

# Gram-Negatif Bakterilerde Aminoglikozid Direnç Mekanizmaları

Hakan Leblebicioğlu<sup>1</sup>, İrfan Şencan<sup>1</sup>, Cafer Eroğlu<sup>1</sup>, Mustafa Sünbül<sup>1</sup>, Şaban Esen<sup>1</sup>, Murat Günaydın<sup>2</sup>

**Özet:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda nozokomiyal enfeksiyon- lu hastalardan izole edilen aminoglikozidlere dirençli 50 Gram-negatif izolat çalışma kapsamına alındı. Aminoglikozid direnç mekanizmaları 12 aminoglikozide karşı direncin fenotipi ve DNA hibridizasyonu ile araştırıldı. İzolatlarda 8 farklı aminoglikozid modifiye edici enzim belirlendi. En sık gözlenen mekanizmalar AAC(6')-I (%72) and ANT(2'') (%54) idi. En sık saptanan kombinasyon ise AAC(6')-I+ ANT(2'') idi. Bu çalışma sonuçlarına göre aminoglikozid direncinde birden fazla direnç mekanizması rol oynamaktadır. Bu direncin gelişmesinde seçici antibiyotik baskısının bir rolü olabilir. Sonuçta her hastanede aminoglikozid direnç mekanizmaları belirlenmeli ve enfeksiyonların tedavisi için aminoglikozid seçiminde saptanan direnç paternleri göz önünde tutulmalıdır.

**Anahtar Sözcükler:** Aminoglikozidler, antibiyotik direnci, Gram-negatif bakteriler.

**Summary:** Aminoglycoside resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. Aminoglycoside-resistant 50 Gram-negative isolates from patients with nosocomial infection were collected in Microbiology Laboratory, Faculty of Medicine, Ondokuz Mayıs University. Aminoglycoside resistance mechanisms were determined in these isolates by the correlation of resistance phenotypes to 12 aminoglycosides and DNA hybridization. Among the isolates eight different aminoglycoside-modifying enzyme (AME) were determined. The most common mechanisms were AAC(6')-I (72%) and ANT(2'') (54%). The most frequent enzyme combination was AAC(6')-I + ANT(2'') (40%). This study showed that more than one resistance mechanisms involved in aminoglycoside resistance. Selective antibiotic pressure might be responsible for the high frequency of resistance. Therefore, each hospital should determine their own aminoglycoside resistance mechanisms and select an aminoglycoside for the therapy of infections according to these aminoglycoside resistance patterns.

**Key Words:** Aminoglycoside, antibiotic resistance, Gram-negative bacteria.

## Giriş

Streptomisinin 1944 ve kanamisinin 1957 yılında kullanıma girmesinden sonra gentamisin, tobramisin, netilmisin ve amikasin gibi parenteral aminoglikozidler bulunmuştur (1). Aminoglikozidler etkilerini bakteride 30S ribozoma bağlanarak protein sentezini inhibe ederek gösterirler. Biyokimyasal olarak tümüyle açıklanamamakla birlikte aminoglikozid antibiyotiklerin bakterisid etkilerinde, translasyon sırasında yanlış okuma, membran harabiyeti, elektron transportuna etki ve morfolojik değişiklikler gibi fizyolojik etkilerin de rol oynadığı düşünülmektedir (2). Aminoglikozidler özellikle Gram-negatif basillerin neden olduğu bakteriyemilerde olmak üzere oldukça etkili antimikrobik ajanlardır. Aminoglikozidler klinik önemi olan aerop Gram-negatiflerden *aeruginosa* dışı *Pseudomonas* türleri dışındakilerin hemen tümüne karşı etkilidirler. Bakteriyel inokülasyonun büyüklüğünden etkilenmezler ve tedavi sırasında direnç gelişmesi nadirdir (1).

Gram-negatif bakterilerde aminoglikozidlere karşı direnç gelişmesinde üç farklı mekanizma vardır. Bunlardan ikisi kromozomaldır. Birincisi ribozom üzerinde 30S alt-

birimine bağlanabilmenin azalmasına yol açan ribozomal mutasyon, ikincisi *Pseudomonas* ve stafilokoklarda düşük dereceli dirence yol açtığı gösterilen aminoglikozid transport genini etkileyebilen kromozomal mutasyon ve üçüncüsü antibiyotikleri modifiye eden R plazmidleriyle ilişkili dirençtir. Periplazmik aralık veya sitoplazmada yerleşmiş en az 12 aminoglikozid modifiye edici enzim (AME) tanımlanmıştır. Enzimler ekstraselüler olarak salgınlamazlar ve hücre içine girmemiş antibiyotikleri etkilemezler. Bunlar esas olarak amino gruplarını asetile eden üç asetiltransferaz olan AAC(2'), AAC(3), AAC(6'); hidroksil gruplarını adenile eden dört adeniltransferaz olan ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) ve hidroksil gruplarını fosforile eden beş fosfotransferaz olan APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(6), APH(5'') enzimleridir. Bu enzimler antibiyotikleri kesin olarak inaktive etmezler; fakat aminoglikozidlerin hücre içine girişini zayıflatırlar ve ribozomlara bağlanmalarını inhibe ederler (1).

Çalışmamızda hastane enfeksiyonu saptanmış hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen ve en az bir aminoglikozide dirençli olan 50 Gram-negatif bakterinin modifiye edici enzim tipleri araştırılmıştır.

## Yöntemler

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen ve standard disk difüzyon metoduyla aminoglikozid (amikasin, genta-

(1) Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun

(2) Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

**Tablo1. Mikroorganizmalarda Saptanan Aminoglikozid Direnç Tiplerinin Dağılımı**

Direnç Mekanizması Sayısı	Permeabilite (n=5)	AAC (3')-V (n=16)	AAC (3')-I (n=5)	ANT (2'') (n=27)	AAC (6')-I (n=36)	AAC (6')-III (n=10)	APH (3')-I (n=9)	APH (3')-II (n=2)	APH (3')-VIII (n=3)	Toplam (n=113)
1	0	3	0	2	0	1	0	0	0	6
2	2	5	0	21	28	1	3	0	0	60
3	2	4	2	3	4	6	5	0	1	27
4	1	4	3	1	4	2	1	2	2	20

misin, netilmisin, tobramisin) antibiyotiklerden herhangi birisine karşı dirençli olduğu saptanan Gram-negatif 50 suş değerlendirilmeye alındı. Bütün suşlar API 20E strip-leri (bioMerieux, Fransa) ile tanımlandı. Antibiyotik duyarlılığı standard disk difüzyon testi ile Mueller-Hinton besiyerinde National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterlerine göre yapıldı (3).

Schering-Plough Research Institute (Bloomfield, New Jersey, ABD)'den sağlanan 12 farklı aminoglikozid diski, amikasin (30 µg), kanamisin (30 µg), neomisin (30 µg), netilmisin (30 µg), tobramisin (10 µg), apramisin (100 µg), fortimisin (100 µg), isepamisin (30 µg), 5-epi-sisomisin (10 µg), 6'-netilmisin (100 µg), 2'-netilmisin (100 µg) ve gentamisin (100 µg) kullanılarak olası modifiye edici enzimler fenotipik olarak belirlendi (4) ve aynı suşlar DNA prob analizi ile enzimleri kodlayıcı genler belirlenmek üzere "dot blotting" yöntemiyle hazırlandı ve DNA prob analizi yöntemiyle modifiye edici enzimleri kodlayan genler tespit edildi ve enzimler genotipik olarak belirlendi (5,6).

Mikroorganizmaların 27'si idrar, 6'sı kan, 14'ü yara, 2'si dışkı ve 1'i de beyin-omurilik sıvısından izole edildi. İzolatlar ise *Escherichia coli* (n=9), *Klebsiella pneumoni-*

*ae* (n=20), *Klebsiella spp.* (n=2), *Enterobacter spp.* (n=3), *Citrobacter freundii* (n=1), *Acinetobacter baumannii* (n=1), *Serratia marcescens* (n=4), *Salmonella spp.* (n=6), *Pseudomonas aeruginosa* (n=3) ve *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1) idi.

### Sonuçlar

Çalışma kapsamına alınan izolatlarda 8 farklı aminoglikozid modifiye edici enzim tipi belirlenmiştir. Ayrıca permeabiliteye bağlı direnç 5 suşta (3 *P.aeruginosa*, 1 *S.maltophilia*, 1 *Klebsiella spp.*) saptanmıştır. İzolatlarda tespit edilen direnç mekanizması/modifiye edici enzim sayısı ve tipleri Tablo 1'de verilmiştir.

Gram-negatif mikroorganizmalarda 20 değişik direnç paterni gözlenmiştir (Tablo 2). En sık gözlenen direnç paterni ise ANT(2'')+AAC(6')-I enzimlerinin birlikteliğidir (%40). En sık rastlanan enzimler AAC(6')-I (%72) ve ANT(2'') (%54)'dir.

### İrdeleme

Çalışmamızın sonuçlarına göre 8 farklı AME enzim+permeabilite, 20 farklı kombinasyonda aminoglikozid direncine yol açmaktadır.

Suşlarımızın 6'sında tek mekanizmayla, 30'unda iki farklı mekanizmayla, 9'unda üç farklı mekanizmayla ve 5'inde dört farklı mekanizmayla direnç geliştiği saptanmıştır. Otkun ve arkadaşları (7), Trakya Üniversitesi Hastanesi'nde yaptıkları benzer çalışmada 8 farklı AME, 25 suşta tek, 15 suşta iki ve 2 suşta üç farklı enzim kombinasyonu saptamışlardır. AME kombinasyon sıklığında tüm bölgelerde önemli derecede artma olduğu ve bu artışın Yunanistan ile birlikte analiz edilen Türkiye için de geçerli olduğu ortaya konulmuştur (5).

Aminoglikozidlere karşı gelişen direncin büyük oranda bu antibiyotiklerin kulla-

**Tablo 2. Mikroorganizmalarda Saptanan Aminoglikozid Direnç Paternleri**

No.	Saptanan Direnç Paterni	Sayı	(%)
1	AAC(6')-III	1	(2)
2	ANT(2'')	2	(4)
3	AAC(3')-V	3	(6)
4	AAC(3')-V+APH(3')-I	1	(2)
5	AAC(3')-V+AAC(6')-I	4	(8)
6	ANT(2'')+AAC(6')-I	20	(40)
7	ANT(2'')+APH(3')-I	1	(2)
8	AAC(6')-I+APH(3')-I	1	(2)
9	AAC(6')-I+Permeabilite	2	(4)
10	AAC(6')-I+AAC(6')-III	1	(2)
11	AAC(3')-V+AAC(6')-III+APH(3')-I	2	(4)
12	AAC(3')-V+AAC(6')-III+APH(3')-VIII	1	(2)
13	AAC(3')-I+AAC(6')-III+Permeabilite	2	(4)
14	AAC(3')-V+AAC(6')-I+AAC(6')-III	1	(2)
15	ANT(2'')+AAC(6')-I+APH(3')-I	3	(6)
16	AAC(3')-V+AAC(6')-I+AAC(3')-I+APH(3')-VIII	1	(2)
17	AAC(3')-V+AAC(6')-I+AAC(3')-I+APH(3')-II	1	(2)
18	AAC(3')-V+AAC(6')-I+APH(3')-VIII+APH(3')-I	1	(2)
19	AAC(3')-I+AAC(6')-III+APH(3')-II+Permeabilite	1	(2)
20	AAC(3')-V+AAC(6')-I+ANT(2'')+AAC(6')-III	1	(2)

nımı sonucu, aminoglikozidleri modifiye eden enzimleri içeren izolatların seleksiyonuna bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Bu nedenle bu antibiyotiklere karşı gözlenen direnç, bölgeler ve hastaneler arasında önemli farklar gösterebilmektedir. İzolatlarımızda en yaygın AME, AAC(6')-I (%72) ve ANT(2'') (%54) ve en yaygın kombinasyon da AAC(6')-I + ANT(2'') (%40) olarak gözlenmiştir. Otkun ve arkadaşları (7) ise en sık ANT(2'') (%64.3), AAC(6')-I (%23.8) ve APH(3')-I (%23.8) enzim tiplerini saptamışlardır. Ülkemizdeki 15 hastanenin 1996'daki aminoglikozid direnç mekanizmalarını araştıran bir çalışmada en sık AAC(3)-I, AAC(3)-II, ANT(2'') ve AAC(6')-I enzimleri saptanmıştır (8). Çalışmamızda en sık saptanan enzim kombinasyon paterni olan AAC(6')-I + ANT(2''), epidemiyolojik açıdan ülkemiz verileri ile uyumluluk göstermektedir (5).

Aminoglikozid direncinin kullanılan aminoglikozidlerle ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Belçika hastanelerinde 56 aylık prospektif bir çalışma yapılmış ve bu hastanelerde en sık kullanılan aminoglikozidin amikasin olduğu ve en yaygın AME olarak AAC(6')-I ve AAC-(3')-V olarak bulunmuş ve modifiye edici enzimlerden AAC(6')-I'de artma dikkati çekmiştir (9). Çalışmamızda en sık gözlenen enzimlerden AAC(6')-I, tobramisin, amikasin, netilmisin, dibekasin ve kanamisin direncinden sorumludur. ANT(2'') ise gentamisin, tobramisin, dibekasin ve kanamisine karşı dirence neden olur (10). Hastanemizde amikasin, netilmisin, tobramisin ve gentamisin sık kullanılan antibiyotiklerdir ve hastane antibiyotik listesinde bulunmaktadır.

Çalışmamızda 10 suşta saptanan AAC(6')-III enzimi, AAC(6')-I'e benzer direnç paterni gösterirken amikasinin yanı sıra ülkemizde olmayan isepamisine karşı da yüksek düzeyde direnç sağlamaktadır. 1996'daki aminoglikozid direnç mekanizmalarını araştıran çalışmada da 707 suşun % 2.9'unda, tek başına; % 8.1'inde, öteki mekanizmalarla bir arada olarak AAC(6')-III enzimi saptanmıştır (8).

Sonuç olarak direnç mekanizmalarının tanımlanmasının ve izlenmesinin epidemiyolojik olarak büyük önemi vardır. Bu nedenle aminoglikozidleri modifiye eden enzimlerin türü ve sıklığı her hastanede araştırılmalı ve kli-

nikte bu grup antibiyotikler kullanılırken bu veriler göz önünde bulundurulmalıdır.

#### Kaynaklar

1. Lortholary O, Tod M, Choen Y, Paitjean O. Aminoglycosides. *Med Clin North Am* 1995; 79:761-78
2. Gür D. Aminoglikozid antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve Türkiye'deki durum. *Mikrobiyol Bül* 1996; 30:197-205
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. M2-A4. 4th ed. Villanova, Pa: NCCLS, 1992
4. Miller GH, Sabatelli FJ, Mann P, Woloj M, Naples L, Hare RS, Shaw KJ. *The Utilization of Aminoglycoside Resistance Phenotypes for the Determination of Aminoglycoside Resistance Mechanisms*. Bloomfield, NJ: Schering-Plough Research Institute, 1995
5. Miller GH, Sabatelli FJ, Naples L, Hare RS, Shaw KJ. The most frequently occurring aminoglycoside resistance mechanisms: combined results of surveys in eight regions of the world. *J Chemother* 1995; 7(Suppl 2): 17-30
6. Wolcott MJ. Advances in nucleic acid based detection methods. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 370-86
7. Otkun M, Akata F, Tuğrul M, Teker B, Dündar V. Türkiye'de aminoglikozid antibiyotiklere direnç mekanizmalarının incelenmesi: Trakya Üniversitesi'nin sonuçları. *Mikrobiyol Bül* 1997; 31: 39-45
8. The Turkish Aminoglycoside Resistance Group (Gur D, Unal S, coordinators), Miller GH, Hare RS, Naples L, Sabatelli FJ, Shaw KJ. Prevalence of aminoglycoside resistance mechanisms in Turkish hospitals in 1996 [Abstract]. In: *Abstracts of the 37th ICAAC* (September 28-October 1, 1997, Toronto, Ontario, Canada). Washington, DC: American Society for Microbiology, 1997:51
9. Moes P, Vanhoof R. A 56-month prospective surveillance study on the epidemiology of aminoglycoside resistance in a Belgian General Hospital. *Scand J Infect Dis* 1992; 24: 495- 501
10. Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Gluoczynski Y, Makey P, Shlaes D, Shimizu K, Shaw KJ, Aminoglycoside Resistance Study Group. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms: changes with time and geographic area, reflection of aminoglycoside usage patterns. *Clin Infect Dis* 1997; 24(Suppl 1): 46-62