



Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Plazmid Aracılı Yüksek Düzey Aminoglikozit Direncinin Araştırılması

Investigation of Plasmid-mediated High-level Aminoglycoside Resistance in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates

Reyhan YİŞ¹(iD), Ayşe Nur SARI KAYGISIZ²(iD), Zeynep GÜLAY²(iD)

¹ İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İzmir, Türkiye

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Makale atfı: Yiş R, Sarı Kaygısız AN, Gülay Z. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında plazmid aracılı yüksek düzey aminoglikozit direncinin araştırılması. FLORA 2020;25(3):423-32.

ÖZ

Giriş: Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae*, son yıllarda nozokomiyal infeksiyonların önde gelen nedenlerinden biri haline gelmiş ve aminoglikozit grubu antibiyotikler geniş antimikrobiyal spektrumları, hızlı bakterisidal etkileri ve diğer antimikrobiyallerle sinerjistik etkileşimleri nedeniyle bu infeksiyonların tedavisinde önem kazanmıştır. Ancak bu antimikrobiyallerin aşırı kullanımı direnç problemini de beraberinde getirmiştir. Çalışmamızda, 2014 yılında izole edilen 32 ve 2015 yılında izole edilen 35 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatında 16S ribozomal RNA metil transferazlardan (16S rRNA Mtaz) kaynaklanan plazmid aracılı yüksek düzey aminoglikozit direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Ardışık olarak izole edilmiş 2014 yılına ait 32 ve 2015 yılına ait 35 izolat olmak üzere toplam 67 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya alındı. İdentifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık BD Phoenix otomatize sistem ile çalışıldı. Bunun yanında aminoglikozit (amikasin ve gentamisin) duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile tekrar edildi. İzolatların karbapenemaz ve 16S rRNA Mtaz gen pozitifliği in-house polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile belirlendi.

Bulgular: Otuz iki adet 2014 yılı izolatının tamamında bla_{OXA48} geni saptanırken, 2015 yılı izolatlarının altı tanesinde bla_{NDM} 10 tanesinde bla_{OXA48} geni tek başına pozitif olarak bulunmuştur. bla_{OXA48} , bla_{NDM} birlikte pozitifliği 19 izolatta gözlenmiştir. 2014 yılı izolatlarının tümünde *armA* negatif bulunmuş iken 2015 yılındaki izolatların 28 tanesinde *armA* pozitifliği görülmüştür. Tek başına bla_{NDM} geni pozitif bulunan izolatların tümünde *armA* pozitifliği saptanırken, tek başına bla_{OXA48} pozitifliği olan beş izolatta *armA* pozitif bulunmuştur. *armA* pozitifliği saptanan 17 izolat ise bla_{OXA48} , bla_{NDM} birlikte pozitif olan izolatlardır. *armA* pozitif izolatların dört tanesinde otomatize cihaz ile amikasin duyarlılık saptanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile izolatların amikasin dirençli oldukları bulunmuştur.

Sonuç: Hastanemizde yatan hastalardan izole edilmiş olan karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarından, 2014 yılı izolatlarında 16S rRNA Mtaz genleri saptanmazken, takip eden bir sonraki yıl *armA* pozitiflikleri ortaya çıkmıştır. bla_{NDM} pozitif izolatların ortaya çıkmasıyla *armA* pozitifliklerinin saptanmaya başlaması, aradaki pozitif korelasyonu göstermektedir. Ek olarak çalışmamızda 28 izolatla saptanmış olduğumuz *armA* tipi 16S rRNA Mtaz gen pozitifliği, ülkemizden daha önce bildirilmemiş olduğu için oldukça anlamlıdır.

Anahtar Kelimeler: 16S ribozomal RNA metil transferaz; Yüksek düzey aminoglikozit direnci; *Klebsiella pneumoniae*; *armA*

Geliş Tarihi/Received: 23/01/2020- Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 15/06/2020

©Telif Hakkı 2020 Flora. Makale metnine www.floradergisi.org web adresinden ulaşılabilir.

Çevrimiçi Yayın Tarihi: 15.10.2020

ABSTRACT

Investigation of Plasmid-mediated High-level Aminoglycoside Resistance in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* IsolatesReyhan Yiş¹, Ayşe Nur SARI KAYGISIZ², Zeynep GÜLAY²¹ Clinic of Microbiology and Clinical Microbiology, Izmir Bozyaka Training and Research Hospital, Izmir, Turkey² Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Ege, Izmir, Turkey

Introduction: Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* has become a leading cause of nosocomial infections in recent years, and aminoglycoside antibiotics have gained importance in the treatment of these infections due to their broad antimicrobial spectra, rapid bactericidal effects, and synergistic interactions with other antimicrobials. However, the excessive use of aminoglycosides has led to resistance. The aim of this study was to investigate plasmid-mediated, high-level resistance to aminoglycosides associated with 16S ribosomal RNA methyltransferases (16S-RMTase) in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates.

Materials and Methods: The study included 67 consecutively isolated carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates obtained in 2014 (n= 32) and 2015 (n= 35). Identification and antimicrobial susceptibility testing were performed using a BD Phoenix automated system. Aminoglycoside (amikacin and gentamicin) susceptibility tests were also repeated by disk diffusion method. In-house polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect genes for carbapenemase resistance and 16S-RMTase in the isolates.

Results: The *bla*_{OXA-48} gene was detected in all 32 isolates obtained in 2014. Of the isolates from 2015, 10 were positive for *bla*_{OXA-48} and 6 were positive for *bla*_{NDM}. Positivity for both *bla*_{OXA-48} and *bla*_{NDM} was observed in 19 isolates. All of the isolates from 2014 were negative for *armA* while 28 of the isolates from 2015 were positive for *armA*. Positivity for *armA* was observed in all isolates that carried the *bla*_{NDM} gene alone versus 5 of the isolates that carried *bla*_{OXA-48} alone. Seventeen of the *armA*-positive isolates carried both *bla*_{OXA-48} and *bla*_{NDM}. Four of the *armA*-positive isolates were sensitive to amikacin in the automated analyzer, but were found to be amikacin-resistant in disk diffusion test.

Conclusion: Although 16S-RMTase genes were not detected in any of the carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates obtained from inpatients in our hospital in 2014, *armA* positivity emerged the following year. The coincident appearance of *armA* and *bla*_{NDM}-positive isolates indicates a positive correlation. Our findings are significant since *armA*-type 16S-RMTase gene positivity, detected in 28 isolates in this study, has not been reported previously in Turkey.

Key Words: 16S ribosomal RNA methyltransferases; High-level aminoglycoside resistance; *Klebsiella pneumoniae*; *armA*

GİRİŞ

Protein sentez inhibitörü olan ve 30S ribozomal alt ünitesine bağlanarak etki gösteren aminoglikozit grubu antibiyotikler, geniş spektrumlu ve oldukça etkili antibiyotiklerdir. Gram-negatif bakteriyel infeksiyonların tedavisinde genellikle β-laktam ajanlar ile birlikte kullanılırlar. Bu ajanlar, bakteri 30S ribozomal alt birimlerinin 16S rRNA'sının yüksek oranda korunan bir bölgesine bağlanarak, protein sentezinin inhibisyonu yoluyla bakteriyel ölüme neden olmaktadır^[1].

Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* son yıllarda hastane infeksiyonlarına neden olan etkenler arasında ilk sıralarda yer almaya başlamıştır. Özellikle geniş antimikrobiyal spektrumları, hızlı bakterisidal etkileri ve diğer antimikrobiyallerle sinerjistik etki göstermeleri, bu infeksiyonların tedavisinde aminoglikozit grubu antibiyotikleri daha

önemli bir yere taşımıştır. Bununla birlikte bu antimikrobiyallerin aşırı kullanımı direnç problemini de beraberinde getirmiştir^[1,2].

İlacın enzimatik modifikasyonu, ribozomal hedefin modifikasyonu ve dış membran geçirgenliğinin değişmesi, iç membrana transportun azalması veya aktif dışa atım pompaları yoluyla azalmış hücre içi antibiyotik birikimi aminoglikozitlere karşı direnç mekanizmaları olup, aminoglikozit modifiye edici enzimlerin üretimi [aminoglikozit fosfotransferazlar (AFT), aminoglikozit nükleotidiltransferazlar (ANT) veya aminoglikosid asetil transferazlar (AAC)] gram-negatif bakterilerde bildirilen en yaygın mekanizmadır^[3]. Küresel olarak son on yılda, aminoglikozitlerin çoğunda yüksek düzey dirence yol açan farklı bir aminoglikozit direnç mekanizması ortaya çıkmıştır^[4]. Ekzojen olarak kazanılmış 16S ribozomal RNA metil transferazlar (16S rRNA MTaz)

aminoglikozitlere karşı yüksek düzey direncin en sık mekanizması olarak önem kazanmıştır^[1]. Kazanılan ilk 16S rRNA MTaz genleri olan *armA* ve *rmtA*, 2003 yılında sırasıyla *K. pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da saptanmış olup, *armA* Avrupa'daki en yaygın metilazdır^[5,6].

16S rRNA Mtaz'lar klinik olarak tüm aminoglikozitlere (MIC > 256 mg/L) karşı yüksek düzeyde dirence yol açmaktadırlar ve bunları kodlayan genler tipik olarak genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL'ler), karbapenemazlar ve florokinolon için direnç belirleyicileri ile birlikte plazmidler üzerinde bulunmaktadır^[7]. Bu durum potansiyel olarak, çoklu ilaca dirençli (ÇİD) gram-negatif infeksiyonları tedavi etmek için kullanılan çok sayıda antimikrobiyal sınıfını etkisiz kılmaktadır^[3].

Özellikle karbapenem dirençli *Enterobacterales*'e karşı kullanım amacıyla geliştirilen ve 2018 yılında FDA tarafından onaylanan yeni bir aminoglikozit ajan olan plazomisin, 16S rRNA Mtaz üreten izolatlar karşı etki göstermemektedir^[8]. NDM ve 16S rRNA Mtaz üreten izolatlarda bu durum özellikle önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda, 2014 yılında izole edilen 32 ve 2016 yılında izole edilen 35 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatında 16S rRNA MTaz'dan kaynaklanan plazmid aracılı yüksek düzey aminoglikozit direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

İzolatlar: Ardışık olarak izole edilmiş 2014 yılına ait 32 ve 2015 yılına ait 35 izolat olmak üzere toplam 67 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya alındı.

Bakteri identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışması: İdentifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık BD Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) otomatize sistem ile çalışıldı. Bunun yanında aminoglikozit (amikasin ve gentamisin) duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile tekrar edildi.

Disk difüzyon çalışması: İzolatların aminoglikozit duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonun steril eküvyon ile Mueller-Hinton agar (MHA) plaklarına ekimi yapılmış, Amikasin (AK) (30 µg) (Bioanalyse, Türkiye) ve Gentamisin (GN) (10 µg) (Bioanalyse, Türkiye) diskleri yerleştirilmiştir. "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)"

kriterlerine göre; 20-24 saat 35°C'de inkübe edilen MHA besiyerinde aminoglikozit disklerinden inhibisyon zon çapları sırasıyla ≤ 14 mm ve ≤ 12 mm olarak ölçülenler dirençli olarak değerlendirildi^[9]. BD Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) otomatize sistem ile GSBL pozitifliği ve karbapenem direnci saptanan izolatlarda; kombine disk yöntemi ile GSBL pozitifliği, karbapenemaz inaktivasyon metodu (CIM) ile karbapenemaz pozitifliği doğrulandı^[10]. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 29522 kullanıldı.

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT): İzolatların karbapenemaz (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{GES}) ve 16S rRNA Mtaz (*armA*, *rmtB*, *rmtC*) gen pozitifliği in-house PZT ile belirlendi. İzolatların 24 saatlik saf kültürlerinden kaynatma yöntemiyle elde edilen DNA'larında, Tablo 1'de belirtilen öncüller kullanılarak ilgili gen bölgeleri araştırıldı^[11-16].

BULGULAR

İzolatların saptandığı örnek tipleri ve izole edilen servise göre dağılım Tablo 2'de yer almaktadır.

İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları: Çalışmaya alınan 2014 yılına ait 32 izolatın 29'unda, 2015 yılına ait 35 izolatın tümünde GSBL pozitifliği saptanmıştır. İdentifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarının yapıldığı BD Phoenix otomatize sistem ile 2014 izolatlarında iki izolat AK, 14 izolat GN dirençli olarak saptanmış; aynı izolatlar disk difüzyon ile çalışıldığında yine iki izolat AK, 12 izolat GN dirençli olarak bulunmuştur. 2015 izolatlarında ise BD Phoenix otomatize sistem ile 26 izolat AK, 31 izolat GN dirençli olarak saptanmış; disk difüzyon ile 27 izolatın AK, 31 izolatın ise GN dirençli olduğu gözlenmiştir (Tablo 3). Disk difüzyon ile AK dirençli saptanan tüm izolatlarda çift inhibisyon zonu saptanmıştır. İzolatların zon içinden koloniler alınarak tekrar çalışıldığında çift inhibisyon zonu görülmeye devam etmiştir (Şekil 1). Tüm izolatların GSBL, karbapenem ve siprofloksasin duyarlılık sonuçları Tablo 4'te görülmektedir.

PZT sonuçları: 32 adet 2014 izolatının tamamında *bla*_{OXA48} geni saptanırken, 2015 yılı izolatlarının altı tanesinde *bla*_{NDM}, 10 tanesinde *bla*_{OXA48} geni tek başına pozitif olarak bulunmuştur. *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} birlikte pozitifliği 19 izolatta gözlenmiştir.

Tablo 1. İzolatların karbapenemaz ve 16S rRNA metilaz gen pozitifliğinin belirlenmesinde kullanılan öncüller, ürün büyüklükleri ve PZR reaksiyon şartları

Primer Dizisi	Ürün Büyüklüğü	Reaksiyon Şartları	
NDM-1-F: 5'-CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-3' NDM-1-R: 5'-ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-3'	826 bp (10)	94°C→5 dk, ön denatürasyon 94°C→1 dk, denatürasyon 54°C→1 dk, birleşme 72°C→1.5 dk, uzama 72°C→10 dk, son uzama	} 30 döngü
OXA-48A: 5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG-3' OXA-48B: 5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3'	438 bp (11)		
IMP-A: 5'-GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC-3' IMP-B: 5'-GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC-3'	586 bp (12)	94°C→5 dk, ön denatürasyon 94°C→1 dk, denatürasyon 53°C→1 dk, birleşme 72°C→1.5 dk, uzama 72°C→10 dk, son uzama	} 30 döngü
VIM-A: 5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' VIM-B: 5'-TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-3'	388 bp (12)		
KPC-F: 5'-TGCTACTGTATCGCCGTC-3' KPC-R: 5'-TATTTTTCCGAGATGGGTGAC-3'	331 bp (13)		
GES-1A: 5'-ATGCGCTTCATTACGCAC-3' GES-1B: 5'CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3'	864 bp (14)	94°C→5 dk, ön denatürasyon 94°C→1 dk, denatürasyon 55°C→1 dk, birleşme 72°C→1.5 dk, uzama 72°C→10 dk, son uzama	} 30 döngü
* ARM-A-F: ATTCTGCCTATCCTAATTGG ARM-A-R: ACCTATACTTTATCGTCGTC	315 bp (15)	94°C→5 dk, ön denatürasyon	
* RMT-B-F: GCTTTCTGCGGGCGATGTAA RMT-B-R: ATGCAATGCCGCGCTCGTAT	173 bp (15)	94°C→25 sn, denatürasyon 55°C→40 sn, birleşme 72°C→50 sn, uzama	} 30 döngü
* RMT-C-F: CGAAGAAGTAACAGCCAAAG RMT-C-R: ATCCCAACATCTCTCCCACT	711 bp (15)	72°C→6 dk, son uzama	

2014 yılı izolatlarının tümünde *armA* negatif bulunmuş iken 2015 yılındaki izolatların 28 tanesinde *armA* pozitifliği görülmüştür. *armA* pozitif izolatların dört tanesinde otomatize cihaz ile AK'ye duyarlılık saptanmıştır. Tek başına *bla_{NDM}* geni pozitif bulunan izolatların tümünde *armA* pozitifliği saptanırken, tek başına *bla_{OXA-48}* pozitifliği olan beş izolatta *armA* pozitif bulunmuştur. *armA* pozitifliği saptanan 17 izolat ise *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}* birlikte pozitif olan izolatlardır.

armA pozitifliği saptanan 28 izolatın 23'ünde AK (MIK: > 16) ve 27'sinde GN'ye (MIK: > 4) direnç saptanmıştır. Otomatize cihaz ile AK duyarlı saptanan beş izolatın dördü ve GN duyarlı saptanan bir izolat disk difüzyon yöntemi ile dirençli olarak bulunmuştur. Otomatize sistem ile AK, GN duyarlılık sonuçları kategorik olarak uyumsuz (AK duyarlı, GN dirençli) olan 2015 yılına ait dört izolatın *armA* pozitif izolatlar olduğu saptanmış, disk difüzyon ile bu izolatların dirençli izolatlar olduğu doğrulanmıştır (Tablo 5).

TARTIŞMA

Hayatı tehdit eden infeksiyonların tedavisinde aminoglikozit antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımıyla birlikte, bu antibiyotiklere karşı direnç önemli bir klinik problem olarak karşımıza çıkmaya başlamıştır^[17,18]. Özellikle son on yılda *Enterobacterales*'de aminoglikozit direncinin prevalansında değişiklik göze çarpmaktadır^[19]. 16S rRNA Mtaz genleri tarafından kodlanan, plazmidlerle taşınan aminoglikozitlere karşı yüksek düzey direnç, 2003 yılından beri bildirilmektedir^[5]. 16S rRNA Mtaz genleri, *Enterobacterales*, *Acinetobacter baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarında tüm dünyada gösterilmiştir. Bu genler plazmid ve transpozon gibi mobil genetik elemanlar üzerinde yer alarak, gram-negatif bakteriler arasında horizontal gen aktarımı yoluyla yayılabilirler^[16].

16S rRNA Mtaz aracılığıyla, 16S rRNA'nın A bölgesinin posttranskripsiyonel metilasyonu, aminoglikozitlerin bağlanmasını azaltarak arbekasin,

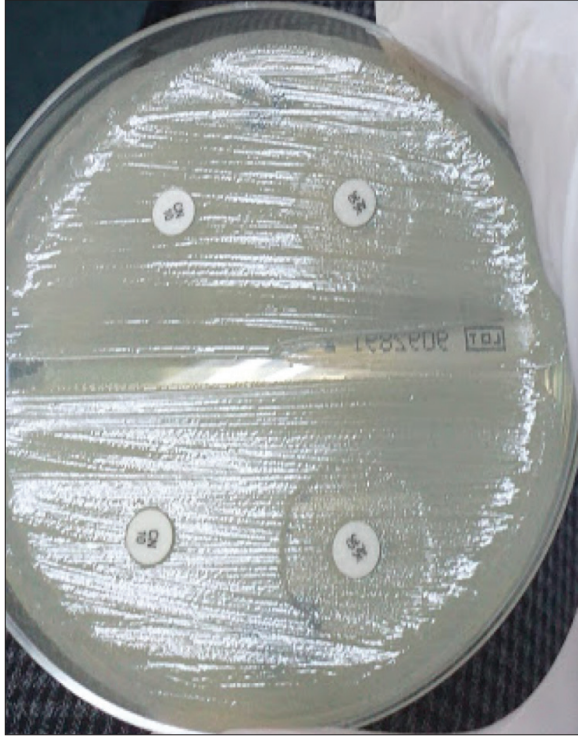
Tablo 2. İzolatların saptandığı örnek tipleri ve izole edilen servise göre dağılım

Servis	Toplam	Çalışma Yılı	Trakeal Aspirat	İdrar	Kateter	Kan	Yara
BC Servis	2	2014	-	1	-	-	-
		2015	-	-	-	-	1
BCYB	1	2014	-	1	-	-	-
		2015	-	-	-	-	-
Dahiliye servisi	4	2014	-	1	-	-	-
		2015	-	3	-	-	-
DYB	5	2014	-	-	-	2	-
		2015	-	1	-	1	-
İH	1	2014	-	-	-	-	-
		2015	-	1	-	-	-
İH Plk	1	2014	-	1	-	-	-
		2015	-	1	-	-	-
FTR	1	2014	-	-	-	-	-
		2015	-	1	-	-	-
GC Servis	6	2014	-	2	1	-	2
		2015	-	1	-	-	-
GCYB	2	2014	-	-	-	-	-
		2015	-	1	-	1	-
GYB	14	2014	3	1	1	1	3
		2015	-	1	-	2	2
Hematoloji	4	2014	-	-	-	-	-
		2015	1	2	-	1	-
LÜ Plk	3	2014	-	1	-	-	-
		2015	-	2	-	-	-
Nöroloji servisi	6	2014	-	3	-	-	-
		2015	-	3	-	-	-
NYB	4	2014	-	3	-	-	-
		2015	1	-	-	-	-
Organ nakli plk	2	2014	-	1	-	-	-
		2015	-	1	-	-	-
Palyatif bakım servisi	3	2014	-	-	-	-	-
		2015	-	3	-	-	-
Reanimasyon	6	2014	2	-	-	1	-
		2015	-	2	-	1	-
Üroloji BTH plk	2	2014	-	1	-	-	-
		2015	-	1	-	-	-
Toplam	67	2014	5	16	2	4	5
		2015	2	24	-	6	3

BC: Beyin cerrahi, BCYB: Beyin cerrahi yoğun bakım, DYB: Dahiliye yoğun bakım, İH: İnfeksiyon hastalıkları, Plk: Poliklinik, GC: Genel cerrahi, GCYB: Genel cerrahi yoğun bakım, GYB: Genel yoğun bakım, LÜ: Lokal üroloji, NYB: Nöroloji yoğun bakım, BTH: Böbrek taşı hastalıkları.

Tablo 3. İzolatların aminoglikozit disk difüzyon ve BD Phoenix ile saptanmış direnç durumları [AK: ≤ 14 mm, GN: ≤ 12 mm (9)]

	2014		2015	
	Disk Difüzyon	BD Phoenix	Disk Difüzyon	BD Phoenix
Gentamisin	12	14	31	31
Amikasin	2	2	27	26

**Şekil 1.** Disk difüzyon ile AK dirençli saptanan tüm *armA* pozitif izolatlarda gözlenen çift inhibisyon zonu.

amikasin, gentamisin ve kanamisin dahil olmak üzere aminoglikozitlere karşı yüksek düzey dirence yol açmaktadır^[3]. Metilaz genleri genellikle *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} ve *qnr* gibi diğer direnç determinantları ile birlikte bulunduğundan, aminoglikozitlere dirençli olan bazı bakterilerin aynı zamanda florokinolonlar ve beta-laktamlara da dirençli olduğu gösterilmiştir^[3,6]. Çalışmamızda da 16S rRNA Mtaz pozitifliklerinin ortaya çıktığı yıla ait izolatların tümünde GSBL pozitif olduğu, bir izolat dışında siprofloksasin direnci gözlemlendiği dikkat çekmektedir.

Günümüzde, tanımlanmış olan on 16S rRNA Mtaz geni (*armA*, *rmfA*, *rmfH* ve *npmA*) bulunmakta olup, *armA* Avrupa'daki en yaygın metilazdır^[3,6]. *ArmA*'yı kodlayan nükleotit sekansının, 2002'de GenBank'a Polonya'dan girilmiş olan

pCTX-M-3 plazmidinin (GenBank AF550415) bir parçası olduğu saptanmıştır. *armA*, genellikle transpozon (Tn1548) içinde 57-196 kb arasında değişen alanda, çeşitli plazmidlerde bulunan *armA* geni tarafından kodlanmaktadır^[1].

16S rRNA Mtaz'ların asıl tehdidi; özellikle tedavi seçeneklerinin zaten sınırlı olduğu ÇİD gram-negatif bakterilerin etken olduğu infeksiyonlarda kurtarma tedavisinde kullanılan potansiyel bir tedavi seçeneğinin kaybıdır. 16S rRNA Mtaz genleri, özellikle karbapenemaz genleri ile birlikte artan bir şekilde saptanmaktadır. Özellikle NDM pozitif *Enterobacterales* izolatlarında 16S rRNA Mtaz pozitifliklerine sıklıkla rastlanmaktadır^[20]. NDM familyasına ait karbapenemazlar, 16S rRNA Mtaz genleri ile aynı plazmidler üzerindeki birlikte bulunabilecek en yaygın karbapenemaz genleridir^[21]. Hindistan'da yapılan, 117 amikasin dirençli *K. pneumonia* izolatının alındığı bir çalışmada, en sık olarak *armA* [n: 79 (%67.52)] 16S rRNA Mtaz geni saptanmıştır. Çalışma izolatlarında en sık karbapenemaz tipi NDM tipi karbapenemaz (n: 60) iken, 25 izolatta *bla*_{OXA48}, yedi izolatta ise her iki karbapenemaz geni birlikte pozitif olarak bulunmuştur^[22]. İrlanda ve İngiltere'den 2004-2015 yılları arasında izole edilmiş 806 *Enterobacterales* izolatının alındığı bir çalışmada 762 (%94.5) susta bir veya daha fazla 16S rRNA Mtaz gen pozitifliği (en sık *armA* (340/762, %44.6) saptanmıştır. Bu çalışmada 16S rRNA Mtaz gen pozitifliği saptanan izolatların %93.4'ünde tek başına ya da birlikte *bla*_{NDM} (%83.1) ve *bla*_{OXA48} (%23.7) geni pozitif olarak bulunmuştur^[21].

Çalışmamızda yer alan ilk döneme ait tümü *bla*_{OXA48} geni pozitif olan izolatlarda *armA*, *rmfB*, *rmfC* negatif bulunmuş iken, ikinci dönemde NDM tipi karbapenemazların saptanmaya başlaması ile birlikte *armA* pozitiflikleri ortaya çıkmıştır. Bu dönemde tek başına *bla*_{NDM} geni pozitif bulunan izolatların tümünde *armA* pozitifliği saptanırken, tek

Tablo 4. İzolatların BD Phoenix ile saptanmış GSBL ve antibiyotik direnç durumları

Antibiyotik adı-GSBL	2014 yılı direnç oranı (n/32)	2015 yılı direnç oranı (n/35)
GSBL	29/32	35/35
İmipenem	28/32	35/35
Meropenem	25/32	34/35
Ertapenem	31/32	35/35
Siprofloksasin	26/32	34/35
Levofloksasin	24/32	35/35
Amoksisilin-Klavulonik Asit	31/32	35/35
Sefotaksim	29/32	35/35
Seftazidim	28/32	35/35
Sefepim	23/32	33/35
Trimetoprim-Sülfametaksazol	25/32	34/35
Fosfomisin	-*	15/24**

* 2014 yılında otomatize sistemin idrar izolatları için antibiyotik duyarlılık panelinde Fosfomisin yer almadığı için oran verilememiştir.

** 2015 yılında otomatize sistemin idrar izolatları için antibiyotik duyarlılık paneline Fosfomisin eklenmiştir. Sadece idrar izolatlarındaki direnç oranı verilmiştir.

başına *bla*_{OXA-48} pozitifliği olan beş izolatta *armA* pozitif bulunmuştur. *armA* pozitifliği saptanan 17 izolat ise *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} birlikte pozitif olan izolatlardır. Çalışmamızda yer alan 2015 yılına ait 35 izolatın 23'ünde tek başına veya *bla*_{OXA-48} ile birlikte *bla*_{NDM} pozitifliğinin saptanmış olması dikkat çekici bir bulgudur.

2010 yılında Wu ve arkadaşları^[23], GSBL ve karbapenemaz enzimlerini taşıyan plazmidlerin, 16S rRNA Mtaz aminoglikozit direnç genleri taşıdığını, beş *Enterobacter cloacae* izolatında KPC enzimini kodlayan plazmidteki *armA* metiltransferaz genini saptayarak doğrulamışlardır. 16S rRNA Mtaz genleri düşük prevalansa sahip olmasına rağmen, gram-negatif basiller arasında bu plazmidler nedeniyle küresel olarak yayılmaktadır. Tayvan'da, *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında yüksek AK direncine sahip izolatlarda *rmtB* ve daha yüksek prevalas ile *armA* genleri tanımlanmıştır^[16]. Çin'de yüksek düzey AK direnci saptanmış olan *Enterobacterales* izolatlarında *armA* ve *rmtB*, Japonya'da *rmtA*, *rmtB*, *npmA* ve *armA* genleri tespit edilmiştir^[4,24]. GSBL ve 16S rRNA Mtaz genleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı, Suudi Arabistan'da yapılmış bir çalışmada izolatlarda *rmtB*, *rmtC* ve *armA* genleri bulunmuştur^[25]. Kuzey Amerika, Latin Amerika ve Avrupa'dan AK'ye yüksek düzey direnç gösteren gram-negatif bakteri izolatlarının

alındığı bir diğer araştırmada *armA*, *rmtB* ve *rmtD* genleri saptanmıştır^[6]. Ülkemizde 2010 yılında yapılmış olan ve beş yıllık bir sürede izole edilen aminoglikozit dirençli 59 klinik izolatta 16S rRNA Mtaz direnci bulunamamıştır^[26]. 2013 yılında yapılmış bir diğer çalışmada aminoglikozitlere dirençli olan bir *K. pneumoniae* izolatında *rmtB* geni gösterilmiştir^[27]. Cirit ve arkadaşları tarafından yapılan ve aminoglikozitlere dirençli olarak saptanan 23 *K. pneumoniae* izolatının alındığı bir çalışmada, bir izolatta *rmtC* pozitifliği saptanmıştır^[28]. Çukurova Üniversitesinde yapılan bir başka çalışmada GSBL ve karbapenemaz pozitiflikleri saptanan dört *K. pneumoniae* izolatında *rmtC* pozitifliği gözlenmiştir^[29]. Çalışmamızda 28 izolatta saptanmış olduğumuz *armA* tipi 16S rRNA Mtaz gen pozitifliği ülkemizde bildirilmemiştir.

Çalışmamızda *armA* pozitifliği saptanan 28 izolatın 25'inde AK'ye ve 26'sında GN'ye direnç gözlenmiştir. Bunun yanında otomatize sistem ile AK, GN duyarlılık sonuçları kategorik olarak uyumsuz olan 2015 yılına ait dört izolatın *armA* pozitif izolatlar olduğu saptanmış, disk difüzyon ile bu izolatların dirençli izolatlar olduğu doğrulanmıştır. 2015 yılında 57 KPC pozitif *K. pneumoniae* izolatının kullanıldığı bir çalışmada VITEK 2 otomatize sistem ile dört izolatın GN duyarlılığında çok büyük hata saptanmıştır. Bu çalışmadaki dört izola-

Tablo 5. *armA* pozitifliği saptanan izolatların karbapenemaz geni taşıma durumları, disk difüzyon ve otomatize sistem ile çalışılmış GN ve AK duyarlılık sonuçları

İzolat no	armA	OXA-48	NDM	GN	MIK	DD	AK	MIK	DD
1	(+)	(-)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
2	(+)	(-)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
3	(+)	(-)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
4	(+)	(-)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
5	(+)	(-)	(+)	R	> 4	R	S	≤ 4	R*
6	(+)	(-)	(+)	S	≤ 1	R	S	≤ 4	R*
10	(+)	(+)	(-)	R	> 4	R	S	≤ 4	S
11	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
12	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
13	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
14	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	S	> 16	R*
15	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
16	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
18	(+)	(+)	(-)	R	> 4	R	R	> 16	R*
20	(+)	(+)	(-)	R	> 4	R	S	≤ 4	R*
21	(+)	(+)	(-)	R	> 4	R	R	> 16	R*
22	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
23	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
24	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
25	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
27	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
28	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
30	(+)	(+)	(+)	R	2	R	R	> 16	R*
31	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
32	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
33	(+)	(+)	(+)	R	> 4	R	R	> 16	R*
34	(+)	(+)	(-)	R	> 4	R	R	> 16	R*
35	(+)	(+)	(+)	R	> 4	RH	R	> 16	R*

* Disk difüzyonda AK'de çift inhibisyon zonu saptanan izolatlar.

tın *armA* pozitif izolatlar olduğu belirlenmiştir^[30]. Jung ve arkadaşları^[31] tarafından yapılan bir diğer çalışmada *armA* pozitif *A. baumannii* izolatlarında VITEK 2 ile AK duyarlılığında çok büyük hatalar ortaya çıktığı ve bu izolatlarda AK duyarlılığının alternatif bir duyarlılık yöntemi ile çalışılmasının gerekliliği vurgulanmıştır. Ko ve arkadaşları^[32] tarafından yapılan bir diğer çalışmada bir yıllık sürede izole edilen ve VITEK 2 otomatize sistem ile AK dirençli olduğu halde GN duyarlı saptanan 12 *K. pneumoniae* izolatı incelenmiş olup, bu izolatla-

rın 11 tanesinde *armA* pozitif olarak bulunmuş ve bunların dokuzunda karbapenemaz genleri ile birliktelik saptanmıştır. Aynı çalışmada izolatların GN duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tekrar edildiğinde *armA* pozitifliği olan izolatların GN'ye yüksek düzey dirençli olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda yer alan 2015 izolatlarında BD Phoenix otomatize sistem ile 26 izolat, disk difüzyon ile 27 izolat AK dirençli olarak saptanmış, disk difüzyon ile dirençli olarak saptanan izolatların tümünde *armA* pozitifliği olduğu gözlenmiştir. Bu

27 izolatta hem ilk çalışmada hem de zon içinden koloniler alınarak yapılan disk difüzyon çalışmasında çift inhibisyon zonu görülmüştür (Şekil 1). Jung ve arkadaşları^[31]'nin çalışmasında, VITEK 2 ile AK duyarlı olarak saptanmış dokuz *A. baumannii* izolatında disk difüzyon ile çalışıldığında çift inhibisyon zonu gözlenmiş ve bu izolatların *armA* taşıdığı saptanmıştır. Araştırmacılar çift inhibisyon zonunun indüklenen direnç ile ilişkili olup olmadığını saptamak adına zon içinden dirençli subpopülasyonları seçerek tekrar ettikleri disk difüzyon ile de aynı sonuca ulaşmışlar ve indüklenen direnç mekanizmasını dışlamışlardır. Çalışmamızda da zon içinden yapılan disk difüzyon testi ile de çift inhibisyon zonu elde edilmiştir. Mekanizmasını tam açıklayamamış olsak da, bu veri bize *armA* taşıyan izolatlarda AK duyarlılığının disk difüzyon ile saptandığı durumlarda, çift inhibisyon zonunun görülebileceğini ve bu durumun *armA* pozitifliği için uyarıcı olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda finansal yetersizlikler nedeniyle sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılamamış olup, bu durum çalışmanın kısıtlılığı olarak kabul edilebilir. Bunun yanında yine aynı nedenlerle kinolon direnç genleri, beta-laktamaz genleri ve integron gen kasetlerinin taranmamış olması çalışmanın diğer kısıtlılıklarıdır. Aynı izolatlar ile bu genlerin taranması yapılacak ek bir çalışmanın konusu olabilir.

Sonuç olarak; hastanemizde yatan hastalardan izole edilmiş olan karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında, 2014 yılı izolatlarında 16S rRNA MTaz genleri saptanmazken, takip eden bir sonraki yıl *armA* pozitiflikleri ortaya çıkmıştır. *bla_{NDM}* pozitif izolatların ortaya çıkmasıyla *armA* pozitifliklerinin saptanması, olası bir ilişkiyi gösteriyor olsa da, tek başına *bla_{OXA-48}* taşıyan izolatlarda da görülmesi mobil elemanlar aracılığıyla ek direnç kazanım mekanizmalarını düşündürmektedir. Bunun yanında ülkemizde *bla_{OXA48}* geni pozitif *K. pneumoniae* izolatlarına bağlı infeksiyonların kombinasyon tedavisinde aminoglikozitlerin yaygın kullanımına bağlı olarak direncin ortaya çıkmış olma ihtimali de olası sebeplerden biri olabilir. Otomatize cihazların 16S rRNA Mtaz'lardan kaynaklanan plazmid aracılı yüksek düzey aminoglikozit direncini saptamadaki problem nedeniyle, kategorik olarak birbiriyle uyumsuz aminoglikozit duyarlılık sonuçları

alındığında ek bir duyarlılık yöntemi ile doğrulanması önerilebilir. Benzer izolatlar ile çalışmanın genişletilmesi ile daha net sonuçlara ulaşılabilecektir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

YAZAR KATKISI

Anafikir/Planlama: RY, ANSK, ZG

Analiz/Yorum: RY, ANSK, ZG

Veri sağlama: RY, ANSK, ZG

Yazım: RY, ANSK, ZG

Gözden Geçirme ve Düzeltme: RY, ANSK, ZG

Onaylama: RY, ANSK, ZG

KAYNAKLAR

1. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat* 2012;15:133-48.
2. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:682-707.
3. Doi Y, Wachino JI, and Arakawa Y. Aminoglycoside resistance: The emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30:523-37.
4. Yang J, Ye L, Wang W, Luo Y, Zhang Y, Han L: Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *armA* and *rmtB* amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:348-51.
5. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2565-71.
6. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES: Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1843-15.
7. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, et al. Dissemination of 16s rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:305-12.
8. Galani I, Nafplioti, Adamou P, Karaiskos I, Giamarellou H, Souli M, et al. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. *BMC Infect Dis* 2019;19:167.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M07-A10. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria that grow aerobically; approved standard. 10th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Erişim tarihi: 1 Aralık 2019. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf
11. Samuelsen Ø, Thilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Küm-mel A, Sundsfjord A. Identification of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Norway. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:670-2.
12. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15-22.
13. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005;43:3129-35.
14. Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, Bethel CR, Hujer KM, Perez F, et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2680-2.
15. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:622-32.
16. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007;45:88-94.
17. Medboua-Benbalagh, C, Touati A, Kermas R, GharoutSait A, Brasme L, Mezhoud H, et al. Fecal carriage of extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains is associated with worse outcome in patients hospitalized in the pediatric oncology unit of Beni-Messous Hospital in Algiers, Algeria. *Microb Drug Resist* 2017;23:757-63.
18. Chaudhary M, Payasi A. Resistance patterns and prevalence of the aminoglycoside modifying enzymes in clinical isolates of gram negative pathogens. *Global J Pharmacol* 2014;8:73-9.
19. Miro E, Grunbaum F, Gomez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, et al. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in Enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist* 2013;19:94-9.
20. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjen S, Doumith M, et al. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:48-53.
21. Taylor E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. High prevalence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the UK and Ireland. *Int J Antimicrob Agents* 2018;52:278-82.
22. Aishwarya KVL, Geetha PV, Shanthi M, Uma S. Co occurrence of two 16S rRNA methyltransferases along with NDM and OXA 48 like carbapenemases on a single plasmid in *Klebsiella pneumoniae*. *J Lab Physicians* 2019;11:305-311.
23. Wu Q, Liu Q, Han L, Sun J, Ni Y. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 and ArmA 16S rRNA methylase conferring high-level aminoglycoside resistance in carbapenem-resistant Enterobacter cloacae in China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;66:326-8.
24. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama K, et al. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis* 2007;13:642-6.
25. Al Sheikh YA, Marie MA, John J, Krishnappa LG, Dabwab KH. Prevalence of 16S rRNA methylase genes among b-lactamase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in Saudi Arabia. *Libyan J Med* 2014;9:24432.
26. Berçot B, Poirel L, Ozdamar M, Hakko E, Türkoglu S, Nordmann P. Low prevalence of 16S methylases among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from a Turkish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:797-8.
27. Ermertcan S, Yilmaz FF, Taşlı H, Yurtman AN, Aydemir SS, Limoncu MH. Investigation of plasmid mediated methylase genes in aminoglycoside resistant gram negative bacteria. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2013;43:12-6.
28. Cirit OS, Fernández-Martínez M, Yayla B, Martínez-Martínez L. Aminoglycoside resistance determinants in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Turkish and Syrian patients. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2019;66:327-35.
29. Guven Gokmen T, Nagiyev T, Meral M, Onlen C, Heydari F, Koksak F. NDM-1 and rmtC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Turkey. *Jundishapur J Microbiol* 2016;9:e33990.
30. Arena F, Giani T, Vaggelli G, Terenzi G, Pecile P, Rossolini GM. Accuracy of different methods for susceptibility testing of gentamicin with KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;81:132-4.
31. Jung S, Yu JK, Shin SH, Park KG, Jekarl DW, Han K, et al. False susceptibility to Amikacin by VITEK 2 in *Acinetobacter baumannii* harboring armA. *Ann Clin Lab Sci* 2010;40:167-71.
32. Ko JH, Baek JY, Peck KR, Cho SY, Ha YE, Kim SH, et al. Disc-repant susceptibility to gentamicin despite amikacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* by VITEK 2 represents false susceptibility associated with the armA 16S rRNA methylase gene. *J Med Microbiol* 2017;66:1448-50.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Uzm. Dr. Reyhan YiŞ

İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği,
İzmir-Türkiye

E-posta: reyhanyis@yahoo.com