

## AMİNOGLİKOZİD DİRENÇLİ GRAM NEGATİF ÇOMAK SUŞLARINDA SAPTANAN DİRENÇ MEKANİZMALARI\*

Betigül ÖNGEN, Arif KAYGUSUZ, Nezahat GÜRLER,  
Kurtuluş TÖRECİ

### ÖZET

En az bir aminoglikozide dirençli 50 Gram negatif çomak suşu apramisin, fortimisin, Sch 21562, Sch 21561, gentamisin, tobramisin, amikasin, isepamisin, netilmisin, Sch 22591, kanamisin ve neomisin diskleri ile denenmiş ve gen problemleri ile aminoglikozid modifiye eden enzimler açısından taranmıştır. Direnç fenotiplerinin belirlenmesi ve dot-blot işlemi laboratuvarımızda, DNA hibridizasyonları ise Schering-Plough Araştırma Enstitüsü'nde yapılmıştır. Çalışmada 11 farklı aminoglikozid modifiye eden enzim saptanmış, bunlar 3'ünde tek enzim, diğerlerinde 2-4 enzim bulunan 19 kombinasyon, permeabilite azlığına bağlı mekanizma da eklendiğinde 20 kombinasyon oluşturmuşlardır. Bazı enzimler belli cinslerde daha sık görülmekle birlikte, genel olarak AAC(6')-IV tek başına, APH (3')-I kombinasyon halinde görülen en sık enzimler olmuş, ayrıca AAC(3)-V, ANT(2''), AAC(6')-I'e de sık olarak rastlanmıştır. Direnç fenotiplerine göre belirlenen olası direnç mekanizmaları ile gen problemlerinden elde edilen sonuçlar büyük oranda uyum göstermiştir.

### SUMMARY

*Resistance mechanisms in aminoglycoside-resistant Gram negative rod strains.*

Susceptibilities of 50 Gram negative rods resistant to at least one aminoglycoside were determined to apramycin, fortimicin, Sch 21562, Sch 21561, gentamicin, tobramycin, amikacin, isepamicin, netilmicin, Sch 22591, kanamycin and neomycin by disk diffusion method and their aminoglycoside modifying enzymes were revealed by gene probes. The establishment of resistance phenotypes and the extraction and fixation of the bacterial genes were performed in our laboratory and DNA hybridizations were done at the Schering-Plough Research Institute. Nineteen combinations of 11 enzymes were encountered, 3 of which consisted of only one enzyme. If the resistance due to impermeability is considered, the number of combinations were 20. Although the frequency of enzymes differed according to species, AAC(6')-IV was the enzyme most frequently encountered alone, and APH(3')-I enzyme in combinations. AAC(3)-V, ANT(2'') and AAC(6')-I were also more frequently encountered enzymes. Good correlations were found with the results of presumed resistance mechanisms deduced from resistance patterns and the results of gene hybridizations.

\* 12. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (2-6 Haziran 1997, Antalya).  
İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Çapa, İstanbul.

## GİRİŞ

Gram negatif çomaklarda aminoglikozidlere direnç daha çok asetiltransferaz (AAC), adeniltransferaz (ANT) ve fosfotransferaz (APH)'lar ile enzimatik modifikasyona bağlıdır (3,13). Ribozomal değişiklik, permeabilite kaybı gibi diğer direnç mekanizmaları daha az sıklıkta görülmektedir. Aminoglikozidlere direnç daha çok aminoglikozid modifiye eden enzimleri kodlayan genleri taşıyan plazmidler vasıtası ile ortaya çıkmakta, ayrıca bu genlerin bir kısmı ilaç direncinin hızlı yayılmasına yol açan transpozonlarla ilişkili olabilmektedir (3,5,11).

Aminoglikozid modifiye eden enzimleri kodlayan genlerin çoğunun DNA dizileri belirlenmiştir. Bu genlerden geliştirilen problar kullanılarak yapılan DNA hibridizasyon çalışmaları, genlerin orijini, sıklığı ve yayılışının anlaşılmasında önemli bir yer tutmaktadır (12).

1980'li yıllarda dünyanın çeşitli bölgelerinden dirençli suşlarda bulunan enzim tiplerini belirleyen pek çok çalışma bildirilmiştir. Bu konuda standardizasyon sağlamak ve toplu veriler elde etmek amacıyla 1992 yılında Dr Miller'in başkanlığında oluşan bir aminoglikozid direnci çalışma grubu, dünyanın 8 ayrı bölgesindeki 30 ülkeye ait 149 hastaneden 11,000'den fazla aminoglikozidlere dirençli suş toplamış, bunların 12 ayrı aminoglikozid ile direnç fenotipleri ve 19 direnç gen probu kullanılarak DNA hibridizasyon çalışmaları ile enzim tiplerini saptamıştır (6,8). Bu dönemde Türkiye'den Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi bu çalışmaya katılmış ve coğrafik yakınlık ve direnç paternlerinin benzerliği nedeniyle Türkiye ve Yunanistan beraber incelenmiştir. 1995 yılında bu çalışmanın ikinci bölümünde Türkiye, 15 farklı hastaneden izole edilen suşlarla daha geniş katımlı olarak yer almıştır (9).

Bu yazıda, yukarıdaki çok merkezli çalışmanın 2. bölümünün bir grubunu oluşturan İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen 50 Gram negatif çomak suşunda belirlenen aminoglikozidlere direnç mekanizmaları özetlenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

1995 yılı içinde klinik olarak kullanılan en az bir aminoglikozide dirençli ve ardarda izole edilmiş 50 Gram negatif çomak suşu apramisin, fortimisin, Sch 21562 (6'Net), Sch 21561 (2'Net), gentamisin, tobramisin, amikasin, isepamisin, netilmisin, Sch 22591 (5-epi), kanamisin ve neomisin diskleri ile NCCLS standartlarına uygun olarak denenmiştir. Suşların direnç fenotiplerine ve zon çaplarındaki değişimlere göre olası direnç mekanizmaları tahmin edilmiştir. Ayrıca suşların 48 saatlik kültürlerinden özel filtre kağıtlarına 10 µl emdirilmiş, 1 N NaOH ile DNA'ları ekstrakte edilmiş, 1 M Tris ile tesbit ve nötralize edilmiş ve kurutulmuş; bu filtre kağıtları Schering-Plough Araştırma Enstitüsü, New York'da gen probları kullanılarak DNA-hibridizasyon yöntemiyle aminoglikozid modifiye eden enzim genleri açısından taranmıştır (7).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Aminoglikozid grubu antibiyotikler ciddi bakteriyel infeksiyonların tedavisinde önemli yeri olan bir antibiyotik grubudur. Uzun yıllardan beri kullanımda olmaları nedeniyle dirençli bakterilerin ortaya çıkması şaşırtıcı olmamıştır. Ayrıca antibiyotik kullanımının belirli protokollarla düzenlenemediği merkezlerde yanlış kullanım da buna eklenince, antibiyotik direncindeki hızlı artış önlenememektedir (10).

Tablo 1. Aminoglikozidlere dirençli 50 suşta belirlenen direnç mekanizmaları.

Aminoglikozid modifiye eden enzim ve/veya permeabilite	Klebsiella spp.	E.coli	Indol (-) Proteus	Acinetobacter spp.	Pseudomonas spp.	Enterobacter spp.	Serratia spp.	Alcaligenes spp.	Providencia spp.	S.lyphiumrium	Identifiye edilmeyen
	n: (19)	(8)	(9)	(5)	(4)	(2)	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)
ANT(2'') + AAC(6)-I	1										
AAC(3)-V + AAC(6)-III + APH(3')-I	2										
ANT(2'')	1					1				1	
AAC(6)-IV	10	3									
AAC(6)-IV + APH(3')-I	1										
AAC(3)-V + AAC(6)-I	1	1									
AAC(6)-I + APH(3')-I	1										
AAC(3)-V	1	4	3								
ANT(2'') + APH(3')-I	1		3								
AAC(3)-I + AAC(3)-Ia + APH(3')-I				2							
AAC(3)-Ia + ANT(2'')				1							
AAC(3)-I + AAC(3)-Ia + APH(3')-VI + APH(3')-I				1							
AAC(3)-Ia + ANT(2'') + APH(3')-VI				1							
AAC(3)-I + AAC(6)-II + APH(3')-II + Permeabilite					1						
AAC(3)-V + AAC(6)-I + APH(3')-I	1					1					
AAC(3)-V + AAC(6)-I + ANT(2'') + APH(3')-I							2				
AAC(3)-I + AAC(6)-I	1										
AAC(3)-V + APH(3')-I											
ANT(2'') + APH(3')-II											1
Permeabilite					2						
Açıklanamayan					1						

Aminoglikozid grubu antibiyotikleri modifiye eden enzimlerin sıklığı ve dağılımı ülkeden ülkeye, hatta bir hastaneden diğerine farklılık göstermektedir (10,13). Bu da farklı merkezlerde antibiyotik kullanımı sonucu oluşan seleksiyon baskısı ile farklı enzimlerin daha yaygın oluşuna bağlanmaktadır (5,10). Ayrıca ABD ve Avrupa'da 1984'den sonra yapılan çalışmalarda son yıllarda farklı enzimlerin yaygınlığının yanında birkaç enzimden birarada görüldüğü kombinasyon mekanizmalarında da bir artış olduğu kaydedilmiştir (8).

Bu çalışma sonucunda, hastanemizde izole edilen ve en az bir aminoglikozide dirençli 50 Gram negatif çomak suşunda 3'ü tek başına bulunan 11 farklı enzim, bu enzimlerin yer aldığı 19 farklı kombinasyon ve ayrıca yalnız permeabilite azalmasına bağlı direnç de dikkate alınınca toplam 20 direnç mekanizması saptanmıştır. Suşların yaklaşık yarısında enzimler 2-4'lü kombinasyonlar halinde bulunmuştur (Tablo 1). Ayrıca direnç fenotiplerine göre belirlenen olası direnç mekanizmaları ile gen problemlerinden elde edilen sonuçlar büyük oranda uyum göstermiştir.

Çalışmamızda en sık rastlanan enzimler tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 50 Gram negatif çomak suşunda en sık rastlanan enzim tipleri.

Enzim	Fenotip	Görüldüğü suş sayısı n(t+k)*
AAC(6')-IV	G,T,N,A	14(13+1)
APH(3')-I	K, Neo	14(0+14)
AAC(3)-V	G,T,N	13(7+6)
ANT(2'')	G,T	12(3+9)
AAC(6')-I	T,N,A	8(0+8)

\* (t+k): (tek başına+kombinasyon halinde)

(G: Gentamisin, T: Tobramisin, N: Netilmisin, A: Amikasin, K: Kanamisin, Neo: Neomisin)

*Klebsiella* bakterilerinde 2'si tekli, 5'i ikili, 2'si üçlü olmak üzere 9 farklı mekanizma saptanmış, bu mekanizmalar içinde en sık rastlanan enzim AAC(6')-IV (G,T,N,A) olmuştur. Daha sonra sırasıyla APH(3')-I (K,Neo), AAC(6')-I (T,N,A), AAC(3)-V (G,T,N) ve ANT(2'') (G,T) görülmüştür. Az sayıdaki *Enterobacter* suşunda ANT(2'') (G,T) tek başına veya amikasini modifiye eden AAC (6')-I'in de bulunduğu 4'lü kombinasyon şeklinde görülmüştür. *Enterobacter* suşlarında AAC(6')-IV (G,T,N,A)'e rastlanmamıştır.

Aminoglikozid direnci çalışma grubunun 1996 yılı öncesi çalışmasında *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (CEK) grubu bakterilerde Türkiye-Yunanistan grubunda suşların %61.4'ünde AAC(6')-I (T,N,A) + AAC(3)-I (G) kombinasyonu bulunurken, diğer birçok bölgede AAC(3)-II(G,T,N) tek başına, AAC(6')-I (T,N,A) ise kombinasyonlarda gözlenen en sık enzim olmuştur (8). Özellikle Fransa ve Güney Afrika'da tek enzim olarak yaygın bulunan, daha önce Hacettepe suşlarında ve bu çalışmada da az olmayan oranda rastlanan amikasini modifiye eden AAC(6')-I enziminin gentamisini modifiye eden enzimlerle sıkça kombinasyon oluşturması, bu suşlarda geniş spektrumlu aminoglikozid direncine yol açmakta ve bunlarda da sadece isepamisin klinik olarak aktif olmaktadır (1,8). Hastanemizde izole edilen bu grup suşlarda amikasini modifiye eden AAC(6')-I (T,N,A)'den başka, daha sıklıkla AAC(6')-IV (G,T,N,A) enziminin de görülmesi, suşlarda isepamisin dışındaki klinik kullanıma uygun tüm aminoglikozidlere direncin sıklığını göstermesi bakımından dikkat çekicidir. Tek bir gen tarafından kodlanan AAC(6')-IV enzimi, ANT(2'')-I (G,T) + AAC(6')-I (T,N,A) ile aynı fenotipik özelliklere sahip, bu çok merkezli çalışma içerisinde daha önce bildirilmemiş bir enzimdir (7,8). Burada ilginç olarak *K.pneumoniae* suşları içinde çocuk hastalardan izole edilen ve seftriaksona ve en az bir aminoglikozide dirençli olan 8 suşun 5'inde AAC(6')-IV, 2'sinde AAC(6')-III + AAC(3)-V + APH (3')-I ve birinde de AAC(6')-I + AAC(3)-I saptanmıştır. Bu bulgular AAC(6')-IV enziminin hastanemizde ve özellikle GSBL oluşturan *K.pneumoniae* suşları arasında yaygın olduğunu düşündürmektedir (4).

*E.coli* ve indol negatif *Proteus* suşlarında en sık AAC(3)-V (G,T,N) enzimi tek başına görülmüş, ayrıca AAC(6')-IV (G,T,N,A) *E.coli* suşlarında rastlanan en sık 2. enzim olmuştur. Daha önceki, bizim suşlarımızın dahil olmadığı çalışmada Türkiye-Yunanistan grubunda *E.coli*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella* ve *Shigella* (EMPSS) bakterileri içinde AAC(6')-I (T,N,A) + AAC (3)-I (G) enzimleri ön planda yer almış ayrıca Türkiye-Yunanistan ve Latin Amerika bölgeleri hariç diğer bölgelerde EMPSS

grubunda kombinasyon insidensinin düşük olmasından dolayı direnç oranları CEK grubuna göre daha düşük bulunmuştur (8).

*Providencia*, *Serratia*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında cinse spesifik direnç mekanizmaları çok yaygındır ve farklı coğrafik bölgelerde bile benzer karakter gösterdikleri bildirilmektedir (10). *P.stuartii*'de kromozomal olarak kodlanan AAC(2')-I (G,T,N) enzimine (11) bir *Providencia* suşumuzda rastlanmamış, G,T ve N'i modifiye eden bir başka enzim AAC(3)-V bulunmuştur. Tüm *S.marcescens* suşlarında da kromozomal olarak kodlanan AAC(6')-I (T,N,A) enzimi bulunmaktadır (11). Çalışmamıza dahil ettiğimiz iki *Serratia* suşunda AAC (6')-I (T,N,A) enzimi AAC(3)-I (G) ile kombinasyon halinde saptanmıştır. Bu kombinasyon daha önceki çalışmada da Türkiye-Yunanistan grubunda *Serratia*'larda en sık saptanan enzim kombinasyonu (%68.2) olmuştur (8). Kromozomal AAC (6')-I (T,N,A) enzimi nedeniyle, *Serratia*'larda gentamisinden daha yüksek oranda tobramisin direnci beklemek pek yanlış olmayacaktır (8).

Çeşitli ülkelerde izole edilen *Pseudomonas*'larda *Enterobacteriaceae*'den farklı direnç mekanizmaları bulunmaktadır ve sık görülen iki mekanizma olan permeabilite azalması ve AAC(6')-II (G,T,N) enzimine çalışmamızdaki 1 *P.aeruginosa* suşunda rastlanmıştır (8). *P.aeruginosa* suşlarından birinde bu enzim ile beraber başka iki enzim ve permeabilite azalması, ikisinde yalnız permeabilite azalması saptanmış, bir suşta mekanizma anlayışlamamıştır. *Pseudomonas* suşlarında permeabilite azalmasına bağlı direncin yaygınlığı, bu suşların izole edildiği 1996 yılında hastanemizde yapılan diğer bir çalışmadaki %96 gentamisin ve %71 amikasin direncini açıklamaktadır (2).

Genellikle tüm bölgelerde aminoglikozidlere yüksek oranda dirençli bulunan *Acinetobacter* suşları ele alındığında, hastanemizde izole edilen suşlarda 2-4'lü enzim kombinasyonları görülmüş ve suşların hepsinde AAC(3)-Ia(G) saptanmıştır. Amikasin ve isepamisini modifiye eden APH(3')-VI diğer cinslerde genellikle %1'den az sıklıkta fakat *Acinetobacter*'lerde oldukça yaygın bulunan bir enzimdir ve diğer bölgelerde de bizim suşlarımıza benzer şekilde AAC(3)-I(G) ve ANT(2'')-I (G,T) ile kombinasyonları sık görülmektedir (8). Başka merkezlerde AAC(3)-? ayrıca en sık rastlanan diğer bir enzimdir. *Acinetobacter* suşları APH(3')-VI(A,I) ve permeabilite mekanizmalarını kazandıkça bugün için klinik kullanıma uygun tüm aminoglikozidlere dirençli duruma geçiyor gibi görünmektedirler.

Çalışmamızda incelenen 50 Gram negatif çomak suşunun 22'sinde amikasinini modifiye eden AAC(6')-IV(G,T,N,A) veya AAC(6')-I (T,N,A) enzimleri bulunmuştur. AAC(6')-I'in (T,N,A) son yıllarda özellikle Türkiye'de artış gösterdiği ve bunun da gentamisin direncinin artışı nedeniyle tedavide amikasinin tercih edilmesine bağlı olduğu ileri sürülmektedir (6).

Bir bakteride birden fazla enzimin bulunabilmesi ve bir enzimin direnç profilini diğerinin maskeleyebilmesi nedeniyle sadece tedavide kullanılan antibiyotiklere ait disklerle direnç mekanizmasını belirlemek pek mümkün görünmemektedir (12). Ayrıca bir bakteri türünde belli bir direnç fenotipi oluşturan bir enzim, bir başka bakteride muhtemelen gen ekspresyonuna bağlı olarak direnç oluşturmaz (11). Dolayısıyla belli aralıklarla DNA hibridizasyon çalışmaları ile aminoglikozid modifiye eden enzimlerin sıklığının belirlenmesi o ülke, bölge veya hastanedeki antibiyotik kullanım politikalarına katkı sağlayacaktır.

**TEŞEKKÜR:** Yalnız deneysel amaçla kullanılan aminoglikozid diskleri ve prob çalışmaları için Dr Miller'e ve Schering-Plough'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- 1- Akalın HE, Torun M, Alaçam R: Aminoglycoside resistance patterns in Turkey, *Scand J Infect Dis* 20: 199 (1988).
- 2- Çetin S, İnce D, Türkyılmaz M, Öngen B, Özsüt H, Eraksoy H, Dilmener M: Disk difüzyon testinde imipeneme dirençli bulunan 124 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun agar dilüsyon testi sonuçları, XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Özet Kitabı s.229, Antalya (1996).
- 3- Foster TJ: Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria, *Microbiol Rev* 47: 361 (1983).
- 4- Kaygusuz A, Öngen B, Gürler N, Töreci K: Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oluşturma sıklığı, *ANKEM Derg* 11: 432 (1997).
- 5- Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA: Mechanism of antibiotic resistance, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4.baskı" kitabında s.212, Churchill-Livingstone, New York (1995).
- 6- Miller GH and the Aminoglycoside Resistance Study Groups: Increasing complexity of aminoglycoside resistance mechanisms in Gram-negative bacteria, *APUA Newslett* 12(2): 1 (1994).
- 7- Miller GH and the Aminoglycoside Resistance Surveys Team: *The Utilization of Aminoglycoside Resistance Phenotypes for the Determination of Aminoglycoside Resistance Mechanisms*, Booklet of Schering-Plough Research Institute, Bloomfield, New Jersey (1995).
- 8- Miller GH and the Aminoglycoside Resistance Study Groups: The most frequently occurring aminoglycoside resistance mechanisms-combined results of surveys in eight regions of the world, *J Chemother* 7 (Suppl 2): 17 (1995).
- 9- Miller GH and the Aminoglycoside Resistance Surveys Team: *Aminoglycoside Resistance Surveys Booklet*, Schering-Plough Research Institute, Bloomfield, New Jersey (1997).
- 10- Miller GN and the Aminoglycoside Resistance Study Groups: The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms-changes with time and geographic area: A reflection of aminoglycoside usage patterns?, *Clin Infect Dis* 24 (Suppl 1): 46 (1997).
- 11- Quintiliani R Jr, Courvalin P: Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6.baskı" kitabında s.1308, ASM Press, Washington (1995).
- 12- Shaw KJ, Hare RS, Sabatelli FJ et al: Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2253 (1991).
- 13- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH: Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes, *Microbiol Rev* 57: 138 (1993).