

# KARBAPENEMLERE DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* İZOLATLARININ APRAMİSİNE DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

## INVESTIGATION OF THE SUSCEPTIBILITY OF CARBAPENEM-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATES TO APRAMYCIN

Sevinç Baba<sup>1</sup> , Zerrin Aktaş<sup>1</sup> , Mustafa Oral Öncül<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: S.B. 0000-0003-3625-155X; Z.A. 0000-0002-5998-0440; M.O.Ö. 0000-0002-1681-1866

**Atf/Citation:** Baba S, Aktaş Z, Öncül MO. Investigation of the susceptibility of carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae isolates to apramycin. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2022;5(1):25-31. <https://doi.org/10.26650/JARHS2022-1034594>

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenemlere dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında bla<sub>OXA-48</sub> benzeri<sup>1</sup> bla<sub>CTX-M-15'</sub> bla<sub>NDM-1</sub> genlerinin varlığı ve apramisine duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya Haziran-Eylül 2020 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen 12 çoğul dirençli *K. pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. Bu izolatlarda imipenem, meropenem, ertapenem ve apramisin için minimum inhibisyon konsantrasyonu (Mik) değerleri, EUCAST önerilerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır. Antibiyotik konsantrasyonları EUCAST (imipenem, meropenem, ertapenem) ve NARMS (apramisin) klinik sınır değerlerini kapsayacak şekilde <0,016-256 µg/mL olarak belirlenmiştir. Klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle *K. pneumoniae* izolatlarında bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>NDM-1'</sub> bla<sub>CTX-M-15</sub> genlerinin varlığı araştırılmıştır.

**Bulgular:** Karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının tamamında (n=12) bla<sub>OXA-48</sub> benzeri ve bla<sub>CTX-M-15</sub> genleri, bir izolatta (%8,33) bla<sub>NDM-1</sub> geni saptanmıştır. İzolatlarının tümü ertapeneme, %91,7'si meropeneme ve %58,3'ü imipeneme dirençli bulunmuştur. Tüm izolatların apramisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Mik aralığı ertapenem için 4-256 µg/mL, meropenem için 0,5-64 µg/mL, imipenem için 0,5-128 µg/mL, apramisin için <0,016-2 µg/mL aralığında saptanmıştır.

**Sonuç:** *K. pneumoniae* izolatlarında apramisin için düşük Mik değerlerinin saptanması, karbapenemlere veya tüm antibiyotiklere dirençli izolatlarda, tedavide alternatif olarak kullanılabilecek bir ajan olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle apramisin klinikte kullanılabilmesiyle ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Klebsiella pneumoniae*, Karbapenemler, Apramisin, OXA-48, NDM-1, CTX-M-15

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, it was aimed to investigate the presence of bla<sub>OXA-48-like</sub>, bla<sub>CTX-M-15'</sub>, bla<sub>NDM-1</sub> genes and susceptibility to apramycin of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates isolated from various clinical samples.

**Material and Methods:** Twelve multiple resistant *K. pneumoniae* isolates isolated from various clinical samples of hospitalized patients in Istanbul Faculty of Medicine Hospital between June and September 2020 were included in the study. The minimum inhibitory concentration (MIC) values for imipenem, meropenem, ertapenem and apramycin in these isolates were determined using the broth microdilution method according to EUCAST recommendations. The antibiotic concentrations were determined as <0.016-256 µg/mL, including the clinical breakpoints of EUCAST (imipenem, meropenem, ertapenem) and NARMS (apramycin). The presence of bla<sub>OXA-48-like</sub>, bla<sub>NDM-1'</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub> genes in *K. pneumoniae* isolates was investigated using the classical polymerase chain reaction (PCR) method.

**Results:** The bla<sub>OXA-48-like</sub> and bla<sub>CTX-M-15</sub> genes were detected in all isolates (n=12) of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems, and the bla<sub>NDM-1</sub> gene was found in one (8.33%). All isolates were found to be resistant to ertapenem, 91.7% of meropenem, 58.3% of imipenem. All isolates were determined as being susceptible to apramycin. The MIC values were detected between 4-256 µg/mL for ertapenem, 0.5-64 µg/mL for meropenem, 0.5-128 µg/mL for imipenem, and <0.016-2 µg/mL for apramycin.

**Conclusion:** The detection of low MIC values for apramycin in *K. pneumoniae* isolates suggests that it may be an alternative treatment agent for isolates resistant to carbapenems or all antibiotics. Therefore, there is a need for more comprehensive studies on the clinical use of apramycin.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenems, Apramycin, OXA-48, NDM-1, CTX-M-15

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Sevinç BABA E-mail: sevincbaba@hotmail.com

**Başvuru/Submitted:** 16.12.2021 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 12.01.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 19.01.2022 • **Kabul/Accepted:** 19.01.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 02.02.2022



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

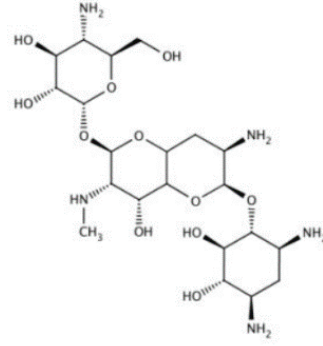
## GİRİŞ

Günümüzde çoklu ilaca dirençli bakteriler en önemli halk sağlığı sorunlarından birini oluşturmaktadır. Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (The Infectious Diseases Society of America, IDSA)'nin hazırladığı rehber göre, "dünya çapında insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri" olarak kabul edilmektedir. Karbapenemlere dirençli *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakteriler, dünyanın birçok yerinde hızla yayılım göstererek hem toplum hem de sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonların önemli bir nedeni olarak bilinmektedir (1-3). Karbapenemler, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) oluşturan Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan beta-laktam grubu içerisinde yer alan en etkili antibiyotiklerden biridir. Ancak karbapenem antibiyotiklerinin yaygın kullanımı ile karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türlerinin prevalansı hızla artmıştır (4). Karbapenemlere dirençli *Enterobacteriaceae* türlerindeki artışın çoğu, karbapenem sınıfı antibiyotiklere karşı etkili  $\beta$ -laktamaz üreten (karbapenemazlar) izolatların ortaya çıkması ve yayılmasından kaynaklanmaktadır (1, 5). Karbapenemaz üreten Gram negatif bakterilerle oluşan enfeksiyonlar tedavi sorunlarına neden olmakta, morbidite ve mortaliteyi büyük ölçüde arttırmaktadır. Bunun yanı sıra, antibiyotik direnci ve bu dirençli bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak seçeneklerin daralmasına neden olmaktadır (6).

*Enterobacteriaceae* türlerinden özellikle *K. pneumoniae* izolatları dünyanın birçok yerinde sıklıkla izole edilmesi ve bu izolatların antibiyotiklerin hemen hemen tümüne dirençli olması nedeniyle bu konuda yapılacak araştırmalara acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

Aminoglikozidler, suda iyi çözünen, katyonik özellikli, amino şekerlerden oluşan geniş spektrumlu antibakteriyel ajanlar olarak kullanılır. 1940'lı yıllarda streptomisin keşfinden itibaren çok sayıda aminoglikozid bulunmuş ve yeni türevleri sentezlenmiştir. Aminoglikozitlerin klinik kullanımının önemli bir dezavantajı ototoksisitelerinin olmasıdır. Kısa süreli tedavilerde hastaların yaklaşık %20'sini etkileyen işitme hasarına neden olduğu gösterilmiştir. Bu ototoksisite iç kulağın duyu hücrelerinin zarar görmesine bağlanmış, kalıcı olarak hem doğal hem de yarı sentetik aminoglikozidlerle ilişkilendirilmiştir. Toksisitelerine rağmen, aminoglikozitler yüksek etkinlikleri, alerji oluşturmaması ve düşük maliyetleri nedeniyle dünya çapında hala en yaygın kullanılan antibiyotikler arasındadır.

Yapısal olarak benzersiz bir aminoglikozit olan apramisin, Gram pozitif ve *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi Gram negatif bakterilerin neden olduğu bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için veterinerlikte kullanılan, ancak insanlarda tedavide kullanılmayan, düşük toksisite gösteren bir antibiyotiktir (7). Apramisinin kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1: Apramisinin kimyasal (C<sub>21</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>.xH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) yapısı

1970'li yıllarda, Gram-negatif enfeksiyonlara karşı daha güvenli ve etkili olan aminoglikozid antibiyotiklerin yerini florokinolonlar gibi diğer antibiyotikler almıştır. Bununla birlikte, son yıllarda florokinolon direncinin hızla yayılması, tüberküloz, pnömoni, peritonit, bakteriyemi ve genitoüriner sistem enfeksiyonları gibi bakteriyel enfeksiyonlara karşı mücadelede bu antibiyotiklerin etkinliğini ciddi şekilde azaltmıştır. Çoğul dirençli mikroorganizmaların artışı, yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara karşı aminoglikozid antibiyotiklerin önemini altını çizmektedir. Bu nedenle güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip zararlı yan etkileri olmaksızın aminoglikozid antibiyotikleri belirlemek büyük önem taşımaktadır. Ototoksisite ile ilgili olarak, aminoglikozid grubu antibiyotiklerden neomisin ve gentamisin ile karşılaştırıldığı *in vitro* ve *in vivo* modellerde, apramisinin neomisin ve gentamisinden daha düşük toksik etkili olduğu gösterilmiştir (8).

Aminoglikozid grubu antibiyotikler bakteriyel ribozomu hedefleyerek, protein biyosentez sürecini engellemektedir. Aminoglikozidler, ciddi sistemik enfeksiyonlarda hızlı bakterisidal aktivite göstermektedir. (9, 10). Veterinerlikte kullanılan apramisinin moleküler yapısının diğer aminoglikozidlerden farklı ve daha düşük toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir (7, 11).

Apramisinin (EBL-1003) prelinik profilini araştırılan bir çalışmada gentamisin ile karşılaştırıldığında benzer etkinliği göstermekte, ancak düşük nefrotoksisitesi sebebiyle komplike üriner sistem enfeksiyonları ve akut piyelonefrit tedavisinde tercih edilebileceği ve daha geniş bir terapötik aralığa sahip olduğu belirtilmiştir (12).

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenem grubu antibiyotiklerden (ertapenem, imipenem veya meropenem) herhangi birine dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında bla<sub>OXA-48</sub> benzeri, bla<sub>NDM-1</sub>' bla<sub>CTX-M-15</sub> genlerinin varlığı ve tedavide alternatif olarak düşünülebilecek arayışlara katkı sağlamak için apramisine duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Haziran-Eylül 2020 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Bilim Dalı Laboratuvarına gönderilen, çeşitli klinik örneklerden

izole edilen ve karbapenemlere dirençli 12 *K. pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 31.01.2020/26657 tarih ve sayılı etik onay alınmıştır.

İzolatlar konvansiyonel ve otomatize sistemlerle (VITEK 2, bioMérieux Fransa) tanımlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle yapılmıştır. Daha sonra çoğul dirençli izolatların imipenem, meropenem, ertapenem ve apramisin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri EUCAST kriterlerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. EUCAST önerileri doğrultusunda her bir izolatın 24 saatlik saf kültüründen 0,5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. Antibiyotik konsantrasyonları EUCAST klinik sınır değerlerini kapsayacak şekilde <0,016-256 µg/mL aralığında belirlenmiş ve seri seyreltmeleri yapılmıştır. 96 kuyucuklu plaklarda antibiyotik içeren kuyucuklara 10 µl bakteri süspansiyonu eklenmiş ve 37 °C'de 16-18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında plaklar siyah zemin üzerinde incelenmiş bakteri üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyonları MİK değerleri olarak belirlenmiştir. Apramisin için sınır değerler EUCAST ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) rehberlerinde bulunmadığından Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC)'nin, Ulusal Antibiyotik Direnç İzleme Sistemi (National Antibiotic Resistance Monitoring System-NARMS) raporunda *Escherichia coli* için yer alan sınır değerleri kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 standart suşları kontrol olarak kullanılmıştır (13, 14).

*K. pneumoniae* izolatlarında bla<sub>OXA-48 benzeri</sub>, bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub> genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. 37 °C'de 18- 24 saat üreyen izolatlardan 1-2 koloni steril öze yardımıyla 50 µl steril distile su bulunan ependorf tüplerinde süspanse edilmiştir. Tüpler ısıtıcı bloğunun içerisinde 95 °C'de 10 dakika bekletilmiş, daha sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek dipteki çökelti atılmış ve üst sıvı kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon karışımı son hacim 25 µl olacak şekilde; DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (2,5µl), DNA 0,5 µl, primerler 2,5 µl, distile su 18,75 µl, 40 mM içeren dNTP karışımından 0,5 µL, Dream Taq DNA polimeraz 0,25 µL (5 U/ µL) kullanılarak hazırlanmıştır.

PCR protokolü modifiye edilerek ilk denatürasyon 94 °C'de 5 dakika; denatürasyon 94 °C'de 60 saniye, primer bağlanması 56 °C 'de (bla<sub>OXA-48 benzeri</sub>), 60 °C'de (bla<sub>NDM-1</sub>, 62°C'de (bla<sub>CTX-M-15</sub>) 45saniye, uzama 72 °C'de 1 dakika, toplam 35 döngü ve son uzama 72°C'de 7 dakika olacak şekilde uygulanmıştır (15, 16). bla<sub>OXA-48</sub>-F (5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3'), bla<sub>OXA-48</sub>-R (5'-GAGCACTCTTTTGATGGC-3') (743 bp) (16); bla<sub>NDM-1</sub>-F (5'-TCTCGACATGCCGGGTTTCGG-3'), bla<sub>NDM-1</sub>-R (5'- ACCGAGATTGCCGAGCGACTT-3') (475 bp) (17); bla<sub>CTX-M-15</sub>-F (5'-CGCTTTCGATGTGCAG-3') bla<sub>CTX-M-15</sub>-R (5'- ACCGCGATATCGTTGGT-3') (550 bp) (18) primerleri kullanılmıştır.

Amplifikasyon ürünleri etidyum bromür ile boyanan % 1'lik agaroz jelde 120 V da 30 dakika yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir.

## BULGULAR

Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının tamamında bla<sub>OXA-48 benzeri</sub> ve bla<sub>CTX-M-15</sub> genleri, bir izolatta (%8,33) bla<sub>NDM-1</sub> geni saptanmıştır (Tablo-1).

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile izolatların ertapenem, meropenem, imipenem ve apramisin MİK değerleri EUCAST kriterlerine göre araştırılmıştır. Apramisin için sınır değerleri EUCAST ve CLSI'da bulunmadığından dolayı, NARMS raporunda *E. coli* için yer alan sınır değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo-2). İzolatların tümü ertapeneme, %91,7'si meropeneme, %58,3'ü imipeneme dirençli bulunmuştur. Apramisine dirençli izolat saptanmamıştır (Tablo-3). İzolatların MİK değerleri ertapenem için 4-256 µg/mL, meropenem için 0,5-64 µg/mL, imipenem için 0,5-128 µg/mL, apramisinde <0,016-2 µg/mL aralığında saptanmıştır (Tablo-4).

**Tablo 1:** *K. pneumoniae* izolatlarında (n=12) saptanan direnç genleri

Suş no	PCR ile saptanan direnç genleri		
	OXA-48 benzeri	NDM-1	CTX-M-15
1	+	+	+
2	+	-	+
3	+	-	+
4	+	-	+
5	+	-	+
6	+	-	+
7	+	-	+
8	+	-	+
9	+	-	+
10	+	-	+
11	+	-	+
12	+	-	+

**Tablo 2:** Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin EUCAST'e göre MİK sınır değerleri (mg/L)

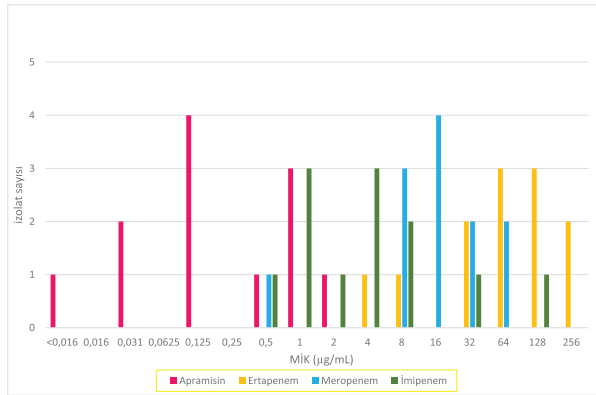
Antibiyotik	Duyarlı ≤ (mg/L)	Dirençli > (mg/L)
Ertapenem	0,5	0,5
Meropenem	2	4
İmipenem	2	8
Apramisin*	8	64

\*: National Antibiotic Resistance Monitoring System (NARMS)'e göre MİK sınır değerleri.

**Tablo 3:** İzolatların sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK (mg/L) değerleri ve sonuçları

Suş No	Ertapenem (mg/L)	Sonuç	Meropenem (mg/L)	Sonuç	İmipenem (mg/L)	Sonuç	Apramisin (mg/L)	Sonuç
1	256	Dirençli	64	Dirençli	128	Dirençli	< 0,016	Duyarlı
2	128	Dirençli	16	Dirençli	4	Dirençli	0,125	Duyarlı
3	64	Dirençli	8	Dirençli	32	Dirençli	0,031	Duyarlı
4	8	Dirençli	8	Dirençli	8	Dirençli	0,031	Duyarlı
5	64	Dirençli	8	Dirençli	4	Dirençli	0,125	Duyarlı
6	128	Dirençli	16	Dirençli	1	Duyarlı	0,125	Duyarlı
7	32	Dirençli	32	Dirençli	2	Duyarlı	0,125	Duyarlı
8	4	Dirençli	0,5	Duyarlı	0,5	Duyarlı	0,5	Duyarlı
9	32	Dirençli	16	Dirençli	1	Duyarlı	1	Duyarlı
10	128	Dirençli	64	Dirençli	8	Dirençli	1	Duyarlı
11	256	Dirençli	32	Dirençli	4	Dirençli	2	Duyarlı
12	64	Dirençli	16	Dirençli	1	Duyarlı	1	Duyarlı

**Tablo 4:** İzolatların antibiyotiklere göre MİK (mg/L) değerleri (n=12).



## TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç, küresel halk sağlığı açısından önemli bir tehdittir. Karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türleri, Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization-WHO) raporunda kritik öneme sahip öncelikli patojenler arasında ilk üçte yer almaktadır (19, 20). 2012 yılında, CDC karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türlerini geniş spektrumlu sefalosporinlere (seftriakson, seftazidim ve sefotaksim) dirençli, imipenem, meropenem ve/veya doripeneme duyarlı olmayanlar olarak tanımlamıştır (21). CDC bu tanımı 2015 yılında, sefalosporinlere direnç bildirimine ihtiyaç duymaksızın, bir ya da birden fazla karbapeneme (ertapenem de dahil) *in vitro* direnç gelişimi olarak güncellemiştir (22).

Karbapenemlere dirençli *Enterobacteriaceae* türlerinin yaygın görülmesi, esas olarak karbapenemazların üretimine ve bu enzimleri kodlayan genlerin plazmid aracılı geçişine dayandırılmaktadır. Karbapenemaz çeşitleri coğrafi bölgelere göre değişkenlik göstermektedir (4).

Metallobetalaktamaz sınıfından NDM-1 (New Delhi metallobetalaktamaz-1) enzimi ilk kez 2008 yılında İsviçre'de üriner sistem enfeksiyonu olan hastanın *K. pneumoniae* izolatında saptanmıştır (23). 2010 yılının Ağustos ayından itibaren Orta ve Güney Amerika kıtaları hariç özellikle Hindistan ile doğrudan bağlantılı olan yerlerde NDM-1 tipi karbapenemaz tespit edilmiş ve hızla yayılım göstermiştir. Son bulgular NDM-1 enziminde ikincil rezervuarları olarak Balkan devletleri ve Orta Doğu olduğunu göstermektedir (24).

2000'li yılların başı itibarıyla genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (GSBL'ler) üreten *E. coli* izolatları görülmeye başlanmıştır. Çoğunlukla CTX-M-15 (sefotaksimi hidrolize eden beta laktamaz - Münih) tipinde olan bu GSBL'ler, sefamisinler ve karbapenemler hariç tüm  $\beta$ -laktamlara direnç sağlamaktadır (24).

CTX-M-15 tipi beta-laktamaz ilk kez Hindistan'da 2000 yılında saptanmıştır. Hindistan, Pakistan ve Bangladeş'te GSBL'lerin yayılımı için enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin kullanımını katkı sağlamış ve NDM-1 tipi karbapenemazların artmasına da zemin hazırlamıştır. NDM-1 enzimi üreten izolatlar, aynı zamanda CTX-M-15 tipi GSBL'lere de sahiptir. Bunun dışında asetiltransferazlar ve metilazlar gibi geniş spektrumlu aminoglikozid direnç enzimlerini de üretmeleri, çoklu ilaca dirençli gelişmesiyle sonuçlanmaktadır (25). Çalışmamızda CTX-M-15 tipi beta laktamazlar ve OXA-48 (oksasilinaz-48) tipi karbapenemazlar tüm izolatlarda bulunmuş, sadece bir tanesinde NDM-1 ve OXA -48 tipi karbapenemazlar ve CTX-M-15 tipi beta laktamazlar saptanmıştır.

OXA-48 enzimi ilk kez *K. pneumoniae*'de 2001 yılında İstanbul Tıp Fakültesi'nde izole edilmiş ve sonraki yıllarda tüm dünyada bildirilmiştir (16). OXA-48 enzimi üreten izolatların ülkemizden ya da ülkemizle bağlantılı olan hastalardan bildirildiği görülmüştür (15). 2014-2015 yıllarında, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* türleri ile ilgili 38 Avrupa ülkesinin verilerini içeren çalışmada, OXA-48 üreten izolatların ülkemizde en yüksek

epidemiolojik seviyede (endemik) olduğu bildirilmiştir (26). Hastanemizde de OXA-48 üreten *K. pneumoniae* suşları endemik hale geçtiğinden dolayı, doğal olarak çalışmamızda da, *K. pneumoniae* izolatlarının tümünde OXA-48 geni bulunmuştur.

Karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türleri ile enfekte olan hastaların sınırlı antimikrobiyal tedavi seçenekleri nedeniyle genellikle yüksek ölüm oranlarına sahip olmaları nedeniyle, etkili antibiyotik arayışlarına sebep olmaktadır. Son çalışmalar özellikle veterinerlikte kullanılan bir aminoglikozit olan apramisin'in çoklu ilaca, karbapenemlere ve aminoglikozitlere dirençli *Enterobacteriaceae* türlerine karşı etkili bir antibiyotik olduğu gösterilmiştir (9, 27-29).

2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmada *Enterobacteriaceae* izolatlarının (n=141) %78'inin ve karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* türlerinin (n=72) %70,8'inin apramisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Çalışmada karbapeneme dirençli izolatların %47,2'si gentamisine, %34,7'si tobramisine, %65,3'ü amikasinine duyarlı bulunmuş; apramisin, amikasin dışındaki diğer aminoglikozidlerin duyarlılıklarına göre istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır (28).

2014-2019 yılları arasında Çin'in farklı bölgelerindeki üç hastaneden toplanan klinik örneklerden izole edilen 84 karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* ve 40 karbapeneme dirençli olmayan *K. pneumoniae* izolatının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile apramisine duyarlılığı araştırılmıştır. Gruplar arasında antimikrobiyal ajanlara direnç oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ( $p>0,05$ ) saptanmamıştır. Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının tamamı apramisine duyarlı, MİK<sub>50/90</sub> değeri 4/8 µg/mL; ertapenem, meropenem ve imipenem direnç oranları sırasıyla %100, %100, %97,6 bulunmuştur. KPC-2 tipi (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemazı 2) karbapenemaz karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında %100, karbapeneme dirençli olmayan *K. pneumoniae* izolatlarında %72,5 oranında; NDM enzimi karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında saptanmamışken, karbapeneme dirençli olmayan *K. pneumoniae* izolatlarının %12,5'inde (bla<sub>NDM-1</sub> (n=4), bla<sub>NDM-5</sub> (n=1) ) varlığı saptanmıştır. OXA-48 enzimi ise her iki grupta da gösterilmemiştir (27). Çin'de KPC-2, NDM-1, NDM-5 tipi karbapenemazların yaygın olduğu gösterilirken, çalışmamızda ülkemizde OXA-48 enzimi izolatların tamamında bulunması, coğrafik olarak ülkeler arasında farklılıklar olabileceğini desteklemektedir. Çalışmamızda izolatların ertapenem, meropenem ve imipenem direnç oranları sırasıyla %100, %91,7 ve %58,3 olarak bulunmuştur. Yine bu çalışmayla benzer bir şekilde tüm izolatlar apramisine duyarlı ve MİK değerleri <0,016-2µg/mL aralığında olduğu saptanmıştır. Apramisin MİK değerlerinin çoğunlukla dirençli izolatlarımızda oldukça düşük saptanması dikkat çekmiş ve klinikte alternatif ajan olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu gözlemlenmiştir.

2019 yılında İspanya'da bir üniversite hastanesindeki klinik örneklerden izole edilen 61 antimikrobiyal dirençli ESKAPE paneli (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Enterobacter* türleri) patojenleri olarak bilinen

türler dahil edilmiştir. Florokinolon direncinin yayılımı ile tedavide önemli bir yeri olan aminoglikozid antibiyotiklerin klinik kullanımı üzerine yapılan çalışmada apramisin ve gentamisin C1a'nın neomisin ve gentamisin ile karşılaştırıldığında daha düşük ototoksositeye sahip olduğu gösterilmiştir. Sadece üç izolat (%4.92) (*K. pneumoniae* x2 ve *A. baumannii*) MİK değeri 64 µg/mL'nin üstünde bulunmuştur (8).

2016-2017 yılları arasında Çin'de 17 hastaneden alınan klinik örneklerden izole edilen 134 karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* izolatının dahil edildiği çalışmada %95.5'inin apramisine duyarlı olduğu saptanmış, MİK değeri 0,5->256 µg/mL aralığında bulunmuştur. *K. pneumoniae* izolatlarının (n=86) %98.8'inin apramisine duyarlı olduğu gösterilmiştir (29).

2021 yılında New York ve New Jersey bölgesindeki hastanelerin yatan hastalarından izole edilen karbapeneme dirençli 155 *K. pneumoniae* izolatı ile yapılan çalışmada %15.5'inin (n=24) apramisine dirençli olduğu gösterilmiş, MİK<sub>50/90</sub> değeri 8->128 mg/L olarak bulunmuştur (30).

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 38 karbapenemaz üreten yaygın dirençli *K. pneumoniae* izolatları ile yapılan çalışmada apramisin için MİK değerleri; %16'sında (n=6) 2 µg/mL, %60'ında (n=23) 4 µg/mL, %3'ünde (n=1) 8 µg/mL ve %21'inde (n=8) >256 µg/mL bulunmuştur. MİK değerlerine göre izolatların sadece 4'ü (%10,5) meropeneme duyarlıdır. Meropenem/apramisin kombinasyonu araştırılmış, izolatların %52'sinin sinerjistik etkiye, %31'inin aditif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. İzolatların %81,5'inde (n=31) kombinasyondaki apramisin için MİK değeri 0,5-2 µg/mL arasında bulunmuştur. Ayrıca karbapenemaz enzimleri araştırılmış, izolatların %34,2'sinde (n=13) yalnızca NDM-1 enzimi, %31,6'sında yalnızca OXA-48 enzimi, %10,5'inde hem NDM-1 hem de OXA-48 enzimi saptanmıştır (31).

2014-2017 yılları arasında Avrupa, Asya, Afrika ve Güney Amerika'daki hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen çoğunlukla dirençli bakteriler, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* türleri ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarıyla *in vitro* apramisin'in aktivitesinin araştırıldığı çalışmada klinik kullanımdaki aminoglikozidlere kıyasla üstün etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>OXA-48</sub>, bla<sub>OXA-23</sub>, bla<sub>OXA-232</sub>, bla<sub>OXA-181</sub>, bla<sub>KPC-2</sub>, bla<sub>IMP-1</sub> genleri taşıyan izolatların yanı sıra plazmit aracılı kolistin direnci sağlayan direnç geni *mcr-1* geni taşıyan klinik *E. coli* izolatlarına karşı apramisin'in etkinliği gösterilmiştir (9).

Apramisin'in, aminoglikozidler arasında kimyasal yapısındaki benzersizliği, aminoglikozid-değiştirici enzimlerin birçoğu tarafından etkisiz hale getirilmesini engellemektedir. Bunun sonucunda apramisin, aminoglikozidlere dirençli bakterilere karşı iyi aktivite göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, apramisin'in insanlarda kullanılan aminoglikozidlerle karşılaştırıldığında karbapenemlere dirençli izolatlara karşı etkili olan tek aminoglikozid olduğu bulunmuştur (32).

Amikasin de dahil olmak üzere aminoglikozidlerden daha güçlü aktiviteye sahip olması tedavisi zor olan enfeksiyonlar açısından apramisin'in klinikte kullanımında büyük beklenti oluşturmaktadır.

dir. Ayrıca çoğul dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının apramisine duyarlılığı çoğul dirençli olmayan izolatlarla benzer olduğu görülmüştür. Düşük ototoksik potansiyeli ile birlikte değerlendirildiğinde klinik kullanımda seçenek oluşturabileceği bildirilmiştir (7) .

Küresel bir halk sağlığı sorunu olan antibiyotik direncinin nedenlerinden birini oluşturan gereksiz antibiyotik kullanımı insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Yeni antibiyotiklerin keşfedilmesinden çok bilinen antibiyotiklerle tedavi seçeneklerinin oluşturulması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde, geliştirilmekte olan yeni antibiyotiklerin yanı sıra, var olan antibiyotiklerden etkili bir ajan bulma konusunda çözüm arayışları devam etmektedir. Ön çalışma niteliğinde olan bu çalışmanın sonuçlarına göre, apramisinin tedavide önemli bir alternatif ajan olabileceği ihtimali gözlemlendiğinden dolayı, daha kapsamlı klinik çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 31.01.2020, No: 26657).

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- Z.A.,S.B.; Veri Toplama- Z.A.,S.B.; Veri Analizi/Yorumlama- Z.A.,S.B., M.O.Ö.; Yazı Taslağı- Z.A.,S.B.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Z.A.,S.B., M.O.Ö.; Son Onay ve Sorumluluk- Z.A.,S.B., M.O.Ö.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Clinical Research Ethical Committee of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine (Date: 31.01.2020, No: 26657)

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- Z.A.,S.B.; Data Acquisition- Z.A.,S.B.; Data Analysis/Interpretation- Z.A.,S.B., M.O.Ö.; Drafting Manuscript- Z.A.,S.B.; Critical Revision of Manuscript- Z.A.,S.B., M.O.Ö.; Final Approval and Accountability- Z.A.,S.B., M.O.Ö.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

## REFERANSLAR

1. Guh AY, Limbago BM, Kallen AJ. Epidemiology and prevention of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the United States. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 2014;12(5):565-80.
2. Gupta P, Bollam N, Mehta Y, Sengupta S, Gandra S. Risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in a tertiary-care hospital in India. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020;1-3.

3. van Duin D, Paterson DL. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community Trends and Lessons Learned. *Infect Dis Clin N Am* 2016;30(2):377-90.
4. Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Detection and Antimicrobial Therapy. *Front Microbiol* 2019;10:1823.
5. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17(10):1791-8.
6. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(9):821-30.
7. Matt T, Ng CL, Lang K, Sha SH, Akbergenov R, Shcherbakov D, et al. Dissociation of antibacterial activity and aminoglycoside ototoxicity in the 4-monosubstituted 2-deoxystreptamine apramycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(27):10984-9.
8. Ishikawa M, Garcia-Mateo N, Cusak A, Lopez-Hernandez I, Fernandez-Martinez M, Muller M, et al. Lower ototoxicity and absence of hidden hearing loss point to gentamicin C1a and apramycin as promising antibiotics for clinical use. *Sci Rep-Uk* 2019;9(1):2410.
9. Juhas M, Widlake E, Teo J, Huseby DL, Tyrrell JM, Polikanov YS, et al. In vitro activity of apramycin against multidrug-, carbapenem- and aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2019;74(4):944-52.
10. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6(6):a027029.
11. Kang AD, Smith KP, Eliopoulos GM, Berg AH, McCoy C, Kirby JE. In vitro Apramycin Activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;88(2):188-91.
12. Becker K, Cao S, Nilsson A, Erlandsson M, Hotop SK, Kuka J, et al. Antibacterial activity of apramycin at acidic pH warrants wide therapeutic window in the treatment of complicated urinary tract infections and acute pyelonephritis. *EBioMedicine* 2021;73:103652.
13. 2000 National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) For Enteric Bacteria Participants (Human Isolates) Available from: URL [https://www.cdc.gov/narms/annual/2000/NARMS\\_final\\_report\\_2000.pdf](https://www.cdc.gov/narms/annual/2000/NARMS_final_report_2000.pdf). Alıntılanma tarihi: 30.07.2021.
14. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. Available from: URL: [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/warnings/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/). Alıntılanma tarihi 19.08.2019.
15. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2008;54(2):101-6.
16. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(1):15-22.
17. Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(7):1543-50.
18. Poirel L, Naas T, Le Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob Agents Ch* 2001;45(12):3355-61.

19. World Health Organization. WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>.2017.
20. van Duin D, Arias CA, Komarow L, Chen L, Hanson BM, Weston G, et al. Molecular and clinical epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriales* in the USA (CRACKLE-2): a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2020;20(6):731-41.
21. Guh AY, Bulens SN, Mu Y, Jacob JT, Reno J, Scott J, et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in 7 US Communities, 2012-2013. *JAMA* 2015;314(14):1479-87.
22. Centers for Disease Control and Prevention. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). November 2015 Update - CRE Toolkit. <https://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/cre-guidance-508.pdf>
23. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(12):5046-54.
24. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother* 2011;66(4):689-92.
25. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh PR, Paterson DL. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(8):3280-4.
26. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* working g. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill* 2015;20(45):1-18.
27. Hao M, Shi X, Lv J, Niu S, Cheng S, Du H, et al. In vitro Activity of Apramycin Against Carbapenem-Resistant and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Front Microbiol* 2020;11:425.
28. Smith KP, Kirby JE. Evaluation of apramycin activity against carbapenem-resistant and -susceptible strains of *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;86(4):439-41.
29. Hu Y, Liu L, Zhang X, Feng Y, Zong Z. *In Vitro* Activity of Neomycin, Streptomycin, Paromomycin and Apramycin against Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* Clinical Strains. *Front Microbiol* 2017;8:2275.
30. Hao M, Schuyler J, Zhang H, Shashkina E, Du H, Fouts DE, et al. Apramycin resistance in epidemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 strains. *J Antimicrob Chemother* 2021;76(8):2017-23.
31. Kilic U, Koroglu M, Olmez M, Altindis M. Investigation of the In Vitro Effectiveness of Aztreonam/Avibactam, Colistin/Apramycin, and Meropenem/Apramycin Combinations Against Carbapenemase-Producing, Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Microb Drug Resist* 2020;26(11):1291-97.
32. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith M, et al. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(1):48-53