

Bir Üniversite Hastanesinde *armA* 16S rRNA Metilaz Geninin Yayılımı ve Hızlı Duyarlılık Test Sistemlerinde Belirlenen Aminoglikozid Duyarlılık Hataları

Spread of *armA* 16S rRNA Methylase Gene in a Tertiary Hospital and Errors in Aminoglycoside Susceptibility Results of Rapid Susceptibility Test Systems

Ayşe Nur SARI KAYGISIZ¹(ID), Özgen ALPAY ÖZBEK²(ID), Abdurahman GÜLMEZ³(ID), İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM²(ID), Zeynep GÜLAY²(ID)

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences, Department of Medical Microbiology, İzmir, Türkiye.

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

² Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Türkiye.

³ T.C. Sağlık Bakanlığı Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

³ Turkey Ministry of Health Çam ve Sakura City Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Istanbul, Türkiye.

Makale Atfı: Sarı Kaygisız AN, Alpay Özbeke Ö, Gülmez A, Öktem İMA, Gülay Z. Bir üniversite hastanesinde *armA* 16S rRNA metilaz geninin yayılımı ve hızlı duyarlılık test sistemlerinde belirlenen aminoglikozid duyarlılık hataları Mikrobiyol Bul 2022;56(3):534-544.

ÖZ

Aminoglikozidler (AG) günümüzde karbapenem dirençli gram-negatif bakterilere karşı kombine tedavilerde sıklıkla tercih edilen ilaçlardır. Aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı yüksek düzey dirence neden olan 16S rRNA metilazların varlığı bu tedavi seçeneğini kısıtlamaktadır. Otomatize sistemlerde AG duyarlılıklarını belirlerken oluşan hataların, 16S rRNA metilaz genlerinden *armA* geni ile ilişkili olabileceğine dair çalışmalar bulunmakla beraber, bu hataların kesin nedeni henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada, hastanemiz *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında farkedilen VITEK 2.0 (bioMérieux, MarcyEtoile, Fransa) ve disk difüzyon AG duyarlılık sonuçlarındaki uyumsuzlukların 16S rRNA metilazlar ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Laboratuvarında 1 Ocak 2018-10 Şubat 2018 tarihlerinde izole edilen bütün *K.pneumoniae* ve *A.baumannii* izolatları prospektif olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca, VITEK 2.0 sistemi ve disk difüzyon yöntemi ile belirlenen amikasin (AK) ve gentamisin (GEN) duyarlılık sonuçları arasında uyumsuzlukların ilk kez fark edildiği Temmuz 2017 tarihine ait birer *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* izolatu da çalışmaya alınmıştır. Toplam 37 izolata [*A.baumannii* (n= 20) ve *K.pneumoniae* (n= 17)] ait amikasin ve gentamisin duyarlılık sonuçları VITEK 2.0 sistemi, disk difüzyon ve altın standart sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile beraber değerlendirilerek, küçük hata ["minor error" (mE)], büyük hata ["major error" (ME)] ve çok büyük hata [very major error" (VME)] oranları hesaplanmıştır. İzolatlarda *rmtB*, *rmtC* ve *armA* genleri polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ile araştırılarak, 16S rRNA metilaz varlığının hatalı duyarlılık sonuçları ile ilişkisi incelenmiştir. Ayrıca çalışma izolatlarının 13'ünde görülen çift zon fenotipinin hızlı duyarlılık testlerindeki etkisini incelemek amacıyla disk difüzyon

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali Öktem, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35340, Balçova/İzmir. **Tel (Phone):** +90 232 412 45 03, **E-posta (E-mail):** mali.oktem@gmail.com

yöntemi sonuçları dört, altı, sekiz saatlik ve bir gecelik inkübasyon süreleri sonunda değerlendirilmiştir. Disk difüzyon yöntemi sonuçlarının tümü sıvı mikrodilüsyon sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. VITEK 2.0 sistemi ile sıvı mikrodilüsyon yöntemi karşılaştırıldığında, AK ve GEN duyarlılık sonuçları için sırasıyla, %10.3 ve %12.1 oranında VME saptanmış ve mE oranı ise AK ve GEN için sırasıyla, %8.1 ve %5.4 olarak bulunmuştur. Çalışma izolatlarında *rmtB* ve *rmtC* genleri saptanmazken, 17 *K.pneumoniae* izolatının sekizinde (%47.1) ve 20 *A.baumannii* izolatının 15 (%75)'inde *armA* geni pozitif bulunmuştur. *A.baumannii* izolatlarında görülen üç VME'nin tümü AK duyarlılık sonuçlarında saptanmıştır. Bunlardan ikisinin *armA* geni pozitif, birinin *armA* geni negatif izolatlar olduğu belirlenmiştir. *K.pneumoniae* izolatlarında saptanan dört VME'nin hepsi sadece GEN duyarlılık sonuçlarına ait olup bu izolatların tümünün *armA* geni pozitif olarak tespit edilmiştir. VITEK 2.0 duyarlılık sonuçlarında saptanan hatalar ile çift zon fenotipi arasında direkt olarak bir ilişki belirlenmemiştir. İzolatlar, 4-16 saatlik inkübasyon zaman aralığında değerlendirildiğinde, aminoglikozid disklerini çevreleyen inhibisyon zonu içerisinde dirençli kolonilerin minimum altı saatlik inkübasyon süresinden sonra tespit edilebildiği görülmüştür. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, *armA* geni pozitif *A.baumannii*'yi Türkiye'den bildiren ilk çalışmadır. İzolatlarımızda saptanan yüksek *armA* gen pozitiflik oranı *armA* gen prevalansının ülkemizde ya da en azından bölgemizde son yıllarda arttığını düşündürmektedir. VITEK 2.0 sistemi AG duyarlılık sonuçlarında kabul kriteri üzerinde VME oranı gösterilmiş olup, oluşan hataların direkt olarak *armA* gen pozitifliği ya da çift zon fenotipi ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Disk difüzyon yönteminde, hızlı duyarlılık prosedürü uygulandığında, AG sonuçlarının altıncı saatten itibaren değerlendirilmesi gerektiği de çalışmamızın bir diğer önemli bulgusudur.

Anahtar kelimeler: Duyarlılık testleri; *armA*; 16S rRNA metilazlar.

ABSTRACT

Aminoglycosides (AGs) are actively used in combination therapies against carbapenem resistant gram negative species in recent years. Spread of 16S rRNA methylases which can cause high-level resistance to AG antibiotics, limits this treatment choice. Although there are some studies showing that errors in determining AG susceptibility in automated systems may be related to the *armA* gene, one of the 16S rRNA methylase genes, the exact reason for these errors is not yet known. In our study, we aimed to investigate the relevance of 16S rRNA methylases to the discrepancies between VITEK 2.0 and disc diffusion test results for amikacin (AK) and gentamicin (GEN) susceptibility of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. All *K.pneumoniae* and *A.baumannii* isolates from 1st January-10th February 2018 were collected prospectively and included in the study. Additionally, two initial isolates from July 2017 (one *K.pneumoniae* and one *A.baumannii* isolate) for which first discrepant susceptibility results were determined, were also included. Amikacin and gentamicin susceptibility results of 37 isolates [*A. baumannii* (n= 20) and *K.pneumoniae* (n= 17)] were evaluated together with VITEK 2.0 system, disc diffusion and gold standard broth microdilution methods and minor error (mE), major error (ME) and very major error (VME) rates were calculated. The *rmtB*, *rmtC* and *armA* genes in isolates were investigated by polymerase chain reaction (PCR) and the relationship between the presence of 16S rRNA methylases and false susceptibility results were examined. In addition, disc diffusion test results were evaluated at the end of four, six, eight hours and one night incubation periods to examine the effect of the double zone phenotype observed in 13 of the study isolates on rapid susceptibility tests. All disc diffusion test results were found to be compatible with broth microdilution test results. When the VITEK 2.0 system and the broth microdilution test were compared, 10.3% and 12.1% VME and 8.1% and 5.4% mE were detected for AK and GEN susceptibility results, respectively. While *rmtB* and *rmtC* genes were not detected in the study isolates, *armA* gene was positive in eight (47.1%) of 17 *K.pneumoniae* isolates and in 15 (75%) of 20 *A.baumannii* isolates. All three VMEs in *A.baumannii* isolates were detected in AK susceptibility results. Two of those were *armA* gene positive and one was *armA* gene negative isolates. All four VMEs in *K. pneumoniae* isolates were detected in GEN susceptibility results only, and all of these isolates were *armA* gene positive. No direct correlation was found between the errors detected in the VITEK 2.0 system susceptibility results and the double zone phenotype. When the isolates were evaluated in the 4-16 hours incubation time interval, it was observed that resistant colonies could be detected after a minimum of six hours of incubation period in the inhibition zone surrounding the aminoglycoside discs. To the best

of our knowledge this is the first report of *armA* producing *A.baumannii* from Turkey. The high rate of *armA* gene positivity detected in our isolates suggested that the prevalence of *armA* gene increased in our country or at least in our region, in recent years. In the AG susceptibility results of the VITEK 2.0 system, the rate of VME above the acceptance criterion has shown that the errors occurred were not directly related to *armA* gene positivity or double zone phenotype. Finally, our study results indicated that AG susceptibility results should be evaluated minimum six hours later of incubation while implementing rapid susceptibility tests.

Keywords: Susceptibility tests; *armA*, 16S rRNA methylases.

GİRİŞ

Aminoglikozidler (AG), son yıllarda artan karbapenem direnç oranlarından dolayı gram-negatif bakterilere karşı kombinasyon tedavilerinde sıklıkla tercih edilen ilaçlardır¹. Bu ilaçlara karşı en yaygın direnç mekanizması aminoglikozid modifiye edici enzimler (AME) tarafından enzimatik inaktivasyondur. Belirli AME'lerin bazı aminoglikozidleri etkilediği fakat bu gruba ait tüm üyelere karşı etkin olmadığı bilinmektedir. Diğer bir direnç mekanizması ise çoğunlukla plazmit kökenli olan ve tüm AG ilaçlara karşı yüksek düzeyde dirence yol açan 16S rRNA metilazlardır. 16S rRNA metilazlar Kore, Japonya ve Çin gibi bazı ülkelerde endemik olmakla birlikte, *Enterobacterales* spp. ve *Acinetobacter* spp. gibi karbapenemaz üreten gram-negatif basillerin (KÜ-GNB) artışına paralel olarak tüm dünyada prevalansı artmıştır². Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarının ülkemizdeki sağlık kuruluşlarında endemik olduğu bilinmekle beraber, bu türlerin 16S rRNA metilaz gen içeriği hakkındaki veri kısıtlıdır³⁻⁵.

Antibiyotik duyarlılığının hızlı ve pratik bir şekilde değerlendirilmesini sağlayan otomatize sistemler, Türkiye'deki klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak (\geq %80) kullanılmaktadır ve çoğu zaman sonuçlar başka bir değerlendirmeye gerek duymadan klinisyene gönderilebilmektedir⁶. Laboratuvarımızda antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde 2017 yılında VITEK 2.0 sistemi (bioMerieux, MarcyEtoile, Fransa) kullanılmaktaydı. Difüzyon testleri (disk ve gradiyent şerit), kalite kontrol adımı olarak rastgele bir şekilde VITEK 2.0 sistemine paralel olarak çalıştırılmaktaydı. Bu sayede, KÜ-GNB'nin otomatize sistem ve difüzyon testleri AG sonuçları arasında uyumsuzluklar olduğu fark edilmiştir. Yapılan incelemelerde, VITEK 2.0 sisteminde aminoglikozid sonuçlarında gözlenen uyumsuz sonuçların 16S rRNA metilazlar ile ilişkili olabileceğine dair yayınların bulunduğu belirlenmiştir⁷⁻¹⁰.

Bu çalışmada, hastanemiz *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* izolatlarında tespit edilen VITEK 2.0 ve disk difüzyon AG duyarlılık sonuçlarındaki uyumsuzluğun 16S rRNA metilazlar ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma İzolatları

2017 yılı Temmuz ayında iki farklı hastanın idrar örneğinden izole edilen *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* izolatlarında VITEK 2.0 sistemi ile belirlenen amikasin (AK) ve genta-

misin (GEN) duyarlılıkları sırasıyla, *A.baumannii* için dirençli (MİK \geq 16 mg/L) ve duyarlı (MİK= 8 mg/L), *K.pneumoniae* için ise duyarlı (MİK= 2 mg/L) ve dirençli (MİK \geq 64 mg/L) olarak belirlendi. Her iki izolata ait disk difüzyon plaklarında gentamisin (10 μ g) ve amikasin (30 μ g) diskleri etrafında çift zon (disk etrafında dıştaki üremeden daha silik bir üreme ile görülen ikinci bir üreme bölgesinin oluşumu) olduğu görüldü. İçteki inhibisyon zonları 6 mm (diskler etrafında tamamen üreme gözlenmesi) olarak ölçüldü. İç zonda üreyen bakterilerden alınan pasajdan tek koloni ekimi yapılarak disk difüzyon duyarlılık testleri tekrar edildi. Aynı fenotip ve duyarlılık sonuçlarının oluştuğu gözlemlendi. İki izolat ileri inceleme için stoklandı.

Bu gözlemlerden sonra VITEK 2.0 sisteminin AG duyarlılık hata oranını belirlemek amacıyla, 1 Ocak 2018-10 Şubat 2018 tarihlerinde üreyen bütün *K.pneumoniae* ve *A.baumannii* izolatlarından her hastanın yalnızca ilk izolatu alınarak seçim yapıldı. Başlangıçtaki iki izolat ile beraber toplam 37 izolat [*A.baumannii* (n= 20), *K.pneumoniae* (n= 17)] çalışmaya dahil edildi.

Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (ADT)

İzolatların, AG duyarlılıkları üç yöntem ile incelendi. Birinci yöntemde izolatlar için rutinde belirlenen VITEK 2.0 duyarlılık sonuçları kaydedildi. İkinci yöntemde Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)]'ne göre disk difüzyon yöntemi uygulandı¹¹. Üçüncü yöntemde ise sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulandı ve sonuçlar EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi^{11,12}.

Kısa İnkübasyon Zamanlı Disk Difüzyon Testi

Çift zon fenotipinin, inkübasyonun hangi zaman aralığında oluştuğunu gözlemlemek için, AK ve GEN duyarlılıkları ikinci bir disk difüzyon çalışması ile incelendi. Bu çalışmada plaklarda, dört, altı, sekiz saatlik ve bir gecelik inkübasyon sonrasında zon çapları ve çift zon oluşumu değerlendirildi. Bu inkübasyon süreleri EUCAST'ın kan kültürü şişelerinden doğrudan hızlı antimikrobiyal duyarlılık testi önerileri referans alınarak belirlendi¹³. Her inkübasyon süresi sonunda çift zonun oluşup oluşmadığı ve zon çapları kaydedildi.

Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi

Çalışma izolatlarında *armA*, *rmtB* ve *rmtC* 16 S rRNA metilaz genleri kendi geliştirdiğimiz multipleks polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] protokolü ile önceden tanımlanan primerler kullanılarak araştırıldı (Tablo I)¹⁴. İzolatlardaki karbapenemaz varlığı *A.baumannii* izolatlarında OXA-karbapenemaz grubu, *K.pneumoniae* izolatlarında OXA-48 ve NDM karbapenemazları araştırılarak belirlendi¹⁵⁻¹⁷.

Hata Oranlarının Hesaplanması ve İstatistiksel Analiz

AK ve GEN antibiyotiklerine ait disk difüzyon ve VITEK 2.0 duyarlılık sonuçları altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi sonuçları ile karşılaştırılarak küçük hata ["minor error" (mE)], büyük hata ["major error" (ME)] ve çok büyük hata [very major error" (VME)] oranları belirlendi¹⁸.

Tablo I. 16S rRNA Metilaz Genleri Multipleks PCR Reaksiyon Karışımı ve Yürütme Şartları

PCR Karışımı (1 örnek için)		Yürütme Şartları			Beklenen Bant Büyüklükleri	
10X Taq tamponu	5 µl	1 çevrim	Ön Denatürasyon	94°C→5 dakika	armA	315 bp
2 mm MgCl ₂	4 µl	30 çevrim	Denatürasyon	94°C→ 25 saniye		
2 mm dNTP	5 µl		Bağlanma	55°C→ 40 saniye		
10 pmol'lük üç primer çiftinin her birinden	1 µl		Uzama	72°C→ 50 saniye	rmtB	173 bp
2.5 ünite Taq polimeraz	0.5 µl	1 çevrim	Son uzama	72°C→ 6 dakika	rmtC	711 bp
Kalıp DNA	5 µl	1 çevrim	Tutma	4°C→ ∞		
Steril distile su	24.5 µl					

BULGULAR

Disk difüzyon plaklarında içteki zonun inhibisyon zonu olarak değerlendirilmesi ile belirlenen duyarlılık sonuçları, sıvı mikrodilüsyon sonuçları ile tam uyumlu bulunmuştur. VITEK 2.0 sistemi ile sıvı mikrodilüsyon yöntemi karşılaştırıldığında, 37 çalışma izolatına ait toplam 74 AK ve GEN duyarlılık sonucunda %16.2 oranında (n= 12) uyumsuzluk tespit edilmiştir. Uyumsuz sonuçların yedisi çok büyük hata (VME) ve beşi küçük hata (mE) kategorisindedir. AK ve GEN duyarlılık sonuçları için VME oranı sırasıyla, %10.3 ve %12.1 olarak hesaplanmıştır. mE oranı, AK ve GEN için sırasıyla, %8.1 ve %5.4 olarak saptanmıştır (Tablo II).

Çalışma izolatlarında 16S rRNA metilaz genlerinden *rmtB* ve *rmtC* saptanmamıştır. On yedi *K.pneumoniae* izolatının sekizinde (%47.1), 20 *A.baumannii* izolatının ise 15 (%75)'inde *armA* geni pozitif bulunmuştur. Tüm çalışma izolatları değerlendirildiğinde *armA* geni pozitif izolat sayısı toplamda 23 (%62.2) olarak belirlenmiştir.

A.baumannii izolatlarının hepsi disk difüzyon ve VITEK 2 yöntemleri ile karbapenem dirençli ve *bla*_{OXA-51-benzeri} ile *bla*_{OXA-23-benzeri} gen bölgeleri pozitif saptanmıştır. *armA* gen pozitifliği saptanan 15 *A.baumannii* izolatının 2 (%13.3)'sinin aynı zamanda *bla*_{NDM} geni de taşıdığı belirlenmiştir.

armA geni pozitif sekiz *K.pneumoniae* izolatının tümü *bla*_{NDM} geni pozitifken, altısının aynı zamanda *bla*_{OXA-48} geninin de pozitif olduğu saptanmıştır. 16S rRNA metilazları açısından negatif toplam dokuz *K.pneumoniae* izolatının beşi disk difüzyon ve VITEK 2 yöntemleri ile karbapenem duyarlı saptanmıştır. Kalan izolatlardan üçü *bla*_{OXA-48} geni, biri ise *bla*_{NDM} geni pozitif olarak bulunmuştur.

A.baumannii izolatlarında görülen üç VME ve bir mE'nin tümü AK duyarlılık sonuçlarında saptanmıştır. VME'lerden ikisi *armA* geni pozitif, biri *armA* geni negatif izolatlarda gözlenmiştir. mE görülen izolatta da *armA* gen varlığı saptanmamıştır.

Tablo II. Çalışma İzolatlarında Belirlenen Antibiyotik Direnç Genleri ile Amikasin ve Gentamisin Duyarlılık Sonuçları

İzolat	Tür	16S rRNA metilaz	Çift zon fenotipinin görüldüğü diskler	Karbapenemaz	Duyarlılık Testi									
					Amikasin					Gentamisin				
					Disk Dif	VITEK 2 (MİK)	Sıvı Mikrodilüsyon (MİK)	Hata	Disk Dif	VITEK 2 (MİK)	Sıvı Mikrodilüsyon (MİK)	Hata		
1	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	OXA-51, OXA-23	R	S (8)	R (> 128)	VME	R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
2	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	GEN	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
3	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	-	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
4	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	-	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
5	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	AK	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
6	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
7	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	-	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
8	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	-	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
9	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
10	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	-	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
11	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	OXA-51, OXA-23, NDM	R	R (≥ 64)	R (128)		R	R (≥ 16)	R (128)	R	R (≥ 16)	R (128)
12	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	-	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
13	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	-	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
14	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	-	OXA-51, OXA-23	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
15	<i>A.baumannii</i>	<i>armA</i>	-	OXA-51, OXA-23, NDM	R	S (8)	R (> 128)	VME	R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
16	<i>K.pneumoniae</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	NDM, OXA-48	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	I (4)	R (128)	R	I (4)	mE
17	<i>K.pneumoniae</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	NDM	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	I (4)	R (> 128)	R	I (4)	mE
18	<i>K.pneumoniae</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	NDM, OXA-48	R	R (32)	R (> 128)		R	S (≤ 1)	R (> 128)	R	S (≤ 1)	VME
19	<i>K.pneumoniae</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	NDM, OXA-48	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	S (≤ 1)	R (> 128)	R	S (≤ 1)	VME
20	<i>K.pneumoniae</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	NDM, OXA-48	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	S (≤ 1)	R (> 128)	R	S (≤ 1)	VME
21	<i>K.pneumoniae</i>	<i>armA</i>	-	NDM	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)
22	<i>K.pneumoniae</i>	<i>armA</i>	AK, GEN	NDM, OXA-48	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	S (≤ 1)	R (> 128)	R	S (≤ 1)	VME
23	<i>K.pneumoniae</i>	<i>armA</i>	AK	NDM, OXA-48	R	R (≥ 64)	R (> 128)		R	R (≥ 16)	R (> 128)	R	R (≥ 16)	R (> 128)

Tablo II. Çalışma İzolatlarında Belirlenen Antibiyotik Direnç Genleri ile Amikasin ve Gentamisin Duyarlılık Sonuçları (devamı)

İzolat	Tür	16S rRNA metilaz	Karbapenemaz	Çift zon fenotipinin görüldüğü diskler	Amikasin				Gentamisin			
					Disk Dif	VITEK-2 (MIK)	Mikrodilüsyon (MIK)	Hata	Disk Dif	VITEK-2 (MIK)	Mikrodilüsyon (MIK)	Hata
24	<i>A.baumannii</i>	-	OXA-51, OXA-23	-	R	S (4)	R (32)	VME	R	R (8)	R (32)	
25	<i>A.baumannii</i>	-	OXA-51, OXA-23	-	R	R (≥ 64)	R (128)		R	R (≥ 16)	R (64)	
26	<i>A.baumannii</i>	-	OXA-51, OXA-23	-	R	R (32)	R (64)		R	R (≥ 16)	R (128)	
27	<i>A.baumannii</i>	-	OXA-51, OXA-23	-	R	I (16)	R (32)	mE	R	R (≥ 16)	R (64)	
28	<i>A.baumannii</i>	-	OXA-51, OXA-23	-	R	R (≥ 64)	R (64)		S	S (4)	S (2)	
29	<i>K.pneumoniae</i>	-	Karbapenem duyarlı	-	S	S (≤ 2)	S (8)		S	S (2)	S (2)	
30	<i>K.pneumoniae</i>	-	Karbapenem duyarlı	-	S	I (16)	S (4)	mE	S	S (2)	S (1)	
31	<i>K.pneumoniae</i>	-	Karbapenem duyarlı	-	S	S (≤ 2)	S (1)		R	R (≥ 16)	R (8)	
32	<i>K.pneumoniae</i>	-	Karbapenem duyarlı	-	S	I (16)	S (0.5)	mE	R	R (≥ 16)	R (8)	
33	<i>K.pneumoniae</i>	-	OXA-48	-	S	S (8)	S (4)		S	S (≤ 1)	S (1)	
34	<i>K.pneumoniae</i>	-	NDM	-	R	R (≥ 64)	R (64)		R	R (≥ 16)	R (64)	
35	<i>K.pneumoniae</i>	-	OXA-48	-	S	S (8)	S (2)		R	R (≥ 16)	R (64)	
36	<i>K.pneumoniae</i>	-	Karbapenem duyarlı	-	S	S (≤ 2)	S (2)		R	R (≥ 16)	R (64)	
37	<i>K.pneumoniae</i>	-	OXA-48	-	S	S (2)	S (4)		R	R (≥ 16)	R (64)	

AK: Amikasin, GEN: Gentamisin, Disk Dif: Disk difüzyonu, MIK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu, R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, VME: Çok büyük hata ("very major errors"), mE: Küçük hata ("minor errors").

K.pneumoniae izolatlarına ait duyarlılık sonuçlarında uyumsuzlukların sadece *armA* geni pozitif izolatlarda olduğu saptanmıştır. Belirlenen dört VME'nin hepsi sadece GEN duyarlılık sonuçlarında görülmüştür. İki izolatta sadece AK ve başka iki izolatta da sadece GEN için mE saptanmıştır (Tablo II).

Disk difüzyon ile duyarlılık sonuçları incelendiğinde, toplam 13 (%35.1) izolatta [*A.baumannii* (n= 6), *K.pneumoniae* (n= 7)] çift zon fenotipi görülmüştür. Bu 13 izolattın tümü *armA* geni pozitif olarak saptanmıştır. Bu fenotip, on izolatta AK ve GEN antibiyotik disklerinin her ikisi etrafında görülürken, iki izolatta yalnızca AK ve bir izolatta yalnızca GEN diski etrafında tespit edilmiştir. *armA* geni pozitif 10 izolatta çift zon fenotipi gözlenmemiştir. VITEK 2.0 duyarlılık sonuçlarında saptanan hatalar ile bu fenotip arasında direkt olarak bir ilişki belirlenmemiştir.

Disk difüzyon yönteminin, inkübasyonun dördüncü, altıncı, sekizinci saatleri ve bir gecelik inkübasyon sonunda değerlendirilmesi ile içteki dirençli zonun altı saat ve sonrasında inkübasyon sürelerinde görünür hale geldiği saptanmıştır.

TARTIŞMA

Çalışmamızda VITEK 2.0 sistemi ile elde edilen duyarlılık sonuçlarında VME oranı AK ve GEN için sırasıyla, %10.3 ve %12.1 olarak hesaplamıştır. Bu oran, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)] kabul kriteri olan < %3'ün üstündedir¹⁸. Daha önce yapılan çalışmalarda da *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* izolatlarında VITEK 2.0 sisteminin aminoglikozid duyarlılık sonuçlarında VME bildirilmiştir^{7,9,10,19}. Çalışmamızda ve önceki çalışmalarda bildirilen bu hata oranları otomatize sistemler ile AG duyarlılık sonucu verilirken ikinci bir test ile doğrulamanın gerekliliğini göstermektedir. VITEK 2.0 sisteminin ülkemizde kullanımda olan antibiyotik duyarlılık test kartlarının prospektüsünde *A.baumannii*'de amikasin duyarlılığı çalışırken alternatif yöntem uygulanması önerilmekirken, gentamisin için bir öneride bulunulmaktadır. *K.pneumoniae*'de amikasin ve gentamisin duyarlılığının çalışılması ile ilgili bir uyarıya rastlanmamıştır.

Yapılan bazı çalışmalarda, otomatize sistemler ile belirlenen AG duyarlılık sonuçlarındaki hatalar *armA* 16S rRNA metilazı ile ilişkilendirilmiştir^{7,9,10}. Çalışmamızda ise izolatların %62.2'sinde saptanan *armA* gen pozitifliği hata tipleri ile beraber değerlendirildiğinde aralarında doğrudan bir ilişki olmadığı görülmüştür. Diğer çalışmaların aksine *armA* geni pozitif olmayan bir izolatta da amikasin için VME saptanmıştır. Bunun nedeni çalışma dizaynımız ile ilgili olabilir. Çalışmamızda, önceki çalışmalardan farklı olarak izolatlar belirli özelliklerine göre seçilmemiş, prospektif olarak belli bir zaman aralığında üreyen tüm izolatlar incelenmiştir.

İzolatlarımızın 13'ünde görülen çift zon fenotipinin, saptanan hatalar ya da *armA* gen pozitifliği ile doğrudan bir ilişkisinin olmadığı görülmüştür. Jung ve arkadaşlarının çalışmasında⁷ da VITEK 2.0 sistemi ile hata veren izolatlarda, amikasin için çift zon fenotipi gösterilmiştir. Araştırmacılar, *A.baumannii*'de bu fenotip ile *armA* gen pozitifliği arasında-

ki ilişkiyi anlamak amacıyla yaptıkları transkonjugasyon deneyleri sonucunda çift zonun sebebinin direkt olarak *armA* genine bağlı olmadığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da bu fenotipin nedeni ortaya konulmamakla beraber, çift zon fenotipi görülen tüm izolatlarda *armA* gen pozitifliğinin saptanmış olması, bu fenotipin *armA* gen taşıyıcılığına yönelik bir uyarı olabileceğini düşündürmektedir.

Çift zon fenotipinin inkübasyonun hangi aralığında oluştuğunu gözlemlemek için yaptığımız disk difüzyon çalışmalarında, içteki zonun altıncı saatten itibaren ortaya çıktığı belirlenmiştir. Geç oluşan direnç ile ilişkili bu fenotipin VITEK 2.0 gibi hızlı değerlendirme yapan sistemlerde ve disk difüzyonda inkübasyonun başlangıç saatlerinde hataya sebep olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, EUCAST'ın önerdiği, kan kültür şişelerinden hızlı antimikrobiyal duyarlılık testi yöntemi (EUCAST-RAST)¹³ ile duyarlılıkların değerlendirilmesinde dördüncü saatte sonuç verildiği durumlarda da sorun teşkil edebilir.

Ülkemizde 16S rRNA metilaz üreten *K.pneumoniae* ve *A.baumannii* izolatları ile ilgili yayımlanmış az sayıda çalışma bulunmaktadır³⁻⁵. *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* için *armA* gen pozitiflik oranı sırasıyla %75 ve %47.1 olarak bulunmuştur. Bu oranlar ülkemizden bildirilen en yüksek *armA* gen pozitiflik oranlarıdır. Bu yüksek oranlar, *armA* gen prevalansının ülkemizde ya da en azından bölgemizde son yıllarda arttığını düşündürmektedir. Bu bulgu, tüm aminoglikozidlerde yüksek düzeyde direnç sebep olabilmeleri ve transpozonlar üzerinden hızlı yayılım sağlayabilmeleri nedeniyle 16S rRNA metilazların, coğrafi bölgemizde takibini önemli kılmaktadır.

Tüm *armA* gen pozitif izolatlarımız aynı zamanda en az bir karbapenemaz geni içermektedir. Yüksek düzey aminoglikozid direnci karbapenem dirençli izolatlarla karşı kullanılan kombine tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Ayrıca, amikasin Türkiye'de idrar yolu enfeksiyon etkeni gram-negatif patojenlerin \geq %90'ı için tercih edilen bir ilaç olduğundan sonuçlarımız endişe vericidir²⁰.

Çalışmamızın kısıtlıklarından biri prospektif olarak yürütülmesine rağmen, yaklaşık bir aylık bir sürede izole edilen az sayıda izolatu içermesidir. İkinci olarak, çalışmamızda hızlı sistemlerde görülen AG duyarlılık hatalarının ve disk difüzyon yönteminde gözlenen çift zon fenotipinin kesin nedenleri ortaya konulamamıştır. Bunun için detaylı moleküler analizlerin tam genom dizileme ile yapılabilirdiği çalışmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak, çalışmamızda VITEK 2.0 sistemi AG duyarlılık sonuçlarında kabul kriterinin üstünde VME oranlarının olduğu gösterilmiş, ek bir duyarlılık testinin gerekliliği vurgulanmıştır. EUCAST-RAST protokolü ile çalışıldığında değerlendirmenin altıncı saatten itibaren yapılması gerektiği de çalışmamızın bir diğer önemli bulgusudur. Son olarak bu çalışma, ülkemizde *armA* geninin *A.baumannii*'de bildirildiği ilk çalışmadır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ramirez MS, Tolmasky ME. Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules* 2017; 22(12): 2267. <https://doi.org/10.3390/molecules22122267>
2. Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquire 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016; 30(2): 523-37. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>
3. Guven Gokmen T, Nagiyev T, Meral M, Onlen C, Heydari F, Koksal F. NDM-1 and *rmtC*-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkey. *Jundishapur J Microbiol* 2016; 9(10): e33990. <https://doi.org/10.5812/jjm.33990>
4. Ermertcan Ş, Yılmaz FF, Taşlı H, Yurtman AN, Aydemir SŞ, Hoşgör Limoncu M. Aminoglikozid dirençli gram-negatif bakterilerde plazmid aracılı metilaz genlerinin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2013; 43(1): 12-6.
5. Yiş R, Sarı Kaygısız AN, Gülay Z. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında plazmid aracılı yüksek düzey aminoglikozid direncinin araştırılması. *FLORA* 2020; 25(3): 423-32. <https://doi.org/10.5578/flora.69733>
6. World Health Organization (WHO). Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance Annual Report 2014: 38.
7. Jung S, Yu JK, Shin SH, Park KG, Jekarl DW, Han K, et al. False susceptibility to amikacin by VİTEK 2 in *Acinetobacter baumannii* harboring *armA*. *Ann Clin Lab Sci* 2010; 40(2): 167-71.
8. Arslan U, Tuncer I, Findik D, Bozdoğan B. VİTEK 2.0 and PHOENIX fail to detect high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolates with *aac-aph* gene. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29(2): 198-9. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.81785>
9. 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(2): 132-4. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.10.011>
10. Ko JH, Baek JY, Peck KR, Cho SY, Ha YE, Kim SH, et al. Diskrepant susceptibility to gentamicin despite amikacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* by VİTEK 2.0 represents false susceptibility associated with the *armA* 16S rRNA methylase gene. *J Med Microbiol* 2017; 66(10): 1448-50. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000583>
11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1, 2018. Available from: <http://www.eucast.org>.
12. International Standards Organisation (ISO). Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems-Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1:Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. 2006. ISO 20776e1.
13. Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G, The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles, *J Antimicrob Chemother* 2020; 75 (4): 968-78. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz548>
14. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007; 45(1): 88-94. <https://doi.org/10.1086/518605>
15. Samuelsen Ø, Thilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Kümmel A, Sundsfjord A. Identification of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Norway. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(3): 670-2 <https://doi.org/10.1093/jac/dkq483>

16. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 15-22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>
17. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(4): 351-3. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>
18. Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, Castanheira M, Dingle T, Hindler JA, et al. CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 2018; 56(4): e01934-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01934-17>
19. Lim J, Cho HH, Kim S, Kim J, Kwon KC, Park JW, et al. The genetic characteristics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* coproducing 16s rRNA methylase *armA* and carbapenemase OXA-23. *J Bacteriol Virol* 2013; 43(1): 27-36. <https://doi.org/10.4167/jbv.2013.43.1.27>
20. Koksali, Yılmaz G, Unal S, Zarakolu P, Korten V, Mulazimoglu L, et al. Epidemiology and susceptibility of pathogens from SMART 2011-12 Turkey: evaluation of hospital-acquired versus community-acquired urinary tract infections and ICU-versus non-ICU-associated intra-abdominal infections. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72(5): 1364-72. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw574>