

Aminoglikozit Dirençli Gram Negatif Bakterilerde Plazmid Aracılı Metilaz Genlerinin Araştırılması

Şafak ERMERTCAN*, Fethiye Ferda YILMAZ*, Hüseyin TAŞLI*, Ayşe Nur YURTMAN*, Sabire Şöhret AYDEMİR**, Mine HOŞGÖR LİMONCU*

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

ÖZET

Amaç: Aminoglikozitler hem gram negatif hem de gram pozitif organizmalardan kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde halen kullanılmakta olan önemli bir antibiyotik grubudur. Bakterilerde diğer antimikrobiklere karşı olduğu gibi aminoglikozitlere karşı da direnç artışı önemli bir sorundur. Plazmid aracılı 16S rRNA metilaz enzimleri aminoglikozitlere karşı yüksek düzey direnç gelişimine neden olan farklı bir mekanizmadır. Bu çalışmada, gram negatif klinik izolatlarda 16s rRNA metilazlardan kaynaklanan plazmid aracılı yüksek düzey aminoglikozit direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakterioloji Laboratuvarı'nda izole edilen ve disk difüzyon yöntemi ile amikasin direnci saptanan 59 gram negatif klinik izolat çalışmaya alındı. İzolatların amikasin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Yüksek amikasin MİK değerleri (MİK≥128 mg/L) saptanan suşlarda 16S rRNA metilaz genlerinin varlığı klasik polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: Yüksek amikasin MİK değeri 37 izolatta saptandı. Bu izolatlarda yüksek düzey aminoglikozit direncinden sıklıkla sorumlu olan *armA*, *rmtA*, *rmtB* genlerine ait bölgelere rastlanmadı.

Sonuç: Test edilen gram negatif organizmalardaki aminoglikozit direncinin farklı metilaz genleri veya direnç mekanizmalarından kaynaklandığı düşünüldü. Ülkemizde yapılacak benzer çalışmalar, metiltransferazlardan kaynaklanan aminoglikozit direncinin izlenmesi ve bu enzimleri kodlayan genlerin yayılımının önlenmesi bakımından önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Gram negatif bakteri, plazmid aracılı metilaz genleri, yüksek düzey aminoglikozit direnci

SUMMARY

Investigation of Plasmid Mediated Methylase Genes in Aminoglycoside Resistant Gram Negative Bacteria

Objective: Aminoglycosides are an important class of antibiotics currently used for the treatment of infections caused by both gram-positive and gram-negative bacteria. Increased microbial resistance to aminoglycosides, and to the other antimicrobials is a serious problem. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases which lead to the development of higher level resistance to aminoglycosides, involve different aminoglycoside resistance mechanisms. The aim of this study was to investigate aminoglycoside resistance caused by plasmid-mediated 16S rRNA methylases among clinical isolates of gram-negative bacteria.

Materials and Methods: Fifty-nine aminoglycoside resistant gram-negative bacteria isolated from the clinical samples at the Bacteriology Laboratory of Ege University Faculty of Medicine Department of Medical Microbiology, were included in the study. Amikacin resistance was determined by the disc diffusion method. Amikacin minimum inhibitory concentration (MIC) values for the isolates were determined by the microdilution method. The 16S rRNA methylase genes were investigated by a conventional PCR method in isolates that had high amikacin MIC values (MIC≥128 mg/L).

Results: High amikacin MIC values were found in 37 isolates. However, the genes (*ArmA*, *rmtA*, *rmtB*) most frequently related to the high level aminoglycoside resistance were not detected in these isolates.

Conclusion: It was concluded that the aminoglycoside resistance in these gram negative organisms was either due to the presence of different methylase genes or other resistance mechanisms. The similar studies which will be carried out in our country will be of great importance on behalf of monitorization of aminoglycoside resistance caused by methyltransferases and prevention of spread of the genes encoding these enzymes.

Key words: Gram negative bacteria, plasmid-mediated methylase genes, high level aminoglycoside resistance

Alındığı tarih: 17.12.2012

Kabul tarihi: 23.02.2013

Yazışma adresi: Fethiye Ferda Yılmaz, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir
e-posta: fetferday@gmail.com - ferda.yilmaz@ege.edu.tr

GİRİŞ

Aminoglikozitler bakteri ribozomunun 30S alt ünitesinin 16S rRNA bölgesine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösteren ve genellikle beta-laktam antibiyotiklerle kombine edilerek gram pozitif ve özellikle gram negatif patojenlerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen önemli bir antibiyotik grubudur ⁽¹⁻³⁾. Bu etkiye karşı bakteriler, dış membran geçirgenliğinde azalma, aktif eflüks, ribozomal proteinlerde amino asit yer değişimi ve ilacın enzimatik modifikasyonu gibi direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir ^(2,3). Gram negatif klinik izolatlarda 16S rRNA'nın metilasyonu sonucu kazanılan yüksek düzey aminoglikozit direncine ise 2003 yılından itibaren rastlanmaya başlanmıştır. Aktinomisetlerde aminoglikozitlere karşı doğal dirençten sorumlu olan enzimlere benzeyen ve *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *npmA* genleriyle kodlanan enzimler aracılığıyla, 16S rRNA'nın A bölgesinin modifikasyonu, arbekasin dâhil hemen hemen tüm aminoglikozitlere karşı direnç gelişimine neden olmaktadır ⁽²⁻⁵⁾. Bunlar arasından, ilk olarak 1997 yılında *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatında tespit edilen *armA* geni, çoğul antimikrobik dirençten sorumlu çeşitli genler içeren tip I integronların bulunduğu geniş plazmidler üzerinde taşınmakta ve çeşitli türler arasında geniş bir yayılım göstermektedir. Amikasin dirençli izolatların çoğunun çeşitli antibiyotiklere karşı da dirençli olduğu ve yüksek minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) düzeyleri gösterdiği, ayrıca 16S rRNA metilaz enzimlerini kodlayan *armA* ve benzeri genler taşıdığı çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir ⁽⁶⁾. Sorumlu genler genellikle transfer olabilen plazmidler içindeki transpozonlar üzerinde taşındığından, 16S rRNA metilazlardan kaynaklanan aminoglikozit direnci, *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri ile *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri gibi nonfermentatif bakteriler arasında dünya çapında hızla yayılmaktadır ⁽¹⁾. Ayrıca metilaz genleri genellikle *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaOXA* ve *qnr* gibi diğer direnç determinantları ile birlikte bulunduğundan, aminoglikozitlere dirençli olan bazı bakterilerin aynı zamanda florokinolonlar ve beta-laktamlara da dirençli olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir ^(1,7,8). *ArmA* (*Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* türleri) ve *rmtB* (*Enterobacteriaceae*) en yaygın olan olup, daha çok Asya ve Avrupa'da tespit edilen metilaz genleridir. *rmtA* ve *rmtC* yalnızca Japonya'da (*P. aeruginosa* ve

Proteus mirabilis), *rmtD* Brezilya'da (*P. aeruginosa*), *npmA* ise Japonya'da (*Escherichia coli*) saptanmıştır ⁽¹⁻³⁾. Son olarak *rmtE* hayvansal bir kaynaktan izole edilen *E. coli*'de görülmüştür ⁽⁹⁾.

Ege Bölgesinde, Manisa ilinden izole edilen klinik izolatlarda yaptığımız bir çalışmada *armA*, *rmtA* ve *rmtB* genlerine rastlanmamıştır ⁽¹⁰⁾. Ülkemizde yalnızca 2010 yılında yayınlanan bir makalede Kocaeli ilinden izole edilen bir *Klebsiella pneumoniae* kökeninde *rmtB* genine rastlandığı bildirilmiştir ⁽¹¹⁾.

Bu çalışmada da, gram negatif klinik izolatlarda 16S rRNA metilazlardan kaynaklanan plazmid aracılı yüksek düzey aminoglikozit direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda Aralık 2008-Şubat 2009 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve disk difüzyon yöntemi ile amikasin direnci saptanan 59 gram negatif izolat çalışma kapsamına alındı. Suşların dağılımı Tablo 1'de görülmektedir. Suşlar, çalışma başlayıncaya kadar %10 gliserinli buyyonda -80°C'de saklandı.

Etken Madde: Amikasin etken maddesi Eczacıbaşı İlaç San.'den (İstanbul, Türkiye) sağlandı. Antibiyotik stok solüsyonu 1024 mg/L konsantrasyonda hazırlanarak kullanılıncaya kadar -20°C'de korundu.

Suşların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi: Suşların amikasin duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda belirlendi ⁽¹²⁾. Duyarlılık testi için U tabanlı 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plakları kullanıldı. Amikasin stok çözeltisinden Mueller-Hinton Broth besiyeri kullanılarak, antibiyotiğin son konsantrasyon aralığı 0,5-256 mg/L olacak şekilde sulandırımı yapıldı. Son inokulum konsantrasyonu 5x10⁵ koloni/mL olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonlarından kuyucuklara 50µL eklendikten sonra plaklar 35°C'de 16-20 saat inkübe edildi. Kontrol kökeni olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı. Testlerde gerekli üreme ve besiyeri kontrollerine yer verildi. İnkübasyon sonunda üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantras-

Tablo 1. Amikasin dirençli 59 gram negatif suşun dağılımı.

Bakteri	Örnek sayısı	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28	47,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	27	45,8
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	1,7
<i>Proteus mirabilis</i>	2	3,4
<i>Escherichia coli</i>	1	1,7

yonu MİK değeri olarak kabul edildi. Amikasin MİK değeri 128 mg/L ve üzeri bulunan izolatlar *armA*, *rmtA* ve *rmtB* genlerinin araştırılması amacıyla seçildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Seçilen bakterilerden kaynatma yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra 16S rRNA metilaz genleri (*armA*, *rmtA* ve *rmtB*) uygun primer setleri (Tablo 2) kullanılarak PZR ile araştırıldı. Yan ve ark. (13) tarafından sağlanan *armA* ve *rmtB* pozitif *Klebsiella pneumoniae* kökenleri, *armA* ve *rmtB* genleri için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

PZR, ısı döngü cihazında (Techne, Barloworld Scientific Ltd., İngiltere) (94°C'de 5dk ön denatürasyonu takiben, 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 60sn denatürasyon, 50°C'de 60sn birleşme, 72°C'de 2dk uzama ve ardından da 72°C'de 7dk son uzatma) gerçekleştirildi. PZR ürünleri agaroz jelde elektroforez ile yürütüldü. Ultraviyole transillüminatörde 280-340 nm dalga boyunda bant büyüklükleri marker ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan 59 gram negatif klinik izolatanın amikasin MİK sonuçları değerlendirildi. Elli dokuz suşun 37'sinde amikasin MİK değeri ≥ 128 mg/L olarak saptandı. Kontrol suş olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922'nin amikasin MİK değeri kabul edilir sınırlar içindeydi (0,5-4 mg/L). Amikasin MİK değeri ≥ 128 mg/L saptanan izolatlar ve *armA*, *rmtA* ve *rmtB* pozitif kontrol kökenlerin DNA ekstraktları kullanılarak PZR yapıldı. Amikasin MİK değeri ≥ 128 mg/L olarak saptanan izolatlarda *armA*, *rmtA*, *rmtB* gen bölgelerinin hiçbirine rastlanmazken, pozitif kontrol olarak kullanılan suşta beklenen uzunluklarda amplifikasyon ürünleri (*armA* için 774-bp, *rmtB* için 769-bp) elde edildi.

Tablo 2. Polimeraz zincir tepkimesinde kullanılan primer setleri.

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

TARTIŞMA

Aminoglikozitler, gram negatif basillerin yer aldığı enfeksiyonların tedavisinde en sık kullanılan geniş spektrumlu antibiyotiklerdendir. Polikatyonik özellikteki bu antibiyotikler, pozitif yükleri nedeniyle negatif yüklü nükleik asitlerle etkileşime girer ve özellikle prokaryotik rRNA'nın spesifik olarak belli bölgelerine yüksek afinite gösterirler. Son yıllarda, *Enterobacteriaceae* ve non-fermentatif gram negatif basillerde plazmidle kodlanan pek çok 16S rRNA metilazın bu grup antibiyotiklere yüksek seviyede direnç gelişimine neden olduğu belirtilmektedir (13-15). Plazmid aracılı 16S rRNA metilaz genlerinin 2003 yılında keşfinden sonra, bu genlerle ilgili epidemiyolojik araştırmalar farklı ülkelerde ve çeşitli bölgelerde yapılmaya başlanmıştır (3).

Japonya'da 2004 yılında çalışmaya alınan 1113 *P. aeruginosa* izolatından *rmtA* geni saptanan dokuzunun amikasin dirençli (MİK>1024) olduğu tespit edilmiştir (16). Japonya'da yapılan diğer bir çalışmada, hastanelerden izole edilen 2877 gram negatif bakteride yarısentetik bir aminoglikozit olan arbekesine karşı yüksek düzey direnç (MİK>512 mg/L) gösteren izolatların biri (*Acinetobacter* MİK=1024 mg/L) hariç diğerlerinin hepsinde *rmtA*, *rmtB* ve/veya *armA* genleri saptanmıştır (17).

Kuzey Amerika, Latin Amerika ve Avrupa'dan izole edilen 407 gram negatif bakteri arasından, amikasin dirençli (MİK ≥ 128 µg/L) 22 izolat metiltransferazlar bakımından incelemiş ve 21'inde *armA* (% 40,9), *rmtB* (% 36,4) ve *rmtD* (% 18,4) genleri saptanmıştır. Çalışmaya alınan suşların hiçbirisi Asya orjinli olmadığından genellikle Japonya'da izole edilen *rmtA*, *rmtC* ve *npmA* genlerine rastlanmamıştır. Fransa'da izole edilmiş olan *armA* pozitif *K. pneumoniae* hariç, diğer 20 kökenin daha önce bu genlere rastlanmamış bölgelerden izole edildiği görülmektedir (2).

Yan ve ark. ⁽¹³⁾ yaptığı çalışma, 81 amikasin dirençli izolattan, oldukça yüksek MİK değeri (>256 mg/L) gösteren 14 *E. coli*'nin 12'sinde ve 21 *K. pneumoniae*'nin 16'sında *armA*, iki *E. coli* ve beş *K. pneumoniae*'da ise *rmtB* varlığı saptanmıştır. Araştırmacılar sonuçların, 16S rRNA metilazların Tayvan'daki insan patojenlerinde yüksek aminoglikozit direncinden sorumlu olduğunu belirten ilk rapor olduğunu ve *armA*'nın *rmtB*'ye göre *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında daha yaygın bulunduğunu bildirmişlerdir. Boegarts ve ark. ⁽¹⁴⁾ Belçika'da yaptıkları çalışmada gentamisin, tobramisin ve amikasin dirençli 22 izolattan *armA* geni saptanan 18'inin bu antibiyotiklere yüksek oranda dirençli (MİK>512 mg/L) olduğunu tespit etmiştir. Bu 18 izolatta ve amikasin düşük oranda dirençli (MİK=8mg/L) yalnızca bir *E. coli*'de *armA* ve diğer bir *E. coli* izolatında ise *rmtB* varlığını göstermişlerdir. Araştırmacılar, *armA*'nın *rmtB*'ye göre daha yaygın bulunmasının, *armA* geninin CTX-M-3 genleri ile aynı konjugatif plazmidlerde bulunması ve fonksiyonel transpozon Tn1548'de lokalize olması ile açıklanabileceğini belirtmişlerdir ⁽¹⁴⁾.

Türkiye'de 2010 yılında yapılan bir çalışmada, aminoglikozit dirençli ve ESBL üreten *Enterobacteriaceae* klinik izolatlarında metil transferaz kodlayan gen (*rmtB-K. pneumoniae*) düşük oranda (%0.7) saptanmıştır ⁽¹¹⁾. Aynı çalışma *rmtB* ve *qepA* effluks determinantının bla-CTX-M-14 geni ile beraber tek bir plazmid üzerinde taşındığını gösteren ilk rapordur. Ege bölgesinde, Manisa ilinden izole edilen 112 gram negatif klinik izolatta yaptığımız çalışmada *armA*, *rmtA* ve *rmtB* genleri saptanmamıştır ⁽¹⁰⁾. Bu çalışmada da amikasin MİK \geq 128 mg/L olan 37 izolatta *armA*, *rmtA* ve *rmtB* genleri araştırılmış, ancak hiçbirine rastlanmamıştır. Bu durumda, suşlardaki aminoglikozit direnci, antibiyotikleri modifiye eden enzimlerden kaynaklandığı için 16S rRNA metilaz genleri tespit edilememiş olabilir. Ayrıca aminoglikozit dirençli kökenleri seçerken yalnızca amikasin direncinin dikkate alınması da neden olarak gösterilebilir.

2010 yılında Çin'de yapılan bir çalışmada amikasin ve gentamisine dirençli 217 gram-negatif klinik izolatın 198'inde amikasin MİK değerleri \geq 512 mg/L olarak bulunmuştur. Bu kökenlerin 193'ünde *armA* (%67.2) ve *rmtB* (%30.3) varlığı saptanmıştır. Amikasin MİK değerleri \leq 256 mg/L olan 19 izolatta

ise bu genlere rastlanmamıştır. Araştırmacılar, yüksek-düzye aminoglikozit direnci olan 104 *Enterobacteriaceae* kökeninin hepsinde, 94 non-fermentatif organizmanın ise %95'inde *armA* ve/veya *rmtB* genlerini saptamışlar, diğer 16S rRNA metilaz genlerine (*rmtA*, *rmtC*, *rmtD* veya *npmA*) rastlamamışlardır. *P. aeruginosa* kökenlerinin dört tanesi ve bir *A. baumannii* kökeni aminoglikozitlere oldukça dirençli bulunmuşsa da bilinen metilaz genleri bakımından incelendiğinde negatif sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca 16S rRNA metilaz içeren kökenlerin sefalosporinlere, karbapenemlere ve kinolonlara da yüksek oranda direnç gösterdiğini bildirmişlerdir ⁽³⁾.

Aminoglikozit direncinin *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında hızlı ve global bir şekilde yayıldığı çeşitli çalışmalarda açıkça görülmektedir ^(2,3,11,16). Yamane ve ark. ⁽¹⁶⁾ tarafından yapılan çalışmada, pulsed-field gel elektroforez profilleri değerlendirilerek dirençli izolatların DNA baz dizilimlerinin birbirlerinden farklı olduğu açıkça görülmüş ve genetik olarak farklı izolatlar arasındaki direnç yayılımının plazmidler ve transpozonlar gibi hareketli DNA parçacıkları aracılığıyla gerçekleştiği belirtilmiştir. Benzer olarak, Zhou ve ark. ⁽³⁾ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PZR ile yapılan tiplendirme sonucu belirlenen gruplar ve aminoglikozit direnci arasında bir ilişkiye rastlamamışlar, dolayısıyla *armA* ve *rmtB* direncinin horizontal olarak yayılmakta olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sonuç olarak, artan direnç oranlarına rağmen, aminoglikozitler ve aminoglikozitlerin diğer antibiyotiklerle olan kombinasyonları antimikrobiyal tedavide hâlâ önemini korumaktadır. Son yıllarda önem kazanan metiltransferazlardan kaynaklanan direnç mekanizması bugüne kadar ülkemizde yalnızca bir izolatta saptanmıştır. Ancak, dünya çapındaki yayılımı değerlendirildiğinde, aminoglikozitlere yüksek düzey direnç gelişimine neden olan plazmid aracılı 16S rRNA metilaz genlerinin ülkemizdeki varlığının izlenmesi ve bu mekanizmanın saptanması durumunda yayılımının engellenmesi için ciddi önlemlere başvurulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007; 45:88-94. <http://dx.doi.org/10.1086/518605>

- PMid:17554708
2. **Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES.** Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1843-5.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01477-07
PMid:18347105 PMCid:PMC2346617
 3. **Zhou Y, Yu H, Guo Q, et al.** Distribution of 16S rRNA methylases among different species of gram negative bacilli with high level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:1349-53.
http://dx.doi.org/10.1007/s10096-010-1004-1
PMid:20614151
 4. **Jana S, Deb JK.** Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 70:140-50.
http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0279-0
PMid:16391922
 5. **Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T.** Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2949-53.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.7.2949-2953.2005
PMid:15980373 PMCid:PMC1168633
 6. **Park YJ, Lee S, Yu JK, Woo GJ, Lee K, Arakawa Y.** Co-production of 16S rRNA methylases and extended spectrum beta-lactamases in Amp-C producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:907-8.
http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl317
PMid:16891325
 7. **Périchon B, Courvalin P, Galimand M.** Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluorquinolones by QepA mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:2464-9.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00143-07
PMid:17470656 PMCid:PMC1913276
 8. **Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR.** Discovery of a gene conferring multiple aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:2666-9.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01743-09
PMid:20368404 PMCid:PMC2876372
 9. **Yu F, Yao D, Pan J, et al.** High prevalence of plasmid mediated 16S rRNA methylase gene *rmtB* among *Escherichia coli* clinical isolates from a Chinese teaching hospital. *BMC Infect Dis* 2010; 10:184.
http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-184
PMid:20573216 PMCid:PMC2905422
 10. **Ermertcan Ş, Hoşgör Limoncu M, Taşlı H, Eraç B, Gazi H.** Gram negatif bakterilerde plazmid aracılı yüksek düzey aminoglikozit direncinin araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2008; 22:203-7.
 11. **Berçot B, Poirel L, Özdamar M, Hakko E, Türkoglu S, Nordmann P.** Low prevalence of 16S methylases among extended spectrum β lactamase producing *Enterobacteriaceae* from a Turkish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:797-98.
http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq003
PMid:20093261
 12. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th informational supplement. CLSI document M100-S18. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
 13. **Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, et al.** Plasmid mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:1007-12.
http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh455
PMid:15486082
 14. **Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, et al.** Emergence of *ArmA* and *RmtB* aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:459-64.
http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl527
PMid:17224412
 15. **Galimand M, Courvalin P, Lambert T.** Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2565-71.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.8.2565-2571.2003
PMid:PMC166065
 16. **Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, et al.** Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2069-74.
http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.6.2069-2074.2004
PMid:15155201 PMCid:PMC415585
 17. **Yamane K, Wachino JI, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y.** Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:951-3.
http://dx.doi.org/10.3201/eid1106.040924
PMid:15963295 PMCid:PMC3367594