

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARIYLA GELİŞTİRİLEN
ENFEKSİYONLARDA SULBAKTAM+KOLİSTİN VE MEROPENEM +
KOLİSTİN KOMBİNASYON TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN *GALLERIA*
MELLONELLA DENEYSSEL MODELİNDE *İN VİVO* OLARAK
ARAŞTIRILMASI

ELDAN SUBAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. CANAN KÜLAH

ZONGULDAK

2020

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARIYLA GELİŞTİRİLEN
ENFEKSİYONLARDA SULBAKTAM+KOLİSTİN VE MEROPENEM +
KOLİSTİN KOMBİNASYON TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN *GALLERIA*
MELLONELLA DENEYSSEL MODELİNDE *İN VİVO* OLARAK
ARAŞTIRILMASI

ELDAN SUBAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. CANAN KÜLAH

ZONGULDAK

2020

KABUL VE ONAY:

“DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARIYLA GELİŞTİRİLEN ENFEKSİYONLARDA SULBAKTAM+KOLİSTİN VE MEROPENEM + KOLİSTİN KOMBİNASYON TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN *GALLERIA MELLONELLA* DENEYSEL MODELİNDE *İN VİVO* OLARAK ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

14.01.2020

Başkan: Prof. Dr. Canan KÜLAH



Üye: Dr. Öğr. Üy. Demet HACİSEYİTOĞLU



Üye: Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ



ONAY:

Yukarıdaki imzaları, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

TARİH: 14.01.2020



Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

Eldan Subaşı, Dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarıyla geliştirilen enfeksiyonlarda sulbaktam/kolistin ve meropenem/kolistin kombinasyon tedavi etkinliğinin *Galleria mellonella* deneysel modelinde in vivo olarak araştırılması, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2020.

Amaç: Kolistinin tek başına veya diğer antimikrobiklerle kombine olarak enfeksiyonlarda klinik olarak sıklıkla kullanıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, meropenem ve sulbaktam ile kombine edilen kolistinin çoklu ve pan ilaç dirençli *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarına karşı sinerjistik aktivitesini hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemlerle araştırdık.

Gereç/yöntem: Kolistin, meropenem ve sulbaktamın duyarlı (n = 3), çoklu (n = 3) ve pan ilaç dirençli (n = 3) *A. baumannii* klinik izolatlarına karşı antibakteriyel aktivitesi araştırıldı. Kolistinin meropenem ve sulbaktam ile sinerjistik aktivitesi *checkerboard* yöntemi ile değerlendirildi. Seçilen antibiyotikler arasındaki etkileşimler, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon endeksi hesaplanarak belirlendi. *Galleria mellonella*, *in vivo* etkinlik testleri için deneysel model olarak kullanıldı.

Bulgular: Kolistin meropenem ve kolistin sulbaktam olmak üzere her iki kombinasyon, pan ilaç dirençli izolatları üzerinde additif bir etkiye sahipken, çoklu ilaç dirençli izolatları üzerinde additif veya sinerjistik etki gösterdi. Pan ilaç dirençli izolatlarıyla enfekte edilen ve sadece tedavi edilen kombinasyonlarda larvaların tümünün öldüğü gözlenirken, kolistin sulbaktam kombinasyon grubunda %80'i ölmüştü. Çoklu ilaç dirençli izolatlarıyla enfekte larva grubunda, sağkalım oranları; kolistin %50, meropenem %10, sulbaktam %10 ve kolistin/meropenem kombinasyonu %70.

Sonuçlar: Sonuçlarımız Kolistinin hem sulbaktam hem de meropenem ile kombinasyon halinde artmış aktiviteye sahip olduğunu *Acinetobacter* enfeksiyonları için umut vaat edebileceğini göstermektedir. Bu çalışma aynı zamanda klinik izolatlarda kolistin kombinasyonlarının etkinliğini hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemlerle değerlendiren ilk çalışma olarak dikkat çekmektedir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter* sp, Sinerji, *In vivo*, Checkerboard, Time-kill-kill

ABSTRACT

Eldan SUBAŞI, In vivo investigation of combination treatment effectiveness of sulbactam/colistin and meropenem/colistin in infections developed with resistant *Acinetobacter baumannii* strains in *Galleria mellonella* experimental model, Department of Medical Microbiology, M.Sc. Thesis, Zonguldak, 2020

Aim: Colistin has been reported to be frequently used clinically in infections, single or combined with other antimicrobials. In this study, we investigated the synergistic activity of colistin combining with meropenem and sulbactam against Multidrug and pandrug resistance *Acinetobacter baumannii* clinical isolates both by in vitro and in vivo methods.

Materials/methods: The antibacterial activity of colistin, meropenem and sulbactam against sensitive (n=3), Multidrug (n=3) and pandrug resistance (n=3) *A. baumannii* clinical isolates was investigated. The synergistic activity of colistin with meropenem and sulbactam was evaluated by checkerboard method. Interactions between the selected antibiotics were determined by calculating the fractional inhibitory concentration index. *Galleria mellonella* was used as an experimental model for in vivo activity testing.

Results: Both combinations, colistin meropenem and colistin sulbactam had additive effect on pandrug-resistance isolates while additive effect or synergism on Multidrug-resistance isolates. The larvae infected by pandrug-resistance isolates and in combination treated alone were all dead; while 80% were dead in the colistin sulbactam combination group. In the larvae group infected by Multidrug-resistance isolates, survival rates; treated with colistin 50%, with meropenem 10%, with sulbactam 10% and with colistin+meropenem combination 70%.

Conclusion: Our results indicate that colistin with combination to both sulbactam and meropenem has enhanced activity and may be promising *Acinetobacter* infections. This study is also remarkable to be the first for evaluating colistin combinations on clinical isolates by both in vitro and in vivo methods.

Keywords: *Acinetobacter* sp, Synergy, In vivo, Checkerboard time-kill.

TEŞEKKÜR

Çalışma hayatımda ve yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmalarımda her zamanyanımda olan engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Canan Külâh'a,

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum azim ve tecrübesiyle yolumda ışık olan Prof. Dr. Füsün Cömert'e,

Aramızda mesafeler olmasına rağmen yanımda olduğunu hissettiğim Prof. Dr. Elif Aktaş Sepetçi'ye

In vivo enfeksiyon modeli deneylerimde larvaların her aşamasını takip ederek bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Aydan Atalar'a,

Mikrobiyoloji ailesine yeni katılan ve çalışmaktan keyif aldığım Dr. Öğr. Üyesi Demet Hacıseyitoğlu'na

Laboratuvarımızın değerli çalışanlarına,

Her zaman yanımda olan aileme özellikle benim için her türlü fedakarlıkta bulunan, bana güvenen, sevgili anneme,

Hayatımın her alanında olduğu gibi tez çalışmamı hazırlarken de her aşamasında bana yardımcı olan sevgili eşim Vedat Subaşı'ya

Ve hayatıma anlam katan evimin neşesi olan çocuklarım Çağan ve İpek'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Biyolog Eldan SUBAŞI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Acinetobacter Baumannii</i> 'nin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	3
2.2. <i>Acinetobacter Baumannii</i> 'nin Tarihçesi ve Epidemiyolojisi	3
2.3. <i>Acinetobacter Baumannii</i> Virülans Faktörleri.....	5
2.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> Antimikrobiyal Direnç.....	6
2.5. <i>Acinetobacter Baumannii</i> Enfeksiyonlarının Kliniği.....	8
2.6. <i>Acinetobacter Baumannii</i> 'nin Toplum Kökenli Enfeksiyonları.....	9
2.7. <i>Acinetobacter Baumannii</i> İlaç Direnci ve Tedavi Seçenekleri.....	10
2.8. <i>Acinetobacter Baumannii</i> 'nin Tedavisi	10
2.9. <i>Acinetobacter Baumannii</i> 'nin Tedavide Antibiyotik Kombinasyonu ve Sinerjisi.....	11
2.10. <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonlarında Kombine Antibiyotik Kullanımı	12
2.10.1. Sulbaktam.....	12
2.10.2. Meropenem	14
2.10.3. Kolistin.....	15
2.11. Antimikrobiyal Etkinlik Testleri.....	20
2.11.1. Difüzyon testleri	20
2.11.2. Dilüsyon testleri	20
2.12. Antibiyotik Kombinasyon Testleri.....	21
2.12.1. Dilüsyon yöntemleri	22
2.13. <i>Galleria Mellonella</i> Enfeksiyon Modeli.....	24
3. MATERYAL METOD	26
3.1. Bakteri Seçimi ve Analizi.....	26
3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	26

3.3. In Vitro Testler.....	28
3.3.1. Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması.....	28
3.3.2. Mikrodilüsyon “Checkerboard” dama tahtası yöntemi	28
3.3.3. Zamana Bağlı Kinetik Öldürme- Yöntemi (Time Kill).....	31
3.4. İn Vivo Testler	34
3.4.1. Aşılama Testi	34
3.4.2. G. mellonella in vivo toksisite testi	34
3.4.3. Tedavi Testleri.....	34
4. BULGULAR	36
4.1. <i>İn vitro</i> Bulgular	36
4.1.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Saptanmasına Ait Bulgular	36
4.1.2. Checkerboard Sonuçları.....	37
4.1.3. Zamana bağlı kinetik öldürme bulguları	38
4.2. <i>İn Vivo</i> Bulgular	41
4.2.1. Aşılama Bulguları.....	41
4.2.2. Toksikite bulguları	41
4.2.3. Tedavi bulguları	41
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ	50
7. KAYNAKLAR.....	51
8. EKLER	67
Ek 1: Etik Kurul İzni.....	67
9. ÖZGEÇMİŞ.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
AbaR	: Direniş adası
Bap	: Biyofilmle ilişkili protein
CAESAR	: Orta Asya ve Doęu Avrupa AMD Sürveyans Ağı
CB	: Checkerboard (Dama tahtası)
CBA	: Kolistin baz aktivitesi
CFU	: Colony-forming unit (koloni oluşturan birim)
CLSI	: (Clinical and Laboratory Standards Institute) Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
EARS Net	: Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı
ESKAPE	: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve <i>Enterobacter</i> türleri içeren patojen bakteri
EUCAST	: (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
FİK	: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon
GSBL	: Geniş spektrumlu beta laktamaz
IRAB	: İmipenem dirençli <i>A. baumannii</i>
Kg	: Kilogram
Log	: Logaritma
LPS	: Lipopolisakkarit
MATE	: Çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon ailesi
MBC	: Minimum bakterisidal yoğunluk
MDR	: (Multi drug resistance) Çoklu İlaç Direnci
MFS	: Ana kolaylaştırıcı üst ailesi
mg	: Miligram
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
PB2	: Bağlayıcı protein 2
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PDR	: (Pan drug resistance) Tüm ilaca direnç

RND	: Direnç-nodülasyon-hücre bölünmesi ailesi
SMR	: Küçük çoklu ilaç direnci ailesi
Tn	: Transpozon
VAP	: Ventilatöre Bağlı Pnömoni
XDR	: (extensive drug resistance) Yaygın olarak ilaca dirençli
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1: <i>Galleria mellonella</i> enfeksiyon modeli işlem basamakları.....	25
2: Kolistin (CO)+Sulbaktam(SUL) checkerboard dilüsyon şeması	30
3: Kolistin(CO)+Meropenem(MEM) checkerboard dilüsyon şeması	31
4: Time-kill testi için antibiyotik konsantrasyonu dilüsyonu.....	32
5: Time-kill testi için bakteri koloni sayımı için seyreltme ve ekim	33
6: <i>Galleria mellonella</i> tedavi testi şematığı	35
7: Time-kill duyarlı izolat grafiği	39
8: Time-kill standart suş grafiği.....	39
9: Time-kill PDR izolat grafiği.....	40
10: Time-kill MDR izolat grafiği	40
11: Tedavi sonrası sağkalım oranları	42

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1: ' <i>A.baumannii</i> 'de Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları.....	7
2: ' <i>Acinetobacter baumannii</i> enfeksiyonlarında araştırılmış olan kolistin, meropenem veya sulbaktam kombine tedavi seçenekleri'	16
3: <i>Acinetobacter</i> türlerinin tedavisinde kullanılan antimikrobiyaller.	27
4: <i>Acinetobakter spp.</i> için baz alınan MİK sınır değerleri.	29
5: Kolistin, Sulbaktam, Meropenem MİK değerleri.....	36
6: Antibiyotik kombinasyon sinerji test sonucu	37
7: Antibiyotik kombinasyonlarının çalışılan toplam 11 bakteri suşu üzerinde etkinlik oranları.	38
8: Time-kill sinerji tablosu	38
9: <i>Galleria mellonella</i> larvalarının bakteri enfekte sonrası yüzdeleri	41

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Acinetobacter baumannii günümüzde özellikle hastane enfeksiyonu etkeni olarak sorunlara yol açan önemli bir patojendir (1). *Acinetobacter baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonlar, çoklu antimikrobiyal direnç gösterebilme yeteneğine bağlı olarak sıklıkla sınırlı antibiyotik tedavi seçeneklerine yol açmakta, morbidite ve mortalitede artışa neden olmaktadır (2).

Duyarlı *Acinetobacter* izolatları genellikle β -laktamlar, üçüncü kuşak sefalosporinler, β -laktam- β -laktamaz kombinasyonları veya karbapenemler ile tedavi edilmektedir. Bu ajanlar çoğunlukla bir aminoglikozit ile kombine edilmektedir. Nozokomiyal *A. baumannii* izolatları ise genellikle antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençlidir. Dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla karbapenemler kullanılmaktadır. Direnç sorunu klinisyenler için çeşitli çözüm arayışına neden olmuştur. Bir çok çalışmada klinik izolatlarda gittikçe daha yüksek oranda karbapeneme dirençli *A.baumannii* bildirilmesi, diğer antimikrobiyal ya da kombinasyon terapilerine acilen ihtiyaç duyulduğunu vurgulamaktadır (3-6). Sulbaktam, *A. baumannii*'ye karşı etkinliği kanıtlanmış bir β -laktam inhibitörüdür, ancak artan direnç monoterapi olarak kullanımını sınırlamıştır (7). Pan dirençli suşları tedavisinde kullanılan seçenekler arasında kolistin ve tigesiklin bulunmaktadır. Ancak kolistinin, öngörülemeyen ve suboptimal farmakokinetiği yanısıra nefro/nörotoksisite riski ve kolistin direncinin gelişmesi gibi nedenlerle uygun dozda ya da tek başına kullanımı ile ilgili endişeler duyulmaktadır(8, 9). Klinikte çoğunlukla etken maddelerden biri kolistin olmak üzere, çeşitli kombinasyonlarla ilgili çalışmalar yürütülmektedir.

Galleria mellonella balmumu güvesi larvaları, mikroorganizmaların neden oldukları enfeksiyonların patogenezinin ve mikroorganizma virulans faktörlerinin araştırılmasında tercih edilen, ilaç kombinasyonlarının in vivo etkinliğinin hızlı bir şekilde belirlenebildiği bir deneysel modeldir (10).

Sonuç olarak MDR izolatlar yanında kolistin de dahil olmak üzere mevcut tüm antibiyotiklere dirençli olan PDR *A.baumannii* izolatlarının ortaya çıkmaya başlaması, yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır (11). Kolistin-sulbaktam ya da kolistin-meropenem gibi muhtemel etkili bir tedavi

kombinasyonunun geliştirilmesi, dirençli enfeksiyonların tedavisinde kritik öneme sahip olabilir.

Bu çalışmada büyük bal mumu güvesi *Galleria mellonella* deneysel model olarak kullanılarak sulbaktam/kolistin ve meropenem/kolistin kombinasyon tedavilerinin *in vitro* ve *in vivo* etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter Baumannii*'nin Mikrobiyolojik Özellikleri

Acinetobacter cinsleri 35-37 °C'de koyun kanlı agar gibi rutin katı ortamlarda üremeyi seven zorunlu aerob, gram negatif bakterilerdir. Koloniler 1 ila 2 µm, yuvarlak, mukoid ve pigmentsizdir. Nonfermentatif, katalaz pozitif, oksidaz, indol ve DNAaz negatiftirler, Flajella yoktur, fimbria vardır ve hareketsiz, kokobasiller olarak tanımlanabilirler.

Acinetobacter, hızlı büyüme sırasında tipik olarak basil şeklindedir, ancak durgun faz sırasında kokobasiller şeklinde görülürler. Kristal viyolenin değişik alımı mikroorganizmanın bazen yanlış gram pozitif kok olarak sınıflandırılmasına sebep olur (12, 13).

Fenotip esas alınarak cins içindeki türlerin ayırt edilmesi zor olduğundan, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında cins genellikle “komplekslere” ayrılır. *A.baumannii-A.calcoaceticus* kompleksi kullanımı klinik olarak en uygun olanıdır. DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına dayanarak yaklaşık 25 farklı "genomik tür" tanımlanmıştır. *A. baumannii* 2 numaralı genomik türdür (14). *Acinetobacter* türlerini ayırabilmek için uygulaması zor, süresi uzun olan farklı karbon kaynaklarının asimilasyonu, üreme derecesi, hemoliz oluşumu, glikoz oksidasyonu ile fenotipik özelliklerinden yararlanır. Bu özelliklerden yararlanarak 44°C’de üreme göstermesi, glikozun oksitlenmesi ve hemoliz yapmaması ile *A.baumannii* diğerlerinden ayırt edilir (15) .

2.2. *Acinetobacter Baumannii*'nin Tarihçesi ve Epidemiyolojisi

Acinetobakterler yaklaşık 100 yıl önce keşfedilmesinden bu yana “Micrococcus” (küçük), “anitrat” (nitrat azaltıcı olmayan) ve “Acinetobacter” (hareketsiz) gibi çeşitli isimlerle anılmıştır. *Acinetobacter spp.* yıllar boyunca birçok taksonomik değişim geçirmiştir. İlk kez 1970 lerde *A. baumannii* olarak sınıflandırılan mikroorganizma enfeksiyonlarının önemli bir sorun olduğu anlaşılmıştır (13) . O zamandan beri *A.baumannii*'nin hastane ortamında önemi giderek artmıştır. Bu artışın hastanelerdeki hasta popülasyonları 1970'lerin başından beri değiştiği ve hastanelerde bulunan hastaların *A.baumannii*'ye karşı daha

savunmasız oldukları ayrıca enfeksiyonlarda yüksek düzeyde seçici antibiyotiklerin kullanımını ve tıptaki ilerlemelerle ilgili olabileceği vurgulanmaktadır (16).

Acinetobacter cinsinin topraktan, sudan ve hayvanlardan sıkça izole edilen diğer türlerinin aksine, *A.baumannii* neredeyse sadece hastane ortamında, özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) bulunur (17), tüm gram negatif hastane enfeksiyonlarının % 2-10'undan sorumlu fırsatçı patojendir (18).

Acinetobacter baumannii, Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği tarafından dünyadaki hastanelerde en önemli altı çok ilaca dirençli (“Multi drug resistance”-MDR) mikroorganizmadan biri olarak sınıflandırılmıştır (19). Florokinolonlar, aminoglikozitler ve karbapenemlere karşı birleşik dirençli *Acinetobacter* türleri çok ilaca dirençli olarak kabul edilmektedir.

Son yıllarda, birçok çalışmada *A. baumannii* enfeksiyonlarının risk faktörlerini bildirmiş ve özellikle çok ilaca dirençli suşların neden olduğu hastalara odaklanmıştır. Çoklu ilaç dirençli *A.baumannii* oluşumu, çevresel kirlenme ve geçici sağlık hizmeti sağlayıcıları ile temas gibi birçok faktörle ilişkilidir (20).

İmipenem dirençli *A. baumannii* (IRAB)' nin edinilmesinde bağımsız risk faktörleri arasında önceden alınmış olan antibiyotik tedavisi, idrar sondası, cerrahi işlemler (21), önceki YBÜ kalış süreleri imipenem veya üçüncü kuşak sefalosporinler olarak sıralanabilir (22). Daha önce imipenem duyarlı MDR *A. baumannii* ile enfekte olmuş hastalarda imipenem dirençli MDR *A. baumannii* ortaya çıkması için en önemli bağımsız risk faktörü imipenem veya meropenem maruziyetidir (22).

Yaygın olarak ilaca dirençli *A. baumannii* (XDR) enfeksiyonları için, daha önce imipenem, meropenem, piperasilin/tazobaktam ve/veya dördüncü kuşak sefalosporin kullanımının 30 günden fazla yatış olan hastalarda bağımsız risk faktörleri olduğu bulunmuştur (23).

Sistemik bir incelemede *A. baumannii*'nin yayılmasının en önemli nedeni enfeksiyon kontrol kılavuzlarının uygulanmasındaki geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımındaki eksiklikler ve çok sayıda değişkenle ilgili olduğu sonucu ortaya çıkmıştır (24).

2.3. *Acinetobacter Baumannii* Virülans Faktörleri

A. baumannii daha önceleri düşük dereceli bir patojen olarak görülürken zamanla patojenitesini ve virülans faktörlerini artırmıştır. Genomik ve fenotipik analizler, hemolitik, fosfolipaz, proteaz ve demir kazanım mekanizmaları, da dahil olmak üzere biyofilm oluşumu, yüzey hareketi ve stres direnci ile hücre dışı bileşenler gibi birçok virülans faktörünün tanımlanmasına yol açmıştır (25). *A. baumannii*'nin tıbbi cihazlar ve konak dokular da dahil olmak üzere abiyotik ve biyotik yüzeylere bağlanması biyofilm oluşumunu kolaylaştırır (26). Biyofilm başlatılması ve olgunlaşması pilus düzeneği ve iki bileşenli sistem BfmRS tarafından düzenlenen biyofilmle ilişkili proteinin (Bap) üretimi ile ilgilidir (27). Bap proteini, insan epitel hücrelerine yapışmasında rol oynar (28) ve bu proteinin inhibisyonu *A.baumannii* enfeksiyonunu önleyebilir (29).

Bakterilerin çoğalmaları sırasında gereksinim duydukları demiri konak ile yarışarak sağlayabilmesi, enfeksiyonun devamı açısından oldukça önemlidir. *A. baumannii*, yalnızca demir alımına bağlı genlerin çoğunda değil, aynı zamanda motiliteye dahil olan genlerde de transkripsiyonel değişikliklere uğramaktadır (30). *A. baumannii*, çeşitli dokuların kolonizasyonu için gerekli olan metal homeostatik sistemleri ile iyi bir şekilde donatılmıştır (31). Genom araştırmaları, klinik *A. baumannii* izolatlarında endojen sideroforların geniş dağılımlarını ve patojenik yeteneklerdeki rollerini ortaya çıkarmıştır (25).

A.baumannii, insan bronş epitel hücrelerine yapışır ve yaygın Avrupa klonu II, bu hücrelere yapışmak için nispeten yüksek bir kapasiteye sahiptir (32). Ek olarak, K1 kapsüler polisakkaritinin *A.baumannii*'nin makrofajlar tarafından fagosite edilmesini önlediği, insan asit sıvısını ve serumundaki büyümesini optimize etmesi ve yumuşak doku enfeksiyonunun sıçan modelinde sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir (33). Ayrıca, birkaç protein, *A. baumannii*'de olası virülans faktörleri olarak gösterilmiştir. Omp38, konakçı hücrelerin apoptozisi uyarır (34), RecA proteininin yokluğu, hem ısı şokuna hem de kurumaya yanıt olarak sağkalımı azaltır (35). FosfolipazD' nin etkisizleştirilmesi *A.baumannii* patogenezi azaltır (36). Önemli olarak, *A. baumannii*'nin dış zar proteini(AbOmpA) A, mitokondriyal hedefleme yoluyla epitel hücrelerinin apoptozisi ile ilişkilendirilmiş en bol yüzey proteindir (37). AbOmpA ayrıca *A. baumannii*'deki spesifik olmayan ana kanaldır ve bu

organizmanın çok sayıda antibiyotiğe karşı yüksek direnç göstermesi için gerekli gibi görünmektedir (38) .

Acinetobacter sadece sınırlı sayıda virülans faktörüne sahip, fırsatçı patojen olarak kabul edilir. Hücre duvarı lipopolissakkarit içermesine rağmen, endotoksijenik hücre hasarı potansiyeli sınırlı gözükmemektedir (39). *A.baumannii*'nin mevcut tüm antibiyotik sınıflarına direnç geliştirmesi önemli bir yeteneğidir. Direncin yanı sıra, *A. baumannii* kuru koşullarda uzun süre hayatta kalabilmesi de hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (40).

2.4. *Acinetobacter baumannii* Antimikrobiyal Direnç.

Çok ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu için standart bir tanım yoktur, ancak genellikle tedavi için düşünülebilecek beş ilaç sınıfından en az üçüne (yani florokinolonlar, aminoglikozitler, sefalosporinler, karbapenemler ve ampisilin-sulbaktam) direnç gösterir. Pan direnç (PDR), tüm β -laktamlara, florokinolonlara ve aminoglikozitlere karşı direnç anlamına gelir ancak tanıma rağmen polimiksin ve tigesiklin hariç tutulmaktadır. Antibiyotik duyarlılık sınır değerlerini belirleyen başlıca kuruluşların (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST) *A. baumannii* enfeksiyonlarında kullanılan bazı temel antibiyotikler için farklı sınır değerleri vardır (41).

A. baumannii' nin antibiyotiklerden etkilenmemek için geliştirdiği birkaç mekanizma bulunmaktadır. Bunlar arasında akış pompaları, porinlerdeki mutasyonlar, antibiyotik hedeflerindeki mutasyonlar (örneğin, penisilin bağlayıcı proteinler, topoizomerazlar ve DNA giraz) ve antibiyotik değiştirici enzimler (beta-laktamazlar, karbapenemazlar ve aminoglikozit değiştirici maddeler) bulunur. *A. baumannii*, sefalosporinaz olan bir AmpC beta-laktamaz içerir. Diğer gram negatif organizmaların aksine, uyarılabilir AmpC ifadesi oluşmaz. Aksine, bir promoter yerleştirme sekansı (ISAba1) yerleştirildiğinde ve β -laktamazın üretimini tetiklediğinde gen aşırı eksprese edilir. Ve çoğu sefalosporin ile tedavi başarısızlığına neden olur (42). Efluks pompa proteinleri ile β -laktam antibiyotikleri periplazmik alanın dışına taşıyabilir ve porinlerin azaltılmış ifadesi antibiyotiklerin girmesini

engelleyebilir. Efluks pompaları ayrıca kinolonları, tetrasiklinleri, tigesiklin, trimetoprim ve bazı dezenfektanları da atmaktadır (43) .

En endişe verici gelişme karbapenem dirençli *A. baumannii*'nin yayılmasıdır. Bu direnç, çoğunlukla serin ve metallo-beta-laktamazları kodlayan mobil genetik elemanların edinilmesinden kaynaklanır. Son zamanlarda, *A. baumannii*'de bir transpozon bazlı ARMA (bir aminoglycoside resistance methylase) geni tanımlanmıştır. Bu gen, bir aminoglikozidin hedef bölgesine bağlanmasını önleyerek tüm aminoglikozitlere direnç oluşturmasını önleyen bir 16S rRNA metilazı kodlar (44). Fournier ve ark Fransa'da, çok sayıda ilaca dirençli *A. baumannii* izolatından AbaR1 direnç adası adı verilen 86 kb'lik bir bölge tanımlamışlardır. Ada, VEB-1, AmpC, OXA-10 beta laktamazlar, çeşitli aminoglikozid değiştirici enzimler ve akış pompaları için kodlama yapanlar dahil 45 direnç geninden oluşan bir küme içermektedir (45).

Tablo 1: '*A.baumannii*'de Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları (46)

<i>A. baumannii</i> 'de antimikrobiyal direnç mekanizmaları					
Antimikrobiyal	Direnç mekanizması	Sınıf/Aile	Protein	İle birlikte açıklanmıştır	Seçilmiş referans
β-laktamları	Kromozomal sefalosporinaz	C sınıfı	AmpC	IS	Hujer ve diğ. (2005)
	Karbapenem-D sınıf hidrolize β-laktamaz	D sınıfı	OXA-51 benzeri	IS	Turton ve diğ. (2006)
			OXA-23 benzeri	IS, Tn, AbaR	Corvec ve diğ. (2007), Adams ve ark. (2008)
			OKSA-24/40	XerC / XerD	Merino ve diğ. (2010)
			OXA-58 benzeri	IS, Tn	Poirel ve Nordmann (2006b)
			OXA -143		Higgins ve diğ. (2009)
	Metallo-β-laktamaz	B sınıfı	IMP	integron	Cornaglia ve diğ. (2011)
			VIM	integron	Cornaglia ve diğ. (2011)
			SİM-1	integron	Cornaglia ve diğ. (2011)
			NDM	IS, Tn	Espinal et al. (2011a), Pfeifer et al (2011)
	Düşük düzey β-laktamazlar	A sınıfı	TEM	AbaR	Adams et al. (2008), Shakil and Khan (2010)
			SHV		Naas ve diğ. (2007)
			SCO-1		Poirel ve diğ. (2007)
			CARB	IS, Tn, integron	Potron et al. (2009), Ramirez ve ark. (2010b)
			PER	IS, Tn, integron	Poirel et al (2005a), Bonnin et al (2011b)
			VEB	IS, integron, AbaR	Fournier et al (2006), Poirel et al. (2009)
			CTX-M	Tn	Potron ve diğ. (2011)
			GES	integron	Moubareck ve diğ. (2009)
			KPC		Robledo ve diğ. (2010)
		D sınıfı	OXA-2, 10, 20, 37	İntegron, AbaR	Navia ve diğ. (2002), Fournier ve ark. (2006), Adams ve ark. (2008)
	Azalan geçirgenlik		Caro	IS	Ravasi ve diğ. (2011)
			47 kDa OMP		Quale et al. (2003)
			44 kDa OMP		Quale et al. (2003)

Tablo 1: ‘A.baumannii’de Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları (46) Devamı

			37 kDa OMP 33–36 kDa OMP		Quale et al. (2003) del Mar Tomas et al. (2005)
			22–33 kDa OMP		Bou et al. (2000a)
			HMP-AB		Gribun et al. (2003)
			43 kDa OMP		Fernández-Cuenca et al. (2011)
	Efflux pompası	RND	AdeABC	IS AdeIJK	Magnet et al. (2001) Damier-Piolle et al. (2008)
	Modifiye penisilin bağlayıcı proteinler		PBP		Cayo et al. (2011)
Aminoglikozidler	Aminoglikozit değiştirici enzimler		Acetyltransferases	IS, Tn, Integron, AbaR	Cho et al. (2009)
			Nucleotidyltransferases		Cho et al. (2009)
			Phosphotransferases		Cho et al. (2009)
	Hedef bağlama site değişikliği		16S rRNA methylases	IS, Tn	Doi et al. (2007)
	Efflux	RND	AdeABC	IS	Magnet et al. (2001)
		MATE	AbeM		Su et al. (2005)
Kinolonlar	Hedef mutasyonları		GyrA/ParC		Hamouda and Amyes (2004)
	Efflux pompası	RND	AdeABC AdeIJK AdeFGH	IS	Magnet et al. (2001) Damier-Piolle et al. (2008) Coyne et al. (2010b)
		MATE	AbeM		Su et al. (2005)
		SMR	AbeS		Srinivasan et al. (2009a)
Kloromfenikol	Efflux pompası	RND	AdeABC AdeIJK AdeFGH	IS	Magnet et al. (2001) Damier-Piolle et al. (2008) Coyne et al. (2010b)
		MFS	CmlA	AbaR	Fournier et al. (2006) , Vila et al. (2007)
		MATE	CraA AbeM		Roca et al. (2009) Su et al. 2005
		SMR	AbeS		Srinivasan et al. (2009a)
Tetrasiklinler	Efflux pompası	MFS	TetA TetB TetM	IS, Tn, AbaR	Ribera et al. (2003a) , Fournier et al. (2006) Vila et al. (2007) Ribera et al. (2003b)
	Ribozomal korunma				
Tigesiklin	Efflux pompası	RND	AdeABC AdeIJK	IS	Magnet et al. (2001) Damier-Piolle et al. (2008)
Polimiksinler	Lipid modifikasyonu	A	PmrCAB		Arroyo et al. (2011) , Beceiro et al. (2011)
	Lipopolisakkarit kaybı		LpxABC	IS	Moffatt et al. (2011)
	porin kaybı				Fernández-Reyes et al. (2009)

IS: ‘insertion sequence’ elementleri, Tn: ‘transpozon’, RND: ‘resistance–nodulation– cell’ division ailesi, MFS: “major facilitator süper” ailesi, MATE: “Multidrug and toxic compound extrusion ” ailesi, SMR: “small multidrug resistance ” ailesi

2.5. Acinetobacter Baumannii Enfeksiyonlarının Kliniği

Acinetobacter baumannii suşları sıklıkla hastanede yatan hastaların solunum yolu ve idrar örneklerinden izole edilir. Aslında, *A.baumannii*'nin deri ve solunum yolunun normal florasında yer alabileceği bilinmektedir (47). Genellikle steril olan (kan ve beyin omurilik sıvısı) bir klinik örnekten *A.baumannii* izole edilmesi ilişkili enfeksiyon belirtileri ve klinik bulguların olması ile enfeksiyon tanımlanır. Bunun

aksine *A. baumannii*'nin bir hastada tipik olarak steril olmayan bir örnekten, klinik ve/veya biyolojik enfeksiyon bulgusu olmadan izolasyonu kolonizasyon olarak tanımlanır (48). *Acinetobacter baumannii*'nin hastane enfeksiyonları herhangi bir bölgeyi içerebilir ancak solunum yolu, idrar yolu ve yaralarda baskındır (49). Çoğu kurumda, *A.baumannii*, YBÜ'de, özellikle VAP'lı (ventilatörle ilişkili pnömoni) hastalarda, nozokomiyal pnömonide vakaların % 5 -10'unda etken olarak giderek artan daha önemli bir nedendir (12, 50, 51).

Özellikle, bu hastalarda üst solunum yolu kolonizasyonunu VAP'tan ayırmak genellikle zordur. *A.baumannii*'ye bağlı VAP kazanımı için kabul edilen başlıca risk faktörleri arasında uzun yatış süresi, mekanik ventilasyon ve daha önce antibiyotik kullanımı vardır (47, 49).

A. baumannii'ye bağlı nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının, tümünün %1,3' ünü (52), YBÜ'lerinde elde edilen kan dolaşımı enfeksiyonlarının %1,6'lık bir prevalansı ve %34 ile %43,4'lük bir kaba ölüm oranı (52) oluşturduğu bildirilmiştir.

A. baumannii kateter kullanımıyla ilişkili olarak idrar yolu (51), cerrahi alan enfeksiyonları ve nozokomiyal menenjit (12) enfeksiyonu nedenidir.

2.6. Acinetobacter Baumannii'nin Toplum Kökenli Enfeksiyonları

Bildirilen toplum kaynaklı enfeksiyonların çoğu akut pnömoni olup, kronik alkolizm, kanser, bronkopulmoner hastalık gibi risk faktörleri olan hastalardır (18). Tropik bölgelerde olduğu gibi Avrupa ve ABD'de de bildirilmiştir (12, 18). Hastalık genellikle %40-60 arasında olan yüksek mortalite oranı ve fulminan bir klinik seyir ile karakterizedir (12, 53).

Son olarak, *A baumannii*, nadir olarak deprem mağdurlarında ve Irak ve Afganistan savaşları sırasındaki askerlerde veya acil durumlarda cilt/yumuşak doku ve yara enfeksiyonlarından sorumlu bir patojen olarak ortaya çıkmıştır (12, 54-56). Fulminan toplum kökenli pnömoni ile karşılaştırıldığında, askerlerdeki yara enfeksiyonu patojenitesi düşük olarak gözükmetedir (54).

2.7. *Acinetobacter Baumannii* İlaç Direnci ve Tedavi Seçenekleri

Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları için tedavi seçenekleri *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi için aminoglikozidler, β -laktamlar ve tetrasiklinler de dahil olmak üzere birçok antibiyotik kullanılmıştır (57). Bugüne kadar karbapenemler, duyarlı suşlar için *A. baumannii*'nin tedavisinde tercih edilen ilaç olmuştur (12).

MDR olmayan *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi, genellikle piperasilin veya imipenem gibi bir β -laktam ile kombinasyon halinde aminoglikozidleri içerir.

Bununla birlikte, karbapenemler de dahil olmak üzere tüm antibiyotiklere dirençli *A. baumannii* suşlarının ortaya çıkması ve yüksek prevalansı, polimiksinlerin, özellikle kolistinin, gündeme gelmesine neden olmuştur (58).

Bununla birlikte, mevcut antibiyotikler arasında bir β -laktamaz inhibitörü olan sulbaktam, MDR *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi için potansiyele sahip olabilir (12).

İlginçtir ki, sulbaktamın tek başına MDR *A. baumannii* suşlarına karşı intrinsek aktiviteye sahip olduğu, ancak bileşiklerin β -laktamların aktivitesini arttırmadığı gösterilmiştir (59-61).

2.8. *Acinetobacter Baumannii*'nin Tedavisi

Antibiyotiğe duyarlı *Acinetobacter* izolatları genellikle β -laktamlarla, üçüncü kuşak sefalosporinlerle, β -laktam- β -laktamaz kombinasyonları veya karbapenemler (imipenem, meropenem) ile tedavi edilir. Bu ajanlar çoğunlukla bir aminoglikozit ile kombinasyon halinde kullanılır. Ancak nozokomiyal *A. baumannii* izolatları genellikle yukarıda bahsedilen antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençlidir. Karbapenemler dirençli *A. baumannii* tedavisinde sıklıkla birinci basamak ajan olarak kabul edilir. Bununla birlikte birçok ilaca dirençli izolat, sulbaktama duyarlı kalır. Sulbaktam penisilin bağlayıcı protein 2 (PB2)'ye bağlanarak *A. baumannii*'ye karşı kendine özgü bir bakterisidal aktiviteye sahiptir (62). Sulbaktam, karbapenem dirençli *A. baumannii*'ye karşı aktivitesini koruyabilir ve *Acinetobacter* spp ile ilişkili ventilatör ilişkili pnömoninin tedavisinde imipenem-cilastatin kadar etkili olduğu gösterilmiştir (63). Pan dirençli suşları tedavi etmek için diğer seçenekler arasında

kolistin ve tigesiklin bulunur. İlişkili nöro ve nefrotoksisiteler nedeniyle rutin kullanımdan düşmüş bir polimiksin olan intravenöz kolistin, rifampin ile kombine edildiğinde daha fazla aktiviteye sahiptir (64). Kolistin inhalasyon yolu ile VAPlarda kullanılır, ancak bronkospazm, nefes darlığı gibi toksit etkileri nedenleri ile tedavi sınırlı kalır. Yeni glisilsiklin antibiyotik tigesiklin çok ilaca dirençli *A. baumannii*'nin bazı suşlarına karşı *in vitro* aktivite gösterir; ancak, birkaç hafta içinde *in vivo* direncin gerçekleştiği bildirilmiştir (65).

2.9. *Acinetobacter Baumannii*'nin Tedavide Antibiyotik Kombinasyonu ve Sinerji

Antibiyotiklerin keşfinden bir zaman sonra meydana gelen direnç sorunu çözüm arayışına neden olmuştur. Antibiyotik çağının başlangıcında bile tek başına yeterli olmayan antibiyotiklerde kombinasyon yapılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Böylece dirençli bakteriler için tedavi olanağını doğurmuştur (66-68). Karbapenemler, *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi etmek için etkili antimikrobiyal ajanlar olarak kabul edilmiştir (69, 70). Bir çok çalışmada klinik izolatlarda gittikçe artan ve yüksek oranda karbapeneme dirençli *A. baumannii* bildirilmesi, diğer antibiyotik sınıflarına veya kombinasyon terapilerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır (3-6). Polimiksin de dahil olmak üzere mevcut tüm antibiyotiklere dirençli olan PDR *A. baumannii* 'in ortaya çıkması, tedavi seçeneklerini araştırmak için daha fazla çaba harcanması gerektiği anlamına gelmektedir (11). İmipenem/sulbaktam, kolistin/rifampisin, kolistin/sulbaktam, kolistin/tigesiklin, kolistin/imipenem veya meropenem ve kolistin/teikoplanin ile kombinasyon tedavileri olası seçenekler olarak araştırılmış ve önerilmiştir (71).

Kolistin, dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının kilit bir ilacı olmasına rağmen, öngörülemeyen ve suboptimal farmakokinetiği, yanısıra nefro ve nörotoksisitesi ve kolistin direncinin gelişmesi gibi nedenlerle kullanımı ile ilgili endişeler duyulmaktadır (8, 9). Sulbaktam tedavisi ile ilgili olarak ise optimal doz bilinmemektedir ve *in vitro* etkinliğin beklenen klinik sonuçları sağlayamaması ile ilgili endişeler vardır (72). Bu endişeler göz önüne alınarak, çoğunlukla etken maddelerden biri kolistin olmak üzere, çeşitli kombinasyonlarla ilgili çalışmalar araştırılmaktadır.

Türkiye’deki 27 hastanede ortaklaşa yapılan detaylı retrospektif bir çalışmada XDR *A. baumannii* kan dolaşımı enfeksiyonu olan hastaların klinik sonuçları araştırılmıştır (73). Kolistine duyarlı olan tüm hastalara standart dozda 5 mg CBA/kg/gün kolistin uygulanmıştır. Hastane içi mortalite oranının kombinasyon grubu monoterapi grubuna göre anlamlı derecede düşük kalmıştır. Mikrobiyolojik eradikasyon oranının kombinasyon grubunda monoterapi grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (74).

Başka bir çalışmada solid organ transplantasyonu yapılmış ve çoğu ventilatörle ilişkili pnömoni olmakla beraber XDR *A. baumannii* enfeksiyonu gelişmiş hastaların yer aldığı, karbapenem ve kolistin kombinasyon tedavisi, bağımsız bir sağkalım prediktörü bulunmuştur. Herhangi bir monoterapi almış hastalardan hiçbiri sağ kalmamıştır. Bu çalışmada kolistin monoterapi ajanı olarak kullanılmamıştır (75). Tek merkezli bir çalışmada kolistin alan tüm klinik hastaların iyileşmeye ve kötüleşme açısından değerlendirildiği, *A. baumannii* enfeksiyonu için iyileşme oranı kolistin monoterapisi alan hastalarda %87 iken kolistin ve meropenem kombinasyonu alan hastalarda %84 bulunmuştur. Kolistin ve piperasilin-tazobactam alanlarda %68, kolistin ve sulbaktam tedavisi görenlerde ise %73 olarak bulunmuştur. Yine, bu çalışmada düşük doz kolistin, yüksek doza kıyasla kötü sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (76). Dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında monoterapinin yetersizliği, yüksek etkinliğe sahip ilaçların olmaması veya ilaçların yeterli düzey konsantrasyonlarının bulunmaması nedenindedir. Örneğin Sinerji olasılığı, glikopeptidlerle, varsayımı zayıf hale getirmektedir. Ayrıca, kolistin ve tigesiklin tedavisi sırasında direnç gelişimiyle ilgili kaygılar farmakokinetik zorlukları olan ilaçların kombinasyon tedavisiyle desteklemektedir. Bu endişeler, bir proilaç olarak uygulanan kolistinin benzersiz farmakokinetik özellikleri ile birlikte, invaziv XDR *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kombinasyon tedavilerinin kullanımını desteklemektedir(74).

2.10. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Kombine Antibiyotik Kullanımı

2.10.1. Sulbaktam

Dirençli bakteriler için beta laktamaz üretimi olan antibiyotikler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sulbaktam dahil β -Laktamaz inhibitörleri, moleküler olarak

β -Laktam antibiyotiklere benzediğinden β -laktam enzimleri ile dönüşümsüz bağlanır, mikroorganizmanın birlikte uygulanan β -laktam antibiyotiklere duyarlılığı artar. Çoğu β -Laktamaz inhibitörleri tek başına verilirse antimikrobiyal aktivite gösteremezler (77). Bununla birlikte sulbaktamın penisilin bağlayıcı proteine bağlanmasına aracılık ettiği düşünülen *A.baumannii* antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Sulbaktam β -laktamazı inhibe etmek için β -laktam antibiyotiklerle birlikte verilmektedir (78) .

Sulbaktam dahil β -Laktamaz inhibitörleri yalnızca Ambler sınıf-A beta-laktamazlardan olan penisilinaz, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'e karşı etkili olmasına rağmen sınıf-C beta-laktamazlara (ampC sefalosporinazlar), sınıf-D beta-laktamazlara (OXA beta-laktamazlar) ve sınıf-B metallo beta-laktamazlara (VIM, IMP beta-laktamazlar) karşı etkisizdir. Bu nedenle mutant olan sınıf-A beta-laktamazların hidrolize ettiği antibiyotiklerle kombine edilerek, bu antibiyotiklerin bakteriyel beta-laktamazlarca hidrolize edilmesini önler (79).

Beta-laktamaz aktivitesi güçlü olmasına rağmen, antibakteriyel etkisi zayıftır. *Acinetobacter*, *Bacteroides* ve *Neisseria* türlerine karşı doğal antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (80, 86).

Sulbaktam *Acinetobacter* türlerinin nötropenik farelerde sebep olduğu sistemik enfeksiyonların ve pnömoninin tedavisinde in-vivo aktivite gösterir (81). Bu konuda Corbella ve ark (82) tarafından yapılan ve 42 hastayı kapsayan klinik bir araştırmada sulbaktamın çoklu direnç olmayan *A. baumannii*'ye bağlı gelişen ve hayati tehlike oluşturmayan enfeksiyonların tedavisinde iyi bir alternatif olduğunu ortaya koymuştur.

A. baumannii enfeksiyonunun tedavisi için sulbaktam bazlı tedavilerin etkinliği konusunda çok sayıda klinik çalışma bildirilmiştir (78, 83). Örneğin, Kempf ve ark. kolistin ile kombinasyon halinde verilen sulbaktamın, kolistin monoterapisine göre önemli bir fayda sağlayabileceğini bildirmiştir. (84). Son zamanlarda, yüksek doz sulbaktam/ampisilin, *A. baumannii*'nin neden olduğu bir ameliyat sonrası menenjit vakasını başarılı bir şekilde tedavi etmek için rifampisin ve fosfomisin ile birlikte kullanılmıştır (85). Yakın tarihli bir başka raporda, ilaca dirençli *A. baumannii* kaynaklı peritonitli bir hasta, polimiksin B ile kombinasyon halinde

sulbaktam/ampisilin ile başarıyla tedavi edilmiştir. In vitro çalışmalar, minosiklin, sefoperazon ve fosfomisin gibi çeşitli antibiyotiklerle kombinasyon halinde sulbaktamın etkinliğini de göstermiştir (86, 87).

Her ne kadar eldeki kanıtlar sulbaktam bazlı tedavilerin *A. baumannii* enfeksiyonunun tedavisi için etkili olabileceğini gösterse de, bu konuda randomize kontrollü çalışmalar konusunda belirgin bir eksiklik vardır (88).

2.10.2. Meropenem

Meropenem, bakteri hücre duvarındaki penisilin bağlayıcı proteinleri (PBP'ler) inhibe etmesi sonucunda hücre ölümüne yol açan hücre duvarı sentezi ile bağlantılı peptidoglikan çapraz bağlanmasını önleyerek bakterisit etkisini gösterir (89, 90). Genel olarak, gram-pozitif bakterilerde az etkili, gram-negatif basillere ise son derece etkilidir (91).

Genellikle güvenli ve iyi tolere edilen meropenem, imipenemden daha düşük genel yan etki oranı ile ilişkilidir (92). Yüksek dozlarda nöbet riski daha düşüktür ve gastrointestinal etkileri doza bağımlı değildir (93). Meropenem, çoğunlukla gram pozitif, negatif aerob ve anaerob bakteriyi kapsayan geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir (94).

Meropenem, penisilinazlar ve sefalosporinazlarda Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen çoğu beta-laktamaza karşı dirençlidir (89).

Karbapenem direncinin araştırıldığı mekanizmalara bakıldığında, imipenem için porin kanallarını azaltan tek bir mutasyonun (yani OprD mutantlarının) direnç gelişimi için yeterli olduğu, imipenem'in aksine meropenem içinse iki bağımsız mutasyon gerektiği ortaya konulmuştur. Bunlar;

1-porin kanallarını azaltan OprD mutasyonu

2-MexA-MexB-OprM'nin (mexR lokusundaki nalB mutasyonu) aracılık ettiği hücresel eflüksu artırıcı mutasyondur (95, 96).

Sonuç olarak, in vitro meropeneme direnç seçim oranı, imipeneminkinden düşüktür (97). Bununla birlikte, meropeneme direnç oluştuğunda, çoğu β -laktam,

florokinolon, tetrasiklin ve kloramfenikole karşı direnç de sağlamaktadır (96). Son 10 yıldaki klinik kullanımda meropenem karşı genel direnç prevalansı, imipeneminkinden daha düşük kalmıştır (98, 99, 100).

Birlikte kullanılan meropenem ve probenesid uygulamasının, meropenemin plazma yarı ömründe %33 oranında artışa neden olduğu, ancak üriner iyileşme oranını etkilemediği (101), meropenem'in hem hayvanlarda hem de insanlarda valproik asidin plazma konsantrasyonlarını azalttığı bildirilmiştir (94, 102).

Wilson tarafından yapılan randomize, çift-kör, çok merkezli bir klinik çalışma meropenemi (her 8 saatte bir 1 g), klindamisin (her 8 saatte bir 900 mg) ve tobramisin (üç doza bölünmüş 5 mg/kg/gün) kombinasyonu ile karşılaştırmıştır. Karın içi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanmıştır. Protokol kriterlerine göre etkinlik değerlendirmesinde tüm kriterleri karşılayan 191 hasta ile toplam 427 hasta iki tedavi grubuna randomize edilmiştir. Sonuçlar, meropenem ile tedavi edilen hastaların % 92'sinin klindamisin ve tobramisin ile tedavi edilen hastaların % 86'sına kıyasla iyileştirildiğini göstermiştir. Her iki tedavi grubunda da benzer sıklıkta advers olaylar meydana gelmiştir (103). Fabian ve ark karmaşık cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile hastanede yatan hastaların tedavisinde çok merkezli, randomize, çift kör, meropenem ve imipenem/cilastatin'i karşılaştıran bir çalışma yapılmıştır. Klinik tedavi değerlendirmesinde tedavi oranları meropenem grubunda %86,2 imipenem/cilastatin grubunda %82,9 şeklinde yaklaşık oranlarda bulunmuştur (104).

2.10.3. Kolistin

Kolistin, ciddi toksisite nedeniyle 1970'lerin başında kullanımı azaltılan polimiksin ailesinden katyonik bir polipeptit antibiyotiktir (105). Son yıllarda kolistin, *Acinetobacter baumannii* de dahil olmak üzere çoklu ilaca dirençli (MDR) gram negatif enfeksiyonların tedavisinde son basamak tedavi olarak tekrar kullanıma girmiştir (106).

Kolistin, gram-negatif organizmaların dış zarının geçirgenlik bariyerinin bozulmasıyla etkisini gösterir. İlacın hücre içine girmesiyle bileşenlerin sızması ve sitoplazmik membran bütünlüğünün bozulması sonucunda hücrenin ölümüne sebep olur. Kolistin, yaygın olarak ortaya çıkan gram negatif klinik izolatların çoğunu içeren ancak gram pozitif veya anaerobik organizmalara karşı klinik bir aktivite

içermeyen dar bir aktivite spektrumu sergiler. Özellikle, *Acinetobacter* çoğu *Enterobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* ve *Escherichia coli* türlerine karşı güçlü bir aktiviteye sahiptir. Buna karşılık, kolistin *Providencia*, *Burkholderia*, *Proteus*, *Serratia* veya *Stenotrophomonas maltophilia* türlerine karşı kendine özgü bir aktivitesi yoktur (107), (108).

Daha önce tarif edildiği gibi, kolistin, dış zarı doğrudan bozar ve bu nedenle hücreye kendi alımını arttırır. Bununla birlikte, artan konsantrasyonlarda kolistin varlığında organizmanın sürekli maruz bırakılmasıyla direnç, *in vitro* olarak indüklenebilir. Bu direncin PmrA geni tarafından indüklendiği tahmin edilmektedir (109). Kolistin, XDR *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kilit bir ilaç olmasına rağmen, tedavi sırasında kolistin direncinin geliştiği gösterilmiştir (110, 111).

Tablo 2: ‘*Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarında araştırılmış olan kolistin, meropenem veya sulbaktam kombine tedavi seçenekleri’ (112)

İlaçlar	Araştırma türü	A. baumannii türü	Bulgular	Referanslar
Karbapenem ampisilin sulbaktam	+ In vivo	Karbapenem dirençli	Ampisilin-sulbaktam ve meropenem ile kombinasyon tedavisi cilt ve yumuşak doku enfeksiyonuna karşı etkilidir	Hiraki et al. 2013
	In vivo	İlaça dirençli	Bir karbapenem ve ampisilin / sulbaktamın kombinasyonu, bir karbapenem ve amikasin veya tek başına monoterapi karbapenem kombinasyonundan daha iyi sonuçla ilişkilendirildi.	Kuo et al. 2007
Karbapenem minosiklin	+ Laboratuvar ortamında	İlaça dirençli	Rifampisin, imipenem ve kolistin ile kombinasyon halinde minosiklin, <i>tetB</i> genini barındırmayan izolatların çoğunda bakterisit sinerji gösterdi, kombinasyonlar <i>tetB</i> - pozitif izolatlarda sinerjistik etki yoktu	Rodriguez et al., 2015
Karbapenem tigesiklin kolistin	+ Vaka raporu	MDR, duyarlı	Bakteremili bir hasta, bir meropenem/kolistin/tigesiklin kombinasyon tedavisi ile olumlu bir klinik sonuç bulundu	Candel et al. 2010
Karbapenem kolistin	+ <i>In vitro</i> / vaka raporu	XDR, duyarlı	Etkili; Hastaların% 80'i başarıyla tedavi edildi	Özbek ve Sentürk, 2010
	Laboratuvar ortamında	MDR, duyarlı	Imipenem/kolistin en iyi sinerji etkilerini gösterdi	Pongpech et al. 2010
	<i>In vitro</i> / vaka raporu	MDR, duyarlı	Meropenem/kolistin 24 saatte bakteri üremesini engelleyebilir	Lee CH et al. 2008
	Laboratuvar ortamında	Kolistin ve kolistin dirençli	Hafifletici meropenem/kolistin, 24 saatte 52 suşun 49'una karşı sinerji gösterdi	Pankuch et al. 2008
	Laboratuvar ortamında	XDR, duyarlı	Kolistin/rifampisin, kolistin/meropenem, kolistin/minosiklin ve minosiklin/meropenem kombinasyonları sinerjistikdir	Liang et al. 2011
	Retrospektif bir çalışma	XDR, duyarlı	Kolistin/karbapenem ve kolistin/sulbaktam, kan dolaşımı enfeksiyonlarında hastalara kolistin monoterapisine kıyasla daha yüksek mikrobiyolojik eradikasyon oranları, daha yüksek kür ve 14 günlük hayatta kalma oranları ile sonuçlanmıştır.	Batirel et al. 2014
	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı	12 izolatın hepsine karşı sinerjik etki gösterdi	Liu X. et al. 2016

Tablo 2: ‘Acinetobacter baumannii enfeksiyonlarında araştırılmış olan kolistin, meropenem veya sulbaktam kombine tedavi seçenekleri’ (112) (devamı)

	In vivo	XDR, kolistin duyarlı ve kolistin dirençli	kolistin ve kolistin dirençli	Kolistin/fusidik asit ve kolistin/rifampisin bir fare uyluk enfeksiyonu modelinde sinerjistikti; Kolistin-meropenem kombinasyonu, kolistin MİK değeri ≤ 32 mg / L olduğunda da etkili olmuştur.	Fan et al, 2016
	Laboratuvar ortamında	XDR		Daptomisin-kolistin kombinasyonu kolistin / imipenem kombinasyonuna göre daha etkiliydi	Cordoba et al, 2015
Karbapenem kolistin rifampisin	+ +	Vaka raporu	MDR, kolistin duyarlı	Multifokal enfeksiyon olgusunda meropenem/kolistin/rifampisin kombinasyon tedavisi başarılı	Biancofiore et al, 2007
Karbapenem plazomicin	+	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli	Sinerjik aktivite	Garcia-Salguero et al, 2015
Imipenem polimiksin B	+	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli	Doripenem, meropenem veya imipenem, polimiksin B ile kombinasyon halinde benzer farmakodinamik gösterdi	Lenhard et al, 2016b
Meropenem polimiksin B	+	Laboratuvar ortamında	İlaça dirençli	Polimiksin B/meropenem -polimiksin B/meropenem/fosfomisin kombinasyonları yüksek sinerjik aktivite göstermiştir	Menegucci et al, 2016
		İn vitro / in vivo	Karbapenem dirençli	Meropenem MIC ne olursa olsun polimiksin B ile kombinasyon halinde yoğunlaştırılmış meropenem dozu sinerjik olarak karbapenem dirençli suşları bakterisid etki göstermiştir	Lenhard et al, 2016a
		Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli	Doripenem, meropenem veya imipenem, polimiksin B ile kombinasyon halinde benzer farmakodinamik gösterdi	Lenhard et al, 2016b
Doripenem kolistin	+	Laboratuvar ortamında	MDR, doripenem dirençli	Sinerjik aktivite	Principe et al, 2013
Doripenem polimiksin B	+	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dayanıklı	Doripenem, meropenem veya imipenem, polimiksin B ile kombinasyon halinde benzer farmakodinamik gösterdi	Lenhard et al, 2016b
		Laboratuvar ortamında	Polymyxin-heteroresistant	Polimiksin B/doripenem kombinasyonu, 10 gün boyunca sürdürülen 24 saat içinde hızlı ve kapsamlı ilk öldürmeye neden oldu.	Rao et al, 2016a
Ampisilin sulbaktam	+	İn vitro / in vivo	MDR	Ampicillin / sulbactam tedavisi, kan dolaşımı enfeksiyonu olan hastalarda ölüm riskini önemli ölçüde azalttı	Smolyakov et al, 2003
Sulbaktam kolistin	+	Retrospektif bir çalışma	XDR, kolistin duyarlı	Kolistin/karbapenem ve kolistin/sulbaktam, kan dolaşımı enfeksiyonu olan hastalarda kolistin monoterapisine kıyasla daha yüksek mikrobiyolojik eradikasyon oranları ve daha yüksek kür ve hastanede 14 günlük hayatta kalma oranları ve mortalite ile sonuçlanmıştır.	Batirel et al, 2014
		Retrospektif bir çalışma	İlaça dirençli	Ventilatöre bağlı pnömonili hastalarda kolistin/sulbaktam kombinasyon tedavisi umut vericidir	Kalin et al, 2014
Tazobaktam kolistin	+	In vivo	Kolistin-duyarlı	Tazobaktam ve kolistin sinerji gösterdi	Sakoulas et al, 2016
Minosiklin kolistin	+	Laboratuvar ortamında	XDR	Kolistin/rifampisin, kolistin/minosiklin ve kolistin/meropenem, kolistin/meropenem ve minosiklin/meropenem kombinasyonları sinerjistikdir	Liang et al, 2011
		İn vitro / in vivo	Minosiklin dayanıklı	Minosiklin/kolistin sinerjik olarak minosikline dirençli izolatları bakterisid etki; Minosiklin/kolistin ayrıca farelerin sağkalımını önemli ölçüde geliştirdi ve farelerin akciğerlerinde bulunan bakteri sayısını azalttı	Yang et al, 2016
		Laboratuvar ortamında	İlaça dirençli	Rifampisin, imipenem ve kolistin ile kombinasyon halinde olan <i>minosiklin</i> , <i>tetB</i> genini barındırmayan izolatların çoğunda bakterisit sinerji gösterdi, ancak kombinasyonlar <i>tetB</i> - pozitif izolatlarda sinerjik değildi	Rodriguez et al, 2015
Tigesiklin kolistin	+	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı	İyi sinerjik etki	Özbek ve Şentürk, 2010 ; Shenget al, 2011
		Laboratuvar ortamında	XDR, kolistin duyarlı	İyi sinerjik etki	Dizbay et al, 2010
		Laboratuvar ortamında	Tigesiklin- olmayan duyarlı	İyi sinerjik etki	Principe et al, 2009

Tablo 2: ‘Acinetobacter baumannii enfeksiyonlarında araştırılmış olan kolistin, meropenem veya sulbaktam kombine tedavi seçenekleri’ (112) (devamı)

	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı ve kolistin dirençli	İyi sinerjik etki	Peck et al, 2012
	İn vitro / in vivo	XDR	İn vitro sinerjistik aktivite; sıçan pnömonisi modelinin akciğer dokusunda kolistin, tigesiklin ve kombinasyon tedavileri arasında bakteri sayımı üzerine etkinlik açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı	Mutlu Yılmaz ve ark, 2012
Tigesiklin polimiksin B	+ Laboratuvar ortamında	Karbapenem-dirençli, polimiksin-heteroresistans	Polimiksin B'nin daha yüksek tigesiklin konsantrasyonları ile kombinasyonu, bakterisit aktivitesinin devam etmesini sağlar	Rao et al, 2016b
	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dayanıklı	Agresif bir dozda simüle polimiksin B ve tigesiklin maruziyeti ile kombinasyon terapisinde sinerjistik etki	Hagihara et al, 2014
Kolistin rifampisin	+ İn vitro / in vivo	Çok ilaca dirençli, kolistin duyarlı	Pnömoni ve menenjit deneysel modellerinde <i>in vitro</i> etkin	Pachon-Ibanez et al, 2010
	Vaka raporu	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı	Ventilatör ilişkili pnömonili 10 hastanın 7'sinde etkin	Song et al, 2008
	Vaka raporu	MDR, kolistin duyarlı	Zatürree ve bakteriyemi hastaları ile kritik öneme sahip 29 hastanın 22'sinde etkinlik	Bassetti et al, 2008
	In vivo	MDR, kolistin duyarlı	Hayatta kalma süresinin uzamasında sinerjistik etki	Pantopoulou et al, 2007
	Klinik çalışma	MDR, kolistin duyarlı	Tüm 26 hastane enfeksiyonu hastası hastalar için elverişli	Motaouakkil et al., 2006
	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı	Rifampisine karşı yüksek dirençli ve orta derecede dirençli suşlar için etkili	Montero et al, 2004
	Laboratuvar ortamında	MDR, kolistin duyarlı	13 izolattan 11'ine karşı sinerjistik etki	Hogg et al, 1998
	Laboratuvar ortamında	XDR	Kolistin/rifampisin, kolistin/meropenem, kolistin/minosiklin ve minosiklin/meropenem kombinasyonları sinerjistikdir	Liang et al, 2011
	Laboratuvar ortamında	MDR, kolistin duyarlı	Kolistin/rifampisin, 5 izolattan 4'üne karşı tamamen sinerjistik; kolistin/meropenem ve kolistin/azitromisin 5 izolattan 3'üne karşı sinerjistik; kolistin/doksisisiklin 5 izolatta kısmen sinerjik veya katkı maddesi idi.	Timurkaynak et al, 2006
	Vaka raporu	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı	Rifampisin/kolistin ve ampisilin/sulbaktam kritik hastalardan 14'ünde mikrobiyolojik klirenslere sonuçlandı	Petrosillo et al, 2005
	Laboratuvar ortamında	Karbapenem-dirençli, kolistin-heteroresif	Rifampisin/kolistin ve imipenem/kolistin, hetero-dirençli izolatlara karşı sinerjistik ve kolistin-dirençli suşların gelişmesini önledi	Rodriguez et al, 2010
	Vaka raporu	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı	Ventilatör ilişkili pnömonili hastalarda sinerjistik etki	Aydemir et al, 2013
	In vivo	XDR, kolistin duyarlı ve kolistin dirençli	Kolistin/fusidik asit ve kolistin/rifampisin bir fare uyluk enfeksiyonu modelinde sinerjistik; Kolistin-meropenem kombinasyonu, kolistin MİK değeri ≤ 32 mg / L olduğunda da etkili olmuştur.	Fan et al, 2016
	Laboratuvar ortamında	Colistin dirençli	En etkili kombinasyonlar, kolistin-rifampin ve kolistin-tikoplanin; her iki kombinasyon da 9 kolistine dirençli suşun 8'inde sinerjistik etki göstermiştir	Bae et al, 2016
Kolistin teikoplanin	+ İn vitro / in vivo	MDR, kolistin duyarlı	Bir fare modelinde kolistin/daptomisin ve kolistin/teikoplanin sinerjistik etkisi	Cirioni et al, 2016
	Laboratuvar ortamında	MDR, kolistin duyarlı	Önemli sinerji	Wareham et al, 2011
	Laboratuvar ortamında	Colistin dirençli	En etkili kombinasyonlar, kolistin-rifampin ve kolistin-tikoplanin; her iki kombinasyon da 9 kolistine dirençli suşun 8'inde sinerjistik etki göstermiştir	Bae et al, 2016
Kolistin daptomisin	+ İn vitro / in vivo	MDR, kolistin duyarlı	Bir fare modelinde kolistin/daptomisin ve kolistin/teikoplanin sinerjistik etkisi	Cirioni et al, 2016
	Laboratuvar ortamında	XDR	Daptomisin-kolistin kombinasyonu en etkili oldu; colistin/imipenem kombinasyonu da etkiliydi	Cordoba et al, 2015
Kolistin vankomisin	+ İn vitro / in vivo	MDR, kolistin duyarlı	Hem in vitro hem de <i>Galleria mellonella</i> hayvan modelinde yüksek derecede aktif	Hornsey ve Wareham, 2011

Tablo 2: ‘Acinetobacter baumannii enfeksiyonlarında araştırılmış olan kolistin, meropenem veya sulbaktam kombine tedavi seçenekleri’ (112) (devamı)

Kolistin fosfomisin	+	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı	İyi sinerji; kolistin ve sulbaktam, kolistin ve imipenem arasında sinerji yok	Santimaleew et al., 2011
Kolistin + fusidik asit		Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı ve kolistin dirençli	Kolistin ve fusidik asit arasındaki <i>in-vitro</i> sinerji; fusidik asit ile sinerji suşa bağımlıdır ve kolistin MİK'lerinin nispeten düşük olduğu suşlara uygulanabilir	Bowler et al., 2016
		Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli, kolistin duyarlı ve kolistin dirençli	Bazı kolistinlere dirençli türler de dahil olmak üzere çok ilaca dirençli klinik suşlara karşı fusidik asit ve kolistin arasında güçlü sinerji	Phee et al., 2015
		In vivo	XDR, kolistin duyarlı ve kolistin dirençli	Kolistin/fusidik asit ve kolistin/rifampisin bir fare uyluk enfeksiyonu modelinde sinerjistikti; Kolistin-meropenem kombinasyonu, kolistin MİK değeri ≤ 32 mg / L olduğunda da etkili olmuştur.	Fan et al., 2016
Kolistin amikasin	+	Vaka raporu	MDR, kolistin duyarlı	Başarılı klinik ve mikrobiyolojik sonuçlar	Fulnecky et al., 2005
Kolistin trimetoprim-sülfametoksazol	+	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli	Kolistin/trimetoprim-sulfametoksazol karbapenem dirençli suşların hepsini etkili bir şekilde öldürdü	Nepka et al., 2016
Polymyxin B netropsin	+	İn vitro / in vivo	Colistin dirençli	Enfekte <i>Galleria mellonella</i> 'nin sağkalımı, polimiksin B ve netropin ile kombinasyon halinde kombinasyon halinde, sadece polimiksin B veya netropin ile tedavi edildiğinde olduğundan önemli ölçüde yüksekti.	Chung et al., 2016
Endolislin (LysABP-01) kolistin	+	Laboratuvar ortamında	İlaca dirençli	Sinerjik aktivite	Thummeepak et al., 2016
Amin-Aminoketon (MD3) + kolistin		Laboratuvar ortamında	Kolistin duyarlı, kolistin dirençli	Kolistin direnç özel mekanizmalarına sahip suşları hedef alan sinerjistik etki; hem kolistin duyarlı suşlara hem de <i>pmrB</i> 'de mutasyona sahip kolistin dirençli suşlara ve lipid A'nın fosfoetanolamin modifikasyonuna karşı sinerji, ancak lipopolisakarit kaybı ile kolistin dirençli suşlara karşı sinerji	Martinez-Guitian et al., 2016
Bulgecin A karbapenem	+	Laboratuvar ortamında	Karbapenem dirençli	Sinerjik aktivite	Skalweit ve Li, 2016
Farnesol kolistin	+	Laboratuvar ortamında	Colistin dirençli	Farnesol, kolistine dirençli suşlar için kolistine duyarlılığı artırdı	Kostoulas et al., 2015
Siyanür 3- klorofenilhidrazon (CCCP) + kolistin		Laboratuvar ortamında	Colistin dirençli	CCCP, kolistin direncini tersine çevirdi ve dirençli alt popülasyonun yeniden büyümesini engelledi	Ni et al., 2016
		Laboratuvar ortamında	Colistin dirençli	Sinerjik aktivite	Park ve Ko, 2015
Galyum nitrat kolistin	+	İn vitro / in vivo	İlaca dirençli	İyi antimikrobiyal aktiviteler; <i>Galleria mellonella</i> larvalarının öldürücü <i>A.baumannii</i> enfeksiyonundan korunması ; kolistin ile sinerjistik aktivite	Antunes et al., 2012
Lizofosfatidilkolin + karbapenem		In vivo	Çok ilaca dirençli suşlar	Kolistin, tigesiklin veya imipenem ile kombinasyon halinde lizofosfatidilkolin, dalak ve akciğerlerden bakteriyel klirensi belirgin şekilde artırdı ve bakteriyemi ve fare ölüm oranlarını düşürdü	Parra Millan et al., 2016
Karbapenem ampisilin sulbaktam +		In vivo	Karbapenem dirençli	Ampisilin-sulbaktam ve meropenem ile kombinasyon tedavisi cilt ve yumuşak doku enfeksiyonuna karşı etkilidir	Hiraki et al., 2013
		In vivo	İlaca dirençli	Bir karbapenem ve ampisilin/sulbaktamın kombinasyonu, bir karbapenem ve amikasin veya tek başına bir karbapenem kombinasyonundan daha iyi bir sonuçla ilişkilendirildi.	Kuo et al., 2007
Kolistin sulbaktam	+		Karbapenem dirençli	Kolistin+sulbaktam Kombinasyonunun denendiği Time-Kill ve Checkerboard yönteminde; denenen tüm suşlarda kolistin+sulbaktam kombinasyonunun yüksek oranda sinerjik etkisinin olduğu görüldü.	Kılbaş İmdat 2017

2.11. Antimikrobiyal Etkinlik Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir mikroorganizma türünün in vitro etkinliğini saptamak, mikroorganizmanın antimikrobiklere karşı oluşmuş direncini bulmak ve antimikrobiklerin mikroorganizmalar üzerinde birlikte etkilerinin saptanması üzerine uygulanan testlerdir (113). Minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK); mikroorganizmanın büyümesinin engelleyen antibiyotığın en düşük konsantrasyonu ve minimal bakterisidal konsantrasyon (MBC) ile saptanır.

Antimikrobiyal etkinlik testlerinde difüzyon(yayılm) ve dilüsyon(sulandırım) olmak üzere başlıca iki metod kullanılır.

2.11.1. Difüzyon testleri

Rutin laboratuvarlarda en sık çalışılan kolay uygulanır ve düşük maliyetli testlerdir.

Disk difüzyon testi: Plak içerisinde katı besiyerine ekilen bakterinin üzerine antibiyotik emdirilmiş diskler yerleştirilir. Diski çevreleyen inhibisyon zonları ölçülür ve belirlenen zon boyutlarıyla karşılaştırılarak en uygun antimikrobiyal ajan/ajanlar tespit edilir

Gradient Testi: Test edilecek bakteri Mueller Hinton agar besiyeri yüzeyine steril bir eküvyonla yayılır. Takiben agar yüzeyine, belli bir antibiyotik gradienti içeren test şeritleri yerleştirilir. Plaklar etüvde inkübe edilip MİK(minimal inhibitör konsantrasyon) değeri belirlenir. MİK değeri şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği noktadır (114).

2.11.2. Dilüsyon testleri

İn vitro duyarlılık testleri hastalık etkeni olan mikroorganizmaların kullanımda olan antibiyotiklere direnç gösterme olasılığı olduğu düşünüldüğünde yapılmaktadır. Bu testler ayrıca direnç sürveyansında, epidemiyolojik çalışmalarda ve yeni veya kullanımda olan antibiyotikleri kıyaslayan seyreltme yöntemidir. Antibiyotiklerin MİK'ini saptamak için kullanılmaktadır ve antibiyotik duyarlılık testlerinde referans testlerdir. Dilüsyon testlerinde, antimikrobiyal ajanın

dilüsyonlarını içeren mikroplak kuyucuklarında ya da agar plak yüzeyinde üremenin gözle görülebilir olması temel alınır (113).

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi: Sıvı dilüsyon, eş hacimde buyyon ve antibiyotik çözeltisi içeren kaplara (genellikle artan geometrik konsantrasyonlarda) belli sayıda mikroorganizmanın inoküle edildiği bir tekniktir. Sıvı mikrodilüsyon ise sıvı dilüsyon testinin minyatürleştirilmesi besiyerlerinin küçük hacimlerde yuvarlak ya da konik tabanlı kuyucukları olan steril plastik mikrodilüsyon plaklarına dağıtılmasıdır. (114). Mikrodilüsyon plaklarının hazırlanmasında en uygun yöntem, sıvı besiyerinde hazırlanmış antibiyotik sulandırımını dağıtıcı aletlerle dağıtmaktır. Bu sulandırım 96 kuyucuklu standart bir mikroplaktaki her bir kuyucuğa $0.1 \pm 0.02 \mu\text{L}$ dağıtmak üzere kullanılmaktadır. Her plakta bir üreme kontrol kuyucuğu ile bir sterilit (inoküle edilmemiş) kuyucuk bulunmalıdır.

Agar Dilüsyon Yöntemi: Antibiyotiklere duyarlılığın belirlenmesinde agar dilüsyon yöntemi yerleşmiş bir tekniktir. Antibiyotik, her plak farklı konsantrasyonda olacak şekilde agar besiyerine karıştırılır (116).

2.12. Antibiyotik Kombinasyon Testleri

Tedavi zorluklarıyla baş edebilmek için, mevcut antibiyotiklerin daha etkili ve birlikte kullanılmasına yönelik antibiyotikler arası etkileşimlerin değerlendirilmesi gündeme gelmiştir (117). Antibiyotik kombinasyonlarının dirençli mikroorganizmayı inhibe etmek/bakterisid etki için kabul edilebilir Non-toksik konsantrasyonlarda kullanımı ile büyük bir tedavi imkanı doğmuştur (66, 118, 119).

Kombinasyon antibiyotik tedavisinde antibiyotik etkileşimleri; sinerjist, antagonist, additif ve indiferan etkileşimler olarak tanımlanırlar.

Sinerjist etki: Pozitif bir etkileşimdir. Antibiyotiklerin birlikte etkisi, antibiyotiğin tek başına kullanımı ile oluşan etkisinden önemli miktarda artmıştır.

Antagonist etki: Negatif bir etkileşimdir. Antibiyotiklerin birlikte etkisi, antibiyotiğin tek başına kullanımı sonucunda oluşan etkiden önemli ölçüde azalmıştır.

Additif etki: Kısmi sinerjiyi gösterir. Birlikte kullanılan antibiyotiklerin etkisi ayrı ayrı etkilerinin toplamı olarak belirtilir.

İndiferan etki: Antibiyotikler birbiriyle etkileşmez. Antibiyotiklerin birlikte iken etkisi, daha etkili olan diğerinin tek başına yaptığı etki kadardır (120).

Kombinasyonlarda sinerjist etkileşim üç farklı şekilde olur (121).

Sinerjistik etki farklı yollarla farklı hedefleri inhibe ederek ortaya çıkmaktadır. Örn, β -laktam ile aminoglikozid kombinasyonunda β -laktam hücre duvarı hasarına neden olur, böylece aminoglikozidin hücre içine geçişi hızla artar. Bu da bakterisit etkiyi artırır (122).

Sinerjist etki, aynı yolla farklı hedeflerin inhibisyonu ile ortaya çıkmaktadır. İki antibakteriyel birbirinin etkisini arttırarak sinerjist etki oluştururlar (123).

Aynı yolla ve aynı hedef bölgenin inhibisyonu ile sinerjist etkinin ortaya çıkmaktadır.

Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğini ölçen testler (124).

- 1- Disk diffüzyon testi
- 2- Gradient testi
- 3- Dilüsyon testi
 - a-Mikrodilüsyon
 - b-Makrodilüsyon
 - c-Agar dilüsyon
- 4- Zamana bağlı kinetik öldürme testi (“Time-kill”)

2.12.1. Dilüsyon yöntemleri

2.12.1.1. Mikrodilüsyon “checkerboard (CB)” sinerji testi:

Mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ajanların kombinasyonlarını değerlendirmek için kullanılan, iki boyutlu, iki ajanlı bir sıvı mikrodilüsyon sinerji testidir. Kombinasyon halindeki antimikrobiyallerin spesifik konsantrasyonlarının, inhibitör veya bakterisidal aktivitesi değerlendirilir. Konsantrasyon aralığının daha

önce tespit edilen MİK değerlerinin iki ve dört katı (2xMİK, 4xMİK) konsantrasyondan başlayacak şekilde ayarlanmış olması gerekmektedir.

İn vitro etkileşimler matematiksel olarak hesaplanır. Kombinasyonun antibakteriyel aktivitesinin tek başına olan ajanların aktivitelerinden daha büyük, eşdeğer veya daha az olmasına bağlı olarak; sırasıyla sinerjistik, antagonistik, additif veya indiferan olarak yorumlanır.

Sonuçların değerlendirilmesi için birinci antibiyotiğin, sonra da ikinci antibiyotiğin MİK değeri okunur, daha sonra kombinasyon kuyucukları okunur ve Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) indeksi aşağıda belirtildiği şekilde hesaplanır

FİK indeksi hesaplaması: $(\sum FİK) = FİK_A + FİK_B$

$$FİK_A = \frac{\text{Kombinasyondaki A ajanının MİK değeri}}{\text{A ajanının tek başına MİK değeri}} + FİK_B = \frac{\text{Kombinasyondaki B ajanının MİK değeri}}{\text{B ajanının tek başına MİK değeri}}$$

FİK indeksi

$\sum FİK \leq 0.5$ ise sinerjistik,

$> 0.5 - \leq 4$ ise additif veya indiferan,

> 4 ise antagonist etki şeklinde yorum yapılabilir (125)

2.12.1.2. Zamana bağlı kinetik öldürme testi (Time-kill)

Zamana bağlı kinetik öldürme testi, belli, bir konsantrasyondaki bir antimikrobiyal ajanın, bakteri izolatu ile, bakteriyostatik ve bakterisidik aktivitesinin zamana karşı incelenmesidir. Bu yöntem, antimikrobiyal ajanların hem konsantrasyona hem de zamana bağlı antibakteriyel aktivitelerini incelemek için kullanılır. Dama tahtası yönteminden farklı olarak antimikrobiyal ilişkiyi dinamik olarak da ortaya koyan bir sinerji testidir. Checkerboard yönteminde 16-20 saat sonunda tek ölçüm yapıldığı halde, bu yöntemde belli zaman aralıklarında değişen etki dinamik olarak gösterilebilmektedir. Bu nedenle bakterisidal amaçlı tedaviler için daha anlamlıdır. Yeni antimikrobiyal ajanların ve ajan kombinasyonlarının etkinliği de bu şekilde değerlendirilir.

Antibiyotik dilüsyonu içeren tüplerden 0, 2, 4, 6 ve 24. saatlerde Müller Hinton agar plaklarına ekim yapılır. Ekilen plakların 24 saat inkübasyonu sonunda oluşmuş bakteri kolonileri sayılıp Cfu/ml değerleri bulunur. Antibiyotiğin zaman bağlı kinetik öldürme etkisinden söz edebilmek için koloni sayısında 24 saatte %99.9 yani 10^3 kat (3 log10) azalma görülmelidir. Denenen iki antibiyotiğin sinerjist etkisinden söz etmek içinse önce kombinasyondaki antibiyotiklerin daha aktif olanının koloni sayıları kaydedilir. Bu değerlere oranla, kombinasyonun 24 saatlik koloni sayılarında ≥ 100 kat (2 log10) düşüş varsa sinerjiye karar verilir; ≥ 100 kat artış antagonizmi, < 10 kat artış veya azalış ise aditif veya indiferan etkiyi gösterir (125).

2.13. *Galleria Mellonella* Enfeksiyon Modeli

Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae) çoğu durumda arı kovanlarında, arı yuvalarında yaşar, balmumu ve polenle beslenir. Arı ya da daha nadiren yaban arısı veya yaban arısı galeriyozisine neden olan haşere olarak kabul edilebilir. Yaşam döngüleri yaklaşık olarak 7-8 haftadır: yumurtadan çıktıktan sonra, larva son instarlara ulaşmadan önce 6 larva aşamasından geçer. Bu işlem 25–28 °C'de 5-6 hafta sürer. Daha sonra prepupa ve pupa oluşur ve 2 hafta sonra yetişkin güveleri ortaya çıkar.

Bu arı güvesi, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* ve *Aspergillus fumigatus* atus gibi insan patojenleri dahil olmak üzere birçok patojenin böcek bağışıklık tepkisi ve virülans faktörlerini incelemek için iyi bir model olmuştur. *Galleria mellonella*, memeli organizmalarla çalışılmasına göre, daha kolay, daha ucuz ve daha etik olduğu için in vivo çalışılmaya uygundur (126).

G. mellonella bakteri, mantar ve virüs tarafından enfekte olabilir. Farklı alanlarda araştırmalar yapılabilmektedir. Bir böcek modeli olarak *G. mellonella* kullanmanın birçok avantajı vardır. Bunlardan biri, memelilerin doğuştan gelen bağışıklık sistemi ile benzer özelliklere sahip olan ve edinilmiş bağışıklık ile müdahale edilmeyen böcek bağışıklık sisteminin mekanizmalarını anlamaktır. Bu nedenle, insan patojenlerinin virülans mekanizmalarını incelemek için bir model görevi görür. Bir başka sebep, hemolenfinin saflaştırılabilen ve sıralanabilen zengin

bir savunma molekülü kaynağıdır. Direnç oluşturmaları için antibiyotiklere alternatif olarak kabul edilirler (127- 131). Son olarak, *G. mellonella*'nın doğal böcek patojenleriyle olan etkileşimini takip edebilir ve bunu bir konakçı-patojen evrimsel silahlanma yarışının ışığında düşünebiliriz. Bu, bu böceğin hem genelleştirilmiş hem de özel patojenlerle etkileşimlerini ilgilendirir, çünkü bunlar sırasıyla genelleştirilmiş ve özel savunma mekanizmalarına neden olurlar (132).

G. mellonella, ucuz ve nispeten kolay kültürü oluşturulabilen bir model organizmadır. Larvalar, kolayca enjekte edilebilmektedir. Hemolenf ve hemositleri elde edilerek daha fazla analiz için yeterince büyüktür (2 cm uzunluğunda, pupasyondan önce 250 mg ağırlık) (133). Bir model organizma olarak dezavantajı ise, genomunun tam sekanslı olmaması ve mutant suşları yaratma metotlarının olmamasıdır. (134, 135).



Şekil 1: *Galleria mellonella* enfeksiyon modeli işlem basamakları

3. MATERYAL METOD

3.1. Bakteri Seçimi ve Analizi

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji laboratuvarında rutin tanı amacıyla gönderilen klinik örneklerden daha önce izole edilerek tanımlanmış; 3 adet tüm ilaçlara dirençli (PDR), 3 adet çoklu ilaç dirençli (MDR) ve 4 adet duyarlı klinik *A. baumannii* suşu seçilerek çalışmaya dahil edildi. Standart test suşu olarak *A. baumannii* ATCC 19606 kullanıldı.

3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları, ticari otomatik bakteri tiplendirme cihazı (Microscan, Beckman Coulter, USA) üretici önerilerine göre kullanılarak yeniden test edildi. Test edilen antimikrobiyaller: Kolistin (CO), amikasin (AK), ampisilin-sulbaktam (SAm), sefepim (FEB), sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ), siprofloksasin (CIP), Doripenem(DOR), gentamisin (GN), imipenem (IPM), levofloksasin (LEV), meropenem (MEM), minosiklin (MI), piperasilin-tazobaktam (TZP), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT), tetrasiklin (TE), Tigesiklin (TGC), tobramisin (TOB). Sonuçlar EUCAST önerileri temel alınarak dirençli (R), duyarlı (S) ve orta duyarlı(I) olarak değerlendirildi.

Tablo 3: *Acinetobacter* türlerinin tedavisinde kullanılan antimikrobiyaller.

Antimikrobiyal Sınıf	Antimikrobiyal ajan
Aminoglikozitler	Tobramisin Amikasin Netilmisin
Antipseudomonal karbapenemler	İmipenem Meropenem Doripenem
Antipseudomonal florokinolonlar	Siprofloksasin Levofloksasin
Antipseudomonal penisilin + β -laktamaz inhibitörleri	Piperasilin-tazobaktam Tikarsilin-klavulanik asit
Genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler	Sefotaksim Seftriakson Ceftazidime Sefepim
Folat yolu inhibitörleri	Trimetoprim-sulfametoksazol
Penisilinler + β -laktamaz inhibitörleri	Ampisilin-sulbaktam
polimiksinler	kolistin Polimiksin B
Tetrasiklinler	Tetrasiklin Doksisiklin Minosiklin

Acinetobacter spp. için MDR, XDR ve PDR'yi tanımlama kriterleri aşağıda verildiği şekilde kullanılmıştır:

MDR: Üç ve üstü sayıda antimikrobiyal sınıfta yer alan antibiyotiklere (her sınıfta en az bir antibiyotik) dirençlidir

XDR: Sadece iki veya tek antimikrobiyal sınıfta yer alan antibiyotikler dışında tüm antibiyotiklere dirençlidir.

PDR: Tablodaki tüm sınıflardaki tüm antimikrobiyal maddelere dirençlidir(136).

3.3. In Vitro Testler

3.3.1. Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan antibiyotiklerden; meropenem; Tüm Ekip İlaç A.Ş., sulbaktam; Mustafa Nevzat İlaç A.Ş. ve kolistin; Sanofi Dif İlaç A.Ş. tarafından temin edilmiştir.

Antibiyotiklerin stok çözeltilerini hazırlamak için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

Çözücünün hacmi (ml) x İstenen konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) = Antibiyotiğin aktivitesi ($\mu\text{g/ml}$)

Antibiyotiklerin her birinden uygun miktarlarda hassas terazide (Scaltec SBC 32) tartılmış, yeterli miktarda uygun çözücüde çözüldükten sonra, steril distile su kullanılarak stok çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler alikotlanarak deneylerde kullanılmak üzere -70°C 'de saklanmıştır.

3.3.2. Mikrodilüsyon “Checkerboard” dama tahtası yöntemi

Daha önce hazırlanarak -70°C 'de saklanmakta olan antibiyotik çözeltileri oda sıcaklığında çözüldü. Müller Hinton sıvı besiyeri üretici önerilerine göre steril koşullarda hazırlandı. Polistiren 96 kuyucuklu ve U-tabanlı steril mikroplaklar kullanıldı. Her bir suş ve o suşa karşı denenecek kombinasyon için bir mikroplak paneli hazırlandı.

Antibiyotiklerin konsantrasyonların ayarlanması: Antibiyotiklerin üst ve alt konsantrasyon değerleri bakterilere karşı sınır değerleri EUCAST ve CLSI kılavuzlarında bildirilmiş MİK değerlerini kapsayacak şekilde düzenlendi. Tablo4'de baz alınan MİK sınır değerleri verilmiştir.

Tablo 4: *Acinetobacter spp.* için baz alınan MİK sınır değerleri.

Antibiyotik	Duyarlı \leq	Dirençli \geq
Kolistin*	2	2
Meropenem*	2	8
Sulbaktam**	4	16

*CLSI ve EUCAST test kılavuzunda yer alan önerilere göre.

**EUCAST ve CLSI test kılavuzlarında *Acinetobacter spp.* izolatları için sulbaktam MİK sınır değer olmadığından literatürdeki diğer çalışmalar dikkate alınarak çalışma konsantrasyonları belirlendi (137).

Tüm antibiyotikler distile su ile sulandırılarak her kuyucukta Şekil 2 ve 3’de gösterilen konsantrasyonlarda ilaç olacak şekilde dağıtıldı. Tüm işlem basamakları aşağıda verilmiştir.

Deney basamakları

- 1- Bütün kuyucuklara 100 µl sıvı besiyeri dağıtıldı.
- 2- Besiyeri (sterilite) kontrol (BK)ve üreme kontrol (ÜK) kuyucukları belirlendi.
- 3- Mikroplakta önce ilk sütundaki tüm kuyucuklara (A-G) ilk antibiyotik hazırlanmış solüsyonundan 100 µl konuldu, daha sonra satır sırasınca soldan sağa doğru (1-9 kadar) seri dilüsyon yapıldı.
- 4- İlk satırdaki (1-10 kadar) tüm kuyucuklara diğer antibiyotik için hazırlanmış solüsyonundan 100 µl konularak bu kez sütun boyunca yukarıdan aşağıya doğru seri dilüsyon yapıldı.
- 5- Mikroplak üzerinde her antibiyotiğin tek başına MİK değerini belirlemek için birer satır ve sütun ayrıca kullanıldı. (Şekil 2 ve 3’de gösterilmiştir)
- 6- Bakteri süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığında (1.5×10^8 cfu/ml) hazırlandı
- 7- Bu bakteri süspansiyonundan 0.8 ml alınarak 25 ml su içinde dilüe edildi (1:31 dilüsyon) Bu şekilde 5×10^6 cfu/ml bakteri yoğunluğu elde edildi.
- 8- Yukarıdaki bakteri solüsyonundan 10’ar µl alınarak sonuç bakteri inokulumu 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı.
- 9- Etüve kaldırılarak 24 saat $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- 10- Kalite kontrol (ATCC 19606) MİK değerleri ve üreme kontrolü, besiyeri kontrolü değerlendirildi
- 11- FİK değerleri hesaplandı.

Hesaplama ;

FİK indeksi (FİKİ)= FİKA (MİKA kombinasyon/MİKtekA)+ FİKKB (MİKB kombinasyon/MİKtekB)

Sonucu Yorumlama ;

FİKİ ≤ 0.5 ise sinerjistik;

> 0.5 - ≤ 1 ise additif (Kısmi sinerji);

> 1 - < 4 ise indiferan (Farksızlık);

≥ 4 ise antagonistik etki olarak yorumlandı ve kayıt altına alındı.

Adımlar üç kez gerçekleştirildi ve ortalama değerler alınarak sonuçlar kaydedildi (125).

CO Dilüsyon 1-9'a kadar

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CO 64 µg/ml SUL 16 µg/ml	CO 32 µg/ml SUL 8 µg/ml	CO 16 µg/ml SUL 4 µg/ml	CO 8 µg/ml SUL 2 µg/ml	CO 4 µg/ml SUL 1 µg/ml	CO 2 µg/ml SUL 0,5 µg/ml	CO 1 µg/ml SUL 0,25 µg/ml	CO 0,5 µg/ml SUL 0,125 µg/ml	CO 0,25 µg/ml SUL 0,0625 µg/ml	CO 0,125 µg/ml SUL 0,03125 µg/ml	CO 0,0625 µg/ml SUL 0,015625 µg/ml	CO 0,03125 µg/ml SUL 0,0078125 µg/ml	CO 0,015625 µg/ml SUL 0,00390625 µg/ml
B	CO 64 µg/ml SUL 8 µg/ml	CO 32 µg/ml SUL 4 µg/ml	CO 16 µg/ml SUL 2 µg/ml	CO 8 µg/ml SUL 1 µg/ml	CO 4 µg/ml SUL 0,5 µg/ml	CO 2 µg/ml SUL 0,25 µg/ml	CO 1 µg/ml SUL 0,125 µg/ml	CO 0,5 µg/ml SUL 0,0625 µg/ml	CO 0,25 µg/ml SUL 0,03125 µg/ml	CO 0,125 µg/ml SUL 0,015625 µg/ml	CO 0,0625 µg/ml SUL 0,0078125 µg/ml	CO 0,03125 µg/ml SUL 0,00390625 µg/ml	CO 0,015625 µg/ml SUL 0,001953125 µg/ml
C	CO 64 µg/ml SUL 4 µg/ml	CO 32 µg/ml SUL 2 µg/ml	CO 16 µg/ml SUL 1 µg/ml	CO 8 µg/ml SUL 0,5 µg/ml	CO 4 µg/ml SUL 0,25 µg/ml	CO 2 µg/ml SUL 0,125 µg/ml	CO 1 µg/ml SUL 0,0625 µg/ml	CO 0,5 µg/ml SUL 0,03125 µg/ml	CO 0,25 µg/ml SUL 0,015625 µg/ml	CO 0,125 µg/ml SUL 0,0078125 µg/ml	CO 0,0625 µg/ml SUL 0,00390625 µg/ml	CO 0,03125 µg/ml SUL 0,001953125 µg/ml	CO 0,015625 µg/ml SUL 0,0009765625 µg/ml
D	CO 64 µg/ml SUL 2 µg/ml	CO 32 µg/ml SUL 1 µg/ml	CO 16 µg/ml SUL 0,5 µg/ml	CO 8 µg/ml SUL 0,25 µg/ml	CO 4 µg/ml SUL 0,125 µg/ml	CO 2 µg/ml SUL 0,0625 µg/ml	CO 1 µg/ml SUL 0,03125 µg/ml	CO 0,5 µg/ml SUL 0,015625 µg/ml	CO 0,25 µg/ml SUL 0,0078125 µg/ml	CO 0,125 µg/ml SUL 0,00390625 µg/ml	CO 0,0625 µg/ml SUL 0,001953125 µg/ml	CO 0,03125 µg/ml SUL 0,0009765625 µg/ml	CO 0,015625 µg/ml SUL 0,00048828125 µg/ml
E	CO 64 µg/ml SUL 1 µg/ml	CO 32 µg/ml SUL 0,5 µg/ml	CO 16 µg/ml SUL 0,25 µg/ml	CO 8 µg/ml SUL 0,125 µg/ml	CO 4 µg/ml SUL 0,0625 µg/ml	CO 2 µg/ml SUL 0,03125 µg/ml	CO 1 µg/ml SUL 0,015625 µg/ml	CO 0,5 µg/ml SUL 0,0078125 µg/ml	CO 0,25 µg/ml SUL 0,00390625 µg/ml	CO 0,125 µg/ml SUL 0,001953125 µg/ml	CO 0,0625 µg/ml SUL 0,0009765625 µg/ml	CO 0,03125 µg/ml SUL 0,00048828125 µg/ml	CO 0,015625 µg/ml SUL 0,000244140625 µg/ml
F	CO 64 µg/ml SUL 0,5 µg/ml	CO 32 µg/ml SUL 0,25 µg/ml	CO 16 µg/ml SUL 0,125 µg/ml	CO 8 µg/ml SUL 0,0625 µg/ml	CO 4 µg/ml SUL 0,03125 µg/ml	CO 2 µg/ml SUL 0,015625 µg/ml	CO 1 µg/ml SUL 0,0078125 µg/ml	CO 0,5 µg/ml SUL 0,00390625 µg/ml	CO 0,25 µg/ml SUL 0,001953125 µg/ml	CO 0,125 µg/ml SUL 0,0009765625 µg/ml	CO 0,0625 µg/ml SUL 0,00048828125 µg/ml	CO 0,03125 µg/ml SUL 0,000244140625 µg/ml	CO 0,015625 µg/ml SUL 0,0001220703125 µg/ml
G	CO 64 µg/ml SUL 0,25 µg/ml	CO 32 µg/ml SUL 0,125 µg/ml	CO 16 µg/ml SUL 0,0625 µg/ml	CO 8 µg/ml SUL 0,03125 µg/ml	CO 4 µg/ml SUL 0,015625 µg/ml	CO 2 µg/ml SUL 0,0078125 µg/ml	CO 1 µg/ml SUL 0,00390625 µg/ml	CO 0,5 µg/ml SUL 0,001953125 µg/ml	CO 0,25 µg/ml SUL 0,0009765625 µg/ml	CO 0,125 µg/ml SUL 0,00048828125 µg/ml	CO 0,0625 µg/ml SUL 0,000244140625 µg/ml	CO 0,03125 µg/ml SUL 0,0001220703125 µg/ml	CO 0,015625 µg/ml SUL 0,00006103515625 µg/ml
H	CO 128 µg/ml	CO 64 µg/ml	CO 32 µg/ml	CO 16 µg/ml	CO 8 µg/ml	CO 4 µg/ml	CO 2 µg/ml	CO 1 µg/ml	CO 0,5 µg/ml				

Şekil 2: Kolistin (CO)+Sulbaktam(SUL) checkerboard dilüsyon şeması

CO DİLÜSYON 1-9 KADAR

↓ CO A-H

→

MEM 1-10

↓ MEM DİLÜSYON A-G KADAR

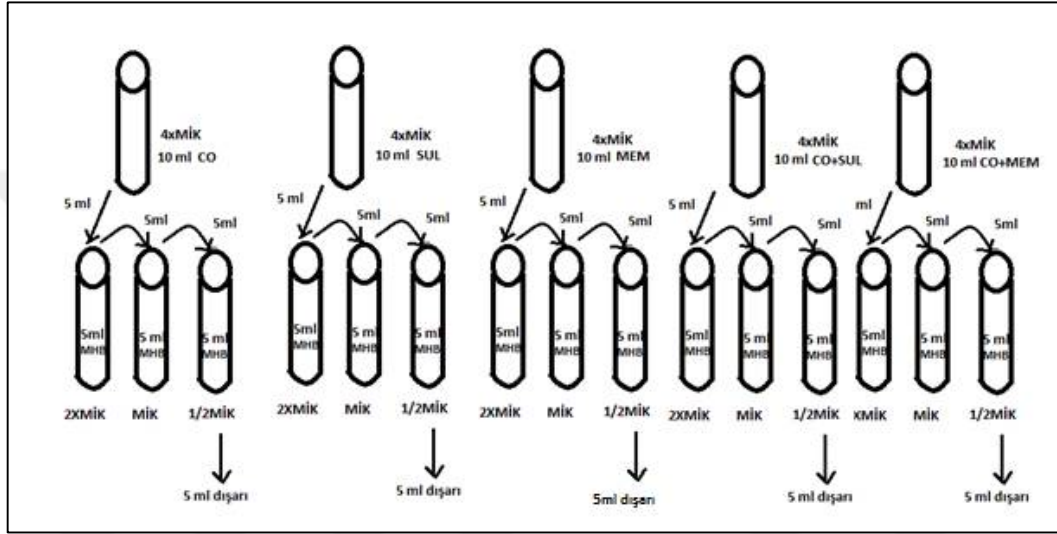
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CO 64 µg/ml MEM 32µg/ml	CO 32 µg/ml MEM 32µg/ml	CO 16 µg/ml MEM 32µg/ml	CO 8 µg/ml MEM 32µg/ml	CO 4 µg/ml MEM 32µg/ml	CO 2 µg/ml MEM 32µg/ml	CO 1 µg/ml MEM 32µg/ml	CO 0,5 µg/ml MEM 32µg/ml	CO 0,25 µg/ml MEM 32µg/ml	MEM 16 µg/ml	BK	ÜK
B	CO 64 µg/ml MEM 16µg/ml	CO 32 µg/ml MEM 16µg/ml	CO 16 µg/ml MEM 16µg/ml	CO 8 µg/ml MEM 16µg/ml	CO 4 µg/ml MEM 16µg/ml	CO 2 µg/ml MEM 16µg/ml	CO 1 µg/ml MEM 16µg/ml	CO 0,5 µg/ml MEM 16µg/ml	CO 0,25 µg/ml MEM 16µg/ml	MEM 8 µg/ml		
C	CO 64 µg/ml MEM 8 µg/ml	CO 32 µg/ml MEM 8 µg/ml	CO 16 µg/ml MEM 8 µg/ml	CO 8 µg/ml MEM 8 µg/ml	CO 4 µg/ml MEM 8 µg/ml	CO 2 µg/ml MEM 8 µg/ml	CO 1 µg/ml MEM 8 µg/ml	CO 0,5 µg/ml MEM 8 µg/ml	CO 0,25 µg/ml MEM 8 µg/ml	MEM 4 µg/ml		
D	CO 64 µg/ml MEM 4 µg/ml	CO 32 µg/ml MEM 4 µg/ml	CO 16 µg/ml MEM 4 µg/ml	CO 8 µg/ml MEM 4 µg/ml	CO 4 µg/ml MEM 4 µg/ml	CO 2 µg/ml MEM 4 µg/ml	CO 1 µg/ml MEM 4 µg/ml	CO 0,5 µg/ml MEM 4 µg/ml	CO 0,25 µg/ml MEM 4 µg/ml	MEM 2 µg/ml		
E	CO 64 µg/ml MEM 2 µg/ml	CO 32 µg/ml MEM 2 µg/ml	CO 16 µg/ml MEM 2 µg/ml	CO 8 µg/ml MEM 2 µg/ml	CO 4 µg/ml MEM 2 µg/ml	CO 2 µg/ml MEM 2 µg/ml	CO 1 µg/ml MEM 2 µg/ml	CO 0,5 µg/ml MEM 2 µg/ml	CO 0,25 µg/ml MEM 2 µg/ml	MEM 1 µg/ml		
F	CO 64 µg/ml MEM 1 µg/ml	CO 32 µg/ml MEM 1 µg/ml	CO 16 µg/ml MEM 1 µg/ml	CO 8 µg/ml MEM 1 µg/ml	CO 4 µg/ml MEM 1 µg/ml	CO 2 µg/ml MEM 1 µg/ml	CO 1 µg/ml MEM 1 µg/ml	CO 0,5 µg/ml MEM 1 µg/ml	CO 0,25 µg/ml MEM 1 µg/ml	MEM 0,5 µg/ml		
G	CO 64 µg/ml MEM 0,5µg/ml	CO 32 µg/ml MEM 0,5µg/ml	CO 16 µg/ml MEM 0,5µg/ml	CO 8 µg/ml MEM 0,5µg/ml	CO 4 µg/ml MEM 0,5µg/ml	CO 2 µg/ml MEM 0,5µg/ml	CO 1 µg/ml MEM 0,5µg/ml	CO 0,5 µg/ml MEM 0,5µg/ml	CO 0,25 µg/ml MEM 0,5µg/ml	MEM 0,25 µg/ml		
H	CO 128 µg/ml	CO 64 µg/ml	CO 32 µg/ml	CO 16 µg/ml	CO 8 µg/ml	CO 4 µg/ml	CO 2 µg/ml	CO 1 µg/ml	CO 0,5 µg/ml			

Şekil 3: Kolistin(CO)+Meropenem(MEM) checkerboard dilüsyon şeması

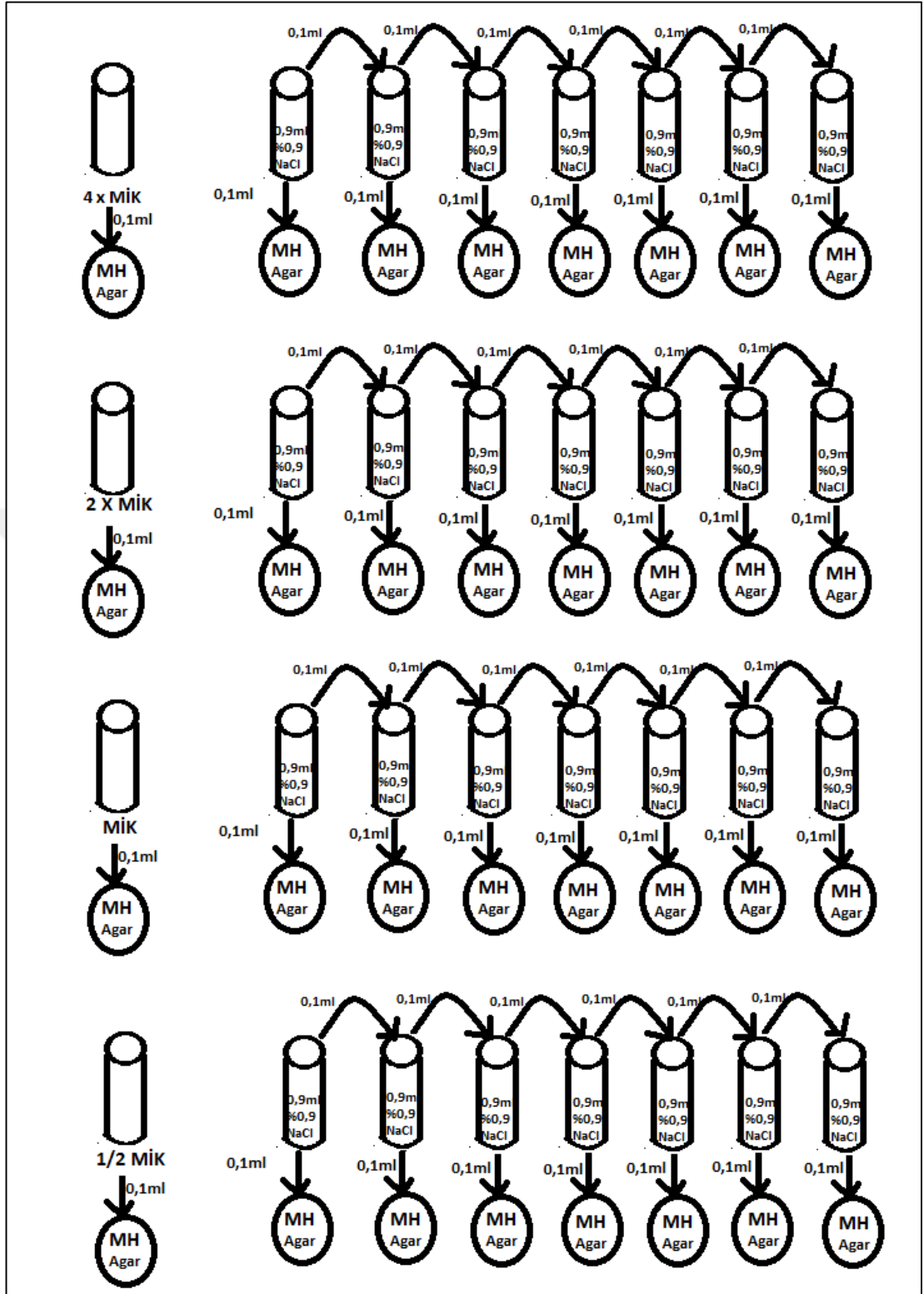
3.3.3. Zamana Bağlı Kinetik Öldürme- Yöntemi (Time Kill)

- 1- Standart öldürme-kinetik deneyleri, bir adet *A. baumannii* ATCC 19606 suşu ve bir adet PDR, bir adet MDR ve bir adet duyarlı *A. baumannii* suşu kullanılarak yapıldı.
- 2- Antibiyotikler bakteri MİK değerlerine göre ½ MİK, MİK, 2X MİK, 4XMİK konsantrasyon tüplerine 5 ml MH sıvı besiyeri 15 ml lik cam tüplerde hazırlandı. 4XMİK tüp 10 ml konsantrasyonda hazırlanarak seri dilüsyon yapıldı. (Şekil 4)
- 3- Bir adet kontrol tüpü kullanıldı (besiyeri+bakteri).
- 4- Her suş için yaklaşık 6×10^5 cfu/ml bakteri inokulumu olacak şekilde hesaplanarak dilüsyon tüplerine eklendi. Sıfırıncı dakika ekimleri yapıldı.
- 5- Kültürler 37 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı.
- 6- İnkübasyon sonrası 2, 4, 6 ve 24. saat aralıklarında, örnekler Mueller- Hinton agar üzerine ekildi.
- 7- Bakteri kolonilerini sayabilmek için yedi tüpe 0.9 ml %NaCl ve üzerine 0.1 ml hazırladığımız MİK konsantrasyon tüpünden koyarak seri dilüsyon yapıp her dilüsyon tüpünden 0.1 ml MH agar besiyerine ektik. (şekil 5)

- 8- Ekilen plakların 37 °C'de bir gün inkübasyonu sonunda oluşmuş bakteri kolonileri sayıldı, cfu/ml olarak kaydedildi. Sayılar 10 logaritmik değerlere çevrildi.
- 9- Bakterisidal etki zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak time kill testi ile gösterildi. Bakteri sayısında 3-log_{10} azalma varsa bakterisidal etki olarak değerlendirildi (125).



Şekil 4: Time-kill testi için antibiyotik konsantrasyonu dilüsyonu



Şekil 5: Time-kill testi için bakteri koloni sayımı için seyreltme ve ekim

3.4. İn Vivo Testler

Bütün deneylerde Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında beş haftada yetiştirilen ağırlık olarak 200 ile 250 mg ağırlığındaki son evre *Galleria mellonella* larvaları rastgele seçilerek kullanıldı.

3.4.1. Aşılama Testi

Birer adet duyarlı, MDR, PDR ve ATCC19606 suşu seçilerek Luria Bertani (LB) (Lab M-Birleşik Krallık) sıvı besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübasyon koşullarında üretildi.

- 1- Bakteriler 0.5 McFarland süspansiyonunda (10^8 cfu/ml) hazırlanır ve seri olarak 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6 , 10^7 cfu/ml konsantrasyonları olacak şekilde seyreltildi.
- 2- Her dilüsyon için onar adet *G. mellonella* larvası rastgele seçildi. Larvaların sol arka ayaklarından 10 µl bakteri süspansiyonu enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası her dilüsyon grubu ayrı petri kutularına alındı ve 28 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- 3- 0, 24, 48, 72 ve 96 saatlik hayatta kalma durumları (canlı/ölü) kaydedildi (138).

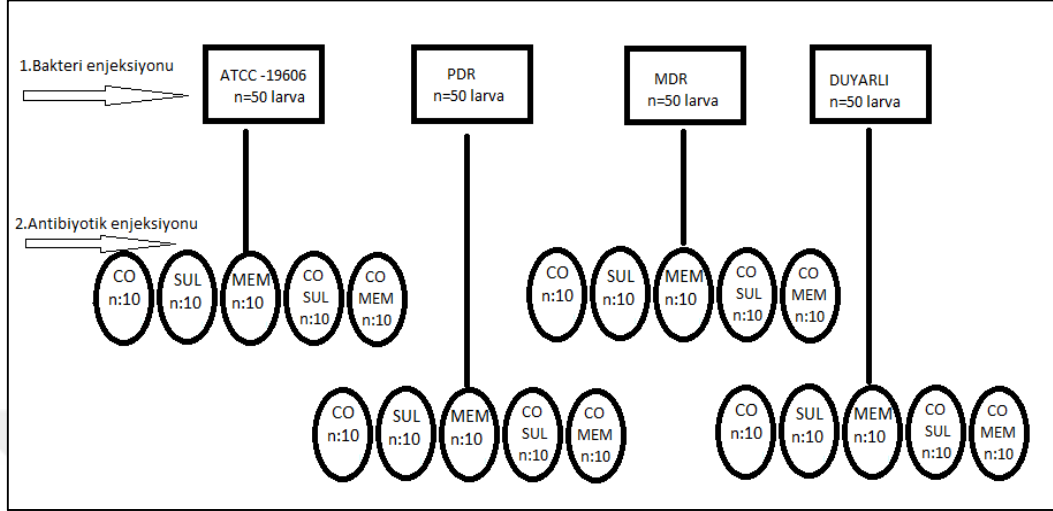
3.4.2. *G. mellonella* in vivo toksisite testi

Kolistin, sulbaktam ve meropenem konsantrasyonları sırasıyla 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mg/kg olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan her bir konsantrasyondaki antibiyotik solüsyonundan, on adet *G. mellonella* son evre larvasının sol arka bacağına 10 µl kadar enjekte edildi. Kontrol grubu olarak da 10 adet larvaya 10 µl PBS enjekte edildi. Larvalar 37°C' de 96 saat etüvde bırakıldı. Her 24 saatte bir gözlem yapılarak ölüm zamanları kaydedildi.

3.4.3. Tedavi Testleri

Birer adet duyarlı, MDR, PDR ve ATCC19606 suşu seçilerek LB sıvı besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübasyon koşullarında üretildi ve 10^8 cfu/ml olacak şekilde konsantrasyonlar sağlandı. Toplam 50 larva duyarlı bakteri solüsyonu ile, 50 larva MDR ile, 50 larva PDR ile, ve 50 larva standart suş ile sol arka ayağına 10 µl enjekte edilerek enfekte edildi. İki saat sonra, her bir larvaya ikinci bir enjeksiyon ile kolistin (2.5 mg/kg), meropenem (60 mg/kg), sulbaktam (60mg/kg), kolistin/sulbaktam veya kolistin/meropenem kombinasyonundan 10 µl verildi(138-140). Kontrol grubu

olarak belirlenen 10 larvaya sadece 10 µl PBS aynı yöntemle uygulandı. Tüm larvalar aynı koşullarda petri kaplarına alınarak 37 °C'de inkübe edildi. Sırasıyla 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki hayatta kalma durumları (canlı/ölü) kaydedildi (141).



Şekil 6: *Galleria mellonella* tedavi testi şematığı

4. BULGULAR

Hastanemizden izole edilen örneklerden 3 PDR, 3 MDR, 1 ATCC 19606 ve 4 duyarlı *A. baumannii* suşu seçildi. Seçilen 11 adet *A. baumannii* suşunda kolistin-meropenem, kolistin-sulbaktam kombinasyonlarının etkinliği araştırıldı.

4.1. *İn vitro* Bulgular

4.1.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Saptanmasına Ait Bulgular

Toplam 3 PDR, 3 MDR, 1 ATCC 19606 ve 4 duyarlı *A. baumannii* suşunun, Kolistin, Sulbaktam ve Meropenem için belirlenen MİK değerleri aşağıda Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5: Kolistin, Sulbaktam, Meropenem MİK değerleri

	Kolistin	Sulbaktam	Meropenem
ATCC 19606	2 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml
PDR 1	2 µg/ml	>16 µg/ml	32µg/ml
PDR 2	2 µg/ml	>16 µg/ml	>32 µg/ml
PDR 3	2 µg/ml	>16 µg/ml	32 µg/ml
MDR 1	> 64 µg/ml	>16 µg/ml	>32µg/ml
MDR 2	> 64 µg/ml	>16 µg/ml	16 µg/ml
MDR 3	> 64 µg/ml	>16 µg/ml	>32 µg/ml
Duyarlı 1	1 µg/ml	1 µg/ml	0.5µg/ml
Duyarlı 2	2 µg/ml	1 µg/ml	32 µg/ml
Duyarlı 3	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
Duyarlı 4	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml

4.1.2. Checkerboard Sonuçları

Tablo 6: Antibiyotik kombinasyon sinerji test sonucu

Bakteri	Kombinasyon	FIK (ΣFIC) indeksi	Etki	Combination	FIK (ΣFIC) index	Etki
ATCC 19606	Kolistin+sulbaktam	1.5	İndiferan	Kolistin+meropenem	2	İndiferan
PDR isolate 1	Kolistin+sulbaktam	1.51	Additif etki	Kolistin+meropenem	0.62	Additif etki
PDR isolate 2	Kolistin+sulbaktam	0.75	Additif etki	Kolistin+meropenem	0.75	Additif etki
PDR isolate 3	Kolistin+sulbaktam	0.56	Additif etki	Kolistin+meropenem	0.53	Additif etki
MDR isolate 1	Kolistin+sulbaktam	0.51	Additif etki	Kolistin+meropenem	0.53	Additif etki
MDR isolate 2	Kolistin+sulbaktam	0.53	Additif etki	Kolistin+meropenem	0.15	Sinerji
MDR isolate 3	Kolistin+sulbaktam	0.25	Sinerji	Kolistin+meropenem	0.04	Sinerji
Sensitive isolate 1	Kolistin+sulbaktam	1	İndiferan	Kolistin+meropenem	1	İndiferan
Sensitive isolate 2	Kolistin+sulbaktam	1	İndiferan	Kolistin+meropenem	1.5	İndiferan
Sensitive isolate 3	Kolistin+sulbaktam	1.5	İndiferan	Kolistin+meropenem	1.5	İndiferan

Antibiyotik kombinasyonlarının hiçbirinde antagonist etki görülmemiştir. Kolistin+sulbaktam kombinasyonu 11 bakterinin 6'sında (%54.5) additif, birinde (%9.1) sinerjik etki göstermiştir. Kolistin+meropenem kombinasyonu ise 11 bakterinin 4'ünde (%36.4) additif, 2'sinde (%18.1) sinerjik etki göstermiştir. Antibiyotik kombinasyonlarının çalışılan toplam bakteriler üzerinde etkinlik oranlar Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: Antibiyotik kombinasyonlarının çalışılan toplam 11 bakteri suşu üzerinde etkinlik oranları.

İlaç Kombinasyonu	Sinerji n (%)	Additif n (%)	İndiferan n (%)	Antagonist n (%)
Kolistin+sulbaktam	1 (%9.1)	6 (%54.5)	4 (%36.4)	0
Kolistin+meropenem	2 (%18.1)	4 (%36.4)	5 (%45.5)	0

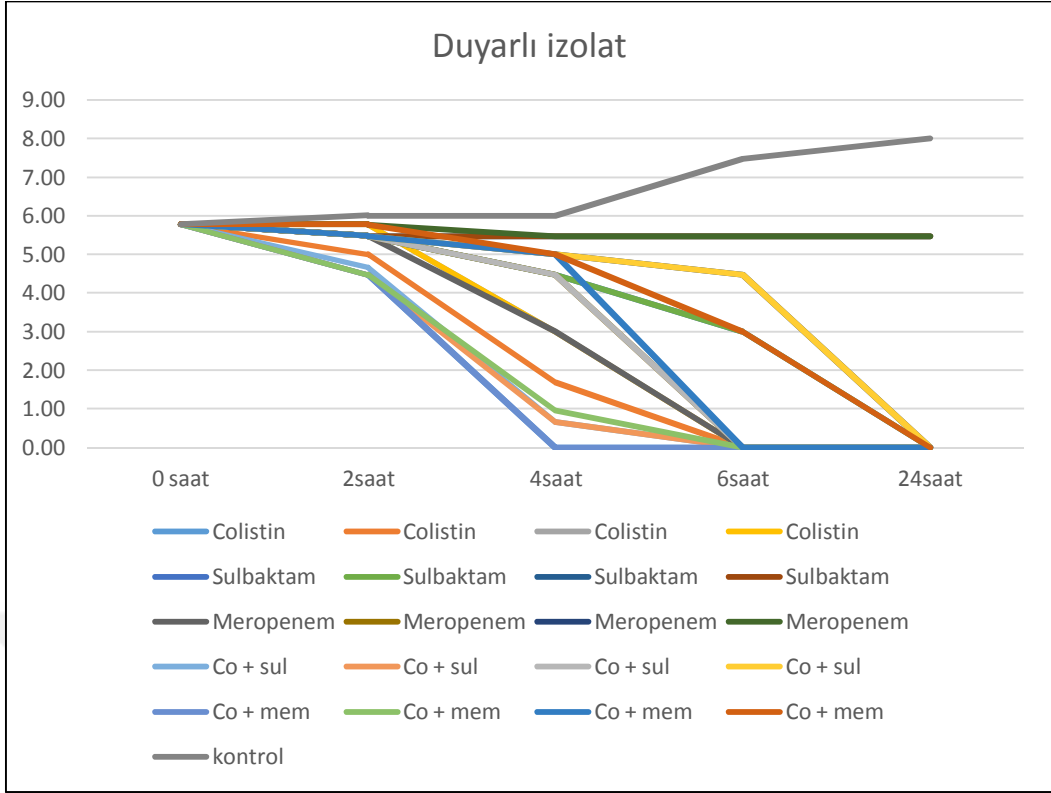
4.1.3. Zamanı bağlı kinetik öldürme bulguları

Çoğu antibiyotiğe duyarlı ATCC 19606 suşu tipi için, CST/Sulbaktam, CST/Meropenem ve monoterapiyle 2x MİK ve 4x MİK konsantrasyonlarında bakterisit aktivite göstermiştir.

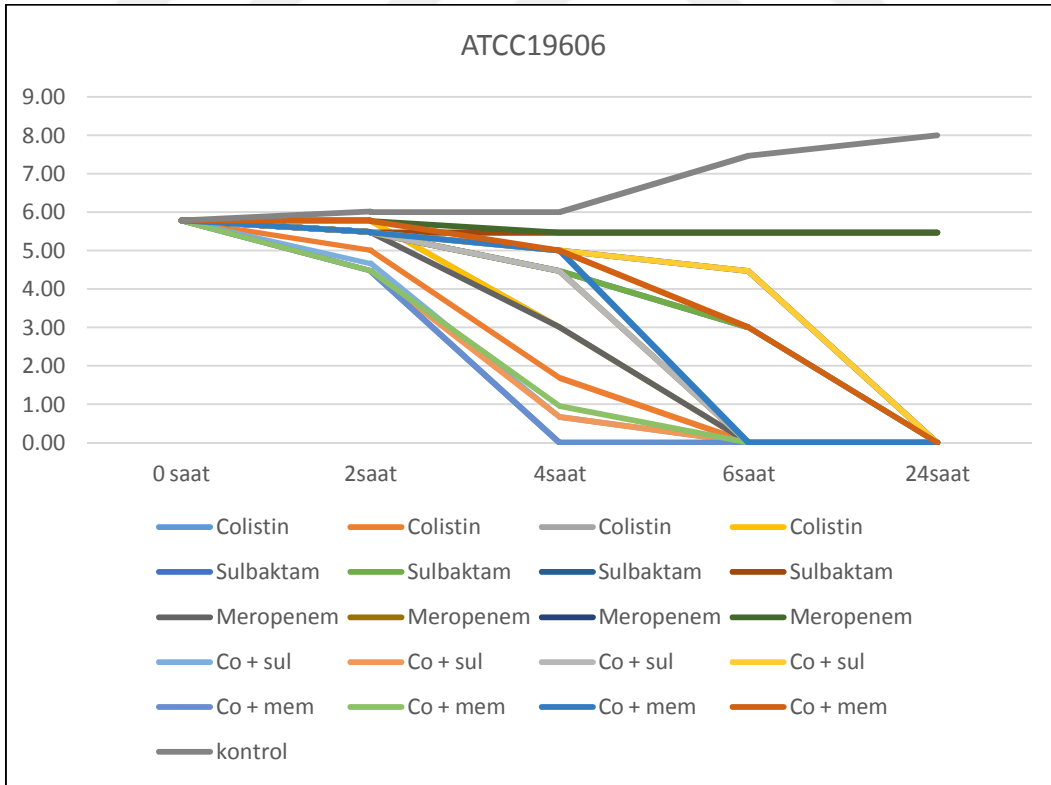
Tablo 8: Time-kill sinerji tablosu

İzolat	Kolistin + Sulbaktam				Kolistin+ Meropenem			
	1/2MİK	1XMİK	2XMİK	4XMİK	1/2MİK	1XMİK	2XMİK	4XMİK
ATCC	NS	NS	S	S	NS	S	S	S
SDR	NS	NS	S	S	NS	NS	S	S
MDR	S	S	S	S	S	S	S	S
PDR	S	S	S	S	NS	S	S	S

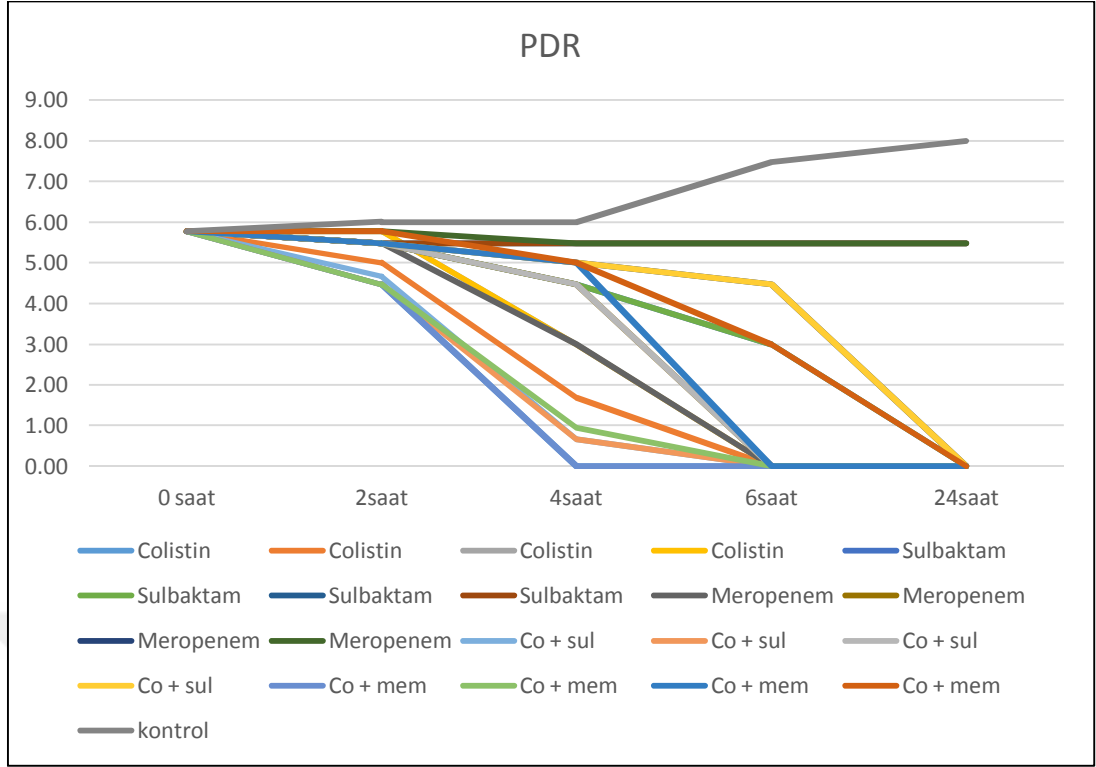
S:Sinerjik ,NS:Non sinerjik etki (Kombinasyonun 24 saatlik koloni sayılarında ≥ 100 kat düşüş varsa sinerji olarak değerlendirilir; ≥ 100 kat artma antagonist etkiyi, < 10 kat artma veya azalma ise additif veya indiferan etki anlamına gelir)



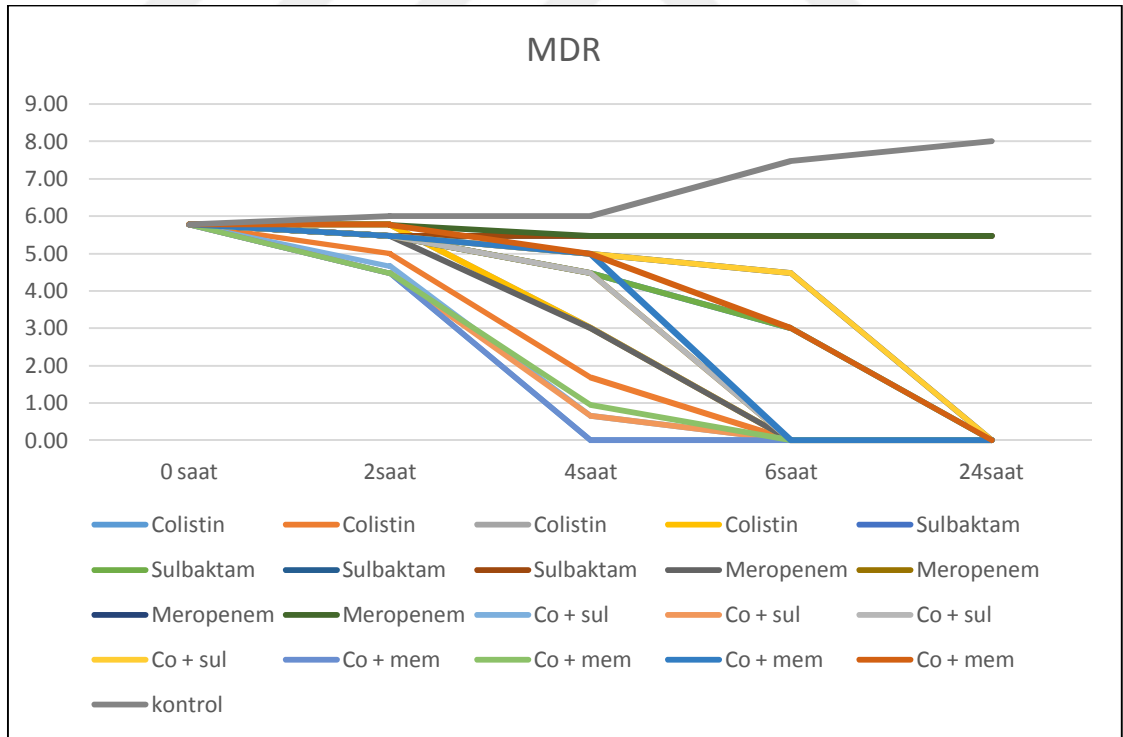
Şekil 7: Time-kill duyarlı izolat grafiği



Şekil 8: Time-kill standart suş grafiği



Şekil 9: Time-kill PDR izolat grafiği



Şekil 10: Time-kill MDR izolat grafiği

4.2. *In Vivo* Bulgular

4.2.1. Aşılama Bulguları

Bakteriler 0,5 McFarland süspansiyonunda (10^8 cfu/ml) hazırlandı ve seri olarak 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6 cfu/ml seyredildi, 28°C de etüve bırakıldı. 120 saat boyunca gözlemlendiğinde canlı/ölü olarak kaydedildi. Sonrasında 10^7 - 10^8 cfu/ml 28°Cde bırakıldı ve 120 saat boyunca gözlemlendi tekrar larvalar ölmedi. Larvalar 10^8 cfu/ml ile enfekte edilip bu sefer 37°Cde bırakıldı.

Tablo 9: *Galleria mellonella* larvalarının bakteri enfekte sonrası yüzdeleri

	24 saat		48 saat		96 saat		120 saat	
	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü
ATCC	90%	10%	60%	40%	40%	60%	30%	70%
19606								
SDR	90%	10%	70%	30%	70%	30%	70%	30%
MDR	60%	40%	50%	50%	40%	60%	20%	80%
PDR	30%	70%	20%	80%	20%	80%	10%	90%

4.2.2. Toksikite bulguları

Kolistin, sulbaktam ve meropenem antibiyotik konsantrasyonları sırasıyla 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mg/kg olacak şekilde *G. mellonella* son evre larvalarının sol arka bacağına sırasıyla enjekte edildi. 28°C de 96 saat sonrasında toksititeye rastlanmadı.

4.2.3. Tedavi bulguları

96. saat sonunda;

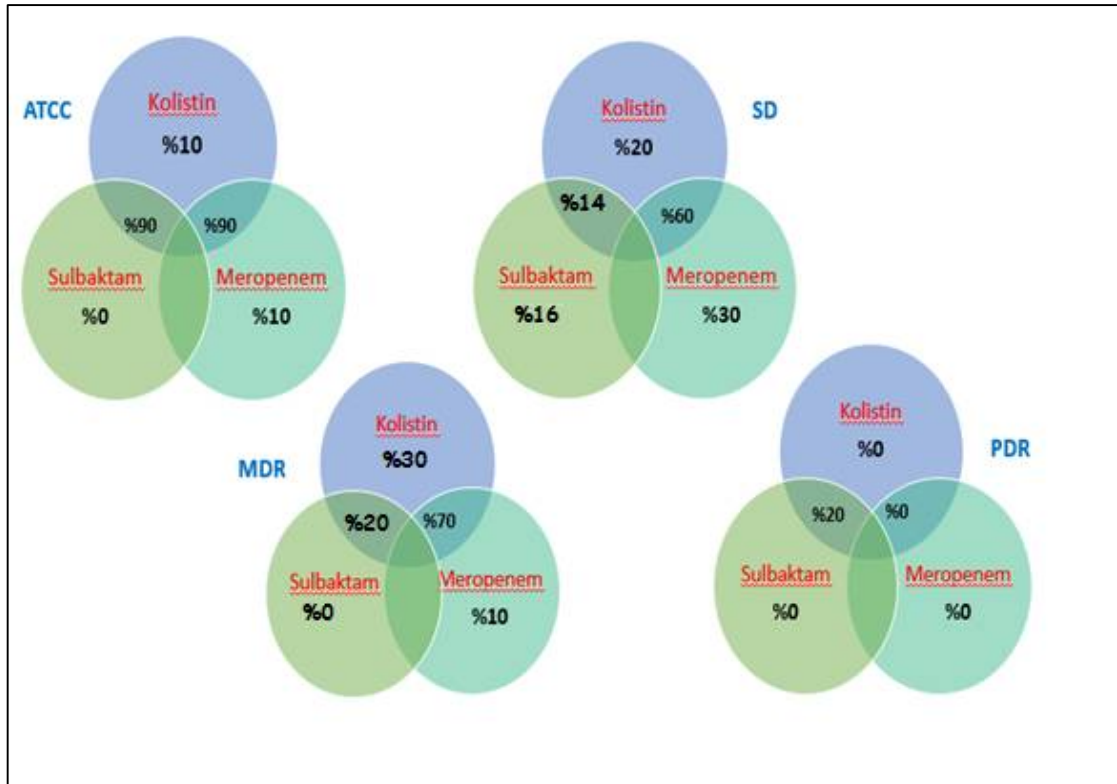
Sulbaktam ile yapılan tedavi sonrasında ATCC19606 suşu ile enfekte edilen larvaların hepsinin öldüğü, PDR suşları ile enfekte edilen larvaların hepsinin öldüğü, MDR ile enfekte edilen larvaların hepsinin öldüğü ve SD ile enfekte edilen larvaların ise %84'ünün öldüğü görülmüştür.

Kolistin ile yapılan tedavi sonrasında ATCC19606 suşu ile enfekte edilen larvaların %90'nın öldüğü, PDR suşları ile enfekte edilen larvaların hepsinin öldüğü, MDR ile enfekte edilen larvaların %70'inin öldüğü ve SD ile enfekte edilen larvaların ise %80'inin öldüğü görülmüştür.

Meropenem ile yapılan tedavi sonrasında ATCC19606 suşu ile enfekte edilen larvaların %90'nın öldüğü, PDR suşları ile enfekte edilen larvaların hepsinin öldüğü, MDR ile enfekte edilen larvaların %90'nın öldüğü ve SD ile enfekte edilen larvaların ise %70'inin öldüğü görülmüştür.

Kolistin+sulbaktam ile yapılan tedavi sonrasında ATCC19606 suşu ile enfekte edilen larvaların %10'unun öldüğü, PDR suşları ile enfekte edilen larvaların %80'inin öldüğü, MDR ile enfekte edilen larvaların %80'inin öldüğü ve SD ile enfekte edilen larvaların ise %86'nın öldüğü görülmüştür.

Kolistin+meropenem ile yapılan tedavi sonrasında ATCC19606 suşu ile enfekte edilen larvaların %10'unun öldüğü, PDR suşları ile enfekte edilen hepsinin öldüğü, MDR ile enfekte edilen larvaların %30'unun öldüğü ve SD ile enfekte edilen larvaların ise %40'nın öldüğü görülmüştür.



Şekil 11: Tedavi sonrası sağkalım oranları

5. TARTIŞMA

Günümüzde *Acinetobacter* türlerinin etken olduğu enfeksiyonlar yüksek morbidite, mortalite oranları ve ek tedavi maliyeti nedeni ile özellikle yoğun bakım ünitelerinde en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır.

Acinetobacter türleri solunum sistemi, üriner sistem ve yara yeri enfeksiyonları başta olmak üzere fırsatçı ve dirençli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde karbapenemler, ampisilin sulbaktam, sefaperazon sulbaktam gibi sulbaktamla kombine ajanlar ve sefepim gibi geniş spektrumlu sefalosporinler kullanılmaktadır (142).

Çoklu dirençli kökenlerin sayısında artma ve bunun sonucunda tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerinde azalma en önemli tehdit olarak görülmektedir (143). Bunun yanında kullanımda olan tüm antibiyotiklere karşı dirençli olan suşlar da bildirilmeye başlanmıştır (144). Bu enfeksiyonların tedavisinde çoğunlukla son çare olarak; eskiden kullanımda olan fakat önemli nöro ve nefrotoksisite sorunu ile ilişkilendirildiğinden terk edilmiş bir antibiyotik olan kolistin tedavi seçeneği olarak yeniden ortaya çıkmıştır. Hem parenteral hem de aerosol uygulama olanağı ile günümüzde dirençli türlerin neden olduğu enfeksiyonlarda tercih edilen tedavi haline gelmiştir (145,146).

Dirençli enfeksiyonlarda klinisyenler ayrıca kolistin kombinasyon tedavilerini de denemekte ve kapsamlı klinik veriler eksik olmasına rağmen, kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (142). Ancak yeniden ve yaygın olarak kullanıma girmesi sonucunda, son zamanlarda, kolistine karşı dirençli enfeksiyonlarda da artış kaydedilmiştir (147).

Ulusal sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar sürveyans ağı 2017 özet raporu antimikrobiyal direnç verilerine bakıldığında *A.baumannii* enfeksiyonlarında Türkiye genelinde karbapenemlere direnç oranı %70.46, kolistine direnç oranı ise %4.79 olarak saptanmıştır (148).

Antibiyotiklerin bulunuşundan kısa bir süre sonra direnç sorunu ortaya çıkmış ve çözüm arayışları gündeme gelmiştir. Daha antibiyotik çağının başında, tek antibiyotik kullanımının başarısız olduğu durumlarda ampirik olarak antibiyotik

kombinasyonları denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Günümüzde ise tedavi güçlükleri ile baş edebilmek için, bir yandan yeni antibakteriyel arayışı sürerken bir yandan da mevcut antibiyotiklerin daha etkili kullanılması ve antibiyotikler arası etkileşimlerin değerlendirilmesi gündeme gelmiştir (66, 149).

Kombinasyon şeklinde kullanılması düşünülen iki antibiyotiğin *in vivo* kullanımından önce *in vitro* olarak sinerjik etkinin varlığı ve antagonist etkinin olup olmadığı araştırılmalıdır (150). Sinerji ya da en azından additif etkinin gösterilmesi klinik kullanım açısından anlamlıdır. *In vitro* etkinliği belirlemek için bizim de çalışmamızda kullanmış olduğumuz kalitatif sonuç veren “checkerboard” mikrodilüsyon ve kantitatif sonuç veren “time kill” yöntemleri geliştirilmiştir.

Antimikrobiyallerin kombinasyon şeklinde kullanılmasının çeşitli avantajları bulunmaktadır. İki ilacın birlikte kullanımı ile daha genişlemiş olan etki spektrumu ve çoğul etki mekanizması ile ilaç direncinin ortaya çıkmasını önleyebilir. Kombinasyon tedavilerinin en önemli avantajı bu şekilde mikroorganizmaların dirençli alt populasyonlarının ortaya çıkışını önlemesi ya da geciktirmesidir. Bu konudaki en güzel örnek tüberküloz ilaçlarının kombinasyon şeklinde kullanılması ve bu şekilde direnç oranının düşük tutulması olabilir (66). *Acinetobacter* türleri sözkonusu olduğunda ise bu konu özellikle kolistin için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle çalışmamızda kolistin kombinasyonları denenerek araştırılmıştır (151).

Kombinasyon tedavilerinin ikinci önemli avantajı ise doza bağlı toksisiteyi azaltma potansiyelidir. Bazı antimikrobiyaller terapötik dozlarda konakta toksik etkilere yol açarlar. Bu durumda doz düşürülerek diğer bir ilaç ile kombine edilebilir ve toksik yan etkiler azaltılmış olur. Yine çalışmamızda etkinliği araştırılan kolistin kombinasyon tedavileri kullanılarak nöro ve nefrotoksisite riski düşürülme şansı olabilir. Kombinasyon tedavilerinde dikkat edilmesi gereken en önemli konu ise iki ilaç arasında antagonizmanın olmamasıdır. Çalışmamızdaki seçeneklerde böyle bir antagonizma etki gözlenmemiştir (152).

Yeni tedavi seçenekleri konusunda yol gösterici olması açısından çalışmamızda, hastanemizde ciddi salgınlara yola açmış ve daha önceki çalışmalarla iyi tanımlanmış MDR ve PDR klinik *A. baumannii* izolatları seçilmiş ve bunlara

karşı kolistin, meropenem ve sulbaktamın hem tek başına ve hem de kombine etkinlikleri araştırılmıştır.

Bununla birlikte literatürde diğer çeşitli antimikrobiyal kombinasyonlarla ilgili yayınlar bulunmaktadır. Bunların bir kısmı klinik izlem çalışması olup ayrıca *in vitro* ve/veya *in vivo* ilaç etkinlik araştırmaları da yapılmıştır. Çalışmamızda denemiş olduğumuz kombinasyonlara yönelik olarak daha önce *in vitro* ve *in vivo* birlikte yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

Kolistine karşı dirençli suşlar hızlı bir şekilde ortaya çıktıkça, kombinasyon tedavilerinin direncin engellenmesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi de ön plana çıkmaktadır. Duyarlı patojenlerin çoğunun üremesini engelleyen terapötik konsantrasyonlar aynı zamanda popülasyonun dirençli mutant bakterilerini seçici olarak zenginleştiren konsantrasyonlardır. Bu nedenle tekli kullanımda direnç problemi hızla yaygınlaşmaktadır (142). Antimikrobiklerin kombine halde kullanılması ile dirençli suşların pozitif seçilimi minimize edilebilir.

Yaptığımız ön çalışmalarda çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* suşlarında kolistinin tek başına etkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle yaptığımız iki kombinasyonda da kolistin kullanılmıştır. Tek başına kolistinin etkinliği değerlendirildiğinde; MDR izolatların dirençli, diğer tüm izolatların duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bu durum kullanılan bakterilerin aynı hastanede gelişen salgınlardan izole edilen suşlardan seçilmesine bağlı olarak genotipik yakın ilişkili olma ihtimaline dayandırılabilir. Diğer olası mekanizma, biyolojik uyum bedeli “(biological fitness cost)” olarak düşünülebilir. Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi farklı mekanizmalar yolu ile olmakta ve bunun sonucunda, fenotipik, genotipik veya fizyolojik değişiklikler meydana gelebilmektedir. PDR mikroorganizmaların yeni antibiyotiklere direnç geliştirirken diğer virülans özelliklerinde de azalma olduğu bildirilmektedir (152). Buna bağlı olarak kolistine karşı duyarlı hale geçtiği düşünülebilir. Bu muhtemel mekanizmanın ileri çalışmalarla desteklenmesi uygun görülmüştür.

Daha önceki yayınlarda sulbaktamın *Acinetobacter* türlerine karşı tek başına intrinsek aktivitesinin olduğu belirtilmiş (153); olmasına rağmen çalışmamızda

sadece standart suş ve genel duyarlı izolatlar karşı etkinlik saptanmış, MDR ve PDR izolatlar karşı ise etkinlik gözlenmemiştir.

Kolistin-sulbaktam kombinasyonu uygulandığında tüm izolatların yarısında aditif etki gözlenirken, PDR izolatlarının tümünde aditif ve MDR izolatlarında aditif veya sinerjik etki şeklinde yüksek etkileşim bulunması özellikle dikkat çekicidir. Kolistin-sulbaktam kombinasyonunda PDR ve MDR izolatlarında aditif etki, duyarlı ve standart izolatta indiferan etki görülmüştür.

Ampisillin/sulbaktam/karbapenem kombinasyon tedavisinin etkinliği MDR *A. baumannii* bakteremilerinde, karbapenem dirençli deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında gösterilmiştir (154). Lee ve ark (155) bakteriyemi ve menenjit etkeni olan çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* suşlarında bu kombinasyonun sinerjik etkinliğini araştırmış ve sulbaktam dirençli suşlarda sulbaktam-kolistin kombinasyonunun sinerjik etkinlik gösterdiğini ve iyi bir tedavi seçeneği olacağını bildirmiştir.

Bir başka β laktamaz inhibitörü tazobaktamın, bir *A. baumannii* enfeksiyon modelinde, kolistin ve daptomisin gibi peptid antibiyotiklerin aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. β -laktamaz inhibitörleri ve peptid antibiyotikler arasındaki yapısal benzerlikler nedeniyle, β -laktamaz inhibitörlerinin peptid antibiyotiklerin etkisini potansiyelize edebileceği öne sürülmüştür (156). Bu nedenle çalışmamızda da sulbaktam kolistin kombinasyonunun etkinliği araştırılmıştır.

Acinetobacter türleri ile enfeksiyonlarda kolistin, meropenem, sulbaktam ile çeşitli diğer ilaçların kombinasyonu ile tedavi opsiyonlarını araştıran literatürdeki bazı çalışmalar Tablo 2’de özetlenmiştir. Bunların çok azında hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemler kullanılmıştır. Kolistin sulbaktam kombinasyonu için sadece iki adet retrospektif izlem çalışması bulunmaktadır. İkisi de 2014 yılında yapılan bu çalışmalardan ilkinde *A. baumannii* kan dolaşımı enfeksiyonlarında kolistin kombinasyonunun kolistin monoterapisine göre daha yüksek sağkalım oranları, yüksek mikrobiyolojik eradikasyon oranları, yüksek tedavi oranı göstererek daha iyi sonuçlar alındığı belirtilmiştir (73). Diğer çalışmada ise VAP tedavisinde; kolistin-sulbaktam kombinasyonunun ümit vaadedici olduğu gösterilmiştir (157).

Meropenem uygun güvenlik profili nedeniyle tercih edilen bir karbapenemdir. Uygun doz ayarlaması yapılarak kombinasyonlarda yer vermek aktivitesini arttırmak için pratik bir çözüm olabilir (158).

Kolistin meropenem kombinasyonu kullanılan iki klinik olgu ve başarılı tedavi sonucu bildirilmiştir (158-160). Bunun yanında çeşitli *in vitro* çalışmalar yapılmış ve bunlarda sinerjik etkinlik gösterilmiştir (155, 161, 162). Bir *in vivo* fare çalışmasında kolistin meropenem kombine tedavisinin kolistin MİK $\leq 32\mu\text{g/L}$ 'nin altında olması durumunda bile etkili olduğu gösterilmiştir (163). Son olarak *in vivo/in vitro* birlikte bir çalışmada karbapenem dirençli suşlarda bile meropenem MİK inden bağımsız olarak kolistin ile sinerjik etki rapor edilmiştir (164). Benzer olarak bir sistemik derleme ve meta analiz çalışma sonucuna göre; karbapeneme dirençli *A. baumannii* karşı bu kombinasyon tedavisi ile %80'e yaklaşan sinerji ortaya konulmuştur (165).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni MDR *A.baumannii* izolatlarında gradient testle sinerji araştırılmış ve kolistin/imipenem kombinasyonunda %13 sinerjik, %83.3 aditif etki; kolistin/sulbaktam kombinasyonunda %13 sinerjik ve %85.2 aditif etki bulunduğu bildirilmiştir (166). Bizim sonuçlarımıza göre kolistin-meropenem kombinasyonunda PDR izolatlarının tümünde aditif MDR izolatlarında ise aditif veya sinerjik etki gözlenmiştir. Standart suş ve duyarlı izolatlarda ise bu kombinasyona ait sinerji görülmemiştir. Bu veriler literatürle de uyumlu olarak meropenem dozunun optimize edildiği bir meropenem ve kolistin kombinasyonunun dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında kullanımını desteklemektedir.

Buna rağmen Rodriguez ve ark, karbapeneme dirençli bazı *A. baumannii* suşlarında antimikrobiyal ajanların kolistin ile kombine edilmesinin aktivitede azalmaya ve antibiyotik direncine neden olduğunu göstermiştir (167). Bu konunun daha geniş kapsamlı çalışmalarla araştırılarak aydınlatılması uygun görülmektedir.

Günümüzde eşlik eden etik ve lojistik kısıtlamalar memeli modellerinin kullanımını sınırlandırmaktadır. Mikroorganizmaların patogenezi aydınlatmak için *G. mellonella* larvalarının deneysel bir model olarak kullanımı pek çok çalışmada bildirilmiştir (168).

Bu mini modelin kullanımı memeli modellerinin çoğunu karşılamaktadır. Bunun yanında zaman, maliyet ve iş gücü açısından üstünlük göstermektedir ve uygulamalar için sertifika zorunluluğu bulunmaması en önemli avantajlarından biridir (169). Bu nedenle laboratuvarımızda üretimine geçilen *G. mellonella* larvaları *in vivo* ilaç etkileşimleri için deneysel bir model olarak seçilmiştir.

Kolistin/meropenem ve kolistin/sulbaktam kombinasyonlarının tedavideki potansiyeli hakkında *in vitro* elde ettiğimiz veriler *G. mellonella* larvaları kullanılarak *in vivo* olarak da desteklenmeye çalışılmıştır.

Deneylelerimiz sırasında, enfekte edilmemiş larvalara, kolistin, meropenem veya sulbaktam ilaçları verildikten dördüncü günün sonunda tümünün canlı olduğu tespit edildi. Buna bağlı olarak ilgili ilaçların *G. mellonella* larvaları üzerine doğrudan toksik etkisinin olmadığından emin olundu. Bununla birlikte kolistinin meropenem ve sulbaktam ile kombinasyonlarının, enfekte edilmiş larvaların duyarlı, MDR ve PDR *A. baumannii* enfeksiyonları tedavisinde sonuçları arasında uyumsuzluklar gözlemlendi. Kolistin/sulbaktam ile yapılan tedavi sonucunda PDR ile enfekte larvaların %20 oranında fayda gördüğü, duyarlı ve MDR ile enfekte edilenlerde ise sonucunun anlamlı değişmediği gözlemlendi. Buna karşın kolistin/meropenem ile yapılan tedavi PDR enfeksiyonları üzerine etkisiz, MDR ve duyarlı izolatlar üzerine ise yüksek oranda etkili olmuştur. Standart bir mikrobiyoloji laboratuvarında sinerji testlerinin uygulanması ilgili zorluklar vardır, özellikle sinerji testi için kabul edilmiş standartlar bulunmamaktadır. Test süreçleri zahmetli, zaman alıcıdır ve belirli prosedürlerde uzmanlık gerektirmektedir. Bunun yanında *in vitro* kombinasyon testlerinin klinik sinerjiyi öngörme gücü bilinmemektedir. Sinerjik verilerin uygunluğu farmakokinetik çalışmalar ve çok merkezli randomize klinik çalışmalar ile değerlendirilebilir.

Kombine tedavide kolistin ve ikinci antibiyotiklerin sinerjik etkisinin kesin mekanizması büyük ölçüde bilinmemektedir, ancak kombinasyonun immün modülatör aktivitelerinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (167). Bu fenomenin türe özgü olup olmadığı bilinmemektedir ve daha fazla araştırma gerektirmektedir.

Özetle, MDR ve PDR *A. baumannii* izolatlarına karşı kolistin/meropenem ve kolistin/sulbaktam kombinasyonlarının *in vitro* ve kısmen de *in vivo* olarak sinerjik

etkisi gözlenmiştir. Ancak, sonuçlarımız dikkatle değerlendirilmelidir. Bu çalışmanın kısıtlılıkları; sınırlı sayıda klinik izolatın kullanılması ve hayvan deneylerinin çok sayıda ve aynı gelişim evresinde larva gereksinimi nedeniyle tekrar edilememiş olmasıdır. Elde ettiğimiz güçlü *in vitro* sonuçlar *in vivo* sonuçlarla bire bir uyum göstermemiştir. Özellikle enfekte larvaların ilgili kombinasyonlarla tedavi sonuçları arasında tespit edilen uyumsuzlukların *in vivo* çalışmalar aynı yöntemlerle tekrar edilerek kontrol edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, *in vitro* ve zaman bağlı testlerle etkinliğini göstermiş olduğumuz kolistin/meropenem ve kolistin/sulbaktam kombinasyon tedavilerinin güvenli bir şekilde kullanılması için, bu kombinasyonun farmakokinetik parametreleri üzerinde *in vivo* olarak daha fazla ve kapsamlı çalışmaya gereksinim görülmektedir. Son olarak, bu kombinasyon rejimlerinin hasta tedavisinde kullanılmak üzere kabul edilmesinden önce prospektif klinik çalışmalarla bu sonuçların doğrulanarak desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, verilerimiz dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi için kolistin/sulbaktam ve kolistin/meropenem kombinasyonlarının ümit verici bir tedavi seçeneği olabileceği desteklemektedir.

6. SONUÇ

Yapılan checkerboard çalışması sonucunda antibiyotik kombinasyonlarında antagonist etki görülmemiştir. Kolistin/sulbaktam kombinasyonunun %54.5 additif, %9.1 sinerjik etki göstermiştir. Diğer kombinasyonumuz kolistin/meropenem de %36.4 additif, %18.1 sinerjik etki göstermiştir

Zamana bağlı kinetik öldürme sonuçları ise ATCC 19606 standart suşu ve duyarlı suşta iki kombinasyonda da iki katı MİK konsantrasyonlarında sinerjik etki, Kolistin/sulbaktam MDR ve PDR suşunda 1/2 MİK konsantrasyonunda sinerjik ,Kolistin/meropenem kombinasyonlarında PDR de MİK konsantrasyonunda MDR de ise 1/2 MİK konsantrasyonunda sinerjik etki bulunmuştur.

Deneyimizde ki in vivo modelin zahmetli olmasına aynı anda aynı büyüklükte yeterli larva sağlanamadığından eş zamanlı olarak bakterilere enfekte ve tedavi yapılamadığından etkili sonuçlar alınmadı bu nedenle daha kontrollü yapılması öngörüldü.

Sonuçlarımız kolistinin hem sulbaktam hem de meropenem ile kombinasyon halinde artmış aktiviteye sahip olduğunu ve hayatı tehdit eden MDR ve PDR Acinetobacter enfeksiyonları için umut vaat edebileceğini göstermektedir. Bu çalışma aynı zamanda klinik izolatlarda kolistin kombinasyonlarının etkinliğini hem in vitro hem de in vivo yöntemlerle değerlendiren ilk çalışma olarak dikkat çekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Louis B Rice. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*, 197(8):1079-1081, 2008.
2. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int*, 2475067: 8, <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>, 2016.
3. Kuo SC, Chang SC, Wang HY, Lai JF, Chen PC, Shiau YR, Huang IW, Lauderdale TL. Emergence of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex over 10 years: nationwide data from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) program. *BMC Infectious Diseases* 12:200, 2012.
4. Su CH, Wang JT, Hsiung CA, Chien LJ, Chi CL, Yu HT, Chang FY, Chang SC. Increase of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in acute care hospitals in Taiwan: association with hospital antimicrobial usage. *PLoS One*, 7(5):e37788, 2012.
5. Mendes RE, Farrell DJ, Sader HS, Jones RN. Comprehensive assessment of tigecycline activity tested against a worldwide collection of *Acinetobacter spp*(2005-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 68: 307–311, 2010.
6. Gordon NC, Wareham DW. A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline. *J Antimicrob Chemother*, 63: 775-780, 2009.
7. Penwell WF, Shapiro AB. Molecular mechanisms of sulbactam antibacterial activity and resistance determinants in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 1680-1689, 2015.
8. Lesho E, Yoon EJ, McGann P, Snesrud E, Kwak Y, Milillo M, Onmus-Leone F, Preston L, St Clair K, Nikolich M, Viscount H, Wortmann G, Zapor M, Grillot-Courvalin C, Courvalin P, Clifford R, Waterman PE. Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon 59 during colistin therapy of wound infections. *J Infect Dis*, 208:1142-1151, 2013.
9. Snitkin ES, Zelazny AM, Gupta J, Palmore TN, Murray PR, Segre JA. Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. *Genome Res*, 13: 117-119, 2013.

10. Tsai C.JY, San Loh J.M, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3): 214–229, 2016.
11. Falagas ME, Karveli EA. The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. *Clin Microbiol Infect*, 13: 117-119, 2007.
12. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Micro Rev*, 21(3): 538-82, 2008
13. Berezin BE, Towner KJ. *Acinetobacter spp* as nosocomial pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 9:148-65, 1996.
14. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. Washington: American Society Microbiology, 2003.
15. Bouvet PJ, Grimont PA. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* a. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 228-240, 1986.
16. Luisa CS Antunes, Paolo Visca, Kevin J. Towner. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71: 292-301, 2014.
17. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*, 73(4):355-6, 2009
18. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect*, 11: 868-873, 2005.
19. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE Jr, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 42:657-668, 2006.
20. Simor AE, Lee M, Vearncombe M, Jones- Paul L. An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: risk factors for acquisition and management. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 5(23): 261-267, 2002.
21. Cisneros J.M, Rodríguez-Banob J, Fernández-CuencacF, Riberad A, Vilad J, Pascualc A, Martínez-Martíneze L, BoufG, Pachón J. Risk-factors for the acquisition

- of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. Clin Microbiol Infect, 11: 874-879, 2005.
22. Ye JJ, Huang CT, Shie SS, Huang PY, Su LH, Chiu CH, Leu HS, Chiang PC. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for appearance of imipenem resistant strains on patients formerly with susceptible strains. PLoS One,5(4), e9947, 2010.
23. Chan MC, Chiu SK, Hsueh PR, Wang CC. Risk factors for healthcare-associated extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a case-control study. PLoS One, 9(1):e85973, 2014.
24. Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. J Hosp Infect,64:7-15, 2006.
25. Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PLoS One,6(8): e22674, 2011.
26. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Future Microbiol, 4: 273–78, 2009.
27. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. Microbiology, 154(11):3398–3409, 2008.
28. Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. Infect Immun, 80:228–233, 2012.
29. Fattahian Y, Rasooli I, Mousavi Gargari SL, Rahbar MR, Darvish Alipour Astaneh S, Amani J. Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). Microb Pathog, 51: 402–406, 2011.
30. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. BMC Genomics, 12: 126, 2011.
31. Mortensen BL, Skaar EP. The contribution of nutrient metal acquisition and metabolism to *Acinetobacter baumannii* survival within the host. Front Cell Infect Microbiol, 3:95, 2013.

32. Lee JC, Koerten H, Van Den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, Van Den Barselaar M, van der Reijden T, Van Der Meer J, Van Der Gevel J, Dijkshoorn L. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol*, 157: 360–366, 2006.
33. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Saubaran SL, MacDonald U, Schultz LW, Umland TC, Campagnari AA. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun*, 78: 3993–4000, 2010.
34. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol*, 7: 1127–1138, 2005.
35. Aranda J, Bardina C, Beceiro A, Rumbo S, Cabral MP, Barbé J, Bou G. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *J Bacteriol*, 193:3740–3747, 2011.
36. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, Sayood K, Iwen PC, Skaar EP, Dunman PM. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun*, 78:1952–1962, 2010.
37. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, Chae JP, Yoo SM, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol*, 10:309-319, 2008.
38. Sugawara E, Nikaido H. OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*, 194: 4089–4096, 2012.
39. Allen DM, Jarman BJ. *Acinetobacter* species. In Douglas Mandell(eds). *Principles and practices of infectious diseases*. New York. 7:2881, 2010.
40. Wadl M, Heckenback K, Noll I. Increasing occurrence of multi-drug resistant in *Acinetobacter baumannii* isolates from four German university hospitals 2002–2006. *Infection*, 38: 47-51, 2010.
41. AlsanM, Klompas M. *Acinetobacter baumannii*: An Emerging and Important Pathogen. *J Clin Outcomes Manag*, 17(8): 363-369, 2010.
42. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter species* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Dis, Clin Infect*, 43: 49-56, 2006.
43. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*, 358: 1271-1281, 2008.

44. Doi Y, Adams JM, Yamane K. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 4209-4210, 2007.
45. Fournier PE, Vallenet V, Berbe S. Comparative genomes of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet*, 2(1):e7, 2006.
46. Ignasi R, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol*, 3:148, 2012
47. Fournier P.E, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*, 42:692-699, 2006.
48. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*, 39:105-114, 2012.
49. Luna C.M. , Aruj P.K. Nosocomial *Acinetobacter pneumonia*. *Respirology*, 12: 787-791, 2007.
50. McDonald L.C, Banerjee S.N, Jarvis W.R. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987–1996. Nosocomial Infections Surveillance System. *Clin Infect Dis*, 29:1133-1137, 1999.
51. Gaynes R, Edwards J.R. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* :848-854, 2005.
52. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S.M, Seifert H, Wenzel R.P, Edmond M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, 39: 309-311, 2004.
53. Luna C.M., Aruj P.K. Nosocomial *Acinetobacter pneumonia*. *Respirology*, 12: 787-791, 2007.
54. Johnson E.N, Burns T.C, Hayda R.A, Hospenthal D.R, Murray C.K. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin Infect Dis*, 45: 409-415, 2007.
55. Oncul O, Keskin O, Acar H.V, Kucukardali Y, Evrenkaya R, Atasoyu E.M. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *J Hosp Infect*, 51: 47-51, 2002.
56. Tao C, Kang M, Chen Z, Xie Y, Fan H, Qin L, et al. Microbiologic study of the pathogens isolated from wound culture among Wenchuan earthquake survivors. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 63: 268-270, 2009.

57. Bergogne-Berezin E, Towner K.J. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*, 9: 148-165, 1996.
58. Stein A, Raoult D. Colistin: an antimicrobial for the 21st century? *Clin Infect Dis*, 35: 901-902, 2002.
59. Higgins P.G, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. In vitro activities of the β -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with β -lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 1586-1592, 2004.
60. Brauers J, Frank U, Kresken M, Rodloff A.C, Seifert H. Activities of various β -lactams and β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* DNA group 3 strains. *Clin Microbiol Infect*, 11:24-30, 2005.
61. Fishbain J, Peleg A.Y. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis*, 51: 79-84, 2010.
62. Li J, Rayner C.R, Nation R.L, Owen R.J, Spelman D. Heteroresistance to Colistin in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:2946-2950, 2006.
63. Wood C.G, Scott H.D, Martin C.A, Timothy F.C, Bradley B.A. Comparison of Ampicillin-Sulbactam and Imipenem-Cilastatin for the Treatment of *Acinetobacter* Ventilator-Associated Pneumonia. *Clin Infect Dis*, 34: 1425-1430, 2002.
64. Motaouakkil S, Charra B, Hachimi A, Benslama A. Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect*, 53: 274-278, 2006.
65. Reid GE, Grim SA, Aldeza CA, Janda WM, Clark NM. Rapid development of *Acinetobacter baumannii* resistance to tigecycline. *Pharmacotherapy*, 27:1198-1201, 2007.
66. Pillai SK, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. Philadelphia: *Antibiotics in Laboratory Medicine* 5th ed, : 365-440, 2005.
67. Hunter T.H. Use of streptomycin in treatment of bacterial endocarditis. *Am J Med*, 436-442, 1947.
68. Jawetz E, Gunnison JB, Colman VR. The combined action of penicillin with streptomycin or chloromycetin on enterococci in vitro. *Science*, 111: 254-256, 1950.

69. Turner PJ, Greenhalgh JM. The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000. *Clin Microbiol Infect*, 9:563-567, 2003.
70. Cisneros JM, Rodríguez-Baño J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect*, 8:687-693, 2002.
71. Lin M-F, Lan C-Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J Clin Cases*, 2(12), 787-814, 2014.
72. Oliveira MS, Kosta SF, Pedri Ed, Heijden I der van, Levin AS. The minimal inhibitory concentration for sulbactam was not associated with the outcome of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter sp.* treated with ampicillin/sulbactam. *Clinics (Sao Paulo)*, 4: 569-573, 2013.
73. Batirel A, Balkan II, Karabay O, Ağalar C, Akalin S, Alici O, Alp E, Altay FA, Altın N, Arslan F, Aslan T, Bekiroğlu N, Cesur S, Çelik AD, Doğan M, Durdu B, Duygu F, Engin DO, Gönen I, Güçlü E, Güven T, Hatipoğlu CA, Hoşoğlu S, Karahocagil MK, Kılıç AU, Ören B, Özdemir D. , Özer S. , Öztoprak N. , Sezak N. , Turhan V. , Türker N. , Yılmaz H. Comparison of colistin-carbapenem, colistin-sulbactam, and colistin plus other antibacterial agents for the treatment of extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.8:1311-1322, 2014.
74. Viehman J.A, Nguyen MH, Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs*, 12(74):1315-1333, 2014.
75. Shields R.K, Clancy CJ, Gillis LM, Kwak EJ, Silveira FP, Massih RC, Eschenauer GA, Potoski BA, Nguyen MH. Epidemiology, clinical characteristics and outcomes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections among solid organ transplant recipients. *PLoS One*, 12(7): e52349, 2012.
76. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat*,13(4-5): 132-138, 2010.
77. Lode HM. Rational antibiotic therapy and the position of ampicillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents*,32:10-28, 2008.
78. Rafailidis PI, Ioannidou E.N, Falagas M.E. Ampicillin/sulbactam: current status in severe bacterial infections. *Drugs*, 1829-1849, 2007.

79. Sili U, Mert A. Beta-Lactamase Inhibitors from 1986 to 2010. ANKEM Dergi, 24: 28-32, 2010.
80. Fisher J, Belasco JG, Charnas RL, Khosla S, Knowles JR. Beta-Lactamase inactivation by mechanism-based reagents. Royal Society Biol Sci, 289:309-319, 1980.
81. Buynak Jd, Doppalapudi VR, Adam G. The synthesis and evaluation of 3-substituted-7-(alkylidene)cephalosporin sulfones as β -lactamase inhibitors. Bioorg Med Chem Lett, 10:853-857, 2000.
82. Corbella X, Ariza J, Ardanuy C, Vuelta M, Tubau F, Sora E, Pujol M, Gudiol F. Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. Journal Antimicrob Chemother, 42:793-802, 1998.
83. Betrosian AP, Douzinas EE. Ampicillin–sulbactam: an update on the use of parenteral and oral forms in bacterial infections. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 5:1099-1112, 2009.
84. Kempf M, Djouhri-Bouktab L, Brunel J.M, Raoult D, Rolain JM. Synergistic activity of sulbactam combined with colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents, 39:180-181, 2012.
85. Mellon G, Clec'h C, Picard B, Cohen Y, Jaureguy F. Postsurgical meningitis due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* successfully treated with high doses of ampicillin/sulbactam combined with rifampicin and fosfomicin. J Infect Chemother, 18:958-960, 2012.
86. Pei G, Mao Y, Sun Y. In vitro activity of minocycline alone and in combination with cefoperazone–sulbactam against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Microb Drug Resist, 18: 574-577, 2012.
87. Santimaleeworagun W, Wongpoowarak P, Chayakul P, Pattharachayakul S, Tansakul P, Garey KW. In vitro activity of colistin or sulbactam in combination with fosfomicin or imipenem against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 42: 890-900, 2011.
88. Chu H, Zhao L, Wang M, Liu Y, Gui T, Zhang J. Sulbactam-based therapy for *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 17:389-394, 2013.

89. İlaçlar şirketi. www.accessdata.fda.gov.2017.[Alıntı Tarihi: 09 12 2019.].
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/209776s001lbl.pdf.
90. Cho JC, Zmarlicka MT, Shaeer KM, Pardo J. Meropenem/Vaborbactam, the First Carbapenem/ β -Lactamase Inhibitor Combination. *Ann Pharmacother*, 8(52):769-779, 2018.
91. Nicolau DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother*, 9(1): 23-37, 2008.
92. Edwards SJ, Emmas CE, Campbell HE. Systematic review comparing meropenem with imipenem plus cilastatin in the treatment of severe infections. *Curr Med Res Opin* , 21(5):785-794, 2005.
93. Hellinger WC, Brewer NS. Karbapenemler ve monobaktamlar: imipenem, meropenem ve aztreonam. *Mayo Clin Proc*, 74: 420-434, 1999.
94. Bonfiglio G, Russo G , Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11(4): 529-544, 2002.
95. Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro: Activity against Characterized Isolates, Mutants, and Transconjugants and Resistance Selection Potential. *Antimikrob Ajanlar Chemother*, 48(8), 3086–3092, 2004.
96. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother*, 47(3): 247-250, 2001
97. Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro: Activity against. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(8): 3086-3092, 2004.
98. Tellado JM, Wilson SE. Empiric Treatment of Nosocomial Intra-Abdominal Infections: A Focus on the Carbapenems. *Surgical Infections*, 6(3): 329-343, 2005.
99. Ünal S, Garcia-Rodriguez JA. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 53: 265-271, 2005
100. Jones RN, Biedenbach DJ, Gales AC. Sustained activity and spectrum of selected extended-spectrum β -lactams (carbapenems and cefepime) against *Enterobacter spp.* and ESBL-producing *Klebsiella spp.*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (USA, 1997–2000). *Int J Antimicrob Agents*, 21(1): 1-7, 2003.

101. Bax RP, Bastain W, Tüy Taşı A, Wilkinson DM, Hutchison M, Haworth SJ. The pharmacokinetics of meropenem in volunteers. *J Antimicrob Chemother*, 24:311-320, 1989.
102. Nacarkucuk E, Sağlam H, Okan M. Meropenem Decreases Serum Level of Valproic Acid. *Pediatr Neurol*, 31(3):232-234, 2004.
103. Wilson S.E. Results of a Randomized, Multicenter Trial of Meropenem Versus Clindamycin/Tobramycin for the Treatment of Intra-Abdominal Infections. *Clin Infect Dis*, 24(2):197-206, 1997.
104. Embil JM, Soto NE, Melnick DA. A post hoc subgroup analysis of meropenem versus imipenem/cilastatin in a multicenter, double-blind, randomized study of complicated skin and skin-structure infections in patients with diabetes mellitus. *Clinical Therapeutics*, 6(3):269-282, 2005
105. Horton J, Pankey GA. Polymyxin B, Colistin, and Sodium Colistimethate. *Med Clin Kuzey Am*, 66(1):135-142, 1982.
106. Boinett CJ, Cain AK, Hawkey J, Do Hoang NT, Khanh NNT, Thanh DP, Dordel J, Campbell JI, Lan NPH, Mayho M, Langridge GC, Hadfield J, Chau NVV, Thwaites GE, Parkhill J, Thomson NR, Holt KE, Baker S. Clinical and laboratory-induced colistin-resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genom*, 5(2): e000246, 2019.
107. Catchpole CR, Andrews JM, Brenwald N, Wise R. A reassessment of the *in vitro* activity of colistin sulphomethate sodium. *J Antimicrob Chemother*, 39(2):255-260, 1997.
108. Chan EL, Zabransky RJ. Determination of synergy by two methods with eight antimicrobial combinations against tobramycin-susceptible and tobramycin-resistant strains of *Pseudomonas*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 6(2):157-164, 1987.
109. Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J. Bacteriol*, 179(22): 7040-7045. 1997.
110. Lesho E, Yoon EJ, McGann P, Snesrud E, Kwak Y, Milillo M, Onmus-Leone F, Preston L, St Clair K, Nikolich M, Viscount H, Wortmann G, Zapor M, Grillot-Courvalin C, Courvalin P, Clifford R, Waterman PE. Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections. *J Infect Dis*, 208(7): 1142-1151, 2013.

111. Snitkin E.S, Zelazny A.M, Jyoti Gupta, Tara N. Palmore, Patrick R. Murray, Julia A. Segre. Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. *Genome Res*, 23(7):1155-1162, 2013.
112. Chang-Ro Lee, Jung Hun Lee, Moonhee Park, Kwang Seung Park. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol*, 7(55), 2017.
113. Bilgehan, Prof.Dr.Hakkı. Klinik mikrobiyoloji tanı. 3(8):149-150, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 2002.
114. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 49(11):1749-1755, 2009.
115. Deniz G. Minimum İnhibitör Konsantrasyon Saptama Yöntemleri: Sıvı Dilüsyon, Agar Dilüsyon ve Antibiyotik Gradyent test. *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi*, 46:11-25, 2016.
116. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3: 163 – 175, 2008.
117. Cornaglia G, Rossolini GM. Forthcoming therapeutic perspectives for infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Clin Microbiol Infect*, 15: 218-223, 2009.
118. Hunter TH. Use of streptomycin in treatment of bacterial endocarditis. *Am J Med*, 2: 436-442, 1947.
119. Jawetz E, Gunnison JB, Colman VR. The combined action of penicillin with streptomycin or chloromycetin on *Enterococci* in vitro. *Science*, 111: 254-256, 1950.
120. King TC, Schlessinger D, Krogstad DJ. The assessment of antimicrobial combinations. *Rev Infect Dis*, 3: 627- 633, 1981.
121. Fischbach MA. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol*, 14: 519-523, 2011.
122. Mehta KC, Dargad RR, Borade DM, Swami OC. Burden of antibiotic resistance in common infectious diseases: Role of antibiotic combination therapy. *J Clin Diagn Res*, 8: 5-8, 2014.
123. Derbentli Ş. Antimikrobiyal Maddeler. [çev.] Bozkaya E. *Tıbbi Mikrobiyoloji I- Nobel Tıp Kitabevleri*, 107-141, 2002.

124. Bal Ç. Antibiyotik Kombinasyonlarının İn vitro Etkinliğinin Saptanması. Flora dergisi, 4(4): 219-229, 1999.
125. Isenberg H.D. Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2:5.0.1, Washington, 2004.
126. Wojda I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. Insect Sci. 24(3): 342-357, 2017.
127. Vilcinskas A, anti-infective therapeutics from the Lepidopteran model host *Galleria mellonella*. Current Pharmaceutical Design, 17: 1240–1245, 2011.
128. Yeung AT, Gellatly SL and Hancock RE. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. Cellular and Molecular Life Sciences, 68: 2161–2176, 2011.
129. Ezzati-Tabrizi R. Insect inducible antimicrobial peptides and their applications. Current Protein and Peptide Science, 14: 698–710, 2013.
130. Li WB, Tailhades J, O'Brien-Simpson NM, Separović F, Otvos L Jr, Hossain MA, Wade JD. Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria. Amino Acids, 46: 2287–2294, 2014.
131. Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 98: 5807–5822, 2014.
132. Keebaugh E.S, Schlenke T. Insights from natural host–parasite interaction: the *Drosophila* model. Developmental and Comparative Immunology, 42: 111-123, 2014.
133. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. Journal of Visualized Experiments, 70: e4392, 2012.
134. Sass M, Kiss A, Locke M. Integument and hemocyte peptides. Journal of Insect Physiology, 40: 407–421, 1994.
135. Lavine, M.D. and Strand, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32: 1295–1309, 2002.
136. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmelie Y, Falagas ME, Giskef CG, Harbarth S, Hindlerh JF, Kahlmeteri G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Ricel L.B, Stellingm J, Struelensa MJ, Vatopoulo A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect, 18(3):268–281, 2011.

137. Wang Y, Li H , Xie X , Wu X, Li X, Zhao Z , Luo S , Wan Z , Liu J , Fu L , Li X. *In vitro* and *in vivo* assessment of the antibacterial activity of colistin alone and/or in combination with other antibiotics against *A. baumannii* and *E. coli*. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2019.
138. Peleg A.Y, Jara S, Monga D, Eliopoulos G.M, Moellering RC Jr, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. Antimicrob Agents Chemother, 53(6): 2605-2609, 2009.
139. Hornsey M, Wareham DW. In Vivo Efficacy of Glycopeptide-Colistin Combination Therapies in a *Galleria mellonella* Model of *Acinetobacter baumannii* Infection. Antimicrobial agents and chemotherapy, 7(55): 3534–3537, 2011.
140. Schaad UB, Guenin K, Straehl P. Single-Dose Pharmacokinetics of Intravenous Sulbactam in Pediatric Patients. Reviews of Infectious Diseases, 8(5): 512–517, 1986.
141. Wei W, Yang HQ, Hu L, Ye, Y, Li J. Activity of levofloxacin in combination with colistin against *Acinetobacter baumannii*: In vitro and in a *Galleria mellonella* model. J Microbiol Immunol Infect: 50(6), 821-830, 2015.
142. Yang H, Chen G, Hu L. *In vivo* activity of daptomycin/colistin combination therapy in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. Int J Antimicrob Agents, 45(2): 188-191, 2015.
143. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Q. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. Drug Resistance Updates, 15(4): 237-247, 2012.
144. Madhuri M. Sopirala, Julie E. Mangino, Wondwossen A. Gebreyes, Beth Biller, Tammy Bannerman, Joan-Miquel Balada-Llasat, Preeti Pancholi. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 54(11): 4678-4683, 2010.
145. Lee HJ, Bergen PJ, Bulitta JB, Tsuji B, Forrest A. Synergistic activity of colistin and rifampin combination against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57(8): 3738 – 3745, 2013.
146. Hartzell JD, Eff R, Ake J, Howard R, Olson S, Paolino K, Vishnepolsky M, Weintrob A, Wortmann G. Nephrotoxicity associated with intravenous colistin

(Colistimethate sodium) treatment at a tertiary care medical center. *Clinical Infectious Diseases*, 48(12): 1724-1728, 2009.

147. Paterson D, Harris P.NA. Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. *The Lancet Infectious Diseases*, 16: 132-133, 2016.

148. T.C Sağlık Bakanlığı Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Özet Raporu, 2017.

149. Aktas G. Antibiyotik Kombinasyonları ve Sinerjistik Etkileşimleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 44(2):47-55, 2014.

150. Odds F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*, 52(1):1, 2003.

151. Deveson Lucas D, Vinç B, Wright A, Han ML, Moffatt J, Bülach D, Gladman SL, Powell D, Aranda J, Seemann T, Machado D, Pacheco T, Marques T, Viveiros M, Ulus R, Li, J, Harper M, Boyce JD. Emergence of High-Level Colistin Resistance in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate Mediated by Inactivation of the Global Regulator H-NS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(7), 2018.

152. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, Öztaş S, Poulain J, Segurens B, Robert C, Abergel C, Claverie JM, Raoult D, Médigue C, Weissenbach J, Cruveiller S. Comparative Analysis of *Acinetobacters*: Three Genomes for Three Lifestyles. *PLoS One*, 19: e1805, 2008.

153. Chu H, Zhao L, Wang M, Liu Y, Gui T, Zhang J. Sulbactam-based therapy for *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*, 17: 389-394, 2013.

154. Kuo LC, Lai CC, Liao CH, Hsu CK, Chang YL, Chang CY, Hsueh PR. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: clinical features, antimicrobial therapy and outcome. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 196–198, 2007.

155. Lee CH, Tang YF, Su LH, Chien CC, Liu JW. Antimicrobial effects of varied combinations of meropenem, sulbactam, and colistin on a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate that caused meningitis and bacteremia. *Microb Drug Resist*, 14:233-237, 2008.

156. Sakoulas G, Rose W, Berti A, Olson J, Munguia J, Nonejuie P, Sakoulas E, Rybak MJ, Pogliano J, Nizet V. Classical β -lactamase inhibitors potentiate the activity of daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and

colistin against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 61: e01745, 2016.

157. Kalin G, Alp E, Akin A, Coskun R, Doganay M. Comparison of colistin and colistin/sulbactam for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Infection*, 42:37, 2014.

158. Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, Nation RL, Li J . Agents of Last Resort: Polymyxin resistance. *Infect Dis Clin North Am*, 3(2): 391–414, 2016.

159. Candel FJ, Calvo N, Head J, Sánchez A, Matesanz M, Culebras E, Barrientos A, Picazo J. A combination of tigecycline, colistin, and meropenem against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a renal transplant recipient: pharmacodynamic and microbiological aspects. *Rev Esp Quimioter*, 23(2):103-108, 2010.

160. Biancofiore G. Colistin, meropenem and rifampin in a combination therapy for multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* multifocal infection. A case report. *Minerva Anestesiologica*, 73(3): 181-185, 2007.

161. Pankuch GA, Lin G, Seifert H, Appelbaum PC. Activity of meropenem with and without ciprofloxacin and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 52:333–336, 2008.

162. Liang W, Liu X. F, Huang J, Zhu D. M, Li J, Zhang J. Activities of colistin- and minocycline-based combinations against extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. *BMC Infect. Dis.* 11: 109, 2011

163. Bing Fan, Jie Guan, Xiumei Wang, Yulong Cong. Activity of Colistin in Combination with Meropenem, Tigecycline, Fosfomycin, Fusidic Acid, Rifampin or Sulbactam against Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Murine Thigh-Infection Model. *Plos One*, 11(6), e0157757, 2016.

164. Lenhard JR, Bulitta JB, Connell TD, King-Lyons, Landersdorfer CB, Cheah SE, Thamlikitkul V, Shin BS, Rao G, Holden PN, Walsh TJ, Forrest A, Ulus RL, Li J, Tsuji BT. High-intensity meropenem combinations with polymyxin B: new strategies to overcome carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72: 153–165, 2017.

165. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, Carmeli Y, Paul M. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*, 10: 5104-5111, 2013.

166. Ak Ö, Haciseyitoglu, D, Cag Y, Gencer S, Biteker F, Ozer S. In vitro activities of colistin combined with imipenem, tigecycline or cefoperazone-sulbactam against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* blood-stream isolates. *Disease and Molecular Medicine*, 4(4):51-54, 2016.
167. Rodriguez CH, De Ambrosio A, Bajuk M, Spinozzi M, Nastro M, Bombicino K, Radice M, Gutkind G, Vay C, Famiglietti A. In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. *J Infect Dev Ctries*. 4(3):164-167, 2010.
168. Wenjuan Wei, Haifei Yang, Lifen Hu, Ying Ye, Jiabin Li. Activity of levofloxacin in combination with colistin against *Acinetobacter baumannii*: In vitro and in a *Galleria mellonella* model. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(6):821-830, 2017.
169. Nalini Ramarao, Christina Nielsen-Leroux, Didier Lereclus. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *J Vis Exp*, 70:4392, 2012.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul İzni



T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

TOPLANTI TARİHİ : 03/04/2019
TOPLANTI NO : 2019/05

KARARLAR :

- 15- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2019-56-03/04 Protokol no'lu "Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarıyla Geliştirilen Enfeksiyonlarda Sulbaktam + Kolistin ve Meropenem + Kolistin Kombinasyon Tedavi Etkinliğinin *Galleria mellonella* Deneysel Modelinde İn Vivo Olarak Araştırılması" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R

Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Zonguldak ilinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Zonguldak'ta tamamladıktan sonra önlisans öğrenimini 1997-1999 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Trabzon Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulunda Tıbbi Laboratuvar bölümünde, 2011-2014 yılları arasında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisansını tamamladı. 2016 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Moleküler laboratuvarında çalışmakta ve görevine devam etmektedir.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres: Güney mah. dere sok. Lebiderya sitesi A1 blok no:1
Kozlu/ZONGULDAK

Tel: (+90) 536 421 10 42

E-posta: e_ldan@hotmail.com