)	5'- TTGGGTGCACGAGTGGGTTA -3' 5'- TAATTGTTGCCGGGAAGCTA -3'	504	21
OT-3 OT-4	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (tam gen)	5'- ATGAGTATTCAACATTTCCG -3 5'- CAATGCTTAATCAGTGAGG -3'	857	24
tet(A)-1 tet(A)-2	<i>tet</i> (A) geni	5'- GTAATTCTGAGCACTGTCCG -3' 5'- CTGCCTGGACAACATTGCTT -3'	917	22
tet(B)-1 tet(B)-2	<i>tet</i> (B) geni	5'- CTCAGTATTCCAAGCCTTTG -3' 5'- ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG -3'	375	22
tet(C)-1 tet(C)-2	<i>tet</i> (C) geni	5'- GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC -3' 5'- CCTCTTGCGGGAATCGTCC -3'	506	22
5'-CS 3'-CS	Sınıf 1 integron değişken bölge	5'- GGCATCCAAGCAGCAAG -3' 5'- AAGCAGACTTGACCTGA -3'		8
hep51 hep74	Sınıf 2 integron değişken bölge	5'- GATGCCATCGCAAGTACGAG -3' 5'- CGGGATCCCGGACGGATGCACGATTGTA -3'		23

GenBank veritabanındaki diğer nükleotid dizileri ve proteinlerinin amino asit dizileriyle karşılaştırılarak biyoinformatik analizleri yapıldı.

**Nükleotid dizisi girişi numarası.** Bu çalışmada tespit edilen sınıf 1 integron ve sınıf 2 integronların nükleotid dizileri EMBL ve GenBank veritabanında depolandılar ve sırasıyla EF543148 ve EF543147 giriş numaraları alındı.

## BULGULAR

Deniz suyu örneklerinden 39 *Escherichia coli*, iki *Enterobacter cloacae*, bir *Klebsiella pneumoniae* ve bir *Citrobacter koseri* olmak üzere 43 koliform bakteri izole edildi. Kırk üç koliform suşunun 17'si test edilen 10 antibiyotiğin en az bir veya daha fazlasına dirençli bulundu. Geri kalan bakteriler (%60.5) bütün antibiyotiklere hassas olarak tespit edildi.

İzole edilen 43 koliformdaki antimikrobik direnç sıklığı Şekil 1'de gösterilmektedir. En yüksek direnç insidansı tetrasikline (%23.2) karşı olmakla birlikte, bunu ampisilin (%20), sulfametoksazol (%11.6), streptomisin (%9.3) ve kloramfenikol (%4.6) takip etti. En düşük di-

renç oranı trimetoprime (%2.3) karşı saptandı. Nalidiksik aside ve streptomisin hariç diğer aminoglikozidlere (gentamisin, kanamisin ve amikasin) direnç tespit edilmedi. Antibiyotik direnci taşıyan deniz izolatlarının antibiyotik direnç fenotipleri ise Tablo 2'de görülmektedir.

TEM-tipi  $\beta$ -laktamaz geni (*bla*<sub>TEM</sub>), 11 ampisiline dirençli *E. coli* suşları ve *Citrobacter koseri* suşunda arandı. Enterobacter ve Klebsiella cinsleri ampisiline doğal dirençli olduklarından bu suşlarda direnç genlerine bakılmadı. *E. coli* suşlarından bir tanesinde (*E. coli* FD3) PZR ile 504 bç TEM-tipi  $\beta$ -laktamaz geni (*bla*<sub>TEM</sub>) tespit edildi (Şekil 2). DNA dizi analizi genin *bla*<sub>TEM-1</sub> olduğunu gösterdi. BLAST analizi genin varsayılan amino asit translasyonunun GenBank'ta depolanmış diğer *bla*<sub>TEM-1</sub> genlerinin amino asit translasyonu ile %100 benzerlik gösterdiğini saptadı. Polimeraz zincir reaksiyonu ile *bla*<sub>TEM</sub> geni tespit edilmeyen diğer ampisiline dirençli suşlarda ÇDS testi negatif bulundu ve suşların GSBL üretmediği anlaşıldı.

Suşlarda *tet*(B) geninin yaygın olduğu belirlendi. Tetrasikline dirençli 10 suşun yedisi *tet*(B) geni açısından PZR ile pozitif saptandı (375 bç

**Tablo 2.** Karadeniz'den izole edilen antibiyotiklere dirençli koliform bakterilerin fenotipik ve genotipik karakterizasyonları.

Suş	Tür	Direnç fenotipi <sup>a</sup>	Transformant fenotipi	<i>tet</i> tipi <sup>b</sup>	TEM-tipi gen <sup>c,d</sup>	Gen kaset sırası
FD1	<i>E. coli</i>	AMP				
FD3	<i>E. coli</i>	AMP, TE	AMP TE	<i>tet</i> (B)	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	
FD6	<i>E. coli</i>	AMP, TE		<i>tet</i> (B)		
FD7	<i>E. coli</i>	TE		<i>tet</i> (B)		
FD8b	<i>E. coli</i>	AMP, TE, C, SMZ		(-)		
FD8bA	<i>E. coli</i>	AMP, TE, C, S, SMZ		(-)		<i>bla</i> <sub>OXA-30-aadA1</sub>
FD12	<i>E. coli</i>	AMP				
FD13a	<i>E. coli</i>	AMP, TE, S	AMP TE S	<i>tet</i> (B)		
FD18	<i>E. coli</i>	TE		<i>tet</i> (B)		
FD19	<i>E. coli</i>	AMP, TE, TMP, S, SMZ		<i>tet</i> (B)		<i>df</i> <sub>A1-sat2-aadA</sub>
FD29	<i>K. pneumoniae</i>	AMP				
FD39	<i>E. coli</i>	SMZ				
FD44	<i>E. cloacae</i>	AMP				
FD45	<i>C. koseri</i>	AMP				
FD51	<i>E. coli</i>	SMZ				
FD52a	<i>E. coli</i>	TE		<i>tet</i> (B)		
FD54	<i>E. coli</i>	TE, S		(-)		

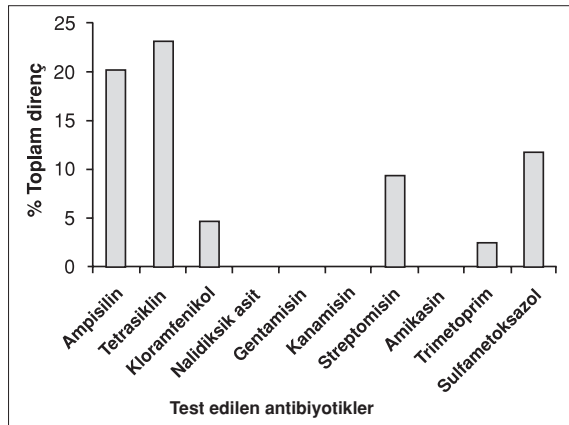
<sup>a</sup>AMP: ampicilin; TE: tetrasiklin; C: kloramfenikol; S: streptomisin; TMP: trimetoprim; SMZ: sulfametoksazol.

<sup>b</sup>(-), *tet*(A), *tet*(B) ve *tet*(C) yok.

<sup>c</sup>Transformantta da TEM-spesifik PZR pozitif.

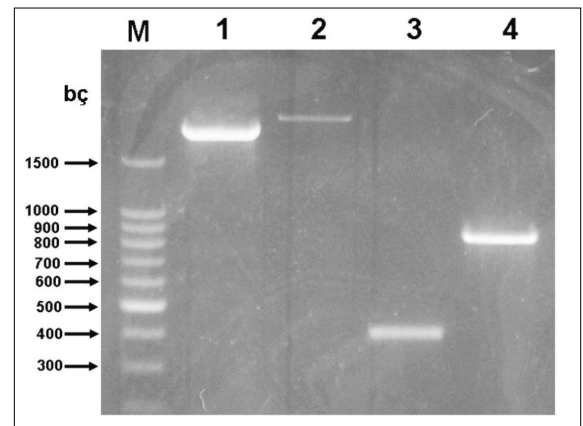
<sup>d</sup>Yalnızca *E. coli* ve *Citrobacter koseri* suşlarında bakıldı.

ürün) (Şekil 2). *tet*(A) veya *tet*(C) aracılı tetra-siklin direnci tespit edilmedi. Transformasyon deneyi ile iki *E. coli* suşunda aktarılabılır antibiyotik direnci gösterildi. Bu suşlar antibiyotik direnç paternlerinin (AMP-TE ve AMP-TE-S) tamamını transformasyon deneyinde hassas bir *E.*

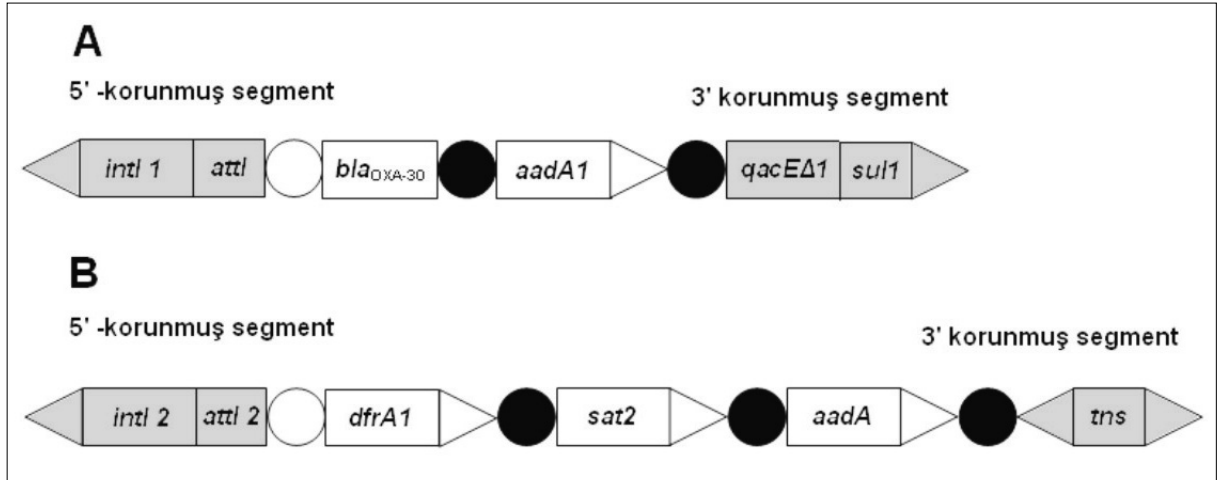


**Şekil 1.** Deniz suyundan izole edilmiş 43 koliformda antimikrobiyallere direncin toplam sıklığı.

*coli* K-12 suşuna aktardı (Tablo 2). Polimeraz zincir reaksiyonu ile transformantlarda da *tet*(B) geni ve *bla*<sub>TEM-1</sub> genleri tespit edildi. Bu sonuçlar direnç fenotiplerinin plazmid aracılı genetik özellikler olduğunu göstermektedir.



**Şekil 2.** İntegronlar ve direnç genlerinin PZR analizi. Sıra M: 100 bp DNA Ladder (Promega, ABD); Sıra 1: sınıf 1 integron (*E. coli* FD8bA); Sıra 2: sınıf 2 integron (*E. coli* FD19); Sıra 3: *tet*(B) amplicon; Sıra 4: *bla*<sub>TEM-1</sub> amplicon (*E. coli* FD3).



**Şekil 3.** Çalışmada tespit edilen sınıf 1 (GenBank giriş numarası EF543148) (A) ve sınıf 2 (GenBank giriş numarası EF543147) (B) integronlara sokulmuş gen kaset sıralarının şematik gösterimi. Siyah yuvarlaklar 59-bç elamanları, beyaz yuvarlaklar ise *attI* bölgelerini temsil etmektedir.

Birer *E. coli* suşlarında sınıf 1 (*E. coli* FD8bA) ve sınıf 2 (*E. coli* FD19) integron saptandı (Şekil 2). 2013-bç'lik sınıf 1 integronun (GenBank giriş numarası EF543148) iki gen kaseti taşıdığı (Şekil 3) ve DNA dizi analizine göre ilki *bla*<sub>OXA-30</sub> gen kaseti olup, ampisiline ve 1. kuşak sefalosporinlere direnç sağlayan geniş-spektrumlu bir b-laktamaz kodladığı bulundu. Bu genin yanındaki bölgede bir *aadA1* gen kaseti bulunduğu ve aminoglikozid 3'-(9)-O-adeniltransferaz enzimi kodladığı anlaşıldı. Bu enzim streptomisin/spektinomisine direnç sağlamaktadır. Bu integronun kaset sırası (*bla*<sub>OXA-30</sub>-*aadA1*) önceden rapor edilmiş klinik veya gıda orijinli *Shigella flexneri* (GenBank giriş numaraları DQ923619 ve AY574195) ve *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'da (GenBank giriş numaraları DQ861642 ve AY534545) tespit edilenlerle %100 benzerlik göstermektedir.

Tespit ettiğimiz 2224 bç-sınıf 2 integron (GenBank giriş numarası EF543147) ise üç gen kaseti taşımaktadır (Şekil 3). DNA dizi analizine göre ilki *dfrA1* geni olup, dihidrofolatredüktaz enzimi kodlamaktadır ve trimetoprima direnç sağlamaktadır. İkincisi *sat2* genidir ve streptotrisin asetiltransferaz enzimi kodlamaktadır ve

streptotrisin antibiyotiğine direnç sağlamaktadır. Üçüncü gen kaseti *aadA* genidir ve aminoglikozid adeniltransferaz A enzimi kodlamaktadır ve streptomisin/spektinomisine direnç sağlamaktadır. Bu integronun kaset sırası (*dfrA1-sat2-aadA*) önceden rapor edilmiş klinik orijinli *Shigella* türü (GenBank giriş numaraları AY639870 ve AY140652) ve *Vibrio cholerae*'da (GenBank giriş numarası AB199789) tespit edilenlerle %100 benzerlik göstermektedir.

## TARTIŞMA

Ülkemizde, toplum ve hastane kökenli koliform bakterilerde yüksek düzey antibiyotik direnci ile ilgili raporlar mevcuttur (25,26). Atık sular, lağım, dereler ve içme suları gibi sucul çevrelerdeki bakterilerde de insan tıbbı ve veterinerlikte kullanılan bazı antibiyotiklere karşı direnç rapor edilmesine rağmen, moleküler mekanizmaları ve ekolojileri üzerine sistematik çalışmalar bulunmamaktadır. Ayrıca, deniz ekosistemindeki fekal orijinli bakterilerde ortaya çıkan antibiyotik direnci üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Özgümüş ve arkadaşları (27) bu çalışmanın yapıldığı bölgede halkın kullandığı

ıçme sularından (musluk ve pınar suları) izole ettikleri çoğul antibiyotik dirençli fekal koliformlardaki antibiyotik direncinin, hareketli genetik elemanlar olan konjugatif R plazmidleri, transpozonlar ve integronlar tarafından taşındığını tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar bölgedeki nehir sularından izole edilen *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi koliform bakterilerde sınıf 1 ve sınıf 2 integronların yanında, çoğul antibiyotik dirençli birçok suşun bu direnci hareketli genetik elemanlar vasıtasıyla yayabileceğini göstermişlerdir (14). Bu bilgiler ışığında mevcut çalışma, integron veya benzer genetik yapılar vasıtasıyla antibiyotiklere dirençli bakterilerin nehir, dere veya diğer su akımları vasıtasıyla denizlere ulaşarak, rekreasyon amaçlı kullanılan veya hayvansal besin kaynağı olan deniz ekosistemlerine de direnç genlerini yayabileceği ihtimalini araştırmaktadır. Deniz ortamının oligotropik şartlarında kıyısız bölgeler besin niteliğindeki maddelerce zengin atık suların ve akımların girdileri nedeniyle besleyici maddeler açısından zengindir. *E. coli* Ayrıca, Karadeniz'in tuzluluk derecesi (yaklaşık 18.5 ppt) ise oldukça azdır (28). Böyle ortamlar bakteri popülasyonlarının hayatta kalabilme şansları açısından pratikte uygun çevrelerdir.

Enterik bakterilerdeki plazmid aracılı enzimler arasında en sık rastlanılanın TEM-1 olduğu rapor edilmektedir (29,30). Bu enzime ampisiline dirençli klinik *E. coli* kökenlerinin yaklaşık %50'sinde rastlanmaktadır (31,32). A sınıf  $\beta$ -laktamaz enzimi olan TEM-1 tip  $\beta$ -laktamaz, sıklıkla nokta mutasyonlarına maruz kalarak substrat aralığını genişletmektedir (33). Ülkemizdeki sağlıklı insanların bağırsak floralarından izole edilen *E. coli*'lerde de gösterilmiştir (34). Bu çalışmada TEM-1 tip  $\beta$ -laktamaz, sahil sularından izole edilen bir koliformda tespit edildi ve bu bulgunun yörede yaşayan halkın

sağlığı açısından bir tehdit oluşturabileceğini düşündürdü. Çalışmamızda, GSBL-negatif suşların büyük olasılıkla kromozomal  $\beta$ -laktamazları vasıtasıyla ampisiline direnç sağladığı kanısına varıldı. Genellikle büyük miktarlarda AmpC tip  $\beta$ -laktamaz üretimi, suşu ampisiline ve 1. kuşak sefalosporinlere dirençli hale getirebilmektedir (35). Ülkemizde yapılan son çalışmalarda GSBL'nin Türkiye'deki hastane izolatları Gram-negatif bakterilerde önemli bir sorun olarak karşımıza çıktığı rapor edilmektedir (36). Yoğun antibiyotik baskısı altında bu genin mutasyonlar vasıtasıyla kolayca evrimleşerek substrat aralığını genişletmesi mümkün olabilir. Bunu kanıtlayabilmek için çevre kökenli bakterilerin ve içerdikleri direnç genlerinin moleküler epidemiyolojilerinin izlenmesi ve konuyla ilgili farklı disiplinlerin çalışmalarına veritabanı oluşturacak bilgilerin sistematik bir biçimde yorumlanması gerektiğine inanmaktayız. Özellikle sucul ortamlardaki antibiyotik artıklarının ve metabolitlerinin miktarları ve ekosistemdeki bakteri popülasyonları üzerindeki etkilerinin aydınlatılması gerekmektedir. Çevre bakterilerindeki direnç evriminin moleküler mekanizmalarıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Song ve arkadaşları (37) derin denizin yaklaşık on bin yıllık soğuk katman sedimanlarının metagenomik kitaplıklarında TEM-tipi  $\beta$ -laktamaz geni belirlediklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, "antibiyotik direnç genlerinin  $\beta$ -laktamaz gibi antibiyotiklerin modern klinik kullanımına cevap olarak evrimleştiği" hipotezine karşı çıkmaktadırlar. Yani, bakterilerdeki  $\beta$ -laktamaz direncinin modern antibiyotik çağından önce ortaya çıkmış olabileceği hipotezini önermektedirler. Ancak, biz bu hipotezin doğrulanmasının karasal ve sucul ekosistemlerdeki bakteriyal popülasyonlarda yapılacak daha kapsamlı ve çeşitli moleküler çalışmalarla desteklenmesi gerekti-



ğine inanmaktayız. Deniz bakterilerinde ortaya çıkan antibiyotik direncinin insanlar ve ekosistem üzerine olan etkilerini aydınlatmak için olgunun moleküler biyolojik ve evrimsel mekanizmalarının aydınlatılmasına ve bu konularda daha fazla bilgiye ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Önceki bir çalışmamızda bu bölgedeki içme sularından izole edilen fekal koliformlarda *bla*<sub>TEM-1</sub> gen taşıyıcılığı tespit edilmiştir (38). Şaşırtıcı bir biçimde, bu bakterilerin bazılarında *bla*<sub>TEM-1</sub> gen varlığı gösterilmesine rağmen, izoelektrik fokuslama tekniği kullanıldığında bakterilerde fenotipik olarak TEM-1 enzim üretimi doğrulanmamıştır. Sonuçlar, muhtemelen bakterilerin kullanmaya gerek duymadığı çevrelerde bazı genlerini eksprese etmediğini ima etmektedir.

Brezilya'daki üç plajdan izole edilen enterobakterilerde yüksek düzeyde antibiyotik direncine rastlanmıştır. Direnç sıklığı ampisilin için %14, sulfametoksazol için %12, tetrasiklin için %9 ve kloramfenikol için %1 olarak belirlenmiştir (39). Direnç oranları bizim çalışmamızdakilerden daha azdır. Çalışmamızdaki antibiyotiklere duyarlı suşların, vahşi veya evcil hayvan bağırsağı kökenli olma ihtimalleri yüksektir. Çünkü sucul ortamlardan izole edilen çoğul antibiyotik dirençli koliform bakterilerin insan bağırsağı kaynaklı olma ihtimalinin çok yüksek olduğu rapor edilmiştir (40). Buna rağmen, solar ultraviyolenin doğal suların dekontaminasyonunda önemli katkısının olduğu da bilinmektedir (41).

Tetrasiklin grubu antibiyotikler insan enfeksiyonlarının tedavisinde ve profilaksisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, veterinerlikte ve kültür balıkçılığındaki bakteri enfeksiyonlarının kontrolünde de tercih edilen gruptandır. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde farklı birçok tet geni belirlenmiştir. Bu grup bakterilerde en sık rastlanan tet genleri *tet*(A) ile *tet*(E) arasındaki sı-

nıflardır (42). Guardabassi ve arkadaşları (43) *tet*(A) ve *tet*(B) genleri tarafından sağlanan tetrasikline direnç mekanizmalarının, sucul ve klinik orijinli *Acinetobacter baumannii* suşlarında yaygın olduğunu rapor etmişlerdir. Özgümuş ve arkadaşları (27) ise Rize yöresindeki halkın kullandığı içme sularından izole ettikleri *E. coli* suşlarında da *tet*(A) ve *tet*(B) genlerinin yaygın olduğunu belirlemişlerdir. Mevcut çalışmada ise aynı bölgedeki deniz suyundan izole edilen tetrasikline dirençli koliformlarda yaygın genin sadece *tet*(B) olduğu saptandı. Tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasikline karşı direnç sağlayan *tet*(A) genine nazaran *tet*(B) geninin ek olarak doksisisikline karşı da direnç sağladığı bilinmektedir (44). Diğer tetrasikline dirençli suşlar (*tet*(A) veya *tet*(B) tespit edilmeyen) alternatif tet genlerinden (örneğin; *tet*(D) ve *tet*(E) veya eflüks mekanizmaları kodlayan diğer genler) kaynaklanan dirence sahip olabilirler. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde farklı tet genleri vasıtasıyla sağlanan diğer bir direnç mekanizması olarak "ribozomal korunma" da gösterilmiştir (45). Bulgularımızın bölgedeki balık çiftlikleri ve kültür balıkçılığındaki balık hastalıkları uzmanları ve halk sağlığı takipçileri tarafından değerlendirilmesinin yararlı olacağı kanısındayız.

İntegron gen kasetleri taşıyan deniz kökenli suşların tespit edilmesinin epidemiyolojik olarak ilginç ve kayda değer bir bulgu olduğuna inanmaktayız. Ayrıca, içme sularından izole edilen *E. coli* suşları üzerinde yapılmış önceki çalışmamızda, *dfrA1-aadA1* (GenBank giriş numaraları DQ875875 ve DQ875876) ve *dfrA17-aadA5* (GenBank giriş numarası DQ875874) gen kasetleri taşıyan sınıf 1 integronlar gösterilmiştir (27). Diğer taraftan, Özgümuş ve arkadaşları (46) aynı bölgedeki hastane enfeksiyonlarından izole edilmiş *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında sınıf 1 integronlara entegre olmuş yeni an-

tibiyotik direnç geni kasetleri tespit etmişlerdir. Çevre veya klinik ortamlarda direnç genlerinin bakteriler arasında sürekli paylaşıldığı ve genler arasındaki genetik rekombinasyonun yeni direnç genlerini ortaya çıkardığı kanısındayız. Ülkemizdeki benzer çalışmalar, antibiyotiklere direncin evrimi ve hareketli antibiyotik direnç determinantlarının moleküler epidemiyolojisi gibi konuların yeni olduğunu göstermektedir. Bu genetik yapıları taşıyan elemanların, toplum ve hastane kökenli bakterilerin klinik ortamlarının izlenmesi, gıdalar, içme suları, yıkanma ve rekreasyon amaçlı kullanılan su rezervleri gibi çevresel ortamlarının takibi, antibiyotiklerin kontrollü kullanımını ve bu antibiyotiklerin çevreye karışmalarının kontrolü için sürveyans çalışmaları gerektiğini önermekteyiz. Patojen bakteriler arasında antibiyotik direncinin yayılması en önemli toplum sağlığı problemlerinden biridir. Bu çalışmadaki duyarlı suşların dirençli olanlardan daha fazla olması antibiyotik direncinin deniz kökenli bakterilerdeki boyutunun korku verici olmadığını düşündürmektedir. Fakat doğal sucül çevrelerde yaşayan, antibiyotiklere dirençli patojenlerin veya kommensal bakterilerin, antibiyotiklere duyarlı olanlarına nazaran her zaman daha fazla seçici avantaja sahip olduğu unutulmamalıdır.

Bu çalışmada rapor edilen integron gen kaset yapılarının dünya genelinde diğer çalışmalarda klinik orijinli bakterilerde de gösterilmiş olması, belki de, "farklı çevre kökenli mikroorganizmalar arasında ortak bir genetik havuzun nasıl paylaşıldığını" göstermektedir.

### İletişim / Correspondence

Osman Birol Özgümüş  
Rize Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı  
İslampaşa Mahallesi 53100 Rize  
Tel: 0464 212 3009 – 12 Dahili: 3202  
Faks: 0464 212 3015  
e-mail: osman.ozgumus@rize.edu.tr

### Kaynaklar

1. Mezrioui N, Baleux B. Resistance patterns of *Escherichia coli* strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge. *Water Res* 1994; 28:2399-406.
2. Young HK. Antimicrobial resistance spread in aquatic environment. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 31:627-35.
3. Davis J, Amabile-Cuevas CF. The rise of antibiotic resistance. In: Amabile-Cuevas CF, ed. *Multiple Drug Resistant Bacteria*. Wiltshire: Horizon Scientific Press, 2003: 1-7.
4. Leverstein van Hall MA, Box ATA, Blok HEM, Pauw A, Fluit AC, Verhoef J. Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug resistant *Enterobacteriaceae* in a clinical setting. *J Infect Dis* 2001; 186:49-56.
5. Matthew M. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5:349-58.
6. Grinstead J, Cruz F, Schmitt R. The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid* 1990; 24:163-89.
7. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989; 3:1669-83.
8. Lévesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:185-91.
9. Fling ME, Richards C. The nucleotide sequence of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase gene harbored by Tn7. *Nucleic Acids Res* 1983; 11:5147-58.
10. Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH. *Int2* integron integrase in Tn7. *J Bacteriol* 2002; 184:1712-21.
11. 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* 2005; 56:1019-24.
12. 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; 9:822-6.
13. 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* 2006; 157:220-6.

14. Özgümüş OB, Sandallı 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. *J Microbiol* 2009; 47:19-27.
15. Brenner DJ. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore:Williams and Wilkins, 1986: 408-516.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19<sup>th</sup> informational supplement, M100-S19. Wayne: CLSI, 2009.
17. Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs CF. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:666-72.
18. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10:867-78.
19. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145:1365-73.
20. Ausubel FM, Brient R, Kingston RE, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York:John Wiley and Sons, 1995.
21. Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett* 1991; 82:19-26.
22. Aarestrup FM, Lertworapreecha M, Evans MC, et al. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:715-8.
23. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2658-61.
24. Arlet G, Brami G, Décrè D, et al. Molecular characterization by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM  $\beta$ -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134:203-8.
25. Usluer G, Başbüyük N, Çolak H, Akşit F. Antimicrobial sensitivity of some gram-negative bacterial strains causing hospital or community-acquired infections. *Mikrobiyol Bul* 1993; 27:221-7.
26. Özyurt M, Haznedaroğlu T, Sahiner F, et al. Antimicrobial resistance profiles of community-acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates during 2004-2006 in a training hospital in İstanbul. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42:231-43.
27. Özgümüş OB, Çelik-Sevim E, Alpay-Karaoglu, S, Sandallı 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* 2007; 45:379-87.
28. Sivri N, Kose E, Feyzioglu AM. Modeling the effects of industrial discharged waters to Degirmendere River (South Eastern Black Sea). *J Sci Ind Res* 2006; 65:632-8.
29. Bush K, Jacoby GA. Nomenclature of TEM  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39:1-3.
30. Sirot D, Recule C, Chaibi EB, et al. Complex mutant of TEM-1  $\beta$ -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1322-5.
31. Sanders CC, Sanders WE.  $\beta$ -lactam resistance in gram negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15:824-39.
32. Özgümüş OB, Tosun İ, Aydın F, Kılıç, AO. Non-conjugative plasmids encoding TEM-type  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*. *İnfek Derg* 2002; 16:329-3.
33. Medeiros AA. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactams. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (suppl 1): S19-45.
34. Özgümüş OB, Tosun İ, Aydın F, Kılıç AO, Ertürk M. Carriage of mobilizable plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase gene in ampicillin-resistant *Escherichia coli* strains with origin of normal fecal flora. *Turk J Med Sci* 2006; 36:307-14.
35. Livermore DM.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84.
36. Gür D, Gülay Z, Arıkan AÖ, et al. Resistance to newer  $\beta$ -lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42:537-44.
37. Song JS, Jeon JH, Lee JH, et al. Molecular characterization of TEM-type  $\beta$ -lactamase identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (South of Lihir Island, Papua New Guinea). *J Microbiol* 2005; 43:172-8.
38. Alpay-Karaoglu S, Özgümüş OB, Sevim E, Kolaylı F, Sevim A, Yeşilgil P. Investigation of antibiotic resistance profile and TEM-type  $\beta$ -lactamase gene carriage of ampicillin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from drinking water. *Ann Microbiol* 2007; 57:281-8.

39. Cardonha AMS, Viera RSHF, Rogrigues DP, Macrae A, Peirano G, Teophilo GND. Fecal pollution in water from storm sewer and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Int Microbiol* 2004; 7:231-8.
40. Kasper CW, Burgess JL, Knight IT, Colwell RR. Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Can J Microbiol* 1990; 36:891-4.
41. Grigsby P, Calkins J. The inactivation of a natural population of coliform bacteria by sunlight. *Photochem Photobiol* 1980; 31:291-4.
42. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65:232-60.
43. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol* 2000; 49:929-36.
44. 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* 2007; 103:2580-92.
45. Taylor DE, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1-5.
46. Özgümüş OB, Caylan R, Tosun I, Sandallı C, Aydın K, Koksallı I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying the IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene in a university hospital in Turkey. *Microb Drug Resist* 2007; 13:191-8.