



Haziran 2015

İletişim adresleri : "Güven Külekçi" gkulekci@istanbul.edu.tr,

"Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti" tmc@tmc-online.org

Anaerop Haber Haziran 2015 sayısının konu başlığı : *Yurt içi / yurt dışı anaerop yayınlar*

Klinik ve İntestinal *Bacteroides fragilis* group izolatlarında Enterotoksin and Antibiyotik Direnç Genlerinin Prevalansı

Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN

Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

e-posta: muzeyyenmamal.torun@med.bahcesehir.edu.tr

Gastrointestinal mikrobiyotadan sıklıkla izole edilen *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) bakteriler , ağız boşluğu, üst solunum yolları ve kadın genital yollarına da kolonize olabilirler. BFG bakteriler, kolondaki mikrobiyotanın %1'inden azını oluşturmalarına rağmen önemli insan patojenleridir ve sıklıkla intraabdominal, plöropulmoner ve genital enfeksiyonlar, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olurlar. Son yıllarda yapılan araştırmalarda BFG bakterilerde farklı coğrafik bölgelere göre değişkenlik gösteren ve giderek artan oranlarda antibiyotik direnci bildirilmektedir. BFG bakteriler arasında antibiyotik direncinin horizontal yayılımı konjugatif ve hareketli plazmidler, konjugatif transpozonlar ve integre genetik elementlerle taşınan antibiyotik direnç genleri ile olmaktadır. Bazı *Bacteroides fragilis* kökenleri enterotoksin üretir (ETBF), hem çocuklarda hem de erişkinlerde enterit, akut diyare ve inflammatuvar barsak hastalıklarına neden olabilir.Yapılan araştırmalarda, ETBF prevalansının diyareli hastalarda %7.2-%15, sağlıklı kişilerde asemptomatik taşıyıcılık oranının %6.5-%12.5 olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde Toprak ve ark. tarafından kolorektal kanserli hastalar ile yapılan bir araştırmada *bft* geni % 38 oranında saptanmıştır.

Danışmanı olduğum Yüksek Lisans Öğrencim Achille Aime Kangaba'nın tez çalışmasında *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerde antibiyotiklere direnç durumu (genotipik ve fenotipik olarak) ve enterotoksin üretimi (genotipik) arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmak istenmiş ve bu tez çalışması planlanmıştır.Bu çalışma 25'i çeşitli klinik örneklerden, 25'i de

sağlıklı insanların dışkılarından izole edilen 50 *Bacteroides fragilis* grubu bakteri ile yapılmıştır.

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli servislerinde yatan hastalara ait intraabdominal, pelvik, deri ve yumuşak doku absesi örnekleri ve kontrol grubu olarak sağlıklı kişilerden alınan dışkı örnekleri alınarak anaerop kütürler yapılmıştır. Örnekler %5 koyun kanı, 10 mg/l hemin ve 1 mg/l K1 vitamini ilave edilen Brucella agar besiyerlerine ekimler yapılarak anaerobik atmosferde 72 saat inkübe edilmiştir. Üreyen gram negatif anaerop çomaklar; Gram boyama, koloni morfolojisi, % 20 safraya direnç özellikleri incelenerek ve Vitek ANC identifikasyon kartları kullanılarak Vitek 2 (BioMerieux, Durham, NC.) cihazında tanımlanmıştır. BFG olarak tanımlanan bakteriler incelemeye alınmaya kadar % 15 gliserin içeren Beyin Kalp Infüzyon (BHI) broth içinde -80° C'de saklanmıştır. Antibiyotik testleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'nin önerileri doğrultusunda agar dilüsyon testleri kullanılarak yapılmış; amoksisilin/klavulonik asit, sefoksitin, klindamisin, imipenem, metronidazole ve tetrasiklinin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIK) belirlenmiştir. Kontrol kökenler olarak *B. fragilis* ATCC 25285 and *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 kullanılmıştır.

Beta- laktamaz üretimi Nitrosefin diski (BBL cefinase; Beckton Dickinson, Baltimore, MD, USA) ile araştırılmıştır. Antibiyotiklere direnç genleri (*cepA*, *cfiA*, *ermF*, *nim*, *tetQ*) ve enterotoksin geni (*bft*) araştırmaları Tablo-1'de bildirilen primerler kullanılarak multipleks PCR testi ile yapılmıştır.

Tablo 1. Multipleks PCR çalışmasında kullanılan primerler

Primer	Ürün Size (bp)	Sequence
<i>cfiA</i> -forward	353	5'-ATG GTA CCT TCC AAC GGG-3'
<i>cfiA</i> -reverse		5'-CAC GAT ATT GTC GGT-3'
<i>cepA</i> -forward	619	5'-TAT CGA GCA GTG CCA TC-3'
<i>cepA</i> -reverse		5'-GCG CAG AAC AGT CCT CCT GA-3'
<i>ermF</i> -forward	185	5'-CCT TAT GGC ATT ACT TCC GA-3'
<i>ermF</i> -reverse		5'-GGA CCT ACC TCA TAG ACA AG-3'
<i>nim</i> -forward	455	5'-ATG TTCAGA GAA ATG CGG CGT AAG CG-3'
<i>nim</i> -reverse		5'-GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC-3'
<i>tetQ</i> -forward	758	5'-GGC TTCT ACG ACA TCT ATTA-3'
<i>tetQ</i> -reverse		5'-CAT CAA CAT TTA TCT CTC TG-3'
<i>bft</i> -forward	220	5'-GAG CCG AAG ACG GTG TAT GTG ATT TGT-3'
<i>bft</i> -reverse		5'-TGC TCA GCG CCC AGT ATA TGA CCT AGT-3'

Klinik izolatlarda β -laktamaz üretimi %92 oranında pozitif olarak bulunmuş; antibiyotiklere fenotipik direnç ampisilin % 92, amoksisillin/klavulanik asid %8, sefoksitin % 28, imipenem %8, klindamisin % 44, metronidazol % 8 ve tetrasiklin % 72 olarak saptanmıştır. İntestinal izolatlarda β -laktamaz üretimi %96 oranında pozitif olarak bulunmuş; antibiyotiklere fenotipik direnç ampisilin % 96, amoksisillin/klavulanik asid %8, sefoksitin % 32, imipenem %12, klindamisin %72, metronidazol % 8 ve tetrasiklin % 96 olarak saptanmıştır. Antibiyotiklere direnç genleri ve enterotoksin genlerinin dağılımı Tablo 2’de; *bft* pozitif ve *bft* negatif izolatlarda multiple antibiyotik direnç genlerinin bulunma durumu Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 2. 50 BFG izolatında antimikrobiyal direnç genleri ve enterotoksin genlerinin dağılımı

İzolatın kaynağı (s)	Gen saptanan izolatlar, s (%)					
	<i>cepA</i> *	<i>cfiA</i> **	<i>erm</i> ***	<i>nim</i> °	<i>tetQ</i> °°	<i>bft</i> °°°
Klinik (25)	22(88)	2(8)	11(44)	2(8)	16(64)	4(16)
İntestinal(25)	23(92)	4(16)	18(72)	1(4)	23(92)	6(24)
Toplam (50)	45(90)	6(12)	29(58)	3(6)	39(78)	10(20)

**cepA*: β -laktamaz üretim geni

***cfiA*: metallo- β -laktamaz üretim geni

****erm*: klindamisin direnç geni

°*nim*: metronidazol direnç geni

°°*tetQ*: tetrasiklin direnç geni

°°°*bft*: enterotoksin üretim geni

Tablo 3. *bft* pozitif ve *bft* negatif izolatlarda multiple antibiyotik direnç genlerinin bulunma durumu

Direnç genleri	Klinik izolatlar (s=25)		İntestinal izolatlar (s=25)	
	<i>bft</i> pozitif (s=4)	<i>bft</i> negatif (s=21)	<i>bft</i> pozitif (s=6)	<i>bft</i> negatif (s=19)
<i>cepA+cfiA+tetQ</i>	1	1	2	1
<i>erm+tetQ</i>	2	5	3	9
<i>erm+nim+tetQ</i>	1	1	1	-
<i>erm+cfiA+tetQ</i>	-	1	-	1
Toplam	4 (100%)	8(38%)	6(100%)	11(57%)

Antibiyotiklere fenotipik direnç ile direnç genlerinin bulunması arasında aşağıda bildirilen kökenler hariç uyum saptanmıştır;

1. İki izolat (1 klinik+ 1 intestinal) fenotipik olarak β -laktamaz enzimi ürettiği halde *cep A* geni bulundurmamaktadır.
2. Üç izolat (1 klinik+ 2 intestinal) amoksisillin/klavulanik asid kombinasyonuna fenotipik olarak dirençli olduğu halde *cep A* geni bulundurmaktadır.
3. Bir intestinal izolat, fenotipik olarak imipenem direnci göstermediği halde *cfiA* geni varlığı göstermektedir. Bu durum, bu kökende *cfiA* gen ürünün ekspresyonu için gerekli olan özel insersion sekanslarının (IS) bulunmadığını düşündürmektedir.
4. Bir intestinal izolat, *nim* geni bulunmadığı halde fenotipik olarak metronidazol direnci göstermiştir.
5. Üç izolat (2 klinik + 1intestinal) , *tetQ* geni bulunmadığı halde fenotipik olarak tetrasiklin direnci göstermiştir.

Bu çalışmada, multidrug-rezistan (MDR) BFG bakteriler, klinik izolatlarda % 48, intestinal izolatlarda % 68 oranında saptanmıştır. En yüksek oranda görülen MDR (%38) genleri *cepA* + *erm* + *tetQ* 'dür. Entertoksin üretiminden sorumlu olan *bft* genlerinin bulunma durumu ve antimikrobiyal direnç arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu çalışmada sonuç olarak, ülkemizde halen BFG bakterilere en etkin olan antibiyotiklerin imipenem, metronidazol ve amoksisillin/klavulonik asid olduğu saptanmıştır. Ayrıca hem klinik hem de intestinal örneklerden izole edilen BFG bakterilerde enterotoksin üretimi ve antimikrobiyal direnç arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Antibiyotik direnç gelişimini önlemek veya kontrol altına alabilmek için BFG bakterilerin antibiyotik direnç paternlerini belirli aralıklarla saptamak ve dirençten sorumlu olan genlerin durumunu yakından izlemek gerekmektedir.

Bu çalışma:

1. **8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur.** Kangaba AA, Yarımcam Sağlam F, Bahar Tokman H, Mamal Torun M. *Bacteroides fragilis* grubu Bakterilerde Antibiyotik Direncinin ve Enterotoksin Yapımının Araştırılması. 04.06.2014-07.06.2014 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. 2014. ANKARA

2. Bu çalışma 'Anaecobe' dergisinde yayınlanmak üzere kabul edilmiştir.

Title: The Prevalence of Enterotoxin and Antibiotic Resistance Genes In Clinical and Intestinal *Bacteroides fragilis* group isolates in Turkey

Article Type: Research Paper

Section/Category: Clinical Microbiology

Keywords: *Bacteroides fragilis* group, *cepA*, *cfiA*, *ermF*, *nim*, *tetQ*, *bft*

Corresponding Author: Prof. Müzeyyen Mamal Torun,

Corresponding Author's Institution: Bahcesehir University School of Medicine

First Author: Müzeyyen Mamal Torun

Order of Authors: Müzeyyen Mamal Torun; Achille A Kangaba, MSc; Filiz Yarımcam Sağlam, Asst Prof; Mert Torun, Mr; Hrisi Bahar Tokman, Prof Dr

Abstract: This study was conducted to measure the antibiotic susceptibilities, corresponding gene contents, and the enterotoxin gene bft, in 50 *Bacteroides fragilis* group isolates, 25 of which were clinical and 25 intestinal. The resistance rates to amoxicillin/clavulonic acid, imipenem and metronidazole were low; ampicillin and tetracyclin resistance was high; clindamycin resistance and ermF gene presence was also high. Regarding phenotypical bacterial resistance and the presence of resistance genes, there was not statistically significant resistance between clinical and intestinal isolates and bft positive and negative isolates.