

# Kinolon Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Direnç Sağlayan Gen Mutasyonlarının ve Direnç Genlerinin Araştırılması

Oya PAZARLI\*, Füsün CÖMERT\*, Canan KÜLAH\*, Elif AKTAŞ\*, Füzuzan KÖKTÜRK\*\*

\*Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak

\*\*Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Zonguldak

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, bölgemizdeki *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında kinolon direnç sıklığının belirlenmesi, bu izolatlarda sık görülen kinolon direnç mekanizmalarının varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Şubat-Ağustos 2009 tarihleri arasında izole edilen nalidiksik aside dirençli/orta duyarlı bulunan 265 *Escherichia coli*, 33 *Klebsiella pneumoniae* ve 2 *Klebsiella oxytoca* izolatında *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *gyrA* ve *parC* gen bölgelerinin araştırılması polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle yapılmıştır. *gyrA* ve *parC* gen bölgelerindeki mutasyonların saptanması için dizi analizi yapılmıştır.

**Bulgular:** Nalidiksik asit direnci *E. coli* için % 52, *Klebsiella* spp. için % 27.5 olarak belirlenmiştir. Nalidiksik aside dirençli izolatlarda beta-laktam, aminoglikozit, trimetoprim-sülfametoksazole direncinin ve GSBL üretiminin anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *gyrA* için kinolon direncini tanımlayan bölgede (*Ala67-Gln106*) çift mutasyon olduğu, bunların *Ser83Leu* ve bir izolat dışında *Asp87Asn*, tek izolatta ise *Asp87Tyr* şeklinde olduğu belirlenmiştir. *parC* için dizileme yapılan izolatların hepsinde *Ser80Ile* değişimi olduğu gözlemlenmiş, izolatların 32'sinde (% 40,3) ilave bir mutasyon bulunduğu ve bunların 26 izolatta *Glu84Val*, 4 izolatta *Glu84Gly*, 2 izolatta ise *Glu84Ala* olduğu belirlenmiştir. *E. coli* izolatlarının 99'unda (% 37,4), *K. pneumoniae* izolatlarının dördünde (% 12,1) *aac(6')-Ib* geni belirlenmiştir. İncelenen izolatlar da *qnr* geni bulunmamıştır.

**Sonuç:** İzolatlarımızda kinolon direnci ve GSBL üretimi yüksek bulunmuştur. Kinolon dirençli izolatlarımızda *gyrA* ve *parC* bölgelerinde üç ve daha fazla mutasyonun bulunduğu ilave olarak *aac(6')-Ib*'nin belirgin olarak direnç mekanizmasına eşlik ettiği belirlenmiştir. İzolatlarımızda *qnr* belirlenmemiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., kinolon direnci, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *gyrA* mutasyonu, *parC* mutasyonu

## ABSTRACT

**The Evaluation of Resistance Genes and Gene Mutations in Quinolone Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Isolates**

**Objective:** The aims of this study are to detect the quinolone resistance rates among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* spp. isolates in our region and to investigate the most common quinolone resistance mechanisms.

**Material and Methods:** The presence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *gyrA* and *parC* genes were investigated by polymerase chain reaction method in 265 *Escherichia coli*, 33 *Klebsiella pneumoniae* and two *Klebsiella oxytoca* strains which were isolated between February–August 2009, and found to be non/intermediate susceptible to nalidixic acid. Sequence analysis was used for detection of *gyrA* and *parC* mutations.

**Results:** Resistance to nalidixic acid was determined as 52% for *E. coli* and 27.5% for *Klebsiella* spp. Beta-lactam, aminoglycoside, trimethoprim-sulfamethoxazole resistance and ESBL-production rates were significantly higher among nalidixic acid resistant isolates. Double mutations were detected in *gyrA* quinolone resistance defining region (*Ala67-Gln106*); the first one being *Ser83Leu* in all isolates and the other being *Asp87Tyr* in one isolate and *Asp87Asn* in other isolates. *Ser80Ile* alteration was observed among all isolates sequenced for *parC* mutations; while 32 (40.3%) of the isolates had an additional mutation, as *Glu84Val*, *Glu84Gly* and *Glu84Ala* in 26, four and two, respectively. The *aac(6')-Ib* gene was detected in 99 (37.4%) of *E. coli* and four (12.1%) of *K. pneumoniae* isolates. The *qnr* gene was not detected in any of the tested isolates.

**Conclusion:** The quinolone resistance rates and accompanying ESBL-production was high among the isolates in our region. We have detected three or more mutations in *gyrA* and *parC* regions in quinolone resistant isolates, and additional *aac(6')-Ib* gene in a significant number of isolates. The *qnr* gene was not detected in any of the tested isolates.

**Keywords:** *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., quinolone resistance, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *gyrA* mutation, *parC* mutation

Alındığı tarih: 13.12.2016

Kabul tarihi: 08.07.2017

Yazışma adresi: Füsün Cömert, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kozlu / Zonguldak

Tel: (0372) 261 24 32

e-posta: fusbeg@yahoo.com

## GİRİŞ

Kinolon grubu antibiyotiklere yaygın olarak kullanılmaları nedeniyle hastane kaynaklı izolatların yanı sıra toplum kaynaklı izolatlarda da direnç oranlarında belirgin artış gözlenmekte, ülkemiz için ampirik tedavide güvenilirliklerini yitirmek üzere oldukları bildirilmektedir<sup>(1)</sup>. Kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç doğal ve kazanılmış olabilmektedir. Doğal direnç endojen “çoklu ilaç atım pompalarının” üretimi ile tanımlanmıştır. Kazanılmış direnç ilacın hedefi olan bakteri enzimlerinde (DNA giraz ve DNA topoizomera-raz IV) kromozomal mutasyonlar, çoklu ilaç atım pompalarının aşırı üretimini aktive eden mutasyonlar, ilaca geçirgenlik azalması veya plazmid aktarımlı olarak gerçekleşmektedir<sup>(2)</sup>. Topoizomera-raz II’yi kinolon inhibisyonundan koruyan Qnr, genel aminoglikozid asetiltransferaz enziminin bir varyantı olan *aac(6’)-Ib-cr* ve kinolon pompa proteinleri olan *QepA* ve *OqxAB* plazmid aracılı dirençte rol oynadığı düşünülen proteinlerdir<sup>(3-5)</sup>. Kinolon direncinin aktarımında rol oynayan plazmidin aynı zamanda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), kloramfenikol asetiltransferaz ve bazı dezenfektan direnç genlerinin aktarımını da yaptığı bildirilmiştir<sup>(3)</sup>.

*Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. başta idrar yolu enfeksiyonları olmak üzere en sık rastlanan enfeksiyon etkenlerinin başında gelmektedir<sup>(6)</sup>. Bu özellikleri ve özellikle toplum kökenli idrar yolu enfeksiyonlarında kinolon grubu antibiyotiklerin ampirik olarak yaygın kullanımı nedeni ile bu bakteriler için kinolon grubuna karşı yüksek direnç oranları bildirilmektedir<sup>(1)</sup>. Bu çalışmada, hastanemize başvuran hastalardan etken olarak izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında en sık rastlanan kinolon direnç mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri

Şubat-Ağustos 2009 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden (idrara, kan, yara ve yumuşak doku, solunum yolu, steril vücut sıvısı, vb.) elde edilen 628 izolatta (508 *E. coli* ve 120 *Klebsiella* spp.) kinolon direnci araştırıldı. Bakteri tanımlamaları geleneksel biyokimyasal testlerle (üç şekerli demirli besiyeri, Simmon’un sitratlı besiyeri, üre ve Motilite-indol-lizin besiyerinde biyokimyasal reaksiyonlar, indol pozitifliği ve hareket değerlendirmesi) yapıldı. İzolatlarda kinolon direnci taraması nalidiksik asit antibiyotik diski (Oxoid) ile yapıldı<sup>(7)</sup>. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. Nalidiksik aside dirençli olan izolatlar için nalidiksik asit (Sigma-Aldrich, Almanya) ve siprofloksasin (Sigma-Aldrich, Almanya) için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) agar dilüsyon yöntemiyle belirlendi<sup>(8)</sup>. İzolatların diğer antibiyotikler (ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefalotin, sefoksitin, sefotaksim, seftriakson, sefepim, imipenem, meropenem, amikasini gentamisin, tobramisim, trimetoprim-sulfame-toksazol) için antimikrobiyal duyarlılık testi disk difüzyon yöntemi ile yapıldı<sup>(7)</sup>. İzolatlarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi çift disk sinerji yöntemiyle belirlendi<sup>(9)</sup>.

### İzolatlarda kinolon direnci sağlayan gen mutasyonlarının ve direnç genlerinin gösterilmesi

İzolatlardan DNA eldesi ticari izolasyon kiti (EZ-10 Spin Column Genomic DNA MiniPreps Kit, Bio Basic, Kanada) kullanılarak yapıldı. *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6’)-Ib*, *gyrA*, *parC* gen bölgelerinin çoğaltılması için Tablo 1’de belirtilen primerler kullanıldı. *aac(6’)-Ib* geni belirlenen izolatlarda *aac(6’)-Ib-cr* varyantları BtsCI restriksiyon enzimi ile araştırıldı<sup>(10)</sup>.

Tablo 1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri.

Gen Bölgesi	Forward Primer	Reverse Primer	Bant Büyüklüğü (bp)	Kaynak no
<i>qnrA</i>	5'-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3'	5'-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA-3'	516	(12)
<i>qnrB</i>	5'-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3'	5'-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3	469	(12)
<i>qnrS</i>	5'-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3'	5'-TAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3	417	(12)
<i>aac(6)-Ib</i>	5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3'	5'-CTCGAATGCCTCCCCTGTTT-3'	482	(10)
<i>gyrA</i>	5'-TACACCGGTCAACATTGAGG-3'	5'-TTAATATTGCCGCCGTCGG-3'	648	(13)
<i>parC</i>	5'-AAACCTGTTACGCGCCGATT-3'	5'-GTGGTGCCGTTAAGCAAA-3'	395	(14)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için 1X PZR tamponu (200 $\mu$ M dNTP, 1.25mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ g/ml sığır serum albümini) kullanıldı (pH 8.4). Her reaksiyon için 20 pmol/ $\mu$ l primer, 2.5U Taq DNA polimeraz (Bioron, İngiltere), 5  $\mu$ l DNA konularak son reaksiyon hacmi 50  $\mu$ l olacak şekilde steril distile su ile tamamlandı<sup>(11)</sup>.

Amplifikasyon için Gene Amp PCR System 9700 Termal Cycler ve görüntüleme için Gel Doc UV görüntüleme sistemi (BioRad, İtalya), belirleyici (marker) olarak 100-bç'lik DNA Ladder (Sigma, Almanya) kullanıldı.

### Nükleik asit dizileme

Kinolon dirençli izolatlar arasından rastgele seçilen 57 izolat için kinolon direncini tanımlayan bölge dizisi (*gyrA* ve *parC*) Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde (TÜBİTAK MAM GMBE) yapıldı. PZR ürünlerinin tamamı agaroz jelde yürütüldükten sonra, agaroz jel DNA ekstraksiyon kiti (Roche, Katalog No. 11696505001) kullanılarak agaroz jelden saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA örneklerinin dizi analizi, ilgili genlere özgü primerler kullanılarak gerçekleştirildi. Beckman Coulter Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (DTCS) kullanılarak kurulan dizi reaksiyonlarında özgün "forward" veya "reverse" primerler 3.2 pmol ve kalıp PZR ürünleri 50 fmol konsantrasyonlarda kullanıldı. Dizi analizi başarılı olan tüm örnekler ait sonuçlar "fasta" ve "scf" olmak üzere iki farklı formatta

elektronik olarak kaydedilerek tarafımıza gönderildi. Elde edilen protein dizileri, National Center for Biotechnology Information (NCBI) web sayfasında bulunan protein BLAST programıyla gen bankasındaki protein dizileriyle karşılaştırıldı<sup>(15)</sup>.

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS (Versiyon 13.0) programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak belirtildi. Kategorik yapıdaki değişkenler bakımından gruplar arası farklılıklar ki-kare testi ile incelendi. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi ve p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Çalışmaya alınan *E. coli* izolatları için nalidiksik asit ve siprofloksasin direnci sırasıyla %52 ve %28.1, *Klebsiella* türleri için ise sırasıyla %46.7 ve %21.1 bulunmuştur. Nalidiksik aside dirençli olan izolatların ampicilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefalotin, sefepim, sefotaksim, sefuroksim, sefoksitin, gentamisin, tobramisin, amikasin, trimetoprim-sülfametoksazole karşı anlamlı olarak daha dirençli oldukları saptanmıştır (p<0.001). İzolatlarda karbapenem direncine rastlanmamıştır.

Nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda nalidiksik asit için MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri >256  $\mu$ g/ml, siprofloksasin için ise >32  $\mu$ g/ml bulunmuştur. Yatan hasta izolatlarında nalidiksik asit

Tablo 2. İzolatlarda belirlenen GSBL oranları.

	Tüm Bakteriler (n,%)			Nalidiksik Asit Dirençli/Orta Duyarlı (n,%)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
GSBL Pozitif	190 (37.4)	36 (31.6)	1	165 (62.3)	23 (69.7)	1
GSBL Negatif	318 (62.6)	78 (68.4)	5	100 (37.7)	10 (30.3)	1
Toplam	508	114	6	265	33	2

direnci anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p=0.049$ ). Nalidiksik aside dirençli olan izolatlarda GSBL üretimi (%83.3), duyarlı olanlara göre (%16.7) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.001$ ) (Tablo 2).

### Kinolon direnci sağlayan gen mutasyonlarının ve direnç genlerinin belirlenmesi

*gyrA* için QRDR olarak tanımlanan Ala67-Gln106 arasında aminoasit dizilimleri incelendiğinde 57 izolatın tümünde 83. kodonda serin yerine lösin (Ser83Leu) ve bir izolat dışında 87. kodonda aspartat yerine asparajin (Asp87Asn), tek izolatta ise 87. kodonda aspartat yerine tirozin (Asp87Tyr) bulunduğu belirlenmiştir. *parC* için 57 izolatın hepsinde 80. kodonda serin yerine izolösin (Ser80Ile) geçişi olduğu belirlenmiştir. *parC* için ilave mutasyon olarak, 84. kodonda glutamat yerine 26 izolatta valin (Glu84Val), 4 izolatta glisin (Glu84Gly) ve iki izolatta alanin (Glu84Ala) geçişi olduğu belirlenmiştir.

*aac(6')-Ib* geni *E. coli* izolatlarının 99'unda (%37.4), *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının dördünde (%12.1) belirlenmiştir. *Klebsiella oxytoca* izolatlarında bu gen bölgesi bulunmamıştır. *aac(6')-Ib* pozitif olan *E. coli* izolatların ikisi dışında tümünün (%98) *aac(6')-Ib-cr* varyantı oldukları belirlenmiştir.

*aac(6')-Ib* geni saptanan *E. coli* izolatlarında tobramisin, gentamisin direnci ve GSBL üretimi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek

bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Bu izolatlarda trimetoprim-sulfametoksazole azalmış duyarlılık belirlenmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.485$ ).

İzolatlarda *qnr* (*qnrA*, *qnrB* ve *qnrS*) geni bulunmamıştır.

### TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan bildirimler kinolon direncinin dünyada ve ülkemizde oldukça yüksek düzeylere ulaştığını göstermektedir<sup>(16)</sup>. Çalışmamızda, siprofloksasin direnci *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları için sırasıyla %46.7 ve %21.1 olarak bulunmuştur. *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL üretimi ile florokinolon direnci arasında yakın ilişki olduğu bildirilmektedir<sup>(17-19)</sup>. Çalışmamızda da, kinolon dirençli izolatlarda GSBL üretimi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Çalışmamızda, GSBL belirlenmesi için kullanılan çift disk sinerji yöntemi CLSI tarafından önerilen referans yöntem olmamakla birlikte, çoğu suş için özellikle de diskler arası uzaklık 15-20 mm. arası olduğunda standart yöntemle uyumlu sonuç verdiği bildirilmiştir<sup>(20)</sup>. Kinolon direncinin en önemli mekanizması DNA giraz ve topoizomeraz IV genlerinde kinolon direncini tanımlayan bölgede oluşan mutasyonlardır. Topoizomeraz IV, kinolonlara DNA giraz kadar duyarlı olmaması nedeniyle Gram negatif bakteriler için ikinci hedefdir. Genellikle *gyrA* genindeki çift mutasyonlar (birinci sıklıkta 83, ikinci sıklıkta 87. kodonda) yüksek düzeyde

kinolon direncinin nedeni olarak bildirilmiştir. *E. coli*'de *parC* ve *parE* mutasyonlarının her zaman *gyrA* mutasyonları ile birlikte bulunması, topoizomeraz IV mutasyonlarının, DNA girazda gelişen mutasyonlarla oluşan azalmış kinolon duyarlılığı olmadan gelişmediğini göstermektedir<sup>(21)</sup>. Buna ilave olarak *parC* geninde oluşan tek veya çift mutasyonların artan kinolon direncinde tamamlayıcı bir rol oynadığı düşünülmektedir<sup>(13,22)</sup>. Kinolon dirençli izolatlarımızın nalidiksik asit ve siprofloksasin için belirlenen  $MİK_{50}$  ve  $MİK_{90}$  değerleri izolatlarımızda kinolon direncinin yüksek düzeyde olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, ilaç hedeflerinde kinolon direncini belirleyen bölgelerde dizileme yapılan izolatların tümünde *gyrA* bölgesinde *Ala67-Gln106* arasında çift mutasyon olduğu, ilave olarak *parC* bölgesinde bu izolatların tümünde tek mutasyon bulunduğu saptanmış, ayrıca *parC* bölgesinde izolatların 32'sinde (%56) ilave mutasyonlar bulunduğu belirlenmiştir. Belirlenen mutasyonlar literatürde belirtilen sık rastlanan mutasyonlar ile uyumludur<sup>(23-25)</sup>. Bu konuda ülkemizde Erač ve ark.<sup>(26)</sup> sekiz *E. coli* izolatında *gyrA* bölgesinde *Ser83Leu* değişimi saptamış, siprofloksasin duyarlı nalidiksik asit dirençli olan bir izolat hariç diğer izolatlarda ek olarak *Asp87Tyr* veya *Asp87Asn* mutasyonları olduğunu belirlemişlerdir. Güven Ö<sup>(27)</sup>, sağlıklı çocukların dışkılarından elde ettiği nalidiksik asit ve siprofloksasin dirençli altı *E. coli* izolatında, *gyrA*'da çift mutasyon (*Ser83Leu* ve *Asp87Asn*) saptamıştır. Aynı çalışmada *parC* bölgesinde suşların hepsinde yine çift mutasyon (*Ser80Ile* ve *Ser83Tyr*) belirlenmiştir. Bu mutasyonlara ek olarak kökenlerin birinde *parC*'de *Glu84Gly*, bir diğerinde ise *Glu84Val* değişimi gözlenmiştir<sup>(27)</sup>. Belirlenen mutasyonlar bakımından bu çalışma bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda, daha önceki bildirimlerden farklı olarak *parC*'de *Glu84Ala* değişimi belirlenmiştir. Ayrıca izolatlarımızda ikinci en sık rastlanan mutasyon olarak *Glu84Val* değişimi

gözlenmiş, Güven'in bildirdiği *Ser83Tyr* değişimi bulunmamıştır.

Çalışmamızda, hedef bölge değerlendirmesi yapılan izolatların yedisinde *gyrA* bölgesinde kinolon direncini tanımlayan bölge dışında 162. kodonda daha önce bildirilmeyen mutasyonun (*Lys162Gln*) yer aldığı gözlenmiştir. Literatüre bakıldığında *gyrA*'da QRDR dışında saptanmış mutasyonlar (*Ala196Glu*, *Ala51Val*) bildirildiği gözlenmiş, ancak bunların kinolon direnci ile ilişkisi kesin olarak belirlenmemiştir<sup>(28,29)</sup>.

1998 yılında çoğul dirençli bir *K. pneumoniae* izolatında *qnrA* geninin gösterilmesi ile birlikte, kinolon direncinin plazmidle ilişkili olabildiği gündeme gelmiş ve büyük ilgi uyandırmıştır<sup>(30)</sup>. Qnr proteinleri pentapeptid yine ailesinin bir üyesi olup, DNA giraz ve topoizomeraz IV'e bağlanarak bu hedef bölgeleri kinolonların inhibitör etkisinden korumaktadır. Tanımlanmış olan ilk protein 218 aminoasit içeren QnrA'dır. Bundan sonra iki protein daha tanımlanmıştır. Bunlar QnrA ile sırasıyla %40 ve %59 aminoasit benzerliği gösteren QnrB ve QnrS proteinleridir. Qnr proteinleri başta *K. pneumoniae* ve *Enterobacter* spp. başta olmak üzere *Enterobacteriaceae* üyelerinde değişik üyelerden bildirilmektedir. Qnr taşıyan plazmidler aynı zamanda GSBL de taşımaktadır. Dünya genelinde bu konuyla ilgili yapılmış çalışmalara bakıldığında, Norveç ve İsveç'te *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında *qnr* prevalansı<sup>(31)</sup> sırasıyla %0.7 ve %7.7, Danimarka'da<sup>(32)</sup> %1.63, Fransa'da GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında (33,34) %1.6, Kanada'da siprofloksasin ve/veya tobramisine dirençli *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında %1 bulunmuştur<sup>(35)</sup>. İspanya<sup>(36)</sup> (%5), Çin<sup>(37)</sup> (%8) ve Amerika<sup>(12,14)</sup> (%15) gibi bazı ülkelerde daha yüksek prevalanslar belirlenmiştir. *Klebsiella* spp. izolatlarında *qnr* gen prevalansının *E. coli*'ye göre daha yüksek olduğu yapılan bazı çalışmalar da dikkat çekmektedir. Örneğin, Fransa'da *E. coli* izolatla-

rının %0.63'ünde, *Klebsiellae* spp. izolatlarının ise %7'sinde *qnr* genleri bulunmuştur<sup>(33)</sup>. Yine benzer şekilde Karah ve ark.<sup>(31)</sup> *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında *qnr* genlerinin prevalansını sırasıyla % 0.7 ve %7.7 olarak bulmuştur. Ülkemizde bu konuyla ilgili olarak az sayıda çalışma yapılmış olması ve yapılan bu çalışmalarda incelenen izolat sayısının da düşük olması nedeniyle *qnr* genlerinin sıklığı hakkında kısıtlı veri bulunmaktadır. Türkiye'de *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşları ile yapılmış çalışmalara bakıldığında, *qnr* genlerinin, ya bu çalışmada olduğu gibi hiç bulunmadığı ya da düşük bildirim oranlarının bulunduğu görülmektedir<sup>(27,38,39)</sup>. Nazik ve ark.<sup>(39)</sup> 2008 yılında yoğun bakım izolatı olan 460 Gram negatif bakterinin üçünde (%0.65) *qnr* geni (bir *qnrB1* ve iki *qnrS1*) saptanmıştır. Poirel ve ark.<sup>(40)</sup> Türkiye'de farklı hastanelerde izole edilen ve GSBL oluşturan 138 *E. coli* ve 110 *K. pneumoniae* izolatından yalnızca birinde *qnrB1* geni saptamışlardır. Öktem ve ark.<sup>(41)</sup> kan kültürlerinden izole edilen nalidiksik asite dirençli 356 *Enterobacteriaceae* üyesinin olan ve altısında *qnrA*, üçünde *qnrS* geni saptamışlardır. *qnrA* saptanan suşların ikisinin ve *qnrS* saptanan suşların birinin GSBL pozitif belirlendiği bu çalışmada, literatürle uyumsuz olarak GSBL negatif kökenlerdeki sıklık daha yüksek bulunmuştur<sup>(41)</sup>. Yine Öktem ve ark.<sup>(42)</sup> bir başka çalışmada, hepsi kinolon dirençli ve GSBL pozitif kan kültürü izolatı olan 34 *E. coli*'nin birinde ve 44 *K. pneumoniae*'nin dördünde *qnrA* saptamışlar, *qnrA* pozitiflik oranını %6.4 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada, *qnrB* ve *qnrS* genleri bulunmamıştır<sup>(42)</sup>. Nazik ve ark.<sup>(43)</sup> yaptıkları başka bir çalışmada, 971'i *Enterobacteriaceae* üyesi, 73'ü non-fermentatif Gram negatif çomak olmak üzere toplam 1044 izolatta üç *qnrA*, iki *qnrB*, bir *qnrS* geni bildirmiş, *qnr* genlerinin GSBL üreten izolatlarda daha sık olduğunu gözlemişlerdir. Özgümüş ve ark.<sup>(44)</sup> Türkiye'nin kuzeydoğu bölgesindeki on nehirden aldıkları su örneklerinden izole ettikleri 88 *E.coli* ve 35 *K. pneumoniae*'da birer *qnrS*

geni bulmuşlardır. Araştırmacılar nehirler gibi çevresel kaynakların çoğul dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri için bir rezervuar rolü oynayabileceğini vurgulamışlardır<sup>(44)</sup>. Güven Ö<sup>(27)</sup>, sağlıklı çocukların dışkılarında kinolon dirençli *E. coli* taşıyıcılığı ve direnç mekanizmalarını saptamak amacıyla yaptığı araştırmada, kinolon direnci saptadığı 15 *E. coli* izolatında *qnr* geni saptamamıştır. Avrupa'daki çalışmalarda<sup>(31,33,45)</sup>, genellikle *qnrS* ve *qnrB* genleri baskın görülmekle birlikte, İngiltere'de yapılmış olan bir çalışmada<sup>(46)</sup>, *qnrA* geni, İspanya'da yapılmış olan bir çalışmada<sup>(36)</sup> ise, *qnrA1* geni yüksek oranda belirlenmiştir. Türkiye'de *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarıyla yapılan çalışmalara bakıldığında, *qnrA*'nın, *qnrS* ve *qnrB* genlerine göre daha yüksek oranda görüldüğü, *qnrS* ve *qnrB* genlerininse birbirine yakın oranlarda görüldüğü gözlenmektedir. Çalışmamızda, incelenen izolatlarda plazmid kaynaklı kinolon direnci saptanmamıştır.

Plazmid geçişli direnç genlerinden diğeri, siprofloksasin ve norfloksasin gibi piperazinil grubu taşıyan kinolonların enzimatik inaktivasyonu ile gerçekleşmektedir. *aac(6')-Ib* geni kanamisin, tobramisin ve amikasin direncine neden olan bir aminoglikozit asetiltransferazı kodlamaktadır. Bu genin bir varyantı olan *aac(6')-Ib-cr* geni ise, *aac(6')-Ib*'den *Trp102Arg* ve *Asp179Tyr* farklılığı göstermektedir. Enzim bu şekilde siprofloksasini asetilleme yetisi kazanmaktadır. *qnr* ve *aac(6')-Ib-cr* aynı hücrede birlikte bulduklarında *qnr*'nin yalnız başına yaptığından dört kat daha fazla MİK artışı oluşmakta, duyarlılık bakımından klinik direnç sınırına (1 µg/ml) yaklaşmaktadır. Bunun yanı sıra *aac(6')-Ib-cr*'nin yalnız bulunması, siprofloksasine maruz kalma durumunda oluşacak kromozomal mutasyon sıklığını arttırmaktadır<sup>(47)</sup>. *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* ve *CTX-M* genlerinin aynı plazmid üzerinde lokalize olarak birlikte aktarılabildiği gösterilmiştir<sup>(37,48)</sup>. Dolayısıyla bu mekanizma GSBL üreten izolatlarda yüksek

kinolon direncinin açıklanmasına katkı sağlamıştır. Türkiye’de *aac(6’)-Ib-cr* geninin araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Poirel ve ark.<sup>(40)</sup> Türkiye’den gönderilen GSBL oluşturan *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının % 78’inde *aac(6’)-Ib-cr* bulunduğunu göstermişlerdir. Nazik ve ark.<sup>(43)</sup> ikisi *qnrB*-pozitif *K. pneumoniae*, biri *qnrA* pozitif *E. coli* olmak üzere üç suşta *aac(6’)-Ib-cr* geni saptamışlardır. Çalışmamızda *E. coli* izolatlarının 99’unda (%37.4), *K. pneumoniae* izolatlarının dördünde (%12.1) *aac(6’)-Ib* geni belirlenmiş, bunların da 101’i (%98) *aac(6’)-Ib-cr* bulunmuştur. İzolatlarımızdaki GSBL üretimi ile *aac(6’)-Ib* gen varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.001$ ). *aac(6’)-Ib* geni saptanan izolatlar incelendiğinde tobramisin ve gentamisin direnci istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Bu izolatlarda trimetoprim-sulfametoksazole azalmış duyarlılık tespit edilmiş, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.485$ ). *aac(6’)-Ib* pozitif türlerin ek olarak trimetoprim-sulfametoksazole de azalmış duyarlılık göstermesi *aac(6’)-Ib-cr*’nin genellikle kompleks integronlarda bulunması<sup>(49)</sup> ve bu integronların 3’-CS bölgelerinin *sul1* geni kodlaması<sup>(50)</sup> ile açıklanmaktadır.

Sonuç olarak izolatlarımızda kinolon direnci *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatları için sırasıyla %46.7 ve %21.1 olarak bulunmuş, bu izolatlardaki direnç düzeyinin yüksek olduğu belirlenmiş, GSBL üretimi anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. İlaç hedef bölgesi değerlendirilen dirençli izolatlarımızın tümünde üç ve yarıdan fazlasında dört mutasyon bulunmuş, izolatlarımızda %37.4 oranında *aac(6’)-Ib-cr* mevcudiyeti belirlenmiştir. Kinolon dirençli izolatlarımızda yüksek düzey kinolon direnci belirlenmiş, bununla ilişkili ve literatürle uyumlu olarak temel kinolon direnç mekanizmasının ilaç hedef bölgesindeki çoklu mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir.

## Teşekkür

Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Fonu (Proje No: 2009-20-01-14) tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmada kullanılan pozitif kontrol izolatlarını bize sağlayan Prof. Dr. Zeynep Gülay’a ve PZR deneylerinde yardımcı olan Bio. Eldan Subaşı’na teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Dündar D, Willke A, Sonmez G. İdrar yolu infeksiyonu etkenleri ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Klinik Derg* 2008; 21:7-11.
2. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005;41:120-6. <https://doi.org/10.1086/428052>
3. Li XZ. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25:453-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.04.002>
4. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3354-60. <https://doi.org/10.1128/AAC.00339-07>
5. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:664-89.
6. Eisenstein BI, Zaleznik DF. *Enterobacteriaceae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Churchill Livingstone Philadelphia, 2000; 2294-2310.
7. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard Tenth Edition. CLSI document M02-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
8. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
9. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*; hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Inf Dis* 1988; 10:867-78.
10. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6’)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3953-5.
11. Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ. Moleküler mikrobiyoloji tanı prensipleri ve uygulamalar, (Ed’ler) Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Palme Yayıncılık. Ankara, 2006.
12. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. Qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States.

- Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50:2872-4.
13. **Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C.** Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003, 51:1001-5.
  14. **Vila J, Ruiz J, Go-i P, de Anta MT.** Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:491-3.
  15. BLAST.National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
  16. **de Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H.** The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:860-8. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12028>
  17. **Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, et al.** Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000; 30:473-8. <https://doi.org/10.1086/313719>
  18. **Lautenbach E, Fishman NO, Bilker WB, et al.** Risk factors for fluoroquinolone resistance in nosocomial *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections. *Arch Intern Med* 2002; 162:2469-77. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.21.2469>
  19. **Kang CI, Kim SH, Park WB, et al.** Clinical epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to broad-spectrum cephalosporin resistance in bloodstream infections caused by *Enterobacter* species. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:88-92. <https://doi.org/10.1086/502492>
  20. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases:a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:657-86. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
  21. **Ruiz J.** Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:1109-17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg222>
  22. **Fendukly F, Karlsson I, Hanson H. S, Kronvall G, and Dornbusch K.** Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin. *APMIS* 2003; 111:857-66. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.1110904.x>
  23. **Betitra Y, Teresa V, Miguel V, Abdelaziz T.** Determinants of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in Bejaia, Algeria. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 7:462-7. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60075-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60075-4)
  24. **Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ.** Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 2:358-73. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006>
  25. **Chakrabarty RP, Sultana M, Shehreen S, Akter S, Hossain MA.** Contribution of target alteration, protection and efflux pump in achieving high ciprofloxacin resistance in *Enterobacteriaceae*. *AMB Express* 2016; 6:126. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0294-9>
  26. **Eraç B, Gill A, Amyes SGB, Gülay Z.** Siprofloksasine dirençli *Escherichia coli* suşlarında *Gyr A* mutasyonlarının incelenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2003; 37:125-30.
  27. **Güven Ö.** Sağlıklı çocuklarda dışkıda kinolon dirençli *Escherichia coli* taşıyıcılığının ve direnç mekanizmalarının saptanması. [Yüksek Lisans Tezi] İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
  28. **Komp Lindgren P, Karlsson Å, Hughes D.** Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3222-32. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3222-3232.200>
  29. **Griggs, DJ, Gensberg K, Piddock LJ.** Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from human and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1009-13.
  30. **Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351:797-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07322-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07322-4)
  31. **Karah N.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in Norwegian and Swedish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. [Master's Thesis in Medical Microbiology] Tromsø, Norveç: Department of Microbiology and Virology Institute of Medical Biology University of Tromsø, 2008.
  32. **Cavaco LM, Hansen DS, Friis-Møller A, Aarestrup FM, Hasman H, Frimodt-Møller N.** First detection of plasmid-mediated quinolone resistance (*qnrA* and *qnrS*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans in Scandinavia. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:804-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl554>
  33. **Poirel L, Leviandier C, Nordmann P.** Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QnrA* and *QnrS* in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3992-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00597-06>
  34. **Cattoir V, Poirel L, Nordmann P.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrB4* in France from an *Enterobacter cloacae* clinical isolate co-expressing a *QnrS1* determinant. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:2652-53. <https://doi.org/10.1128/AAC.01616-06>
  35. **Pitout JD, Wei Y, Church DL, Gregson DB.** Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')-Ib-cr*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(5): 999-1002.
  36. **Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, et al.** Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:291-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm448>
  37. **Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, et al.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-ib-cr*



- in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:1003-6.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkn063>
38. **Nazik H, Poirel L, Nordmann P.** Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2146-7.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.2146-2147.2005>
39. **Nazik H, Öngen B, Kuvat N.** Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance among isolates obtained in a Turkish intensive care unit. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61:310-2.
40. **Poirel L, Gür D, Minarini L, Arslan U, Nordmann P.** Molecular epidemiology of plasmid mediated quinolone resistance determinants in extended spectrum beta-lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates from Turkey. 18<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, İspanya, 2008: P1527.
41. **Öktem MA, Biçmen M, Gülay Z.** Kan kültürlerinden soyutlanan *Enterobacteriaceae* izolatlarında plazmit ile ilişkili kinolon direnci genlerinin saptanması, 8. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, Program ve Özet Kitabı, İstanbul, 2008: P28.
42. **Oktem IM, Gulay Z, Bicmen M, Gur D, HITIT Project Study Group.** *qnrA* prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61:13-7.
43. **Nazik H, İlktaç M, Öngen B.** Prevalence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* (in *qnr*-positive isolates) among the ESBL-positive and/or ciprofloxacin-resistant isolates in Turkey. *J Chemother* 2009; 21:219-21.  
<https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.2.219>
44. **Ozgunus OB, 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* 2009; 47:19-27.  
<https://doi.org/10.1007/s12275-008-0206-z>
45. **Chen YT, Shu HY, Li LH, et al.** Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum- $\beta$ -Lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3861-6.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00456-06>
46. **Corkill JE, Anson JJ, Hart CA.** High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:1115-7.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dki388>
47. **Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al.** Fluoroquinolone modifying enzyme: a novel adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12:83-8.
48. **Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:664-89.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00016-09>
49. **Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC.** Plasmid mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2242-8.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2242-2248.2003>
50. **Bennett PM.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:1-4.  
<https://doi.org/10.1093/jac/43.1.1>