

GRAM-NEGATİF BAKTERİLERDE PLAZMİT ARACILI YÜKSEK DÜZEY AMİNOGLİKOZİT DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF PLASMID MEDIATED HIGH LEVEL AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Şafak ERMERTCAN¹, Mine HOŞGÖR-LİMONCU¹, Hüseyin TAŞLI¹, Bayrı ERAÇ¹, Hörü GAZİ²

¹Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

²Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

Anahtar Sözcükler: Gram-negatif bakteriler, direnç plazmidi, yüksek düzey aminoglikozit direnci

Keywords: Gram-negative bacteria, R-plasmid, high level aminoglycoside resistance

Geliş: 03 Kasım 2008

Kabul: 20 Kasım 2008

*Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (2005/ECZ/005) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Gram-negatif bakteriler hastanede yatan hastalarda önemli infeksiyon etkenlerindedir. Gram-negatif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde aminoglikozit grubu antibiyotikler günümüzde de önemini korumaktadırlar. Son yıllarda bakterilerin 16S rRNA'larının metilasyonu ile ortaya çıkan yeni bir direnç mekanizması bildirilmiştir. Yüksek düzey aminoglikozit direncine neden olan bu mekanizma plazmit üzerinde taşınmakta ve Gram-negatif bakteriler arasında kolaylıkla yayılabilmektedir. Bu çalışmada, Gram-negatif bakterilerde 16S rRNA metilaz enzimleri aracılığı ile kazanılan aminoglikozit direncinin araştırılması amaçlandı. Mikrodilüsyon yöntemi ile toplam 112 Gram-negatif bakteriden sadece bir *Acinetobacter baumannii* kökeninde yüksek düzey aminoglikozit direncine rastlandı. Polimeraz zincir tepkimesi yöntemi ve daha sonra yapılan agaroz jel elektroforez ile bu kökende metilaz enzim genleri saptanmadı. 16S rRNA metilaz genleri çoğunlukla beta-laktamaz genleri ile birlikte bulunmakta ve birçok aminoglikozide karşı yüksek düzey dirence neden olmaktadır. Bu nedenle kapsamlı çalışmalarla ülkemizde bu direnç mekanizmasının varlığının araştırılması önem taşımaktadır.

SUMMARY

Gram-negative bacteria are the most important infective agents in hospitalized patients. Aminoglycosides are still important in the treatment of infections caused by Gram-negative bacteria. In recent years a new resistance mechanism emerging by methylation of the bacterial 16S rRNA has been reported. This mechanism, causing high-level aminoglycoside resistance, is coded on plasmids and easily transferred among Gram-negative bacteria. The purpose of this study was to investigate aminoglycoside resistance mechanism acquired by 16S rRNA methylase enzymes in Gram-negative bacteria. With microdilution method high-level aminoglycoside resistance was detected only in one *Acinetobacter baumannii* strain out of 112 Gram-negative bacteria. Methylases enzymes genes were not observed by polymerase chain reaction+agarose gel electrophoresis in this strain. 16S rRNA methylase genes are usually found with beta-lactamase genes and confer high-level resistance against most of the aminoglycosides. Therefore, investigation of this resistance mechanism by further studies in our country is required.

GİRİŞ

Gram-negatif bakteriler hastane infeksiyonlarına neden olan etkenler arasında ilk sıralarda yer almaktadırlar (1). Gram-negatif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde kulla-

nılan aminoglikozit grubu antibiyotikler geniş antimikrobiyal spektrumları, hızlı bakterisidal etkileri ve diğer antimikrobiyallerle sinerjistik etki göstermeleri nedeniyle tercih edilmektedirler. Ancak direnç gelişimi, diğer

antibiyotiklerin olduğu gibi aminoglikozitlerin de kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bakterilerde aminoglikozitlere karşı direnç gelişiminde en sık rastlanan mekanizma aminoglikozitleri modifiye eden enzim sentezidir. İkinci olarak, dış membran geçirgenliğinde azalma veya aktif eflüksi ile aminoglikozitlerin bakteri içinde birikiminin engellenmesi yer alır. Diğer bir mekanizma ise aminoglikozitlerin hedefi olan ribozomal proteinler veya 16S rRNA'da oluşan değişikliklerdir. Son yıllarda *Enterobacteriaceae* üyeleri ile non-fermentatif Gram-negatif bakterilerde 16S rRNA'nın metilasyonu ile kazanılan yeni bir direnç mekanizması saptanmıştır. Aminoglikozitler bakterilerin 16S rRNA'sına bağlanarak ribozom fonksiyonlarını bozarlar. 16S rRNA'nın metilasyonu aminoglikozitlerin hedefine bağlanmasını önler. Doğada aminoglikozit sentezleyen *Actinomycetes*'te bulunan bu mekanizma ile streptomisin hariç tüm aminoglikozitlere karşı yüksek düzey direnç gelişir. Bu yolla kazanılan direncin bir diğer önemli özelliği ise plazmitler üzerinde taşınması ve bakteriler arasında kolaylıkla yayılabilmesidir (2-4). İlk 16S rRNA metilaz geni 2002 yılında Polonya'da bir *Citrobacter freundii* kökeninden sekanslanmış, ancak *armA* (aminoglycoside resistance methylase A) olarak tanımlanması 2003 yılında Galimand ve ark. (5) tarafından bir *K. pneumoniae* kökeninden izole edildikten sonra olmuştur. Yine 2003 yılında, *rmtA* adı verilen diğer bir yüksek düzey aminoglikozit direnç geni Japonya'da *Pseudomonas aeruginosa* kökeninde saptanmıştır (6). 2004 yılında, yine Japonya'da bir *Serratia marcescens* kökeninde *rmtB* enzimi bulunmuştur (7). Bunları 2006 yılında Japonya'dan bildirilen *RmtC* ve 2007 yılında Brezilya'dan rapor edilen *RmtD* enzimleri izlemiştir (8, 9). Son olarak, *NpmA* adı verilen enzim Wachino ve ark. (10) tarafından tanımlanmıştır. Nozokomiyal etkenlerde saptanan ve her geçen gün sayıları artan metilaz enzimlerinin gelecekte aminoglikozit kullanımını kısıtlamasından korkulmaktadır.

Bu çalışmada, Gram-negatif bakterilerde plazmit aracılı yüksek düzey aminoglikozit direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakterioloji Laboratuvarı'nda 2005-2007 yılları arasında izole edilen, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimi taşıyan 112 Gram-negatif bakteri kökeni çalışma kapsamına alındı. Kökenlerin dağılımı Tablo 1'de görülmektedir. Kökenler, çalışma başlayıncaya kadar %10 gliserinli buyon besiyerinde -80° C'de saklandı.

Amikasin etken maddesi Eczacıbaşı İlaç San. (İstanbul)'dan sağlandı. Antibiyotik stok solüsyonları 1024 mg/L konsantrasyonda hazırlanarak kullanılıncaya kadar -20° C'de saklandı.

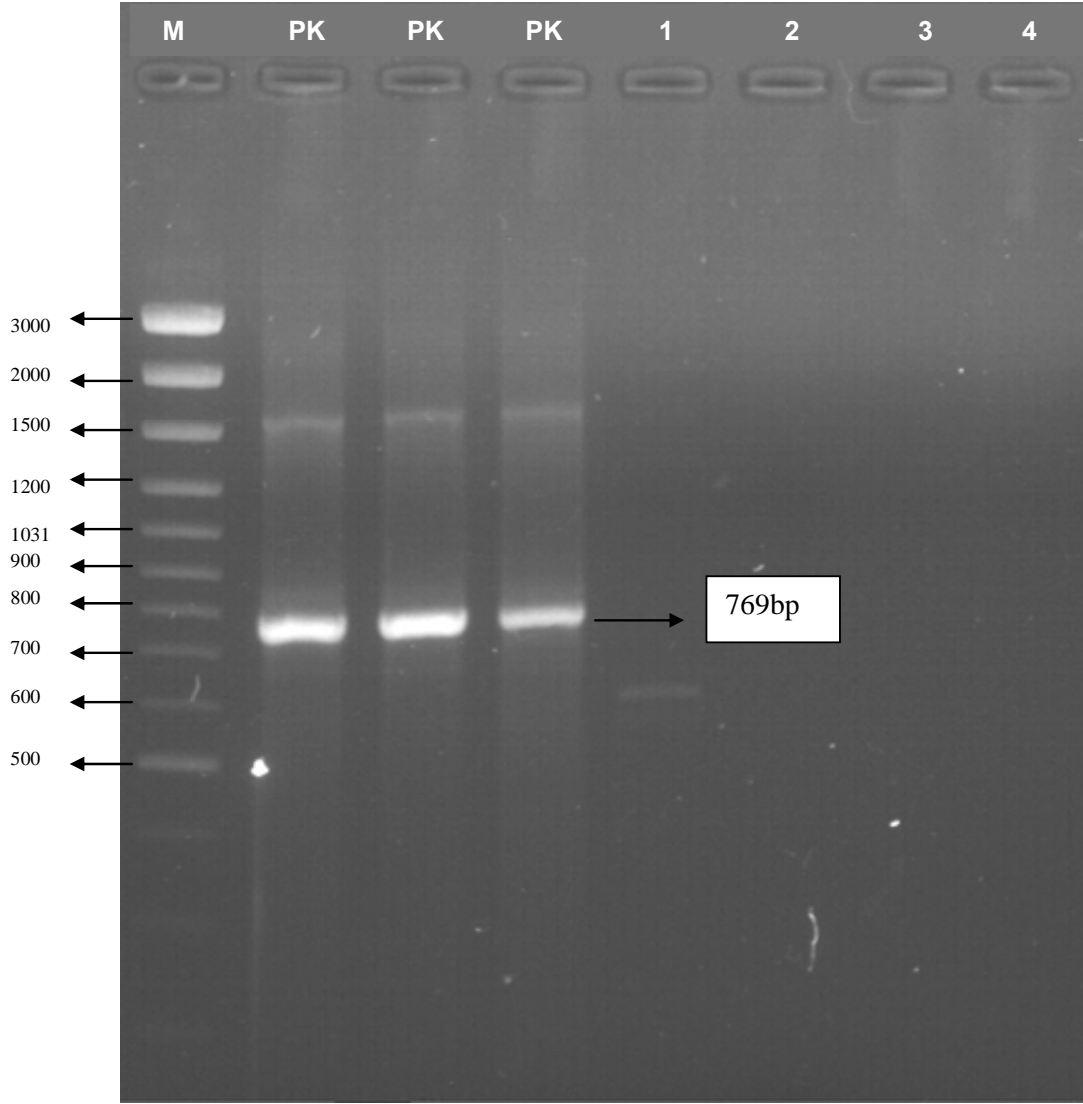
Tablo 1. Bakteri kökenlerinin dağılımı

Bakteri kökenleri	Sayı	%
<i>Escherichia coli</i>	77	68.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	13.4
<i>Klebsiella oxitoca</i>	1	0.9
<i>Klebsiella</i> spp.	16	14.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0.9
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	0.9
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0.9

Kökenlerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi:

Kökenlerinin amikasin duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (11) önerileri doğrultusunda belirlendi. Duyarlılık testi U tabanlı 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plaklarında yapıldı. Amikasin stok solüsyonundan Mueller-Hinton buyonu kullanılarak antibiyotik son konsantrasyonu 256-0.5 mg/L olacak şekilde sulandırım yapıldı. Hazırlanmış olan bakteri süspansiyonlarından kuyulara 50'şer µL inoküle edildi. Kontrol kökeni olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı, testlerde gerekli üreme kontrolleri ve besiyeri kontrollerine de yer verildi. Plaklar 35° C'de 16-20 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak kabul edildi. Amikasin MİK değeri 64 µg/mL ve üzeri bulunan kökenler *armA*, *rmtA* ve *rmtB* genleri varlığı açısından incelendi.

Polimeraz zincir tepkimesi (PZT): Bakterilerden ısıtma yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, PZT ile 16S rRNA metilaz genleri olan *armA*, *rmtA* ve *rmtB* Tablo 2'de gösterilen primer setleri kullanılarak araştırıldı. Pozitif kontrol olarak Yan ve ark. (3) tarafından Tayvan'da saptanan *armA* ve *rmtB* pozitif kökenler kullanılarak sonuçlar değerlendirildi. Polimeraz zincir tepkimesi ısı döngü aygıtında (Techne, Barloworld Scientific Ltd., İngiltere) (94° C'de beş dakika ön denatürasyonu takiben, 35 döngü olacak şekilde 94° C'de 60 saniye denatürasyon, 50° C'de 60 saniye birleşme, 72° C'de iki dakika uzama ve ardından da 72° C'de yedi dakika son uzatma) gerçekleştirildi. Polimeraz zincir tepkimesi ürünleri agaroz jelde elektroforez ile yürütüldü. Bant büyüklükleri marker ile karşılaştırılarak ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda incelendi.



M: Marker; PK: *rmtB* pozitif kontrol; 1-4 negatif çalışma örnekleri

Şekil 1. *RmtB* genine özgü PFT jel görüntüsü

Tablo 2. Polimeraz zincir tepkimesinde kullanılan primer setleri

Primer	Dizi (5' → 3')	Ürün uzunluğu
<i>armA</i> F	CCGAAATGACAGTTCCTATC	774-bp
<i>armA</i> R	GAAAATGAGTGCCTTGGAGG	
<i>rmtA</i> F	CTAGCGTCCATCCTTTCTC	635-bp
<i>rmtA</i> R	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	
<i>rmtB</i> F	ATGAACATCAACGATGCCCT	769-bp
<i>rmtB</i> R	CCTTCTGATTGGCTTATCCA	

BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan GSBL pozitif 112 kökenin amikasin MİK aralığı 0.5-64 µg/mL olarak bulundu. Bir *Acinetobacter baumannii* kökeninde amikasin MİK değeri 64 µg/mL olarak saptandı.

Amikasin MİK değeri 64 µg/mL saptanan köken ile Yan ve ark. (3) tarafından Tayvan'da saptanan *armA* ve *rmtB* pozitif kökenlerin DNA ekstraktları kullanılarak PZT yapıldı. Amikasin MİK değeri 64 µg/mL olarak saptanan kökende *armA*, *rmtA* ve *rmtB* gen bölgelerinin hiç birine rastlanmazken, pozitif kontrol olarak kullanılan Tayvan kökenlerinde beklenen uzunluklarda amplifikasyon ürünleri elde edildi (*armA* için 774-bp, *rmtB* için 769-bp) (Şekil 1).

TARTIŞMA

Dirençli patojenlerle meydana gelen nozokomiyal enfeksiyonlar tedavi maliyetini artırması, hastanede kalış süresini uzatması, hastada morbidite veya mortaliteye yol açması yönünden oldukça önemlidir. Bu enfeksiyonlara yol açan patojenler arasında Gram-negatif bakterilerden *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. ilk sıralarda gelmektedirler. Aminoglikozitler beta-laktamlarla kombine edilerek bu gibi etkenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (1, 2, 4). Yaygın kullanımlarının sonucu olarak bu grup antibiyotiklere karşı bakteriler direnç kazanırlar. Gram-negatif bakterilerde en sık rastlanan aminoglikozit direnç mekanizması bu antibiyotikleri modifiye eden enzimler aracılığı ile gelişmektedir. Bu tip direnç söz konusu olan enzimlerin substratı olan aminoglikozitlerle sınırlı kalmaktadır. 16S rRNA'nın metilasyonu yoluyla ise, streptomisin hariç tüm aminoglikozitlere karşı yüksek düzey direnç gelişmektedir. Bu mekanizma aminoglikozit üreten aktinomiçeslerde doğal olarak bulunmaktadır. Son yıllarda önem kazanmasının nedeni, klinik kökenlerde saptanmış olması ve plazmitler üzerinde kodlandığı için bakteriler arasında konjugasyon ve transformasyonla aktarılabileceğinin gösterilmiş olmasıdır. Muhtemelen bu direnç mekanizması daha önce de klinik kökenlerde bulunuyordu, ancak saptanamadığı için birden fazla aminoglikozit modifiye eden enzim üreten kökenlerle karıştırılıyordu (4, 12-15).

İlk tanımlanan 16S rRNA metilaz enzimlerinden RmtA, Japonya'da klinik *P. aeruginosa* kökenlerinde saptandı. RmtB'nin Japonya, Tayvan, Güney Kore, Çin ve Belçika'da çeşitli *Enterobacteriaceae* üyelerinde bulunduğu bildirildi. ArmA Doğu Asya, Doğu ve Batı Avrupa'da hem *Enterobacteriaceae* ailesinde hem de *Acinetobacter* türlerinde saptandı. RmtC Japonya'da *Proteus mirabilis* kökeninde, RmtD ise Brezilya'da *P. aeruginosa* kökeninde tanımlandı. Son olarak da NpmA Japonya'da *E. coli* kökeninde saptandı (5-10).

Bu çalışmaya alınan 112 Gram-negatif bakteri kökeninden bir tanesinde amikasin MİK değeri 64 µg/mL olarak bulundu. Bu kökende *armA*, *rmtA* ve *rmtB* metilaz genlerinin varlığı pozitif kontroller kullanılarak araştırıldı ancak bu genlerin varlığı saptanmadı.

Yan ve ark. (3) nozokomiyal kaynaklı *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenlerinde *armA* ve *rmtB* genlerini PZT yöntemi ile araştırmışlardır. Amikasin MİK değeri 256 µg/mL'nin üzerinde olan toplam 35 kökenden, 12 *E. coli* ile 16 *K. pneumoniae*'de *armA* geni, iki *E. coli* ile beş *K. pneumoniae*'de ise *rmtB* geni saptamışlardır. Araştırmacıların amikasin MİK'i 16-64 µg/mL arasında olan toplam 46 kökende sözü edilen genlere rastlanmamış olması 16S rRNA metilaz genlerinin çoğunlukla yüksek düzey amikasin direncine sahip kökenlerde bulunduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda *armA*, *rmtA* ve *rmtB* metilaz genleri saptanmayan kökenin de amikasin MİK değeri 64µg/mL idi. Buna karşılık, Belçika'da gerçekleştirilen çalışmada (16), amikasin MİK'i 8 µg/mL olan bir *E. coli* kökeninde *armA* geni bulunmuştur. Aynı çalışmada (16), 4,6-disüstitüe deoksistreptamin MİK değerleri 512 µg/mL'nin üzerinde olan 18 *Enterobacteriaceae* kökeninden 17'sinde *armA*, birinde ise *rmtB* geni saptanmıştır. Hiçbir kökende *rmtA* genine rastlanmamıştır.

Yamane ve ark. (17)'nin gerçekleştirdiği çalışmada, arbekasin MİK değeri 1024 µg/mL olan bir *Acinetobacter* kökeninde *rmtA*, *rmtB* ve *armA* genlerinden hiçbiri saptanamazken, bu kökenin 6'-asetiltransferaz ve 2''-adeniltransferaz enzimlerini ürettiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda metilaz enzimleri saptanmayan *Acinetobacter* kökeninde de aminoglikozit modifiye eden enzimler aracılığı ile direnç geliştiği düşünülebilir.

Japonya'da klinik *P. aeruginosa* kökenlerinde RmtA enzim prevalansının en az % 0.4 olduğu tahmin edilmektedir (6). Tayvan'da yapılan çalışmada (3), ArmA ve RmtB prevalansının *K. pneumoniae* kökenlerinde % 0.9, *E. coli* kökenlerinde ise % 0.3 dolayında olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi, 16S rRNA metilaz enzimlerinin prevalansı oldukça düşük düzeyde bulunmaktadır. Ancak bu enzimlerin dünyanın çok değişik bölgelerinden izole edilen Gram-negatif bakteri kökenlerinde saptanmış olması global bir özellik taşıdığını göstermektedir. Metilaz genlerinin plazmitler üzerinde kodlanması ve bakteriler arasında horizontal geçiş göstermesi önemini bir kat daha artırmaktadır. Bu çalışmada, sınırlı sayıdaki klinik kökende *armA*, *rmtA* ve *rmtB* genlerine rastlanmamıştır. Ancak tüm dünyada

olduğu gibi, ülkemizde de daha fazla sayıda Gram-negatif kökünde 16S rRNA metilaz genlerinin araştırılması gerekmektedir. Benzer çalışmalar antimikrobiyal tedavileri yönlendirmede ve gerekli infeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasında yarar sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar bu araştırmanın proje olarak desteklenmesini sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Yönetim Kurulu'na teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

1. Akalin H. Çoğul dirençli Gram-negatif bakteriler. Doğanay M, Ünal S, ed. *Hastane İnfeksiyonları*'nda. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, **2003**; 269-87.
2. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**; 70: 140-50.
3. Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother* **2004**; 54: 1007-12.
4. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* **2007**; 45: 88-94.
5. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 2565-71.
6. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* **2003**; 362: 1888-92.
7. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48: 491-6.
8. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, rmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50: 178-84.
9. Doi Y, Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-β-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 852-6.
10. Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, et al. Plasmid-mediated novel m¹ A1408 methyltransferase, NpmA, for 16S rRNA found in clinically isolated *Escherichia coli* resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 4401-9.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. 7th ed. Approved Standard M7-A7. Wayne, PA: CLSI, **2006**.
12. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 2949-53.
13. Gonzales-Zorn B, Catalan A, Escudero JA, et al. Genetic basis for dissemination of *armA*. *J Antimicrob Chemother* **2005**; 56: 583-5.
14. Gonzales-Zorn B, Teshager T, Casas M, et al. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **2005**; 11: 954-6.
15. Liou GF, Yoshizawa S, Courvalin P, Galimand M. Aminoglycoside resistance by *armA*-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J Mol Biol* **2006**; 359: 358-64.
16. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 59: 459-64.
17. Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis* **2005**; 11: 951-3.

İLETİŞİM

Doç. Dr. Şafak ERMERTCAN
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
35100 Bornova, İZMİR
e-posta: safak.ermertcan@ege.edu.tr