

# Türkiye’de Su Kaynaklı *Aeromonas* spp. İzolatlarında Saptanan İlk *QnrS* Gen Pozitifliği

## Detection of the First *QnrS* Gene Positivity in Aquatic *Aeromonas* spp. Isolates in Turkey

Ertan Emek ONUK<sup>1</sup>, Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI<sup>2</sup>, Ahmet Yılmaz ÇOBAN<sup>3</sup>, Alper ÇİFTÇİ<sup>4</sup>, Behire Işıl DİDİNEN<sup>5</sup>, Soner ALTUN<sup>6</sup>, Mehtap SÖĞÜT ÜNLÜ<sup>7</sup>, Aydın DEVECİ<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun.

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Aquatic Animal Diseases, Samsun, Turkey.

<sup>2</sup> Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

<sup>2</sup> Ankara Occupational Diseases Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

<sup>3</sup> Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Samsun, Turkey.

<sup>4</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

<sup>4</sup> Ondokuz Mayıs University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Samsun, Turkey.

<sup>5</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta.

<sup>5</sup> Suleyman Demirel University Egirdir Fisheries Faculty, Isparta, Turkey.

<sup>6</sup> Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa.

<sup>6</sup> Uludag University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Aquatic Animal Diseases, Bursa, Turkey.

<sup>7</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Samsun.

<sup>7</sup> Ondokuz Mayıs University High School of Health, Samsun, Turkey.

<sup>8</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

<sup>8</sup> Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Samsun, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 20.08.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 30.12.2014

### ÖZ

Sularda yaygın olarak bulunan *Aeromonas* türleri, gram-negatif, oksidaz pozitif, fakültatif anaerob bakteriler olup, *A. hydrophila*, *A. sobria* ve *A. bestiarum* türleri hem insanlarda hem de soğukkanlı hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Tıp ve veterinerlik alanında yaygın olarak kullanılan kinolonların çevresel ortamlarda değişmeden kalabilme özelliği, dirençli mutantların seçiminde önemli rol oynamaktadır. Plazmid aracılı direnç, kinolonlara karşı direncin gelişiminde etkin olan mekanizmalardan biri olup, *qnr*, *qepA*, *aac(6′)-Ib-cr* ve *oqxAB* genleri direnç determinantları olarak tanımlanmıştır. Birçok farklı *qnr* determinantının, başta *Enterobacteriaceae* ailesi olmak üzere çeşitli bakterilerde saptanması, bu yapıların doğada bulunabileceğini vurgulamaktadır. Yakın zamanda sudan izole edilmiş *Aeromonas* spp. izolatlarında plazmid aracılı kinolon direnci tespit edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, ülkemizde su

**İletişim (Correspondence):** Uzm. Dr. Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, 06280 Keçiören, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 580 8395, **E-posta (E-mail):** yeliztanriverdi@gmail.com

kaynaklı *Aeromonas* suşlarında *qnr* gen varlığının araştırılmasıdır. Çalışmaya, Türkiye'nin üç farklı coğrafi bölgesindeki (Ege, Akdeniz ve Karadeniz) balık ve sulardan izole edilmiş toplam 45 *Aeromonas* spp. izolatı dahil edilmiştir. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması 16S rDNA-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (M-PCR) ile yapılmış ve 20 suş *A.sobria*, 10 suş *A.hydrophila*, 9 suş *A.salmonicida*, dört suş *A.bestiarum* ve iki suş *A.veronii* olarak tanımlanmıştır. Plazmid aracılı kinolon direnç genlerinden *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrS* genlerinin varlığı M-PCR ile araştırılmış; *qnr* pozitif olarak saptanan dokuz izolata dizi analizi uygulanmıştır. Dizi analizi sonucuna göre, altı *A.sobria*, iki *A.bestiarum* ve bir *A.hydrophila* izolatında (9/45; %20) *qnr* varlığı tespit edilmiş; bu gen GenBank veri tabanı ile karşılaştırıldığında *qnrS2* olarak tanımlanmıştır. Tüm *qnrS2* pozitif *Aeromonas* izolatları siprofloksasine duyarlı olarak saptanırken, beş izolat nalidik aside dirençli bulunmuştur. Bu çalışma, ülkemizde su kaynaklı *Aeromonas* türlerinde plazmid aracılı kinolon direncinin araştırıldığı ve *qnrS2* varlığının tespit edildiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Sonuç olarak, su kaynaklı mikroorganizmalardaki farklı direnç genlerinin diğer bakterilere ve klinik izolatlara aktarılmasının, enfeksiyonların tedavisinde potansiyel bir risk oluşturacağı düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Aeromonas* türleri; plazmid aracılı kinolon direnci; *qnr*; su; Türkiye.

## ABSTRACT

*Aeromonas* spp. are oxidase positive, gram-negative, facultative anaerobic bacilli that are widely distributed in aquatic environments. *A.hydrophila*, *A.sobria* and *A.bestiarum* may cause severe infections in both human and cold-blooded animals. Environmental persistence of quinolones that are widely used in both human and veterinary medicine plays an important role in the selection of resistant mutants. Plasmid-mediated resistance is one of the main mechanisms involved in quinolone resistance, and *qnr*, *qepA*, *aac(6)-Ib-cr*, *oqxAB* genes are identified as resistance determinants. Determination of various types of *qnr* gene in different bacteria mainly in *Enterobacteriaceae*, suggests that they are widely distributed in nature. Recently, plasmid-mediated quinolone resistance was defined among *Aeromonas* species isolated from water. The aim of this study was to investigate the presence of *qnr* genes among aquatic *Aeromonas* spp. in Turkey. A total of 45 *Aeromonas* strains isolated from water and fishes collected from three different geographical regions (Aegean, Mediterranean and Blacksea) in Turkey, were included in the study. The isolates were identified at species level by the use of 16S rDNA-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) analysis and multiplex polymerase chain reaction (M-PCR). Among the isolates, 20 were identified as *A.sobria*, 10 as *A.hydrophila*, nine as *A.salmonicida*, four as *A.bestiarum* and two as *A.veronii*. The plasmid-mediated quinolone resistance determinants, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* and *qnrS* genes, were investigated by M-PCR, and sequence analysis was performed for nine *qnr*-positive isolates. According to the sequence analysis of the genes, *qnr* genes were characterized in six *A.sobria*, in two *A.bestiarum* and in one *A.hydrophila* isolate (9/45; 20%). When the sequence was compared with GenBank database, this gene was found as *qnrS2*. All *qnrS*-positive *Aeromonas* spp. isolates were ciprofloxacin-susceptible, while five of them were resistant to nalidixic acid. This study is the first research about the plasmid-mediated quinolone resistance and the presence of *qnrS2* genes among *Aeromonas* spp. isolated from fishes and water in Turkey. In conclusion, various resistance genes of aquatic bacteria may constitute a potential risk for the transmission of those genes to other bacteria as well as clinical isolates.

**Keywords:** *Aeromonas* species; plasmid-mediated quinolone resistance; *qnr*; water; Turkey.

## GİRİŞ

Sularda yaygın olarak bulunan *Aeromonas* türleri, gram-negatif, oksidaz pozitif, fakültatif anaerob bakterilerdir. *Aeromonas* spp. hem insanlarda hem de soğukkanlı hayvanlarda önemli enfeksiyonlara neden olmaktadır<sup>1</sup>. Geniş bir konak seçiciliğine

sahip olan *A.salmonicida* türü, özellikle salmonid kültür balıkları için önemli patojenler arasındadır ve ciddi ekonomik zararlara neden olur. *A.hydrophila*, *A.sobria* ve *A.bestiarum* gibi mezofilik türler ise birçok farklı balık türünde enfeksiyonlara neden olabilmektedir<sup>2-4</sup>. *Aeromonas* spp. ayrıca insanlarda septisemi, yara enfeksiyonları, menenjit, peritonit gibi birçok enfeksiyondan sorumlu olup, *A.veronii*, *A.caviae*, *A.trota* ve *A.hydrophila* gibi bazı türler enterotoksinleri sayesinde gastrointestinal şikayetlere yol açmaktadır<sup>5,6</sup>.

Son yıllarda, antibakteriyel direncin tüm dünyada giderek yaygınlaşması enfeksiyonların tedavisinde sıkıntı yaratmaktadır. Geniş antibakteriyel spektruma sahip olan kinolonlar, birçok enfeksiyonun tedavisinde kullanılmalarının yanı sıra veterinerlikte de yaygın olarak kullanılmaktadır. Kinolonların dış çevrede değişmeden kalabilme özelliği, dirençli mutantların seçiminde etkili olabilir<sup>7,8</sup>. Kinolonların bakterisidal etkisi, DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini etkileyerek DNA sentezinin inhibisyonu ile olmaktadır. Bakteride DNA giraz (*gyrA* ve *gyrB*) ve topoizomeraz IV (*parC* ve *parE*) genlerinde meydana gelen spontan mutasyonlar ve dışa-atım pompa sistemlerinin hiperaktivasyonu, kinolonlara karşı dirençten sorumlu mekanizmalar arasındadır. Son yıllarda ise plazmid aracılı *qnr*, *qepA*, *oqxAB* ve *aac(6')-Ib-cr* genlerinin de kinolon direncinde rol oynadığı gösterilmiştir<sup>9</sup>. Plazmid aracılı kinolon direnci ilk olarak 1998 yılında *Klebsiella pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır<sup>10</sup>. Plazmidle aktarıldığı saptanan ve kinolon direncine neden olan bu gen bölgesi "*qnr*" olarak isimlendirilmiş; bu gen daha sonra *qnrA* olarak adlandırılmış ve sonrasında *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* ve *qnrD* genleri de tanımlanmıştır<sup>6,11</sup>. *Qnr* genleri tarafından kodlanan proteinler DNA giraz ve topoizomeraz IV yapılarına bağlanarak onları kinolonların etkisinden koruyarak etki gösterir<sup>9</sup>. Birçok farklı *qnr* geninin zaman içinde tanımlanması bu yapıların doğada bulunabileceklerini düşündürmüştür. Bazı *qnrA* geni varyantları (*qnrA3-qnrA5*) *Shewanella algae* kromozomunda gösterilmiş; Seine (Paris, Fransa) nehrinden izole edilmiş olan *Aeromonas punctata* subsp. *punctata* ve *A.media* suşlarında ise *qnrS2* geni saptanmıştır<sup>12,13</sup>. Bu veriler, kinolon direnci ile ilişkili olan *qnr* determinantlarının sulardaki mikroorganizmaların kromozomlarında bulunduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın amacı, ülkemizdeki su ve balıklardan izole edilmiş olan *Aeromonas* spp. izolatlarında *qnr* genlerinin varlığını araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Bakteriyel İzolatlar

Çalışmaya, Türkiye'deki üç farklı coğrafi bölgedeki (Ege, Akdeniz, Karadeniz) su ve balıklardan izole edilen 45 *Aeromonas* spp. izolatı dahil edildi. Tüm suşlar %1 NaCl içeren triptik soy agarda  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de üretildi ve çalışılıncaya kadar %15 gliserol içeren triptik soy buyyon içinde  $-70^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Cins Düzeyinde Tanımlama

İzolatlardan DNA ekstraksiyonu, spin kolon yöntemi ile ticari kit (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, ABD) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda yapıldı. Elde edilen genomik DNA'lar çalışılıncaya kadar  $-20^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

DNA amplifikasyonu, Chacon ve arkadaşlarının<sup>14</sup> tanımladığı yönteme göre yapıldı. PCR karışımı; 1x PCR tamponu, 1.8 mM MgCl, 0.3 mM dNTP, 1 µM GCAT primerleri, 2.5 U Taq polimeraz ve 5 µl DNA olacak şekilde toplam 25 µl hacimde hazırlandı. Amplifikasyon; 95°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu; 35 döngü (denatürasyon 94°C'de 1 dk, bağlanma 65°C'de 1 dk ve uzama 72°C'de 1 dk) olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin beklenen büyüklüğü ve çalışmada kullanılan primerler Tablo 1'de gösterildi. PCR yönteminde kontrol olarak *qnr* pozitif olarak tanımlanmış suşlar kullanıldı.

### 16S rDNA-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

*Aeromonas* olarak ön tanımlaması yapılan suşların, PCR ile amplifikasyonu yapılan 16S rDNA genlerinin restriksiyon analizi ile kesin tanımlaması yapıldı. 16S rDNA segment amplifikasyonu ve endonükleaz kesimi Borell ve arkadaşları<sup>15</sup> tarafından tarif edilen protokole göre çalışıldı. Amplifikasyonu yapılmış olan 16S rDNA genleri iki endonükleaz enzimi (*AluI* ve *MboI*) ile aynı anda kesildi. Ancak *A.salmonicida*, *A.bestiarum*, *A.encheleia*, *Aeromonas* sp.HG11 ve *A.popoffii* bu iki enzimle ortak RFLP profili gösterdiğinden, *A.salmonicida* ve *A.bestiarum* suşlarının ayırımını yapabilmek için ek olarak *EheI* (*NarI*) enzimi de kullanıldı.

Tablo 1. PCR Yönteminde Kullanılan Primer Dizileri

Primer	Oligonükleotid dizisi (5' → 3')	Amplikon büyüklüğü (bp)
GCAT-F	CTCCTGGAATCCCAAGTATC	237
GCAT-R	GGCAGGTTGAACAGCAGTATC	
20F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	1500
1500R	GGTACCTTGTTACGACTT	
Fer 3	CGGTTTTGGCGCAGTGACC	422
Fer 4	GGCGCTCGGGTTGGCTATCT	
Hydrolipase F	AACCTGGTCCGCTCAAGCCGTTG	760
Hydrolipase R	TTGCTCGCCTCGGCCAGCAGCT	
<i>gyrB-veronii</i> F	CCATTTTCAGCGATACCCTGTT	101
<i>gyrB-veronii</i> R	CTCGTCTTGACAGACGGATGGAG	
<i>qnrAF</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516
<i>qnrAR</i>	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	
<i>qnrBF</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	476
<i>qnrBR2</i>	ATGAGCAACGATGCCTGGTA	
<i>qnrCF</i>	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	307
<i>qnrCR</i>	CACCTACCCATTTATTTTCA	
<i>qnrSmF</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
<i>qnrSmR</i>	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	

*A.salmonicida* ve *A.bestiarum* arasındaki ayırım için *hydrolipase* ve *gyrB-veronii* genlerini hedef alan primerler kullanılarak ve daha önceki çalışmalarda belirtilmiş yöntemlerde bazı değişiklikler yapılarak multipleks-PCR (M-PCR) yöntemi uygulandı<sup>16</sup>. *gyrB-veronii* geni hem *A.salmonicida* hem de *A.bestiarum* için negatifken, *hydrolipase* geni sadece *A.bestiarum* için pozitifdir. M-PCR için reaksiyon karışımı; 5 µl DNA, 1x PCR tamponu, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM her bir primer çiftinden, 200 µM dNTP ve 1 U Taq polimeraz içerecek şekilde ve dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiş steril distile su eklenerek 25 µl'ye tamamlandı. DNA amplifikasyonu; 94°C'de 5 dk başlangıç denatürasyonu; 40 döngü (94°C'de 1 dk, 62°C'de 1dk ve 72°C'de 90 sn) ve 72°C'de 10 dk son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. Ayrıca *A.salmonicida* için primer çiftleri (Fer3/Fer4) kullanılarak, özgül PCR ile Beaz-Hidalgo ve arkadaşları<sup>17</sup> tarafından tanımlanan şekilde genetik doğrulama yapıldı.

### **Qnr Genlerinin M-PCR ile Belirlenmesi**

Tüm suşlar *qnr* genleri için *qnrAF/qnrAR*, *qnrBF/qnrBR2*, *qnrCF/qnrCR* ve *qnrSmF/qnrSmR* primerleri kullanılarak, Kim ve arkadaşları<sup>18</sup> tarafından tanımlanan şekilde M-PCR ile çalışıldı (Tablo I). Bu yöntemde PCR karışımı 50 µl olacak şekilde; DEPC ile muamele edilmiş su, 1x PCR tampon, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 3 U Taq polimeraz, 1 µM her bir primerden ve 3 µl DNA eklenerek hazırlandı. Amplifikasyon programı; 95°C'de 1 dk başlangıç denatürasyonu, 35 döngü amplifikasyon (95°C'de 1 dk, 60°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk) ve 72°C'de 10 dk son uzama olacak şekilde uygulandı. M-PCR ile *qnr* geni tespit edilen suşlara tek primer kullanılarak tekrar PCR işlemi uygulandı.

### **Qnr Gen Bölgelerinin Dizilenmesi**

M-PCR sonucu *QnrS* pozitif olduğu saptanan izolatların PCR ürünleri saflaştırılarak *qnrSmF* primeri ile tek yönlü dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonuçları Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak Gen Bankası ile karşılaştırıldı.

### **Antibiyotik Duyarlılık Testi**

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı<sup>19</sup>. *Qnr* pozitif izolatların MİK değerlerinin belirlenmesinde E-test (M.I.C. Evaluator, Oxoid, İngiltere) yöntemi kullanıldı.

## **BULGULAR**

Çalışmamızda, 16S rDNA-RFLP analizi sonucunda 45 izolatın 10'u *A.hydrophila*, 20'si *A.sobria*, 2'si *A.veronii* ve 13'ü *A.salmonicida/A.bestiarum* olarak tanımlanmıştır. Yapılan ileri tanımlamada, *A.salmonicida/A.bestiarum* izolatlarının 4'ünde *hydrolipase* geni tespit edilerek bu suşlar *A.bestiarum* olarak tanımlanmış; geri kalan 9 izolatta *hydrolipase* ve *gyrB-veronii* genleri tespit edilmemiş, bu izolatlarda *A.salmonicida* için özgül olan *fstA* (ferric siderophore receptor) geni saptanmıştır (Tablo II).

Karadeniz bölgesinden izole edilen suşların 8'inde ve Akdeniz bölgesinden izole edilen suşların 1'inde *qnrS* gen bölgesi saptanmış, Ege bölgesi izolatlarında *qnr* gen bölgesi tespit edilmemiştir (Tablo II). Yapılan dizi analizi sonucunda izolatlara ait elde edilen

**Tablo II.** *Aeromonas* spp. İzolatlarının Moleküler Tanımlanması ve *QnrS* Pozitif Suşlarda Siprofloksasin MİK ( $\mu\text{g/ml}$ ) Değerleri

Suş no.	PCR-RFLP ile tanı	<i>fstA</i> geni	<i>hyd/gyrB</i> genleri	Sonuç	Coğrafi bölge	<i>Qnr</i> geni	MİK
1	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	+	-/-	<i>A.salmonicida</i>	Ege	-	
2	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	+	-/-	<i>A.salmonicida</i>	Ege	-	
3	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	+	-/-	<i>A.salmonicida</i>	Ege	-	
4	<i>A. hydrophila</i>				Ege	-	
5	<i>A. hydrophila</i>				Ege	-	
6	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	+	-/-	<i>A.salmonicida</i>	Ege	-	
7	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	+	-/-	<i>A.salmonicida</i>	Ege	-	
8	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	+	-/-	<i>A.salmonicida</i>	Ege	-	
9	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	+	-/-	<i>A.salmonicida</i>	Karadeniz	-	
10	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	+	-/-	<i>A.salmonicida</i>	Karadeniz	-	
11	<i>A. hydrophila</i>				Karadeniz	-	
12	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	-	+/-	<i>A.bestiarum</i>	Karadeniz	<i>qnrS2</i>	0.002
13	<i>A.sobria</i>				Karadeniz	-	
14	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	+	-/-	<i>A.salmonicida</i>	Karadeniz	-	
15	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	-	+/-	<i>A.bestiarum</i>	Karadeniz	-	
16	<i>A.sobria</i>				Karadeniz	<i>qnrS2</i>	0.5
17	<i>A.sobria</i>				Karadeniz	<i>qnrS2</i>	0.094
18	<i>A.hydrophila</i>				Karadeniz	-	
19	<i>A.sobria</i>				Karadeniz	-	
20	<i>A.hydrophila</i>				Karadeniz	<i>qnrS2</i>	0.002
21	<i>A.sobria</i>				Karadeniz	-	
22	<i>A.sobria</i>				Karadeniz	<i>qnrS2</i>	0.002
23	<i>A.salmonicida/A.bestiarum</i>	-	+/-	<i>A.bestiarum</i>	Karadeniz	<i>qnrS2</i>	0.25
24	<i>A.hydrophila</i>				Karadeniz	-	
25	<i>A.hydrophila</i>				Karadeniz	-	
26	<i>A.hydrophila</i>	-			Karadeniz	-	

**Tablo II.** *Aeromonas* spp. İzolatlarının Moleküler Tanımlanması ve *QnrS* Pozitif Suşlarda Siprofloksasin MİK ( $\mu\text{g/ml}$ ) Değerleri (Devamı)

Suş no.	PCR-RFLP ile tanı	<i>fstA</i> geni	<i>hyd/gyrB</i> genleri	Sonuç	Coğrafi bölge	<i>Qnr</i> geni	MİK
27	<i>A.sobria</i>				Karadeniz	<i>qnrS2</i>	0.003
28	<i>A.veronii</i>				Karadeniz	-	
29	<i>A.sobria</i>				Karadeniz	-	
30	<i>A.sobria</i>				Karadeniz	<i>qnrS2</i>	0.047
31	<i>A.veronii</i>				Karadeniz	-	
32	<i>A.hydrophila</i>				Karadeniz	-	
33	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	
34	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	
35	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	<i>qnrS2</i>	0.094
36	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	
37	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	
38	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	
39	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	
40	<i>A.hydrophila</i>				Akdeniz	-	
41	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	
42	<i>A.salmonicida/A. bestiarum</i>	-	+/-	<i>A.bestiarum</i>	Akdeniz	-	
43	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	
44	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	
45	<i>A.sobria</i>				Akdeniz	-	

*hyd/gyrB*: Hidrolipase/*gyrB-veronii* genleri.

kısmi *qnrS* dizilerin GenBank'a daha önceden kayıt edilen *qnrS2* genleri ile uyumlu olduğu saptanmış ve bu izolatlar *qnrS2* pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo II).

İzolatların antibiyotik duyarlılığı değerlendirildiğinde; *qnr* pozitif izolatların hepsi siprofloksasine duyarlı bulunmuş ve MİK değerleri Tablo II'de sunulmuştur. Nalidiksik asit duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle araştırılmış ve 3 izolat duyarlı, 1 izolat orta duyarlı ve 5 izolat dirençli olarak tespit edilmiştir. Üç izolatın hem siprofloksasin hem nalidiksik aside duyarlı; 5 izolatın siprofloksasine duyarlı nalidik aside dirençli; 1 izolatın ise siprofloksasine duyarlı, nalidiksik aside orta duyarlı olduğu belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

Plazmid aracılı kinolon direncinin araştırıldığı çalışmalarda, *qnr* determinantlarının prevalansı %0.2 ile %94 arasında değişen oranlarda verilmekte; bu geniş aralığın nedeni olarak, çalışılan suşların özelliklerinin farklı olması (geniş spektrumlu beta-laktamaz pozitif izolatlar, seftazidim veya nalidiksik aside dirençli suşlar gibi) gösterilmektedir<sup>9</sup>.

Ülkemizde *qnr* genlerinin varlığının araştırıldığı çalışmalarda, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* genlerinin bulunduğu bildirilmiştir<sup>20-24</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da, *qnr* genlerinin çevresel gram-negatif bakterilerden köken aldığı gösterilmiştir<sup>12,13,25</sup>. Poirel ve arkadaşları<sup>12</sup>, 48 gram-negatif bakteri türünde gerçekleştirdikleri dizi analizinde, *Shewanella algae* kromozomunda *qnrA* varyantlarını (*qnrA3-qnrA5*) tanımlamışlar; bu bakterinin siprofloksasin MİK değerinin *qnr* geni taşımayan *Shewanella putrefaciens* türüne göre 4-8 kat yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada ayrıca deniz ve taze su kaynaklarından izole edilmiş olan *Shewanella* spp. izolatlarında *qnrB5* ve *qnrB19* genleri tespit edilmiştir<sup>12</sup>. Birçok *Vibrionaceae* türünün *qnr* tipi genleri kromozomal olarak taşıdıkları ve *S.algae* ile *Vibrio splendidus* bakterilerinin *qnrA* ve *qnrS* genleri için öncül oldukları düşünülmektedir<sup>12,25,26</sup>.

Cattior ve arkadaşları<sup>13</sup> 2006 yılında Seine nehri sularında yaptıkları çalışmada, *A.punctata* subsp. *punctata* ve *A.media* izolatlarında *qnrS2* geni tespit etmişler; bu iki izolatın da nalidiksik asit ve florokinolonlara dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak araştırmacılar, bu iki izolatındaki yüksek kinolon ve florokinolon MİK değerlerinin, tip II topoizomeraza meydana gelen mutasyonlara bağlı olduğunu belirtmişlerdir<sup>13</sup>. Yine 2008 yılında İsviçre'deki göllerden alınan örneklerde yapılan çalışmada, *A.allosaccharophila* izolatında *qnrS2* gen varlığı saptanmış; bu izolatın kinolon ve florokinolonlara karşı azalmış duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür<sup>27</sup>. Çalışmamızda *qnrS2* determinantının, su ve balıklardan izole edilmiş olan altı *A.sobria*, iki *A.bestiarum* ve bir *A.hydrophila* izolatında saptanmış olması, akuatik ortamda *Aeromonas* türlerinin *qnrS* genlerinin rezervuarı olabileceğini düşündürmektedir. *QnrS2* varlığı ayrıca *A.veronii* ve *A.caviae* klinik izolatlarında da bildirilmektedir<sup>28,29</sup>. Su kaplumbağası ve karideslerden izole edilmiş olan *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas putida* izolatlarında da *qnrA* and *qnrB* genleri tespit edilmiştir<sup>30,31</sup>.

Çevrenin antibiyotikler veya diğer kirleticilerle kontamine olması, antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına neden olmaktadır<sup>32</sup>. Bu genlerin yayılmasındaki mekanizmalardan biri de, direnç plazmidlerinin doğal çevrede birbirinden ilişkisiz bakteriler arasında aktarılmasıdır<sup>33</sup>. Bu nedenle su kaynaklı mikroorganizmalardaki farklı direnç genlerinin diğer bakterilere aktarılması ve klinik izolatlarda da saptanması kaçınılmaz olarak görülmektedir. Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda, *Campylobacter* spp. ve *P.aeruginosa* gibi *Enterobacteriaceae* ailesi dışındaki bakterilerde *qnr* genleri araştırılmış, ancak tespit edilememiştir<sup>24,34-36</sup>. Dolayısıyla sunulan bu çalışma, ülkemizde su kaynaklı *Aeromonas* türlerinde *qnr* geninin araştırıldığı ve *qnrS2* varlığının tespit edildiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

## TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan *qnr* pozitif suşlar Prof. George Jacoby (Lahey Clinic, Burlington, USA) ve Prof. Patrice Nordmann (Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914 "Emerging Resistance to Antibiotics", Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine et Université Paris-Sud, K.-Bicêtre, France) tarafından; *qnrC* plazmidini ise Prof. Min Gui Wang (Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, People's Republic of China) tarafından temin edilmiştir.



**KAYNAKLAR**

1. Huddleston JR, Zak JC, Jeter RM. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. isolated from environmental sources. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(11): 7036-42.
2. Kozinska A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis* 2007; 30(5): 293-301.
3. Rey A, Verjan N, Ferguson HW, Irequi C. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Vet Rec* 2009; 164(16): 493-9.
4. Onuk EE, Fındık A, Turk N, et al. Molecular identification and determination of some virulence genes of *Aeromonas* spp. in fish and water from Turkish coastal regions. *Rev Med Vet* 2013; 164(4): 200-6.
5. Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998; 27(2): 332-44.
6. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 35-73.
7. Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review. *Chemosphere* 1998; 36(2): 357-93.
8. Goni-Urriza M, Arpin C, Capdepuuy M, Dubois V, Caumette P, Quentin C. Type-II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(2): 350-9.
9. Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* 2009; 16(3): 1028-46.
10. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351(9105): 797-9.
11. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper D, Robiscek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4): 664-89.
12. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Hammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3091-4.
13. Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(2):231-7.
14. Chacon MR, Castro-Escarpullia G, Soler L, Guarro J, Figueras MJ. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44(3): 221-5.
15. Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martinez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1997; 35(7): 1671-4.
16. Sen K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Can J Microbiol* 2005; 51(11): 957-66.
17. Beaz-Hidalgo R, Magi GE, Balboa S, Barja JL, Romalde JL. *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Vet Microbiol* 2008; 128(3): 386-94.
18. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(2): 639-45.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 23<sup>rd</sup> Informational Supplement. CLSI Document M100-S23, 2013. CLSI, Wayne, PA.
20. Oktem IM, Gulay Z, Biçmen 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(1): 13-7.
21. 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(4): 310-2.

22. Avsaroglu MD, Helmuth R, Junker E, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by *qnrS1* in *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin. J Antimicrob Chemother 2007; 60(5): 1146-50.
23. Coban AY, Nohut OK, Tanrıverdi Çaycı Y, et al. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae*: a multicenter study. Mikrobiyol Bul 2012; 46(3): 366-74.
24. Nazik H, İlktaç M, Ongen 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(2): 219-21.
25. Cattoir V, Poirel L, Mazel D, Soussy CJ, Nordmann P. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated *QnrS*-like quinolone resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(7): 2650-1.
26. Poirel L, Liard A, Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P. *Vibrionaceae* as a possible source of *Qnr*-like quinolone resistance determinants. J Antimicrob Chemother 2005; 56(6): 1118-21.
27. Picao RC, Poirel L, Demarta A, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophika* recovered from a Swiss lake. J Antimicrob Chemother 2008; 62(5): 948-50.
28. Arias A, Seral C, Navarro F, Miro E, Coll P, Castillo FJ. Plasmid-mediated *QnrS2* determinant in an *Aeromonas caviae* isolate recovered from a patient with diarrhea. Clin Microbiol Infect 2010; 16(7): 1005-7.
29. Sanchez-Cespedes J, Blasco MD, Marti S, et al. Plasmid-mediated *QnrS2* determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(8): 2990-1.
30. Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, et al. Zoo animals as reservoirs of gram negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. Appl Environ Microbiol 2007; 73(20): 6686- 90.
31. Tran QT, Nawaz MS, Deck J, Nguyen KT, Cerniglia CE. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas putida* isolates from imported shrimp. Appl Environ Microbiol 2010; 77(5): 1885-7.
32. Goni-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. Appl Environ Microbiol 2000; 66(1): 125-32.
33. Kruse H, Sorum H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. Appl Environ Microbiol 1994; 60(11): 4015-21.
34. Coban AY, Tanrıverdi Çaycı Y, Yildirim T, Erturan Z, Bozdoğan B, Durupinar B. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. Mikrobiyol Bul 2011; 45(4): 602-8.
35. Ongen B, Nazik H. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance among *Campylobacter* strains. Farmaci & Terapia 2008; 25(3-4): 37-9.
36. Tanrıverdi Çaycı Y, Coban AY, Gunaydin M. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Ind J Med Microbiol 2014; 32(3): 285-9.