



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FENOTİPİK OLARAK AMİKASİN DUYARLI  
ESCHERICHIA COLI KÖKENLERİNDE  
AMİNOGLİKOZİD DİRENCİNDEN SORUMLU AAC(6')-I  
ENZİMİNİN GENOTİPİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

NESRİN AYDOĞAN  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Güner SÖYLETİR

İSTANBUL-2010

## TEZ ONAYI

ÖRNEK

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( × )      Doktora ( )

Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Sahibi : Nesrin AYDOĞAN

Tez Başlığı : Fenotipik Olarak Amikasin Duyarlı *Escherichia coli* Kökenlerinde Aminoglikozid Direncinden Sorumlu AAC(6')-I Enziminin Genotipik Olarak Araştırılması

Sınav Yeri : Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Sınav Tarihi : 05.11.2010

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/~~Doktora~~ Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Güner SÖYLETİR

Kurumu

Tıp Fakültesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan,  
Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN

Doç. Dr. Mustafa ÖZYURT

A. Karahasen  


Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun ~~22/11/2010~~ 22/11/2010 tarih ve 4.1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr.  
Gülden Z. OMURTAG  
Müdür

  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

05.11.2010

Nesrin AYDOĞAN



## D) ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Güner SÖYLETİR'e,

Bilgi ve tecrübeleriyle, yüksek lisans eğitimimde büyük emeği geçen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN, Prof. Dr. Ufuk HASDEMİR, Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU, Doç. Dr. Nurver ÜLGER ve Dr. Burak AKSU'ya,

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren yardım ve desteklerini esirgemeyen, tez çalışmamda önemli katkıları olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Gülşen ALTINKANAT'a,

Eğitimim boyunca dostluğunu, manevi desteğini hep yanımda hissettiğim, her an için yardıma hazır olduğunu bildiğim, çok sevdiğim Asistan Dr. Pınar BEKDEMİR'e,

Birlikte çalışmaktan sonsuz mutluluk duyduğum tüm yüksek lisans ve asistan arkadaşlarıma,

Canım aileme teşekkür ederim.

## **II) İÇİNDEKİLER:**

I) Önsöz

II) İçindekiler

III) Kısaltmalar ve Simgeler

IV) Şekil, Resim ve Tabloların Listesi

<b>Özet</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>6</b>
2.1. Bakterilerde Antimikrobiyal İlaçlara Direnç Mekanizmaları	6
2.2. Aminoglikozidler	7
2.2.1. Kimyasal Yapıları	8
2.2.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Mekanizması	9
2.2.3. Antimikrobiyal Etki Spektrumu	10
2.2.4. Aminoglikozidlere Direnç Geliştirme Mekanizmaları	11
2.3. İn vitro Antibiyotik Etkinliğinin Saptanması	15
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>20</b>
3.1. Gereçler	20
3.1.1 Besiyerleri	20
3.1.2. Standart Kökenler	20
3.1.3. Antibiyotikler	20
3.1.4. PZR Malzemeleri	21

3.1.5. Hazırlanan Besiyerleri ve Solüsyonlar	21
3.2. Araçlar ve Ayrıtlar	22
3.3. Yöntemler	23
3.3.1 Kökenlerin Seçimi	23
3.3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	26
3.3.3. <i>Escherichia coli</i> 'lerin Genotiplendirilmesi	26
3.3.4. İstatistiksel Değerlendirme	28
<b>4. BULGULAR</b>	<b>29</b>
4.1. Fenotipik Sonuçlar	29
4.2. Genotipik Sonuçlar ve Fenotipik Sonuçlarla İlişkisi	30
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>36</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>46</b>
<b>Özgeçmiş</b>	
<b>Etik Kurul Onayı</b>	

### III) KISALTMALAR VE SİMGELER

- AAC: Aminoglycoside Acetyltransferases  
AES: Advanced Expert System  
AME: Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim  
AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit  
ANT: Aminoglycoside Adenyltransferases  
APH: Aminoglycoside Phosphotransferases  
ATCC: American Type Culture Collection  
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
EDP: Energy Dependent Phase  
GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz  
MİK: Minimal İnhibitör Konsantrasyon  
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
RNA: Ribonükleik asit  
TBE: Tris Borik asit- Ethylendiamintetraasetik asit  
TOB: Tobramisin  
tRNA: Transfer ribonükleik asit

## IV) ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

### i. Őekillerin Listesi

Şekil 1. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimler ve Substratları

### ii. Resimlerin Listesi

Resim 1. GSBL(-) ve birçok antibiyotiğe duyarlı *E. coli* kökeninin VITEK 2 laboratuvar raporu çıktı rneği.

Resim 2. GSBL(+) ve birçok antibiyotiğe dirençli *E. coli* kökeninin VITEK 2 laboratuvar raporu çıktı rneği.

Resim 3. aac(6')-I direnç genine sahip olan kökenlerin agaroz jeldeki görüntüleri.

### iii. Tabloların Listesi

Tablo 1. VITEK 2 AES ile referans genotip arasındaki uyum

Tablo 2. PZR'de kullanılan primer seti

Tablo 3. PZR Koşulları

Tablo 4. Amikasin MİK ve tobramisin disk difüzyon testi sonuçları

Tablo 5. Kökenlerde tobramisin duyarlılık ve aac(6')-I direnç geni taşıma oranları

Tablo 6. Amikasin MİK sonuçları ve aac(6')-I varlığı arasındaki ilişki

Tablo 7. Gen pozitifliğinin GSBL(+) ve GSBL(-)'lerde amikasin MİK değerlerine göre dağılımı

Tablo 8. MİK değeri 4 μg/ml olan kökenlerin tobramisin duyarlılığı ile aac(6')-I geni varlığı arasındaki ilişki

Tablo 9. MİK değeri 8 μg/ml olan kökenlerin tobramisin duyarlılığı ile aac(6')-I geni varlığı arasındaki ilişki

Tablo 10. MİK değeri 16 µg/ml olan kökenlerin tobramisin duyarlılığı ile aac(6')-I geni varlığı arasındaki ilişki

Tablo11. Kinolon duyarlılığı ile GSBL ilişkisi

Tablo 12. Kinolon duyarlılık oranlarının aac(6')-I geniyle ilişkisi

## ÖZET:

Gram negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen aminoglikozid grubu antibiyotiklerin yaygın kullanımına bağlı olarak bakterilerin ürettiği modifiye edici enzimler aracılığıyla bu antibiyotiklere direnç gelişmekte ve tedavide başarısızlıklara neden olmaktadır. Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilerek VITEK 2 otomatize sistemiyle tanımlanan ve amikasinin minimum inhibitör konsantrasyonu duyarlı aralıkta olmasına rağmen sistem tarafından orta duyarlıya çevrilen ve ayrıca AAC(6') enzimiyle direnç gelişebilir uyarısı verilen *Escherichia coli* kökenleri çalışmaya alınmıştır. GSBL üreten (n:100) ve üretmeyen (n:100) toplam 200 adet *E. coli* kökeninin tobramisin, netilmisin ve amikasin duyarlılıkları disk difüzyon testi ile belirlenmiş; aac(6')-I direnç geni varlığı PZR yöntemiyle araştırılmıştır. Amikasin MİK'i 4 µg/ml (n:85) olan kökenlerin tobramisin direnci %34.1 iken MİK'i 8 µg/ml (n:58) olan kökenlerde %69, MİK'i 16 µg/ml (n:57) olanlarda ise %91.2 oranında bulunmuştur. aac(6')-I geni taşıma oranları MİK değeri 4, 8 ve 16 µg/ml olan kökenler için sırasıyla %30.6, %63.8 ve %86 olarak saptanmıştır. Buna karşın bu MİK değerlerine sahip kökenler tobramisine de dirençli iseler MİK:4 µg/ml olanlarda dahi gen varlığı kökenlerin %79.3'ünde gözlenmiştir. GSBL(+) kökenlerde aac(6')-I varlığı GSBL(-) olanlara kıyasla amikasin MİK'i 4 µg/ml olanlarda 3 kat daha fazla bulunurken MİK'i 16 µg/ml olanlarda anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu sonuçlara göre özellikle MİK değeri 4 µg/ml olan kökenler için sistemin bu uyarıyı vermesi toplam olguların 2/3'ünde gereksiz yere amikasin kullanımını kısıtlamakta, buna karşın MİK'i 16 µg/ml olan kökenler için oldukça isabetli bir uyarıyı gerçekleştirmektedir. Bu uyarı, tobramisin duyarlılığı test etmekle desteklendiğinde özellikle MİK:4 µg/ml olan kökenler için klinisyene daha doğru bir yanıt vermek mümkün olabilecektir.

**Anahtar Sözcükler:** AAC(6') enzimi, Amikasin, Aminoglikozid modifiye edici enzimler, VITEK 2 otomatize sistemi.

## **SUMMARY:**

### **Genotypic Analysis of AAC(6')-I Enzyme which is Responsible for Aminoglycoside Resistance in *Escherichia coli* strains that are Phenotypically Susceptible to Amikacin**

Due to widespread use of aminoglycosides in the treatment of infections caused by Gram negative bacteria, the modifying enzymes produced by bacteria may cause resistance to those antibiotics and may result in treatment failures. *Escherichia coli* strains which were isolated from clinical samples at Clinical Microbiology Laboratory of Marmara University Hospital and identified by VITEK 2 automated system were included in this study. Study isolates were chosen to have a minimum inhibitory concentration of amikacin in susceptible category, but converted from susceptible to intermediate by VITEK 2 Advanced Expert System(AES) and warned to develop resistance by AAC(6') enzyme. For a total of 200 *E. coli* strains, with (n:100) or without (n:100) ESBL production, sensitivities to tobramycin, netilmicin and amikacin were detected by disk diffusion and, aac(6')-I gene was determined by PCR. In the strains with amikacin MIC of 4 µg/ml (n:85), 34.1% was resistant to tobramycin, while in the strains with MIC of 8 µg/ml (n:58) and 16 µg/ml (n:57), tobramycin resistance rates were 69% and 91.2%, respectively. In regard to carrying aac(6')-I gene, the rates were found to be 30.6%, 63.8 and 86 for the strains with MIC values are 4, 8, and 16µg/ml, respectively. However; if the strains were also resistant to tobramycin, presence of the gene in strains even with MIC:4 µg/ml was increased to 79.3%. The aac(6')-I existence in the ESBL(+) strains with amikacin MIC of 4 µg/ml was three times more than that of ESBL(-) ones, while there was no significant difference in strains with MIC of 16 µg/ml. According to these results; AES warning of VITEK 2, especially for the strains with MIC value of 4 µg/ml, unnecessarily limits the use of amikacin in 2/3 of the events, however in the strains with MIC of 16 µg/ml, it gives much accurate warning with a rate of more than 90% of the strains. This warning strengthened by tobramycin sensitivity testing,

especially for the strains MIC is 4 µg/ml will provide to give a more true information to the clinician.

**Key Words:** AAC(6<sup>3</sup>) enzyme, Amikacin, Aminoglycoside modifying enzymes, VITEK 2 automatised system.

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tarih boyunca insanlar ve enfeksiyona sebep olan mikroorganizmalar arasında sürekli bir savaş olmuştur. Bu mikroorganizmalara karşı etkin bir mücadele yapılması tıbbın önemli bir amacıdır.

Enfeksiyon hastalıklarını tedavi amacıyla kemoterapötik olarak adlandırılan bazı boyaların ve kimyasal maddelerin kullanımı 17. yüzyıldan itibaren başlamıştır. Bakteriyel enfeksiyonlar açısından; 1930'lu yılların sonunda sülfonamidlerin keşfi ve hemen ardından penisilinin klinik kullanıma girmesiyle çağdaş antimikrobiyal tedavi dönemi başlamıştır. Son elli-altmış yıl içerisinde doğal, sentetik ve yarı sentetik birçok antibiyotik kullanıma girmiş ve ölümcül pek çok enfeksiyon hastalığının tedavisini olanaklı kılmıştır. İnsanlık tarihinin en önemli buluşlarından olan antibiyotiklerin uygunsuz ve gereksiz yere kullanımı arttıkça bakteriyel patojenler tarafından geliştirilen direnç mekanizmaları daha da artmıştır. Bu durum çok sayıda yeni antibiyotiğin bulunmasına yol açmış ve bunların bilinçsizce kullanılmasına bağlı olarak, dirençli bakteri kökenlerinin oluşmasını, ilaç yan etkilerinin artmasını, ekonomik yük gibi önemli sorunları ortaya çıkarmıştır.

Günümüzde hem toplumsal hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlarda *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ve *Citrobacter* türlerinin izolasyon sıklığı ve buna paralel olarak çeşitli antibiyotiklere direnç oranları artmaktadır. *Enterobacteriaceae* üyesi gram negatif mikroorganizmalarla meydana gelen deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni, primer veya sekonder bakteriyemi gibi ağır enfeksiyonları olan hastalarda genellikle antimikrobiyal ajanların yaygın kullanılması sonunda antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalar seleksiyona uğramaktadır. Gram negatif bakteriyel

enfeksiyonların tedavisinde sefalosporin gibi beta-laktam antibiyotikler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlü antibiyotikler, karbapenemler veya aminoglikozidler kullanılmaktadır (1,2).

Bakterilerin antimikrobik ilaçlara karşı gösterdiği direnç mekanizmalarından biri olan enzimatik direnç, en sık gözlenen mekanizmadır ve plazmit, transpozon veya kromozom üzerindeki genler tarafından kodlanan enzimler ile antibiyotik modifiye edilmektedir.

Gram negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen aminoglikozid grubu antibiyotiklerin yaygın kullanımına bağlı olarak bakterilerin ürettiği modifiye edici enzimler aracılığıyla bu antibiyotiklere direnç gelişmekte ve tedavide başarısızlıklara neden olmaktadır. Aminoglikozidler, bakteri hücre membranından geçerken bu enzimler ile modifiye edildiğinden ribozomlara bağlanamazlar ve böylece etkisiz kalırlar (3).

Aminoglikozidler gerek hastane kökenli gerekse toplum kökenli enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılırlar. Kullanıma giren birçok antibiyotik nedeniyle daha çok kombine antibiyoterapide kullanılmaktadırlar (4).

Aminoglikozid direncini sağlayan enzimlerin genetik bilgisi bakteride ekstra kromozomal plazmit ve transpozonlar üzerinde taşınır ve bakteriler arasında aktarılabılır dolayısıyla hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler arasında transfer edilebilir bir dirençlilik sağlar (5). Aminoglikozid modifiye edici enzimi (AME) taşıyan plazmitler heterojendir ve klinik etkileri sıklıkla birlikte taşınan beta-laktamazlarla şiddetlenmektedir. Direnç mekanizmalarının tanımlanmasının ve izlenmesinin epidemiyolojik olarak büyük önemi vardır. Bu sebeple aminoglikozidleri modifiye eden enzimlerin türü ve sıklığı her hastanede araştırılmalı ve klinikte bu antibiyotikler kullanılırken bu veriler göz önünde bulundurulmalıdır (6).

Aminoglikozid grubu antibiyotikleri modifiye eden enzimlerin dağılımı coğrafi farklılık göstermektedir. Bu da antibiyotik kullanımı sonucu oluşan seleksiyon baskısı ile farklı enzimlerin daha yaygın oluşuna bağlanmaktadır (7). Örneğin, gentamisin'in amikasin'den daha sık kullanıldığı ülkelerde en sık gözlenen enzimler ANT(2') ve AAC(3)'tür. Amikasin'in yaygın olarak kullanıldığı ülkelerde ise amikasin'i inaktive edebilen AAC(6') enzimi sık bulunmaktadır. Türkiye'de yapılan çok merkezli bir çalışmada da AAC(6')-I enziminin gram negatif bakterilerde en sık olarak bulunan enzimlerden biri olduğu belirlenmiştir (8). AAC(6')-I enzimi tobramisin, kanamisin, netilmisin ve amikasin direncinden sorumludur (9).

Hastanemizde kombine tedavilerde amikasin ilk tercih edilen ve sıklıkla kullanılan bir aminoglikozittir. Buna rağmen son bir yılda izole edilen *E. coli* kökenlerinde; amikasine yaklaşık %0.7 oranında düşük bir direnç söz konusudur. Ancak bu fenotipik sonucun genotipi ne kadar yansıttığı açık değildir. Çünkü AAC(6')-I enziminin substratları olan tobramisin ve netilmisin birçok laboratuvar da mikroorganizmaların tanımlanması ve duyarlılığı için kullanılan VITEK 2 otomatize sistem panelinde yer almamakta, dolayısıyla bu antibiyotiklerin duyarlılığına laboratuvar da ek test olarak bakılmamaktadır. Ancak laboratuvarımızda da kullandığımız bu otomatize sistemin amikasin MİK'i duyarlı aralıkta (MİK: 4, 8 ve 16 µg/ml) olduğu halde, sonucu orta duyarlıya çevirdiği ve AAC(6') enzimiyle aminoglikozidlere direnç gelişebilir uyarısı verdiği dikkati çekmiştir. Dolayısıyla bu direnç fenotipinin gerçek genotipi yansıtıp yansıtmadığını irdelemek üzere çalışmamızda; 2009-2010 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen klinik *E. coli* kökenlerinde AAC(6')-I AME varlığı araştırılacaktır. Bunun için VITEK 2 otomatize cihazının amikasin için duyarlı aralıkta olduğu halde sistemin orta duyarlı olarak değiştirdiği ve tobramisin, netilmisin ve amikasin için AAC-(6') enzimiyle direnç gelişebileceği uyarısını verdiği genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten (GSBL+) ve üretmeyen (GSBL-) kökenler çalışmamıza dahil edilmiştir. Kökenlerin tobramisin, netilmisin ve amikasin duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle saptanmış ve bu antibiyotiklere dirence sebep olan gen varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metoduyla araştırılmıştır.

Bu çalışmayla duyarlılık testlerinde, bu enzimin substratı olan aminoglikozidlerden sadece amikasinin kullanılması halinde, amikasin için saptanan fenotipik duyarlılığın ne kadar güvenilir olduğu ortaya konmuş olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kemoterapötikler ve antibiyotikler son 50 yılda önemli derece faydalı olmuşlar ve eskiden öldürücü olduğu bilinen pek çok hastalığın zamanında tanı ve tedavisi için vazgeçilmez unsurlar haline gelmişlerdir. Ancak bu maddelerin uzun zaman ve bazen gereksiz yere kullanılmaları sonunda hastalık etkenlerinin ilaçlara karşı direnç kazanmaları, enfeksiyon hastalıklarının sağaltımını güçleştirmesiyle son yıllarda çağdaş tıbbın en önemli problemi olarak ortaya çıkmıştır (3,6,10).

### 2.1. Bakterilerde Antimikrobiyal İlaçlara Direnç Mekanizmaları

Antibakteriyel ajanların yaygın kullanılmasına bağlı olarak bakteriler tarafından çeşitli direnç mekanizmaları geliştirilmiştir.

Mikroorganizmaların antimikrobiyallere karşı gösterdiği direnç doğal (intrinsik) ve kazanılmış (genotipik, kalıtsal) direnç olmak üzere ikiye ayrılır (3,6,8).

**Doğal direnç:** Bir mikroorganizma türünün genetik özelliği olan direnci tanımlamaktadır. Antimikrobiyalin hedefi olan yapıyı taşımamalarının veya yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşamamasının bir sonucudur. Örneğin gram negatif bakteriler vankomisine ve metisiline, enterokoklar sefalosporinlere duvar yapıları nedeniyle intrinsik direnç gösterirler. Aminoglikozidlerin hücre membranından geçişi oksijene bağımlı, enerji gerektiren bir olay olduğundan oksidatif fosforilasyonun olmadığı zorunlu anaerob bakterilerde yeterli ilaç hücre içine giremediğinden anaeroplara üzerine aminoglikozid antibiyotikler etki gösteremezler (3,6,8).

**Kazanılmış direnç:** Bakteri DNA'sındaki mutasyonlar ya da yeni bir DNA edinilmesi sonucu sonradan ortaya çıkmaktadır. Bakteri popülasyonu antimikrobiyal ile ilk temas geldiğinde ilaç etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antimikrobiyal maddeye karşı direnç gelişir. Antimikrobiyallere karşı gelişen direnç esas olarak bu yolla olmakta ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli kökenler ortaya çıkıp yayılmaktadır. Genetik direnç kromozom, plazmit, transpozon kontrolü altındadır. Bakteriler direnç mekanizmalarından birini veya birkaçını birlikte kullanarak antibiyotiklere direnç kazanmaktadır (3).

Kazanılmış direnç mekanizmaları şu şekilde gruplandırılabilir:

1. İlacın hedefinde değişiklik oluşturulması
  - a. Penisilin bağlayan proteinlerin değişimi:  $\beta$ -laktamlara karşı direnç
  - b. Ribozomal hedefin değişimi: Aminoglikozid, makrolit, linkozamitlere karşı direnç
  - c. Değişmiş enzimatik hedef: Sülfonamid, trimetoprim, rifampin, kinolon
2. Sentezlenen enzimle ilacın inaktive veya modifiye edilmesi:  $\beta$ -laktamaz, aminoglikozid modifiye eden enzimler (asetilaz, adenilaz, fosforilaz), kloramfenikol asetil transferaz
3. Hücreye giren ilaç miktarının azaltılması
  - a. Permeabilitenin azaltılması
  - b. Antibiyotiğin alım ve transport sisteminin zayıflığı veya yokluğu
  - c. Aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması (3,8).

Birçok temel antibiyotik sınıfına dirençte önde gelen mekanizma; ilacı inaktive eden enzimlerin üretimidir. Örneğin plazmit veya transpozon kökenli modifiye edici enzimlerin üretimi aminoglikozidlere karşı kazanılmış dirençte en sık görülen mekanizmadır (6).

## 2.2. Aminoglikozidler

Aminoglikozid antibiyotikler 1940'lı yıllardan itibaren antibakteriyel ilaçların önemli bir grubu haline gelmişlerdir. *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi funguslardan elde edilen doğal ya da semisentetik antibiyotiklerdir. 1944 yılında *Streptomyces griseus*' tan streptomisin elde edilmesiyle kullanıma girmişlerdir (18). Elde ediliş ve klinik kullanıma giriş sırasına göre; streptomisin (1944), neomisin (1949), kanamisin (1957), gentamisin (1963), tobramisin (1967), sisomisin (1970), amikasin (1972), netilmisin (1975), dibekasin (1971), isepamisin (1978), arbekasin (1990) bu grup antibiyotikleri oluşturur (5,11).

### 2.2.1. Kimyasal Yapıları

Aminoglikozidlerin kimyasal yapıları; genellikle santral yerleşen 'heksoz' nükleusa yani aminosiklitol halkasına iki veya daha fazla aminoşekerin glikozid bağlarıyla bağlanmasından oluşmuştur. Spektinomisin aminoşeker ve glikozidik bağ içermemesi ile diğer aminoglikozidlerden farklılaşır (5,12).

Aminoglikozidler arasındaki bireysel farklılıklar aminosiklitol halkaya bağlı aminoşekerlerin yapı ve sayısından kaynaklanmaktadır. Aminoglikozidlerin kimyasal yapıları ile antibakteriyel etkinlikleri arasındaki ilişki çok iyi anlaşılamamıştır. Değişik halkalara bağlı bazı hidroksil ve amino gruplarının bazı bakteri enzimleriyle ya da kimyasal maddelerle modifiye edilmesi antibakteriyel etkinin ve toksisitenin azalmasına neden olmaktadır.

Aminoglikozidler kimyasal yapılarına göre beş aileye ayrılır:

1. Streptomisin ailesi; streptomisin
2. Kanamisin ailesi; kanamisin A, kanamisin B, amikasin, tobramisin, dibekasin
3. Gentamisin ailesi; gentamisin C1, gentamisin C1a, gentamisin C2, sisomisin, netilmisin, isepamisin
4. Neomisin ailesi; neomisin, paromamisin
5. Spektinomisin ailesi; spektinomisin.

Streptomisin, neomisin, kanamisin ve tobramisinden her biri ayrı bir *Streptomyces* türünden elde edilirken gentamisin ve sisomisin *Micromonospora* türlerinden elde edilir. Son iki aminoglikozidin sonundaki misin eki bu farklılığı gösterir. Diğer yandan amikasin; kanamisin A'nın, netilmisin ise sisomisinin semi-sentetik türevleridir (5,12,13).

Aminoglikozidler suda iyi derece çözünürken, organik çözücülerde çözünmezler. Çok az lipofiliktirler, bundan dolayı yağ içeren zarlardan sınırlı geçişleri vardır. Moleküler ağırlıkları 445 ve 600 dalton arası değişir. Moleküler yapıları; dondurulma, 100 °C'de 4 saat ısıtılma, saatlerce 3-12 pH aralığında kalma gibi koşullarda değişmez. pH 7,4'de katyonik olup çok yüksek pozitif yüke sahiptirler. Bu aynı zamanda antimikrobiyal aktivite ve toksisitesi ile de yakından ilişkilidir. Antibakteriyel aktivite alkalın pH'da artarken, asidik pH'da azalır. Aminoglikozidler ve beta-laktamlar kimyasal olarak birbirlerine aktif olup, beta-laktam halkasının nükleofilik açılmasıyla aminoglikozidin amino grubunun asetillenmesi sonucunda antibakteriyel etkinliklerini kaybederler (12).

### **2.2.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Mekanizması**

Aminoglikozidlerin antibakteriyel etki mekanizması multifaktöriyel bir süreç olup hücrenin dış yüzeyi ile iyonik etkileşim, iki enerji bağımlı faz ve ribozomlara bağlanma basamaklarından oluşur. Aminoglikozidlerin bakteri hücre yüzeyine bağlanması elektrostatik, pasif bir olaydır ve enerji gerektirmez. Gram negatif bakteri hücre duvarında lipopolisakkaridlere, fosfolipidlerin polar başlarına ve aniyonik dış membran proteinlerine bağlanır, burada rekabetçi olarak  $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarını yerlerinden oynatırlar. Bunun sonucunda hücre duvarının normal geçirgenlik fonksiyonu bozulur. Bu sebeple protein sentezini inhibe eden diğer antimikrobiyaller (örn: tetrasiklinler, kloramfenikol) bakteriyostatik iken, aminoglikozidler bakterisidal olarak etki gösterirler. Bakteri hücre zarını geçmiş olan aminoglikozid geri dönüşümsüz olarak sitoplazma içinde kalır. Hücre zarına iyonik bağlanmadan sonra aminoglikozidin bakteri içine alınışı birbirini takip eden ve enerji gerektiren iki fazda gerçekleşir. Bunlar: Energy dependent phase 1 (EDP-1) ve energy dependent phase 2

(EDP-2)'dir. EDP-1 yavaş seyredirken EDP-2 hızlıdır. Bu fazlar için gereken enerji ATP hidrolizi ile veya solunum sırasında proton açığa çıkması ile oluşan transmembran elektrokimyasal yük farkından sağlanır. Bakterinin hücre membran potansiyeli ne kadar fazla ise aminoglikozidin etkisi o kadar fazla olmaktadır. Anaerop ortamda, düşük pH'da ve yüksek ozmolar ortamda membran potansiyeli azaldığından aminoglikozidlerin antibakteriyel etkileri de azalmaktadır. Dolayısıyla apselerin anaerop ortamda, idrarın hiperozmolar asidik olması durumunda aminoglikozidlerin etkisi azalır (5,12,14).

Sitoplazmik membranı geçen aminoglikozidler ribozomlara bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Bu olay daha sonraki antibiyotik transport fazı olan EDP-2'yi hızlandırır. EDP-2'nin hızlanması hücre membranının progresif bozulmasıyla ilişkilidir ve aminoglikozidlere bağlı bakteri ölümünden önce ilk sırada küçük iyonların, bunu takiben daha büyük moleküllerin, en sonunda da proteinlerin bakteri hücresinden sızması gerekçesine dayandırılmaktadır. Bakteri sitoplazmik membranının bozulması aminoglikozidlerin letal etkisini açıklayabilir (5,12).

Hücre dışı aminoglikozid yoğunluğu ne kadar fazla ise hücre içi ilaç yoğunluğu o kadar artar ve EDP-2'yi tetikleyecek miktara hızla ulaşır, sonuçta bakteri ölümü görülür (5).

Aminoglikozidler bakterilerin 30S ribozomlarında 16S rRNA'nın A alt bölgesine geri dönüşümsüz bağlanarak mRNA kodonlarının ve tRNA antikodonlarının okunmasını bozarlar. (Streptomisin sadece 30S alt birimine bağlandığı halde, diğerleri ilave olarak 50S alt birimine de bağlanırlar.) Bunun sonucunda protein sentezi inhibe olur ve hücre ölümü gerçekleşir (1,5,12).

### **2.2.3. Antimikrobiyal Etki Spektrumu**

Aminoglikozidler kimyasal olarak oldukça stabil, allerjik yan etkileri az görülen, duyarlı bakteri hücresine hızlı bakterisidal etkili, geniş antibakteriyal spektruma sahip antibiyotiklerdir (11).

Gram negatif bakterilerin etken olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla tercih edilirler. En önemli etkinlikleri pseudomonaslar başta olmak üzere gram negatif aerop basiller üzerinedir. Gram pozitif bakteriler üzerine etkinlikleri kısıtlıdır (15). Metisiline duyarlı stafilokoklara genellikle etkilidirler, piyojen streptokoklar aminoglikozidlere nadiren duyarlıdırlar. *Listeria* ve diğer gram pozitif basillerin çoğu aminoglikozidlere dirençli, *Haemophilus spp.* ve *Neisseria spp.* genellikle duyarlıdır (5,15). Streptomisin *M. tuberculosis*'e, kanamisin *Mycobacterium avium-intracellulare* ve diğer atipik mikobakterilere etkilidir. Streptomisin ayrıca *Yersinia pestis* enfeksiyonlarında ilk seçenek olarak, streptomisin ve gentamisin *Francisella tularensis* enfeksiyonlarında başarı ile kullanılmaktadır. *Streptococcus pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.* ve diğer anaeroplara pratik olarak in vitro etkisizdirler. Klinik örneklerden izole edilen *S. maltophilia* ve *B. cepacia*'nın tanımlanmasında kullanılan özelliklerden biri de aminoglikozidlere dirençli olmalarıdır. Diğer yandan aminoglikozidlerin riketsiyalara, funguslara, mikoplazma ve virüslara klinik yönden etkinlikleri yoktur. Aminoglikozidlerin hücre içine girişleri iyi olmadığı için *Legionella* enfeksiyonlarında kullanılmazlar ancak bruselloz, tüberküloz gibi enfeksiyonlarda kombine olarak kullanılırlar. Aminoglikozidler içinde yalnızca spektinomisin gonore tedavisinde, paromomisin ise sindirim kanalından absorbe edilmediğinden oral yoldan amipli dizanteri tedavisinde ve AIDS'li hastalardaki *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonlarında kullanılır (5).

#### **2.2.4. Aminoglikozidlere Direnç Geliştirme Mekanizmaları**

Aminoglikozidler, *Enterobacteriaceae* ve pseudomonaslarda hücre içine hücre duvarındaki porin kanallarından girerek 30S ribozomlarına bağlanarak translasyonu bozmakta ve mRNA'nın genetik kodunun yanlış okunmasına yol açarak protein sentezini inhibe etmektedirler. Gram pozitif ve negatif bakterilerde aminoglikozidlere karşı direnç; ribozomal, permeabiliteye bağlı ve enzimatik direnç olmak üzere üç mekanizmayla oluşmaktadır (8,14,15).

**a. Ribozomal Direnç:** Aminoglikozid antibiyotiklerin bakteri hücresindeki hedefleri olan 30S ribozomal alt üniteye mutasyonlar sonucu gelişmektedir. Bu tip direnç sıklıkla streptomisine karşıdır ve genellikle tek bir aminoglikozide özgüdür. *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterokoklar ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi birçok bakteri türünde bildirilmiştir (8,15).

**b. Permeabiliteye Bağlı Direnç:** Aminoglikozidlerin hücre içine taşınmasının engellenmesi bu gruptaki tüm antibiyotiklere çapraz direnç gelişmesine sebep olmaktadır. Hedefleri olan ribozomlara ulaşmadan evvel hücre duvarını ve sitoplazmik membranı geçmek zorunda olan bu katyonik bileşikler Gram negatif bakterilerin dış membranında yer alan lipopolisakkarit tabakasındaki divalant katyonlarla (örn:  $Mg^{+2}$ ) yer değiştirirler ve membran bütünlüğünün bozulması ile hücre içine geçerler. Zardaki lipopolisakkarit, dış membran proteinleri, porinler veya fosfolipitlerin yapısındaki değişiklikler aminoglikozidlerin hücre içine alınmasını engeller. Aminoglikozidlerin hücre zarından geçmesini ise elektron transport zinciri ile kazanılan elektriksel potansiyel sağlamaktadır. Bu nedenle, elektron transport sistemi bulunmayan anaerobik mikroorganizmalar aminoglikozidlere doğal olarak dirençlidirler (6).

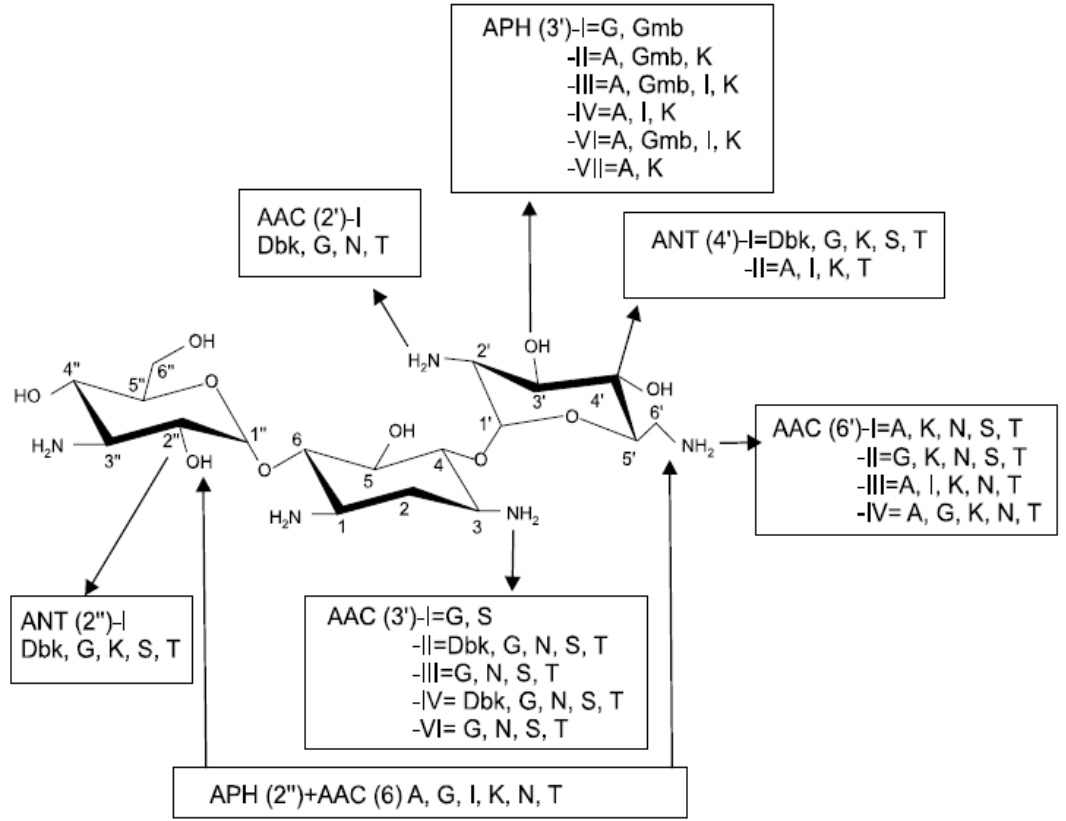
**c. Enzimatik Direnç:** Aminoglikozidlere dirençli bulunan gram pozitif ve negatif bakterilerde en sık görülen mekanizma plazmit tarafından kodlanan enzimlerle antibiyotiğin değiştirilmesidir. Aminoglikozidin hidroksil veya amino gruplarına özgül olarak bağlanan bu enzimler, aminoglikozid yapısını asetilasyon, adenilasyon veya fosforilasyon mekanizmaları ile inaktive ederler. Kataliz ettikleri reaksiyona göre bu enzimler üç grupta toplanmaktadır: Asetiltransferazlar, fosfotransferazlar, nükleotidil transferazlar (8,16). Enzimin aminoglikozid molekülündeki etki bölgesi parantez içinde bir rakamla belirtilmektedir. Örneğin; AAC(2''), 2''-amino grubunun asetile edildiğini göstermektedir. Benzer etki gösteren enzimlerin ayırdedilmesi için buna Romen rakamları eklenmektedir; örneğin AAC(3) enzimi, AAC(3)-I'den AAC-VII'ye kadar numaralanmıştır (17). Protein tanımlaması ise a, b, c vs. olarak yapılmaktadır. Örneğin AAC(6')-Ia ve AAC(6')-Ib aynı direnç profilini oluşturan iki farklı proteindir. Bunları kodlayan genler ise *aac(6')-Ia* ve *aac(6')-Ib* olarak

gösterilmektedir (18). Aminoglikozidlere direnci sağlayan bu enzimler bakterideki ekstra kromozomal plazmit ve transpozonlar aracılığıyla diğer bakterilere taşınır ve bakteriler arasında bulaşıcı tipte direnç oluştururlar (11).

- a. Asetiltransferazlar (AAC):** Aminoglikozid molekülündeki 1-, 3-, 6'- ve 2'- amino gruplarını asetile etmektedirler.
- b. Fosfotransferazlar (APH):** Aminoglikozid molekülündeki hidroksil grubunu fosforile etmektedir.
- c. Nükleotidil transferazlar (ANT):** Bu enzimlere adeniltransferazlar da denilmektedir. Aminoglikozidlerin hidroksil gruplarını adenile etmektedirler (8).

Bir aminoglikozid molekülü birden fazla bölgede modifikasyona uğrayarak birçok farklı enzim için substrat olabilir. Ayrıca bir enzim birçok farklı aminoglikozidi modifiye edebilir (19). Aminoglikozid grubu antibiyotikleri modifiye eden enzimlerin dağılımı coğrafi farklılık göstermektedir. Bu da antibiyotik kullanımı sonucu oluşan seleksiyon baskısı ile farklı enzimlerin daha yaygın oluşuna bağlanmaktadır (20). Örneğin, gentamisinin amikasinden daha sık kullanıldığı ülkelerde en sık gözlenen enzimler ANT (2') ve AAC(3)' tür. Ülkemizde gentamisin ve tobramisine direnç amikasine oranla daha yüksektir, buna karşın amikasin kullanımındaki artışa bağlı olarak bu antibiyotiğe dirençte de artış görülmektedir (8).

Aminoglikozidleri modifiye eden enzimler ve substratları Şekil 1.'de görülmektedir.



Şekil 1. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimler ve Substratları (14).

A: Amikasin, Dbk: Dibekasin, G: Gentamisin, Gmb: Gentamisin B, I: İzepamisin, K: Kanamisin A, N: Netilmisin, S: Sisomisin, T: Tobramisin.

#### 2.2.4.1. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimler ve Kinolon Direnci

Bakterilerde kinolon direnci, genellikle topoizomerazları kodlayan kromozomal genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmakta, ayrıca geri atım pompaları ve porinlerin kaybı direnç gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar kinolon direncinin yayılması ve artışının plazmid aracılı olabileceğini göstermiştir. Bugüne kadar plazmid aracılı kinolon direnci ile ilgili *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* olmak üzere üç gen tanımlanmıştır. 2006 yılında bazı kinolonların enzimatik inaktivasyonuna neden olan ve plazmitle aktarılan farklı bir mekanizma bulunmuştur. Aminoglikozidleri modifiye eden ve *aac(6')-Ib* ile kodlanan enzimin bir varyantı olan *aac(6')-Ib-cr* geni keşfedilmiştir. Bu

gen norfloksasin ve siprofloksasin gibi bazı kinolonların enzimatik inaktivasyonuna ve sonuçta da bu antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır (21).

### **2.3. İn vitro Antibiyotik Etkinliğinin Saptanması**

Duyarlılık testlerinin amacı hastanın tedavisinde kullanılacak olan antibiyotiklerin in vitro koşullarda etkinliğini saptamaktır. Bakteriler için antimikrobiyal duyarlılık testleri; görülebilir üremeyi önleyen en düşük antimikrobiyal miktarının saptanmasıyla (MİK) kantitatif olarak ya da antimikrobiyal içeren filtre kağıtlar kullanarak duyarlı-orta duyarlı-dirençli gibi değerlerin verilmesiyle kalitatif olarak uygulanabilir (22,23).

#### **A. Kalitatif Testler**

Disk difüzyon testi (Kirby-Bauer testi) :

McFarland 0.5 ( $1,5 \times 10^8$  kob/ml) bulanıklık standardına eşdeğer bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar yüzeyine pamuklu çubukla yaygın şekilde ekilir, antibiyotik emdirilmiş filtre kağıtlar agar üzerine yerleştirilir. 35 °C’de bir gecelik inkübasyondan sonra disk etrafında oluşan inhibisyon zonu ölçülerek CLSI’nın önerdiği disk difüzyon standartlarıyla karşılaştırılıp, mikroorganizma o antibiyotiğe karşı kalitatif olarak “duyarlı, orta duyarlı veya dirençli” şeklinde değerlendirilir.

Bu test özel alet gerektirmeyen, kolay uygulanabilir bir yöntem olmakla birlikte iyi standardize edilmediği takdirde sonuçlar güvenilir olmayabilir.

CLSI’nın disk difüzyon yönteminde ele aldığı mikroorganizmaların içinde yer almayan bakterilerin duyarlılıkları araştırılmak isteniyorsa kantitatif yöntemle MİK’leri belirlenmelidir (22).

#### **B. Kantitatif Testler**

**a. Agar dilüsyon yöntemi:** İki kat artan oranda seri sulandırılmaları yapılan antibiyotikten 8-10 dilüsyon olacak şekilde agarlı besiyerlerine katılarak plaklara dökülür. Her bir plağın belirli antibiyotik konsantrasyonu içerdiği bu yöntemde,

plaklara nokta şeklinde  $1 \times 10^4$  kob/ml bakteri bırakılarak bir gece inkübe edilir, görülebilir üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon (MİK) belirlenir.

Steers replikatör gibi aletler kullanılarak otuzdan fazla bakterinin aynı plak üzerinde MİK değerleri saptanabilmektedir (22).

**b. Sıvı dilüsyon yöntemi:** Antibiyotiğin seri sulandırılmaları 8 ile 10 tüpte hazırlanır. Her bir antibiyotik sulandırımı içeren 2 ml'lik sıvı besiyerlerine son konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  kob/ml olacak şekilde bakteri eklenir. Bir gece inkübasyondan sonra görülebilir bulanıklığın olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilir.

Antibiyotik dilüsyonlarının test tüpleri yerine, plastik mikrotitrasyon plaklarında 100 ml'lik hacimler halinde yapılmasıyla çok daha fazla kökenin ucuz ve hızlı olarak MİK değerleri saptandığı mikrodilüsyon yöntemi bu amaçla daha sık kullanılmaktadır.

Antimikrobiyal duyarlılık testlerini yaparken besiyeri içeriğinin, agar kalınlığının, antibiyotik disk ve dilüsyonları potensinin, inkübasyon ısısı ve süresinin sonuçları etkileyebileceği unutulmamalıdır. CLSI, duyarlılık testlerinin yapılmasında uyulması gereken kuralları güncelleyerek periyodik olarak yayınlamaktadır. Laboratuvarlar bu değişimleri takip ederek ve sağlayacakları ATCC (American Type Culture Collection) kökenleriyle testlerini standardize etmelidirler (22,23).

**c. Antibiyotik gradiyenti ile MİK belirleyen testler**

E test (AB biodisk, Solna, İsveç) ve Spiral Streak Gradient End Point sistemi (Spiral Biotech Inc, Bethesda) bu yöntemin ticari olarak üretilmiş örnekleridir. Rutinde en çok kullanılan ise E testtir. Disk difüzyon yönteminde olduğu gibi belli sayıda bakteri içeren süspansiyon, Mueller Hinton Agar yüzeyine inoküle edilip, gittikçe azalan konsantrasyonda antibiyotik emdirilmiş plastik E test şeritleri agar yüzeyine radial yerleştirilir. Bir gecelik inkübasyonun ardından antibiyotiğin oluşturduğu eliptik şekilli inhibisyon zonunun, şeridi kestiği noktadaki antibiyotik

konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilir. Bu yöntem özellikle *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* gibi güç üreyen bakteri türlerinin MİK değerlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. E test yöntemi CLSI, BSAC gibi standartlarda halen yer almamaktadır. Bu nedenle elde edilen olağan dışı sonuçlar referans yöntemle tekrarlanmalıdır (22).

### **C) Otomatize Yöntemler**

Otomatize sistemler: Mikroorganizmaların identifikasyon ve duyarlılık testlerinde hızlı sonuç alınması, klinisyene daha kısa sürede sonuç verilmesi, tür ve cins düzeyinde daha fazla identifikasyon olanağı sağlaması ve antibiyotik direnç paternleriyle ilişkili uyarıcı notlar verebilmesi bakımından mikrobiyoloji laboratuvarlarında önemli yere sahiptirler. İş yükünü hafifletme, bilgisayar bağlantılı kayıt ve sonuç gönderme, istatistiksel verilere kolaylıkla ulaşabilme (epidemiyolojik sürveyans çalışmaları) gibi avantajları da vardır. Bunun yanında maliyetlerinin yüksek olması, cihaz bakımı, teknik servis ihtiyacı, kit bağımlılığı, teknik hatalar (yazılım hataları, veri tabanındaki güncellemeler), direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında ek testlere ihtiyaç duyma, antibiyogram kartlarının sınırlı antibiyotik içeriği gibi konularda dezavantajları da bulunmaktadır ([www.klimud.org](http://www.klimud.org), Erişim tarihi: 10 Kasım 2010).

Duyarlılık testleri sıvı dilüsyon esasına göre çalışmakla birlikte gerçek MİK sonucu üretmemektedir. MİK sınır değerleri üzerinden değerlendirme yapmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanımda olan sistemler arasında VITEK (BioMerieux, Fransa), Phoenix (Becton Dickinson, Amerika), MicroScan Walkaway (Dade Int., Amerika) örnek gösterilebilir.

Çalışmamızda yararlandığımız ve laboratuvarımızda rutin tanımlama ve duyarlılık testleri için kullanılan sistem VITEK 2 otomatize sistemidir.

## VITEK 2 Otomatize Sistemi:

VITEK 2 sistemi (biomerieux, Fransa) gram pozitif ve gram negatif birçok bakterinin identifikasyon/duyarlılık sonuçlarının belirlenmesinde kullanılan otomatize bir sistemdir. İnce plastik kartlarda bulunan mikro–kuyucuklardaki bakteriyel üreme ve metabolik değişiklikleri florasan tabanlı bir teknoloji ile saptar.

VITEK 2 uzman sistemi (AES: Advanced Expert System); cihazın verdiği MİK değerlerini, sistemin yazılımında mevcut verileri analiz ederek mikroorganizma için antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarını irdeleyerek direnç mekanizması hakkında kullanıcıyı uyarmaktadır (24).

VITEK 2 sisteminin vermiş olduğu duyarlılık sonuçlarını AES, üç aşamalı bir yaklaşımla yorumlamaktadır. Sistem ilk aşamada (biyolojik onay); sonucun, identifiye edilen mikroorganizmanın direnç fenotipiyle uyumlu olup olmadığına bakar. Eğer duyarlılık test sonucu ile tanımlanan mikroorganizma arasında uyumsuzluk varsa sistem bunu tutarsız, çelişkili olarak yorumlar ve MİK sonucunun doğrulanması önerisini verir. Birden çok antibiyotiğin MİK sonucu direnç fenotipiyle uyum göstermediğinde ise AES yorum yapmaz fakat kullanıcıyı çelişkili sonuçlara karşı uyarır ve başka testler yapılmasını tavsiye eder.

İkinci aşamada terapötik yorumlamalarda bulunur. Bu yorumlamaları yaparken şu beş rehberden yararlanır: CLSI, Deutsches Institut für Normung (DIN), Comité de l'Antibiogramme de la Société Française (CA-SFM), fenotipik direnç ve doğal direnç. Bu aşamada AES, VITEK 2 duyarlılık panelinde test edilmiş antibiyotikle aynı sınıftan olan antibiyotiklerin duyarlılık sonuçlarını ortaya çıkarır.

Son aşamada ise duyarlılık sonuç yorumlamalarını ekler ve kullanıcıya direnç fenotipine ilişkin olarak tavsiyelerde bulunur (24,25,26).

Literatürde VITEK 2'nin standart ve referans antibiyotik duyarlılık yöntemleriyle karşılaştırılmasının yapıldığı çalışmalar mevcuttur. 2002 yılında Kanada'da 300 Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*,

*Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, *Salmonella spp.*, *Serratia liquefaciens*, *S. marcescens*, *Shigella sonnei*) izolatının AES yorumlu sonuçları ile laboratuvarın dondurulmuş sıvı mikrodilüsyon plaklarında gerçekleştirdiği duyarlılık test sonuçları karşılaştırılmış ve aralarında %96.2 gibi yüksek bir oranda uyumluluk saptanmıştır (25). Başka bir çalışmada çeşitli antibiyotiklere karşı bakterilerin referans genotipik verileriyle AES verileri arasında; stafilokoklarda %83.3, gram(-) basillerde %68.2, enterokoklarda %100 oranında uyumlu sonuç gözlenmiştir (27). Livermore ve ark. çalışmalarına dahil ettikleri, çeşitli antibiyotiklere direnç genotipleri bilinen gram pozitif ve gram negatif bakterilerde VITEK 2 AES raporlarının %87.9 oranında direnç genotipleriyle uyumluluk, %4.7 gibi çok düşük bir oranda kısmi uyum ve %6.9'luk bir uyumsuzluk gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca Tablo 1'de görüldüğü üzere gram negatif bakterilerde kinolon direnç mekanizmalarını saptamada yaklaşık %98'lik bir uyum görülür iken aminoglikozid modifiye edici enzimleri saptamada %24.2 gibi düşük bir uyum tespit etmişlerdir (28).

Tablo 1. VITEK 2 AES ile referans genotip arasındaki uyum

	<b>Uyum</b> n(%)	<b>Kısmi uyum</b> n(%)	<b>Uyumsuzluk</b> n(%)	<b>Tanımlanamayan</b> n(%)	<b>Toplam</b> n(%)
$\beta$ -laktamazlar	205 (83.7)	18 (7.4)	19 (7.7)	3 (1.2)	245 (100)
Aminoglikozidlere direnç	8 (24.2)	21 (63.7)	4 (12.1)	-	33 (100)
Kinolon direnci	43 (97.7)	-	-	1 (2.3)	44 (100)
Toplam (n)	256	39	23	4	322

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. Besiyerleri**

- Mac Conkey Agar (Oxoid)
- Mueller Hinton Agar (Oxoid)
- Mueller Hinton Sıvı Besiyeri (Oxoid)
- Skim milk (Oxoid)

##### **3.1.2. Standart Kökenler**

- ATCC 25922 *Escherichia coli*
- *Citrobacter freundii* 88031626

ATCC 25922 *Escherichia coli*, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan,

*Citrobacter freundii* 88031626, Prof. Dr. George A. Jacoby'den (Lahey Klinik, Burlington, ABD) temin edilmiştir.

##### **3.1.3. Antibiyotikler**

- Tobramisin disk (10 µg/ml) (Oxoid)
- Netilmisin disk (30 µg/ml) (Oxoid)
- Amikasin disk (30 µg/ml) (Oxoid)

### 3.1.4. PZR Malzemeleri

- PZR Master Miks (2X) (Fermentas)
- 6 x Yükleme boyası (Loading Dye, MBI Fermentas)
- 100 kb DNA Ladder (MBI Fermentas)
- Enjeksiyonluk su (DNaz- RNaz içermeyen distile su) (MBI Fermentas)
- 10x TBE Tampon (Tris, EDTA, Borik asit)
- 200 µl sarı, 1000 µl mavi pipet ucu (DNaz, RNaz içermeyen) (Axygen)
- Agaroz (Prona)
- Etidyum bromid (Merck)
- 1,5 ml'lik mikrotüpler (Axygen)
- Eldiven (Beybi)

### 3.1.5. Hazırlanan Besiyerleri ve Solüsyonlar

#### **Mueller Hinton sıvı besiyerinin hazırlanışı**

22 gram toz besiyeri tartılıp 1 lt distile su ile karıştırılıp 121 °C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

#### **Mueller Hinton Agar besiyerinin hazırlanışı**

38 gram toz besiyeri tartılıp 1 lt distile su ile karıştırılmıştır. 121 °C'de 15 dakika steril edilmiş ve 9 cm'lik petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

#### **Mac Conkey Agar besiyerinin hazırlanışı**

51,5 gram besiyeri 1 lt distile su ile karıştırılmış, 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir. 9 cm'lik petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

### **Skimmilk**

100 gram toz besiyeri, 1 lt distile su ile karıştırılıp, 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek hazırlanmıştır.

### **TBE Tampon ( 10X, Stok Solüsyon)**

Tris Base.....	121, 10 gram
Borik Asit.....	61, 83 gram
EDTA.....	5, 84 gram
Distile su.....	1000 ml

Sodyum hidroksit ile pH 8’ e ayarlanmıştır.

### **3.2. Araçlar ve Aygıtlar**

- Etüv (Memert)
- Pasteur fırını (Memert)
- Otoklav (Hirayama)
- Buzdolabı (Arçelik)
- ( - 20 °C ) Dondurucu (Uğur)
- ( - 80 °C ) Dondurucu (iShin)
- Steril plastik petripler
- Hassas terazi (Sartorius)
- Vorteks (Yellowline)
- Steril pamuklu çubuklar
- Termal Döngü Cihazı (Techne, BIO-RAD)
- Elektroforez tankı ve cihazı (Biometra)
- Mikrodalga fırın (Beko)
- UV görüntüleyici (Vilber Lourmant)
- Santrifüjler ( Hettich)
- Otoklav (Hirayama)
- Cam balonlar, otomatik pipetler

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1 Kökenlerin Seçimi

Çalışmamıza, 2009-2010 yılları içinde Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı' na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 adet GSBL(+) ve 100 adet GSBL(-) *E. coli* kökeni dahil edilmiştir.

Klinik örneklerin besiyerlerine ekilip patojen mikroorganizma üretilmesinden sonra identifikasyon ve duyarlılık testleri için laboratuvarında rutin olarak kullanılan VITEK 2 otomatize tanı ve duyarlılık sistemi kullanılmıştır.

Bu kökenlerin seçiminde: VITEK 2 cihazının, amikasin aminoglikozid antibiyotiği duyarlılık ve MİK sonuçları dikkate alınmıştır. Cihaz kartlarında yalnızca aminoglikozid antibiyotiklerden amikasin substratı bulunmaktadır. Amikasin için cihazın, duyarlı aralıkta olan; 4, 8 ve 16 µg/ml değerlerde MİK sonuçlarını AES aracılığı ile orta duyarlı gösterip tobramisin, netilmisin ve amikasin için AAC(6') enzimiyle direnç gelişebileceği uyarısını verdiği kökenler seçilmiştir. Bu kökenlere ait AES değerlendirme sonrası laboratuvar raporu çıktı örnekleri Resim 1 ve 2'de sunulmuştur.

Laboratuvarımızda, klinik örneklerden izole edilen bakteri kökenleri -70 °C'de Skimmilk içinde saklanmıştır.

bioMerieux Customer: 11  
System #: V2-1

## Laboratory Report

Printed Feb 22, 2010 16:08 CST  
Printed by: rat

Patient Name:  
Isolate Group: 326303-1

Patient ID: DSIZ5000192

Bionumber: 0005610550526611  
Selected Organism: Escherichia coli

Susceptibility Information		Card: AST-N091	Lot Number: 391156110	Expires: Mar 24, 2011 13:00 CDT	
		Completed: Feb 17, 2010 22:31 CST	Status: Final	Analysis Time: 6.00 hours	
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
ESBL	NEG	-	Ceftriaxone	<= 1	S
Ampicillin	4	S	Cefepime	<= 1	S
Amoxicillin/Clavulanic Acid	4	S	Ertapenem	<= 0.5	S
+Piperacillin		S	Imipenem	<= 1	S
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Meropenem	<= 0.25	S
Cefazolin	<= 4	S	Amikacin	4	*I
Cefuroxime	4	S	Gentamicin	2	S
Cefuroxime Axetil	4	S	Levofloxacin	<= 0.12	S
Cefoxitin	<= 4	S	Tigecycline	<= 0.5	S
Ceftazidime	<= 1	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R

+ = Deduced drug \* = AES modified \*\* = User modified

AES Findings:		Last Modified: Feb 2, 2010 18:21 CST	Parameter Set: Global+Phenotypic 2009
Confidence Level:	Consistent		
Phenotype:	AMINOGLYCOSIDES RESISTANT TOB NET AMI (AAC(6'))		

Resim 1. GSBL(-) ve birçok antibiyotiğe duyarlı *E. coli* kökeninin VITEK 2 laboratuvar raporu çıktı örneği.

bioMerieux Customer: 11  
System #: V2-1

## Laboratory Report

Printed Feb 22, 2010 13:18 CST  
Printed by: rat

Patient Name:  
Isolate Group: 313720-1

Patient ID: 962601

Bionumber: 0405610450106611  
Selected Organism: *Escherichia coli*

Susceptibility Information	Card:	AST-N092	Lot Number:	392110410	Expires:	Dec 22, 2009 12:00 CST
	Completed:	Nov 15, 2009 01:16 CST	Status:	Final	Analysis Time:	8.25 hours
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation	
ESBL	POS	+	Ertapenem	<= 0.5	S	
Ampicillin	>= 32	R	Imipenem	<= 1	S	
Amoxicillin/Clavulanic Acid	>= 32	R	Meropenem	<= 0.25	S	
+Piperacillin		R	Amikacin	4	*I	
+Piperacillin/Tazobactam			Gentamicin	>= 16	R	
+Cefazolin		R	+Tobramycin			
Cefuroxime	>= 64	R	Ciprofloxacin	2	I	
Cefuroxime Acetil	>= 64	R	Levofloxacin	2	S	
Cefoxitin	32	R	Fosfomycin	<= 16	S	
Ceftazidime	<= 1	*R	Nitrofurantoin	32	S	
Ceftriaxone	>= 64	R	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R	
Cefepime	32	R				

+ = Deduced drug \* = AES modified \*\* = User modified

AES Findings:		Last Modified: Oct 22, 2009 16:10 CDT		Parameter Set: Global+Phenotypic 2009	
Confidence Level:	Consistent				
Phenotype:	BETA-LACTAMS	ESBL (CTX-M LIKE)			
	AMINOGLYCOSIDES	RESISTANT GEN TOB NET AMI (AAC(6)*?)			

Resim 2. GSBL(+) ve birçok antibiyotiğe dirençli *E. coli* kökeninin VITEK 2 laboratuvar raporu çıktı örneği.

### **3.3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

VITEK 2 otomatize sistemi amikasin MİK sonuçlarına göre seçtiğimiz 200 adet kökene tobramisin, netilmisin ve amikasin aminoglikozid antibiyotiklerine duyarlılıklarını belirlemek üzere laboratuvarımızda kullandığımız referans bir yöntem olan disk difüzyon testleri yapılmıştır. Kökenlerin disk difüzyon testi duyarlılık sonuçları yanı sıra VITEK 2 sisteminin kinolon grubu antibiyotikler için vermiş olduğu duyarlılık sonuçları da incelenmiştir. (Levofloksasin ve/veya siprofloksasin).

#### **3.3.2.1. Disk Difüzyon Testi**

Antibiyotik duyarlılık testleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapılmıştır. Mac Conkey agar besiyerinde üremiş kolonilerden steril pamuklu çubukla alınarak Mueller-Hinton sıvı besiyerine karıştırılmıştır. Süspansiyon bulanıklığı 0.5 McFarland standardına ulaştıktan sonra pamuklu çubuk, Mueller-Hinton agarın tüm yüzeyine sürülerek inokulum yayılmıştır. Antibiyotik diskleri (Oxoid) yerleştirilerek, petri plakları 16-18 saat inkübe edilmek üzere 35±2 °C' lik etüve kaldırılmıştır. İnkübasyondan sonra plaklardaki inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve sonuçlar CLSI'nın önerdiği yorumlama kriterlerine göre değerlendirilmiştir (29). Kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır.

### **3.3.3. *Escherichia coli*'lerin Genotiplendirilmesi**

#### **3.3.3.1. DNA İzolasyonu**

Stoktan çözülen kökenlerin ikinci pasajları yapıldıktan sonra ısıtma yöntemiyle DNA'ları elde edilmiştir. Küçük ependorflar içinde, 250 µl DNaz, RNaz içermeyen enjeksiyonluk suda bakteriden alınan 5- 6 koloni süspanse edilmiş, daha sonra ısı bloğunda 95 °C'de 20 dakika ısıtılarak 2 dakika en yüksek devirde santrifüjlenmiştir. Üst kısımda kalan sıvı DNA amplifikasyonu için -20 °C'de saklanmıştır.

### 3.3.3.2. PZR Yöntemi

Bakteri DNA'ları izole edildikten sonra uygun primer seti (Tablo 2) kullanılarak tobramisin, netilmisin ve amikasin direncine sebep olan aac(6')-I geni amplifiye edilmiştir.

Bunun için:

PZR karışımı.....12,5 µl

Primer (Forward).....1,5 µl

Primer (Reverse).....1,5 µl

H<sub>2</sub>O..... 7 µl

karıştırılmış ve üzerine 2,5µl bakteri DNA' sı eklenerek termal döngü cihazında çalışılmıştır.

Tablo 2. PZR' de kullanılan primer seti\*

Primer	Primer Dizisi (5'-3')
aac(6')-I (F)	CGCGCGGATCCCACACTGCGCCTCATGA
aac(6')-I (R)	GACGGGTCGTTTGAATTCTGGTG

\*30 no'lu kaynaktan alınmıştır.

Tablo 3. PZR Koşulları\*

Primer	Döngü Koşulları
aac(6')-I (F) aac(6')-I (R)	94 °C 10 dk 1 döngü
	94 °C 45 sn
	55 °C 45 sn } 34 döngü
	72 °C 45 sn }
	72 °C 10 dk 1 döngü

\*30 no' lu kaynaktan alınmıştır.

PZR ürünleri %1,5'luk agaroz jelde 60 volt akımda 1 saat yürütülmüş ve oluşan bantlar UV ışığı altında incelenmiştir. Gözlenen bantlar kontrol köken bantlarıyla kıyaslanmıştır.

#### **3.3.4. İstatistiksel Değerlendirme**

Çalışmamızın veri analizinde Instat istatistik yazılım programı kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılığı ile direnç genine sahip olma arasındaki ilişki Fischer's Exact iki örnekli testi ile değerlendirilmiştir.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2009 ve 2010 yılları içerisinde gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 100'er adet GSBL (+) ve GSBL (-) olmak üzere toplamda 200 adet *E. coli* kökeni çalışmaya alınmıştır. Bu kökenlerin seçiminde bölüm 3.3.1.'de bahsedilen kriterler dikkate alınmıştır.

### 4.1. Fenotipik Sonuçlar

VITEK 2 otomatize sistemi ile tanımlanan *E. coli* kökenlerine aminoglikozid grubu antibiyotiklerinden tobramisin, netilmisin ve amikasin kullanılarak disk difüzyon testi yapılmış, duyarlılıkları belirlenmiştir.

VITEK 2 sistemi amikasin MİK sonuçlarına göre duyarlı aralıkta bulunan kökenlerimiz disk difüzyon test sonuçlarına göre de duyarlı bulunmuş olup tobramisin %63.5 direnç oranıyla en çok direnç gözlenen aminoglikozid olarak karşımıza çıkmıştır. Özellikle GSBL(+) kökenlerde tobramisin direnci %87 gibi oldukça yüksek bir değerde saptanmıştır. GSBL(-) olanlarda ise bu oran %40 olarak bulunmuştur. Test ettiğimiz bir diğer aminoglikozid olan netilmisine ise tüm kökenlerimizde %14.5 gibi düşük bir direnç söz konusudur.

AAC(6') enziminin önemli bir substratı olan tobramisine karşı saptadığımız direnç amikasin MİK değerleri ile karşılaştırmalı olarak irdelendiğinde;  
-4 µg/ml amikasin MİK değerine sahip 85 kökenin %34.1'i tobramisine dirençli,  
-8 µg/ml amikasin MİK değerine sahip 58 kökenin %69'u tobramisine dirençli,  
-16 µg/ml amikasin MİK değerine sahip 57 kökenin %91.2'sinin tobramisine dirençli olduğu saptanmıştır.

Özetle; amikasin MİK değeri arttıkça tobramisine dirençli saptadığımız köken sayısı dikkat çekici bir şekilde artmaktadır (Tablo 4).

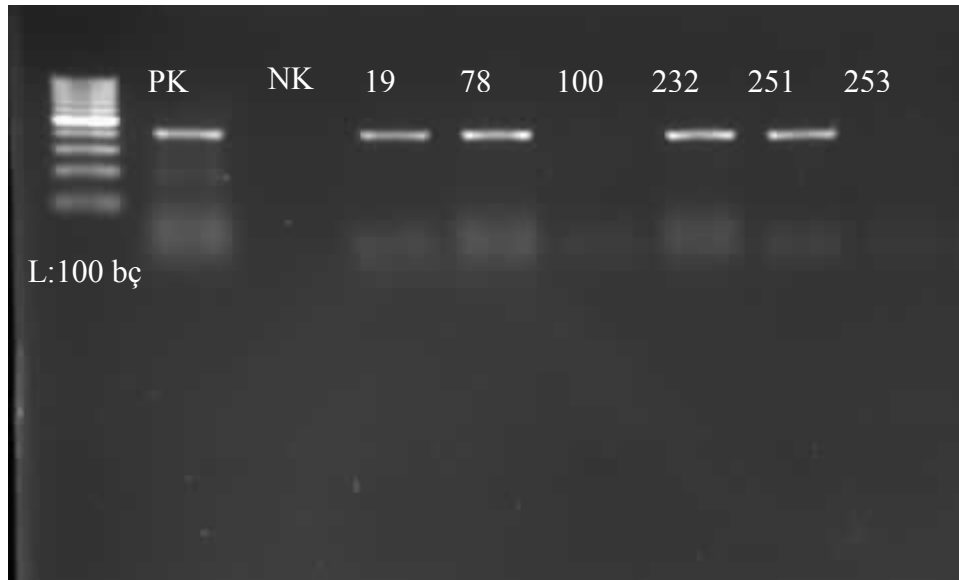
Tablo 4. Amikasin MİK ve tobramisin disk difüzyon testi sonuçları

	<b>Amikasin MİK</b>			Toplam (n)
	<b>4 µg/ml n(%)</b>	<b>8 µg/ml n(%)</b>	<b>16 µg/ml n(%)</b>	
<b>TOB(R)</b>	29 (34.1)	40 (69)	52 (91.2)	121
<b>TOB(S)</b>	56 (65.9)	18 (31)	5 (8.8)	79
Toplam (n)	85 (100)	58 (100)	57 (100)	200

TOB: Tobramisin, R: Dirençli,S: Duyarlı.

#### 4.2. Genotipik Sonuçlar ve Fenotipik Sonuçlarla İlişkisi

Çalışmaya alınan kökenlerin %56'sında aac(6')-I geni saptanmış; GSBL(+) kökenlerde bu oran %73, GSBL(-) kökenlerde ise %39 olarak bulunmuştur (Tablo 5, Resim 3).



Resim 3. aac(6')-I direnç genine sahip olan kökenlerin agaroz jeldeki görüntüleri.

L: 100 baz çiftlik belirteç, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol, 19-78-100-232-251-253: Hasta kökenleri.

Kökenlerin tobramisin direnci ve aac(6')-I geni taşıma arasındaki ilişki irdelendiğinde (Tablo 5); tobramisine dirençli bulunan kökenlerin %85'inde direnç geni saptanırken tobramisine duyarlı olanların %94.5 gibi büyük kısmında direnç geni tespit edilmemiştir. Tobramisin direnci ve aac(6')-I direnç geni arasındaki anlamlı ilişki ( $p<0.0001$ ) GSBL üreten ve üretmeyen kökenlerde dikkat çekebilecek oranda fark göstermemektedir.

Tablo 5. Kökenlerde tobramisin duyarlılık ve aac(6')-I direnç geni taşıma oranları

	<b>aac(6')-I (+)</b> n(%)	<b>aac(6')-I (-)</b> n(%)	Toplam n(%)
<b>TOB(R)</b>	108 (85)	19 (15)	127 (100)
<b>TOB(S)</b>	4 (5.5)	69 (94.5)	73(100)
Toplam	112 (56)	88 (44)	200 (100)

(+): Pozitif, (-): Negatif, TOB: Tobramisin, R: Dirençli, S: Duyarlı.

Tablo 5 bir başka açıdan değerlendirildiğinde; direnç geni taşıyan kökenlerin (n:112) %96.4'ü tobramisin dirençli iken gen taşımayanların (n:88) sadece %21.6'sında tobramisine direnç saptanmıştır.

Artan amikasin MİK değerleri ile aac(6')-I geni taşıma arasındaki ilişki Tablo 6'da irdelenmiştir. Amikasin MİK değeri 4 µg/ml olan 85 kökenin %30.6'sı direnç geni taşıırken; 8 ve 16 µg/ml MİK değerine sahip kökenlerde bu oran sırasıyla %63.8 ve %86'dır. Bu sonuçlara göre; artan MİK değerleriyle birlikte aac(6')-I direnç genini taşıyan köken sayısındaki artış dikkat çekicidir.

Tablo 6. Amikasin MİK sonuçları ve aac(6')-I varlığı arasındaki ilişki

	<b>Amikasin MİK (µg/ml)</b>			Toplam (n)
	<b>4 µg/ml n(%)</b>	<b>8 µg/ml n(%)</b>	<b>16 µg/ml n(%)</b>	
<b>aac(6')-I (+)</b>	26 (30.6)	37 (63.8)	49 (86)	112
<b>aac(6')-I (-)</b>	59 (69.4)	21 (36.2)	8 (14)	88
Toplam (n)	85 (100)	58 (100)	57 (100)	200

(+): Pozitif, (-): Negatif, R: Dirençli, S: Duyarlı.

Gen pozitifliği ve amikasin MİK değerleri arasındaki ilişkiye GSBL üretiminin katkısı olup olmadığı irdelendiğinde; GSBL(+) kökenlerde aac(6')-I geni varlığı GSBL(-) olanlara kıyasla amikasin MİK'i 4 µg/ml olanlarda 3 kat daha fazla bulunurken MİK'i 8 µg/ml olan GSBL(+) kökenlerde %82.7 olan direnç geni pozitifliği GSBL(-) olanlarda %44.8 olarak bulunmuş, MİK'i 16 µg/ml olanlarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 7).

Tablo 7. Gen pozitifliğinin GSBL(+) ve GSBL(-)'lerde amikasin MİK değerlerine göre dağılımı

	<b>4 µg/ml</b>			<b>8 µg/ml</b>			<b>16 µg/ml</b>		
	aac(6')-I(+)	Toplam	%	aac(6')-I(+)	Toplam	%	aac(6')-I(+)	Toplam	%
<b>GSBL(+)</b>	18	37	48.6	24	29	82.7	31	34	91.2
<b>GSBL(-)</b>	8	48	16.6	13	29	44.8	18	23	78.3
p değeri	p=0.002			p=0.0056			p>0.05		

Tablo 5’te verilen tobramisin direnci ile direnç geni taşıma arasındaki ilişkiye amikasin MİK değerlerinin katkısı olup olmadığı araştırılmış ve MİK değeri yükselmesi ile birlikte tobramisine de dirençli olan kökenlerde direnç geni varlığının da arttığı görülmüştür (Tablo 8-10).

Tablo 8. MİK değeri 4 µg/ml olan kökenlerin tobramisin duyarlılığı ile aac(6’)-I geni varlığı arasındaki ilişki

<b>Amikasin MİK:4 µg/ml</b>			
	aac(6’)-I (+) n(%)	aac(6’)-I (-) n(%)	Toplam n(%)
<b>TOB(R)</b>	23 (79.3)	6 (20.7)	29 (100)
<b>TOB(S)</b>	3 (5.3)	53 (94.7)	56 (100)
Toplam n(%)	26 (30.6)	59 (69.4)	85(100)

TOB: Tobramisin, S: duyarlı, R: dirençli, (+):pozitif, (-): negatif.

Amikasin MİK’i 4 µg/ml olan kökenler %30.6 oranında direnç genine sahipken (Tablo 6) bu kökenler tobramisine de dirençli iseler direnç geni taşıma oranı %79.3’e çıkmaktadır (Tablo 8).

MİK değeri 8 µg/ml olan kökenlere baktığımızda MİK’i 4 µg/ml olanlara benzer şekilde, aac(6’)-I genine sahip olma oranı %63.8’den tobramisine dirençli olan kökenlerde %92.5’e yükselmiştir (Tablo 9). (p<0.001)

Tablo 9. MİK değeri 8 µg/ml olan kökenlerin tobramisin duyarlılığı ile aac(6')-I geni varlığı arasındaki ilişki

<b>Amikasin MİK:8 µg/ml</b>			
	aac(6')-I (+) n(%)	aac(6')-I (-) n(%)	Toplam n(%)
TOB(R)	37 (92.5)	3 (7.5)	40 (100)
TOB(S)	0	18 (100)	18 (100)
Toplam n(%)	37 (63.8)	21 (36.2)	58 (100)

TOB: Tobramisin, S: duyarlı, R: dirençli, (+):pozitif, (-): negatif.

Halbuki; MİK değeri 16 µg/ml olan kökenlerde (n:57) toplamda %86 olan gen pozitiflik oranı tobramisine dirençli kökenlerde %92.3'e yükselmiş olmakla birlikte bu artış istatistiksel bir anlam ifade etmemiştir. (p>0.05)

Tablo 10. MİK değeri 16 µg/ml olan kökenlerin tobramisin duyarlılığı ile aac(6')-I geni varlığı arasındaki ilişki

<b>Amikasin MİK: 16 µg/ml</b>			
	aac(6')-I (+) n(%)	aac(6')-I (-) n(%)	Toplam n(%)
TOB(R)	48 (92.3)	4 (7.7)	52 (100)
TOB(S)	1 (20)	4 (80)	5 (100)
Toplam n(%)	49 (86)	8 (14)	57 (100)

TOB: Tobramisin, S: duyarlı, R: dirençli, (+):pozitif, (-): negatif.

Kökenlerin VITEK 2 otomatize sisteminde aminoglikozid antibiyotikler yanı sıra kinolon grubu antibiyotiklere duyarlılık sonuçları da incelenmiş ve kökenlerin %61.5

gibi büyük bir bölümünde kinolonlara direnç saptanmıştır. Kinolonlara dirençte bütün kökenler için saptanmış olan bu oran, GSBL(+)'lerde %73, GSBL(-)'lerde ise %50 olarak bulunmuş olmakla birlikte GSBL üretiminin kinolon direncine istatistiksel olarak ( $p > 0.05$ ) anlamlı bir katkısı olmamıştır (Tablo11).

Tablo 11. Kinolon duyarlılığı ile GSBL ilişkisi

	<b>Kinolon (R)</b> n(%)	<b>Kinolon (S)</b> n(%)	Toplam (n)
<b>GSBL(+)</b>	73 (73)	27 (27)	100
<b>GSBL(-)</b>	50 (50)	50 (50)	100
Toplam n(%)	123 (61.5)	77 (38.5)	200

S: duyarlı, R: dirençli, (+):pozitif, (-): negatif.

\*Kinolon duyarlılık oranları siprofloksasin ve/veya levofloksasin duyarlılığına göre belirlenmiştir.

Buna karşın; Tablo 12'de görüldüğü gibi aac(6')-I direnç genine sahip kökenlerin (n:112) %86.6'sında kinolon direnci saptanmış, gen taşımayan kökenlerdeki kinolon direnci % 29.5 ile sınırlı kalmıştır ( $p < 0.0001$ ) Direnç genine sahip kökenlerin GSBL negatif ve GSBL pozitiflik durumlarına göre kinolon direnci irdelendiğinde direnç oranlarının sırasıyla %92.3 ve %83.6 olduğu gözlenmiş ve bu kökenlerde GSBL pozitifliğinin kinolon direnci üzerinde anlamlı bir katkısı olmadığı saptanmıştır. ( $p > 0.05$ )

Tablo 12. Kinolon duyarlılık oranlarının aac(6')-I geniyle ilişkisi

	<b>aac(6')-I (+)</b> n(%)	<b>aac(6')-I (-)</b> n(%)	Toplam n(%)
<b>Kinolon (R)</b>	97 (86.6)	26 (29.5)	123 (61.5)
<b>Kinolon (S)</b>	15 (13.4)	62 (70.5)	77 (38.5)
Toplam n(%)	112 (100)	88 (100)	200 (100)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç gelişimi sorunu, ülkemizde olduğu gibi tüm dünyada enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde güçlükler neden olmaktadır. Son yıllarda birçok antibiyotik direnç mekanizmasının birlikteliği ile klinikte kullanılan tüm antibiyotiklere dirençli bakterilere rastlanmaktadır. Özellikle direnç genlerinin plazmitler ile aktarılabilir olması ve bu plazmitler üzerinde çok sayıda antibiyotik direnç geninin bir arada bulunabilmesi, direncin hızla yayılması yanında, birçok antibiyotiği de klinik kullanımdan mahrum bırakmıştır (31).

Gram negatif bakterilerin etken olduğu gerek hastane gerekse toplum kökenli enfeksiyonların tedavisinde daha çok beta-laktam antibiyotiklerle birlikte kombine antibiyoterapide tercih edilen aminoglikozid grubu antibiyotiklerin yaygın kullanımına bağlı olarak bakterilerin ürettiği modifiye edici enzimler aracılığıyla bu antibiyotiklere direnç gelişmekte ve tedavide başarısızlıkla karşılaşmaktadır.

Aminoglikozid antibiyotiklere direncin sıklığı hem bu ilaçların kullanımına hem de belirli enzimleri kodlayan genlerin sıklığına bağlıdır. Örneğin gentamisin ve türevlerinin amikasinin daha sık kullanıldığı yerlerde en sık gözlenen enzimler ANT(2'') ve AAC(3)'tür. Amikasinin yaygın olarak kullanıldığı Uzak Doğu ülkelerinde ise en sık olarak AAC(6') enzimi bulunmaktadır. Belirli aminoglikozid antibiyotiklerin kullanımı sonucu oluşan seleksiyon baskısı, bunları inaktive eden enzimleri kodlayan genlerin ortaya çıkışına ve yayılımına yol açmaktadır. New York Veterans Administration Medical Center'da amikasin kullanımının üç kat artışı ile birlikte 18 ay içerisinde amikasin direncinin AAC(6')'ya bağlı olarak %2'den %7'nin üzerine çıktığı saptanmıştır (32). Buna benzer bir durum Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde gözlenmiştir. Akalın ve Lolans 1983 yılında yaptıkları çalışmada Illinois ve Hacettepe Üniversitesi hastanelerinde izole edilen *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* suşlarında aminoglikozidleri modifiye eden enzimleri tanımlamışlardır. Her iki hastanede en sık saptanan enzim ANT(2'') olmuştur. Hacettepe izolatlarında %10.7 oranında saptanan AAC(6')-II enzimi ve %28.5 oranında gözlenen AAC(3)-II enzimi Illinois izolatlarında saptanmamıştır. Bu

durum antibiyotik kullanımına bağlı seleksiyon baskısının iki hastanede farklı oluşuyla ilişkilendirilmiştir (33).

Yunanistan'da 2003 yılında yayınlanan bir çalışmada 8 yıl periyodunda hastanelerinde izole ettikleri Enterobacteriaceae üyesi dört türde aminoglikozid direnç fenotiplerini araştırmışlar; *Enterobacter spp.* ve *Klebsiella spp.* kökenleri için sırasıyla %66.7 ve %46.5 oranlarında AAC(6')-I enzimine sahip olduklarını bulmuşlardır. Yüksek orandaki AAC(6')-I tespit etmelerini, bu enzimin substratı olan amikasin hastanelerinde %72 gibi büyük oranda kullanmalarına bağlamışlardır (34). Benzer şekilde başka bir çalışmada; İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen 50 gram(-) çomağın 22'sinde amikasin modifiye eden AAC(6')-IV ve AAC(6')-I enzimleri sık olarak saptanmıştır. AAC(6')-I'in Türkiye'de artış gösterdiği ve bunun da gentamisin direncinin artışı nedeniyle tedavide amikasinin tercih edilmesine bağlı olduğu ileri sürülmektedir (35). Bizim çalışma kökenlerimizde ise bu enzimin bir diğer substratı olan tobramisine bağlı direnç söz konusudur.

Direnç mekanizmalarıyla ilgili Türkiye'de yapılan ilk çalışmalarda gram negatif bakterilerde aminoglikozidlere direncin düşük oranlarda ve dirençten tek mekanizmanın sorumlu olduğu bulunmuştur. Akalın ve ark.'nın 1985 yılındaki çalışmalarında en yaygın olarak: gentamisin ve tobramisin direncine yol açan ANT(2'')-I ve AAC(3)-I ile gentamisin, tobramisin ve netilmisin direncine yol açan AAC(3)-II enzimlerini saptamışlardır (36). Aynı yıllarda Amerika'da Enterobacteriaceae için ANT(2'')-I, Japonya'da AAC(6')-I ve Avrupa'da AAC(3)-II en sık rastlanan ve Türkiye'deki gibi çoğunlukla tek olarak bulunan direnç mekanizmaları olarak belirlenmiştir (37,38). Kombine direnç mekanizmalarının yaygınlaştığı 1980'li yıllarda, Amerika ve Avrupa'da en çok görülen ve gentamisin, tobramisin, netilmisin ve amikasin direncine sebep olan AAC(3)-II+AAC(6')-I kombine direnç mekanizmasına yenileri eklenmeye başlamıştır. 1988 ve 1993 yılları arasında Güney Amerika, Yunanistan ve Türkiye'de kombine direnç mekanizmalarında artışlar olmuş ancak Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde sınırlı kalmıştır (39).

Türkiye'nin değişik coğrafik bölgelerindeki 15 merkezde izole edilen ve klinik kullanımdaki aminoglikozidlerden (gentamisin, tobramisin, netilmisin, amikasin) en az birine dirençli olan 585 gram negatif bakterinin direnç mekanizmalarının araştırıldığı çalışmada; daha önceki çalışmalarda belirlenen AAC(3)-II, AAC(6')-I, ANT(2'')-I modifiye edici enzimlerinin varlığını halen koruduğu belirlenmiştir. Bunlara ek olarak ülkemiz izolatlarında tobramisin, netilmisin, amikasin ve izepamisin direncine yol açan AAC(6')-III ile gentamisin, tobramisin, netilmisin ve amikasin direncine sebep olan AAC(6')-IV enzimleri tespit edilmiştir. AAC(6')-III, Enterobacteriaceae'de (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*) %11.9, *Pseudomonas spp.*'de ise %19.3 oranında bulunmuştur. AAC(6')-IV enzimi Enterobacteriaceae'de %26.9 oranında bulunurken *Pseudomonas spp.*'de saptanmamıştır. Bu çalışmadaki izolatlarda AAC(6')-IV enzimi dışında diğer direnç mekanizmaları çoğunlukla birbirleriyle ya da az görülen aminoglikozid direnç mekanizmalarıyla kombine biçimde bulunmaktadır. Direnç mekanizmalarının kombine halde bulunma insidansı Enterobacteriaceae ve *Pseudomonas spp.*'de sırasıyla %48 ve %58.7 olarak belirlenmiştir. En sık saptanan direnç mekanizmaları prevalansı, bakteri cinslerine göre farklılık göstermiş, AAC(3)-I, AAC(6')-II ve permeabilite direncine *Pseudomonas spp.*'de sık rastlanırken diğerlerinde çok düşük oranlarda ya da hiç rastlanmamıştır. *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* ve *E. coli*' de yaygın görülen AAC(3)-II, AAC(6')-I, AAC(6')-IV, *Pseudomonas spp.*'de saptanmamış veya çok düşük oranlarda saptanmıştır (40).

Leblebicioğlu ve ark. çalışmalarında disk difüzyon metoduyla aminoglikozid (amikasin, netilmisin, gentamisin, tobramisin) antibiyotiklerden herhangi birisine karşı dirençli olduğu saptanan gram negatif 50 suşu direnç mekanizmaları açısından değerlendirmeye almışlar ve en sık gözlenen direnç paternini ise ANT(2'')+AAC(6')-I enzimlerinin birlikteliği olarak bulmuşlardır (%40). En sık rastlanan enzimler olarak ANT(2'') (%54) ve AAC(6')-I (%72)'i saptamışlardır (20).

Ülkemizde yapılmış aminoglikozid direnç mekanizmaları araştırmalarında sıklıkla tespit edilen AAC(6')-I enzimi çalışma kökenlerimizde de yüksek oranda saptanmıştır.

Güney Kore’de 2008 yılında Kim ve ark. yaptıkları bir çalışmada, 55 adet amikasin dirençli *Pseudomonas aeruginosa* kökeninin 48’inde (%87.3) aph(3’)-VI, ant(2’)-I, aac(6’)-I ve aac(3)-II/VI direnç genlerini saptamışlardır. Bu 48 izolatın 36’sının iki ya da daha fazla direnç genine sahip olduğu, bunlarda da aph(3’)-VI + ant(2’)-I (%66.7) ve aph(3’)-VI+aac(6’)-I (%16.7) kombine direnç mekanizmalarının bulunduğu belirlenmiştir. 37 izolatta bulunan aph(3’)-VI geni en sık gözlenen direnç geni olmuştur (30).

Aminoglikozid direnç oranlarının oldukça düşük olduğu Belçika’da 1102 gram negatif bakteri ile yapılmış çok merkezli bir çalışmada 157 izolatın aminoglikozidlere dirençli olduğu ve bunlarda %8.3 oranında aac(6’) direnç genleri en sık görülmekle beraber bunu takiben aac(3) genleri (%3.4) ve permeabilite direnci (%2.6) geldiği tespit edilmiştir. aac(6’)-Ib geni ise %4.4 oranıyla en sık saptanan aminoglikozid modifiye edici gen olarak bulunmuştur (41).

Ploy ve ark. 62 adet *Acinetobacter spp.* suşunda PZR ve DNA hibridizasyon yöntemleriyle aac(6’)-I gen varlığını araştırmışlar, iki yöntemde de benzer sonuçlar elde etmişlerdir. 51 *A. baumannii* suşunun 19’unda aac(6’)-Ib, 32’sinde aac(6’)-Ih genlerini tespit ederken, 10 adet *A. haemolyticus* suşunun hepsinde aac(6’)-Ig genini tespit etmişlerdir (42).

Aminoglikozid direnç mekanizmalarının araştırıldığı bahsettiğimiz çalışmalara bakıldığında direnç oranlarının; coğrafik bölgeye, hatta ülkeden ülkeye farklılık gösterdiği tespitinde bulunulmuştur.

Hastane laboratuvarlarında otomatize sistemler, özellikle gram negatif enterik bakterilerin, gerek identifikasyon gerek antibiyotik duyarlılık testleri amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Hastanemizde kullandığımız VITEK 2 sisteminin vermiş olduğu duyarlılık sonuçları uzman yazılımı sayesinde (AES) direnç mekanizmaları hakkında kullanıcıya uyarı vermektedir. Bu uyarıların ne kadar isabetli olduğuna dair literatürde çeşitli çalışmalar yer almaktadır. Blondel-Hill ve ark.’nın çalışmasında

300 adet Enterobacteriaceae klinik izolatının 10 antibiyotik için dondurulmuş sıvı mikrodilüsyon duyarlılık sonuçlarıyla VITEK 2 AES yorumlamaları arasındaki uyum %96.2 gibi yüksek bir oranda bulunmuş, aminoglikozid grubu antibiyotikler (tobramisin, netilmisin) ayrıca irdelendiğinde ise 86 *E. coli* kökeninin birinde ve üç adet *Providencia stuartii* kökeninin ikisinde duyarlılık sonuçları arasında uyumsuzluk görülmüştür (25).

2002 yılında yapılmış çok merkezli bir çalışmada Enterobacteriaceae üyesi bakterilerin antibiyotik direnç mekanizmalarına ilişkin referans genotipik verileriyle AES yorumlamaları arasındaki uyum incelendiğinde; kinolon direncini saptamada %98,  $\beta$ -laktamaz varlığını saptamada %83.7 oranlarında uyum gözlenirken aminoglikozid modifiye edici enzimlerde bu oran %24.2'ye düşmüştür. Kısmi uyum oranı %63.7 iken %12.1 uyumsuzluk saptanmıştır. GSBL üretenler ile de %92 oranında uyum gösterdiğini belirlemişlerdir (28).

Gram negatif çomakların, VITEK 2 cihazının saptamış olduğu aminoglikozid direnç fenotipleriyle AES'in yorumlamaları arasında %97.6 oranında büyük bir uyum gözlenirken kinolonlar ve  $\beta$ -laktam fenotiplerinde de %90'ın üzerinde uyum saptamışlardır (26).

Barry ve ark. 2003 yılında yayınlanan çalışmalarında; Gram negatif basillerin sahip olduğu çeşitli antibiyotik direnç mekanizmalarının, uzman sistemin yaptığı fenotipik yorumla %68.2 oranında uyum gösterdiğini saptamışlardır. Aminoglikozid direnç enzimlerine sahip dört kökenin ikisi için VITEK 2 AES direnç yorumu yapmıştır. Kinolon dirençli altı adet *E. coli* kökeninin beşinde de doğru direnç uyarısı vermiştir (27).

Literatürdeki bu verilere katkı sağlamak amacıyla yaptığımız çalışmamızda; amikasin duyarlı olup, VITEK 2 otomatize sisteminin AES düzeltmesi ile amikasin duyarlılığı 'orta' kategorisine çevrilen 200 kökenin 112'sinde (%56) aac(6')-I geni saptanmıştır. Bu kökenlerin AAC(6')-I enziminin önemli bir substratı olan tobramisine direnç oranları ise toplamda %63.5 olup GSBL(+) kökenlerde %87,

GSBL(-) kökenlerde ise %40 olarak belirlenmiştir. Genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar plazmitler aracılığı ile aktarılırken beraberinde diğer antimikrobiyal direnç genlerini de aktarabilmektedirler. Bu aminoglikozid modifiye edici enzimi kodlayan genin pozitiflik oranlarının da GSBL(+)’lerde %73, GSBL(-)’lerde %39 olması,  $\beta$ -laktamaz ve aminoglikozid modifiye edici enzimleri kodlayan plazmitlerin birlikte aktarıldığını doğrular niteliktedir.

Birçok hastanede olduğu gibi hastanemizde de amikasin, kombine tedavilerde ilk tercih edilen ve sıklıkla kullanılan bir aminoglikozidtir ve hastanemizde son bir yılda izole edilen *E. coli* kökenlerinde; amikasine yaklaşık %0.7 oranında oldukça düşük bir direnç söz konusudur. Ancak rutinde kullanılan VITEK 2 otomatize sistemi amikasin MİK değeri duyarlı aralıkta olmasına karşın bu sonucu AES ile orta duyarlıya çevirmekte ve AAC(6<sup>3</sup>) enzimiyle tobramisin, netilmisin ve amikasine direnç gelişebileceği uyarısı vermektedir. Bu fenotipik sonucun genotipi ne kadar yansıttığı açık değildir. AAC(6<sup>3</sup>) enziminin substratları olan tobramisin ve netilmisin VITEK 2 cihazı panelinde yer almamasına, amikasin MİK değeri duyarlı olmasına rağmen cihazın AES’inin neden direnç uyarısı verdiğini saptamak ve bu direnç mekanizmasının genotipik temelini araştırmak üzere bu çalışma planlanmıştır.

Kökenlerimizin diğer bir test edilen aminoglikozid olan netilmisine de büyük oranda duyarlı bulunması sebebiyle VITEK 2 AES’in verdiği direnç uyarısının tobramisin direnci kaynaklı olduğu düşünülmüştür. AAC(6<sup>3</sup>) enziminin önemli bir substratı olan tobramisine karşı saptadığımız direnci amikasin MİK değerleri ile karşılaştırmalı olarak irdelediğimizde; amikasin MİK değerlerinin artmasıyla tobramisine dirençli saptanan köken sayısının da arttığı belirlenmiştir.

Aminoglikozid direncine sıklıkla sebep olan aac(6<sup>3</sup>)-I geninin VITEK 2 cihazının amikasin MİK değerleriyle ilişkisi incelendiğinde MİK değerinin artmasıyla birlikte direnç genine sahip olan köken sayısının da arttığı dikkat çekmiştir. Amikasin MİK’i 4  $\mu$ g/ml olan kökenler %30.6 oranında direnç genine sahipken; tobramisine dirençli kökenlerde bu oran % 79.3 düzeyine yükselmiştir. VITEK 2 sistemi ile amikasin MİK’i 4  $\mu$ g/ml olan kökenlerin tobramisine duyarlı %65.9’luk bölümünün büyük

çoğunluğunun (%94.7) aac(6')-I geni taşımadığı tespit edilmiştir (Tablo 6 ve Tablo 8) ki bu durumda VITEK 2 AES'in amikasin MİK'i  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  olan tüm kökenler için gereksiz yere "AAC(6') aracılığı ile amikasine de direnç olabilir" uyarısı verdiği düşünülebilir. Ancak, tobramisine dirençli olanların %79.3'ü direnç geni taşıdığı göz önüne alınırsa, aminoglikozid direnç uyarısını moleküler yöntemlerle doğrulama imkanının olmadığı rutin laboratuvarlarda, tobramisin disk difüzyon testinde dirençli bulunduğu bu kökenler için orta duyarlı sonucu verilebilir. Gen pozitifliği ve amikasin MİK değeri arasındaki ilişkiye GSBL üretiminin katkısı olup olmadığı irdelendiğinde; GSBL(+) kökenlerde aac(6')-I geni varlığı GSBL(-) olanlara kıyasla üç kat daha fazla saptanmıştır (Tablo 7). Bu nedenle; en azından direnç mekanizması uyarısı verilen GSBL(+) kökenlerde tobramisin direnci disk difüzyon testi yöntemi ile araştırılmalıdır.

MİK değeri 8  $\mu\text{g/ml}$  olan kökenlerde aac(6')-I genine sahip olma oranı %63.8 iken tobramisine dirençli olan kökenlerde %92.5'e yükselmiştir (Tablo 9). İstatistiksel olarak da anlamlı bulunan bu ilişkiye dayanarak MİK'i 8  $\mu\text{g/ml}$  olan kökenler tobramisin dirençli bulunurlarsa direnç geni pozitifliğinin yüksek olduğunu öngörmek mümkün olabilecektir. Dolayısıyla bu kökenlerde tobramisin direncini saptamak suretiyle çok daha güvenli bir şekilde VITEK 2 uyarısı dikkate alınabilir.

MİK değeri 16  $\mu\text{g/ml}$  olan kökenlerde toplamda %86 olan gen pozitiflik oranı tobramisine dirençli kökenlerde %92.3'e yükselmiş olmakla birlikte bu artış istatistiksel bir anlam ifade etmemiştir (Tablo 10). GSBL(+) kökenlerde aac(6')-I geni varlığı da GSBL(-) olanlara kıyasla istatistiksel olarak bir fark yaratmamıştır. GSBL pozitif de olsa negatif de olsa MİK değeri 16  $\mu\text{g/ml}$  olan kökenlerde %90'ın üzerinde tobramisin direnci ve aminoglikozid direnç geni saptandığından VITEK uyarısını doğrulamak için tobramisin disk difüzyon testi yapılmadan ve sonucu elde etmek için ek zaman harcamadan amikasin için orta duyarlı sonucu vermek klinik başarısızlığa yol açmamak adına bir önlem olabilir.

Çalışmamızda VITEK 2 otomatize cihazının uzman sisteminin raporları irdelenmiş ve sistem tobramisin için duyarlılık sonucu vermediğinden yalnızca

amikasin MİK sonuçlarına göre sokak fenotipi ile AAC(6') direnç fenotipi arasında kaldığı, bu sebeple hata riski almayarak kesin olarak dirençlidir sonucu vermeyip, orta duyarlıya çevirip aminoglikozidlere direnç gelişebilir uyarısı yaptığı sonucuna varılmıştır. AES veritabanında amikasin için:  $\leq 4$  µg/ml MİK değerlerinde sokak fenotipi,  $\geq 4$  µg/ml MİK değerlerinde ise AAC(6') direnç fenotipi gösterdiği bilgisi bulunmaktadır.

Özetle; otomatize sistemin amikasin MİK değeri duyarlı aralıkta olduğu halde orta duyarlıya çevirdiği ve aminoglikozidlere direnç gelişebilir uyarısı verdiği kökenlerde PZR'ye gerek olmaksızın amikasin MİK ve tobramisin disk difüzyon testi duyarlılık sonuçlarına bakılarak çözüm getirilebileceği kanaatindeyiz. Ayrıca VITEK 2 sistem paneline tobramisinin eklenmesi halinde de bu sorunun, önemli ölçüde ortadan kalkması mümkün olacaktır.

1992 yılında Rather ve ark. AAC(6')-I ve AAC(6')-II enzimlerinin substrat özgüllüklerini 119. pozisyondaki aminoasite bağlı olduğunu, serin bulunması halinde gentamisine, lösin bulunması durumunda ise amikasine direnç geliştiğini göstermişlerdir (43). Bir başka çalışmada da yine aac(6')-Ib gen kasetleri tarafından kodlanan ve 119. pozisyonunda lösin bulunan AAC(6')-I enziminin amikasin direncine sebep olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada ilginç olarak amikasin MİK değerinin düşük ( $\leq 8$  mg/L, EUCAST'e göre) olduğu kökenlerde de bu gene rastlanmıştır. Bu durumda amikasinin klinik kullanımını konusunda problemlere yol açabileceği belirtilmiştir. Ayrıca aac(6')-Ib genine sahip kökenlerin beta-laktamaz enzimi de ürettikleri belirlenmiştir (44).

Çalışmaya dahil edilen kökenlerin %61.5 oranında kinolon grubu antibiyotiklere dirençli oldukları saptanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar kinolon direncinin yayılması ve artışının plazmit aracılı olabileceğini göstermiştir. 2006 yılında bazı kinolonların enzimatik inaktivasyonuna neden olan ve plazmitle aktarılan farklı bir mekanizma bulunmuştur. Aminoglikozidleri modifiye eden ve aac(6')-Ib ile kodlanan enzimin bir varyantı olan aac(6')-Ib-cr geni keşfedilmiştir. Bu gen

norfloksasin ve siprofloksasin gibi bazı kinolonların enzimatik inaktivasyonuna ve sonuçta da bu antibiyotiklere duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır (21).

Wieczorek ve ark. aac(6')-Ib aminoglikozid direnç geni saptadıkları *Proteus mirabilis* suşlarında siprofloksasin direncine de rastlamışlardır (45).

Jiang ve ark. plazmid aracılı kinolon direnciyle ilgili çalışmalarında 62 adet GSBL(+) aac(6')-Ib genine sahip kökende, –cr varyantını %58 oranında saptamışlardır (46).

Kim ve ark. 555 Enterobacteriaceae izolatında %86 oranında aac(6')-Ib gen pozitifliği saptamışlardır. Bunların da %22'sinin aac(6')-Ib-cr genini taşıdıklarını bulmuşlardır. aac(6')-Ib-cr genini taşıyan kökenlerin çeşitli beta-laktamaz genlerine de sahip olduklarını belirlemişlerdir (47).

Çalışmamızda, aac(6')-I genini taşıyan 112 kökende %87 gibi yüksek bir oranda kinolon direnci gözlenirken, bu geni taşımayan 88 kökenin sadece %29.5inde dirence rastlanmıştır. Aminoglikozid direnç geni pozitif olan kökenlerimizde yüksek oranda gözlemlediğimiz kinolon direnci, kinolonların enzimatik inaktivasyonuna neden olan ve plazmitle aktarılan bir enzimin bu dirençten sorumlu olabileceğini ve bu enzimin de aminoglikozidleri modifiye eden ve aac(6')-Ib geni ile kodlanan enzimin bir varyantı olan aac(6')-Ib-cr olma olasılığını akla getirmektedir. Bu konunun aydınlatılması için; hem kinolon hem de aminoglikozid grubu antibiyotiklere dirence sebep olabilen aac(6')-Ib-cr geninin araştırılması gerekmektedir.

Antibiyotiklerin gereksiz ve yanlış kullanımları sonucu birçok farklı direnç mekanizmasını aynı anda taşıyan çoklu dirençli bakteriler seçilerek baskın hale gelmektedirler. Özellikle farklı direnç genlerini bir arada taşıyabilen ve direnç mekanizmalarını bakteriler arasında aktarma kapasitesine sahip olan plazmitler bu açıdan büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda aminoglikozid ve kinolon direncinin yakın ilişkisi göz önüne alındığında ülkemiz verilerine bu konuyla ilgili genotipik çalışmalar yapılarak katkı sağlanmalıdır.

Sonuç olarak; çalışmamız VITEK 2 gibi otomatize sistemlerin uzman yazılımlarının aminoglikozid direnç uyarısına moleküler yöntemlerle açıklık getirmiş ve bu uyarının rutin bakteriyoloji laboratuvarlarında uygulanabilecek basit yöntemler sayesinde büyük lde doğrulanabileceğini ortaya koymuştur. Özellikle görece düşük amikasin MİK değerlerinde direnç uyarısının disk difüzyon yöntemi ile bakılacak tobramisin duyarlılığı ile bertaraf edilmesi sayesinde gereksiz yere amikasin kullanımının kısıtlanması engellenmiş olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- 1- Çolak D. (1999). Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. İçinde: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ed: Ustaçelebi Ş, Güneş Kitabevi, Ankara; s. 81-89.
- 2- Durmaz B, Özerol İ H, Şahin K, Tekerekoğlu M S, Köroğlu M. (1997). *Enterobacteriaceae* üyesi ve *Pseudomonas* cinsi bakterilerin  $\beta$ -Laktam antibiyotiklere direnci. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 4(2):193-196.
- 3- Öztürk R. (2002). Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişme Mekanizmaları ve Günümüzde Direnç Durumu. İçinde: *Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi* No:31. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, s. 83-100.
- 4- Kaygusuz S, Ayaşlıoğlu E, Özlük Ö, Kılıç D. (2005). Gram negatif bakterilerde isepamisin ve diğer aminoglikozid antibiyotiklere karşı direnç. *Klinik Derg*; 18(1):38-40.
- 5- Willke Topçu A. (2002). Aminoglikozidler. İçinde: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Ed: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1:214-223.
- 6- Gülay Z. (1999). Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. İçinde: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ed: Ustaçelebi Ş, Güneş Kitabevi, Ankara, s. 91-107.
- 7- Gür D. (2000). “Antimikrobik Tedavide Yeni Direnç Sorunları” Antimikrobiyal Tedavide Yenilikler. *Modern Tıp Seminerleri*, No. 9:59-65.
- 8- Gür D. (2002). Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç. İçinde: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Ed: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1:182-192.

- 9- Jana S, Deb J.K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol Mini-Rev*, 70: 140-150.
- 10- Günalp A. (2002). Antimikrobiyal İlaçların Etki Mekanizmaları. İçinde: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Ed: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1:167-174.
- 11- Küçükateş E, Kansız E, Gültekin N. (2007). Gram negatif bakterilerde isepamisin, amikasin ve gentamisine karşı direnç. *İnfek Derg*, 21(1): 21-25.
- 12- Gilbert DN. (1995). Aminoglycosides. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Eds: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, 4<sup>th</sup> ed, Churchill and Livingstone, Philadelphia, p.279-290.
- 13- Yao JDC, Moellering RC, JR. (2007). Antibacterial Agents. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Eds: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, 9<sup>th</sup> ed, Washington, ASM, p.1077-1113.
- 14- Park YJ. (2009). Aminoglycoside resistance in Gram-negative bacilli. *Korean J Clin Microbiol*, 12:57-61.
- 15- Yamazhan T. (2007). Sulfonamidler ve aminoglikozidler. *Ankem Derg*:21(ek2):52-56.
- 16- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*, 57:138-163.
- 17- Gür D. (2009). Gram negatif bakterilerde antibiyogram yorumu. *ANKEM Derg*, 23(Ek 2):188-192.

- 18- Gür D. (1996). Gram negatif bakterilerde aminoglikozid antibiyotiklere direnç ve aminoglikozidleri değiştirici enzimler. *ANKEM Derg*, 10:247-251.
- 19- Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:727-737.
- 20- Leblebicioğlu H, şencan İ, Eroğlu C, Sünbül M, Esen ř, Günaydın M. (1998). Gram negatif bakterilerde aminoglikozid direnç mekanizmaları. *Klinik Derg*, 11(2):50-52.
- 21- Nazik H, Öngen B. (2010). Türkiye’de plazmid aracılı kinolon direnci. *ANKEM Derg*, 24(1): 46-54.
- 22- Söyletir G, Ülger N. (2008). Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı. İçinde: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Ed: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1:115-146.
- 23- Richter SS, Ferraro MJ. (2007). Susceptibility Testing Instrumentation and Computerized Expert Systems for Data Analysis and Interpretation. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Eds: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, 9<sup>th</sup> ed, Washington, ASM, p.245-256.
- 24- Leclercq R. (1997). Concepts of expert system for the interpretation of antimicrobial susceptibility tests. VITEK 2 References, ECCMID, Lausanne, Switzerland, 1:11-14.
- 25- Blondel-Hill E, Hetchler C, Andrews D, Lapointe L. (2003). Evaluation of VITEK 2 for analysis of Enterobacteriaceae using the Advanced Expert System (AES) versus interpretive susceptibility guidelines used at Dynacare Kasper Medical Laboratories, Edmonton, Alberta. *Clin Microbiol Infect*, 9:1091-1103.

- 26- Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Cavalieri SJ, Shubert C, Thomson KS, Boeufgras JM, Sanders WE, JR. (2001). Potential impact of the VITEK 2 System and the Advanced Expert System on the clinical laboratory of a university-based hospital. *J Clin Microbiol*, 39:2379-2385.
- 27- Barry J, Brown A, Ensor V, Lakhani U, Petts D, Warren C, Winstanley. (2003). Comparative evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System (AES) in five UK hospitals. *J Antimicrob Chemother*, 51:1191-1202.
- 28- Livermore DM, Struelens M, Amorim J, Baquero F, Bille J, Canton R, Henning S, Gatermann S, Marchese A, Mittermayer H, Norhoff C, Oakton KJ, Praplan F, Ramos H, Schito GC, Van Eldere J, Verhaegen J, Verhoef J, Visser MR. (2002). Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *J Antimicrob Chemother*, 49:289-300.
- 29- Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th Informational Supplement. (2008). M100-S18, CLSI, Wayne.
- 30- Kim JY, Park YJ, Kwon HJ, Han K, Kang MW, Woo GJ. (2008). Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J Antimicrob Chemother*, 62: 479-483.
- 31- Durmaz R. (2009). Direnç gelişimini önlemede moleküler mikrobiyolojinin katkısı. *ANKEM Derg*; 23(Ek 2):111-115.
- 32- Gür D. (1992). Aminoglikozit grubu antibiyotikler ve bunlara karşı gelişen direnç mekanizmaları. *ANKEM Derg*, 6(2):307-311.

- 33- Akalın HE, Lolans V. (1983). Comparison of enzyme-mediated aminoglycoside resistance in Gram-negative bacilli isolated in Turkey and the United States. *J Infect Dis*, 148(6):1128.
- 34- Neonakis I, Gikas A, Scoulica E, Manios A, Georgiladakis, Tselentis Y. (2003). Evolution of aminoglycoside resistance phenotypes of four Gram-negative bacteria: an 8-year survey in a University Hospital in Greece. *Int J Antimicrob Agents*, 22:526-531.
- 35- Öngen B, Kaygusuz A, Gürler N, Töreci K. (1997). Aminoglikozid dirençli Gram negatif çomak suşlarında saptanan direnç mekanizmaları. *ANKEM Derg*, 11:507-512.
- 36- Akalın HE, Torun M, Alaçam R. (1988). Aminoglycoside resistance patterns in Turkey. *Scand J Infect Dis*, 20:199-203.
- 37- Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupezynski Y, Mackey P, Shlaes D, Shimizu K, Shaw KJ, the Aminoglycoside Resistance Study Groups. (1997). The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms—changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? *Clin Infect Dis*, 24 (Suppl 1):46-62.
- 38- Shimizu K, Kumada T, Hsieh WC, et al. (1985). Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. *Antimicrob Agents and Chemother*, 28:282-288.
- 39- Over U, Gur D, Unal S, Miller GH and the Aminoglycoside Resistance Study Group. (2001). The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clin Microbiol Infect*, 7: 470-478.

- 40- Över U, Gür D, Ünal S, Miller GH. (2000). Gram negatif bakterilerde aminoglikozid antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları: Son gelişmeler ve Türkiye sonuçları. *Flora*, 5(3):168-178.
- 41- Vanhoof R, Nyssen HJ, Van Bossuyt E, Hannecart-Pokorni E. (1999). Aminoglycoside resistance in Gram negative blood isolates from various hospitals and the Grand Duchy of Luxembourg. *J Antimicrob Chemother*, 44(4): 483-488.
- 42- Ploy MC, Giamarellou H, Bourlioux P, Courvalin P, Lambert T. (1994). Detection of aac(6')-I Genes in Amikacin-Resistant *Acinetobacter spp.* by PCR. *Antimicrob Agents and Chemother*, 38: 2925-2928.
- 43- Rather PN, Munayyer H, Mann PA, Hare RS, Miller GH, Shaw KJ. (1992). Genetic analysis of bacterial acetyltransferases: Identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase Ib and IIa proteins. *J Bacteriol*, 174:3196-3203.
- 44- Fihman V, Lartigue MF, Jacquier H, Meunier F, Schnepf N, Raskine L, Riahi J, Pors MJS, Bercot B. (2008). Appearance of aac(6')-Ib-cr gene among extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing Enterobacteriaceae in French Hospital. *J Infect*, 56:454-459.
- 45- Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Ostas A, Klosowska W, Ratajczak J, Trynieszewska E. (2008). The aac(6')Ib gene in *Proteus mirabilis* strains resistant to aminoglycosides. *Folia Histochem Cytobiol*, 46(4): 531-533.
- 46- Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, Li L. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*, 61: 1003-1006.

- 47- Kim EU, Jeong JY, Jun JB, Choi SH, Lee SO, Kim MN, Woo JH, Kim YS. (2009). Prevalance of aac(6<sup>'</sup>)-Ib-cr encoding a ciprofloksasin-modifying enzyme among Enterobacteriaceae blood isolates in Korea. *Antimicrob Agents and Chemother*, 53:2643-2645.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Nesrin	<b>Soyadı</b>	AYDOĞAN
<b>Doğum Yeri</b>	Tokat	<b>Doğum Tarihi</b>	12.01.1985
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kimlik No</b>	35761623700
<b>E-mail</b>	n.aydogan85@gmail.com	<b>Tel</b>	05376772176

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	Gazi Üniversitesi	2007
<b>Lise</b>	Maltepe Süper Lisesi	2003

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Stajyer	Haydarpaşa Numune EA Hastanesi	Temmuz 2006-Ağustos 2006
2.	Stajyer	Haydarpaşa Numune EA Hastanesi	Temmuz 2007
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	orta	iyi

\* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

# Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

# KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>	63.390	65.984	67.096

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar

Ön Değerlendirme Komisyonu

**PROJENİN ADI:** Fenotipik Olarak Amikasin Duyarlı GSBL Pozitif ve Negatif Escherichia Coli' lerde Aminoglikozid Direncinden Sorumlu Enzimlerin Genotipik Olarak Araştırılması  
**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Prof. Dr. Güner SÖYLETİR  
**PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR:** Nesrin AYDOĞAN  
**ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI:** 14.09.2010 – 18

**Sayın Prof. Dr. Güner SÖYLETİR**

43 protokol nolu "Fenotipik Olarak Amikasin Duyarlı GSBL Pozitif ve Negatif Escherichia Coli' lerde Aminoglikozid Direncinden Sorumlu Enzimlerin Genotipik Olarak Araştırılması" isimli projeniz Enstitümüzün ön değerlendirme komisyonunda incelenmiş ve araştırmanın Komisyonumuzun ön değerlendirme kriterlerine uygunluğuna karar verilmiştir.

Doç. Dr. Ümit ŞEHİRLİ  
Komisyon Başkanı

Prof. Dr. Gül DÜLGER AYANOĞLU

Prof. Dr. Bahar GÜR SOY

Prof. Dr. Can İKİZLER

Doç. Dr. Oğuzhan DENYELİ

Doç. Dr. Asım ÇİNGİ

Yrd. Doç. Dr. Murat ÇEKİN

Yrd. Doç. Dr. Mustafa TAŞDEMİR

Öğr. Gör. Dr. Tolga GÜVEN