

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

***PROVIDENCIA* İZOLATLARINDA AMİNOGLİKOZİD DİRENÇ
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ebru ATAYETER

Danışman

Prof. Dr. Mahmut BAYKAN

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 171418002proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2020

Tez Onay Sayfası

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Ebru ATAYETER'in "*Providencia* izolatlarında aminoglikozid direnç genlerinin araştırılması" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA/07.10.2020

Danışman

Prof. Dr. Mahmut BAYKAN

İmza

N.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.

Üye

Prof. Dr. Mehmet Özdemir

İmza

N.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.

Üye

Doç. Dr. Metin Doğan

İmza

N.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.

Üye

Prof. Dr. Uğur Arslan

İmza

S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.

Üye

Doç. Dr. Hatice Türkdağı

İmza

S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../2020 tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmza

BEYANAT

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

07.09.2020

Ebru ATAYETER



BENZERLİK RAPORU

Tezin Tam Adı: *Providencia* izolatlarında aminoglikozid direnç genlerinin araştırılması

Öğrencinin Adı Soyadı: Ebru ATAYETER

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 97 sayfa

Mahmut Baykan | Kullanıcı Bilgisi | Mesajlar | Öğretmen ▼ | Türkçe ▼ | Topluluk | Yardım | Çıkış



Ödevler Öğrenciler Not Defteri Kütüphaneler Takvim Tartışma Tercihler

GÖRÜNTÜLENİYOR: ANASAYFA > DOKTORA > DOKTORA

Bu sayfa hakkında

Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

Doktora

GELEN KUTUSU | GÖRÜNTÜLENİYOR: YENİ ÖDEVLER ▼

Dosyayı Gönder

Çevrimiçi Derecelendirme Raporu | Ödev ayarlarını düzenle | E-posta bildirmeyenler

☐	YAZAR	BAŞLIK	BENZERLİK	PUANLA	CEVAP	DOSYA	ÖDEV NUMARASI	TARİH
☐	Ebru Atayeter	 Doktora	%7 	--	--		1387543283	15-Eyl-2020

Danışman Öğretim Üyesi Adı Soyadı: Prof. Dr. Mahmut BAYKAN

İmza:



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sürecinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve her konuda bana yardımcı olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Mahmut BAYKAN' a, birçok konuda desteğini aldığım Anabilim Dalı Öğretim Üyelerimiz Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR, Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU, Doç. Dr. Metin DOĞAN ve Dr. Öğ. Üyesi Fatma ESENKAYA TAŞBENT hocalarıma, tezimi 171418002 no' lu proje ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü yöneticilerine son olarak tüm eğitim hayatım boyunca benden hiçbir zaman desteklerine esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Ebru ATAYETER

İÇİNDEKİLER

iç Kapak.	i
Tez Onay Sayfası	ii
Beyanat.....	iii
Benzerlik Raporu	iv
Teşekkür.....	v
İçindekiler	vi
Kısaltmalar	viii
Şekiller Listesi.....	ix
Tablolar Listesi.....	x
Özet	xii
Abstract	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Providencia</i>	4
2.1.1.Tarihçe ve Taksonomi	4
2.1.2. <i>Providencia</i> Genel Özellikler	6
2.1.3. Klinik Önemi.....	9
2.2.Antibiyotikler	10
2.2.1.Antibiyotiklerin Keşfi ve Tarihçesi	10
2.2.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması ve Etki Mekanizmaları	12
2.2.3.Antibiyotik Direnci	13
2.3.Aminoglikozidler	15
2.3.1.Aminoglikozidler Keşfi ve Tarihçesi	15
2.3.2.Aminoglikozidler Genel Özellikleri	17
2.3.3.Aminoglikozitlerin Yapısı ve Sınıflandırılması	18
2.3.4.Spektrum Alanı	21
2.3.5.Aminoglikozidler Hücreye Girişi	22
2.3.6.Aminoglikozidler Antimikrobiyal Etki Mekanizması	24
2.3.7.Aminoglikozid Direnç Mekanizması	24
2.3.8.Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimleri Oluşturan Genlerinin Orijini	41
2.3.9.16S rRNA Metiltransferazlar	42
2.3.9.1.Etki Şekli	44
2.3.9.2.16S RMTaz Enzimlerinin Yayılımı	46
3.MATERYAL- METOD	49
3.1.Çalışma Prosedürü	49
4.BULGULAR	61
5.TARTIŞMA	71
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	75
7.ÖZGEÇMİŞ.....	76

8.KAYNAKLAR.....	77
9.EKLER.....	85



KISALTMALAR

DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA:	Ribo Nükleik Asit
PPA:	Fenil pirüvik asit
DOS:	Deoksistreptamin
LPS:	Lipopolisakkarit
EDP-I:	Enerjiye bağımlı faz I
EDP-II:	Enerjiye bağımlı faz II
rRNA:	Ribozomal RNA
mRNA:	Mesajcı RNA
aa-tRNA:	Aminoasil-tRNA
PAE:	Postantibiyotik etki
AG:	Aminoglikozid
AME:	Aminoglikozidleri modifiye eden enzim
OMP:	Dış Membran Proteini
RND:	Direnç nodülasyon hücre bölünmesi
MFP:	Membran füzyon proteini
AAC:	Asetiltransferaz
ANT:	Nükleotidiltransferaz
APH:	Fosfotransferaz
MIC:	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
PMQR:	Plazmid aracılı kinolon direnci
ArmA:	Aminoglikozid direnci konsantrasyonu
RmtA:	Ribozomal RNA metiltransferaz A
RmtB:	Ribozomal RNA metiltransferaz B
RMTaz:	Ribozomal RNA metiltransferaz
SAM:	S-adenosilmetiyonin
PCR:	Polymerase Chain Reaction
EMB:	Eosin Methylen-blue Lactose Sucrose agar
GSBL:	Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
EUCAST:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
AmpC:	Ampler sınıf C sefalosporinaz

Şekiller Listesi

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. 2-deoksistreptamin ve Streptidin'in yapısı	17
Şekil 2.2. Başlıca aminoglikozidlerin kimyasal yapıları	19
Şekil2.3. Aminoglikozidlerin normal aktivitesinin (mavi) ve direnç mekanizmasının gösterimi	23
Şekil 2.4. Bazı AME'lerinaminoglikozidlerimodifiye ettiği bölgeler	27
Şekil 2.5.G1405 16S RMTases'infilogenetik ağacı	42
Şekil 2.6.RMTaz ve donör moleküllerinin kristal yapıları	44
Şekil 2.7.Ribozomal hedeflerinde belirli kalıntılarla etkileşime giren 4,6 2-DOS ve 4,5 2-DOS aminoglikozidinin moleküler temsili	44
Şekil 3.1. <i>Providenciastuartii</i> EMB besiyeri koloni görünümü	49
Şekil 3.2. Çift Disk Sinerji Testi ileESBL'nin gösterimi	51
Şekil 4.1. PCR amplifikasyon eğrisi	62
Şekil 4.2.Pozitif bulunan genlerin jel elektroforez görüntüleri	66
Şekil 4.3. Örneklerin geldiği servisler	67
Şekil 4.4. Hastaların cinsiyet dağılımı	67
Şekil 4.5. Hastaların Yaş Dağılımı	67
Şekil 4.6.Muller Hilton aminoglikozid disk difüzyon plağı	70

Tablolar listesi

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. <i>Providencia</i> cinsinin taksonomik tarihçesinin zaman çizelgesi	5
Tablo 2.2. <i>Providencia</i> türlerinin biyokimyasal reaksiyonlara göre farklılaşması	7
Tablo 2.3. Antibiyotiklerin tarihsel kronolojisi	11
Tablo 2.4. Antimikrobiyal ajanların etki mekanizmaları	12
Tablo 2.5. Başlıca aminoglikozidlerin elde edildiği mikroorganizmalar ve izolasyon yılları	15
Tablo 3.1. <i>Enteobacterales</i> Antibiyotik MIC Değerleri ve İnhibisyon Zon Çapları	50
Tablo 3.2. Çalışmaya dahil edilen AME gen listesi	55
Tablo 3.3. Çalışmaya dahil edilen genlerin baz dizilimi	56
Tablo 4.1. PCR sonuçları pozitif olan genlerin listesi	58
Tablo 4.2. Hastalardan izole edilen suşların izole edildiği klinik örnekler, aminoglikozid ilaç duyarlılıklarının inhibisyon zon çapları (mm) ve MIC değerleri (mg/L)	68

ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROVIDENCIA İZOLATLARINDA AMİNOGLİKOZİD DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru ATAYETER

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi / Konya-2020

Özellikle uzun süre hastanede kalan kişilerde ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara sebebiyet veren *Providencia* türlerindeki çoklu ilaç direncinin bir parçası olan aminoglikozid ilaç direncinin aydınlatılmasına yardımcı olmak amacıyla yaptığımız çalışmada bu dirence sebep olan genlerin varlığını belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamıza Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı' na gönderilen ve kültüre alınmış biyolojik materyallerden *Providenciaspp.* üreyen ve aminoglikozid ilaç direnci gözlenen bakteriler dahil edilmiştir. İlaç direncine neden olan genleri moleküler düzeyde araştırmak amacıyla PCR yöntemi kullanılmış ve 33 genin varlığı araştırılmıştır.

Araştırmalarımız sonucunda yedi tanesi aminoglikozidmodifiye eden enzim geni (*aac(2'')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IIc*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr*, *ant(2')-Ia*, *ant(3'')-Ia*) ve bir tanesi de 16S rRNAmetilasyon geni (*armA*) olmak üzere toplamda sekiz adet gen pozitif olarak bulunmuştur.

Çalışmamızdan elde edilen veriler doğrultusunda *Providencia* türlerindeki aminoglikozid ilaç direncine sebep olan birçok gen bir arada bulunmuştur. Endişe verici olan bu bakterilerin diğer bakterilerden horizontal olarak ilaç direnç genlerini alabildiği ve kendi DNA' sına entegre edebildiği, aynı şekilde kendi direnç genlerini de diğer bakterilere aktarabileceği gerçeğidir. Bunun önüne geçmek ve direnç oranını azaltmak amacıyla antibiyotik kullanımında daha dikkatli davranılmalı ve direnç genleri göz önüne alınarak tedavi stratejileri geliştirilmelidir.

Anahtar Kelimeler; Aminoglikozid direnci, *Providencia spp.*, 16S rRNA metilasyonu

ABSTRACT

T. C.

NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

INVESTIGATION OF AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE GENES IN *PROVIDENCIA* ISOLATES

Ebru ATAYETER

Department of Medical Microbiology

PhD Thesis/ Konya-2020

We aimed to determine the presence of genes that cause this resistance in our study to help elucidate aminoglycoside drug resistance, which is a part of multi-drug resistance in *Providencia* species that cause serious nosocomial infections, especially in people who stay in hospital for a long time.

Providencia spp., one of the biological materials sent to Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty Medical Microbiology Laboratory and taken to culture. Included are bacteria that grow and exhibit aminoglycoside drug resistance. PCR method was used to investigate the genes causing drug resistance at the molecular level and the existence of 33 genes was investigated.

As a result of our research, a total of eight genes, seven of which are aminoglycoside modifying enzyme genes (*aac* (2'')- *Ia*, *aac* (3) -*IIa*, *aac* (3) -*IIc*, *aac* (6'')- *Ib*, *aac* (6')- *Ib-cr*, *ant* (2'')- *Ia*, *ant* (3'')- *Ia*) and one of which is 16S Rrna methylation gene (*armA*), were found to be positive.

In line with the data obtained from our study, many genes that cause aminoglycoside drug resistance in *Providencia* species were found together. What is alarming is the fact that bacteria can take drug resistance genes horizontally from other bacteria and integrate them into their own DNA, as well as transmit their resistance genes to the bacteria. In order to prevent this and to reduce the resistance rate, more careful attention should be paid to the use of antibiotics and treatment strategies should be developed considering the resistance genes.

Keywords; Aminoglycoside resistance, *Providencia spp.*, 16S rRNA methylation

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Antibiyotikler keşiflerinden günümüze kadar bakteriyel enfeksiyonların tedavisi edilmesi ve kontrol altına alınmasında oldukça etkili olmuşlardır (Gold ve ark. 1996). Tarihsel süreçte antibiyotiklerin keşfi çok sayıda hastalığın tedavisi açısından çok önemli olsa da bakteriler bu ajanlara karşı direnç geliştirme konusunda geride kalmamışlar ve çeşitli mekanizmalarla bu ajanların etkilerine karşı kendilerini koruma altına almışlardır. Neredeyse sadece yüzyılın başına kadar hastane ortamıyla sınırlı olan bu durum bugün toplum kökenli enfeksiyonlar için de geçerli hale gelmiştir (Ruppé ve ark. 2015).

Antibiyotik ailesinin önemli bir üyesi olan aminoglikozidler, 1940’larda klinik kullanıma girdiklerinden beri bakterilerle mücadelede antimikrobiyal silahlanmanın önemli bir parçası olmuşlardır. Aminoglikozidlerin etki spektrumu, hızlı bakterisidal aktivite ve uygun kimyasal ve farmakokinetik özellikleri bu ajanları klinik olarak yararlı bir ilaç sınıfı haline getirmiştir. Geniş spektrumlu β -laktam antibiyotikler gibi etkili ve daha az toksik ajanların keşfedilmesi, aminoglikozidlerin kullanımında bir miktar azalmaya yol açmasına rağmen son zamanlarda çok ilaca dirençli Gram negatif patojenlerin yaygınlaşması aminoglikozid sınıfına duyulan ilgiyi yeniden arttırmıştır (Ramirez ve Tolmasky 2010).

Aminoglikozid grubu antibiyotiklerin temel hedeflerini aerobik Gram pozitif bakteriler ve Gram negatif bakteriler, oluşturur (Tsodikova ve Labby 2016). 1970’lerde geliştirilen amikasin, netilmisin ve dibekasin gibi aminoglikozidlerin yarı sentetik çeşitleri, gentamisin, kanamisin ve tobramisin gibi eski çeşitlere karşı artan direnç oranlarının önüne geçmek için tasarlanmıştır. Önceleri bu antibiyotiklerin dünya çapında kullanımının daha az olmasından dolayı direnç oranının daha az olacağı beklenmekteydi ancak artan direnç enzimlerinin keşfedilmesiyle birlikte neredeyse tüm klinik açıdan önemli olan aminoglikozidlere karşı özellikle antibiyotik kullanımının düzenlenmediği gelişmekte olan ülkelerde direnç oranı her geçen gün artmıştır (Gad ve ark. 2011).

Aminoglikozidler, bakterilerde translasyon hatalarına neden olarak ve translokasyonu inhibe ederek etki gösterirler (Davies ve Davis 1968). Hedef sahaları, kodon-antikodonun doğruluğunun değerlendirildiği ribozomal alanları içerir (Purohit ve ark. 1994). Özellikle, ribozom fonksiyonlarında değişikliklere yol açan yüksek

oranda korunmuş bir 16S RNA motifine bağlanırlar. 16S rRNA ve aminoglikozidlerarasındaki bağlanmada yer alan bazların ikame edilmesi veya metilasyonu, antibiyotik için afinite kaybına ve konağın direncine yol açabilir (Yoshizawa ve ark. 1999).

Bu antibiyotikler özellikle nozokomiyal ortamlarda enfeksiyonlara neden olan Gramnegatifbakterilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bakteriler fırsatçı patojendirler ve immünsisitemi baskılanmış kişilerde özellikle hastane ortamlarında enfeksiyonlar oluşturabilirler (Ruppé ve ark. 2015).

Providencia cinsi üyeleri, daha önce *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan 2016 yılından itibaren ise *Morganellaceae* ailesinde sınıflandırılan fırsatçı patojen Gram negatif basillerdir (Adeolu ve ark. 2016). Nadiren enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıksa da özellikle hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde ve yaşlı bakım evlerinde uzun süreli katater kullanımına bağlı olarak tedavisi güç salgınlara yol açabilmektedir (Wie 2015). Bu enfeksiyonlar normal şartlarda antibiyotiklerin yardımıyla tedavi edilebilmektedir ancak günümüzde, farklı antibiyotik gruplarına karşı birden fazla direnç mekanizmasına sahip olan çoklu ilaca dirençli suşlarınortaya çıkması giderek artan küresel bir sorun haline gelmiştir (Partridge 2015). Gram negatif bakterilerdeki antimikrobiyal direnç, antibiyotik inaktiveedicienzimlerin ve nonenzimatik mekanizmaların ekspresyonundan kaynaklanır (Ruppé ve ark. 2015).

Bakterilerdeki antibiyotik direnç gelişimi çok sayıda uluslararası sağlık ve politik zirveye konu olmuştur. Antibiyotik direncinin yol açtığı tehditlerle mücadele etmek için hem uluslararası hem de ulusal düzeyde kapsamlı raporlar, kılavuzlar ve tavsiyeler bol miktarda yayınlanmış olmasına rağmen, antibiyotik direnci tüm dünyada artmaya devam etmektedir (Exner ve ark. 2017).

Çalışmamızda yer verdiğimiz *Providencia* cinsi özellikle nozokomiyal ortamlarda tedavisi güç ve bazen salgınlara kadar yol açabilen enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu enfeksiyonlar nadir görülmekle birlikte çoklu ilaç direnci gözlenmesinden ötürü tedavisi oldukça güç bir hale gelebilmektedir. Ayrıca özellikle yoğun bakım hastalarında enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan bu bakteri çoğunlukla koenfeksiyon şeklinde görülmektedir bu durum diğer bakterilerle arasında plazmid aracılı direnç genlerinin aktarılabilceğini düşündürmektedir.

İzolatlarımızda gözlenen çoklu ilaç direncinde rol oynayan direnç genlerinin aynı plazmid üzerinde taşınmış olabileceğini gösteren literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur.

Ülkemizde çeşitli bakterilerde aminoglikozid ilaç direnciyle ilgili olarak birçok çalışma mevcuttur ancak *Providencia* türlerine, nadir enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmasından dolayı az sayıda çalışmada yer verilmiştir. Çalışmamızda, literatürdeki bu boşluğu doldurmak ve özellikle nozokomiyal enfeksiyonların tedavisine yardımcı olmak amacıyla bu suşlardaki aminoglikozid direnç genlerini belirlemeyi amaçladık.



2.GENEL BİLGİLER

2.1.PROVIDENCIA

2.1.1.Tarihçe ve Taksonomi

Providencia cinsi taksonomik olarak, Proteobacteria şubesinde, Gammaproteobacteria sınıfının Enterobacteriales ordosunda bulunan *Morgenallaceae* ailesinde yer alır. Gammaproteobacteria sınıfı üyeleri Gram negatif, fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyan, çubuk şeklindeki çeşitli bakterilerin oluşturduğu geniş bir gruptur. Bu grubun üyeleri toprakta, suda, bitkiler, böcekler, hayvanlar ve insanlar dahil olmak üzere canlı organizmalarla bağlantılı olarak bir dizi farklı ekolojik nişte yaşar (Adeolu ve ark. 2016).

Şu anda, NCBI genom veri tabanında bulunan Enterobacteriales ordosunda sekiz aile (*Budviciaceae*, *Enterobacteriales*, *Erwiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Thorselliaceae*, *Yersiniaceae*) ve yayınlanmış 54 cinse ait 14.000'den fazla genom bulunmaktadır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

Morganellaceae familyasında, *Morganella* (Fulton, 1943), *Arsenophonus* (Ghera ve diğerleri, 1991), *Cosenzaea* (Giammanco ve diğerleri, 2011), *Moellerella* (Hickman-Brenner ve diğerleri, 1984), *Photorhabdus* (Boemare ve diğerleri, 1993), *Proteus* (Hauser, 1885), *Providencia* (Ewing, 1962) ve *Xenorhabdus* (Thomas ve Poinar Jr, 1979) cinsleri yer alır.

Providencia cinsinde *P.alcalifaciens*, *P. burhodogranariea*, *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii*, *P. sneebia*, *P. stuartii*, *P. thailandensis* ve *P. vermicola* olmak üzere dokuz tür bulunmaktadır. Ayrıca yeni bir tür olan *P. huaxiensis* yakın zamanda onuncu tür olarak önerilmiştir (Ksentini ve ark. 2019).

1904 yılında Rettger, koleraya benzeyen bir salgın sırasında tavuklardan daha önce tanımlanmamış bir organizma izole etmiş ancak o yıllarda izolatla ilgili olarak ayrıntılı bir çalışma yapmamıştır. 14 yıl sonra 1918' de Hadley ve ark. daha detaylı olarak inceledikleri bu organizmayı tanımlayıp *Bacterium rettgeri* olarak adlandırmıştır (Abdallah ve Balshi 2018). 1920' de Ornstein, insan bağırsağından izole edilen *Bacillus inconstans* adını verdiği bir organizma tanımlamış (Ornstein 1920) ve bu suş daha sonra *Providencia* cinsinin yayınlanan ilk türü olmuştur. 1944' te Gomes, daha sonra *Providencia* cinsine dahil edilecek olan “*Eberthella*

alcalifaciens” türünü tanımlamıştır (O’Hara ve ark. 2000). 1951’ de Kauffmann, Stuart’ ın çalıştığı Brown Üniversitesi’ nde bulunduğu Providence, R.I. adasının isminden esinlenerek *Providence* grubu olarak adlandırmıştır (O’Hara ve ark. 2000). Ewing 1958 ve 1962’ de *Proteea*’nın taksonomisini gözden geçirmiş ve dönüm noktası olarak kabul edilen bir öneride bulunmuştur *Providence* grubunun *Proteus* cinsine dahil edilemediğini kabul etmiş ve *Providence* grubu için doğru terimin *Providencia* olmasını ve doğru tür adının *Providencia inconstans* olması gerektiğini vurgulamıştır (Ewing 1958). Devam eden çalışmaların bir sonucu olarak, Ewing’ in artık *Providencia* alt grupları A ve B olarak 2 alt guruba ayırmıştır alt grup A’da *P. alcalifaciens*, alt grup B’ de *P. stuartii* yer almıştır (Ewing 1962). 1978 yılında yapılan bir çalışmada Brenner ve ark. DNA-DNA hibridizasyonu tekniği yöntemini kullanarak çeşitli organizmaları yeniden sınıflandırmıştır (Brenner 1978). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, *Proteus rettgeri*, *Providencia rettgeri* olarak isimlendirilirken *Proteus rettgeri* biogroup 5 ise *P. stuartii* olarak isimlendirilmiştir. 1983’ te DNA hibridizasyonu çalışmaları neticesinde, *P. alcalifaciens* biogroup 3’ ün *Proteus* grubu üzerinde erken çalışmalar yapan Robert Rustigian’ ı onurlandırmak için *Providencia rustigianii* olarak adlandırılmıştır (Brenner ve ark. 1983). Tesadüfen, 1986’ da Müller ve ark. penguenlerin dışkısından izole ettikleri yeni bir tür olan *Providencia heimbachae*’ i tanımlamıştır (Muller ve ark. 1986).

Providencia başlangıçta *Enterobacteriales* ailesinde yerleştirilmiş ancak 2016’ da *Morganellaceae* ailesine dahil edilmiştir (Hu ve ark. 2019). Tablo 2.1’ de *Providencia* cinsinin taksonomik tarihçesinin zaman çizelgesi verilmiştir.

Tablo 2.1. *Providencia* cinsinin taksonomik tarihçesinin zaman çizelgesi (O'Hara ve ark. 2000)

Keşif Tarihi	Yazar Adı	Tanımlama
1904	Rettger	İlk olarak tavuklardan izole etti ama tanımlama yapmadı
1918	Hadley ve ark.	Bu bakteriyi " <i>Bacterium rettgeri</i> " olarak tanımladı
1920	Ornstein	Organizmayı " <i>Bacillus insconstans</i> " olarak tanımladı
1923	St. John Brooks ve Rodos	" <i>Bacterium rettgeri</i> " olan bakteriyi " <i>Bacterium rettgeri</i> " olarak yeniden isimlendirmiştir
1943	Rustigian ve Stuart	<i>Proteus rettgeri</i> olarak yeniden tanımlanmasını tavsiye etmiştir
1943	Stuart ve diğ.	" <i>Anaeromonas paracolon 29911</i> " olarak tanımladı
1944	Gomes	" <i>Eberthella alcalifaciens</i> " i tanımladı
1951	Kauffmann	" <i>Anaeromonas paracolon 29911</i> " i <i>Providencia</i> grubu olarak adlandırdı
1952	Kauffmann ve Edwards	<i>Proteus rettgeri</i> olarak adlandırılmasını önermişlerdir
1954	Buttner ve ark.	<i>Providencia</i> grubunu " <i>Proteus stuartii</i> " ve " <i>Proteus rettgeri</i> " olarak adlandırdı
1955	Shaw ve Clarke	" <i>Bacillus insconstans</i> " ı " <i>Proteus insconstans</i> " olarak adlandırdı
1962	Ewing	<i>Providencia</i> cinsini 2 alt gruba ayırdı. Alt grup A <i>P. alcalifaciens</i> , alt grup B <i>P. stuartii</i>
1978	Brenner ve ark.	" <i>Proteus rettgeri</i> " yi " <i>Providencia rettgeri</i> " olarak adlandırmıştır
1983	Hickman- Brenner ve ark.	<i>P. alcalifaciens</i> bio grup 3'ü <i>P. rustigianii</i> olarak adlandırdı
1983	Müller	<i>P. friderici</i> türünü tanımladı
1986	Müller ve ark.	<i>P. heimbachae</i> türünü tanımladı
1986	Hickman- Brenner ve ark.	<i>P. rustigianii</i> daha önce tanımlandığı için <i>P. friderici</i> isimlendirilmesini geçersiz kıldı

2.1.2. *Providencia* Genel Özellikler

Morganellaceae familyasında yer alan *Providencia* cinsinin üyeleri doğada toprak, atık su ve kirli su rezervuarlarında bulunabildiği gibi çeşitli canlı organizmalardan da izole edilirler (Hu ve ark. 2019).

Providencia cinsinin üyelerinin hepsi fakültatif anaeroblardır ve peritrik flagella bulundurdıklarından hareketlidir ancak, hücresel farklılaşma ve kümelenme davranışı sergilemezler. Üreaz üretimi *Providencia* türlerinin bir özelliğidir (Manos ve Belas 2006). Bu bakterilerin tanınması için kesin biyokimyasal karakter, fenilalanini fenilpirüvik asit (PPA) üretmek için deamine etme yeteneğidir (Hawkey 1984).

Providencia türleri, laktoz negatif, metil kırmızısı ve fenilpirüvik asit pozitif Gram negatif basil morfolojisindeki bakterilerdir. *Providencia* cinsi üyelerinin fenilalanindeaminaz testi pozitifdir ve D-mannoz' dan asit üretirler ancak lisin ve ornitin dekarboksilaz ve arginin dihidrolaz için yapılan testler negatiftir (Abdallah ve Balshi 2018).

Bu fırsatçı patojenler, çoğunlukla küçük çocuklarda ve bağışıklık sistemi zayıflamış cerrahi veya yanık ünitelerindeki hastalarda enfeksiyonlara neden olabilir (Ovchinnikova ve ark. 2013). *Providencia stuartii* ve *Providencia rettgeri* en sık nozokomiyal kaynaklı idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edilir. Daha az sıklıkla, solunum ve cilt enfeksiyonlarına da sebep olabilir (Wie 2015). *Providencia alcalifaciens* genellikle dışkı örneklerinden diğer enterik patojenlerle izole edilebilirken (Brenner ve ark. 1983) benzer bir tür olan *P. rustigianii* yapılmış olan birçok çalışmada penguen dışkısı da dahil olmak üzere bir dizi insan ve hayvan kaynağından izole edilmiştir (Muller 1986).

Taksonomik olarak tanımlanmış diğer bir *Providencia* türü *Providencia heimbachae*, ilk olarak penguen dışkısından ve bir sığır fetüsünden izole edilmiş ve 1986 yılında Muller (O'Hara ve ark. 1999) tarafından tanımlanmıştır. Sonraki dönemlerde bu türün özellikle idiyopatik ishali olan bir hastanın dışkısından izole edilmiştir (Jones ve Mobley 1987).

Tablo 2.2' de *Providencia* türlerinin biyokimyasal reaksiyonlara göre farklılaşması verilmiştir.

Tablo 2.2.*Providenci*türlerinin biyokimyasal reaksiyonlara göre farklılaşması

Biyokimyasal özellikler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sitrat kullanımı	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Üre	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Indol üretimi	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Jelatinaz	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Asit kaynağı:										
D-Liksoz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Mannitol	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
Rafinoz	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
D-Ksiloz	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
L-Arabinoz	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
L-Rhamnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2-Keto-glukonat	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Arbutin	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
Çellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Aesculin	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Gliserol	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Mannitol	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Salisin	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Sorbitol	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Sükroz/Sakkaroz	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
DNA G + C içeriği(%mol)	41.3	43.0	39.1	39.6	40.5	41.8	34.7	40.7	41.0	ND

Suşlar: 1.*P.huaxinsis*, 2. *P.alcalifaciens*, 3. *P. buhodogranariea*, 4. *P. heimbachae*, 5. *P. rettgeri*, 6. *P. rustigianii*, 7. *P. sneebia*, 8. *P. stuartii*, 9. *P. thailandensis*, 10. *P. vermicola*, Pozitif +, Negatif -, ND belirlenemedi(Hu ve ark. 2019).

2.1.3. Klinik Önemi

Dünya çapında en yaygın sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlar arasında yer alan kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonu, hastane kaynaklı enfeksiyonların %40' ını oluşturmaktadır (Hooton ve ark. 2010). Son 30 yılda derlenen veriler kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %86' sını *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* kombinasyonlarını içeren polimikrobiyal enfeksiyonların oluşturduğu gösterilmiştir (Ljubovic ve Hukić 2009).

Providencia türleri, uzun süre kalıcı idrar sondaları olan ve hastanede ya da bir bakım evinde ikamet eden kişilerde yaygın olarak görülen üropatojenlerdir. Bu cinsin türleri arasında klinik olarak en sık gözlenen enfeksiyon ajanları *P. stuartii* ve *P. rettgeri*'dir. *P. stuartii* üreaz pozitif bir türdür ve üreaz aktivitesi ürolitiazis (idrar yolu taşı) gelişimine katkıda bulunur. Dolayısıyla, *Providencia* türleri, bakteriyel üreaz, idrar yolu taşlarının oluşumu, uzun süreli ürinerkateterlerin tıkanması veya akut piyelonefrit gelişimi ile ilişkili önemli virülans faktörü üreten Gram negatif bir basildir (Jones ve Mobley 1987). Spesifik olarak, *P. stuartii* ve *Proteus mirabilis*' in oluşturduğu koenfeksiyonlar sırasında üreaz aktivitesinin sinerjistik indüksiyonu ürolitiazis ve bakteriyemi insidansının artmasına neden olmaktadır (Wie 2015).

Tip 3 fimbria' ya sahip *P. stuartii* idrar sondalarına yapışır ve kalıcı idrar kateterlerinin *P. stuartii* ile kolonizasyonu idrar yolu enfeksiyonlarının yanı sıra idrar kateterlerinin arızalanmasına da yol açabilir (Darouiche 2001). *P. stuartii* ve *P. rettgeri* ayrıca triptofan ve fenilalanin dahil aromatik amino asitleri deamine edebilir ve triptofanınmetabolitleri olan indol ve indoxylsulphate oluşumunu etkileyebilirler bu bakterilerin doksilsülfataz veya indoksilfosfataz enzimlerini üretmelerini sağlar. Bu enzimler indoksil sülfatın idrarda indigo ve indirubine dönüşmesine neden olarak "*Mor idrar torbası sendromu*" na sebep olurlar. Bu hastalarda indigo ve indirubinin alkali idrarın mor olmasına neden olduğu bilinmektedir (Wie 2015).

Kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen *Providencia* türleri, genellikle *Providencia* bakteriyemi vakalarında yüksek mortaliteye katkıda bulunan çoklu antibiyotiklere direnç gösterir ve hastaların polimikrobiyal enfeksiyonlara sahip olma olasılıkları daha yüksektir (Armbruste ve ark. 2014). Birçok çalışma *P. stuartii*' nin idrar yolundan diğer organlara geçerek endokardit,

perikardit, peritonit ve menenjitte neden olabileceğini göstermiştir (Kurmasheva ve ark. 2018).

2.2.ANTİBİYOTİKLER

Antibiyotikler, küçük dozlarda konakta ciddi toksisiteye yol açmadan mikroorganizmalar üzerinde üremelerini durdurucu veya öldürücü etki yapan mikrobiyalmetabolitler veya sentetik analoglardır (Fair ve Tor 2014). Antimikrobiyal ajanlar çoğunlukla toprak bakteri ve mantarların ürünüdür, ana antibiyotik üreten bakteri grubu *Actinomycetes*' lerdir (C. Walsh 2004). Günümüzde klinik kullanımdaki antimikrobiyal ajanların çoğu fermantasyonun doğal ürünlerinden türetilmekte veya antibakteriyel ve farmakolojik özelliklerini geliştirmek için kimyasal olarak modifiye edilerek yarı sentetik hale getirilebilmekte ya dakinolonlar gibi bazı antimikrobiyal ajanlar ise tamamen sentetik olarak sentezlenebilmektedir (Mayer 2007).

2.2.1.Antibiyotiklerin Keşfi ve Tarihçesi

Antibiyotiklere maruz kalmanın “modern antibiyotik dönemle” sınırlı olduğuna dair yaygın inanın aksine yapılan çeşitli araştırmalar bunun böyle olmadığını ortaya koymuştur (Aminov 2010). Antimikrobiyal özellik gösteren karışımların kullanımı düşündüğümüzden çok daha eskilere dayanmaktadır. Sudan' da Nubian topluluğu (Bassett ve ark. 1980) ve Mısır' ın Dakhleh Oasis vahasında yapılan çalışmalar insan kemiklerini floresan etiketleme analizi altında incelemiş ve tetrasiklin birikimini ortaya çıkarmışlardır (Cook ve ark. 1989) bu bilgi, bize antibiyotik kullanımının çok eski bir geçmişe sahip olduğuna işaret etmektedir (Aminov 2010). Yine benzer şekilde Ürdün' de geleneksel olarak kullanılan (ve halen farmasötik ürünlere ucuz bir alternatif olarak kullanılmakta olan), kızıl killerin antibiyotik benzeri özellikleri, bazı antibiyotik üreten maddelerin keşfedilmesine yol açmıştır (Falkinham ve ark. 2009).

Antibiyotik dönem öncesi antimikrobiyal etkilere maruz kalmanın bir başka olasılığı geleneksel / alternatif tıpta, özellikle geleneksel Çin tıbbında (TCM) bilinen en iyi örneği binlerce yıl boyunca birçok hastalık için çare olarak kullanılan *Artemisia* bitkilerinden elde edilen güçlü bir sıtma karşıtı ilacı olan qinghaosu'n (artemisinin 1970) keşfidir (Cui ve Su 2009). Bunun yanı sıra, geleneksel tedavilerin tarih boyunca uzun süre kullanımına bağlı olarak antimikrobiyal aktiviteler tarafından uygulanan selektif baskıların, insan

popölasyonlarında antibiyotik direnç genlerinin birikmesine sebep olabileceği düşünölmektedir(Aminov 2010).

Antibiyotik olarak kullanılan ilk etken madde piyosiyanazdır, Alman bilim adamı Freuderreich 1888' de yapmış olduğu bir deneyde *Bacillus pyocyaneus* (*Pseudomonas aeruginosa*)' un ürettiği mavi-yeşil pigmentin bazı bakterilerin üremelerini inhibe ettiğini gözlemlemiştir (Levy 1992). Paul Ehrlich, sonraki süreçte mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye sahip ancak dokulara herhangi bir toksik etkiye sahip olmayan bir etken madde bulma çalışmaları sonucunda 1910 yılında seçici toksik etkiye sahip bir boya maddesi olan “sihirli mermi” (sihirli bir kurşun) yi bulmuştur. Ehrlich tüm bu çabalarının sonucunda Afrika uyku hastalığı etkeni olan Tripanozomlar üzerine etkili olan salvarsanı bularak kemoterapatiklerin dönemini başlatmışlardır. Arsenik türevi olan bu madde, toksisite oranı hayli yüksek olmasına rağmen başka çare olmadığı için özellikle sifiliz gibi hastalıkların tedavisinde uzun yıllar kullanılmıştır.

Antimikrobiyal tedavi kavramı, Alexander Fleming' in (1881-1955) çalışmalarıyla ve ünlü keşfi ile devrim yaratmıştır. Fleming, daha önce kendi burun mukozasını bir kültür plağına ekerek keşfettiği lizozimin antimikrobiyal özelliklerini incelerken, eski bir *Staphylococcus aureus* kültür plağında alışılmadık bir fenomen fark etmiştir (Fleming 1929). Kültür plağında bakterilerin büyümesi, kirletici bir mavi küfün (*Penicillium notatum*) varlığı ile inhibe olmuştur. Ne yazık ki, Fleming, birtakım sebeplerden ötürü penisilin tedavisine yeteri kadar değeri gösterememiş ve çalışmaları yarım kalmıştır. *Penicillium notatum*' un antimikrobiyal özelliği, Howard Florey (1898-1968) ve Ernst Chain (1906-1979), Oxford Üniversitesi' de toplanan birtakım bilim adamının yardımıyla 1940' ta tekrar keşfedilmiştir ve deneysel olarak enfekte hayvanların tedavisi için penisilin antimikrobiyal değeri gösteren ilk makale yayınlanmıştır (Khardori 2006). Böylece ilk ticari penisilin üretimini başlanmış ve 1945' te Nobel tıp ödölü Fleming, Florey ve Chain' e verilmiştir (Khardori 2006). Penisilin özellikle II. Dünya Savaşı sırasında çok sayıda enfeksiyonun tedavisinde kullanılmıştır (Bud 2007).

II. Dünya Savaşı döneminde *Mycobacterium tuberculosis* yaygın olarak görölen ve son derece tehlikeli bir patojen haline gelmiştir. Antibiyotik tarihindeki önemli dönüm noktalarından biri de penisilin etkisiz kaldığı bu patojene karşı 1944'te Selman Waksman ve Albert Schatz tarafından *Streptomyces griseus*

bakterisinden streptomisin keşfi olmuştur (Schatz ve ark. 1944). Daha sonra yaygın olarak kullanılan streptomisin *M. tuberculosis*' e karşı inhibe edici etkiler sergileyen ilk antibiyotik bileşiği olmuş ve Waksman'ın 1952' de Nobel Tıp Ödülü'nü almasına neden olmuştur. Bununla birlikte, streptomisin keşfi ile Albert Schatz, sadece tüberküloza karşı etkili bir antibiyotik bulmakla kalmayıp, aynı zamanda aminoglikozidler olarak bilinen geniş bir antibiyotik grubunun ilk ilacını tanımlamıştır. Takip eden yıllarda bulaşıcı hastalıkların tedavisine katkıda bulunan birçok yeni ilaç piyasaya sürülmüş ve 1950-1960 yılları arası antibiyotik keşiflerinin altın çağı olmuş, en çok antibiyotik bu dönemde keşfedilmiş (1945' te tetrasiklin, 1947' de kloramfenikol, 1949 yılında neomisin (ilk aminoglikozid), 1952 yılında eritromisin, 1956 yılında vankomisin, 1957 yılında kanamisin, 1960 yılında metisilin, 1960' larda kinolonlar, 1961 yılında ampisilin, 1962' de Trimetoprim ve Nalidiksik asit ve sonra florokinolon türevleri, 1963 yılında gentamisin, , 1970 yılında trimetoprim (sülfametoksazol ile birlikte ko-trimoksazol), 1970' lerde Linezolidin) ve tedavide kullanılmaya başlanılmış. Ne yazık ki, antimikrobiyal direncin önemli bir klinik problem olarak ortaya çıkması uzun bir zaman almamış ve bu durum antimikrobiyal ajanların etkinliğini yitirmesine yol açmıştır.

Tablo 2.3' da antibiyotiklerin tarihsel kronolojisi verilmektedir.

Tablo 2.3.Antibiyotiklerin tarihsel kronolojisi

Antibiyotik	Keşfeden	Yıl	Mekanizma ve Etki
Arsphenamine (salvarsan)	Ehrlich ve Sata	1909	Bakteiyostatik DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu
Protosil	Domagk	1932	Bakteiyostatik
Penicilin	Fleming	1928	Bakterisidal hücre duvar sentezinin inhibisyonu
	Florey	1940	
Streptomycin	Waksman ve Schatz	1943	Bakterisidal protein sentezinin inhibisyonu
Cephalosporin (cephalosporin C)	Brotzu	1945	Bakterisidal hücre duvar sentezinin inhibisyonu
	Abraham ve Newton	1948	

2.2.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması ve Etki Mekanizmaları

Antibiyal ajanlar çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Antibiyotikler vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki dereceleri dikkate alınarak hedef hücreye etkilerine göre ve etki mekanizmalarına göre iki gruba ayrılır (Akkan 1997). Hedef

hücreye etkilerine göre de bakteriyostatik ve bakterisidal olarak iki sınıfa ayrılırlar. Bakterisidal ajanlar bakteriyel hücre ölümüne neden olurken bakteriyostatik ajanlar bakterilerin üremesini engelleyerek etki ederler (Walsh 2010).

Bakteriler, insan hücrelerinden farklı olan prokaryotik hücre yapısına sahiptir. Bu, konakçı hücreye önemli bir zarar vermeden bakteri özgünlüğünü sağlayan ilaçların tasarımını kolaylaştırır. Etki mekanizmalarına göre antibiyotikler, 1)Hücre duvarına etki edenler (hücre duvarının sentezini bozar) 2)Bakteriyel ribozoma etki edenler (protein sentezini bozar) 3)Nükleik asit sentezineetki edenler4)Hücre zarı sentezine etki edenler (hücre zarını bozar) 5)Antimetabolitler olarak etki edenler (bakteriyel metabolik yolları engeller)olmak üzere 5 grup altında toplanmaktadır (Akkan 1997).

Tablo 2.4.Antimikrobiyal ajanların etki mekanizmaları (Tenover 2006'dan uyarlanmıştır)

Etki mekanizması	Antimikrobiyal ajan (lar)
1. Hücre duvarı sentezi ile girişim	β -laktamlar: Penisilin, Sefalosporinler, Karbapenemler, Monobaktam Sikloserin, Ristoesetin, Basitrasin Glikopeptitler: Vankomisin, Teikoplanin
2. Protein sentezinin inhibisyonu: 50S ribozomal ünitesine bağlanma 30S ribozomal ünitesine bağlanma	Macrolides, Chloramphenicol, ClindamycinQuinopristin-Dalfopristin, Linezolid Aminoglycosides, Tetracyclines
3. Nükleik asit sentezi ile girişim: DNA sentezinin inhibisyonu RNA sentezinin inhibisyonu	Fluoroquinolones, Rifampicin, Nalidiksikacid, Metronidazol, Aktinomisinler, Mitomisinler, Bleomisin, Asiklovir, Doksorubisin, Daunorubisin, Metotreksat
4. Bir metabolik yolun inhibisyonu	Sulfonamides, FolicAcidAnalogları, Sülfonamidler, Sülfonlar, PAS, İzoniazid (INH), Etambutol, Trimetoprim
5. Bakteriyel membran yapısının bozulması (Deterjan etkisi yapanlar)	Polymyxins, Daptomycin, Gramisidin, Nistatin, Amfoterisin B, Kandisein, Ketokonazol ve diğer antifungalimidazoller, Flukonazol ve diğer antifungaltrizoller, Hekzaklorofen, Katyonik deterjanlar

2.2.3.Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direnci, bir mikroorganizmanın, bir antimikrobiyal maddenin öldürücü konsantrasyonlarında hayatta kalma kabiliyetidir (Munita ve Arias 2016). Antibiyotikler doğada var olan mikroorganizmalar tarafından doğal olarak üretildiğinden, bu ajanların üreticileri olan mikroorganizmalarda kendilerine zarar vermesini önlemek amacıyla direnç genleri de mevcuttur (Fair ve Tor 2014). Üreticilerdeki iç dirence genellikle üç ana yoldan biri aracılık eder: (i) antibiyotiğin etkisizleştirilmesi, (ii) antibiyotiğin akışı ve (iii) duyarlı moleküler hedefin modifikasyonu. Bununla birlikte, iç direnç, antibiyotik üreticileri ile sınırlı değildir.

Bakteri türlerine bağlı olarak, örneğin, zarin bileşimindeki farklılıklar doğal olarak bileşiğin hücreye alınmasını önleyerek bakteriyi dirençli hale getirebilir (Nikaido 1994). Rastgele genetik mutasyonlar nedeniyle direnç mekanizması kendiliğinden oluşuyormuş gibi görülsede antibiyotiklerin aşırı kötüye kullanılması gibi faktörler direnç prevalansını büyük ölçüde arttırmıştır (Fair ve Tor 2014).

Kullanım oranlarına bağlı olarak direnç gelişim süreci değişmektedir. Örneğin; Penisilin gibi bir dizi antibiyotik için, ajanın piyasaya sürülmesinden hemen sonra, 1940' larda direnç gelişimi gözlenmiştir (Abraham ve Chain 1940) vankomisin gibi ajanlarda ise direncin bildirilmesi neredeyse 30 yıl almıştır (1987) (Schwalbe ve ark. 1987). Bu, penisilin ile karşılaştırıldığında, sınırlı miktarda vankomisin kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca çeşitli antibiyotiklere direnç mekanizmaları önemli ölçüde farklılık gösterir. β -laktam direnci tek bir gen ürününün etkisiyle ortaya çıkarken, hidrolitik β -laktamaz, vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE)' ların oluşması için 5-gen direnç kaseti gereklidir (Wiesch ve ark. 2010). Bakteriler, bir veya daha fazla antimikrobiyal madde sınıfına karşı yapısal olarak dirençli olabilir. Bu durumlarda, bir bakteri türünün tüm suşları bu antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir (Tenover ve ark. 2006).

Direnç novo mutasyonlar veya başka organizmalardan direnç genlerinin alınmasıyla oluşabilir. Normalde duyarlı bakteri popülasyonları, antimikrobiyal maddelere mutasyonlar ve seçim yoluyla veya başka bakterilerden direnç genleri edinerek dirençli hale gelebilirler (Tenover ve ark. 2006). Kazanılmış direnç, tüm tür popülasyonunda mevcut değildir, ancak seçici basınç altında çoğalabilir ve yayılabilir. Özellikle hastane ortamları, bakterilerin antibiyotiklere yoğun bir şekilde maruz kalması nedeniyle antibiyotik direnç yayılmasında önemli bir rol oynar. Bu gibi ortamlar, bakterilerin direnç genleri edinmeleri ve yaymaları için çok güçlü bir seçici baskı yaratır (Aminov 2010).

Bakteriler antibiyotiklere karşı dört kazanılmış direnç mekanizma vardır: (i) ilaç hedef sahasının mutasyonu / modifikasyonu (ii) enzimatik ilaç modifikasyonu veya etkisizleştirilmesi (iii) ilacın membran boyunca geçirgenliğini azaltması ve (iv) ilacın hücre dışına akışını arttırması (Tsodikova ve Labby 2016).

Direnç prevalansının artmasında direnç faktörlerinin yatay (horizontal) transferi önemli bir yer tutmaktadır (Courvalin 1994). Direnç geni veren bakteriler,

genellikle genetik ortamlar arasında ve hatta farklı ailelerin bakterileri arasında direnç genlerini harekete geçirebilen genetik elementler içinde bulunur (Barlow 2009). Bu tür mobil genetik ortamlar, dirençli genlerin yayılmasını büyük ölçüde kolaylaştırır, alıcı hücreler çok sayıda direnç genini hızlı bir şekilde elde edilebilir ve kendi DNA'larına kolaylıkla entegre edilebilir. Pek çok direnç geni, bu hareketli genetik ortamlarda bulunur (Martínez 2008). Bu konuyla alakalı olarak karşılaşılan en büyük tehdit, nozokomiyal ortamlarda direnç birikimidir. Bu durumun kaçınılmaz sonucu, tipik olarak en az üç farklı antibiyotik sınıfına eşzamanlı dirence sahip çok ilaca dirençli suşlar olarak sınıflandırılan patojenlerin ortaya çıkışıdır.

Gram negatif bakterilerdeki antibiyotik direnci inaktive edici enzimlerin ve nonenzimatik mekanizmaların ekspresyonundan kaynaklanır (Ruppé ve ark. 2015). Kromozomal genlerdeki mutasyonlar, iç direnç mekanizmalarının (antibiyotik-inaktive edici enzimler veya akış pompaları) ekspresyonunda bir artışa, dış zar porinlerinin kaybıyla geçirgenlik değişikliklerine veya hedef modifikasyonlarına neden olur. Direnç genleri taşıyan hareketli genetik elemanların yatay transferi (horizontal), en belirgin şekilde plazmid kodlayan beta-laktamazlar, Aminoglikozidler modifiye edici enzimler (AME) veya *Enterobacteriales*' de florokinolon direnci için Qnr (plazmid kaynaklı kinolon direnci) gibi mekanizmaları içerir. Bu plazmitler genel olarak çoklu direnç belirleyicileri taşıdığından, tek bir plazmid konjugasyonu, alıcı suşuna çok ilaahlı bir direnç fenotipini vermek için yeterli olabilir (Ruppé ve ark. 2015).

2.3.AMİNOGLİKOZİDLER

2.3.1.Aminoglikozidlerin Keşfi ve Tarihçesi

Streptomisin, 1944' te Selman Waksman ve Albert Schatz tarafından tanımlanıp karakterize edilen ilk aminoglikozid grubu ilahtır. Mantarlardan izole edilen penisilinin aksine, streptomisin, bakteriyel bir kaynaktan *Streptomyces griseus*' tan izole edilen ilk antimikrobiyaldir. Streptomisinin keşfi, özellikle ikinci dünya savaşı dönemlerinde yaygın olarak görülen ve son derece tehlikeli bir patojen olan *Mycobacterium tuberculosis*' e etki edebilen ilk ilaç olduğu için antimikrobiyallerin tarihinde önemli bir dönüm noktası olmuştur (Schatz ve ark. 1944). Bununla birlikte, streptomisin keşfi ile Albert Schatz, sadece tüberküloza karşı etkili bir antibiyotik bulmakla kalmayıp, aynı zamanda aminoglikozidler olarak bilinen geniş bir antibiyotik grubunun ilk ilacını tanımlamıştır (Nicolaou ve Rigol

2018). 1949 yılında Waksman ve ark. *Streptomyces fradiae* bakterisinden yeni bir antibiyotik olan neomisin ürettirmişlerdir (Waksman ve ark 1949). Hem streptomisin hem de neomisin sayısız bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılmış olmakla birlikte, aminoglikozidlerin keşfi yıllar içerisinde devam etmiştir (Nicolaou ve Rigol 2018).

Streptomisine karşı artan direnç, yaşamı tehdit edici enfeksiyonların tedavisinde olumsuz toksisite seviyelerinin yanı sıra, daha fazla aminoglikozid keşfetmek için baskı oluşturmıştır. Antibiyotik direnci ile bu erken mücadele sırasında, *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsinin toprak bakterilerinden çok sayıda aminoglikozid keşfedilmiştir. Neomisin, tobramisin, paromisin, kanamisin, amikasin, arbekasin ve spektinomisin *Streptomyces* türlerinden üretilirken, gentamisin ve netilmisin *Micromonospora* türlerinden üretilmektedir (Krause ve ark. 2016).

Bu sınıftaki yeni ilaçların (gentamisin, tobramisin, neomisin ve sisomisin dahil) keşfedilmesi, ilaç direnci gelişim seviyelerini azaltmıştır. Özellikle *Staphylococcus* spp. gibi bazı Gram pozitif bakterilere ve *Pseudomonas* spp. ve *Enterobacteriales* türlerinin sebep olduğu Gram negatif enfeksiyonların çoğuna karşı oldukça etkili olduğu görülmüştür (Tsodikova ve Labby 2016).

İlerleyen süreçte bu ajanların toksisitesini azaltmanın yanı sıra ortaya çıkan direnci önleyebilmek ve antibakteriyel spektrumlarını ve etkilerini arttırmak amacıyla bir dizi biyokimyasal yaklaşımında bulunulmuştur. Bu çalışmalar dibekasin, amikasin (kanamisininden türetilmiş) veya daha yakın zamanda keşfedilen arbekasin (dibekasinden türetilmiş) gibi yarı sentetik ajanlarla sonuçlanmıştır, bu yöntemle elde edilen bileşiklerin sadece belirli direnç mekanizmalarına karşı etkisiz kalmıştır aynı zamanda farklı toksikolojik profiller de sergilemişlerdir (Jana ve Deb 2016).

Tablo 2.5' te başlıca aminoglikozidlerin elde edildiği mikroorganizmalar ve izolasyon yılları verilmiştir.

Tablo 2.5.Başlıca aminoglikozidlerin elde edildiği mikroorganizmalar ve izolasyon yılları

Aminoglikozid	İzole edilmiş / sentezlenmiş	İzolasyon yılı
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	1944
Neomisin	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1957
Gentamicin	<i>Micromonospora purpurea</i>	1963
Tobramycin	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	1967
Sisomisin	<i>Micromonospora inositol</i>	1970
Amikacin	Kanamisinden sentezlenmiştir	1972
Arbekacin	Dibekasinden sentezlenmiştir (sentetik türev kanamisin'den)	1973
Isepamicin	Gentamisinden sentezlenmiştir	1975
Netilmicin	Sisomisin'den sentezlenmiştir (sentetik türev Gentamisinden)	1976

2.3.2.Aminoglikozidlerin Genel Özellikleri

Aminoglikozidler, antimikrobiyal ajanlar olarak faydalı olmalarını sağlayan çeşitli özellikler gösterir (Jeong ve ark. 2009). Aminoglikozidlerin bakterisidal aktivitesi, inhibitör konsantrasyonlarına ve bakterinin antimikrobiyal ajana maruz kalma süresine bağlıdır ve artan konsantrasyonlarla artar. Ek olarak, aminoglikozidler postantibiyotik etkiye sahip olduklarından maruz kalma süresinden sonra bile önemli bir antibiyotik etkisi sergileyerek bakterileri öldürmeye devam eder. Bu muhtemelen ribozom için güçlü, geri dönüşümsüz bir bağlanma nedeniyledir. Hücre duvarı biyosentezini inhibe eden antimikrobiyal ajanlar ile birlikte, sinerjik bakterisidal aktivite aminoglikozidlerin bir başka önemli özelliğidir. Sinerjizm muhtemelen hücre duvarı sentezi inhibitörleri ile inkübasyondan sonra bakterilerin geçirgenliğinin artmasına bağlı olarak hücre içi aminoglikozid alımının artmasından kaynaklanmaktadır.

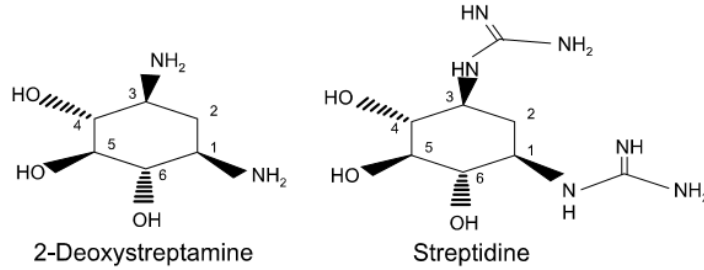
Ne yazık ki, aminoglikozidler ototoksikite ve renal toksisite gibi toksik tepkiler verebilir. Streptomisin, diğer aminoglikozidlerin yanı sıra iç kulağın duyusal saç hücrelerini hedefler ve hastaların %5' inde saç hücrelerinin dejenerasyonuna ve kalıcı işitme kaybına yol açabilir (Becker ve Cooper 2012). Aminoglikozidlerin günlük dozlama konsantrasyona bağlı bakterisidal aktivite ve ototoksikite riski ile birlikte antibiyotik sonrası etki ve böbrek fonksiyonları normal olan hastalarda böbrek toksisitesi günde bir kez kullanılmalarının ana nedenleridir (Jeong ve ark.

2009). Bununla birlikte ilacın etkinliğini korurken toksisitesini azaltmaya yönelik yapılan çalışmalarla doz şemaları geliştirilmiştir. Spesifik olarak, klinik çalışmalar günde bir kez dozlama ile daha düşük nefrotoksisite insidansını bildirmiştir (Nicolau ve ark. 1995). Günde bir kez aminoglikozid dozlamasının avantajları artık yaygın olarak kabul edilmektedir ve birçok enfeksiyon tipi için bu dozlama programı standart hale gelmiştir (Avent ve ark. 2011).

2.3.3. Aminoglikozitlerin Yapısı ve Sınıflandırılması

Streptomyces, *Micromonospora*, *Bacillus* ve diğer bakteri türlerinin, aminoglikozid-aminosiklitol antibiyotik ürettiği gösterilmiştir *Streptomyces*' ten türetilen bileşikler “-mycin” (örneğin, tobramisin) ekiyle, *Micromonospora*' dan türetilen bileşikler ise “-micin” (örneğin gentamisin) son ekiyle isimlendirilir (Arya 2007).

Aminoglikozidler/aminosiklitol antibiyotikler, ya streptidin (streptomisinde bulunur) ya da 2-deoksistreptamin (diğer aminoglikozidlerde bulunur) olan bir glikosidik bağ ile bağlanan iki veya daha fazla amino şeker ile karakterize edilir (Park 2009).



Şekil 2.1. 2-deoksistreptamin ve Streptidin'in yapısı

Aminoglikozid aktivitesi, psödoglikosidik bağlarla dibasiklitol omurgasına birleştirilen bir veya daha fazla amin şekeri varlığına dayanan kimyasal yapılarına büyük ölçüde bağlıdır (Vicens ve Westhof 2002). Bu omurganın yapısında bulunan bağlı şekerlerin yeri ve sayısı biyolojik aktiviteyi büyük ölçüde değiştirdiği için, aminoglikozid fonksiyonunun temelini oluşturur (Magnet ve Blanchard 2005). Ayrıca bu şekerlerde en az bir amino grubunun varlığının biyolojik aktivite için gerekli olduğu gösterilmiştir.

Spektinomisin (amino şekerler ile bağlantılı olmayan bir aminosiklitol) aminosiklitol fortamin taşıyan astromisin gibi bileşikler de istisnalar olmasına

rağmen bu aileye dahil edilir (Jana ve Deb 2016). Aminoglikozidler karmaşık bir bileşik ailesidir ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırmaktadır. Bugüne kadar tespit edilen doğal olarak oluşan aminoglikozidler, aminosiklitol halkalarının niteliğine göre kategorize edilir. Glikozidik bağlar yoluyla amino şekerlere bağlanmış bir aminosiklitol çekirdeği (streptamin, 2-deoksistreptamin (DOS) veya streptidin) olmasıyla karakterize edilen farklı yapısal aminoglikozid sınıfları vardır.

Çekirdek yapı, her bir aminoglikozid ile ilişkili çeşitli aminoglikozid değiştirici enzimlere (AME) etki mekanizmaları ve duyarlılığı üzerinde doğrudan etkisi olan çeşitli amino ve hidroksil ikameleri ile süslenmiştir. Bu bilgiden yola çıkarak çoğu literatür bu antibiyotik ailesini iki gruba ayırır: Streptomisin sınıfı (I) ve 2-deoksistreptamin sınıfı (II) olmak üzere iki ana aminoglikozid sınıfı vardır (Ramirez ve Tolmasky 2010).

(I) 2-DOS aminosiklitol taşımayan diğer tüm aminoglikozid ailesinin üyeleri, 2-DOS dışı alt gruba aittir. Bu, merkezi aminosiklitol olarak bir streptidin halkasına sahip olan orijinal aminoglikozid streptomisin ve bunun türevlerini (dihidrostreptomisin), fortimisin A ve türevlerini (dactimisin) ve apramisin içerir (Magnet ve Blanchard 2005). Streptomisin, üç şeker bileşeninden oluşur: bir pentoza (streptoz) bağlı bir aminosiklitol (streptidin) bu da yine glukozamine bağlıdır (C. Walsh 2004). Streptomisin türevleri, pentoz üzerindeki R grupları olarak farklı yarı sentetik modifikasyonlara sahiptir.

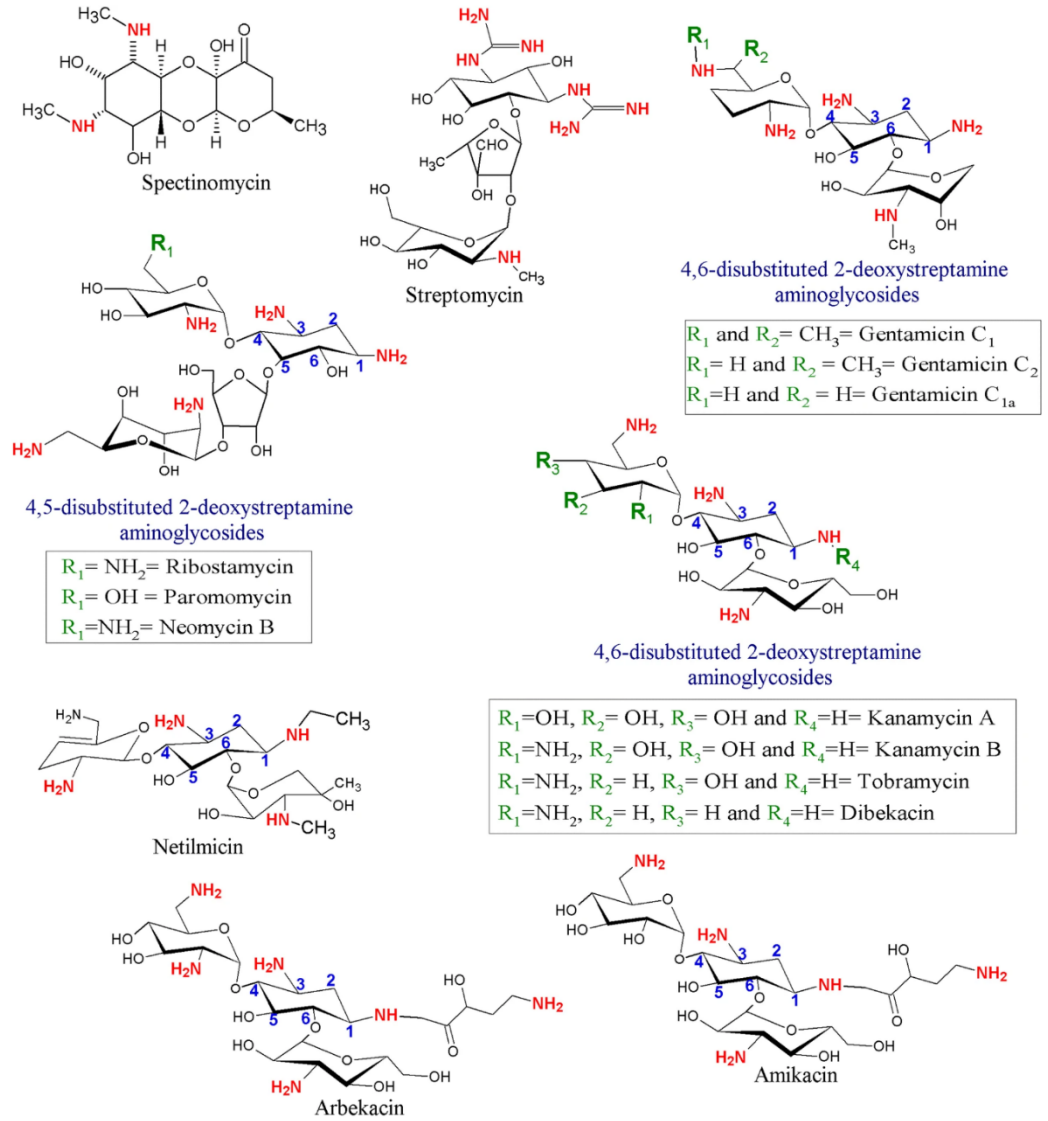
(II) Deoksistreptamin sınıfı, molekülün ortasına yerleştirilmiş aminosiklitol çekirdeğe streptamine sahiptir. Bu sınıf, şeker bileşenlerinin aminosiklitol çekirdeğinin 4,5 veya 4,6 pozisyonuna yerleştirilip yerleştirilmediğine göre iki gruba ayrılır (Arya 2007). 4,6 2-DOS aminoglikozidlerin birinci alt grubu kanamisin A ve türevlerinden (dideoksi-kanamisin ve amikasin), kanamisin B ve türevlerinden (dibekasin ve arbekasin) ve ayrıca tobramisin' den oluşur. Kanamisin deoksistreptamin aminoglikozidlerin ilkidir 1957'de Japonya' da izole edilmiştir. Kanamisin' de 4,6 ikameli deoksistreptamin sınıfına ait bir aminoglikoziddir. Yapıdaki şekerlerin farklı pozisyonlarına yerleştirilen farklı R grupları, kanamisin türevlerini oluşturur (Arya 2007).

4,6 2-DOS aminoglikozidlerin ikinci alt grubu, doğal olarak oluşan gentamisin, gentamisin B, gentamisin C, sisomisin ve genetikin de dahil olmak

üzere, ilk olarak 1963' te tanımlanan gentamisin ile ilişkili bileşiklerden oluşur. Gentamisin, tek bir molekül olmadığı için aminoglikozidler arasında özel bir durumu vardır üç ana ve birkaç küçük bileşenden oluşur (Isoherranen ve Soback 2000). İlaç kompleksinin ana bileşenleri gentamisin C1, C1a ve C2'dir. C2 bileşeni ise C2 ve C2a olarak iki stereoizomerden oluşur. Kanamisin alt grubunda olduğu gibi, gentamisine bağlı aminoglikozidler, netilmisin ve izepamisin gibi türevleri için şablon olarak kullanılan güçlü antimikrobiyallerdir (Magnet ve Blanchard 2005).

4. ve 5. pozisyonlarda süstitüe edilmiş bir aminosiklitol halkası içeren aminoglikozidler, 2-DOS aminoglikozidlerin ikinci alt grubunu oluşturur (Şekil 3). Bu aile, *Streptomyces* cinsinden izole edilen, (ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere) neomisinler, paromomisinler ve butirosinler dahil olmak üzere doğal olarak oluşan bileşiklerden oluşur. Bu grubun bir başka üyesi olan *Streptomyces ribosidificus*' tan izole edilen ribostamisinin 4,5-2-DOS aminoglikozidlerinin öncüsü olduğu düşünülmektedir (Kudo ve Eguchi 2016). Düşük maliyeti ve stabilitesi nedeniyle, gentamisin, *Enterobacteriales* ve *Pseudomonas aeruginosa* arasında düşük direnç seviyelerine sahip hastanelerde bir numaralı aminoglikozid tercihidir.

Yapı, çeşitli amino ve hidroksil ikameleri ile birlikte, belirli bir aminoglikozidi bloke edebilen veya inaktive edebilen bakteriyel direnç mekanizmalarının tipi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir (Kotra ve ark 2000).



Şekil2.2. Başlıca aminoglikozidlerin kimyasal yapıları

2.3.4.Spektrum Alanı

Genişve özdeş olmayan bir bileşik ailesinden bekleneceği gibi, farklı aminoglikozidlerin aktivitespektrumlarında farklılık gösterir (Ramirez ve Tolmasky 2010).

Aminoglikozidler çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif organizmalara karşı aktiftir. Aminoglikozidler özellikle *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae* ve *K. aerogenes*, *Providencia spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.* ve *Serratia* türleri dahil olmak üzere çeşitli Gram negatif bakterilere karşı etkilidir (Landman ve ark. 2010). Ayrıca aminoglikozidler, sırasıyla veba ve tulareminin etken maddeleri olan *Yersinia pestis* (Heine ve ark. 2015) ve *Francisella tularensis* 'e (Ikaheimo ve ark. 2000) karşı aktiftir. Sınıf ayrıca *P. aeruginosa* ve daha az bir ölçüde *Acinetobacter baumannii* (Aggen ve ark. 2010) metisiline dirençli

ve vankomisine orta ve dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarına karşı iyi bir aktiviteye sahiptir (Landman ve ark. 2010). Birçok *Mycobacterium* türü (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve *M. avium* gibi) aminoglikozidlere karşı hassastır (Ho ve ark. 1997). Aminoglikozid hücrelere alınması için aktif elektron taşınması gereklidir, bu nedenle sınıf doğal olarak anaerobik bakterilere karşı aktiviteden yoksundur (Ramirez ve Tolmasky 2010). Aminoglikozidlerin çoğu *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* türlerine karşı etkili değildir (Ramirez ve Tolmasky 2010).

Aminoglikozidlerin geniş spektrumlu aktivitesi, diğer antimikrobiyal sınıflarıyla sinerji yoluyla in vitro olarak arttırılır. İki antimikrobiyal ajanın birleşik etkisinin bireysel etkilerinin toplamından daha büyük olduğu bu fenomen, aminoglikozidler ve beta-laktamlar gibi hücre duvarı aktif maddeler arasında özellikle iyi karakterize edilir. Aminoglikozidler ve beta-laktamlar arasında in vitro sinerji, vahşi tip ve çoklu ilaç direncine sahip izolatlar da dahil olmak üzere hem Gram negatif hem de Gram pozitif organizmalarda, çeşitli yöntemler kullanılarak gözlenmiştir. Bu in vitro gözlemler, bir dizi enfeksiyon tipinin tedavisinde aminoglikozid içeren kombinasyon terapisinin kullanımını uyarmaya yardımcı olmuştur (Ramirez ve Tolmasky 2010).

2.3.5. Aminoglikozidlerin Hücreye Girişi

Bakteriyel hücreler tarafından aminoglikozid alımı, birincisi bakteriyel zarın geçirgenliğini arttıran, ikincisi ve üçüncüsü ise enerjiye bağımlı olan üç ayrı aşamada gerçekleşir (Krause ve ark. 2016) ve sürecin kendisinin bu antibiyotik sınıfının bakterisit aktivitesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Shaw ve ark. 1993).

İlk aşama, aminoglikozid molekülleri bakteriyel hücrelerle temas ettiğinde, polikasyonik antibiyotik moleküller, Gram negatiflerde lipopolisakkarit, fosfolipidler ve dış membran proteinleri gibi hücre yüzey anyonik bileşiklerine ve Gram pozitiflerde lipopolisakkaritin (LPS) negatif yüklü bileşikleri teikoik asit ve fosfolipidlere bağlanır (Ramirez ve Tolmasky 2010). Dış zardaki anyonik bölgelere bağlanmanın bir sonucu olarak polikasyonik aminoglikozid, bitişik LPS moleküllerini çapraz köprüleyen ve stabilize eden esansiyel iki değerlikli kationları (Mg^{+2}) rekabetçi bir şekilde yer değiştirir (Shaw ve ark. 1993). Bu kationlar, bakteri zarının lipid bileşenlerinin çapraz köprülemesinden ve stabilizasyonundan sorumludur ve bunların çıkarılması dış zarın bozulmasına, geçirgenliğin

arttırılmasına ve aminoglikozidin periplazmik boşluğa “kendi kendini yükselten alım” penetrasyonuna yol açar (Krause ve ark. 2016). Bu fenomen, yavaş, enerjiye bağımlı, elektron taşıma aracılı bir süreç yoluyla sitoplazmaya girişi kolaylaştırır (Ramirez ve Tolmasky 2010).

Sitoplazmik zar boyunca aminoglikozid taşınması, elektron taşınmasına bağlı olan ve enerjiye bağımlı faz I (EDP-I) olarak adlandırılır bir ilk gecikme fazını ve ardından ilacın hızla alındığı ikinci bir fazı içerir. Sitoplazmik membran boyunca taşınması, oksijene bağlı bir işlemde elektron taşıma sisteminden enerji gerektirir (Shaw ve ark. 1993). Böylece, anaerobik bakterilerin aminoglikozidlere karşı içsel direnci ilacın hücre içinde taşınmamasıyla açıklanabilir(Shaw ve ark. 1993).

Enerjiye bağımlı faz I sırasında sitoplazmaya ulaşan az sayıda molekül, protein sentezinde hatalara neden olur ve zar proteinleri yerleştirildiklerinde sitoplazmik zarın bütünlüğüne zarar vererek, “enerjiye bağımlı faz II” olarak bilinen bir sonraki adımı tetiklerler (Ramirez ve Tolmasky 2010).

Hücre içine girdikten sonra sitosolde aminoglikozidler, yine enerjiye bağımlı bir işlemle (enerjiye bağımlı faz II [EDP-II]), 16S ribozomal RNA (rRNA) üzerindeki aminoasil-tRNA (aa-tRNA) alıcı bölgesinde (A) 30S ribozomal alt birimine bağlanır ve kodon yanlış okuma ve translokasyon inhibisyonuyla protein sentezini etkiler (Shaw ve ark. 1993).

Tüm bu işlemlerin sonunda oluşan anormal proteinler hücre zarına sokulabilir. Hasarlı zardaki anormal proteinler, normal protein sentezine müdahale seviyesini artıran daha fazla antibiyotik molekülünün taşınmasını kolaylaştırır, otokatalitik hızlandırılmış alım oranı zarda daha fazla hasara yol açar ve sonuçta hücrenin ölümü gerçekleşir (Ramirez ve Tolmasky 2010).

Prokaryotlar ve ökaryotlar arasındaki 16S rRNA’ nın sekansındaki tek fark, tüm prokaryotik ve ökaryotik mitokondriyal sekanslarda bir adenosin ve sitoplazmatik ökaryotik sekanslarda bir guanozin olan 1408 pozisyonundadır. Bakteriyel ribozomdaki A1408-A1493 baz çifti, primer halka için ökaryotik yapıda meydana gelmeyen bir bağlanma cebi oluşturur ve bakteriyel hedef için aminoglikozidlerin göreceli özgüllüğünü açıklar (Kocabiyik ve Perlin 1992).

2.3.6.Aminoglikozidlerin Antimikrobiyal Etki Mekanizması

Aminoglikozidlerin birincil etki mekanizması, bakteriyel ribozomun 30S alt birimine bağlandıktan sonra protein sentezinin azalmasıdır. Polikatyonik yapıları, tRNA bağlanması için A bölgesinde (kodon ve antikodon tanıma bölgesi) 30S ribozom üzerinde polianyonik 16S rRNA'ya bağlanmaya izin verir. Aminoglikozid bağlı bakteriyel ribozomlar daha sonra protein sentezi sırasında mRNA'nın translasyonu için kullanılamaz hale gelir ve böylece hücre ölümüne yol açar (Kotra ve ark 2000).

Etki mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır. (1) küçük miktarlarda antibiyotik, aktif olarak uzayan proteinler olan ribozomlarda A bölgesine tam olarak anlaşılmayan ve az miktarda yanlış okumaya neden olan bir mekanizma ile hücreye nüfuz eder; (2) yanlış okunan proteinler yanlış katlanır ve daha büyük bir antibiyotik akışına izin veren kanallar oluşturdıkları membrana dahil edilir; (3) hücre içi antibiyotik konsantrasyonu artar ve ilaç hücrenin içinde hapsolür, bu da bakteri ölümüne neden olan protein sentezinin tamamen inhibisyonu ile sonuçlanır (Kotra ve ark 2000). Bazı aminoglikozidler, uzamayı engelleyerek veya başlatmayı doğrudan inhibe ederek protein sentezini de etkileyebilir (Wilson 2014). Tam bağlanma mekanizması ve müteakip aşağı akış etkileri kimyasal yapıya göre değişir, ancak tüm aminoglikozidler hızla (Leclercq ve ark. 1999) ve tipik olarak uzun süreli bir postantibiyotik etki (PAE) gösterirler (Zhanel ve ark. 1991). PAE'nin, bakterilerin protein sentezinin inhibisyonundan iyileşmesi için geçen süreyle doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (Krause ve ark. 2016).

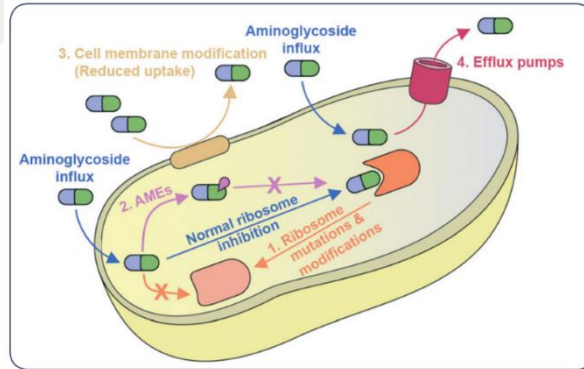
2.3.7.Aminoglikozid Direnç Mekanizması

Dirençli suşların ortaya çıkışı ampirik tedavilerde aminoglikozidlerin potansiyel etkisini bir miktar azaltmıştır (Leclercq ve ark. 1999). Bakterilerde aminoglikozidlere (AG) dirençte üç mekanizma rol oynar. Bunlar, ribozomal bağlanma bölgelerindeki değişiklikler; 30S ribozomal alt birimindeki reseptör proteini, bir mutasyon sonucunda değişebilir ve bağlanma bölgesinde modifikasyona yol açar, OMP (dış membranlarında bulunan porin proteinleri) geçirgenliğini değiştirerek iç zardan alımı azaltarak veya aktif akıntı yaparak aminoglikozidin hücre içine girişinin azalması (alımın azalması) ve en sık karşılaşılan aminoglikozidleri modifiye eden enzimlerin (AME) üretimidir (Park 2009). Bu mekanizmaların her

biri, sınıfın farklı üyeleri üzerinde çeşitli etkilere sahiptir ve genellikle herhangi bir dirençli izolatta birden fazla mekanizma yer alır (Krause ve ark. 2016).

Ribozomal bağlanma bölgelerindeki değişiklikler sadece streptomisine önemli ölçüde direnç gösterir. Diğer iki mekanizma ise tüm aminoglikozidleri etkileyebilirler (Leclercq ve ark. 1999).

Aminoglikozidler ayrıca Gram negatif bakterilerde önemli bir rol oynayan direnç nodülasyonu hücre bölünmesi (RND) taşıyıcı süper familyası da dahil olmak üzere bir dizi çok ilaçlı akışpompalarının substratlarıdır. Çeşitli RND proteinleri, *P. aeruginosa*, *Burkholderia pseudomallei*, *Acinetobacter baumannii* ve *E. coli* dahil olmak üzere çeşitli Gram negatif patojenlerde aminoglikozid direncinde rol oynar (Park 2009). Bu çeşitli direnç mekanizmalarına rağmen, aminoglikozidler antimikrobiyal tedavide, özellikle ciddi Gram negatif nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde hala önemli bir yere sahiptirler (Grogan ve ark. 1998). Aminoglikozidler doğru bir şekilde kullanmak için, direncin doğru bir şekilde saptanması ve dirençli izolatların yayılmasını önleme çabaları gereklidir (Park 2009).



Şekil 2.3. Aminoglikozidlerin normal aktivitesinin (mavi) ve direnç mekanizmasının gösterimi: hedef modifikasyon (turuncu), enzimatik modifikasyon (mor), azalan ilaç geçirgenliği ve akış pompaları (pembe) (Tsodikova ve Labby 2016).

2.3.7.1. Aminoglikozid Adaptif Direnç

Adaptif direnç, bir antibakteriyel ajanın bakterisidal etkisine geri dönüşümlü refrakterliği tanımlayan bir terimdir (Barclay ve Begg 2001). Gram negatif basillerde ve özellikle *Pseudomonas aeruginosa*' da görülmektedir (Barclay ve ark. 1992). Aynı şekilde, *P. aeruginosa*, Gram pozitif koklarda ve bir dizi *Enterobacteriales*' de kinolon grubuna karşıda adaptif direnç görülmüştür (Gould ve ark. 1990). Adaptif direnç, bir aminoglikozid dozundan sonra hızla indüklenir, ancak gerçek direncin aksine, birkaç saat içinde geri dönüşlüdür. Doz aralığının uzaması, sonraki dozdan

önce bakteriyel duyarlılığın geri dönüşü için zaman sağlayabilir. Geleneksel çoklu günlük uygulamalarda olduğu gibi daha kısa doz aralıkları, muhtemelen adaptif direncin güçlendirilmesine ve kalıcılığına neden olacaktır (Barclay ve Begg 2001).

2.3.7.2.Ribozomal Mutasyonlar

Birincil bakteri hedefinin mutasyon yoluyla modifikasyonu, çoğu antibiyotik için ortak birdirenç mekanizmasıdır. Bununla birlikte, klinik aminoglikozid direnci genellikle ribozomun yapısal bileşenlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlarla kendini göstermez. Çoğu bakteri türü rRNA'yı kodlayan genlerin birden fazla kopyasına sahiptir ve bu nedenle bu genlerin her kopyasının, direnci sağlamak için mutasyona uğraması gerekecektir. Böyle bir olayın olasılığınereydeyse yoktur. Bununla birlikte, *Mycobacterium* ve *Borrelia*, 16S rRNA' nın tek bir kopyasını veya tüm ribozomal operonun tek bir kopyasını içeren türlerdir. Buna göre ribozomal mutasyonlara bağlı klinik direnç, bu bakteri türlerinde önemlidir. Streptomisine direnç bu mekanizma ile gerçekleşir, ajan ribozomun 30S alt birimindeki tek bir bölgeye bağlanır. Bu mekanizma ile diğer aminoglikozidlere direnç nadirdir. Bunun sebebi, her iki ribozomal alt birimdeki birden fazla bölgeye bağlanabilmeleridir (Serio ve ark. 2017).

2.3.7.3.Azaltılmış Alım veya Azalmış Hücre Geçirgenliği

Bazı *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında ve diğer Gram negatif basiller membran geçirimsizliği nedeniyle aminoglikozid direnci sergiler. Bu mekanizma büyük olasılıkla kromozomaldır ve tüm aminoglikozidlere karşı çapraz dirence sebep olur. Tüm aminoglikozidleri etkilediği için ve orta derecede bir dirençle (orta duyarlılık) sonuçlandığı için klinikte oldukça önemlidir (Leclercq ve ark. 1999).

Bakteriler, antibiyotikleri akış sistemleri yoluyla ekstrüde edebilir ve böylece hedef inhibisyon için gerekli olan bir antibiyotiğin hücre içi birikimini azaltma yeteneğine sahiptir. Sonuç olarak, bu sistemler genellikle çeşitli patojenlerde çoklu ilaç direncini sağlamada önemli bir rol oynar. Efflux sistemlerin direnç-nodülasyon-bölüm (RND) ailesi, Gram negatif bakterilerde bu tip antibiyotik direncinde en önemli rolü oynamaktadır (Serio ve ark. 2017).

RND taşıyıcıları Gram negatif bakterilerin sitoplazmik zarında lokalizedir ve bir enerji kaynağı olarak membran proton itici kuvvetini kullanır. Periplazmik boşlukta lokalize edilmiş bir membran füzyon proteini (MFP), RND taşıyıcısını dış zar porinlerine (OMP) bağlar ve substratları hücreden verimli bir şekilde aktarabilen

sürekli bir üçlü kanal oluşturur. Çeşitli RND sistemlerinin çeşitli patojenlerde intrinsik aminoglikozid direncinde rol oynadığı gösterilmiştir. İçsel direnç, çeşitli antibiyotiklere doğal olarak düşük seviyeli bir dirence neden olan akış pompalarının kurucu ifadesi ile karakterizedir. Ayrıca pompaların düzenleyici genlerindeki mutasyonlar veya substrat varlığında ekspresyonun indüklenmesi, pompanın kendisinin aşırı ekspresyonuna ve yüksek seviyeli antibiyotik direncine yol açabilir (Serio ve ark. 2017).

2.3.7.4.Enzimatik İlaç Modifikasyonu

Klinik olarak karşılaşılan aminoglikozid direncinin en yaygın mekanizması, aminoglikozid molekülünün aminoglikozid değiştirici enzimler (AME' ler) yoluyla doğrudan modifikasyonudur (Serio ve ark. 2017). Bu modifikasyonlar ilacın hedefi için bağlanma afinitesini azaltır ve antibakteriyel etkinin kaybına yol açar (Krause ve ark. 2016). AG' lere dirençli suşlar genellikle AME enzimleri kodlayan plazmid kaynaklı genlerin edinilmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Shaw ve ark. 1993). Aminoglikozid direnç genlerinin türetilmesi çalışmaları bu genlerin hem bunları üreten organizmalardan hem de mikroorganizmalarda bulunan normal hücresel genlerin mutasyonundan kaynaklandığını göstermiştir (Shaw ve ark. 1993). Bu hücre içi bakteriyel enzimler, aminoglikozid molekülünün spesifik amino veya hidroksil gruplarının kovalent modifikasyonunu katalize eder (Leclercq ve ark. 1999). Bu etkinin sonucunda kimyasal olarak değiştirilmiş ilacın bakteriyel 16S rRNA' nın A bölgesine afinitesi azalır. Bu durum, enzimleri barındıran organizmalarda dirençli fenotiplere neden olur (Serio ve ark. 2017).

Aminoglikozidleri modifiye eden enzimlerin, amino grubunun asetilCo-A' ya bağlı asetilasyonunu kataliz eden N-asetiltransferaz (AAC), ATP' ye bağlı hidroksil grubunun adenillenmesini katalize eden O-adeniltransferaz (ANT/ADT), hidroksil grubunun ATP' ye bağlı fosforilasyonunu katalize eden O-fosfotransferaz (APH)' lar olmak üzere üç enzim ailesi vardır (Vanhoof ve ark. 1998). Aminoglikozidleri modifiye eden enzimler büyük ve çeşitli bir dağılıma sahiptir (Vanhoof ve ark. 1998). Enzimatik modifikasyon yüksek düzeyde direnç sağlar. Aminoglikozidleri modifiye eden enzimleri kodlayan genler genellikle plazmid kaynaklıdır ancak transpoze edilebilir elementlerle de ilişkilidir. Plazmid değişimi ve transpozonların yayılması sadece belirli bir tür içinde değil, çok çeşitli bakteri türleri arasında ilaca direnç fenotiplerin hızlı bir şekilde yayılmasını kolaylaştırır. Gram negatif basillerde

enzim aracılı direncin çoğu çoklu direnç genlerinden kaynaklanır (Leclercq ve ark. 1999).

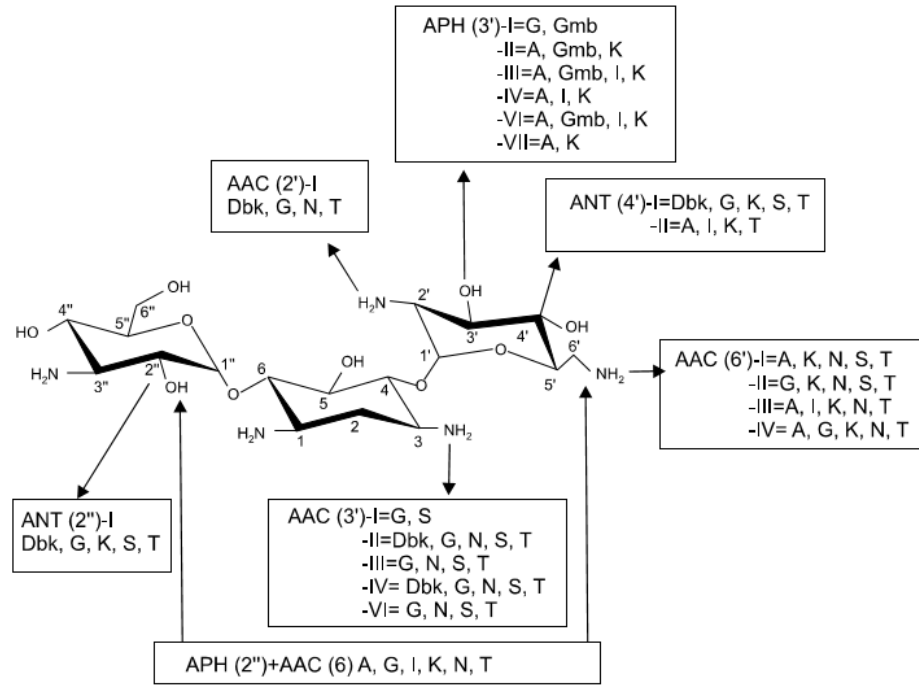
2.3.7.4.1. Aminoglikozidler Modifiye Eden Enzimlerin İsimlendirilmesi

Moleküler tekniklerin mevcudiyeti, araştırmacıların çeşitli aminoglikozid direnç genlerini daha doğru bir şekilde ayırt etmelerini ve bu genlerin heterojenliğini daha derinlemesine incelemelerini sağlamıştır. Genetik analiz, bu modifiye edici enzimleri kodlayan genlerde yüksek derecede heterojenlik olduğunu ortaya koymuştur. Kaçınılmaz olarak, bu durum özellikle bu genlerin isimlendirilmesinde tartışmalara yol açan karmaşıklıklara sebep olmuştur. Dahası, iki isimlendirme sisteminin kullanılmasıyla durum daha da karmaşık hale gelmiştir (Vanhoof ve ark. 1998).

Novick ve ark. tarafından önerilen bakteri plazmidleri için standart terminolojide (Park 2009), aminoglikozid asetiltransferazları, nükleotidiltransferazları ve fosfotransferazları kodlayan genler, sırasıyla aac, aad (ant) ve aph olarak adlandırılır (Vanhoof ve ark. 1998). Bu adlandırmada enzimatik modifikasyon tipi için AAC (asetiltransferaz), ANT (adeniltransferaz ya da nükleotidiltransferaz) ve APH (fosfotransferaz); modifikasyon bölgesi için (1), (3), (6), (9), (2'), (3'), (6'), (2'') ve (3''); benzersiz direnç profilleri için I, II, III, IV, V...vb., ve benzersiz protein tanımlamaları için a, b, c, ... kullanılmaktadır (Serio ve ark. 2017). Örneğin; APH (3') enzimi duyarlı aminoglikozidlerin 3'-hidroksilin grubunu modifiye eder (Shaw ve ark. 1993).

Aminoglikozidlerin AME modifikasyon alanları standart bir numaralandırma sistemi ile tanımlanır. 4 pozisyonundaki ilk şeker parçası tek bir asal (1'ila 6') numaralı pozisyonlara sahiptir; 6 pozisyonundaki ikinci şeker kısmı, bir çift asal (1'' ila 6'') ile numaralandırılmış pozisyonlara sahiptir. Bu tanımlamadan yola çıkarak AAC (6')-Ia ve AAC (6')-Ib aynı profilini veren iki eşsiz proteindir. Bu enzimleri kodlayan genlerin isimlendirilmesi Mitsunashi' nin genotip isimlendirilmesinin bir modifikasyonudur. Yaygın olarak kullanılan bu terminolojide gen tanımı, enzim tanımında olduğu gibidir ancak italik ve küçük harflerle yazılır (Vanhoof ve ark. 1998). Her bir gene benzersiz bir tanımlayıcı sağlamak için bir sayı da dahil edilebilir. Örneğin; *aac(6')-Ia* ve *aac(6')-Ib* aynı direnç profiline sahip iki proteini kodlayan benzersiz genlerdir (Serio ve ark. 2017).

Genlerin üç harfli bir koda dayalı olarak belirtildiği (aac = asetiltransferaz; aad = adenililtransferaz; aph = asetilfosfotransferaz) ve değişiklik bölgesini belirten bir büyük harf ile gösterildiği alternatif bir isimlendirme devardır. Bu adlandırma altında, asetilasyon enzimlerinin ailesinde, aacA, aacB ve aacC, sırasıyla aminoglikozid 6'-N-asetiltransferaz, aminoglikozid 2'-N-asetiltransferaz ve aminoglikozid 3'-N-asetiltransferazanlamına gelir (Shaw ve ark. 1993). Bu terminolojide, aacA7' nin bir 6'-N-asetiltransferaz enzimini kodlayan yedinci keşfedilengen olduğu varsayılmaktadır. Bu atamanın ardından bir alt bölümü belirten bir sayı gelebilir (Vanhoof ve ark. 1998). İki terminoloji sisteminin eşzamanlı kullanımının yanlış anlaşılmalara ve karışıklığa neden olabileceği açıktır (Vanhoof ve ark. 1998).



Şekil2.4. Bazı AME'lerin aminoglikozidleri modifiye ettiği bölgeler

2.3.7.4.2.Aminoglikozidleri Modifiye Eden Enzimlerin Sınıflandırması

2.3.7.4.2.1.Aminoglikozid Asetiltransferazlar

AME'lerin en büyük grubudur ve asetil-CoA' yı substrat olarak kullanarak tipik aminoglikozid moleküllerinin amino gruplarının asetilasyonunu kataliz eder (Braiu ve Piepersberg 1985). Aminoglikozidleri 1-, 3-, 6'- ve 2'- amino gruplarını modifiye eden dört N-asetiltransferaz sınıfı tanımlanmıştır (Shaw ve ark. 1993).

Spesifik olarak, AAC (1) ve AAC (3) enzimleri, 2-deoksistreptamin halkasının sırasıyla 1 ve 3 pozisyonunda bulunan amino gruplarını hedefler, AAC (2') ve AAC (6') ise 2,6-di-deoksi-2,6-diaminoglukoz halkasının 2' ve 6' pozisyonunda bulunan amino gruplarını hedefler (Krause ve ark. 2016). Bakterilerde bildirilen ilk AME, 1965 yılında Okamoto ve Suzuki tarafından tanımlanan kanamisin 6'-N-asetiltransferaz IV (AAC (6')- IV) enzimidir. Bu enzim, penisilinazın keşfinden sonra ilaç inaktivasyonu veya modifikasyonu ile antibiyotik direncine neden olan bir bakteriyel enzimin ikinci örneği olmuştur (Serio ve ark. 2017).

AAC (1); Aminoglikozidlerin 1-amino grubunu asetilleyerek modifiye eden enzim grubudur. Apramisin, lividomisin, paromomisin ve ribostamisin direnci ile karakterizedir. Ayrıca in-vitro enzim analizleri, butirosin ve neomisinin bu enzim tarafından asetillendiğini göstermiştir (Shaw ve ark. 1993). Bugüne kadar AAC (1) enzimleri *E. coli*, *Campylobacter spp.* ve bir *Actinomyces* türünde bulunmuştur (Ramirez ve Tolmasky 2010).

AAC (2'); Aminoglikozidlerin 2' amino grubunu asetilleyerek modifiye eden enzim grubudur. Gentamisin, tobramisin, netilmisin, dibekasin ve 6'-N-etilnetilmisin'e karşı dirençle karakterizedir (Shaw ve ark. 1993). Bu enzim grubunda başlıca *aac(2')-Ia* (*Providencia stuartii*), *aac(2')-Ib* (*Mycobacterium fortuitum* ve *Acinetobacter baumannii*), *aac(2')-Ic* (*M. tuberculosis* ve *Mycobacterium bovis*), *aac(2')-Id* (*Mycobacterium smegmatis*) ve *aac(2')-Ie* (*Mycobacterium leprae*) (Adams ve ark. 2008) olmak üzere 5 gen bulunmaktadır.

AAC (2')-Ia enzimi *Providencia stuartii* suşundan kromozomal olarak klonlanmıştır (Ramirez ve Tolmasky 2010). *Providencia/Proteus* grubuyla sınırlı olmasına rağmen *Pseudomonas* suşlarında da birkaç örneği gösterilmiştir (Shaw ve ark. 1993). *P.stuartii*'de bulunan AAC(2')-Ia enziminin, peptidoglikanın asetilasyonu yoluyla hücre duvarı döngüsünde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Gen ekspresyonu karmaşıktır ve çevresel koşullara bağlıdır. Bu nedenle, suşlar tipik olarak aminoglikozidlere duyarlıdır ve enzim aminoglikozidler tarafından uyarılmaz. Artmış aminoglikozid minimum inhibe edici konsantrasyonları (MİK) sağlamak için düzenleyici gende bir dizi mutasyonlar gereklidir (Serio ve ark. 2017).

M. tuberculosis' te bulunan *aac (2')- Ic* geni klonlanmış ve *E. coli* içinde eksprese edilmiştir ve saflaştırılmış enzim, in vitro olarak test edilen tüm

aminoglikozid substratlarını asetillemiştir. İn vitro bu geniş aktiviteye rağmen, *aac(2')* genlerinin mikobakterilerdeki klinik aminoglikozid direncinde rol oynamadığı gösterilmiştir (Serio ve ark. 2017).

AAC (3); Aminoglikozidlerin 3-amino grubunu asetilleyerek modifiye eden enzim grubudur. Gram negatif bakterilerde tanımlanmış olan başlıca dokuz alt sınıfı vardır (Ramirez ve Tolmasky 2010). AAC (3) -V ve AAC (3) -II enzimlerinin yapılan çalışmalar neticesinde aynı oldukları ortaya çıkmıştır (Shaw ve diğ.,1993).

i. AAC (3)-I; Gentamisin, sisomisin ve fortimisin (Astromisin) direnciyle karakterizedir (Shaw ve ark. 1993). *Enterobacteriales* üyeleri arasında yaygın olarak bulunmakla birlikte çalışmalar *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerinde de bulunduğunu göstermiştir (Shaw ve ark. 1993). Yapılan çalışmalarda, bu gruptaki enzimlerin genlerinin integronlardaki gen kasetlerinin bir parçası olarak bulunmuştur (Ramirez ve Tolmasky 2010).

ii. AAC (3)-II; Gentamisin, tobramisin, dibekasin, netilmisin, 2'-N-etilnetilmisin, 6'-N-etilnetilmisin ve sisomisine direnç ile karakterizedir. Bu enzim daha önce AAC (3)-V olarak tanımlanmıştır fakat DNA dizi analizleri bu iki enzimi kodlayan genlerin aynı olduğunu göstermiştir (Shaw ve ark. 1993). Bu enzim *Enterobacteriales* üyelerinde çok sık görülmekle birlikte cinsler arasında farklılık göstermektedir. Ayrıca *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türleri arasında da görülmektedir. DNA dizi çalışmaları sonucunda bu enzimi kodlayan üç gen *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IIb* ve *aac(3)-IIc'* nin dizi analizleri belirlenmiştir (Ramirez ve Tolmasky 2010). *aac(3)-IIa* çeşitli cinslerde bulunurken, *aac(3)-IIb* geni *E. coli*, *Alcaligenes faecalis* ve *S.marcescens'* ten, *aac(3)-IIc* geni ise *E. coli* ve *P.aeruginosa'* dan klonlanmıştır (Ramirez ve Tolmasky 2010).

iii. AAC (3)-III; Gentemisin, tobramisin, dibekasin ve 5-epizizomisine direnç ile karakterize edilir. Bu enzim *aac(3)-IIIa*, *aac(3)-IIIb* ve *aac(3)-IIIc* olmak üzere 3 gen tarafından kodlanmaktadır. Bu üç gen de *Pseudomonas* suşlarından klonlanmıştır (Ramirez ve Tolmasky 2010). *aac(3)-IIIc* geni ile *ant (2'')-Ib* geninin DNA dizi analizi karşılaştırmaları bu iki genin aynı olduğunu göstermiştir (Shaw ve ark. 1993). Bazı araştırmacılar *ant (2'')-Ib* geninin yanlışlıkla *aac(3)-IIIc* geni olarak sınıflandırıldığına inanmaktadır (Shaw ve ark. 1993).

iv. **AAC (3)-IV;** Gentamisin, tobramisin, dibekasin, netilmisin, 2'-N-etilnetilmisin, 6'-N-etilnetilmisin, apramisin ve sisomisin'e direnç ile karakterizedir. *Enterobacteriales* üyelerinde nadir görülmektedir. *aac(3)-IVa* geni *E. coli*'nin (başlangıçta *Salmonella* olduğu düşünülen) klinik suşlarında (Brau ve ark. 1984), *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas stutzeri*' de (Heuer ve ark. 2002) ve bir veteriner izolatu olan *Salmonella* suşundan klonlanmış ve klinik olarak önemli olan türlere transfer edilebildiği gösterilmiştir (Shaw ve ark. 1993).

v. **AAC (3)- VI;** Gentamisin ve 6'-N-etilnetilmisin' e karşı direnç ile karakterizedir. Tobramisin, netilmisin, 6'-N-etilnetilmisin, 5-epizizomisin ve kanamisin'e direnç göstermese de bu bileşiklere karşı düşük düzeyde bir enzimatik aktiviteye sahiptir. *Enterobacteriales* üyeleri arasında oldukça nadir görülmektedir (Shaw ve ark. 1993).

vi. **AAC (3) -VII, AAC (3) -VIII, AAC (3) -IX ve AAC (3) -X;** Dört ek *aac (3)* geni, aktinomiset suşlarından klonlanmıştır (Ramirez ve Tolmasky 2010). AAC (3)-X enzimi gentamisin, dibekasin, kanamisin' e karşı direnç sağlarken neomisin ve paromomisin' e daha az oranda direnç sağlar (Shaw ve ark. 1993). Bu enzimin önemli bir özelliği 3-amino grubunda kanamisin ve dibekasinin asetilasyonunu katalizlemenin yanı sıra, arbekasin ve amikasindeki 3-amino grubuna asetilasyon aracılık etmesidir ve böylece AAC (3 ") aktivitesine sahip olduğu tespit edilen ilk AAC enzimi olmuştur (Hotta ve ark. 1998).

AAC (6'); Aminoglikozidlerin 6'-amino grubunu asetilleyerek modifiye eden başka bir enzim grubudur. Bu enzimlerden bazıları klinik açıdan öneme sahip tobramisin, amikasin, netilmisin, fortimisin, sisomisin ve gentemisin C_{1a} ve C_{2'} yimodifiye edebilmektedir ancak gentamisin C_{1'} e ve izepamisin' e karşı daha az etkilidir (Shaw ve ark. 1993).

AAC (6 ') enzimleri en yaygın olanıdır ve farklı bakteri türlerinde ve çeşitli mobil elementlerde bulunur. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde bulunurlar, genler plazmidlerde ve kromozomlarda bulunur ve genellikle mobilgenetik elementlerin bir parçasıdır (Tolmasky 2007).

AAC (6')-I ve AAC (6')-II enzimleri tobramisin, netilmisin ve 2'-N-etilnetilmisin asetilasyonu yapabilen iki enzim sınıfıdır (Shaw ve ark. 1993). Bununla birlikte amikasin ve gentamisin' i modifiye edebilme kabiliyetleri yönünden

önemli bir fark vardır (Shaw ve ark. 1993). AAC (6')-II enzimleri, tüm gentamisin C bileşiklerini modifiye edebilirken amikasin'e etki edemez. AAC (6')-I enzimi ise amikasin ve gentamisin C_{1a} ve C_{2'} yi modifiye edebilmektedir (Ramirez ve Tolmasky 2010).

Bu enzim sınıfının 3 alt ailesi vardır. En büyük AAC (6') alt ailesini AAC (6')- Ib, AAC (6')- IIa, AAC (6')- I Ib' den ve AAC (6') + APH (2'') bifonksiyonel enzimin (AAC(6')- Ie) amino-terminal kısmı oluşturmaktadır (Shaw ve ark. 1993). AAC (6') + APH (2'') bifonksiyonel enzimi Gram pozitif bakterilerle sınırlıyken AAC (6')- Ib, AAC (6')- IIa ve AAC (6')- I Ib enzimleri yalnızca Gram negatif bakterilerde görülmektedir (Shaw ve ark. 1993).

İkinci bir AAC (6')- I alt ailesi AAC (6')- Ic, AAC (6')- Id ve AAC (6')- If enzimlerinden oluşur. Yapılan çalışmada AAC (6')- Id ve AAC (6')- If enzimlerinin yüksek derecede ilişkili bulunması yakın zamanda ortak bir atadan gelen genlerden türetildiklerini ileri sürülmüştür (Shaw ve ark. 1993). Ayrıca aynı çalışmada kromozomal olarak kodlanmış AAC (6')- Ic enzimini kodlayan gen, bu plazmid kaynaklı genlerin her ikisinin ortak atası olabileceğine yer verilmiştir (Shaw ve ark. 1993).

AAC' nin üçüncü alt ailesi tek üyesi AAC (6')-Ia' dır (Shaw ve ark. 1993). AAC (6')- I alt sınıfı kalabalık bir nüfusa sahiptir ve tanımlanmaları için çift küçük (AAC (6')-Iaf) harfle adlandırılmaya başlanmıştır. AAC (6')- Ib varyantları, AAC (6')- Ib3, AAC (6')- Ib4, AAC (6')- Ib6 ve AAC (6')- Ib7 şeklinde tanımlanmaktadır (Ramirez ve Tolmasky 2010).

i. AAC (6')-I; Tobramisin, amikasin, netilmisin, dibekasin, 5-epizisomisin, 2'-N-etilnetilmisin ve sisomisine karşı direnç ile karakterizedir. Bu enzimi kodlayan dokuz gen (*aac (6')-Ia*, *aac (6')-Ib*, *aac (6')-Ic*, *aac (6')-Id*, *aac (6')-Ie*, *aac (6')-If*, *aac (6')-Ig*, *aac (6')-Ih*, *aac (6')-Ii*) tanımlanmıştır. *aac (6')-Ia* son derece nadir gözlenmektedir. Aac (6') - Ib, en yaygın aminoglikozid modifiye edici enzimdir ve tobramisin, kanamisin ve amikasin'e direnç kazandırır, ilk olarak 1986 yılında *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında tanımlanmıştır (Kim ve ark. 2011). *Acinetobacter*, *Enterobacteriales*, *Pseudomonadaceae* ve *Vibrionaceae* cinsine ait birçok Gram negatif türden izole edilmiştir (Ramirez ve Tolmasky 2010). *aac (6')-Ic* geni *Serratia marcescens* suşlarından klonlanmıştır ve DNA hibridizasyon analizleri tüm *Serratia marcescens* suşlarının AAC(6')-I direnç profilinin ifade edilip

edilmediğine bakılmaksızın bu geni taşıdıkları gösterilmiştir (Shaw ve ark. 1992). *Serratia* suşlarında bu gen kromozomal yerleşim gösterir (Champion ve ark. 1988). *Serratia* haricindeki bakterilerle yapılan hibridizasyon çalışmaları bu genin diğer bakterilerde bulunmadığını göstermiştir (Shaw ve ark. 1992) *aac (6')-Id* çok nadir bulunur. *aac (6')-Ie* Gram pozitif bakterilerde görülen ve iki fonksiyonlu bir enzim olan AAC(6')+APH(2'') enziminin amino terminal bölümünü kodlamaktadır. *aac (6')-If* *Enterobacter cloacae*' dan, *aac (6')-Ig* ve *aac (6')-Ih* *Acinetobacter spp.*' den, *aac (6')-Ii* ise *Enterococcus faecium* suşlarından klonlanmıştır (Shaw ve ark. 1993).

ii. **AAC (6')-II;** Gentamisin, tobramisin, netilmisin, dibekasin, 2'-N-etilnetilmisin ve sisomisin' e direnç ile karakterizedir. Bu enzimi kodlayan *aac(6')-IIa* ve *aac(6')-IIb* geni sadece *Pseudomonas* suşlarından klonlanmıştır (Shaw ve ark. 1993).

AAC (6')- Ib-cr

Florokinolonlar, klinik veya veterinerlik tıbbında yaygın olarak kullanılan antimikrobiyallerdir (Leo'n ve ark. 2011). *Enterobacteriales*' deki kinolon direnci genellikle hedef enzimlerdeki mutasyonlardan (DNA gyrase ve / veya topoizomerez IV), porin ekspresyonundaki değişikliklerden ya da aşırı akış pompalarının aşırı ekspresyonundan kaynaklanır (Paterson 2006). Son zamanlarda, plazmid aracılı kinolon direnci (PMQR), farklı mekanizmalarla kinolonlara düşük seviye direnç kazandırdığı tespit edilmiştir. Her ne kadar PMQR' nin klinik önemi belirsiz olsa da PMQR' nin plazmidler üzerindeki β -laktamazlara bağlanması, geniş spektrumlu β -laktamaz (ESBL) üreticilerinin, kinolonlara ortak seçim yoluyla azaltılmış duyarlılıklarının yayılmasına katkıda bulundukları açıklanmıştır (Leo'n ve ark. 2011).

Aminoglikozid asetiltransferaz *aac (6')- Ib* enzimini kodlayan plazmid kaynaklı genin çeşitli varyantları bulunmaktadır ve en büyük klinik endişe, aminoglikozidlere ek olarak florokinolonları içerecek şekilde enzimin hedeflerini genişleten *aac (6')-Ib-cr* varyantıdır (Bell ve ark. 2009). Bu enzim *aac(6')-Ib* enzimidaki kodon 102 (Trp®Arg) ve kodon 179' da (Asp®Tyr) amino asit değişiklikleri ile karakterizedir (Robicsek ve ark. 2006).

Aac(6')-Ib-cr enzimidaki -cr eki, siprofloksasin (florokinolon) direnci anlamına gelir. Böylece, *aac(6')- Ib-cr* varyant geni aynı anda aminoglikozid ve florokinolona karşı direnci indükleyebilir (Kim ve ark. 2011).

Bu varyant 2003 yılında Çin' de bir klinik *E. coli* izolatında tespit edilmiştir. Kısa bir süre sonra, Kuzey Amerika' da farklı bir plazmid üzerinde tekrar tanımlanmıştır (Wang ve ark. 2004). İlk tanımlanmasından bu yana, bu enzim çok sayıda genetik ortamda çok sayıda coğrafi bölgede tespit edilmiştir (Strahilevitz ve ark. 2009). 1990' larda siprofloksasinin klinik kullanımındaki sürekli artışın, bu varyant için seçim basıncı oluşturduğu muhtemel görünmektedir (Robicsek ve ark. 2006). *aac(6')-Ib-cr* geni Türkiye' de ilk olarak 2006 yılında Nazik ve ark. tarafından tanımlanmıştır (Nazik ve Öngen 2010).

aac(6')-Ib-cr geni *Enterobacteriales* arasında hızla yayılmıştır izolatlara düşük seviyeli bir direnç sağlasa da özellikle yüksek topoizomera mutasyonları barındıran daha yüksek dirençli determinantların seçimini kolaylaştıran bir ortam yaratabilir (Ilaria Frasson ve ark. 2011).

Aac(6')-Ib-cr varlığı multiklonaldır ve geniş spektrumlu β -laktamazların varlığı ile ilişkilendirilmiştir (Warburg ve ark. 2009). Direnç genlerinin kümelenmesi, belirli gen kombinasyonlarının sıklıkla birlikte hareket ettiği ve bir antibiyotiğin kullanılmasının, ilişkisiz antibiyotik sınıflarına direnç veren genlerin korunmasını seçebileceği anlamına gelir (Partridge 2015).

Genellikle farklı integronlarda bir gen kaseti olarak bulunur ve *qnrA1*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB6*, *qnrB10*, *qnrS1*, *qnrS2* ve *qepA* kinolon direnç genleriyle veya *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-14*, *blaCTX-M-15*, *blaCTX-M-24*, *blaDHA-1*, *blaSHV-12* ve *blaKPC-2* gibi β -laktamaz genleriyle ilişkilendirilir ayrıca çeşitli konjugasyon deneyleri genin yatay transfer edilebildiğini göstermiştir (Ramirez ve Tolmasky 2010).

2.3.7.4.2.2.Aminoglikozid Nükleotidiltransferazlar

Aminoglikozid nükleotidiltransferazlar (veya adenililtransferazlar), O-adenilatlıaminoglikozid ve inorganik pirofosfatın magnezyum şelatını oluşturmak için Mg-ATP ve aminoglikozid molekülleri arasındaki reaksiyonu katalize eder. Bu enzimler, 2'', 3'', 4', 6 ve 9 konumlarındaki hidroksil gruplarını bir ATP vericisinden hidroksil gruplarına AMP ekleyerek etki eder (Krause ve ark. 2016). Klinikte yaygın görülen üyeleri ANT (2'') ve ANT (4')' dir. ANT (3''), streptomisin 3-hidroksil pozisyonunu ve spektinomisin 9-hidroksil grubunu değiştirerek atipikaminoglikozidler streptomisine ve spektinomisine direnç kazandırır (Serio ve ark. 2017).

ANT (6) ve ANT (9) adenilat Gram pozitif organizmalarda sırasıyla 6-hidroksil ve 9-hidroksil streptomisin ve spektinomisin gruplarına etki eder (Serio ve ark. 2017).

ANT (2'') ilk olarak *Klebsiella pneumoniae'* nin klinik izolatında tanımlanmıştır. Bu enzim, 4,6-ikame edilmiş aminoglikozid moleküllerinin 2''-hidroksil grubunun O-adenillenmesini katalize eder ve çok çeşitli substrat moleküllerini adenile ettiği için çokluaminoglikozidlere direnç sağlar (Serio ve ark. 2017).

ANT(4') kanamisin nükleotidiltransferaz başlangıçta *Staphylococcus aureus'* un klinik izolatlarından izole edilmiştir. Bu enzim, nükleotid substratı olarak ATP, GTP veya UTP kullanarak kanamisinin 4'-hidroksil grubunu adenile eder. Kanamisin A, B ve C, gentamisin A, amikasin, tobramisin ve neomisin B ve C dahil olmak üzere çok çeşitli aminoglikozidleri inaktive edebilir (Krause ve ark. 2016).

ANT enzimlerini kodlayan genler plazmidlerde, transpozonlarda ve kromozomlarda bulunur (Ramirez ve Tolmasky 2010).

ANT (2''); Aminoglikozidleri 2''- amino grubunu adenilleyerek modifiye eden enzim grubudur. Ailenin tek üyesi olan ANT (2'')-Ia enzimi sınıf 1 ve 2 integronlardaki gen kasetlerinde bulunur (Ramirez ve ark. 2005) ve gentamisin, tobramisin, dibekasin, sisomisin ve kanamisine direnç aracılık eder (Ramirez ve Tolmasky 2010). Yaygın olarak plazmidler ve transpozonlar tarafından kodlanır. aadB olarak da adlandırılan bir gen tarafından kodlanan bu enzim, *Enterobacteriales* üyelerinde ve non-fermentatif Gram negatif basillerde bulunur (Ramirez ve Tolmasky 2010).

i. ANT (2'')-I; Gentamisin, tobramisin, dibekasin, sisomisin ve kanamisine direnç ile karakterizedir. Bütün Gram negatif bakteriler arasında yaygındır. 2''-O-adeniltransferaz aktivitesini kodlayan üç gen bildirilmiştir. *ant(2'')-Ia* geni en yaygın olanıdır. Fosfoşelüloz bağlama deneyleri daha önce de belirttiğimiz gibi *ant(2'')-Ib* geni *aac(3)-IIIc* geniyle aynı olduğu gösterilmiştir (Shaw ve ark. 1992).

ANT (3''); Bakterilerde en sık görülen ANT enzimleridir, spektinomisin ve streptomisine karşı direnç sağlar ve kodlama genleri genellikle aadA olarak adlandırılır (Hollingshead ve Vapnek 1985). GenBank' ta aadA1 ila aadA24

olaraktanımlanan yüksek derecede ilişkili gen versiyonu bulunur (Ramirez ve Tolmasky 2010). AadA1 tarafından kodlanan protein için alternatif adlandırma ANT (3'')-Ia'dır. ANT (3'')-Ia'yı tanımlamak için kullanılan diğer bir isim AAD (3'')' dir. AadA genleri çok sayıda integron, plazmid ve transpozonun bir parçası olarak gen kasetlerinde bulunur (Ramirez ve Tolmasky 2010).

ANT (4'); Tobramisin, amikasin, izepamisin ve 4'-hidroksil grupları olan diğer aminoglikozidlere karşı dirençle karakterize olan adeniltransferazlardır (Shaw ve ark. 1993).

i. ANT (4')-I; Aminoglikozidleri hem 4'- hem de 4''- hidroksil gruplarını modifiye eden ve böylece dibekasına direnç sağlayan enzim grubudur. Bu mekanizma Gram pozitif bakterilerle sınırlıdır. *ant(4')-Ia* geni *Staphylococcus* suşlarında sık görülür (Shaw ve ark. 1993). ANT (4') -Ia, *Staphylococcus*, *Enterococcus* ve *Bacillus spp.* gibi Gram pozitif plazmidlerde bulunur. Bu gen ayrıca *aadD* ve *aadD2* olarak da adlandırılır (Perez ve ark. 2009).

ii. ANT (4')-II; Bu mekanizma ilk olarak 1981 yılında bir hastanede Gram negatif bakterilerde amikasin direncinin patlak vermesiyle ortaya çıkmıştır. İlk önce *P.aeruginosa* izolatlarında gözlenmiş ancak 1984' te *E. coli*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.* ve *Serratia spp.*' de görülmüştür (Jacoby ve ark. 1990).

Gram negatif basillerde iki adet ANT (4')-II enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler hedef olarak aminoglikozidlerin 4. pozisyonunu kullanamadıklarından dibekasını modifiye edemezler. ANT(4')-IIa, *Pseudomonas* ve *Enterobacteriales* üyelerinde ve ANT(4')-IIb enzimi ise bir *P. aeruginosa* transpozonunda tanımlanmıştır (Coyne ve ark. 2010).

ANT (6); Enzim, *ant (6) -Ia*, *ant (6)-Ib* ve *aadE* genleri tarafından kodlanır. Hepsi aynı substrat profilini sahip (streptomisine direnç) olduğundan aynı alt sınıfa aittir, ancak aynı değildirler. Bu genler Gram pozitif bakteriler arasında oldukça yaygındır (Tolmasky 2007).

ANT (9); ANT (9) -Ia ve ANT (9) -Ib olarak iki enzim tanımlanmıştır ve her ikisi de spektinomisine direnç gösterir. ANT (9)-Ia önce *S. aureus'* ta ve sonra *Enterococcus avium*, *E. faecium* ve *E. faecalis'* te tarif edilmiştir. Dört bakterinin hepsinde gen, Tn554' ün birparçası olarak bulunur (Ramirez ve Tolmasky 2010).

2.3.7.4.2.3.Aminoglikozid Fosfotransferazlar

APH sınıfı enzimler ikinci büyük aminoglikozid değiştirici enzim grubudur. Bu enzimler, aminoglikozid molekülleri üzerinde γ -fosforil grubunun ATP' den hidroksil gruplarına transferini kataliz eder. Yapısal olarak çeşitli enzim grubu, aminoglikozidlerde bulunan hidroksil gruplarının ATP' ye bağlı fosforilasyonunu katalizeettikleri için kinazlar gibi davranırlar (Krause ve ark. 2016). APH sınıfı enzimlere “aminoglikozid kinazlar” da denir ve   karyotiklerin-treonin ve tirozin kinazlarla bazı mekanik ve yapısal benzerlikleri paylaşarak evrimsel bir bağlantı olduğunu gösterir APH enzimlerinin çoğu APH (3') alt ailesine aittir (Kim ve Mobashery 2005), ancak 2'' hidroksili hedefleyen varyantlar da mevcuttur (Ramirez ve Tolmasky 2010). Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler arasında görülür. Ailenin çeşitli   yeleri kanamisin ve neomisine direncine yol açar, ayrıca amikasin ve gentamisin B dahil olmak üzere çeşitli aminoglikozidlerde de modifiye edebilir (Krause ve ark. 2016).

Sınıflar ve alt sınıflar şunlardır: APH (4) -I, APH (6) -I, APH (9) -I, APH(3')- I ila VII, APH (2'')- I ila IV, APH (3'') -I, APH (7'')- I (Ramirez ve Tolmasky 2010).

APH (2''); APH (2''), Gram pozitiflerde gentamisine dirençte önemli bir rol oynar (Ramirez ve Tolmasky 2010).

APH (3); Kanamisin ve neomisin direnci ile karakterizedir. Bu grup direnç mekanizması, butirosin, lividomisin, amikasin, izepamisin ve gentamisin B' ye kadar geniş bir direnç profiliyle tanımlanmaktadır (Shaw ve ark. 1993). Aph (3')- IIIa geni öncelikle Gram pozitif koklarda bulunur ve kanamisin, amikasin, neomisin ve butirosin dahil olmak üzere çok çeşitli aminoglikozid antibiyotiklerine direnç sağlar. Gram pozitif organizmalarda, 6'-N-asetiltransferaz ve 2''-O-fosfotransferazın iki işlevli birenzimin ifadesi, şu anda klinik uygulamada kullanılan aminoglikozidlere karşı yüksek seviyeli dirençten sorumludur. Her iki aktivite ayrı ayrı ifade edilebilir ve iki işlevli enzimin kinetik özellikleri, tek işlevli muadillerinden farklı değildir (Serio ve ark. 2017).

Aminoglikozid fosfotransferazlara bağlı streptomisin direnci APH (3'') ve APH (6) olmak üzere iki enzimin sonucudur. Her iki enzim streptomisin   reticisi *Streptomyce sgriseus'* ta bulunur ve aph (6) kodlama geni streptomisin biyosentetik genleri ile kümelenir (Krause ve ark. 2016).

APH (4) ve APH (9), ilgili aminoglikozid molekülleri üzerindeki 4- ve 9-hidroksilpozisyonlarının fosforilasyonu, sırasıyla higromisin ve spektinomisine dirençten sorumludur (Krause ve ark. 2016).

i. APH (3)-I; Kanamisin, neomisin, paromomisin, ribostamisin, lividomisin ve gentamisin B' ye direnç ile karakterizedir. Çok yaygın olarak görülen bir direnç mekanizmasıdır. Gram negatif bakterilerde, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde görülmüştür. *aph(3')-Ia*, *aph(3')-Ib*, *aph(3')-Ic* olmak üzere üç gen klonlanmıştır (Shaw ve ark. 1993). AphA-1 olarak da bilinen *aph(3')-Ia* geni, Tn903 transpozonunun bir parçasıdır ve klonlama araçlarında yaygın olarak marker gen olarak kullanılır (Bernardi ve Bernardi 1991). *aph (3')-Ib* geni, geniş konakçı konjugatif RP4 plazmidinin bir parçasıdır (Ramirez ve Tolmasky 2010). *aph(3')-Ic* geni, plazmidlerin ve transpozonların bir parçasıdır ve *Corynebacterium spp.* *Klebsiella pneumoniae* suşundan klonlanmıştır ve geniş dağılıma sahiptir (Vakulenko ve Mobashery 2003).

ii. APH (3 ')- II; Alt sınıfı kanamisin, neomisin, butirosin, paromomisin ve ribostamisine karşı direnci belirten üç enzimi içerir. AphA-2 olarak da bilinen *aph (3')- IIa*, Tn5 transpozonunda kodlanan üç direnç geninden biridir (Steiniger ve ark. 2004). Hem prokaryotlar hem de ökaryotlar için klonlama vektörlerinde direnç markerı olarak kullanılır (Wright ve Thompson, 1999). Bu gen tarafından kodlanan enzim ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir ve kanamisin ile kompleks halinde kristal yapısı çözülmüştür (Nurizzo ve ark. 2003). *aph(3')-Iib* geni *P.aeruginosa* kromozomunda (Winsor ve diğerleri, 2005) ve bu alt sınıfın üçüncü üyesi olan *aph(3')-Iic* geni yakın zamanda *S. maltophilia*' da tanımlanmıştır (Ramirez ve Tolmasky 2010).

iii. APH (3)-III; Kanamisin, neomisin, paromomisin, ribostamisin, lividomisin, butirosin ve gentamisin B' ye direnç ile karakterizedir. Amikasin ve izepamisin de in-vitro olarak modifiye edilir. Bu mekanizma daha çok Gram pozitif bakteriler arasında yaygındır ancak *Camplobacter* türlerinde de bulunur. *aph(3')-IIIa* geni *S. aureus* ve *Streptococcus faecalis*' den klonlanmıştır (Shaw ve ark. 1993). ADP ile kompleks halinde kristal yapısı çözülmüş ve ökaryotlardan kinazlara yakın bir benzerlik göstermektedir (Hon ve ark. 1997). *aph(3')-IVa* kodlama geni, *Bacillus* kromozomunda (Herbert ve ark. 1983) ve APH(3')-Va ila Vc' yi kodlayan genler aktinomisetlerin (Wright ve Thompson 1999) kromozomunda bulunur (Ramirez ve

Tolmasky 2010). Bu alt sınıf için direnç profili neomisin, paromomisin ve ribostamisin içerir. AphA-6 olarak da bilinen *aph (3')- VIa*, *A. baumannii*' de (Martin ve ark. 1988) ve *aph (3')- VIb*, *K. pneumoniae* ve *S. marcescens*'te tanımlanmıştır (Ramirez ve Tolmasky 2010). AphA-7 olarak da bilinen *aph (3')- VIIa*, *C. jejuni*' de tarif edilmiştir ve kanamisin ve neomisin direnç sağlar (Tenover ve ark. 1989).

iv. APH (3')-V; Üç *aph (3')-V* geni aktinomisetlerden klonlanmıştır: *aph (3')- Va*, bir *Streptomyces fradiae* neomisin üreten suştan (Thompson ve Gray 1983), *aph (3')- Vb*, *Streptomyces ribosidificus* (ribostamisin üreten) (Hoshiko ve ark. 1988) ve *aph (3')- Vc*, bir neomisin üreten *Micromonospora chalybeata* ' dan klonlanmıştır (Salauze ve Davies 1991). Bu genler tarafından kodlanan proteinler yüksek oranda korunmuştur (Shaw ve ark. 1993).

APH (3''); APH (3'') enzimlerinin tek alt sınıfı vardır ve streptomisine direnç gösterir. *aph (3'')- Ia* geni ayrıca *aphE* ve *aphD2* olarak da bilinir (Ramirez ve Tolmasky 2010). APH (3'')- Ia enzimi *S. griseus* ' dan klonlanmıştır ve 3'' pozisyonunda streptomisini değiştirdiği gösterilmiştir (Mansouri ve ark. 1989). APH(3'')- Ib kodlama geni başlangıçta RSF1010 plazmidi (Scholz ve diğerleri, 1989) içinde ve daha sonra çok sayıda plazmid, transpozon, bütünleştirici konjugatif element ve en az bir kromozomda bulunmuştur (*V. cholerae* MJ-1236'nın kromozomu1, erişim numarası CP001485). Gen ayrıca *strA* olarak adlandırılabilir (Ramirez ve Tolmasky 2010). Aph(3'')-Ic enzimi *M. fortuitum* kromozomlarından izole edilmiştir (Ramon ve ark. 2006).

APH (4); Bu grupta APH (4)-Ia ve APH (4)-Ib olarak iki enzim vardır (Ramirez ve Tolmasky 2010). Bu enzimler higromisine direnç gösterir ve klinik olarak anlamlı değildir. Bu genler hem prokaryotlar hem de ökaryotlar için klonlama araçlarının yapımında kullanılmıştır (Abhyankar ve ark. 2009). Higromisine B direncinde *aph (4) -Ia* ve *aph(4) -Ib* proteinleri aracılık eder (Ramirez ve Tolmasky 2010).

APH (6); APH (6)' enziminin alt sınıfında streptomisine direnç sağlayan 4 enzim vardır (Ramirez ve Tolmasky 2010). *AphD* ve *strA* olarak da bilinen Aph (6)- Ia enzimini kodlayan gen, *aph (3'')-Ia* geniyle aynı *Streptomyces griseus* suşundan klonlanmıştır ve streptomisin üretiminde yer alan enzimleri kodlayan genlerle kümelenmiş olarak bulunmuştur (Mansouri ve ark. 1989).

Aph (6)-Ib ayrıca *sph* olarak adlandırılmış ve *Streptomyces glaucescens*' te tanımlanmıştır (Shaw ve ark. 1993). APH (6) -Ic' yi kodlayan gen, Gram negatiflerde bulunan bir transpozon olan Tn5' te bulunan üç direnç geninden biridir (Steiniger ve ark. 2004). *strB* ve *orfI* olarak da adlandırılan *aph (6) -Id* geni, ilk olarak Gram negatif bakterilerde ve ayrıca *Actinomycetes*' ten klonlanmıştır (Ramirez ve Tolmasky 2010).

APH (7''); Higromisine direnç gösteren *aph(7'')*- *la*, *S. hygroscopicus*' tan izoleedilip, klonlanmış ve *Chlamydomonas reinhardtii*' nin moleküler genetik analizinde kullanılmıştır (Berthold ve ark. 2002).

APH (9); *aph (9)-Ia* geni ilk olarak *Legionella pneumophila*' da bulunmuştur (Suter ve ark. 1997). Aminoglikozidlerin 9- hidroksil grubunu fosforile eder ve spektinomisine dirençten sorumludur(Krause ve ark. 2016).

2.3.8.Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimleri Oluşturan Genlerinin Orijini

Klinik olarak ilgili suşlardaki aminoglikozid direnç genlerinin, aminoglikozidleri üreten organizmalardan türetildiği uzun zamandır önce sürülmüştür (Serio ve ark. 2017). Aminoglikozid üreten suşlarda bu enzimlerin varlığı, üretilen antibiyotiğe karşı kendi kendini koruma mekanizması sağlayabilir. Bu nedenle, aktinomisetler, bugünün bazı aminoglikozid direnç genlerinin türetildiği başlangıç gen havuzunu sağlayabilirler (Shaw ve ark. 1993).

İkinci bir teori ise aminoglikozid direnç genlerinin, normal hücrel metabolizmaya katılan enzimleri kodlayan bakteri genlerinden türetilmiş olmasıdır.

Bu teoriye göre aminoglikozid kullanımının selektif basıncı, bu enzimlerin ekspresyonunu değiştiren mutasyonlara neden olarak aminoglikozidleri değiştirme kabiliyetine neden olur (Piepersberg ve ark. 1988).

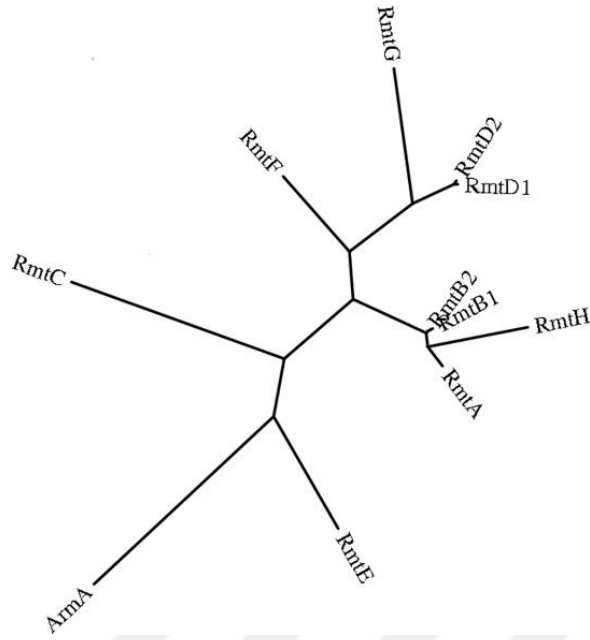
1983' ten önce izole edilen suşlar üzerindeki aminoglikozid direnci araştırmaları, çoğu suşunsadece tek bir direnç mekanizması içerdiğini göstermiştir. Sonraki dönemde yapılan araştırmalar çoğu dirençli suşun, birkaç aminoglikozid direnç mekanizmalarının kombinasyonlarını taşıdığını göstermiştir, altı adete kadar aminoglikozid direnç mekanizması taşıyan suşların varlığını belgelemiştir. Tek bir integron içinde çoklu direnç genlerinin keşfi, çoklu dirençli suşların ortaya

ıkmasının en büyük nedenidir. Bu bulguların, bu direnç genlerinin bakteri türleri içinde yayılması için ciddi etkileri vardır(Shaw ve ark. 1993).

2.3.9.16S rRNA Metiltransferazlar

Bir dizi aktinomisetin, kendi ürettikleri aminoglikozidlere karşı yapısal olarak dirençli oldukları bilinmektedir. Direnç mekanizmaları arasında aminoglikozidlerin, aminoglikozid modifiye edici enzimlerin üretilmesiyle etkisizleştirilmesi ve 30S ribozom alt biriminde 16S rRNA'nın 16S rRNAmetilaz üretimi ile korunması yer alır. Bu son mekanizma, çoklu aminoglikozidlere karşı yüksek seviyede direnç sağlar. Kendi protein sentezini inhibe etmekten kaçınmak için etkili bir aracı temsil eder ve aminoglikozid üreten aktinomisetler arasında yaygındır (Doi ve Arakawa 2007).

Metilasyon, prokaryotlarda sıklıkla transkripsiyon, transpozisyon, replikasyon ve uyumsuzluk onarımı içeren işlemleri düzenlemek için kullanılan bir mekanizmadır (Becker ve Cooper 2013). Prokaryotik ribozomal RNA' nın, aminoglikozid antibiyotikler yerine bakteriyel enzimler tarafından doğrudan metilasyonu, en etkili ve verimli direnç yöntemlerinden biridir. Bu modifikasyon, esas olarak, amikasin, kanamisin ve arbekasin gibi aminoglikozidlere yüksek seviyede direnç sağlayan ilaçların bağlanma etkinliğini azaltır (Liang ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.5.G1405 16S RMTases' in filogenetik ağacı. Ağaç, <http://www.phylogeny.fr> adresinde bulunan araçlar kullanılarak oluşturulmuştur. GenBank referansları aşağıdaki gibidir: ArmA, AY220558; RmtA, AB120321; RmtB1, AB103506; RmtB2, JN968578; RmtC, AB194779; RmtD1, DQ914960; RmtD2, HQ401565; RmtE, GU201947; RmtF, JQ808129; RmtG, JX486113.

Yakın zamana kadar, 16S rRNA'nın metilasyonu ile ribozomal korunmanın, aminoglikozid üreten aktinomisetlerin kromozomları ile sınırlı olduğu düşünülmektedir. Ancak 2000 yılında, Fransa'da idrar yolu enfeksiyonundan izole edilmiş bir *Klebsiella pneumoniae*, 4,6-2-DOS aminoglikozidlerinin hepsine alışılmadık derecede yüksek direnç göstermiştir (Galimand ve ark. 2003). Direnç determinantını taşıyan genetik fragman, Genbank'ta önceden yüklenen sekanslarla karşılaştırılmadan önce klonlanmış ve sekanslanmıştır. Bu gen bölgesinin daha sonra Polonya'da *Citrobacter freundii* suşundan yüklenen ve bir pCTX-M3 (Erişim no. AF550415) plazmidini taşıyan sekans ile aynı olduğu gösterilmiştir (Golebiewski ve ark. 2007). İlginç bir şekilde, pCTX-M3'ün dizisi "tamamen" açıklığa kavuşturulmuş olmasına rağmen bu metil transferaz benzeri gen gözden kaçırılmıştır. 2003 yılında Galimand ve ark. bu proteini tanımlanmış ve ArmA (aminoglikozid direnci metiltransferaz A) olarak adlandırılmışlardır (Galimand ve ark. 2003). Ayrıca armA taşıyan ilk izolatta ESBL geni blaCTX-M-3'ün kenarı boyunca keşfedilmiş olması dikkat çekicidir (Galimand ve ark. 2003). ArmA'nın buzdağının sadece görünen yüzü olduğunu anlamak uzun sürmemiş ArmA'nın tanımlanıp yayınlanmasından sadece 4 ay sonra Yokoyama ve ark. 1997 yılına ait bir *P. aeruginosa* izolatında, rmtA (ribozomal RNA metiltransferaz A) adını verdikleri başka bir 16S rRNA

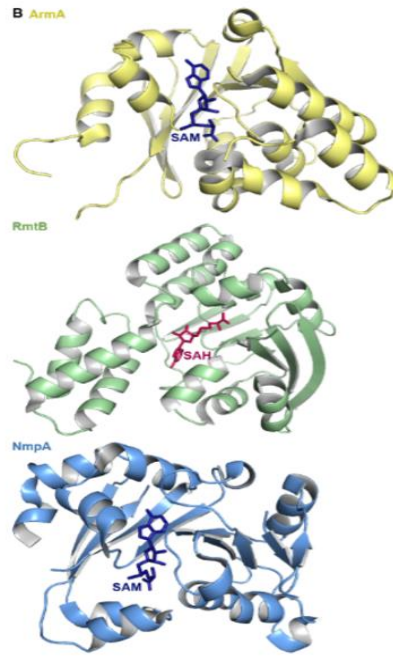
metiltransferazı tanımlamışlardır. ArmA gibi, bu gen de 4,6-2-DOS aminoglikozidlere alışılmadık derecede yüksek direnç sağlamıştır (Yokoyama ve ark. 2003).

Bugüne kadar, on bir 16S rRNA metilaz enzimi (rmtA, rmtB, rmtC, rmtD, rmtD2, rmtE, rmtF, rmtG, rmtH, armA ve npmA) tanımlanmıştır. (Yokoyama ve ark. 2003),(Galimand ve ark. 2012),(Doi ve ark. 2004),(Bueno ve ark. 2013),(Wachino ve ark. 2007),(Doi ve Arakawa 2007),(Davis ve ark. 2010), (Galimand ve ark. 2003), (Hara ve ark. 2013).

Elde edilen 16S RMTazlar, Arm (aminoglikozid direnci metiltransferaz) ve Pam (pan-aminoglikozid direnci metiltransferaz) olmak üzere iki aileye ayrılabilir. Daha önce tarif edilen RMTaz' ların tümü (ArmA ve RmtA-H), Arm metiltransferaz ailesine aittir ve klinikte aminoglikozidlere karşı direnç sağlarken, Pam ailesine ait bilinen tek 16S metiltransferaz, NpmA' dır. Bu enzim A1408' in N1 pozisyonunu metiller; bu da kanamisin, neomisin veya apramisin gibi yapısal olarak çeşitli aminoglikozidlere karşı direnç gösterir (Wachino ve ark. 2007).

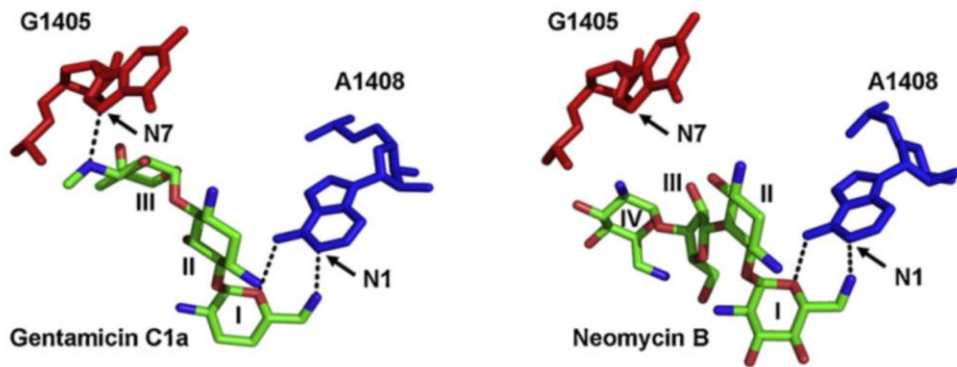
2.3.9.1.Etki Şekli

16S rRNA metiltransferazlardan kaynaklanan edinilmiş aminoglikozid direnci, iç direnç RMTazlara benzer şekilde işlev görür. Bu kazanılmış direnç metiltransferazların GC içeriğine dayanarak (rmtA,>%55 bir GC içeriğine sahiptir), yüksek GC içeriğine sahip atalara (örn., Aktinomisetler) özgü iç direncin RMTaz' lardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Liou ve ark. 2006). Aminoglikozidleri üreten mikroorganizmalar kendi ürünlerinden kendilerini korumak amacıyla bir savunma mekanizması geliştirmişlerdir. S-adenosilmetiyonin' e (SAM) bağımlı 16S rRNA metilazlarını kodlayan bir dizi gen, *Streptomyces* ve *Micromonospora* türleri dahil olmak üzere birçok aminoglikozid üreten *Aktinomycetes*' ten tanımlanmıştır (Shaw ve ark. 1993). Bu mekanizma kofaktör olarak S-adenosilmetionin kullanılarak transkripsiyon sonrası rRNA NpmA nın metilasyonunu içerir. Ayrıca, bu 16S RMTaz' lar sırasıyla 7-metilguanosa veya 1-metiladenosa üretmek üzere G1405 tortusunun N-7 pozisyonuna veya A1408 tortusunun N1 pozisyonuna etki eder (Kotra ve ark 2000). İlgili metilasyon, aminoglikozidlerin hedef bölgelerine afinitesini, ribozomun fonksiyonunu etkilemeden büyük ölçüde azaltır, bu da bir miktar aminoglikozide karşı yüksek direnç seviyeleri sağlar.



Şekil 2.6.RMTaz ve donör moleküllerinin kristal yapıları. ArmA, RmtB ve NmpA, değiştirici grup donör molekülleri ile birlikte sırasıyla SAM; SAH ve SAM görülmektedir.

Matrix destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon kütle spektrometrisi (MALDI-MS) kullanılarak yapılan deneyler, bu enzimlerin metilasyon bölgesinin G1405 kalıntısının N7 pozisyonu olduğunu da doğrulamıştır (Gutierrez ve ark. 2012). Özetle, bu hedef modifikasyonları, proteinlerin doğru translasyonuna izin vermek için mevcut okuma mekanizmalarına müdahale etmeden aminoglikozid bağlanmasını önleyebilir (Gutierrez ve ark. 2012).



Şekil2.7.Ribozomal hedeflerinde belirli kalıntılarla etkileşime giren bir 4,6 2-DOS (solda) ve 4,5 2-DOS (sağda) bir aminoglikozidın moleküler temsili (Kesik çizgiler olası hidrojen bağlarını temsil eder, N1 ve N7; metil grubunun konumu). Aminoglikozidler yeşil renkle, ribozomal kalıntılar G1405 ve A1408 sırasıyla kırmızı ve mavi renklerle gösterilmiştir. (Wachino ve diğerleri, 2012'den Şekil)

2.3.9.2.16S RMTaz Enzimlerinin Yayılımı

Bu direnç mekanizmasının potansiyel etkisi ve yayılmasının hızlı olması nedeniyle, 16S rRNAmetiltransferazların yayılmasının altında yatan genetik çevre üzerine birtakım çalışmalar yapılmıştır (Galimand ve ark. 2003). Pek çok rahatsız edici direnç mekanizmasında olduğu gibi 16S rRNA metiltransferazlar, mobil genetik elemanlar içinde bulunur (Doi ve ark. 2016) 16S metiltransferazların çoğu, bir dizi başka direnç mekanizmasının yanı sıra plazmidlerde (hem konjugatif hem de konjugatif olmayan) kodlanmış olsa da son literatürlerde, çok ilaca dirençli patojenlerin kromozomları içinde, bu edinilmiş metil transferazları tespit edilmiştir (Rahman ve ark. 2015).

16S rRNA metilaz üreten suşların, hayvanlardan da rapor edilmesi tehlikenin boyutunu arttırmaktadır. Plazmid aracılı *arm A* ve *rmtB* genleri, sırasıyla İspanya ve Çin' den gelen domuzlarda *E. coli'* den tanımlanmıştır (Chen ve ark. 2007). Veteriner hekimlikte kanamisin, gentamisin, apramisin ve streptomisin dahil olmak üzere çok miktarda aminoglikozid tüketilmiştir. Bu muhtemelen patojenik olmayan çevresel aktinomesetlerden enterik Gram negatif organizmaların 16S rRNAmetilaz genlerini elde etmesi için seçici bir basınç işlevi görmüş olabilir, bu enzimler gıda tedarik zincirleri vasıtasıyla insanlara yayılmıştır. Bu nedenle, bu yeni direnç mekanizmasının aracılık ettiği Gram negatif patojenler arasında yüksek seviyeli aminoglikozid direncinin izlenmesi, hayvancılık ortamlarında da önemli olacaktır (Chen ve ark. 2007).

2.3.9.3.ArmA

En yaygın görülen 16S metiltransferaz ArmA, şimdiye kadar yalnızca plazmitlerde tanımlanmış olsa da son yayınlar ArmA 'nın kromozom içinde de bulunabildiğinden bahsetmektedirler (Karah ve ark. 2016). Başlangıçta, sırasıyla *C. freundii* ve *K. pneumoniae'* deki IncL / M plazmitleri pCTX-M3 ve pIP1204 üzerindeki ESBL geni blaCTX-M3 ile birlikte keşfedilmiştir (Galimand ve ark. 2005) *armA* geni, sadece 16.6kb transpozon Tn1548 içerisinde tanımlanmıştır. Spesifik olarak *armA*, bir yerleştirme sekansı (ISCR1) boyunca yerleşir ve bunu *dhfrXII* genleri (trimetoprim direnci veren bir dihidrofolatredüktaz), *aadA2* (streptomisin direncini veren bir adeniltransferaz) ve aynı zamanda *sul1*genini (sülfonamid direncini veren) içeren sınıf 1 integron takip eder. Tipik olarak, makrolid direnci veren *mel* ve *mph2* genlerinin yanı sıra *trpA* (transpozaz benzeri bir gen),

armA' nin aşağısında tanımlanmıştır. Sınıf 1 integron içerisindeki *armA'* nin genetik ortamının biraz değiştiği gösterilmiş olsa da *armA'* nin bu küresel genetik içeriğinin *Enterobacteriales* ve *Acinetobacter baumannii* arasında yaygın şekilde yayılmasına rağmen çok iyi korunmuş gibi görünmektedir (Granier ve ark. 2011).

2.3.9.4. RmtA

rmtA bugüne kadar yalnızca aktarılabılır plazmidler içinde veya daha spesifik olarak transpozonlar gibi aktarılabılır genetik elemanlarda tanımlanmıştır. *P. aeruginosa'* da *rmtA'* yı barındıran genetik ortamın, daha önce *Pseudomonas spp'* de tespit edilen cıva direnci taşıyan Tn5041 transpozonu içinde bulunan bir kappa-gama elemanının (mobil genetik elemanların bir kalıntısı olduğu tahmin edilen) iki kopyası ile kuşatılmış olduğu bulundu (Yamane ve ark. 2004). Tarihsel olarak, *rmtA'* nin izolasyonu *armA'* dan daha seyrek olmuştur, *rmtA'* yı Japonya ve Kore' de sınırlı sayıda *P. aeruginosa* izolatında tespit edilmiştir (Jin ve ark. 2009).

2.3.9.5. RmtB / B2

rmtB ilk önce iki IS26 elemanı ile çevrili bir Tn3 benzeri transpozonun akış aşağısındaki bir plazmidde rapor edildi. *rmtB'* nin aşağı akış bölgesinin tipik olarak florokinolon akış akımı gen *qepA* veya bir varyasyonla ilişkili olmasına rağmen, oldukça değişken olduğu gösterilmiştir (Périchon ve ark. 2007). Daha yakın zamanlarda, *rmtB* bir IncI1 plazmidi üzerinde çok ilaca dirençli bir bölgede tanımlanmıştır. Bu plazmitlerde, *rmtB*, blaTEM-1 ile birlikte, bir sınıf 1 integron kaset dizisi (intI1-dfrA12-orfF-aadA2-qacE1-sul1) ve aminoglikozid N-asetiltransferaz *aacC2* ile tanımlanmaktadır. *ArmA'* dan farklı olarak, *rmtB'* nin dağılımı, her iki metiltransferazın da yaygın olarak ilişkili olduğu *Enterobacteriales'* de bulunan blaNDM-1' in dünya çapında ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmiştir (Carattoli ve ark. 2012). RmtB aynı zamanda tanımlanmış bir değişkene sahip ilk elde edilen metiltransferazdır. Korunan bir alan içindeki tek bir amino asit varyasyonuna dayanarak, RmtB2 farklı bir varyant olarak sınıflandırılır. RmtB ve rmtB2 arasındaki benzerliklere dayanarak, genetik ortamlarının yüksek derecede koruma sağlaması şaşırtıcı değildir (Doi ve ark. 2016). Bu çok yönlülük, konakçıda meydana gelen biyolojik zararı azaltırken yüksek seviyede direnç sağlayan metiltransferazların ifadesi için en uygun olan genetik ortamın seçilmesine de yol açar. Bununla birlikte, muhtemelen 16S rRNA metiltransferazların hızlı yayılmasının altında yatan en önemli faktör direnç belirleyicileri ile ilişkilidir. Bir dizi yayın,

edinilen 16S metiltransferazların ortaya çıkmasını, blaNDM-1 ve blaCTX-M' de dahil olmak üzere genişletilmiş beta-laktamazların küresel yayılımıyla doğrudan ilişkilendirmiştir (Doi ve ark. 2016). Özellikle, direnç belirleyicisi, aynı plazmid üzerindeki diğer direnç genleriyle birlikte bulunduğunda herhangi bir antibiyotik tedavisi, her iki direnç genini de beraberinde seçer ve bu da popülasyondaki genleri korur (Doi ve ark. 2016).



3.MATERYAL- METOD

Çalışmamıza, Ocak 2017- Ocak 2019 tarihleri arası Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bakterioloji Laboratuvar'ına enfeksiyon şüphesiyle çeşitli polikliniklerden ve kliniklerden gönderilen klinik örneklerden kültürü yapılmış ve bunun sonucunda enfeksiyon etkeni olarak *Providencia spp.* üremiş olan ve aminoglikozid grubu antibiyotiklere direnç profili gösteren örnekler dahil edilmiştir.

Providencia türlerinde aminoglikozid ilaçlara karşı dirence sebep olan genlerin belirlenmesiprensibine dayanan çalışmamız ilk olarak örneklerin toplanması ve identifikasyonu ile başlamıştır. Tanımlamada geleneksel mikrobiyolojik yöntemler kullanılmıştır. Laktoz negatif, metil kırmızısı, fenilpirüvik asit vefenilalanindeaminaz testleri pozitif ancak lisin ve ornitindekarboksilaz ve arginindihidrolaz negatif, D-mannozdan asit üretebilen Gram negatif basil morfolojisinde olan bakteriler VITEK 2 (bioMérieux, Marcy'l'Etoile, Fransa) otomatize sistemiyle identifiye edilmiştir.

Bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmış olup zon çapları belirlenmiştir ve VITEK 2 (bioMérieux, Marcy'l'Etoile, Fransa) otomatize sistemiyle MIC değerleri ölçülmüştür. Zon çapları ve MIC değerleri değerlendirildikten sonra aminoglikozid grubu ilaçlara fenotipik olarak dirençli olduğu gözlenen *Providencia* türlerinin genotipik direnç profillerini de belirlemek amacıyla suşlar PCR yöntemine tabi tutulmuş ve direnç genlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.1.Çalışma Prosedürü

3.1.1.Bakteri izolasyonu ve saklama

1. N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesine başvuran ayaktan hastalardan ve hastanede yatmakta olan hastalardan enfeksiyon şüphesiyle Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar'ına gönderilen biyolojik materyaller %5' lik koyun kanlısıyla zenginleştirilmiş besiyerine ve EMB (Eosin Methylene-blue Lactose Agar) besiyerlerine ekimleri yapılmıştır.

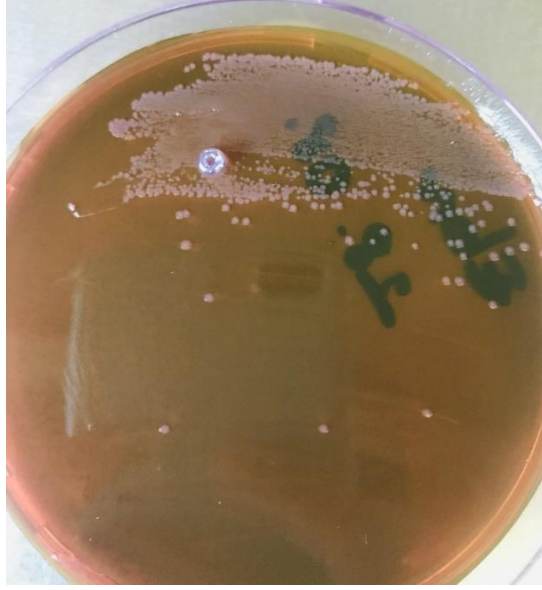
2. Ekilen örnekler üremesi için 35-37 °C lik etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3. Bu süre sonundan plaklar değerlendirilmiş ve üremesi olan plaklar etkenin tanımlanması amacıyla değerlendirmeye alınmıştır.

4. Değerlendirme sırasında Gram boyama yapılmış ve Gram negatif basil olduğu anlaşılan bakterilerde oksidaz testi yapılmıştır. Oksidaz testleri negatif olan suşlar daha ileri biyokimyasal testlere tabi tutulmuş ve İMVİC testi yapılmıştır.

5. Testin sonuçlarını doğrulamak amacıyla izolatlar daha ileri tanımlama yapmak için VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) otomatize sistemiyle, identifikasyon (GN) ve duyarlılık belirleme (AST) kartları firmanın belirttiği prosedürlere uyularak çalışılmış ve tür düzeyinde tanımlama yapılmış ve antibiyotik MIC değerleri belirlenmiştir.





Şekil 3.1. *Providencia stuartii* EMB besiyeri koloni görünümü

3.1.2.Duyarlılık Testleri

İzolatların antimikrobiyal duyarlılığı belirlemek amacıyla Mueller Hinton Agar' da Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

Disk Difüzyon Yöntemi

1. Üremesi olan ve tanımlaması yapılan izolatlar antibiyotik duyarlılık testine tabi tutulmuşlardır ve plaklardan alınan kolinilerbuyyon içinde 0.5 MacFarland' da suspanse edilmiştir.

2.+2/+8 °C debuzdolabında saklanandiskler kullanımdan 1-2 saat kadar önce buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir.

3. Süspansiyondan alınan örnekler Mueller Hinton Agar' a ekilmiş üzerlerine EUCAST prosedürlerine göre belirlenmiş olan antibiyotik diskleri yerleştirilmiş ve plaklar 35-37 °C lik etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

4. Ertesi gün değerlendirmeye alınan plaklar EUCAST kriterlerine göre belirlemiş olan zon çaplarına göre yorumlanmış ve sonuçlar raporlanmıştır. Özellikle gentamisin (10µg), tobramisin (10 µg), netilmisin (30µg) ve amikasin (30µg) kullanılarak aminoglikozid duyarlılık durumu sonuçlarında dirençlilik gözlenen suşlar stok besiyerine aktararak saklamaya alınmıştır.

Tablo 3.1. *Enteobacterales* Antibiyotik MIC Değerleri ve İnhibisyon Zon Çapları

Antibiyotik	MIC sınır değerleri (mg/L)		Zon çapı sınır değeri (mm)	
	S ≤	R >	S ≤	R >
Ampisilin	8	8	14	14
Amoksisilin/klavulanik asit	8	8	19	19
Aztreonam	1	4	26	21
Sefazolin	-	-	-	-
Seftazidim	1	4	22	19
Seftriakson	1	2	25	22
Sefotaksim	1	2	20	17
Sefepim	1	4	27	24
İmipenem*	0.125	4	50	17
Meropenem	2	8	22	16
Ertapenem	0.5	0.5	25	25
Amikasin	8	16	18	15
Gentamisin	2	4	17	14
Netilmisin	2	4	15	12
Tobramisin	2	4	17	14
Siprofloksasin	0.25	0.5	25	22
Levofloksasin	0.5	1	23	29
Trimetoprim/sülfametaksazol	2	4	14	11
Piperasilin-tazobaktam	8	16	20	17
Kolistin	2	2	MIC yöntemi kullanılmıdır (sadece sıvı mikrodilüsyon)	
Tigesiklin* ¹	0.5	0.5	18	18

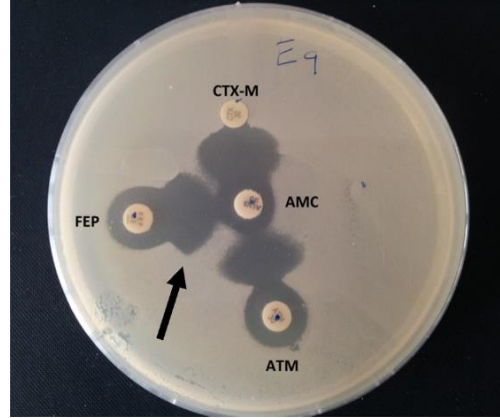
*İmipenem, *Morganella morganii*, *Proteus spp.* Ve *Providencia spp.*'ye karşı imipenemin etkisinin içsel olarak düşük olması, tedavide imipenemiçini yüksek doz kullanımını gerektirmektedir.

*¹Tigesiklin *Morganella morganii*, *Proteus spp.* ve *Providencia spp.* için zayıf etkinliğe sahiptir (EUCAST 2019).

İzole Edilen Suşlara Çift Disk Sinerji Testi Yönteminin Uygulanması

Bu yöntemde 0,5 MacFarland'a uygun olarak hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldı. Amoksisilin/klavulanik asit (AMC, 20/10 µg) antibiyotik diskinin etrafına, merkezden merkeze uzaklık 25 mm olacak şekilde, aztreonam (30 µg), seftriakson (30 µg), seftazidim (30 µg) ve sefotaksim (30 µg) (Oxoid, İngiltere) antibiyotik diskleri yerleştirildi. Plaklar bir gece 35°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının, amoksisilin/klavulanik asit yönünde genişleme göstermesi veya

diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi, GSBL varlığı açısından pozitiflik olarak kabul edildi.



Şekil 3.2. Çift Disk Sinerji Testi ile GSBL' nin gösterimi

4.VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) otomatize sistemiyle izolatların MIC değerleri belirlenmiştir.

Çalışma grubuna dahil edilen kolonilerin aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisin, netilmisin, tobramisin, streptomisin ve amikasin'e karşı duyarlılıkları saptamak amacıyla Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmış ve duyarlılık testlerinde aminoglikozid dirençli olan suşlar VITEK 2 otomatize sistemiyle MIC değerleri belirlenmek üzere VITEK 2 otomatize sistemiyle tekrar duyarlılık testine tabi tutulmuştur ve dirençli gözlenen suşlar PCR yöntemiyle direnç genlerinin belirlenmesi aşamasına geçilmiştir.

3.1.1.3.VITEK 2 Tanımlama ve Duyarlılık Testi

VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), floresan bazlı teknolojiyi kullanarak bakteri tanımlama ve duyarlılık testi için kullanılan tam otomatik bir sistemdir. Tür tanımı için üreticinin talimatlarına göre VITEK 2' nin (bioMérieux) IDGN kartı (bioMérieux) kullanılmıştır. Bakterimiz Gram negatif basil grubundan olduğu için duyarlılık testi için içinde gentamisin, tobramicin, ampicillin, cefotaxime, cefoxitin, sefpirome, sefpodoksim, seftazidim, sefuroksim, siprofloksasin, mecillinam, meropenem, nitrofurantoin, trimetoprim, trimetoprim / sülfometoksazol, amoksisilin / klavulanik asit, piperasilin / tazobaktam, aztreonam, sefalotin, sefuroksimaksetil ve nalidiksik asit antibiyotiklerini barındıran AST-325 (bioMérieux) kartı kullanılmıştır.

3. Bakterilerin Stoklanması

1. İzole edilen bakteriler %15' lik gliserinli triptik soy buyyonbesiyeri içinde, -80 °C 'de saklanmıştır.

2. PCR çalışmanın yapılacağı günden 1 gün önce saklama besiyerinde muhafaza edilen suşlarkoyun kanıyla zenginleştirilmiş kanlı agara ve EMB (Eosin Methylene-blue Lactose Agar) agara ekim yapılarak üremesi için 35-37 °C lik etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakılmış ve oluşan kolonilerden PCR çalışması için hazır hale getirilmiştir.

VITEK 2 otomatize sistemiyle duyarlılık testiyle aminoglikozidlere dirençli olduğu gözlenen izolatların direnç genlerinin belirlenmesi amacıyla PCR aşamasına geçilmiştir.

3.1.3. Moleküler Yöntemle İzolatlarda Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması

PCR Yöntemi:

1. **Ön Hazırlıklar:** PCR işlemi öncesinde aşağıdaki 2a ve 2b' de belirtilen kit ve malzeme içerikleri sağlanmış ve yine aşağıda belirtilen primerler temin edilmiştir.

2. **DNA İzolasyonu:** Bakteri DNA izolasyonu “GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit” (Vivantis, Malezya) ile firma önerileri doğrultusunda aşağıdaki gibi yapılmıştır.

a. Kitin içeriği;

GF-1 columns 100 adet

Collection tubes 100 adet

Resuspension Buffer 1 (Buffer R1) 15ml

Resuspension Buffer 2 (Buffer R2) 24ml

Bacterial Genomic Binding Buffer (Buffer BG) 56ml

Wash Buffer 34ml

Elution Buffer 20ml

Proteinase K*

b. Gerekli materyaller;

- Saf etanol (>95%)

- Lizozim (50mg/ml)
- Yıkama solüsyonu: “WashBuffer” kiti üzerine 80 ml saf etanol eklenerek hazırlandı.
- Proteinaz K: Üzerine 4,5 ml “Reagent Preparation Buffer” eklenerek hazırlandı, -20 C’de saklamaya alındı.

c. DNA’nın elde edilmesi: Daha önce hazırlanmış örnekler oda ısısına getirildikten sonra her bir örnek için aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

1. Bütün örneklerin üzerine 20 µl lizozim enzimi eklendi. Hafif karıştırıldıktan sonra 37 °C sıcaklıkta 20 dakika bekletilmiştir.

2. İnkübasyondan sonra 10.000 g de 3 dakika santrifüj yapılmıştır.

3. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 180 µl buffer R2 ve 20 µl proteinaz K eklendi. Karışımı vortekslendikten sonra 65 °C sıcaklıkta 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

3. İnkübasyondan sonra karışımın üzerine, karışımın 2 katı olacak şekilde buffer BG eklendi. Hafif karıştırıldıktan sonra 65 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

4. İnkübasyondan sonra karışım üzerine 200 µl etanol ekleyip hafif karıştırdıktan sonra her örnek için kitten çıkan spin kolon filtreleri tüplere karışım eklendi ve 10.000 g de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

5. Santrifüjden sonra filtreli tüplerin altındaki atık tüplerine geçen karışım döküldü. Ardından filtreli tüpler tekrar atık tüplerin içerisine yerleştirildi.

6. 650 µl washbuffer (yıkama solüsyonu) ekleyip 10.000 g de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

7. Tekrar atık tüpleri döküldü yerlerine yerleştirildi ve filtreli tüpler boş haldeyken etanolü uzaklaştırmak için 10.000 g de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Bu işlemle birlikte filtreli tüpler kurutulmuş olmuştur.

8. Ardından Filtreli tüpün altına temiz bir ependorf tüp koyulmuştur.

9. 50-100 µl arası (70 µl kullanıldı) Elution Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir.

10. 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve total bakteri DNA' sı elde edilmiştir (-20°C'de saklandı).

3. Real Time PCR Aşaması:

Yapmış olduğumuz çalışmada, izolatlarımızda PCR yöntemiyle pozitif bulmayı amaçladığımız olası, 15 aminoglikozidmodifiye enzime (AAC(2)-I, AAC (3)-I, AAC (3)-II, AAC (3)-III, AAC (3)-IV, AAC (3)- VI, AAC (3)- VI, AAC(6')-II, ANT(2)-I, ANT(3'')-I, ANT(4')-I, ANT(4)-II, APH(2)-I, APH(3)-I, APH(3')-III) ait 29 gen, RmtA, RmtB ve Arm A olmak üzere 16S rRNAmetilasyon enzimlerini belirlemek için 3 gen ve son olarak bir aminoglikozid enzim varyantı olarak ortaya çıkan ve hem aminoglikozidlere hem de ciprofloksasin direncine sebep olan AAC (6')-Ib-cr enzim geniyle birlikte toplamda 19 enzim ve 33 genin varlığını araştırdık (Tablo 7' de çalışılan aminoglikozidmodifiye enzimlerinin gen listesi ve tablo 8' de genlerin baz dizilimi gösterilmektedir).

a. Bakteri direnç genlerini tanımlamak ve Real Time PCR' da çoğalma eğrilerini görmek amacıyla primer belirlenerek aşağıda yazılı primer dizileri kullanılmıştır.

b. Real Time PCR Miks (karışımı) Hazırlama

2 µl Primer+ 5 µl PCR grade su + 10 µl Master mix = 17 µl total hacim hazırlandı.

PCR MIX

	Conc.	Volüm	Final Conc.
FaststartessentialDNAma stergreen	2x conc.	10 µl	1x conc.
Forward ve reversprimer (0,5 nmol)		2 µl	Primerler 5 pmol
PCR grade su		5 µl	
Total Volüm		16 µl	

Her bir örnek için yukarıdaki protokole 3' er µl DNA eklenerek ROCHE marka LightCycler (İsviçre 2004) sistemlerinde firma önerileri doğrultusunda çalışıldı.

Denaturasyon	95°C de 10 dk.
Amplifikasyon Bu döngü 40 kez gerçekleşir (40 cycle, Ramp-rite 1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi)	95°C de 20 sn. 60°C de 20 sn 72°C de 20 sn Okuma
MeltingCurve	95°C de 30 sn. 50 °C de 1 dk. 90 °C de (3 per/°C)
Cooling	40 °C de 1 dk.

Son aşama olarak amplifikasyon eğrileri incelenmiş ve cycle eğrisi 30'un altında olanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.2.Çalışmaya dahil edilen AME gen listesi

Asetiltransferazlar	Adeniltransferazlar	Fosfotransferazlar	Metiltransferazlar
<i>aac (2')-Ia</i>	<i>ant (2'')-Ia</i>	<i>aph(2'')-Ia</i>	<i>armA</i>
<i>aac (3)-Ia</i>	<i>ant (2'')-Ib</i>	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>rmtA</i>
<i>aac (3)-Ib</i>	<i>ant(4')-Ia</i>	<i>aph(3')-Ib</i>	<i>rmtB</i>
<i>aac (3)-IIa</i>	<i>ant(4')-IIa</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	
<i>aac (3)-IIb</i>	<i>ant(3'')-Ia</i>		
<i>aac (3)-IIc</i>			
<i>aac (3)-IIIa</i>			
<i>aac (3)-IIIb</i>			
<i>aac (3)-IVa</i>			
<i>aac (3)-VIa</i>			
<i>aac (6')-Ia</i>			
<i>aac (6')-Ib</i>			
<i>aac (6')-Ic</i>			
<i>aac (6')-If</i>			
<i>aac (6')-Ig</i>			
<i>aac (6')-Ih</i>			
<i>aac (6')-Ii</i>			
<i>aac (6')-IIa</i>			
<i>aac (6')-IIb</i>			
<i>aac (6')-Ib-cr</i>			

Tablo 3.3 Çalışmaya dahil edilen genlerin baz dizilimi

Direnç geni	Primer	Primer Sekansı	bp
<i>aac (2')-Ia</i>	Forward	5'- CAT TCG GTT GGA TGG CAA ATC -3'	89
	Reverse	5'- ACT CCG CCT TCT TCT TCA ATA G -3'	
<i>aac (3)-Ia</i>	Forward	5'- GAG GGC TGC TCT TGA TCT TT -3'	94
	Reverse	5'- GAG CAA GTT CCC GAG GTA ATC -3'	
<i>aac (3)-Ib</i>	Forward	5'- CAG CCG ACC AAT GAG TAT CTT -3'	124
	Reverse	5'- CTT GCT CGA ACT TGG GTA GAA -3'	
<i>aac (3)-IIa</i>	Forward	5'- AAA CGA TGG GTG ACG TAT GAG -3'	98
	Reverse	5'- CAA TCG AGA ATG CCG TTT GAA T-3'	
<i>aac (3)-IIb</i>	Forward	5'- ACG ATC GCC AAG GCT TAT G -3'	87
	Reverse	5'- TCC TGC GCT TCA AAC AGA TAG -3'	
<i>aac (3)-IIc</i>	Forward	5'- CAT ACG CGG AAG GCA ATA AC -3'	98
	Reverse	5'- ACC GGA CCA ATC GCT TTA -3'	
<i>aac (3)-IIIa</i>	Forward	5'- GTG ATC CGC ACG ATT ATA G-3'	93
	Reverse	5'- CAT CCG CAT CAC CGA CTT T -3'	
<i>aac (3)-IIIb</i>	Forward	5'- ACC TAC AGG CAC GCA CTG -3'	96
	Reverse	5'- GTC ACG ATT CCC GCG AAA TA -3'	
<i>aac (3)-IVa</i>	Forward	5'- TTG ATG GCA AAG GTT CCC AT -3'	101
	Reverse	5'- TCA CAG CAG TGG TCA TTC TC -3'	
<i>aac (3)-VIa</i>	Forward	5'- GTC ACC GCG CTC CAT TAT -3'	80
	Reverse	5'- CGC AGT AAG GGC ATC GAA TA -3'	
<i>aac (6')-Ia</i>	Forward	5'- CCT GGG AAT TGC ATC CAT TG -3'	100
	Reverse	5'- CCT TGC TCT CTA GCT CTG TTT -3'	
<i>aac (6')-Ib</i>	Forward	5'- AGA GTC CGT CAC TCC ATA CA -3'	119
	Reverse	5'- GTA CTC CTG GAT CGG TTT CTT C -3'	
<i>aac (6')-Ic</i>	Forward	5'- CGG AAA TGC GCG AGA TAT TG -3'	117
	Reverse	5'- AGC CGT TGA CGT AAT CGT AG -3'	
<i>aac (6')-If</i>	Forward	5'- AAG CAG TCC GGT GGT TTA TC -3'	125
	Reverse	5'- CCA TCT CGG TGC AAC CTT T -3'	
<i>aac (6')-Ig</i>	Forward	5'- ATG TGA GGA CTG AGA CTT C -3'	110
	Reverse	5'- CAC TTC GGC CTG TCG AAT AA -3'	
<i>aac (6')-Ih</i>	Forward	5'- TGG CCT GAT CAT GAA GAT GTG -3'	98
	Reverse	5'- GCT TGT TGG GTG TCG GTA TAA -3'	
<i>aac (6')-Ii</i>	Forward	5'- GCG CTA GAC CAA GAT GAG TTA G-3'	97
	Reverse	5'- TCG GGA GCT TTC TAC AAC TAA TG-3'	
<i>aac (6')-IIa</i>	Forward	5'- GCT CTC GTT GAA CTA CTG TTC TC -3'	108
	Reverse	5'- CAC GAA TCC TGC CTT CTC ATA G -3'	
<i>aac (6')-IIb</i>	Forward	5'- GAC GAC ATC GGT ATG CTT CA -3'	101
	Reverse	5'- CGA TAG TCC TCT TTC ACC TCT TC -3'	
<i>aac (6')-Ib-cr</i>	Forward	5'- ATC CAG GAG TAC GCG GAA TA -3'	103
	Reverse	5'- TGA ACA GCA ACT CAA CCA GAG-3'	

Tablo 3.3. Çalışmaya dahil edilen genlerin baz dizilimi (Devam)				
<i>ant (2'')-Ia</i>	Forward	5'- GGC GAT CAT CTG GGA TTA CTT -3'	89	
	Reverse	5'- CTG TAG GAC TCT ATG TGC TTT GT-3'		
<i>ant (2'')-Ib</i>	Forward	5'- TTC TCT CGT TGG TCG AAA CC -3'	81	
	Reverse	5'- ATG GAC CAT GAC CGC ATC -3'		
<i>ant(4')-Ia</i>	Forward	5'- GAA GAT TTC CGC CAA GCT ATT C -3'	87	
	Reverse	5'- CAA GGA TGG CAA GTA GGT AGA A -3'		
<i>ant(4')-IIa</i>	Forward	5'- TTC TCT CCG CTT CGT CTC TA -3'	100	
	Reverse	5'- CAT GAA TAG CTT GGC GGA AAT C -3'		
<i>ant(3'')-Ia</i>	Forward	5'- AGA ATG GCA GCG CAA TGA -3'	90	
	Reverse	5'- CTA CCA AGG CAA CGC TAT GT -3'		
<i>aph(2'')-Ia</i>	Forward	5'- GCC ACA AAT GTT AAG GCA ATG A -3'	93	
	Reverse	5'- GCC ACA CTA TCA TAA CCA CTA CC -3'		
<i>aph(3')-Ia</i>	Forward	5'- TAT CGG CTG CAT AGC AAG TC -3'	83	
	Reverse	5'- CCA ACG CAA TCT CAC CAT TTC -3'		
<i>aph(3')-Ib</i>	Forward	5'- TCT GCC ACG GTG ATC TCT -3'	88	
	Reverse	5'- CCG TCC CAG GTC GAT GAA -3'		
<i>aph(3')-IIIa</i>	Forward	5'- GGA AGG AAT GTC TCC TGC TAA G -3'	95	
	Reverse	5'- CAT CAT AGG TGG TCC CTT TAT ACC -3'		
<i>armA</i>	Forward	5'- GGG TCT TAC TAT TCT GCC TAT CC -3'	101	
	Reverse	5'- GTT GCG ACT CTT TCA TTC GTC -3'		
<i>rmtA</i>	Forward	5'- GGC CCT CTT TAT ACG TGA CAT AA -3'	95	
	Reverse	5'- ATC CCT GAT GAT GGG CAA AG-3'		
<i>rmtB</i>	Forward	5'- GCT GGA TAC CCT GTA CGA TTT -3'	103	
	Reverse	5'- AAT GCC GCG CTC GTA TAG -3'		

3.1.1.4.AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

A-Agaroz Jel Hazırlanması

1. Gerekli miktarda agaroz tartıldıkları koyuldu (1g. Agaroz, 0.5X 50 mL TBE, 2 µlEtBr)
2. Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyuldu.
3. Mikrodalga fırın örnek kaynamaya başlayana kadar yüksek ayar da çalıştırıldı.
4. Aralıklarla erlen mikrodalgadan çıkarılıp çalkalandı.
5. Kaynama başladıktan sonra mikrodalganın ayarı düşürüldü. Tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtılır.
6. EtBr eklenir ve çalkalayarak tüm çözeltiye dağılması sağlandı.
7. Trayin çatlamaması için çözelti muslukta biraz soğutuldu.

8. Traye yavaşça dökülür ve polimerize olması için en az 15 dakika beklendi.

B- Örneklerin Jele Yüklenmesi

1. Jel tanka yerleştirildi.

Örnek Yükleme Tamponu	10X, 100mL
Bromfenol Mavisi	250 mg
Tris pH 7,6 150 mM	33 mL
Gliserol	60 mL
dH ₂ O	7 mL

2. Tank jelin üstünü kapatacak kadar TBE ile dolduruldu.

3. Küçük bir parça parafilm alınır ve yüklenecek örnek sayısı kadar yükleme tamponu (yaklaşık 1' er µl) üstüne koyuldu.

4. 5 µl örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp jele yüklendi.

5. Bir kuyucuğa da markır koyuldu 6. 80 V da 20 dakika yürütüldü.

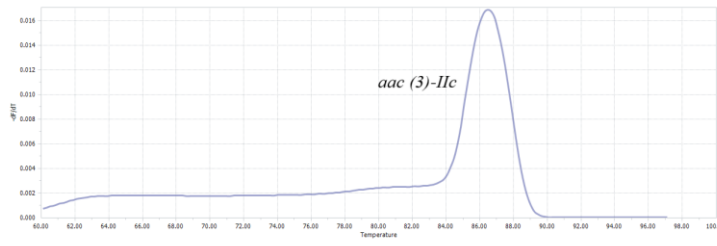
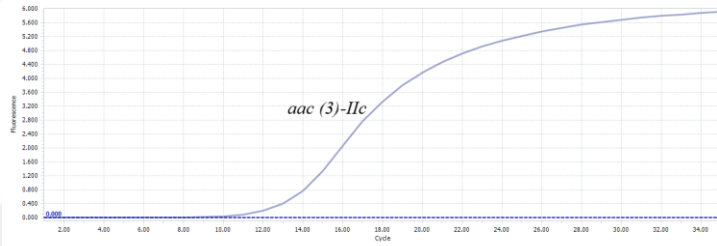
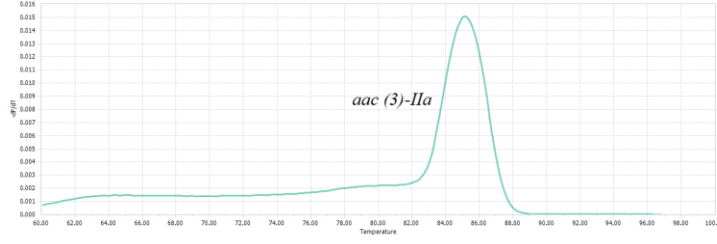
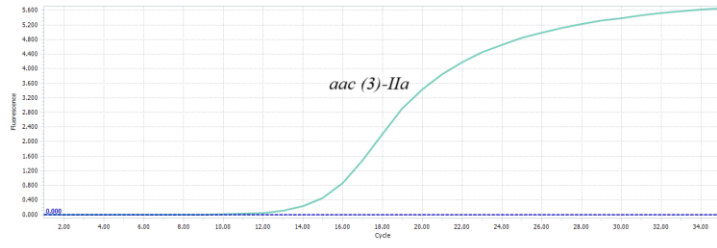
4.BULGULAR

Çalışmamızın sonucunda, tüm hastalarda 29 aminoglikozid modifiye eden enzim geninden 5 asetiltransferaz ve 2 adeniltransferaz geni olmak üzere 7 AME geni pozitif bulunmuş çalışılan genlerin 22'si negatif bulunmuştur ve fosfotransferaz genlerinden hiçbiri izolatlarımızda bulunmamıştır. 16S rRNA metiltransferaz genlerinden armA tüm hastalarda pozitif bulunmuşken rmtA ve rmtB metilaz genleri hiçbir hastada saptanamamıştır. Tablo 4.1' de pozitif bulunan genlerin listesi verilmiştir.

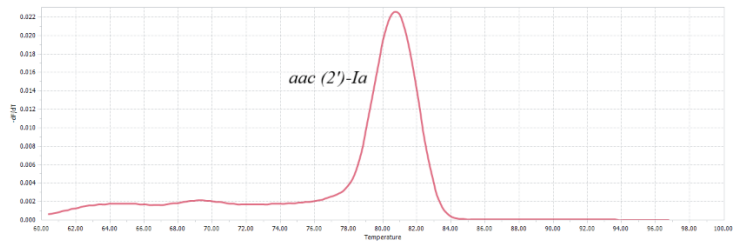
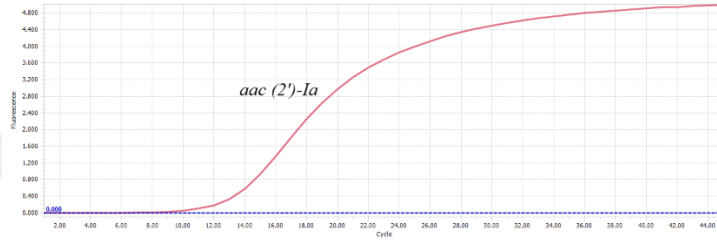
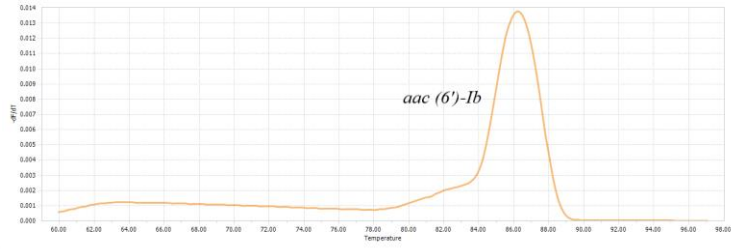
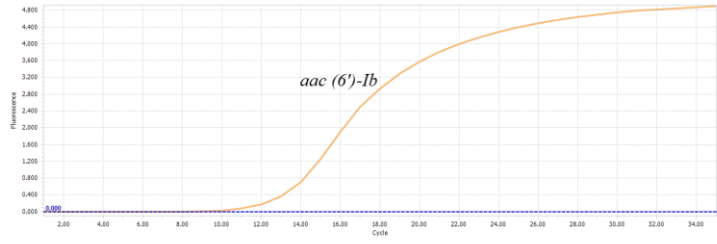
Tablo 4.1. PCR sonuçları pozitif olan genlerin listesi

Asetiltransferazlar	Adeniltransferazlar	Fosfotransferazlar	Metiltransferazlar
<i>aac (2')-Ia</i>	<i>ant (2'')-Ia</i>		<i>armA</i>
<i>aac (3)-IIa</i>	<i>ant(3'')-Ia</i>		
<i>aac (3)-IIc</i>			
<i>aac (6')-Ib</i>			
<i>aac (6')-Ib-cr</i>			

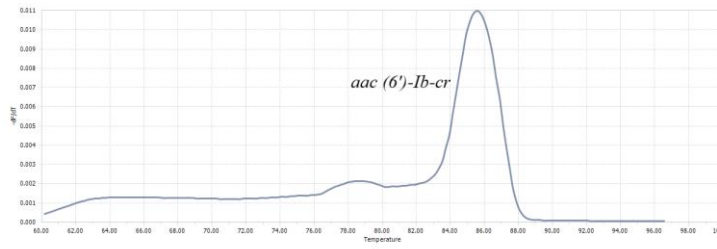
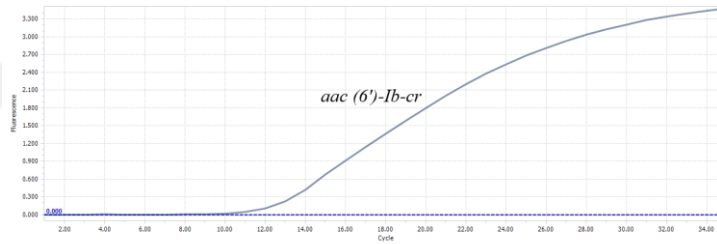
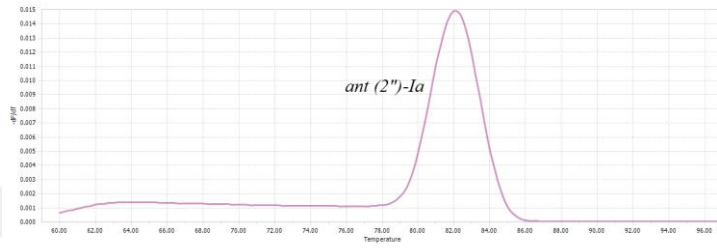
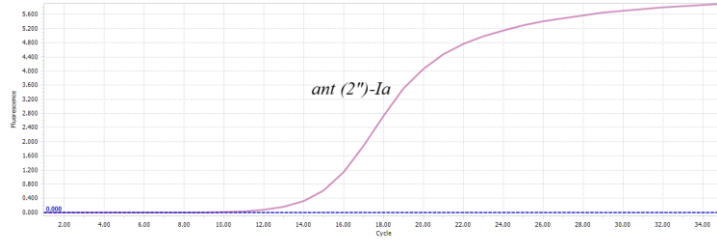
İzolatların PCR çalışması sonucunda oluşan amplifikasyon ve sıcaklık eğrileri Şekil 4.1' de gösterilmektedir.



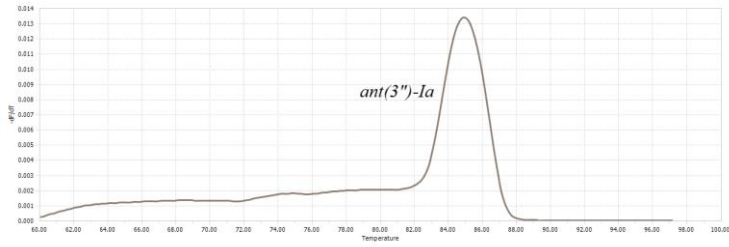
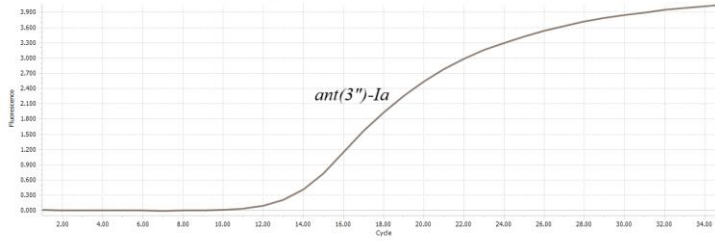
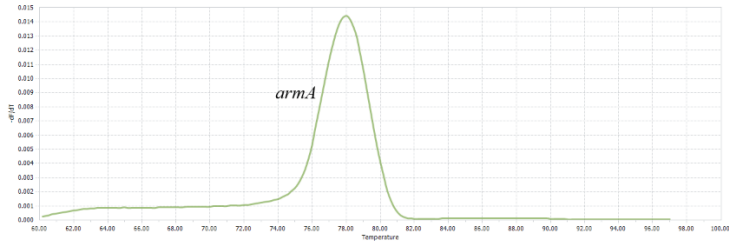
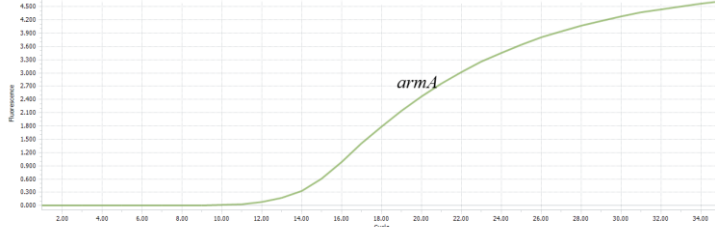
Şekil 4.1. PCR amplifikasyon ve sıcaklık eğrileri



Şekil 4.1. PCR amplifikasyon ve sıcaklık eğrileri (Devamı)

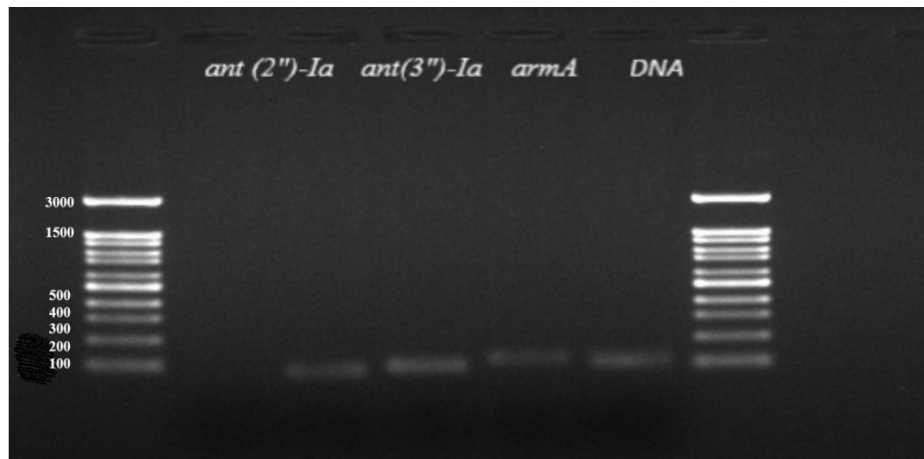
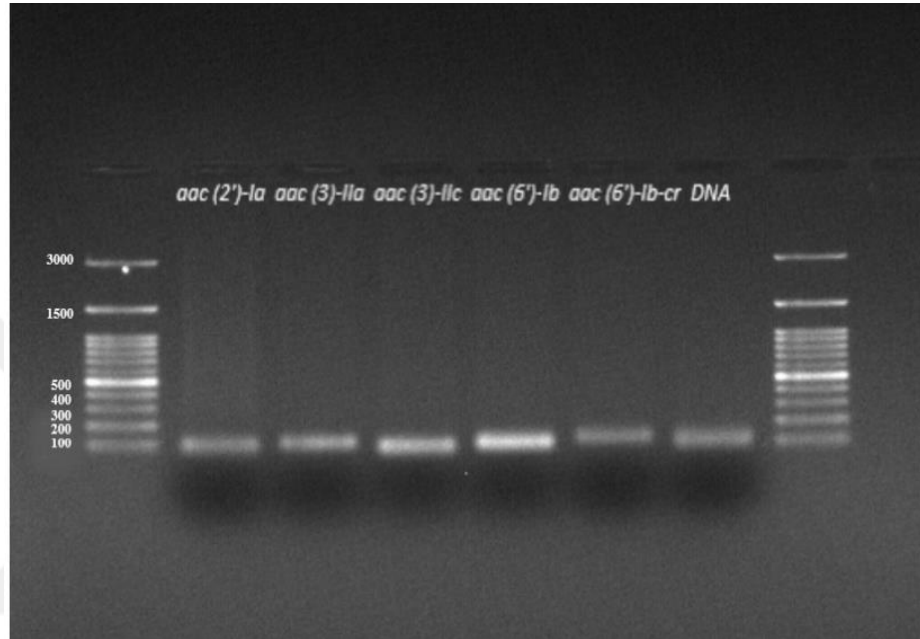


Şekil 4.1. PCR amplifikasyon ve sıcaklık eğrileri (Devamı)



Şekil 4.1. PCR amplifikasyon ve sıcaklık eğrileri (Devamı)

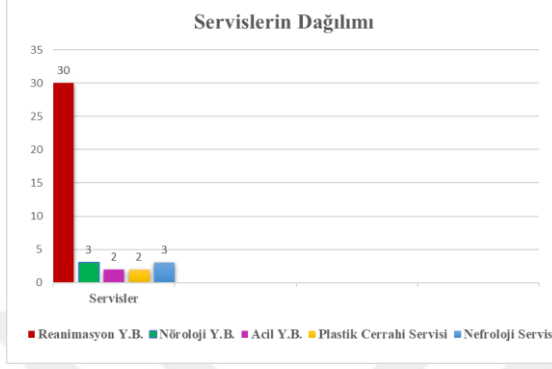
PCR çalışması sonucunda pozitif bulunan genler, çalışma sonuçlarını teyit etmek amacıyla jel elektroforezinde yürütülmüş ve varlıkları doğrulanmıştır. Şekil 4.2' de pozitif genlerin jel elektroforez görüntülerine yer verilmiştir.



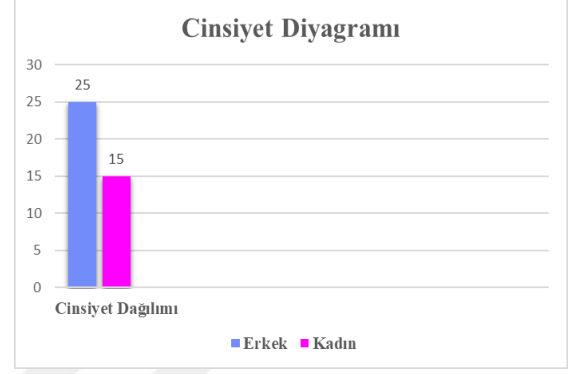
Şekil 4.2. Pozitif bulunan genlerin jel elektroforez görüntüleri

Çalışmaya dahil edilen örneklerin hepsi yatan hasta grubundandır. Şekil 4.3' te hasta örneklerinin geldiği servislerin dağılımı görülmektedir. 40 hastadan 5 tanesi servis hastası (2' si Plastik Cerrahi Servisi, 3' ü Nefroloji servisi) 35 tanesi yoğun

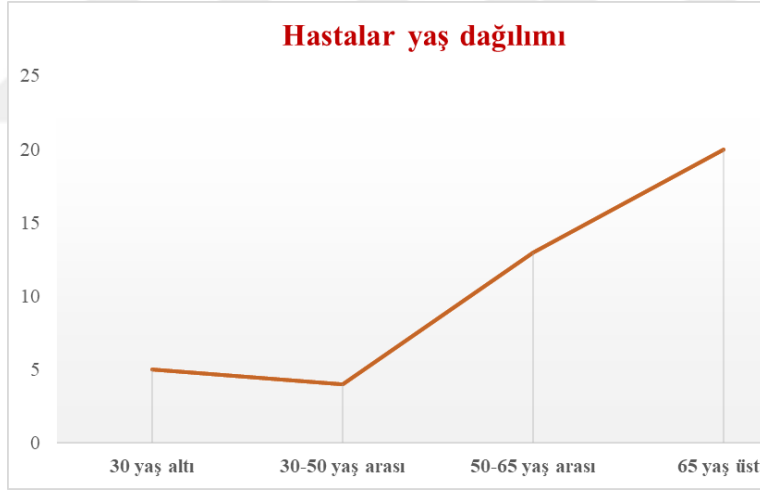
bakım hastasıdır ve bu hastaların büyük bir çoğunluğu Reanimasyon yoğun bakımında yatmaktadır ayrıca servis hastalarının da öncesinde yoğun bakımda kalış öyküsü bulunmaktadır. Hastaların cinsiyet dağılımı Şekil 4.4' te görülmektedir ve çoğunluk erkek hastalardadır. Hastaların yaş dağılımları ise Şekil 4.5' de görüldüğü gibi enfeksiyonun görülme yoğunluğu 65 yaş üstüdür.



Şekil 4.3. Örneklerin geldiği servisler



Şekil 4.4. Hastaların cinsiyet dağılımı



Şekil 4.5. Hastaların Yaş Dağılımı

Çalışmamızdaki hastalarımızda aminoglikozid direnciyle birlikte GSBL pozitifliği de saptanmıştır 40 hastanın hepsinde GSBL pozitif vardı.

Hastalardan gelen klinik örneklerin dağılımını incelediğimizde 27' si bronşial lavaj (%67,5), 4' ü trekeal aspirat (%10), 3' ü kan (%7,5), 2'si idrar (%5), 2' si katater (%5), 1' i yara (%2,5) ve 1' i drenaj (%2,5) örneğinden izole edilmiştir. İzole edilen suşların Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle zon çapları ve VITEK otomatize

sistemiyle MIC değerleri belirlenmiştir, gentamisin, tobramisin, netilmisin ve amikasin ve ciprofloksasin antibiyotiklerine direnç oranları Tablo 3.5' te klinik örnek tipi ile birlikte verilmiştir.

Tablo 4.2. Hastalardan izole edilen suşların izole edildiği klinik örnekler, aminoglikozid ilaç duyarlılıklarının inhibisyonzon çapları (mm) ve MIC değerleri (mg/L)(EUCAST 2019).

İzolat	Klinik örnek tipi	Gentamisin		Tobramisin		Netilmisin		Amikasin		Ciprofloksasin	
		ZON	MIC	ZON	MIC	ZON	MIC	ZON	MIC	ZON	MIC
1	Bronşial lavaj	4	≥16	3	≥4	5	≥32	8	≥64	11	≥4
3	Bronşial lavaj	5	≥16	3	≥4	3	≥32	7	≥64	9	≥4
4	Bronşial lavaj	7	≥16	4	≥4	3	≥32	5	≥64	9	≥4
5	Bronşial lavaj	5	≥16	4	≥4	3	≥32	5	≥64	8	≥4
6	Bronşial lavaj	6	≥16	5	≥4	3	≥32	7	≥64	11	≥4
7	Bronşial lavaj	4	≥16	3	≥4	3	≥32	7	≥64	10	≥4
8	Bronşial lavaj	4	≥16	3	≥4	4	≥32	7	≥64	9	≥4
9	Bronşial lavaj	5	≥16	3	≥4	4	≥32	7	≥64	10	≥4
10	Bronşial lavaj	5	≥16	3	≥4	3	≥32	6	≥64	12	≥4
11	Bronşial lavaj	7	≥16	4	≥4	5	≥32	7	≥64	10	≥4
12	Bronşial lavaj	6	≥16	3	≥4	4	≥32	8	≥64	9	≥4
13	Bronşial lavaj	6	≥16	5	≥4	4	≥32	8	≥64	12	≥4
14	Bronşial lavaj	5	≥16	4	≥4	3	≥32	6	≥64	12	≥4
15	Bronşial lavaj	5	≥16	4	≥4	3	≥32	7	≥64	12	≥4
16	Bronşial lavaj	4	≥16	4	≥4	3	≥32	6	≥64	10	≥4
17	Bronşial lavaj	5	≥16	3	≥4	4	≥32	6	≥64	12	≥4
18	Bronşial lavaj	3	≥16	3	≥4	3	≥32	8	≥64	11	≥4
19	Bronşial lavaj	3	≥16	3	≥4	5	≥32	6	≥64	15	≥4
20	Bronşial lavaj	4	≥16	4	≥4	3	≥32	9	≥64	13	≥4
21	Bronşial lavaj	5	≥16	4	≥4	4	≥32	7	≥64	13	≥4

Tablo 4.2. Hastalardan izole edilen suşların izole edildiği klinik örnekler, aminoglikozid ilaç duyarlılıklarının inhibisyonzon çapları (mm) ve MIC değerleri (mg/L) (Devam)

22	Bronşial lavaj	5	≥16	4	≥4	3	≥32	8	≥64	10	≥4
23	Bronşial lavaj	7	≥16	5	≥4	7	≥32	8	≥64	12	≥4
24	Bronşial lavaj	4	≥16	5	≥4	5	≥32	7	≥64	10	≥4
25	Bronşial lavaj	4	≥16	7	≥4	4	≥32	9	≥64	9	≥4
26	Bronşial lavaj	4	≥16	4	≥4	5	≥32	5	≥64	10	≥4
27	Bronşial lavaj	6	≥16	4	≥4	5	≥32	5	≥64	10	≥4
28	Trekeal aspirat	7	≥16	4	≥4	4	≥32	9	≥64	11	≥4
29	Trekeal aspirat	5	≥16	4	≥4	3	≥32	10	≥64	11	≥4
30	Trekeal aspirat	5	≥16	4	≥4	3	≥32	9	≥64	12	≥4
31	Trekeal aspirat	7	≥16	5	≥4	3	≥32	9	≥64	12	≥4
32	Kan	8	≥16	4	≥4	6	≥32	8	≥64	10	≥4
33	Kan	8	≥16	4	≥4	6	≥32	8	≥64	12	≥4
34	Kan	8	≥16	5	≥4	5	≥32	5	≥64	10	≥4
35	İdrar	7	≥16	5	≥4	7	≥32	8	≥64	10	≥4
36	İdrar	6	≥16	5	≥4	7	≥32	9	≥64	12	≥4
37	Katater	6	≥16	6	≥4	4	≥32	6	≥64	12	≥4
38	Katater	6	≥16	5	≥4	4	≥32	6	≥64	9	≥4
39	Yara	8	≥16	5	≥4	6	≥32	11	≥64	11	≥4
40	Drenaj	8	≥16	4	≥4	4	≥32	7	≥64	15	≥4

*EUCAST¹ ta Gram negatif bakteriler için streptomisin MIC değerleri mevcut değildir.



Şekil4.6. Muller Hilton aminoglikozid disk difüzyon plağı

5.TARTIŞMA

Providencia, *Morganellaceae* familyasından yer alan bir cinstir. Diğer birçok Gram negatif bakterinin aksine nadiren enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkar, insanlarda en sık enfeksiyon yapan türleri *P. stuartii* ve *P. rettgeri*' dir. Özellikle huzurevinde yaşayan ve uzun süreli hastaneye yatış öyküsü olan yoğun bakım hastalarında nozokomiyal enfeksiyonlara ve salgınlara neden olabilirler (Wie 2015). Bu cins ampisilin, amoksasilin-kluvanik asit, ampisilin-sulbaktam, sefazolin, sefalotin, sefalekssin, sefadroksil, sefuroksim, tetrasiklinler, tigesiklin, polimiksin B, kolistin ve nitrofurantoin gibi birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençlidir (EUCAST 2016) .

Çalışmamızda, aminoglikozid grubuna dahil ilaçlar için MIC değerlerini göz önüne alarak fenotipik olarak belirlediğimiz dirençli suşların olası mekanizmalarını tanımlamak adına hangi aminoglikozid modifiye edici enzimin (AME) mevcut olduğunu kesin olarak belirlemek ve izolatlardaki direnç mekanizmasının kökenini anlamak amacıyla moleküler düzeyde çeşitli genlerin varlığını araştırdık.

Hayakawa ve ark. artan kolistin tüketimi ile *P. stuartii* enfeksiyonlarının artan prevalansı arasında bir korelasyon olduğunu ileri sürmüşlerdir. Özellikle yoğun bakımlarda karbapenem dirençli *Enterobacteriales* türlerinin yayılmasına bağlı olarak bu enfeksiyonların tedavisi için son çare antibiyotik olarak kullanılan kolistin ve tigesiklin kullanımının artmasına sebep olmuştur. Bu durum hasta florası üzerinde *P. stuartii* seçimine yol açan önemli baskı uygulamıştır ve seçici baskı sayesinde *Providencia* enfeksiyonlarının oranı artmıştır. Kolistin kullanımı arttıkça, *Enterobacteriales*' de kolistine kendinden dirençli olan karbapenemaz üretiminin ortaya çıkması ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Hayakawa ve ark. 2012).

Ma ve ark., 16S metilaz genleri taşıyan plazmidlerin bir türden diğerine aktarılabilirliğini ve ayrıca çapraz enfeksiyon yoluyla yayılabileceğini bulmuşlardır (Ma ve ark. 2009). Suşlarımız ağırlıklı olarak hastanemizin yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir ve hastalarımızda öncesinde *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* gibi enfeksiyon etkenleri mevcuttur bu bakterilerin tedavisi sırasında kullanılan kolistin ve tigesikline uzun süreli maruz kalmanın neticesinde bu ilaçlara doğal olarak dirençli olan *Providencia* seçici baskı sonucunda tedavisi güç enfeksiyonlar oluşturduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca *A.baumannii* ve *P. aeruginosa*' daki AME' ler sıklıkla transfer edilebilir plazmidler ve integronlarla ilişkili

olduğundan, bu genler yatay gen transferi yoluyla diğer Gram negatif türlerle paylaşılabılır (Tait ve ark. 2014),(Miller ve ark. 1997), (Nemec ve ark. 2004).

Neredeyse tüm *Providencia* türleri uyarılabilir AmpC β -laktamazları üretebilir ve birçok izolat da nozokomiyal ortamlarda geniş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) edinildiği bildirilmiştir (Aubert ve ark. 2005). *P. stuartii*, kromozom olarak ifade edilen bir Ambler sınıf C sefalosporinaz (AmpC) nedeniyle aminopenisilinlere ve dar spektrumlu sefalosporinlere doğal olarak dirençlidir (Jacoby 2009). AmpC' nin aşırı ekspresyonu genellikle bu türe seftazidim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere düşük seviye direnç sağlar. Daha yüksek seftazidimdirenç seviyeleri esas olarak genişlemiş spektrum-beta-laktamazların (GSBL) edinilmesiyle ilişkilidir (Arpin ve ark. 2012). İzolatlarımızdaki GSBL pozitifliği seftazidim direnciyle (MIC>64) ilişkilidir ve literatürdeki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

GSBL genleri çoğunlukla plazmid aracılı olduğu için aminoglikozidler, makrolidler, kloramfenikol, kinolon veya karbapenemler gibi diğer antibiyotik sınıflarına direnci kodlayan genler de taşıyabilir. Plazmidlerde kodlanan çoklu direnç genlerinin varlığı nedeniyle GSBL üreten bakteriler için tedavi seçenekleri kısıtlanır (Gajamer ve ark. 2018).

Aminoglikozid direnci, AME ile modifiye edilmiş aminoglikozid molekülleri, spontan mutasyonlar veya 16S rRNA metiltransferazlar ile hedef modifikasyonlar ve akış ve geçirgenlik sorunlarını içeren çeşitli direnç mekanizmalarından kaynaklanabilir ve bakteriler arasında plazmidler aracılığıyla aktarılabilir (Costello ve ark. 2019). *P. stuartii*' de intrinsik, kromozomal bir asetiltransferaz (AAC (2')- Ia) bulunur ve aşırı eksprese edildiğinde yüksek seviyeli aminoglikozid direnci sağlar (Macinga ve ark. 1999). İzolatlarımızın hepsinde bu gen pozitif bulunmuştur, suşlarımız yoğun bakım hastalarına ait olduğu için birçok antibiyotiğe maruz kalmıştır bu etkinin sonucunda gen aşırı eksprese edilmiştir ve aminoglikozid direncine katkı sağlamıştır.

Çalışmamızda suşlarımızda kromozomal genin (*aac (2')-Ia*) haricinin altı modifiye enzim bir arada tespit edilmiştir. Bu durum suşlarımızın hastalarda enfeksiyon etkeni olarak bulunan diğer bakterilerden plazmid aracılığıyla edinilmiş olduğu fikrimizi desteklemektedir. Birden fazla modifiye enzimin bir arada

olduğu birçok çalışma vardır. Firmo ve ark.'nın *S. marcescens* ve *P. mirabilis* türleriyle yapmış oldukları çalışmada en yaygın AME geni *aph (3') -VI*, ardından *aac (6')-Ib*, *aac (3)-IIa* ve *ant (2'')-Ia*, yedi izolatta *aac (3)-IIa +aac (6')-Ib* kombinasyonu ve üç izolatta *aac (6')-Ib + aph (3') -VI* olarak bulmuşlardır. Mevcut çalışmada, bla NDM-1 genini taşıyan izolatların çoğunun bla KPC-2 genini ve farklı AME'leri (*aac (3) -IIa*, *aac (6') -Ib* ve *aph (3') -VI*) bir arada bulunmaktadır bu çalışmadan elde edilen veriler, bla KPC-2 ve AME genleri ile ilişkili bla NDM-1'in, multiklonal profilli enterobakterilerin izolatlarında ortaya çıkmasına işaret etmekteydi. Bizim çalışmamızda GSBL ile birlikte birden fazla modifiye enzimin bir arada bulunması ve hem kinolon direnci hem de aminoglikozid direncine neden olan *aac (6') -Ib-cr* enziminin birlikteliği bu verilerle paralellik göstermektedir. Bu genler sıklıkla kombinasyon halinde tespit edilir, bu da tek bir genin varlığına bağlı olarak aminoglikozid direnç profilini tahmin etmeyi zorlaştırır.

Aminoglikozid direnç mekanizmaları zamanla karmaşık hale gelmiştir. Farklı mekanizmaların kombinasyonları aynı izolatta sıklıkla meydana gelir ve aminoglikozid direnci spektrumunu genişletir. İzolatlar, aminoglikozidlere karşı karmaşık bir direnç fenotipi veren çeşitli mekanizmalara sahip olabilir. Bu genler sıklıkla kombinasyon halinde tespit edilir, bu da tek bir genin varlığına bağlı olarak aminoglikozid direnç profilini tahmin etmeyi zorlaştırır (Costello ve ark. 2019).

Costello ve ark., Gram negatif izolatlarında aminoglikozid değiştirici enzim ve 16S ribozomal RNA metiltransferaz genlerini araştırmak için yaptıkları küresel çapta bir çalışmada en yaygın AME genin *aac (6')-Ib* olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada enzimler kombinasyonlar halinde bulunmuştur. Çalışmamız bu literatürle paralellik göstermiştir ve beş asetiltransferaz geni (*aac (2')-Ia*, *aac (3)-IIa*, *aac (3)-IIc*, *aac (6')-Ib*, *aac (6')-Ib-cr*), iki adeniltransferaz geni (*ant (2'')-Ia*, *ant(3'')-Ia*) ve bir tane 16S rRNA metiltransferaz geni pozitif bulunmuştur ayrıca enzimler kombinasyon halindedir.

Suşlarımızdaki direnç profillerindeki benzerlik bize hastalardan aldığımız örnekler arasında bir klonal ilişki olabileceğini düşündürmüştür. Bütün örnekleri Reanimasyon servisinde gelen örneklerden ürettiğimiz *Providencia stuartii* türüne ait olması ve hastaların aynı serviste kalıyor olması bizim bu düşüncemizi

kuvvetlendirmektedir ancak bunun belirlenmesi için daha ileri boyutta bir çalışmayla ilişkisinin ortaya çıkarılması gerekmektedir.

AME'lerin klinik önemi büyüktür çünkü bu enzimleri kodlayan genler plazmidler veya transpozonlar tarafından yayılabilir ve genellikle metalo- β -laktamazlar dahil olmak üzere diğerdirenç genlerini barındıran ve seçimini kolaylaştıran integronlar ile taşınan gen kasetlerinin bir parçası olarak bulunur (Ramirez ve Tolmasky 2010). Suşlarımızda gözlenen çoklu ilaç direncinin bu genlerin pozitifliğinden kaynaklandığını görülmektedir. Özellikle GSBL, *armA* ve *aac(6')-Ib-cr* geni hastane ortamlarında çeşitli direnç geni taşıyan plazmidler aracılığıyla horizontal olarak yayılmakta ve çok ilaca dirençli suşların oluşmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca çoğu hastada birden fazla enfeksiyon etkeni bakteri bulunmaktaydı yani koenfeksiyonlar gözlenmekteydi bu horizontal yayılım düşüncemizi destekleyen sebeplerden biridir fakat koenfeksiyondaki diğer bakterilerin direnç fenotipleri bu düşüncemizle tutarlı olsa da genotipik olarak bir çalışma yapılmamıştır.

2000' lerin başındaki keşiflerinden bu yana, 16S rRNA metiltransferazlar, diğer son çare antibiyotiklere direnç sağlayan karbapenemaz genleri gibi diğer direnç belirleyicileri ile birlikte artan bir şekilde tanımlanmıştır (Doi ve ark. 2016). 16S RMTaz' lar nispeten yeni bir direnç mekanizması olmasına rağmen, tedavi edilemeyen hayatı tehdit edici enfeksiyonlara neden olan dirençli bakterilerin ortaya çıkmasını büyük ölçüde kolaylaştıran karbapenemaz epidemisi ile ilişkili görünmektedir (Fair ve Tor 2014).

Galimand ve ark., çeşitli ülkelerde toplanan ve CTX-M enzimi üretmesi muhtemel olan 34 klinik *Enterobacteriales* izolatında *armA* geniyle olan ilişkisini incelemişler ve iki suşta *bla_{CTX-M-3}* geniyle birlikte *armA* geninin birlikteliğini göstermişlerdir ve ArmA için yapısal genin, transfer edilebilir bir plazmit üzerindeki bileşik bir transpozon Tn 1548 üzerinde bulunduğu ve sıklıkla CTX-M-3 tipi GSBL genleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Galimand ve ark. 2005). Bizim izolatlarımızda da *armA* ve GSBL pozitifliği söz konusudur bu iki direnç profilinin aralarındaki ilişki olduğuna dair literatürle tutarlılık göstermektedir ancak izolatlarımızın hani GSBL direnç geninin mevcut olduğu çalışmamız kapsamında olmadığından çalışılmamıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

16S rRNAmetiltransferazları kodlayan genler, hemen hemen tüm aminoglikozidlere yüksek direnç seviyeleri kodlar (Costellove ark., 2019). Tüm izolalarımızda çalıştığımız aminoglikozid ilaçların (gentamisin, tobramisin, netilmisin, amikasin) her birine karşı direnç gözlemledik bunun sebebi farklı direnç profiline sahip birden fazla aminoglikozidmodifiye enziminin bir arada bulunması ya da metiltransferaz enzimi pozitifliği olabilir.

Moleküler çalışmamız sonucunda, suşlarımızda bu iki durumda söz konusudur hem metiltransferaz geni hem de farklı direnç profillerine sahip farklı aminoglikozidmodifiye enziminin bir arada olduğu bulunmuştur.

armA ve *aac(6')-Ib-cr* geni ve birçok aminoglikozid modifiye enzimi aynı plazmidde bulunabildiği gibi ESBL ile de ilişkili bulunmuştur. Bizim izolatlarımızda da bu genler arasında pozitif bir korelasyon vardır. Tüm hastalarımızda ESBL pozitifliği ile birlikte aminoglikozidmodifiye enzimi *armA*ve *aac(6')-Ib-cr* geni pozitifliği saptanmıştır. İzolatlarımızdaki çoklu ilaç direnci bu enzimlerin aynı plazmidde yer almasından kaynaklandığını tahmin etmekteyiz.

Florokinolon ve aminoglikozidleri uygun şekilde kullanmak amacıyla AME, 16S RNA metiltransferazları ve *aac(6')-Ib-cr* varyantını barındıran suşların belirlenmesi çok önemlidir. Çünkü bu enzimlerin pozitifliği aminoglikozidlerin, kinolonların, β -laktamların ve dolaylı yoldan diğer antibiyotiklerin enfeksiyonların tedavisinde yararlılığını azaltmaktadır.

Çalışmamızdan edindiğimiz çıkarım sonucunda bizim önerimiz, antibiyotiklerin tedavi amacıyla kullanılmasından önce hastane ortamındaki genel ilaç direnç profilinin belirlenmesi özellikle yoğun bakımda yatan hastalarda yoğun antibiyotik kullanımı sonucu seçici etkinin ortaya çıkarak dirençli bakterilerin hakimduruma geçmesi ve direnç genlerinin horizontal olarak yayılabileceği ihtimaline karşı tüm bu etkenler göz önüne alınarak daha dikkatli kullanılması yönündedir.

7.ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ebru	Soyadı	Atayeter
Doğum Yeri	Konya	Doğum Tarihi	15.09.1982
Medeni Durumu	Bekar	Tel	5337433340
E-mail	ebruatayeter82@gmail.com	Uyruğu	T.C.
Yazışma Adresi	Ferhuniye Mah. Ahmet Hilmi Nalçacı Cad. Hukukçular Sitesi B Blok 16/3 Selçuklu/Konya		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Selçuk Üniversitesi	2005
Yüksek Lisans	Selçuk Üniversitesi	2007
Doktora	Necmettin Erbakan Üniversitesi	2020

İş Deneyimi

Görevi	Kurum/Görev	Süre (Yıl)
Biyolog	Necmettin Erbakan Üniversitesi	11

Yabancı Dil	İngilizce
--------------------	-----------

KAYNAKLAR

- Akkan, A. G. (1997, Mayıs 2 - 3). Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri , s. 53-62.
- Fair, R., ve Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect Medicin Chem.* 2014; 6: 25–64.
- Piepersberg, W., ve ark. (1988). Antibiotic resistance by modification: many resistance genes could be derived from cellular control genes in actinomycetes-a hypothesis. . *Actinomycetologica* , 83-98.
- Abdallah, M., ve Balshi, A. (2018). First literature review of carbapenem-resistant *Providencia*. *New Microbe and New Infect* , 16–23.
- Abhyankar, M., ve ark. (2009). Development of the Gateway system for cloning and expressing genes in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int* , 95–7.
- Abraham, E., ve Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Reviews of Infectious Diseases* .
- Adams, M., ve ark. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* , 8053–64.
- Adeolu, M., ve ark., v. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales':proposal for Enterobacterales ord.nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Pectobacteriaceae, Yersiniaceae, Hafniaceae, Morganellaceae and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 5575–99.
- Aggen, J., ve ark. (2010). Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. *Antimicrob Agents Chemother* , 4636–42.
- Aminov, R. (2010). A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*. *Frontiers in Microbiology*, 1 -134.
- Armbruste, C. E., ve ark. (2014). Increased Incidence of Urolithiasis and Bacteremia During *Proteus Mirabilis* and *Providencia Stuartii* Coinfection Due to Synergistic Induction of Urease Activity. *J Infect Dis* , 1524-32.
- Arpin, C., ve ark. (2012). Evolution of an incompatibility group IncA/C plasmid harboring blaCMY-16 and qnrA6 genes and its transfer through three clones of *Providencia stuartii* during a two-year outbreak in a Tunisian burn unit. *Antimicrob Agents Chemother* , 1342-9.
- Arya, D. (2007). Aminoglycoside antibiotics. From chemical biology to drug discovery. WILEY.
- Aubert, D., ve ark., v. (2005). Novel Genetic Structure Associated with an Extended-Spectrum - Lactamase blaVEB Gene in a *Providencia stuartii* Clinical Isolate from Algeria. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* , 3590–2.
- Avent, M. L., ve ark. (2011). Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. *Intern Med J* , 441-9.
- Barclay, M. L., ve Begg, E. J. (2001). Aminoglycoside Adaptive Resistance/ Importance for Effective Dosage Regimens. *Drugs* , 713-21.
- Barclay, M., ve ark. (1992). Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic in vitro model. *Antimicrob Agents Chemother* , 1951-7.
- Barlow, M. (2009). What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. *Methods in Molecular Biology* , 397–411.
- Bassett, E., ve ark. (1980). Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* , 1532–4.
- Becker, B., ve Cooper, M. (2012). Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chemical Biology* , 105-15.
- Bell, J. M., ve ark. (2009). Aac(6')-Ib-cr genotyping by simultaneous high resolution melting analysis of an unlabelled probe and full length amplicon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 1378-80.

- Bernardi, F., ve Bernardi, A. (1991). Inter- and intramolecular transposition of Tn903. *Mol Gen Genet* , 22–7.
- Berthold, P., ve ark. (2002). An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* , 401–12.
- Braiu, B., ve Piepersberg, W. (1985). Purification and characterization of a plasmid-encoded aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase IV from *Escherichia coli*. *FEBS* , 43-6.
- Brau, B., ve ark. (1984). Genes for gentamicin-(3)-N-acetyltransferases III and IV: I. Nucleotide sequence of the AAC(3)-IV gene and possible involvement of an IS140 element in its expression. *Mol Gen Genet* , 179–87.
- Brenner, D. J. (1978). Deoxyribonucleic acid relatedness of *Proteus* and *Providencia* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 269–82.
- Brenner, D. J., ve ark. (1983). *Providencia rustigianii*: a new species in the family Enterobacteriaceae formerly known as *Providencia alcalifaciens* biogroup 3. *J. Clin. Microbiol.* , 1057–60.
- Bud, R. (2007). Antibiotics: the epitome of a wonder drug. *BMJ*, 334 (6).
- Bueno, M., ve ark. (2013). Co-production of 16S ribosomal RNA methyltransferase RmtD and RmtG with KPC 2 and CTX-M-group ESBLs in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* , 2397–400.
- Carattoli, A., ve ark. (2012). Evolution of IncA/C blaCMY-(2)-carrying plasmids by acquisition of the blaNDM-(1) carbapenemase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 783–6.
- Champion, H. M., ve ark. (1988). Cloning and characterization of an AAC(6') gene from *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* , 587-96.
- Chen, L., ve ark. (2007). Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother* , 880-5.
- Cook, M., ve ark. (1989). Fluorochrome labelling in roman period skeletons from dakhleh oasis, Egypt. *Am. J. Phys. Anthropol.* , 137–43.
- Costello, S. E., ve ark. (2019). Aminoglycoside-modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methyltransferase genes among a global collection of Gram-negative isolates. *J Glob Antimicrob Resist* , 278-85.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* , 1447–51.
- Coyne, S., ve ark. (2010). Acquisition of multidrug resistance transposon Tn6061 and IS6100-mediated large chromosomal inversions in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbiology* , 1448–58.
- Cui, L., ve Su, X. (2009). Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev. Anti. Infect.* , 999–1013.
- Darouiche, R. O. (2001). Device-associated Infections: A Macroproblem That Starts With Microadherence. *Clin Infect Dis* , 1567-72.
- Davies, J., ve Davis, B. D. (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J. Biol. Chem.* , 3312–6.
- Davis, M., ve ark. (2010). Discovery of a gene conferring multiple aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother* , 2666–9.
- Doi, Y., ve Arakawa, Y. (2007). 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases* , 88-94.
- Doi, Y., ve ark. (2016). Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* , 523-37.
- Doi, Y., ve ark. (2004). Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 491-6.
- EUCAST. (2016). Doğal Direnç ve Beklenmeyen Fenotipler Uzman Kuralları Sürüm 3.1 26. 1-10.

- EUCAST. (2019). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0. EUCAST.
- Ewing, W. H. (1958). The nomenclature and taxonomy of the *Proteus* and *Providencia* groups. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* , 17–22.
- Ewing, W. H. (1962). The tribe *Proteeae*: its nomenclature and taxonomy. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* , 93–102.
- Exner, M., ve ark. (2017). Antibiotic resistance: What is so special about multidrug resistant Gram negative bacteria? *GMS Hygiene and Infection Control*, 12, 2196-5226.
- Falkinham, J. O., ve ark. (2009). Proliferation of Antibiotic-Producing Bacteria and Concomitant. *Applied And Environmental Microbiology*, 2735–41.
- Fiett, J., ve ark. (2006). Molecular epidemiology of acquired-metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* , 880–6.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Bull World Health Organ* , 780-90.
- Gad, G., ve ark. (2011). Aminoglycoside resistance rates, phenotypes, and mechanisms of Gram-negative bacteria from infected patients in upper Egypt. *Plos One*, 6 (2).
- Gajamer, V., ve ark. (2018). Emergence of Multidrug-Resistant Uropathogens harboring ESBL, Carbapenem, Aminoglycosides and AmpC resistant genes from Northern India. *BioRxiv* .
- Galimand, M., ve ark. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* , 2565-71.
- Galimand, M., ve ark. (2012). RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob. Agents Chemother* , 3960–2.
- Galimand, M., ve ark. (2005). Worldwide disseminated arm(A) aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* , 2949–53.
- Gionechetti, F., ve ark. (2008). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* isolated from Mediterranean herring gulls (*Larus cachinnans*). *Microb Drug Resist* , 93–9.
- Gold, H. S., ve ark. (1996). Antimicrobial Drug Resistance. *The New England Journal of Medicine*, 335 (19).
- Golebiewski, M., ve ark. (2007). Complete Nucleotide Sequence of the pCTX-M3 Plasmid and Its Involvement in Spread of the Extended-Spectrum β -Lactamase Gene blaCTX-M-3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 3789-95.
- Gould, I., ve ark. (1990). Concentration-dependent bacterial killing, adaptive resistance and post-antibiotic effect of ciprofloxacin alone and in combination with gentamicin. *Drugs Exp Clin Res* , 621-8.
- Granier, S. A., ve ark. (2011). ArmA methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 5262–6.
- Grogan, J., ve ark. (1998). Extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Dublin paediatric hospital. *Br J Biomed Sci* , 111-7.
- Gutierrez, B., ve ark. (2012). Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother* , 2335–41.
- Hara, O., ve ark. (2013). Novel 16S ribosomal RNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with warrelated trauma. *Antimicrob. Agents Chemother* , 2413–6.
- Hawkey, P. M. (1984). *Providencia stuartii*: A Review of a Multiply Antibiotic-Resistant Bacterium. *J Antimicrob Chemother* , 209-26.
- Hayakawa, K., ve ark. (2012). Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. *Int J Infect Dis* , 646-8.
- Heine, H. S., ve ark. (2015). In vitro antibiotic susceptibilities of *Yersinia pestis* determined by broth microdilution following CLSI methods. *Antimicrob Agents Chemother* , 1919-21.

- Herbert , C., ve ark. (1983). The sequence of an antibiotic resistance gene from an antibiotic producing bacterium. Homologies with transposon genes. FEBS Lett , 67–71.
- Heuer, H., ve ark. (2002). Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. FEMS Microbiol Ecol , 289–302.
- Ho , Y., ve ark. (1997). In-vitro activities of aminoglycoside-aminocyclitols against mycobacteria. . J Antimicrob Chemother , 27-32.
- Hollingshead, S., ve Vapnek , D. (1985). Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/pectinomycin adenylyltransferase. . Plasmid , 17–30.
- Hon, W., ve ark. (1997). Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. Cell , 887–95.
- Hooton, T., ve ark. (2010). Diagnosis, Prevention, and Treatment of Catheter-Associated Urinary Tract Infection in Adults. Clinical Infectious Diseases , 625–63.
- Hoshiko, S., ve ark. (1988). Nucleotide sequence of the ribostamycin phosphotransferase gene and its control region in *Streptomyces ribosidificus*. Gene , 285-96.
- Hotta, K., ve ark. (1998). The novel enzymatic 3'-N-acetylation of arbekacin by an aminoglycoside 3-N-acetyltransferase of *Streptomyces* origin and the resulting activity. J Antibiot (Tokyo) , 735–42.
- Hu, Y., ve ark., v. (2019). *Providencia huaxiensis* sp. nov., recovered from a human rectal swab. Int J Syst Evol Microbiol , 2638-43.
- Ikaheimo, I., ve ark. (2000). In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. J Antimicrob. Chemother , 287-90.
- Ilaria Frasson , ve ark. (2011). Prevalence of aac(6')-Ib-cr plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae in Italy. Frasson et al. Gut Pathogens, 3 (12).
- Isoherranen, N., ve Soback, S. (2000). Determination of gentamicins C(1), C(1a), and C(2) in plasma and urine by HPLC. Clin. Chem. , 837-42.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews , 161–82.
- Jacoby, G. A., ve ark. (1990). Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4')-II] in Gram-negative pathogens. Antimicrob. Agents Chemother. , 2381-6.
- Jana, M. S., ve Deb, J. K. (2016). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Applied Microbiology and Biotechnology , 140– 50.
- Jeong, K. E., ve ark. (2009). Prevalence of aac(6')-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme among Enterobacteriaceae Blood Isolates in Korea. Antimicrobial Agents and Chemotherapy , 2643-5.
- Jin, J. S., ve ark. (2009). Emergence of 16S rRNA methylase rmtA in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. Int J Antimicrob Agents , 490-1.
- Jones, B., ve Mobley, H. L. (1987). Genetic and Biochemical Diversity of Ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* Species Isolated From Urinary Tract Infection. Infect Immun , 2198-203.
- Karah, N., ve ark. (2016). Novel Aminoglycoside Resistance Transposons and Transposon-Derived Circular Forms Detected in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother , 1801-18.
- Khardori, N. (2006). Antibiotics-past, present, and future. Med. Clin. North Am , 1049-76.
- Kim, C., ve Mobashery, S. (2005). Phosphoryl transfer by aminoglycoside 3'-phosphotransferases and manifestation of antibiotic resistance. Bioorg Chem , 149 –58.
- Kim, Y.-T., ve ark. (2011). Identification of strain harboring both aac(6')-Ib and aac(6')-Ib-cr variant simultaneously in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. BMB Rep , 262-6.
- Kocabiyyik, S., ve Perlin, M. (1992). Altered substrate specificity by substitutions at Tyr218 in bacterial aminoglycoside 3'-phosphotransferase-II. . FEMS Microbiol. , 199-202.

- Kotra, L. P., ve ark. (2000). Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* , 3249–56.
- Krause, K. M., ve ark. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* , 1-6.
- Ksentini, I., ve ark. (2019). *Providencia entomophila* sp. nov., a new bacterial species associated with major olive pests in Tunisia. *Plos one*, 14 (10).
- Kudo , F., ve Eguchi , T. (2016). Aminoglycoside Antibiotics: New Insights into the Biosynthetic Machinery of Old Drugs. *Chemical Record* , 4-18.
- Kurmasheva, N., ve ark. (2018). The Potential Virulence Factors of *Providencia stuartii*: Motility, Adherence, and Invasion. *Biomed Res Int* , 1-8.
- Landman, D., ve ark. (2010). Activity of a novel aminoglycoside, ACHN-490, against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from New York City. *J Antimicrob Chemother* , 2123-7.
- Leclercq, M. P., ve ark. (1999). Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 727–37.
- Lee, H.-W. (2007). Multidrug-resistant *Providencia* Isolates Carrying blaPER-1, blaVIM-2, and armA. *J Microbiol* , 272-4.
- León, S. H., ve ark. (2011). Characterization of multidrug-resistant Enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. *J Antimicrob Chemother* , 287 –90.
- Levy , S. (1992). *The Antibiotic Paradox. How Miracle Drugs Are Destroying the Miracle?* . New York-London: PlenumPress.
- Liou, G. F., ve ark. (2006). Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J Mol Biol.* , 358-64.
- Ljubovic, D. A., ve Hukić, M. (2009). Catheter-related urinary tract infection in patients suffering from spinal cord injuries. *Bosn J Basic Med Sci* , 2-9.
- Ma, L., ve ark. (2009). Widespread Dissemination of Aminoglycoside Resistance Genes armA and rmtB in *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Taiwan Producing CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* , 104–11.
- Macinga, D. R., ve ark. (1999). The Chromosomal 2'-N-Acetyltransferase Of *Providencia Stuartii*: Physiological Functions And Genetic Regulation. *Frontiers in Bioscience* , 132-40.
- Magnet, S., ve Blanchard, J. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews* , 477–97.
- Manageiro, V., ve ark. (2015). Draft Genome Sequence of the First NDM-1-Producing *Providencia stuartii* Strain Isolated in Portugal. *Genome Announc*, 3 (5).
- Manos, J., ve Belas, R. (2006). The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Prokaryotes* , 245–69.
- Mansouri, K., ve ark. (1989). Genetics of streptomycin production. C. L. Hershberger, ve ark. içinde, *Genetics and molecular biology of industrial microorganisms*. (s. 61-7). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Martin, P., ve ark. (1988). Nucleotide sequence of *Acinetobacter baumannii* aphA-6 gene: evolutionary and functional implications of sequence homologies with nucleotide-binding proteins, kinases and other aminoglycoside-modifying enzymes. *Mol Microbiol* , 615–25.
- Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science* , 365-7.
- Mayer, G. (2007). Antibiotics- protein synthesis- nucleic acid synthesis- and metabolism.
- Miller , G., ve ark. (1997). The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms—changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? *Aminoglycoside Resistance Study Groups. Clin Infect Dis* , 46–62.
- Muller, H. E. (1986). Occurrence and pathogenic role of *Morganella-Proteus-Providencia* group bacteria in human feces. *J Clin Microbiol.* , 404–5.

- Muller, H. E., ve ark. (1986). *Providencia heimbachae*, a new species of Enterobacteriaceae isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 252–6.
- Munita, J., ve Arias, C. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.*, 4 (2).
- Nazik, H., ve Öngen, B. (2010). Türkiye’de Plazmit Aracılı Kinolon Direnci. *Ankem Derg* , 46-54.
- Nemec, A., ve ark. (2004). Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* , 1233-40.
- Nicolaou, K. C., ve Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics* , 153–84.
- Nicolau, D. P., ve ark. (1995). Experience with a once-daily aminoglycoside proGram administered to 2,184 adult patients. *Antimicrob Agents Chemother* , 650–5.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science (New York, N.Y.)* , 382–8.
- Nurizzo, D., ve ark. (2003). The crystal structure of aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance. *J Mol Biol* , 491–506.
- O'Hara, C. M., ve ark., v. (2000). Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (4), 534–46.
- O'Hara, C., ve ark. (1999). Isolation of *Providencia heimbachae* from Human Feces. *Journal of Clinical Microbiology* , 3048-50.
- Oikonomou, O., ve ark., v. (2016). *Providencia* *Stuartii* Isolates From Greece: Co-Carriage of Cephalosporin (*bla*SHV-5, *bla*VEB-1), Carbapenem (*bla*VIM-1), and Aminoglycoside (*rmtB*) Resistance Determinants by a Multidrug-Resistant Outbreak Clone. *Microb Drug Resist* , 379-86.
- Ornstein, M. (1920). Zur bakteriologie des schmitzbazillus. *Z. Hyg* , 152– 78.
- Ovchinnikova, O. G., ve ark. (2013). O-antigens of Bacteria of the Genus *Providencia*: Structure, Serology, Genetics, and Biosynthesis. *Biochemistry (Mosc)* , 798-817.
- Park, Y. J. (2009). Aminoglycoside Resistance in Gram-negative Bacilli. *Korean J Clin Microbiol*, 12 (2).
- Partridge, S. R. (2015). Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Molecular Diagnostics In Microbiology*, 47 (3), 276-84.
- Paterson, D. (2006). Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Contro* , 20-8.
- Perez, V., ve ark. (2009). Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant(4')-Ia* and the efflux pump genes *msrA/msrB*. *J Antimicrob Chemother* , 21–31.
- Périchon, B., ve ark. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* , 2464-9.
- Purohit, P., ve ark. (1994). Interactions of a small RNA with antibiotic and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature* , 659–62.
- Rahman, M., ve ark. (2015). RmtC and RmtF 16S rRNA Methyltransferase in NDM-1–Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Infect Dis.* , 2059–62.
- Ramirez, M. S., ve Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist Updat* , 151–71.
- Ramirez, M., ve ark. (2005). Novel rearrangement of a class 2 integron in two nonepidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* , 5179–81.
- Ramon, G. S., ve ark. (2006). Novel streptomycin resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrob Agents Chemother* , 3920–2.
- Robicsek, A., ve ark. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* , 83-8.

- Ruppé, É., ve ark. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram negative bacilli. Ruppé et al. *Ann. Intensive Care* 5:21 , 5-21.
- Salauze, D., ve Davies, J. (1991). Isolation and characterization of an aminoglycoside phosphotransferase from neomycin-producing *Micromonospora chalybeata*: comparison with that of *Streptomyces fradiae* and other producers of 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamine antibiotics. *J. Antibiot.* , 1432-43.
- Schatz, A., ve ark. (1944). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Exp. Biol. Med.* , 66 –9.
- Schwalbe, R., ve ark. (1987). Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *The New England Journal of Medicine* , 927-31.
- Serio, A. W., ve ark. (2017). Aminoglycosides: Mechanisms of Action and Resistance. D. L. Marchaim içinde, *Antimicrobial Drug Resistance* (s. 213-29).
- Shaw, K. J., ve ark. (1992). Characterization of the chromosomal *aac(6')*-Ic gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* , 1447-55.
- Shaw, K. J., ve ark. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* , 138–63.
- Sobell, H. M. (1985). Actinomycin and DNA Transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 5328-31.
- Steiniger, W. M., ve ark. (2004). Structure/function insights into Tn5 transposition. *Curr Opin Struct Biol* , 50–7.
- Strahilevitz, J., ve ark. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* , 664-89.
- Suter, T., ve ark. (1997). Isolation of a gene encoding a novel spectinomycin phosphotransferase from *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* , 1385-8.
- Taitt , C., ve ark. (2014). Antimicrobial resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* isolates taken from military treatment facilities. *Antimicrob Agents Chemother* , 767–81.
- Tenover, F., ve ark. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. . *Am. J. Infect. Control* .
- Tenover, F., ve ark. (1989). Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, *aphA-7*, from *Campylobacter jejuni* and comparison to other kanamycin phosphotransferase genes. *Plasmid* , 52–8.
- Thompson, C. J., ve Gray, G. S. (1983). Nucleotide sequence of a streptomycete aminoglycoside phosphotransferase gene and its relationship to phosphotransferases encoded by resistance plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 5190-4.
- Tijet, N., ve ark. (2015). Characterization of Multiple NDM-1-producing Enterobacteriaceae Isolates From the Same Patient. *Antimicrob Agents Chemother* , 3648-51.
- Tolmasky, M. (2007). Aminoglycoside-modifying enzymes: characteristics, localization, and dissemination. R. Bonomo, ve M. Tolmasky içinde, *Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition* (s. 35-52). Washington: ASM.
- Tsodikova, S. G., ve Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside: overview and perspectives. *Med. Chem. Commun.* , 11–27.
- Vakulenko, S., ve Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* , 430–50.
- Vanhoof, R., ve ark. (1998). Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* , 483.
- Vicens, Q., ve Westhof, E. (2002). Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding site. *Chemistry and Biology* , 747–55.
- Wachino, J., ve ark. (2007). Novel plasmid-mediated 16S rRNA *m1A1408* methyltransferase, *NpmA*, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother* , 4401–9.
- Waksman, S., ve ark. (1949). Neomycin-Production and antibiotic properties. *J Clin Invest.* , 934–9.

- Walsh, C. (2004). Antibiotics: Actions, origins, resistance. *Protein Sci* , 3059–60.
- Walsh, C. (2010). Antibiotics: Initial Concepts. In *Antibiotics: Actions, origins and resistance* , 3-9.
- Wang, M., ve ark. (2004). Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother* , 1295–9.
- Warburg, G., ve ark. (2009). Changes in aac(6)-Ib-cr Prevalence and Fluoroquinolone Resistance in Nosocomial Isolates of *Escherichia coli* Collected from 1991 through 2005. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* , 1268–70.
- Wie, S.-H. (2015). Clinical significance of *Providencia* bacteremia or bacteriuria. *Korean J Intern Med* , 167–9.
- Wiesch, S. z., ve ark. (2010). Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 2085–95.
- Wilson , D. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. . *Nat Rev Microbiol* , 35-48.
- Wright, G., ve Thompson , P. (1999). Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* , 9–21.
- Yamane, K., ve ark. (2004). Genetic environments of the rmtA gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 2069–74.
- Yan, J., ve ark. (2006). Characterization of acquired β -lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the. *J Antimicrob Chemother* , 530–6.
- Yokoyama, K., ve ark. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet* , 1888-93.
- Yoshizawa, S., ve ark. (1999). Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science* , 1722–5.
- Zaffiri, L., ve ark. (2012). History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery* , 67–77.
- Zhanel, G., ve ark. (1991). The postantibiotic effect: A review of in vitro and in vivo data. *DICP* , 153-63.

9.EKLER

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 51

Toplantı Tarihi: 26.05.2017

Karar Sayısı: 2017/929: Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mahmut BAYKAN' ın "Providencia izolatlarında aminoglikozid direnç genlerinin araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 18.05.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüldü, Ebru ATAYETER' in doktora tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mahmut BAYKAN' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin ilaç ve tıbbi cihaz dışı araştırmalar etik kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Mahmut BAYKAN

Yardımcı Araştırmacı: Ebru ATAYETER

ASLI GİBİDİR
26.05.2017

Prof. Dr. Saim ACIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

