

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

HASTANE İNFEKSİYONU ETKENİ OLARAK BELİRLENMİŞ,  
ÇOKLU ANTİBİYOTİK DİRENCİ GÖSTEREN  
*ACINETOBACTER BAUMANNII* KLİNİK İZOLATLARININ  
İMİPENEM VE MEROPENEMİN, SEFOPERAZON-  
SULBAKTAM, AMPİSİLİN-SULBAKTAM, POLİMİKSİN-B VE  
RİFAMPİN İLE KOMBİNASYONLARINA DUYARLILIĞININ  
İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Dr. Ayşegül ÖZSEVEN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN

ISPARTA – 2011

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

HASTANE İNFEKSİYONU ETKENİ OLARAK BELİRLENMİŞ,  
ÇOKLU ANTİBİYOTİK DİRENCİ GÖSTEREN  
*ACINETOBACTER BAUMANNII* KLİNİK İZOLATLARININ  
İMİPENEM VE MEROPENEMİN, SEFOPERAZON-  
SULBAKTAM, AMPİSİLİN-SULBAKTAM, POLİMİKSİN-B VE  
RİFAMPİN İLE KOMBİNASYONLARINA DUYARLILIĞININ  
İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Dr. Ayşegül ÖZSEVEN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN

Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
Tarafından 2380-TU-10 Proje Numarası ile Desteklenmiştir

ISPARTA – 2011

## ÖNSÖZ

Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN başta olmak üzere, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Selçuk KAYA ve Sayın Doç.Dr. Mustafa Demirci hocalarıma, uzmanlık eğitimimde ve tez çalışma sürecimde büyük bir sabır ve özveriyle emeğini, bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Doç.Dr. Emel SESLİ ÇETİN hocam'a teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma ve laboratuvar tecrübelerini benimle paylaşan tüm biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışma sürecimde bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki asistan arkadaşlarıma ve hocalarıma, çalışmalarına sağladıkları bilimsel katkılardan dolayı Sayın Doç.Dr. Banu SANCAK'a ve Sayın Remzi KULEOĞLU'na teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan sevgili annelerime, babama ve kardeşlerime, yoğun çalışma sürecimde her türlü yardım ve desteğini büyük bir sabırla benden esirgemeyen hayat arkadaşım, sevgili eşim Levent'e ve biricik kızım Elif Ece'ye teşekkür ederim.

**Dr. Ayşegül ÖZSEVEN**

**Isparta-2011**

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Taksonomi ve Tarihçe.....	3
2.2. <i>A.baumannii</i> 'nin Genel Özellikleri .....	3
2.3. <i>A.baumannii</i> 'nin Laboratuvar Tanısı ve İdentifikasyonu .....	4
2.4. <i>A.baumannii</i> 'nin Epidemiyolojisi .....	5
2.5. <i>A.baumannii</i> İnfeksiyonlarının Patogenezi ve Virulans Faktörleri.....	6
2.6. <i>A.baumannii</i> İnfeksiyonlarında Klinik Tablo ve Risk Faktörleri.....	7
2.6.1. Hastane Kaynaklı Pnömoni.....	8
2.6.2. Toplum Kaynaklı Pnömoni .....	8
2.6.3. Bakteriyemi .....	8
2.6.4. Deri ve Yumuşak Doku İnfeksiyonları .....	9
2.6.5. Üriner Sistem İnfeksiyonları .....	9
2.6.6. Meningenjit .....	9
2.6.7. <i>A.baumannii</i> 'nin Neden Olduğu Diğer İnfeksiyonlar .....	9
2.7. <i>A.baumannii</i> 'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları .....	9
2.7.1. $\beta$ -laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları .....	11
2.7.1.1. $\beta$ -laktamazlar (Enzimatik $\beta$ -laktam Direnci) .....	11
2.7.1.2. Non Enzimatik Mekanizmalar .....	12
2.7.2. Aminoglikozitlere Karşı Direnç Mekanizmaları.....	14
2.7.3. Florokinolonlara Karşı Direnç Mekanizmaları .....	14
2.7.4. Polimiksinlere Karşı Direnç Mekanizmaları.....	15
2.7.5. Tetrasiklin ve Glisilsiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları .....	15
2.7.6. Diğer Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları .....	15
2.8. <i>A.baumannii</i> İnfeksiyonlarının Tedavisi .....	16
2.8.1. Sulbaktam ve Kombinasyonları .....	16

2.8.2. Karbapenemler .....	17
2.8.3. Polimiksinler .....	17
2.8.4. Rifampin.....	18
2.8.5. Aminoglikozitler .....	19
2.8.6. Tetrasiklinler .....	19
2.8.7. Tigesiklin (TGC).....	19
2.8.8. Monoterapide İntravenöz $\beta$ -laktamların Sürekli İnfüzyonu.....	20
2.8.9. Yeni Ajanlar, Peptidler .....	20
2.8.10. Kombinasyon Tedavileri.....	21
2.9. Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkinliklerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan In Vitro Testler .....	22
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>25</b>
3.1. Bakteri İzolatları.....	25
3.2. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyonu.....	25
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	25
3.4. Mikrodilüsyon Testlerinde Kullanılan Antibakteriyal İlaçlar.....	27
3.5. Çözücü ve Sulandırıcıların Hazırlanması.....	28
3.6. Sıvı Besiyerinin Hazırlanması.....	29
3.7. Üreme Kontrol İndikatörünün Hazırlanması .....	29
3.8. Antibiyotik Kombinasyonları.....	29
3.9. MİK Değerlerinin Saptanması .....	30
3.10. Dama Tahtası (Checkerboard) Yöntemi .....	33
3.11. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntem .....	37
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>40</b>
4.1. <i>A.baumannii</i> İzolatlarının Klinik Özellikleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları ...	40
4.2. Kombinasyonda Kullanılan Antibiyotiklerin MİK Sonuçları.....	41
4.3. Kombinasyonlardan Elde Edilen Etkileşimler .....	42
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>48</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>60</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>62</b>

**KISALTMALAR**

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>AFLP</b>	: Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>ARDRA</b>	: Amplified 16S rRNA gene restriction analysis
<b>AK</b>	: Amikasin
<b>BD</b>	: Becton Dickinson
<b>BK</b>	: Besiyeri Kontrolü
<b>BSAC</b>	: British Society for Antimicrobial Chemotherapy
<b>CAZ</b>	: Seftazidim
<b>CDC</b>	: Centers for Disease Control and Prevention
<b>CİP</b>	: Siprofloksasin
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMS</b>	: Kolistimetat sodyum
<b>CN</b>	: Gentamisin
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EMB</b>	: Eozin Metilen Blue
<b>ESBL</b>	: Extended-spectrum beta-lactamase (genişlemiş spektrumlu beta laktamaz)
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>FEP</b>	: Sefepim
<b>FİK</b>	: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu
<b>ΣFİK</b>	: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksi
<b>FTS</b>	: Fizyolojik Tuzlu Su
<b>İPM</b>	: İmipenem
<b>İV</b>	: İntravenöz
<b>İYE</b>	: İdrar Yolu Enfeksiyonu
<b>KAMHB</b>	: Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth
<b>LB</b>	: Luria Bertani besiyeri
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarid
<b>MBL</b>	: Metallo Beta-Laktamaz
<b>MDR</b>	: Multi Drug Resistant

<b>MEM</b>	: Meropenem
<b>MI</b>	: Minosiklin
<b>MİK</b>	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>OMP</b>	: Outer membrane protein (dış membran proteini)
<b>PB</b>	: Polimiksin B
<b>PBP</b>	: Penisilin bağlayan protein
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PDR</b>	: Pan Drug Resistant
<b>RİF</b>	: Rifampin
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>tRNA</b>	: Taşıyıcı Ribonükleik asit
<b>rRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>SAM</b>	: Ampisilin/sulbaktam
<b>SCP</b>	: Sefoperazon/sulbaktam
<b>SDÜ</b>	: Süleyman Demirel Üniversitesi
<b>SSS</b>	: Santral Sinir Sistemi
<b>SXT</b>	: Trimetoprim/sülfametoksazol
<b>TİK</b>	: Tikarsilin
<b>TGC</b>	: Tigesiklin
<b>TLR</b>	: Toll-like receptor
<b>UV</b>	: Ultraviolet
<b>ÜK</b>	: Üreme Kontrolü
<b>VİP</b>	: Ventilatör İlişkili Pnömoni
<b>YBÜ</b>	: Yoğun bakım ünitesi

**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo 1.</b> <i>Acinetobacter</i> türlerinin temel özellikleri .....	4
<b>Tablo 2.</b> <i>A.baumannii</i> 'nin antibiyotik direnç mekanizmaları.....	10
<b>Tablo 3.</b> <i>A.baumannii</i> için CLSI tarafından önerilen disk difüzyon duyarlılık zon çapları.....	27
<b>Tablo 4.</b> Antimikrobik ilaçların stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli çözücü ve sulandırıcılar.....	28
<b>Tablo 5.</b> CLSI'nin <i>A.baumannii</i> için MİK değerleri .....	31
<b>Tablo 6.</b> Bakterilerin izole edildiği klinik örneklerin gönderildikleri ünitelere göre dağılımı .....	40
<b>Tablo 7.</b> <i>A.baumannii</i> suşlarının disk difüzyon testi ile antimikrobiyal duyarlılık sonuçları .....	41
<b>Tablo 8.</b> <i>A.baumannii</i> suşlarının broth mikrodilüsyon testi ile bulunan MİK sonuçları .....	42
<b>Tablo 9.</b> Kombinasyonlardan elde edilen etkileşimler .....	46



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> İzolatların her bir antibiyotik için MİK değerleri belirlenirken kullanılan plağın temsili şekli .....	31
<b>Şekil 2.</b> A ve B ilaçları için pipetaj formatı .....	35
<b>Şekil 3.</b> 96 kuyucuklu plağı temsil eden üremelerin kaydedildiği örnek format .....	36
<b>Şekil 4.</b> Kombinasyondaki ilaçların FİK değerlerini gösteren şekil .....	38
<b>Şekil 5.</b> İPM/SAM için örnek dama tahtası plağı .....	38
<b>Şekil 6.</b> Örneğin FİK değerlerini gösteren şekil .....	38
<b>Şekil 7.</b> Kullanılan yöntemin şekil üzerinde gösterilmesi .....	39
<b>Şekil 8.</b> Yöntemlerin şekil üzerinde gösterilmesi. ....	58

**RESİMLER DİZİNİ**

<b>Resim 1.</b> Bir izolattan elde edilen antibiyotik MİK sonuçlarını gösteren plak .....	32
<b>Resim 2.</b> Aditif etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü. ....	43
<b>Resim 3.</b> Sinerjistik etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.....	44
<b>Resim 4.</b> Sinerjistik etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.....	44
<b>Resim 5.</b> Aditif etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü. ....	45
<b>Resim 6.</b> Sinerjistik etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.....	46
<b>Resim 7.</b> Tanımlanamayan etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü. ....	47
<b>Resim 8.</b> Aditif etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü. ....	47

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

*Acinetobacter* türleri, doğada ve hastane ortamında yaygın olarak bulunan ve insan örneklerinden *Pseudomonas aeruginosa*'dan sonra ikinci en sık izole edilen nonfermentatif bakterilerdir. Hastanede yatan hastaların kolonizasyon ve infeksiyonunda önemli rol oynarlar. Bu grup içinde hastane infeksiyonu salgınlarında en sık izole edilen ve antibiyotiklere en dirençli tür *Acinetobacter baumannii*'dir. Fırsatçı patojen olarak çoklu ilaç dirençli (MDR: Multi Drug Resistant) *A.baumannii* infeksiyonlarının sayısı küresel olarak son yirmi yılda artmıştır ve nozokomiyal Gram negatif patojenler içerisinde kontrol ve tedavisi en güç olanlardan biri haline gelmiştir (1-4).

*A.baumannii*'nin özellikle Yoğun Bakım Ünitesine (YBÜ) yatan hastaların %71'ini yatışı takiben birinci haftanın sonunda kolonize ettiği ve bu hastalarda *A.baumannii* ile ilişkili infeksiyonların arttığı gösterilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yapılan bir çalışmada, 10 yıllık bir süreçte Yoğun bakım ünitelerinden elde edilen Gram negatif izolatlar incelendiğinde 10 yılın sonunda *A.baumannii*'nin çoklu ilaç direncinin 4 kattan fazla arttığı görülmüştür (4,5).

Günümüzde *A.baumannii* suşlarına bağlı oluşan infeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı giderek artan direnç tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (6,7). Son yıllarda sürveyans çalışmalarında bu bakterilere karşı halen birinci seçenek olmayı sürdüren karbapenemlere karşı da direncin artmakta olduğu görülmektedir (4,5). Antibiyotiklere artan direnç oranları bu bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kombine antibiyotik uygulamalarını zorunlu kılmaktadır. Kombinasyon tedavileri, MDR *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde, alternatif bir seçenek olmuştur ve ampirik kombinasyon tedavileri klinisyenlerce genel bir uygulama haline gelmiştir. Bu nedenle araştırmacılar tedavi etkinliğini artırmak amacıyla çeşitli ilaç kombinasyonları ile çalışmaya yönelmiştir. Kombine antibiyotik kullanımı özellikle hayatı tehdit eden ciddi infeksiyonların tedavisinde, dirençli suşlara karşı sinerjistik etki sağlanmasında, ilaçların doza bağlı toksisitesinin azaltılmasında ve polimikrobiyal infeksiyonların tedavisinde prognozu etkileyen önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir (2,8).

*A.baumannii*'ye karşı intrensek aktivitesi bilinen sulbaktam, polimiksin B, kolistin gibi çeşitli antimikrobiyallerin özellikle karbapenemlerle ikili ya da üçlü kombinasyonlarının sinerjik, additif ya da antagonist etkilerini değerlendiren bir çok in vitro çalışma yapılmıştır (9-14).

Polimiksinler, hastane infeksiyonlarına sebep olan Gram negatif bakterilere karşı en yüksek aktiviteye sahip antimikrobiyal ajanlardır ve çeşitli çalışmalarda MDR *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde son seçenek, kurtarıcı ilaç grubu olarak tanımlanmıştır. Çoklu ilaç direncinin getirdiği aciliyet, in vitro duyarlılık testlerinde kullanılan antibiyotiklerin ve kombinasyonların sayısının ve çeşitliliğinin artırılmasını gerekli kılmaktadır. Polimiksinlerin, rifampin veya imipenemle olan kombinasyonlarının, tek başlarına kullanımlarına göre etkiyi değiştirdiği ve oluşabilecek ilaç yan etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Ancak yapılan pek çok in vitro çalışma, klinisyenlerce tercih edilen bazı kombinasyonların antagonist etkili olabildiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle tercih edilen kombinasyon tedavilerinin seçiminde in vitro sinerji testleri yol gösterici olmaktadır (15-17).

Özellikle çoklu ilaç dirençli mikroorganizmaların sebep olduğu hastane kaynaklı infeksiyonların tedavisinde, hasta için en uygun ve etkin ilaç kombinasyonlarını belirlemek, hem hastanın sağaltımı hem de hastane salgınının önlenmesi ve infeksiyon kontrolü açısından hayati önem taşımaktadır. Bu amaçla uzun zamandır MDR *A.baumannii* tedavisinde klinisyenlerce sıklıkla tercih edilen karbapenemlerin, bu bakteriye etkinliği bilinen sulbaktam ile olan kombinasyonlarının incelenmesi, ayrıca polimiksin B ve rifampinle olabilecek yeni kombinasyonların etkinliğinin ortaya konması, klinisyenlere yol gösterici olacak, minimal etkin ilaç dozunun kombinasyonlarla azaltılması neticesinde ilaç yan etkileri en aza indirgenecek ve etkin tedavi seçeneğinin belirlenmesini sağlayacaktır.

Bu çalışmada, SDÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinden laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve MDR *A.baumannii* olarak tanımlanmış 34 *A.baumannii* izolatının, tedavide klinisyenlerce sıklıkla tercih edilen antimikrobiyaller olan, imipenem (İPM) ve meropenemin (MEM), sefoperazon-sulbaktam (SCP), ampisilin-sulbaktam (SAM), polimiksin B (PB) ve rifampin (RİF) ile olan kombinasyonlarına duyarlılığının in vitro olarak araştırılması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Taksonomi ve Tarihçe

*Acinetobacter* türleri ilk kez 1911’de topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak adlandırılmıştır. Takip eden yıllarda benzer organizmalar tanımlanmış ve en az 15 değişik tür adı bildirilmiştir. Günümüzde kullanılan *Acinetobacter* ismi ilk kez Brisou ve Pre’vot tarafından 1954’de ortaya atılmıştır. 1968’de Baumann ve ark. tanımlanan bu 15 değişik türün aslında tek bir familyaya ait olduklarını bildirmişler ve *Acinetobacter calcoaceticus* ismi Bergey’in sistematik bakteriyoloji el kitabının 1974 baskısında tek bir tür adı olarak listelenmiştir (18-21).

1986’da Bouvet ve Grimont, DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarını baz alarak, 12 genetik türünü tanımlamışlardır. Bunlar arasında *A.baumannii*, *A.calcoaceticus*, *A.haemolyticus*, *A.johnsonii*, *A.junii* ve *A.lwoffii* sayılabilir (22). Daha sonra yapılan çalışmalarla 20 ek *Acinetobacter* türünün de belirlenmesiyle en son toplam 32 genomik tür sayısı tanımlanmıştır (18,23).

*A.calcoaceticus*, *A.baumannii*, *Acinetobacter genomik tür-3* ve *Acinetobacter genomik tür-13TU*, birbirleriyle yakın ilişkilidirler ve fenotipik özellikleri açısından ayırt edilmeleri zordur. Bu yüzden bu dördü tek bir isim altında toplanarak, bu bakteriler için, *A.calcoaceticus-A.baumannii* complex terimi kullanılmaktadır (18).

### 2.2. *A.baumannii*'nin Genel Özellikleri

*Gammaproteobacteria* grubunda yer alan *Moraxellaceae* ailesinden, zorunlu aerop, sporsuz, Gram negatif, hareketsiz, fermentasyon yapmayan bakterilerdir. Oksidaz negatif, katalaz pozitif ve indol negatiftir. Birçok türü nitratları nitritlere indirgeyemez. Fimbriaları vardır ve hareketsizdirler (1,18). İnsan kaynaklı *Acinetobacter* türleri, genel üretim besiyerlerinde 35- 37°C’de kolayca üretilebilirler. Üremenin logaritmik fazında kısa, iri, bazen boyanma problemi gösteren, Gram negatif, 1,0–1,5 µm uzunluğunda basil şeklinde, üremenin duraklama fazında kok veya kokobasil şeklinde görülmektedir. Pozitif kan kültürü şişelerinden hazırlanan preparatlarda Gram pozitif kok olarak görülebilirler. Koyun kanlı agarda düzgün, mukoid, gri-beyaz koloniler oluştururlar. Bazı türler hemolitik özellik gösterebilirler.

MacConkey agarda ve Eozin Metilen Blue (EMB) agarda laktoz negatif koloniler oluştururlar. Enterobakterilerden daha küçük, opak, pigmentsiz, S tipi koloniler meydana getirirler. Bazı türleri pigmet oluşturabilirler (1,18,24).

### 2.3. *A.baumannii*'nin Laboratuvar Tanısı ve İdentifikasyonu

*Acinetobacter* türlerini diğer nonfermentatif Gram negatif bakterilerden ve major *Acinetobacter* türlerini birbirlerinden net olarak ayıran tek bir metabolik test yoktur. Tablo-1'de major *Acinetobacter* türlerini ayırt eden temel özellikler görülmektedir (1).

**Tablo 1.** *Acinetobacter* türlerinin temel özellikleri

Acinetobacter türleri	44°C'de üreme	Glukoz oksidasyonu	Hemoliz
<i>A.baumannii</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif
<i>A.calcoaceticus</i>	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>A. haemolyticus</i>	Negatif	Pozitif	Pozitif
<i>A.lwoffii</i>	Negatif	Negatif	Negatif

*Acinetobacter* türlerinin identifikasyonu için DNA-DNA hibridizasyonu referans standarttır. Bouvet ve Grimont'un 1986'da tanımladığı 28 fenotiplendirme testi içinde; glukozdan asit üretimi, 37, 41 ve 44 derecelerde üretme, jelatin hidrolizi ve 14 farklı karbon kaynağının asimilasyonu gibi uygulamalar yer almaktadır (22). *A.baumannii*'nin identifikasyonu için geliştirilen moleküler yöntemler arasında; çoğaltılmış 16S rRNA gen analizi (ARDRA), high-resolution fingerprint analysis by amplified fragment length polymorphism (AFLP), ribotiplendirme, tRNA parmak izi analizi, 16S-23S rRNA gen ayırma bölgelerinin sekans analizi ve RNA polimeraz  $\beta$ -subunit gen analizi sayılabilir. ARDRA ve AFLP analizi günümüzde tür identifikasyonu için onaylanan referans metotlardır. *A.calcoaceticus*-*A.baumannii* kompleks içinde yer alan türleri birbirinden ayırt etmek için ribotiplendirme ve 16S-23S rRNA gen ayırma bölgelerinin sekans analizi bir arada kullanılır. Ancak bu yöntemler rutin laboratuvarlarda uygulanamaz ve sadece referans laboratuvarlarında kullanılırlar (18).

Günümüzde *A.baumannii* identifikasyonu yaparken kullanılmak üzere 3 yeni yöntem tanımlanmıştır. Bunlar; bla OXA-51 tipi karbapenemaz geninin belirlenmesi, PCR elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi ve bakterilerin gyrB genlerindeki

kendilerine ait farklılıkların PCR bazlı metotla tespit edilmesidir. İdentifikasyon için rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan manuel veya yarı-otomatik sistemler (API 20NE, Vitek 2, Phoenix vs), sınırlı veri bankaları nedeniyle ve kullandıkları parametrelerin *Acinetobacter*'lere özgü olmamasından dolayı *A. calcoaceticus-A.baumannii* kompleks içinde yer alan türleri birbirinden ayırt edemezler ve bunların hepsini *A.baumannii* olarak tiplendirirler (18,25).

#### 2.4. *A.baumannii*'nin Epidemiyolojisi

Avrupa'da 1980'den beri ortaya çıkan *A.baumannii* hastane salgınları, epidemiyolojik tiplendirme metodları kullanılarak incelenmiştir (24,26). Belirli MDR *A.baumannii* suşlarının hastaneler arasında ve hatta şehirler ve ülkeler arasında transmisyonu, kolonize hastaların transferi ile gerçekleşmektedir. İngiltere'deki güneydoğu klonu ve OXA 23 klon 1 ve 2'nin yayılımı, Portekiz'deki bir MDR *A.baumannii* klonunun yayılması, Fransa'da VEB-1 ESBL üreten bir *A.baumannii* klonunun 55 medikal merkez ve hastaneler arasında yayılımı ve İspanya'nın değişik bölgelerindeki 9 hastane arasında yayılan bir *A.baumannii* klonunun gözlenmesi bu duruma örnek gösterilebilir. Ek olarak Belçika, Danimarka, Çek Cumhuriyeti, Fransa, İspanya, Hollanda ve İngiltere gibi kuzey Avrupa ülkelerine ait hastanelerde gözlenen Avrupa klonları I, II ve III olarak adlandırılan üç uluslararası *A.baumannii* klonu, aynı dönemlerde İtalya, İspanya, Yunanistan ve Türkiye gibi güney ve güneydoğu Avrupa ülkelerine ait hastanelerde de rapor edilmiştir (18,27,28).

*A.baumannii*'nin karbapenem direncinin Türkiye, Yunanistan, İtalya, İspanya ve İngiltere'de en yüksek, Almanya ve Hollanda'da en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (28). 2002-2004 yıllarında 48 Avrupa hastanesinden elde edilen verilerle yapılan bir sörveyans raporunda izolatların sadece %73,1'inin meropeneme ve %69,8'inin imipeneme duyarlı olduğu bildirilmiştir. *A.baumannii* izolatlarının Avrupa'da polimiksine direnç oranları çok düşük düzeydedir (29,30).

ABD'de bir CDC yayımına göre, 1986'da YBÜ menşeli pnömonilerin %4'ünün etkeni *A.baumannii* iken, 2003'te bu oran %7'ye yükselmiştir (31). ABD'de nozokomiyal *Acinetobacter* infeksiyonlarının mevsimsel varyasyon gösterdiği ve açıklanamayan bir şekilde yaz ayları sonunda artış gösterdiği söylenmektedir (18). ABD'de karbapenem dirençli *A.baumannii* salgınları ilk kez

1991-1992 yıllarında görülmüş, bunu ESBL üreten *Klebsiella pneumoniae*'ye bağlı bir başka salgın izlemiş ve ardından imipenem kullanımı oldukça artmıştır. Bu salgınlardaki mikroorganizmalar çoklu ilaç dirençliydi ve sadece polimiksin ve ampisilin/sulbaktama duyarlıydı (32). Daha sonraki yıllarda da ABD'den birçok MDR veya pan-drug resistant (PDR) *A.baumannii* salgını bildirilmiştir (18).

Asya-Pasifik, Avrupa, Latin Amerika ve Kuzey Amerika olmak üzere dört büyük coğrafi bölgeden elde edilen 2621 *Acinetobacter spp* izolatına karşı polimiksin B için direnç oranları, Kuzey Amerika'da %1.7, Asya-Pasifik bölgesinde %1.9, Avrupa'da %2.7 ve Latin Amerika'da %1.7 bulunmuştur. Karbapenem dirençli suşların %2.8'i, MDR suşların ise %3.2'si polimiksin B'ye dirençli bulunmuştur. Asya ve Ortadoğu'dan tigesiklin ve polimiksin B'yi de içeren çok sayıda PDR *A.baumannii* salgını bildirilmiş, 2001-2004 yılları arasında imipenem ve meropenem için % 25 ve SAM için %40 direnç oranları rapor edilmiştir (18,30).

### **2.5. *A.baumannii* İnfeksiyonlarının Patogenezi ve Virulans Faktörleri**

Bu organizma için birkaç virulans faktörü tanımlanmıştır ancak toksin veya sitolizin ürettiğine dair bir bilgi yoktur. MDR ve antibiyotik duyarlı *A.baumannii* ile çevresel orjinli *Acinetobacter baylyi* arasındaki karşılaştırmalı genomik çalışmalar göstermiştir ki, pilus biyogenezi, demir alımı ve metabolizması, sinyal yolları ve bir tip-4 sekresyon sistemini de içeren genleri taşıyor olması bu organizmanın virulansı ile ilişkilidir (33).

*A.baumannii*, biyofilm oluşturarak biyolojik ve biyolojik olmayan yüzeylere nüfuz edebilir. Bu özellik birçok bakteri için, protezler üzerinde kolonizasyon oluşturmak, ilaç direncine yol açmak ve kaynağın immün sisteminden kurtulmak için kullandığı patojenik özelliktir (34,35). *A.baumannii*'nin biyofilm oluşturması, hastane ortamında ve cihazların yüzeyinde uzun süre canlı kalabilmesi nedeniyle, özellikle kateter kaynaklı hastane infeksiyonlarında önemli bir virulans faktörüdür. Yapılan çalışmalar *Acinetobacter* türlerinin %14 oranında biyofilm oluşturduğunu göstermiştir (36). Organizmanın bazı dış membran proteinlerini (OMPs) içermesi biyofilm oluşturma yeteneğiyle ilişkilidir (23). Benzer bir ilişki biyofilm formasyonu ile PER-1  $\beta$ -lactamaz arasında da vardır. Yapılan çalışmalarda antibiyotik direncinden sorumlu PER-1  $\beta$ -lactamaz enziminin virülansı ve mortaliteyi arttırdığı



gösterilmiştir (34,37). Bunlara zıt olarak, biyofilm formasyonu ile siprofloksasin direnci arasında negatif bir korelasyon vardır (38).

*A.baumannii*'nin polisakkarit yapıdaki kapsülü, bakteri yüzeyinin daha hidrofilik olmasını sağlar ve bakteriyi fagositozdan korur. İçerdiği fimbrialar sayesinde konakçı epiteline, intravenöz kateter ve trakeal kanül gibi materyallerin yüzeyine tutunmayı sağlayarak bakterinin virulansını artırır (24).

*A.baumannii*'nin bir diğer virulans faktörü, demir kullanımımıdır. Bakteri, siderofor ve acinetobaktin gibi demir elde etmesini sağlayan molekülleri salgılar ve aynı zamanda bir hemin utilizasyon sistemini üretir. *A.baumannii* bakteriyemisi geçirdikten sonra iyileşen bireylerde, demir bağlayıcı proteinlere karşı bir immünolojik aktivite geliştiği gözlenmiştir (23).

Gram negatif sepsisin gelişiminde temel molekül olan *A.baumannii* lipopolisakkaritinin (LPS) inflamatuvar potansiyeli olduğu keşfedilmiştir. Bu LPS, insan monositlerinde proinflamatuvar sitokin salınımını, TLR-2 ve TLR-4 yolaklarını kullanarak güçlü bir şekilde tetikler. *A.baumannii*'nin inflamatuvar yanıtı uyarma yeteneği, infeksiyonun patogenezi belirgin düzeyde etkiler ve bakterinin patojenitesini artırır (20).

## **2.6. *A.baumannii* İnfeksiyonlarında Klinik Tablo ve Risk Faktörleri**

*Acinetobacter* cinsi bakteriler virülansı düşük kabul edilen, hastane kaynaklı infeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenlerdir. Nozokomiyal infeksiyonlar hastaneye yatıştan 48-72 saat sonra ve hasta taburcu olduktan sonra 10 gün içinde gelişir (39). Kolonizasyon ve infeksiyonu ayırt etmek zordur. Ancak her ikisi için de risk faktörleri aynıdır. Bunlar; uzun süreli hospitalizasyon, YBÜ'nde yatış, geçirilmiş cerrahi girişimler, yanıklar, enteral beslenme, mekanik ventilatöre bağlı kalma, idrar sondası, endotrakeal tüp veya trakeostomi varlığı, santral venöz kateter kullanımı, uzun süren antimikrobiyal tedavi, konakçı immün sisteminin baskılandığı malignite gibi altta yatan ciddi bir hastalığın varlığı, konakçının yaşı ve özellikle huzurevi sakinlerinde ve duyarlı kişilerde kolonizasyonun olması gibi durumlardır (1,40).

*Acinetobacter* türleri kuru ve cansız yüzeylerde 5 ay gibi uzun bir süre yaşayabildikleri için, insan rezervuarları ve hastane materyalleri vasıtasıyla hastalar

arasında belirgin geçiş özelliği gösterirler (24). Ayrıca çok sayıda kazanılmış direnç mekanizmalarına sahip olması, özellikle MDR infeksiyonların ve salgınların sık görülmesine neden olur. Salgınlarının çoğu, klimalar, mekanik ventilasyon ekipmanları ve hasta yatakları gibi çevresel kaynaqlıdır (40,41).

### 2.6.1. Hastane Kaynaklı Pnömoni

Ventilatör ilişkili pnömoni (VİP), *A.baumannii*'nin oluşturduğu en yaygın infeksiyondur. Çoğu zaman üst solunum yolu kolonizasyonunu gerçek pnömoniden ayırt etmek güçtür. Buna rağmen *A.baumannii*'ye bağlı gerçek VİP'lerin sık görüldüğü bilinmektedir. ABD'den bildirilen büyük sürveyans çalışmalarında YBÜ kaynaklı tüm pnömonilerin %5-10 kadarı *A.baumannii*'ye bağlıdır. Genel olarak hastaların YBÜ'sinde uzun süre yatış öyküleri vardır. Ancak salgın durumlarında hastalarda çok daha kısa sürede infeksiyon gelişmektedir (18,31).

### 2.6.2. Toplum Kaynaklı Pnömoni

Avustralya ve Asya'nın tropikal bölgelerinde gözlenir. Hastalık tipik olarak alkolizm öyküsü olan kişilerde mevsimsel olarak yağışların fazla olduğu yaz aylarının sonu ve kış aylarının başları gibi görülür ve bazen hastalarda yoğun bakım ihtiyacı oluşabilir. Özellikle sekonder bakteriyemiye sebep olabilen ve mortalite oranı %40-60 düzeyinde olan fulminan bir klinik tablo ile karakterizedir (18,42).

### 2.6.3. Bakteriyemi

ABD'de 1995-2002 yılları arasında nozokomiyal bakteriyemi ile ilgili yapılan büyük çaplı bir çalışmada *A.baumannii* en yaygın 10. etyolojik ajan olarak belirlenmiş ve bütün tek ajanlı bakteriyemilerin %1,3'ünden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Sıklıkla yoğun bakım kaynaklıdır ve YBÜ'sindeki mortalite hızı %34-43,4 iken, yoğun bakım dışı ünitelerde bu oran %16,3'tür. YBÜ'lerindeki bakteriyemi etkenleri arasında 3. en yüksek mortaliteye sahip ajandır ve onu sadece *P.aeruginosa* ve *Candida* türlerine bağlı infeksiyonlar geçmektedir. *A.baumannii* bakteriyemisi hospitalizasyon sırasında görülen bakteriyemiler içinde en geç ortaya çıkar (ortalama 26 gün). Bakteriyeminin kaynağı olarak, altta yatan pnömoni, İdrar yolu infeksiyonu (İYE) veya yara yeri infeksiyonu gösterilmektedir (18,43)

#### 2.6.4. Deri ve Yumuşak Doku İnfeksiyonları

YBÜ ve yanık ünitelerinde gözlenir. Bir çalışmada YBÜ kaynaklı deri/yumuşak doku infeksiyonlarının %2,1'inde etken olarak *A.baumannii* izole edilmiştir. Açık tibial fraktürü olan savaş yaralılarının incelendiği bir çalışmada en yaygın (%32,5) izole edilen organizma olmuştur (31,44).

#### 2.6.5. Üriner Sistem İnfeksiyonları

YBÜ kaynaklı İYE'lerinin sadece %1,6'sından sorumludur. Bakteri tipik olarak kateter kaynaklı infeksiyon veya kolonizasyon ile ilişkilidir. *A.baumannii* ile sağlıklı bireylerde komplike olmayan İYE genellikle beklenmez (18,31).

#### 2.6.6. Menenjit

Nörolojik ameliyatlardan sonrası nozokomiyal *A.baumannii* menenjiti sık görülmektedir. Sıklıkla nörocerrahi geçirmiş ve external ventriküler drenaj sağlanan hastalarda görülür. Ve mortalite oranları %70'lere kadar çıkmaktadır (18).

#### 2.6.7. *A.baumannii*'nin Neden Olduğu Diğer İnfeksiyonlar

Nadir de olsa bazı çalışmalar *A.baumannii* endokarditinin varlığını rapor etmektedir. Bunların çoğu kapak protezi olan vakalardır. Kontakt lens kullanımı veya göz cerrahisi sonrası, keratit etkeni olarak da görülmektedir (18,45).

#### 2.7. *A.baumannii*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Bazı MDR izolatlarının genomik yelpazeleri araştırıldığında, çoklu direnç genleri içeren birçok büyük genomik adanın (AbaR1, R2, R3 ve R5) varlığı tespit edilmiştir. *Acinetobacter* türleri arasında antibiyotik direnç genlerinin aktarımı konjugasyon mekanizmasıyla olur. Farklı büyüklüklerde ve çok sayıda plazmid taşıdıkları bilinmektedir ve bazı çalışmalarda direnç genlerinin plazmidlerle aktarıldığı gösterilmiştir. Ayrıca bakteri kromozomunda yer alan transpozonlar çoklu antibiyotik direnç genlerinin aktarımından sorumludur (24,46).

Direnç mekanizmaları arasında,  $\beta$ -laktamlara karşı enzim üretimi, aminoglikozitlere karşı modifiye enzimleri, kinolonlara karşı bağlanma bölgelerinin

yok edilmesi, birkaç çeşit eflux mekanizması ve dış membran proteini değişiklikleri bildirilmiştir. Bunların bir kaçı veya hepsi bir araya gelerek *A.baumannii*'nin MDR ve PDR fırsatçı bir patojen haline gelmesine sebep olur (18).

Tablo-2'de *A.baumannii*'nin farklı sınıf antibiyotiklere karşı ortaya çıkan major direnç mekanizmaları görülmektedir (23).

**Tablo 2.** *A.baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları

Antimikrobiyalsınıf/ Direnç mekanizması	Sınıf/aile	Varyasyonlar
β-Laktamlar β-Laktamazlar	Intrensek sefalosporinaz Sınıf A/yüksek prevalans ESBLA Sınıf A/ düşük prevalans ESBLA Sınıf D OXA enzimleri/ESBLM-D	AmpC (ADC1-7), VEB-1, -2 PER-1,-2, TEM-92, -116 SHV-12,-5, CTX-M-2, -3 SCO-1, OXA-51-like
Karbapenemazlar	SınıfDOXAenzimleri/ESBLCARA- MBLs/ESBLCARBA-B Sınıf Akarbapenemaz/ESBLCARB-A	D-OXA-23-27,-37,-40,-58 like VIM, IMP, SIM, GES-11
OMP kaybı	CarO, HMP-AB, 33-36 kDa protein 43 kDa protein	
Efluks pompası	AdeABC	
PBP'lerde bozulma		PBP2 downregulation
Tetrasiklinler Efluks pompası	MFS RND	TetA, TetB AdeABC
Ribozomal koruma		TetM
Glisilsiklinler:Efluks pompası	RND	AdeABC
Aminoglikozitler Enzimatik parçalanma	Asetiltransferazlar, fosfotransferazlar, Nükleotidiltransferazlar	AacC1/2, AadA, AadB, Ant1 AphA1, AphA6
Efluks pompaları	RND , MATE	AdeABC, AdeM
16s rDNA metiltransferazlar		ArmA
Kinolonlar DNAgiraz/topoizomeraz mutasyonları		GyrA/ParC
Efluks pompaları	RND, MATE, BIMP	AdeABC, AdeM, AbeS
Kloramfenikol Efluks pompaları	RND, MFS, BIMP	AdeABC, CmlA, CraA AbeS
Trimetoprim/sulfometoksazol Efluks pompası	RND	AdeABC, AdeIJK
Dihidropteroat sentaz		SulI/II
Dihidrofolat redüktaz		FoIA
Makrolitler: Efluks pompaları	MATE, BIMP	AbeM, AbeS
Polimiksinler	PmrAB iki-kısımlı mutasyon	

### 2.7.1. $\beta$ -laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

*A.baumannii*'nin  $\beta$ -laktam direnci, enzimatik ve non-enzimatik yollarla olmaktadır (47).

#### 2.7.1.1. $\beta$ -laktamazlar (Enzimatik $\beta$ -laktam Direnci)

$\beta$ -laktam direncinin en yaygın mekanizmasıdır. Genellikle tek bir direnç mekanizması değil, birçok mekanizma birlikte çalışarak  $\beta$ -laktam direncine yol açar.

*A.baumannii* intrensek bir sınıf-D oksasilinaz ve indüklenemeyen kromozomal bir AmpC sefalosporinaz içerir. Bu sefalosporinazlar bütün *A.baumannii* suşlarında mevcuttur ve günümüzde *Acinetobacter* kaynaklı sefalosporinazlar (ADCs) olarak da adlandırılırlar. Bu enzimin aşırı salınımını düzenleyen IS*AbaI* olarak bilinen bir IS elementidir. IS*AbaI* elementi *A.baumannii*'ye özgüdür ve varlığı, artmış AmpC gen ekspresyonu ve geniş spektrumlu sefalosporinlere gözlenen direnç ile yüksek oranda korelasyon gösterir. *A.baumannii*'de oksasilinazlara bağlı karbapenem direnci için IS elementleri önemlidir. Karbapenemler, bu enzimlere cevap olarak aktivitelerini kaybederler. IS elementleri ayrıca *A.baumannii*'nin diğer antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde de önemli rol oynar (18,48,49).

*A.baumannii*'de MBL'ler OXA-tip karbapenemazlardan daha az sıklıkta görülmesine rağmen, karbapenemlere karşı hidrolitik aktiviteleri daha fazladır. Bu enzimler, karbapenemler de dahil bütün  $\beta$ -laktamları hidrolize etme yeteneğine sahiptir. Bugüne kadar tanımlanan 5 MBL grubundan sadece 3'ü *A.baumannii*'de gözlenir. Bunlar, İMP, VIM ve SIM tipleridir (18). MBL'ler aztreonam dışında diğer  $\beta$ -laktamlar ve karbapenemlere karşı yüksek düzeyde direnç göstermektedir ve genellikle OXA tipi enzimlerden farklı olarak kompleks sınıf-1 integronlarla ilişkilidir (23). Bu integronlar direnç unsurlarının ekspresyonunu sağlayan özelleşmiş genetik yapılarıdır. *A.baumannii*'de birçok kazanılmış MBL geni sınıf 1 integronlar içinde yer alır ve integron taşıyan izolatlarda integronsuz olanlara göre daha fazla ilaç direnci görülmektedir (50). Bu genetik yapının en önemli klinik özelliği, bir antimikrobiyal ajanın aşırı kullanımı sonucu çoklu direnç determinantlarının aşırı

ekspresyonuna yol açmasıdır. Ayrıca integronlar, plazmidler veya transpozonlar aracılığıyla aktararak, direnç yayılımında rol oynarlar (18).

*A.baumannii* için Ambler sınıf A grubundan olan geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar (ESBL) da tanımlanmıştır. Bu  $\beta$ -laktamazlar içinde TEM, SHV, CTX-M, GES, SCO, PER ve VEB ailelerinin  $\beta$ -laktamazları vardır. Geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı oluşan direnç, bu enzimlerin üretimine bağlıdır. Ancak, bu direnç, Amp C ile oluşan dirençten daha nadir görülür (18). ESBL'ler içinde, VEB-1 enzimi ilk olarak 2001 yılında Fransa'da tanımlanmıştır (51). PER-1 enzimi ise ilk kez 1996 yılında Türkiye'de saptanmıştır ve bu enzimi taşıyan *A.baumannii* suşları ile oluşan infeksiyonların prognozunun daha kötü olduğu tespit edilmiştir (37).

*A.baumannii*'nin oksasilinazları OXA-51 tipi enzim grubuna aittirler. OXA-51 benzeri genler, organizmayı tür düzeyinde tanımlayabilmeye yarayan önemli bir genetik markırdır. Bunlar, penisilinleri ve karbapenemleri zayıf bir şekilde hidrolize edebilirler ancak, geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı aktif değildirler (23,25).

*A.baumannii*'de karbapenem direncinin en yaygın enzimatik modeli blaOXA-23, blaOXA-40 ve blaOXA-58 benzeri genler tarafından kodlanan oksasilinaz üretimidir. Bunlar, klavulonik asitle inhibe edilemezler ve dünyanın birçok bölgesinde gözlenirler. OXA-51 tipi enzimler,  $\beta$ -laktam direncine yol açabilmek için ISAbal elementinin varlığına ihtiyaç duyarlar. Bu element aynı zamanda sulII'nin aracılık ettiği sülfonamid direncinin de uyarıcısıdır (18,23).

### 2.7.1.2. Non Enzimatik Mekanizmalar

Bunlar, dış membran proteinlerinde değişiklikler (OMPs), eflux pompaları ve penisilin bağlayan proteinlerin (PBPs) afinitesi ve ekspresyonundaki değişikliklerdir (18,23).

**i) Porin değişiklikleri (Permeabilite defektleri):** Membran permeabilitesinde dış membrandan madde transportunu sağlayan porinler olarak görev alan OMP'lerin azalmasına sebep olacak şekilde değişimler olması ile direnç artmaktadır. *A.baumannii* diğer Gram negatif bakterilere oranla daha az porine sahiptir ve bunlar onun intrinsek antimikrobiyal direncinde görev almaktadır. *A.baumannii*'deki dış membran porinleriyle ilgili çok az şey bilinmektedir. Günümüzde CarO adıyla

bilinen 29 kDa protein kaybının imipenem ve meropenem direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu protein sadece *Moraxellaceae* ailesinin bir bireyi olan yeni bir OMP ailesine aittir. CarO üzerinde imipenemin bağlandığı özel bir bölge yoktur. Yani bu porin, spesifik olmayan kanallar meydana getirir. İkinci bir protein olan Omp25, CarO ile ilişkilidir, ancak bu proteinin por (gözenek, kanal) oluşturma kapasitesi yoktur. *A.baumannii*'deki imipenem direnci CarO porinlerinin kaybıyla oluşur. Porin kaybı en çok  $\beta$ -laktam direnci ile ilişkilidir ve burada 33-36 kDa proteini azalmıştır.  $\beta$ -laktam direnci ile ilgili tanımlanmış diğer OMP'ler arasında, HMP-AB, OprD ve OmpW sayılabilir (18,23).

ii) Multidrug eflux sistemleri: Aktif eflux mekanizmalarıyla ilaçların uzaklaştırılması çoklu ilaç direncinin oluşumuna yardım eder. MDR *A.baumannii* genomu çok sayıda eflux pompası kodlamaktadır. MFS (Major Facilitator Superfamily) içinde yer alan dar spektrumlu pompalar, tetrasiklin (TetA, TetB) ve minosiklin (TetB) direncinde rol alır ve aynı zamanda kloramfenikolün dışarı atılımını sağlayan CmlA sistemini de içerir. Ancak TetA da, TetB de tigesiklini etkileyemez. RND (resistance-nodulation-cell division) tipi pompalar periplazmik iç ve dış membran bölümlerini içeren 3 komponentli pompalardır. *A.baumannii*'de iki sistem karakterize edilmiştir. Bunlar, AdeABC ve AdeIJK'dır (23,52).

Bu güne kadar en iyi tanımlanan RND tipindeki AdeABC pompası,  $\beta$ -laktamları, aminoglikozitleri, eritromisini, kloramfenikolü, tetrasiklinleri, florokinolonları, trimetoprimi ve etidyum bromidi etkileyen geniş bir profile sahiptir (18). Bu pompa 3 komponentlidir. AdeA, iç membran füzyon proteinini, AdeB, transmembran parçasını ve AdeC ise, OMP'yi içerir. AdeABC kromozomal olarak AdeS ve AdeR tarafından kodlanır. Bu genlerdeki nokta mutasyonları pompanın aşırı çalışmasına sebep olur, ancak bu mutasyonlar olmadan da pompa çalışabilir (53,54). MATE (multidrug and toxic compound extrusion) ailesinin bireyi olan AbeM pompasının da aşırı çalışması, kinolonlara, gentamisine, kanamisine, eritromisine, kloramfenikole ve trimetoprime duyarlılığın azalmasına sebep olur (23). En yeni tanımlanan eflux sistemi AbeS ise, BIMP (bacterial integral membrane protein) ailesinin bir üyesidir ve kinolonlar, makrolidler ve kloramfenikole karşı oluşan dirençten sorumlu olduğu gösterilmiştir. En güncel olarak MDR *A.baumannii*'de

dirence yol açan etken olarak AdeS geninin bir IS elementi olan IS<sub>Aba1</sub> ile parçalanması tanımlanmıştır (54,55).

iii) Penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişikliklerin oluşması: Bu direnç, kromozomal mutasyonlar sonucu PBP'lerin antibiyotiklere afinitelerinin azalması veya afinitesi düşük yeni PBP'lerin sentezlenmesi şeklinde görülmektedir (56).

### 2.7.2. Aminoglikozitlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Bu direnç, efluks pompaları ve aminoglikozid modifiye enzimleri aracılığıyla olmaktadır. Aminoglikozit direnci için, asetiltransferazlar, nükleotidiltransferazlar ve fosfotransferazlar gibi major enzim sınıfları tanımlanmıştır ve bu enzimler *A.baumannii*'de sıklıkla bir arada bulunmaktadır. Bunlar, plazmidler ve transpozonlar üzerinde veya sınıf-1 integronlarla birlikte bulunabilirler. Sınıf-1 integronlara lokalize 12 farklı gen bulunmuştur. Bu genlerin ekspresyonu farklı aminoglikozitlere değişken düzeyde duyarlılığa yol açmaktadır (18,23,57).

Aminoglikozit direncine yol açan bir başka enzim seti de 16s rRNA metiltransferazlardır (ArmA). Bu gen, genellikle blaOXA-23 ile birlikte görülmektedir. 16s rRNA metilasyonu aminoglikozitin hedef bölgeye bağlanmasını bozarak, klinik olarak etkili bütün aminoglikozitlerde yüksek düzeyde dirence sebep olur. Aminoglikozitler AdeABC eflux pompasının hidrofilik özelliği nedeniyle bu pompadan etkilenmez. Son zamanlarda tanımlanan ve MATE ailesinin bir üyesi olan AbeM pompası esas olarak aminoglikozit direncinden sorumludur (18,23,58).

### 2.7.3. Florokinolonlara Karşı Direnç Mekanizmaları

*A.baumannii* için gyrA ve parC genlerindeki mutasyonlar nedeniyle DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerindeki değişiklikler net olarak açıklanmıştır. Bu mutasyonlar ilacın hedef bölgeye bağlanmasını engeller. Kinolon direncindeki bir diğer mekanizma, multidrug efluks pompalarıdır. Bunlar arasında RND tip AdeABC pompası ve MATE AdeM pompası sayılabilir (18,23,58,59).



#### 2.7.4. Polimiksinlere Karşı Direnç Mekanizmaları

*A.baumannii*'de polimiksinlere karşı gün geçtikçe artan düzeyde in vitro direnç ve heteroresistansı gösteren raporlar olmasına rağmen, direnç mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak bakterinin LPS miktarında, spesifik dış membran proteinlerinde, lipid içeriğinde, hücrenin  $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  içeriklerinde azalma gibi bakteri hücresinin dış duvarının bütünlüğünü bozucu etkilerle ilişkilidir. Ayrıca, polimiksin direnci için iki komponentli regülatör sistem (pmrA/B) mutasyonlarından da bahsedilmektedir (18,30,60,61).

#### 2.7.5. Tetrasiklin ve Glisilsiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Tetrasiklin ve türevlerinin direnç profili eflux pompaları veya ribozomal koruma yollarıyla oluşmaktadır. Tetrasiklinlere özgü efluks pompaları tetA'dan tetE'ye kadar olan determinantlarla kodlanmaktadır ve *A.baumannii* için tetA ve tetB determinantları tanımlanmıştır. TetA, tetrasiklin direncine neden olur, minosikline etki etmez ve IS elementi ile ilişkilidir. Bu nedenle minosiklin *A.baumannii*'ye karşı tetrasiklinden daha etkilidir. Ribozomal koruma, tetM ve tetO aracılığıyla olur, ancak tetM *A.baumannii*'de çok nadir olarak bulunur. Bu sınıf ilaçlar multidrug efluks sistemine yani, AdeABC pompalarına da duyarlıdır (18,58). Tigesikline direnç gelişimi de bahsedilen efluks sistemi ile gerçekleşir. Bakterideki adeB gen ekspresyonundaki artış ile tigesiklinin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerlerindeki artışın korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (53,54).

#### 2.7.6. Diğer Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

Birçok bölgede *A.baumannii* için trimetoprim-sülfometaksazol direnç oranları yüksektir. MDR *A.baumannii* suşlarında integronların yaygın görüldüğü bilinmektedir. Ve integron taşıyan *A.baumannii* suşlarında sülfonamid direnci görülme ihtimali yüksektir. Benzer olarak trimetoprim ve kloramfenikol direncinin de *A.baumannii*'deki integron yapılarının içindeki genlerle kodlandığı rapor edilmiştir. Ayrıca trimetoprime karşı direnç gelişiminde bir dihidrofolat redüktaz (folA) enzimi ve eflux pompaları da etkilidir (18,23,50,57).

## 2.8. *A.baumannii* İnfeksiyonlarının Tedavisi

MDR *A.baumannii* infeksiyonlarında tedavi zor ve klinisyenlere en uygun ampirik ilacın seçimi konusunda yol gösterebilecek bilimsel veriler sınırlıdır. Bu infeksiyonların tedavisinde klinisyenin deneyimleri önemlidir. Ancak patojenin ilaçlara dirençli doğası ve tahmin edilemeyen duyarlılık modelleri ampirik tedavi seçimlerini zorlaştırmaktadır (40).

### 2.8.1. Sulbaktam ve Kombinasyonları

Sulbaktam, penisilin bağlayan protein 2'ye (PBP-2) bağlanarak *A.baumannii*'ye karşı intrensek bir aktivite yürüten  $\beta$ -laktamlara benzer yapıya sahip bir Ambler sınıf A  $\beta$ -laktamaz inhibitörüdür.  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri arasında *A.baumannii* izolatlarına karşı en yüksek intrinsik bakterisidal aktiviteye sahip ajandır (18,62). *A.baumannii* pnömonisi veya bakteriyemisi olan hastalarda eğer organizma sulbaktama duyarlıysa, sulbaktam içeren tedavi rejimleri diğer ajanlardan üstün olduğu kabul edilmektedir (40,60). Karbapenem dirençli *A.baumannii* infeksiyonlarında sulbaktam polimiksinlere oranla daha etkili görünmektedir (60,63).

Ampisilin-sulbaktam (SAM) içeren preparatların orta ve ağır derecede kan, solunum yolları ve idrar yolları *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (64,65). SAM ile ilgili ilk deneyim olan Urban ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (66), mekanik ventilasyon uygulanan ciddi düzeyde infekte 10 hastanın 9'unda 6-8 saatte bir İV SAM uygulamasıyla klinik iyileşme gözlemlendiği rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada MDR *A.baumannii* bakteriyemisi olan hastalarda SAM tedavisinin mortaliteyi düşürdüğü gösterilmiştir (65). Randomize kontrollü yapılan bir çalışmada da VİP tedavisinde yüksek doz SAM, kolistinle karşılaştırılmış ve etkinlik bulgularının benzer olduğu bildirilmiştir (67).

Karbapenem dirençli izolatlarda karbapenemlerle sulbaktam kombinasyonlarının etkili olduğu gösterilmiştir (14,68). Sulbaktamın ayrıca sefepim, meropenem, amikasin ve rifampin gibi diğer antibakteriyallerle kombine edildiğinde de etkisinde artış olduğu bulunmuştur (12,13,60,68). Ancak diğer antibiyotik sınıflarında olduğu gibi, sulbaktama da direnç gelişimi ve bu direncin yaygınlaşması, ilacın gelecekteki kullanımını sınırlayacak gibi görünmektedir (23).

### 2.8.2. Karbapenemler

Karbapenemler, MDR *A.baumannii* infeksiyonlarında en önemli tedavi seçeneği olma özelliğini korumaktadır. Fakat gün geçtikçe artan karbapenem direnci ve birçok *A.baumannii* izolatının karbapenemlerin yanı sıra diğer major antibiyotiklerin de çoğuna dirençli olduğu düşünüldüğünde bu durum ciddi terapötik karışıklıklara sebep olmaktadır (40). Tedaviye karar verirken karbapenemlerle ilgili uygun laboratuvar desteğini almak önemlidir. İmipenem sonuçları meropeneme uygulanamaz. Bir vaka raporunda (69) imipenem duyarlılığı baz alınarak meropenem tedavisi verilen bir *A.baumannii* pnömonisi vakasının ölümle sonuçlandığını ve sonradan bu izolatın meropenem dirençli olduğunun gösterildiğini bildirmişlerdir. Doripenem, *A.baumannii* izolatlarına karşı imipenem ve meropenemle eşit aktiviteye sahip bir karbapenemdir ve diğer ikisine bir üstünlüğü yoktur (40).

### 2.8.3. Polimiksinler

Piyasada 50 yıldan uzun süredir bulunan polikatyonik lipopolipeptid yapısında antimikrobialerdir. Membran bütünlüğünün kaybına sebep olacak şekilde hem dış membran hem de sitoplazmik membran üzerine etkilidirler. Bu grup içinde polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) klinik kullanım için uygundur. Yüksek düzeyde dirençli Gram negatif bakterilerin tedavisinde son seçenek, kurtarıcı ajanlardır. MDR suşların çoğunluğu polimiksinlere duyarlıdır ve bu durum ilacın toksisitesine yönelik kaygılara rağmen tedavide polimiksinlere olan ilgiyi artırmaktadır. Fakat kolistin dirençli izolatların sebep olduğu sporadik infeksiyon vakaları da bildirilmiştir (40,60,70).

ABD’de genellikle kullanılan kolistindir ve kolistimetat sodyum (CMS) olarak bilinen ön ilaç formu İV yolla kullanılmaktadır. Kolistin sülfat sadece topikal yolla kullanılır ve laboratuvarında duyarlılık testi için kullanılan formdur. Kolistinin günümüzde Gram negatif bakteri infeksiyonlarını tedavi ederken gözlenen etkinliği ve toksisitesi hakkında bilgi veren pek çok yayın mevcuttur ve etkinlik oranları (%55-%80 arasında) yüksektir. Ancak ciddi nefrotoksik etkisi ilacın kullanımında kaygı yaratmaktadır. İlaç formulasyonları ülkeden ülkeye değiştiği için doz ayarlaması karmaşıktır. İV kolistinin akciğerlere penetrasyonu zayıf olmasına

rağmen, VİP tedavisinde imipenemle karşılaştırılabilecek düzeyde etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu infeksiyonlarda inhale CMS'nin tedavi olarak kullanımı ile ilgili umutlandırıcı veriler mevcuttur (18,23,40).

#### 2.8.4. Rifampin

Bu ajanın genellikle Gram pozitif bakterilere etkili olduğu kabul edilmektedir, ancak in vitro çalışmalar ve deneysel infeksiyon modelleri, rifampinin tek başına kullanıldığında bile MDR *A.baumannii* üzerinde bakterisidal etki oluşturabildiğini ve rifampin ile monoterapinin imipenemle aynı etkiye sahip olduğu ve hatta kolistin monoterapisinden daha etkili olduğunu göstermiştir. Ancak rifampin tek başına kullanıldığında hızla direnç gelişimi olmakta ve bu yüzden bir başka antimikrobiyalle kombinasyonu gerekmektedir (71-75). Rifampinin karbapenemler, tigesiklin veya SAM gibi çeşitli ajanlarla kombinasyonu sonucu aditif etki veya sinerjik etki elde edilmiş olmasına rağmen en ümit verici kombinasyonu kolistinle olmuştur (74,76). Rodriguez ve ark. rifampin-kolistin kombinasyonunun, rifampin MİK değerlerinden bağımsız olarak heteroresistan izolatlardaki dirençli subpopulasyonları inhibe ettiğini göstermişlerdir (77). Kolistin ve rifampin arasındaki sinerji, in vitro çalışmalar dışında deneysel modeller üzerinde de gösterilmiştir. Pantopoulou ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları deneysel MDR *A.baumannii* infeksiyonunda rifampin varlığında kolistin aktivitesinin belirgin olarak arttığını ve kombinasyonun infekte ratların yaşam süresini uzatmada etkili olduğunu göstermişlerdir (78). Bu sonuçların ışığında Bassetti ve ark. ciddi MDR *A.baumannii* infeksiyonu olan 29 hastayı İV kolistin ve rifampin kombinasyonu ile tedavi etmişler, vakaların %76'sında (22/29) klinik ve mikrobiyolojik olarak olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. İnfeksiyonla ilişkili mortalite oranını %21 (6/29) olarak bulmuşlar ve hiçbir vakada rifampin veya kolistine direnç gelişimi olmadığını tespit etmişlerdir (79). Dikkat çekici bir diğer durum da, rifampinin başlangıç MİK değerinin kombinasyon tedavisinden çıkan sonuç üzerindeki etkisidir. Nitekim başlangıçta rifampine yüksek düzeyde dirençli bulunan vakalarda (MİK  $\geq$  64 $\mu$ g/ml) sonuç olarak zayıfta olsa mikrobiyolojik eradikasyon oranlarının gözlemlendiğine dair veriler mevcuttur (80).

### 2.8.5. Aminoglikozitler

Amikasin ve tobramisin *A.baumannii* izolatlarında etkili olan iki ajandır. Ancak tüm antimikrobiyallerde olduğu gibi MDR izolatlarında direnç oranları artmaktadır ve aktivitelerini göstermek için duyarlılık testleri mutlaka yapılmalıdır (40). Tedavide genellikle tek ajan olarak kullanılmazlar ve toksik etkileri kullanımlarını kısıtlar. Bir çalışmada *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde tobramisinin aktivitesi ve toksisitesi kolistinle karşılaştırılmış, mortalite oranlarında, tedaviye başlangıç değerine göre serum kreatinin düzeyindeki yükselmeye ve mikrobiyolojik eradikasyon zamanında her iki ilaç arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (81).

Son günlerde inhale aminoglikozitlerin kullanımı gündemdedir. Ancak, *A.baumannii* infeksiyonlarında kullanımı ile ilgili çok az klinik veri vardır. İn hale tobramisin FDA tarafından sadece kistik fibrozisli hastalardaki *Pseudomonas* infeksiyonları için onaylanmıştır (40).

### 2.8.6. Tetrasiklinler

Minosiklin ve doksisisiklin, İV infüzyon için uygun ajanlardır ve minosiklinin *Acinetobacter* infeksiyonlarında kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Bakteriyel protein sentezini inhibe ederek hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere etki eden bir tetrasiklin derivesidir. Son günlerde minosikline duyarlı MDR *A.baumannii* izolatlarında kullanımı artmıştır. Mutlaka her ajan için duyarlılık testleri yapılmalıdır. Çünkü tetrasikline dirençli bulunan birçok izolatın minosikline duyarlı olduğu kanıtlanmıştır (40,60).

### 2.8.7. Tigesiklin (TGC)

Semisentetik bir glisilsiklidir. Modifiye minosiklini temsil eder ve bakterinin 30S ribozomal subünitine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek, Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob bakterilere karşı aktivite gösterir (60). Komplike deri ve yumuşak doku infeksiyonlarının ve intra abdominal infeksiyonların tedavisinde etkili ve lisanslı bir ajandır. Genellikle MDR *A.baumannii*'ye karşı invitro olarak iyi etki göstermektedir. Alternatif tedavi seçeneklerinin olmadığı

durumlarda, standart tedavi endikasyonunun dışında kalan kan ve solunum yolu infeksiyonlarında da %68 ile %84 arasında klinik cevapların alındığı rapor edilmiştir (23). Ancak, *A.baumannii* endikasyonları için ruhsatı yoktur ve 2010 baskılarında bile ne CLSI ne de BSAC *A.baumannii* için yetersiz klinik bilgi nedeniyle TGC için herhangi bir duyarlılık sınırı bildirmemişlerdir (82,83). Buna rağmen özellikle MDR *A.baumannii*'ye karşı tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve çeşitli çalışmalarda MİK değerinin düşük olarak bildirilmesi, bu bakteriye karşı TGC kullanımını özendirmiştir (60).

### 2.8.8. Monoterapide İntravenöz $\beta$ -laktamların Sürekli İnfüzyonu

*A.baumannii*'de MDR sıklığı ve yeni antibakteriyellerin geliştirilememesi sebebiyle, elimizde var olan ajanların etkilerini arttırmak için uzatılmış veya sürekli İV antibakteriyal uygulaması gibi bazı alternatif tedavi yaklaşımları kullanılmaktadır. Bu yöntem, zamana bağımlı bakteri öldürmede, normal zaman aralıklı İV ilaç uygulamasından daha üstündür. Karbapenemler veya sefepim gibi  $\beta$ -laktamların uzatılmış infüzyonu, özellikle MİK değerleri 4 ila 16 $\mu$ g/ml olan az duyarlı mikroorganizmalar için, serum ilaç konsantrasyonlarının daha uzun süre MİK değerlerinin üzerinde kalmasını sağlar. Klinik deneyimler Gram negatif dirençli bakterileri tedavi etmek için  $\beta$ -laktamların uzatılmış infüzyonunu önermektedir. Li ve ark. meropenem MİK değeri 4  $\mu$ g/ml olan bir bakteri için ilaç infüzyon zamanı 0,5 saatten 3 saate çıkarıldığında bakterisidal aktivitenin %64'ten %90'a çıktığını göstermişlerdir. *A.baumannii* VIP hastalarından elde edilen veriler de bu bulguları desteklemektedir (40,60,84).

### 2.8.9. Yeni Ajanlar, Peptidler

Yeni sentezlenmiş kimyasal maddeleri ve doğal ürünleri de içeren bir seri yeni molekülün *A.baumannii*'ye karşı aktiviteleri sürekli test edilmekte ve değişken sonuçlar elde edilmektedir. Bu yeni ajanlar arasında en ümit verici grup peptidlerdir. Bunlar, bakteri türleri, bitkiler ve hayvanlardan izole edilmiştir ve bakteriyel membranın negatif yüklü bölgelerini bağlayarak membran permeabilitesini artırır, bu da bakteriyel içeriğin dışarı sızmasına ve birçok süstratında yoğun bir şekilde içeri girişine sebep olur ve böylece inhibitör etkileri ortaya çıkar. Peptid bazı

antienfektif ilaçların sistemik olarak uygulanması dolaşımdaki yarılanma ömürlerinin çok kısa olması nedeniyle zordur. MDR *A.baumannii*'ye karşı aktif olan 3 peptid rapor edilmiştir (60,85).

**i)** Alyteserin-1c ve analogları: Bu maddenin *A.baumannii*'ye karşı bakterisidal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Analogu olan E4K'nın bir time-kill çalışmasında minimum bakterisidal konsantrasyonunda, 30 dakikada bakterileri %99,9'un üzerinde öldürdüğü gözlenmiştir (86).

**ii)** Buforin II: Asya Bufo bufo gargarizanlarının midelerinden elde edilen bir peptiddir (60). Membran permeabilitesini artırdığı ve RİF gibi hidrofobik ajanların penetrasyonunu kolaylaştırdığı görülmektedir. Cirioni ve ark.'nın oluşturdukları rat modeli MDR *A.baumannii* sepsisinde, Buforin II güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiş, hayatta kalım oranlarını artırmış ve serum endotoksin ve sitokin düzeylerinde belirgin düşüşe sebep olmuştur (85).

**iii)** Human  $\beta$ -defensin 2 (*hBD2*): Antimikrobiyal etkilerini, hedef organizmanın hücre membranını parçalayıp, hücre içeriğinin salıverilmesine yol açarak gösterir. Primer olarak insanda idrar ve solunum yolları epitelyum hücrelerinde yer alır. Ayrıca, LPS'lere bağlanarak onları inaktive eder ve bakteriyel endotoksinin nötralizasyonuna sebep olarak, endotoksik şoku engeller ve lipid membranlarda kanallar oluşturma özelliğiyle de hidrofilik ilaçların penetrasyonunu kolaylaştırır (60). Routsias ve ark. 14 tanesi MDR olan 21 *A.baumannii* izolatu üzerinde hBD2'nin bakterisidal aktivitesini incelemişler ve düşük konsantrasyonlarda hBD2 uygulamasının 2 saat içinde MDR izolatları da dahil olmak üzere, *A.baumannii* populasyonunu tamamen öldürdüğünü göstermişlerdir (87).

### **2.8.10. Kombinasyon Tedavileri**

Tedavide yeni ajanların keşfinin yetersizliği nedeniyle, klinisyenlerin ikili hatta üçlü antimikrobiyal kombinasyonlara olan ilgisi kaçınılmazdır (23,40). Ancak, elimizdeki verilerin çoğu in vitro veya hayvan deneylerinden elde edilmiştir. Klinik çalışmalar yok denecek kadar azdır. Petrosillo ve ark. kolistinin kombinasyon tedavilerini inceledikleri yayında, sadece 4 tane çalışma bulmuşlar ve bunlardan

sadece bir tanesinde istatistiksel olarak monoterapi, kombinasyondan daha etkin bulunmuştur. Ancak bu çalışmalarda, kombinasyonların ve infeksiyonların yerleşimlerinin farklı olması ve hasta sayılarının az olması yorum yapmayı zorlaştırmaktadır (88).

Falagas ve ark. yaptıkları retrospektif bir kohort çalışmasında, kolistin monoterapisi ve kolistin-meropenem kombinasyon tedavisi alan hastaları karşılaştırmışlar ve her iki grup arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Ancak bu çalışmada monoterapi alan hasta sayısı azdır (89). Klinik çalışmalara oranla çok sayıda in vitro ve in vivo hayvan çalışması vardır. İn vitro olarak kolistin rifampinle, minosiklinle, seftazidimle veya imipenemle kombine edildiğinde ve sulbaktam meropenemle kombine edildiğinde (68) belirgin sinerji elde edilmesine rağmen, bu kombinasyonların klinik olarak yarar sağladığına dair in vivo bulgular mevcut değildir (88). MDR *A.baumannii* kaynaklı infeksiyonu bulunan hastaların aynı anda birçok antimikrobiyal ajan kullandığı düşünülürse, bu hastaların tedavi rejimlerini oluştururken elimizdeki bulguların dikkate alınması, hastaların potansiyel olarak antagonizma oluşturacak kombinasyonları kullanmasını önleyecektir (23).

Sonuç olarak *A.baumannii* infeksiyonlarında kullanılacak kombinasyon tedavileri için, kontrollü ve karşılaştırmalı çalışmaların azlığı nedeniyle belirgin bir tavsiye yapılamamaktadır (40).

## **2.9. Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkinliklerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan In Vitro Testler**

Bu amaçla major olarak kullanılan 3 yöntem vardır. Bunlar; E-test, öldürme zamanı (time-kill) ve dama tahtası (checkerboard) yöntemleridir.

E-test yöntemi, ticari firmalardan hazır olarak temin edilebilen antibiyotik emdirilmiş difüzyon stripleri kullanılarak antibiyotik kombinasyonlarının potansiyel sinerjistik aktivitelerinin kantitatif olarak değerlendirilmesini sağlayan, laboratuvarlarda kolay kullanılan, iş gücü ve zaman kaybı düşük, uygulaması kolay bir yöntemdir. Ancak antagonizma E test metoduyla olduğundan daha az oranda tespit edilebilmektedir. Çünkü inhibisyon zonu çapraz duran striplerin altında kaybolabilmektedir (90).



Öldürme zamanı yöntemi (time kill) ile bakterisidal aktivitenin ölçülmesi, belirli bir antibiyotik konsantrasyonunda nasıl bir öldürme hızı olduğuna dair bilgi edinme imkanı sağlar. Yavaş, zamandan çalan, uygulaması zor ve zahmetli bir yöntem olmasına rağmen, antibiyotiklerin zaman içindeki hareketleri ile ilgili dinamik görüntü elde eden bir yöntemdir. Bu yöntemde koloni sayımı için değişik zamanlarda (0, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde) çok sayıda örnek alınması gerekir. Belirli bir antibiyotik daha önce belirlenmiş MİK değeri ile ilişkili birden fazla konsantrasyonda (örn., MİK, 2xMİK ve 4xMİK) test edilir. Bakterisidal etki, belirli bir zamanda  $\geq \%99,9$  öldürme olarak tanımlanır. Bu yöntemle ilaç kombinasyonları test edildiğinde, kombinasyonla elde edilen CFU sayısında kombinasyondaki en etkili tek ilaçla kıyaslandığında  $\geq 2$  log azalma sinerji olarak tanımlanır (91).

Dama tahtası yöntemi (checkerboard), time kill gibi antimikrobiyal kombinasyon çalışmaları için standart test olarak kabul edilmesine rağmen zaman alıcı ve zahmetli bir yöntemdir. Mikrodilüsyon esasına dayanan bir tekniktir. Kombinasyon etkinlikleri araştırılmak istenen farklı ilaçların, değişik konsantrasyonları bir araya getirilerek iki ilaç için de üremenin olmadığı en düşük konsantrasyonun olduğu MİK değerleri esas alınır. İlaçların kombinasyondan elde edilen MİK değerleri ile tek başlarına olan MİK değerleri oranlanarak, Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) değerleri elde edilir. Daha sonra kombinasyondaki tüm ilaçların FİK değerleri toplanarak FİK indeksi ( $\Sigma$ FİK) hesaplanır. Bu yöntemde sinerji  $\Sigma$ FİK  $\leq 0,5$  değeri, aditif etkileşim  $\Sigma$ FİK = 1 değeri ve antagonizma  $\Sigma$ FİK = 2 değeri baz alınarak tanımlanmaktadır (92-94). Daha yeni kaynaklar, 4'ten büyük bulunan  $\Sigma$ FİK değerlerinin antagonizma olarak tanımlanması gerektiğini söylemektedir (95). Kesin sınırlarla tanımlanan sinerji ve antagonizma dışındaki durumlar için, tanımlanamayan (indiferansiye) tabirinin kullanılmasının daha doğru olacağı bildirilmektedir (94-97).

Sinerji, antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamından daha fazla etki elde edilmesidir. Bir diğer tanımlamayla, tek başına bir antibiyotiğin MİK değerine oranla, aynı antibiyotiğin kombinasyon MİK'inde en az 4 kat düşüş olmasıdır.

Antagonizma, antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamından daha düşük etki elde edilmesidir.

Aditif etki, antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamına eşit bir etki elde edilmesidir.

Tanımlanamayan etkileşim (indiferansiye) tabiri, kombinasyondaki ilaçların sinerjistik ve antagonistik etkileşimler gibi sınırları net olan etkileşimleri içermediği, ancak etkileşimlerinin tam olarak ne türde olduğunun tanımlanamadığı durumları tarif eder.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Bakteri İzolatları

Şubat 2009- Şubat 2011 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinden Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve disk difüzyon testi ile tamamı imipenem ve meropenem dirençli olarak belirlenmiş, yine aynı yöntemle MDR (Multi Drug Resistant = Çoklu İlaç Dirençli) olarak tespit edilen 34 adet *Acinetobacter baumannii* suşu çalışmaya dahil edilmiştir.

#### 3.2. Bakteri İzolasyon ve İdentifikasyonu

Laboratuvara gelen klinik örnekler %5 koyun kanlı agar ve Eozin Metilen Blue agar (EMB) kültür ortamlarına ekilerek 24-48 saat  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  etüvde inkübe edilmiştir. Kan kültürleri Bactec 9120 BD otomatize kan kültürü sisteminde inkübe edilmiş, üreme gösteren örnekler kan kültürü şişelerinden uygun katı besiyerine ekilerek yine 24-48 saat  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  etüvde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası %5 koyun kanlı agar ve EMB agarda saf koloni halinde üreyen, Gram negatif, aerob, non-fermenter (glukoz ve laktozu fermente etmeyen) üreme özelliği gösteren ve gram boyamasında Gram negatif koko-basil veya diplokok morfolojisinde saptanan bakteri, katalaz pozitif ve oksidaz negatif olarak tespit edilmiş, bakterilerin tamamı BD BBL Crystal E/NF yarı otomatize identifikasyon sistemi ile *A.baumannii* olarak tiplendirilmiştir.

#### 3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'nin (82) önerilerine göre *A.baumannii* için A grubundan ampisilin/sulbaktam (SAM), imipenem (İPM), meropenem (MEM), seftazidim (CAZ), gentamisin (CN), ve siprofloksasin (CİP); B grubundan sefepim (FEP), amikasin (AK), minosiklin (MI) ve trimetoprim/sülfametoksazol (SXT) ve O grubundan, tikarsilin (TİC) Kirby- Bauer disk difüzyon yöntemi ile Mueller-Hinton agarda test edilmiş ve yine CLSI kriterlerine göre adı geçen tüm antibiyotiklerin duyarlılıkları belirlenmiştir (82).

Disk difüzyon testi için, %5 koyun kanlı agar besiyerinde 24-48 saat  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon sonrası üreyen saf bakteri kolonilerinden 2-4 koloni kadar steril öze ile alınıp, 3 cc kadar steril FTS (fizyolojik tuzlu su) da BD Phoenix Spec Nephelometer cihazı ile 0.5 McFarland bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonu, 15 cm çaplı petri plaklarına 4 mm yükseklikte olacak şekilde dökülen ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında muhafaza edilen Mueller Hinton agar besiyerine, plağın tüm alanını kaplayacak şekilde steril pamuk uçlu eküvyon çubuğu ile yaygın ekilmiş ve 8-10 dakika emilmesi beklendikten sonra; ampisilin/sulbaktam 10/10  $\mu\text{g}$  (Himedia), imipenem 10  $\mu\text{g}$  (Himedia), meropenem 10  $\mu\text{g}$  (Himedia), seftazidim 30  $\mu\text{g}$  (Himedia), gentamisin 10  $\mu\text{g}$  (Himedia), siprofloksasin 5  $\mu\text{g}$  (BD BBL), sefepim 30  $\mu\text{g}$  (Himedia), amikasin 30  $\mu\text{g}$  (Himedia), minosiklin 30  $\mu\text{g}$  (BD BBL), trimetoprim/sülfametoksazol 25  $\mu\text{g}$  (Himedia), tikarsilin 75  $\mu\text{g}$  (Bioanalyse) antibiyotik diskleri kenarlardan 15 mm ve birbirlerinden 25-30 mm uzaklıkta olacak şekilde plağa yerleştirilmiş ve  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  etüvde 20-24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında antibiyotiklerin inhibisyon zon çapları ölçülerek elde edilen sonuçlar CLSI kriterlerine göre tablo-3'te görülen değerler baz alınarak, duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak yorumlanmıştır (82).

Aşağıda belirtilen antibiyotik sınıflarından en az üç tanesinin kabul görmüş tipik antibiyotiklerine dirençli olan *A.baumannii* izolatları çoklu ilaç dirençli (MDR) *A.baumannii* olarak tanımlanmıştır. Bunlar; sefalosporinler (sefepim, seftazidim, seftriakson, sefotaksim), aminoglikozidler (gentamisin, amikasin, tobramisin), antipseudomonal penisilinler (piperasilin, tikarsilin), karbapenemler (imipenem, meropenem), ve kinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin) ve ek olarak ampisilin/sulbaktam ve/veya tetrasiklinlerdir (tetrasiklin, doksisisiklin).

Buna göre MDR olarak tespit edilen ve tamamı imipenem ve meropeneme dirençli bulunan toplam 34 tane *A.baumannii* izolatu çalışmamızda kullanılmak üzere seçilmiş ve %15 gliserin ekli Luria Bertani (LB) besiyeri içeren ependorflara pasajlanarak  $-80^\circ\text{C}$  de saklanmıştır.

**Tablo 3.** *A.baumannii* için CLSI tarafından önerilen disk difüzyon duyarlılık zon çapları

Antibiyotik	Duyarlı (S) mm	Orta duyarlı (I) mm	Dirençli (R) mm
Ampisilin/sulbaktam	≥ 15	12-14	≤ 11
İmipenem	≥ 16	14-15	≤ 13
Meropenem	≥ 16	14-15	≤ 13
Seftazidim	≥ 18	15-17	≤ 14
Gentamisin	≥ 15	13-14	≤ 12
Siprofloksasin	≥ 21	16-20	≤ 15
Sefepim	≥ 18	15-17	≤ 14
Amikasin	≥ 17	15-16	≤ 14
Minosiklin	≥ 16	13-15	≤ 12
Trimetoprim/sülfametoksazol	≥ 16	11-15	≤ 10
Tikarsilin	≥ 20	15-19	≤ 14

### 3.4. Mikrodilüsyon Testlerinde Kullanılan Antibakteriyal İlaçlar

Çalışmamızda; İmipenem monohydrate powder (Sigma-Aldrich), Meropenem trihydrate powder (Sigma-Aldrich), Cefoperazone sodium salt powder (Sigma-Aldrich), Ampicillin sodium salt powder (Sigma-Aldrich), Rifampicin powder (Sigma-Aldrich), Polymyxin B sulfate powder (Fluca) ve Sulbactam sodium powder (Zhejiang Xinhua Pharmaceutical Co. Ltd.) antibiyotiklerinin toz şekilleri kullanılmıştır. Tozlar, üretici firmanın önerilerine uygun olarak, her ilaç için gerekli ısı ve şartlarda taşınmış ve saklanmıştır.

Toz halindeki tüm antibiyotiklerin CLSI'nin (98) önerilerine göre, analiz sertifikası verileri değerlendirilerek potensleri hesaplanmış, ml'de elde edilmek istenen konsantrasyonuna göre sulandırım yapılacak sıvı hacimleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Hacim(ml)} = \text{Ağırlık(mg)} \times \text{Potens}(\mu\text{g/mg}) / \text{Konsantrasyon}(\mu\text{g/ml})$$

### 3.5. Çözücü ve Sulandırıcıların Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak her antimikrobiyal toz için tablo-4'te görülen CLSI'nin önerdiği çözücü ve sulandırıcılar kullanılarak antibiyotik stok solüsyonları hazırlanmıştır (82).

İmipenem ve ampisilin için kullanılacak fosfat tamponlar uygun şekilde hazırlandıktan sonra, otoklavda steril edilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır. Distile su, ticari firmalarca üretilen hazır steril stoklardan kullanılmıştır.

Antibiyotik tozları, darası alınmış steril kaplarda, hassas terazide tartılmış ve her antibiyotik için yukarıdaki formülle hesaplanan sıvı hacimleri kullanılarak uygun çözücü ve sulandırıcıda karıştırarak eritilmiş ve dilüe hale getirilmiştir.

**Tablo 4.** Antimikrobik ilaçların stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli çözücü ve sulandırıcılar

	Çözücü	Sulandırıcı
İmipenem	Fosfat tamponu pH 7,2 (0,01 mol/L)	Fosfat tamponu pH 7,2 (0,01 mol/L)
Meropenem	Distile su	Distile su
Ampisilin	Fosfat tamponu pH 8 (0,1 mol/L)	Fosfat tamponu pH 6 (0,1 mol/L)
Rifampin	Metanol	Distile su
Polimiksin B	Distile su	Distile su
Sefoperazon	Distile su	Distile su
Sulbaktam	Distile su	Distile su

Rifampin stok solüsyonu hazırlanırken çözücü olarak kullanılan metanol, olabilecek en düşük miktarda kullanılmış (maksimum konsantrasyonu 640 µg/ml olacak şekilde), ilaç iyice çözüldükten sonra gerekli sıvı miktarı, sulandırıcısı olan distile su ile tamamlanmıştır (82).

Ampisilin-sulbaktam (SAM) kombinasyonu hazırlanırken, disk difüzyon testlerinde bu kombinasyon için kullanılan ilaç oranları göz önüne alınarak her iki ilacın eşit miktarları (oran 1/1 olacak şekilde) alınarak sulandırım yapılmıştır. Çözücü ve sulandırıcı olarak ampisilin için önerilen fosfat tamponlar kullanılmıştır (tablo-4).

Sefoperazon-sulbaktam (SCP) kombinasyonu hazırlanırken, yine disk difüzyon testlerinde bu kombinasyon için kullanılan ilaç oranları göz önüne alınarak,

75/30 oranında olacak şekilde ilaçların miktarları hesaplanarak tartılmış ve distile su ile sulandırım yapılmıştır.

Tüm antimikrobialerin hazırlanan stok solüsyonları, her bir bakteri suşu için gereken miktarda olacak şekilde steril ependorflara aktararak -80 °C'de saklanmıştır.

### **3.6. Sıvı Besiyerinin Hazırlanması**

CLSI'nin mikrodilüsyon ve dama tahtası sinerji testi yöntemleri için standardize ve kabul ettiği Katyon Ayarlı (20-25 mg/l Ca<sup>++</sup> ve 10-12,5 mg/l Mg<sup>++</sup> içeren) Mueller Hinton Broth (KAMHB) besiyeri, üretici firmadan (BD BBL Mueller Hinton II Broth) hazır olarak temin edilmiş ve çalışmamızda kullanılmıştır (98).

Toz halindeki besiyeri, üretici firmanın kullanım talimatları doğrultusunda önerilen miktarda hassas terazide tartılarak yine önerilen miktarda distile su ile 10 dakika çalkalanarak iyice karıştırılmış, homojenize hale gelince pH ölçümü yapılarak otoklavda steril edilmiş ve buzdolabında +4°C'de 7 günden fazla olmayacak şekilde saklanmıştır. Bir haftayı geçen stok KAMHB besiyeri dökülmüş, taze olarak tekrar hazırlanmıştır.

### **3.7. Üreme Kontrol İndikatörünün Hazırlanması**

Plak üzerinde üreme olan kuyucukları tespit etmek amacıyla kolorimetrik indikatör olarak Resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich) %0,01'lik kullanılmıştır. Toz halindeki indikatör, hassas terazide 10 mg tartılmış, üzerine 100 ml steril distile su eklenerek %0,01'lik solüsyon hazırlanmıştır. İndikatör, çalışmanın yapıldığı gün taze olarak hazırlanmış ve günlük kullanılmıştır.

### **3.8. Antibiyotik Kombinasyonları**

Çalışmamızda, her bir suş için toplam sekiz antimikrobiyal kombinasyon, dama tahtası yöntemiyle test edilmiştir. Bu kombinasyonlar:

İmipenem ve ampisilin/sulbaktam

İmipenem ve sefoperazon/sulbaktam

İmipenem ve polimiksin B

İmipenem ve rifampin

Meropenem ve ampisilin/sulbaktam

Meropenem ve sefoperazon/sulbaktam

Meropenem ve polimiksin B

Meropenem ve rifampin olacak şekilde planlanmıştır.

### 3.9. MİK Değerlerinin Saptanması

Çalışmamızda kullanılan her bakteri suşu için öncelikle, antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde altın standart kabul edilen broth mikrodilüsyon yöntemi CLSI'nin önerileri doğrultusunda uygulanarak her antibiyotiğin MİK değeri saptanmıştır (82).

Bu amaçla 96 kuyucuklu steril U tabanlı plaklar kullanılmıştır. Her antibiyotik için plağın 1'den 12'ye kadar olan bir satırı kullanılmıştır. Her suş için 6 farklı antibiyotiğin MİK değeri tespit edileceğinden, plağın ilk altı satırı 1'den 12'ye kadar kullanılmıştır. Kullanılan bu kuyucukların hepsine KAMHB besiyeri 50 µl eklenmiştir.

Her ilaç için kullanılan 12 kuyucuğun ilkine test edilecek antibiyotiğin başlangıç konsantrasyonunu içeren çözeltisinden 50 µl eklenmiştir. İlk kuyucuktaki antibiyotik başlangıç konsantrasyonu ve ilacın test edilecek MİK sınırları, tablo-5'te görülen CLSI'nin *A.baumannii* için belirlediği, duyarlı ve dirençli MİK değerleri esas alınarak, dirençli MİK değerinin 2-3 kat üstünden, duyarlı MİK değerinin 4-8 kat altına kadar olan değerleri içine alacak şekilde belirlenmiştir (Rifampin için CLSI'nin Gram pozitif bakteri panelindeki değerler baz alınmış, sefoperazon/sulbaktam içinse, CLSI'nin diğer Enterobacteriaceae dışı Gram negatif bakteriler için MİK yorumlama standartları kullanılmıştır) (82).

Test edilecek en yüksek ilaç konsantrasyonunun eklendiği ilk kuyucuktan 50 µl alınıp 2. kuyucuğa aktarım ve pipetaj, 2. kuyucuktan 50 µl alınıp 3. kuyucuğa aktarım ve pipetaj şeklinde son kuyucuğa kadar (12. kuyucuk), ilacın çift kat seri dilüsyonları yapılmış ve son kuyucuktan 50 µl alınıp dışarı atılmıştır.



**Tablo 5.** CLSI'nin *A.baumannii* için MİK değerleri

	S (µg/ml)	I (µg/ml)	R (µg/ml)
İmipenem	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Ampisilin/sulbaktam	≤ 8-4	16-8	≥ 32-16
Sefoperazon	≤ 16	32	≥ 64
Polimiksin B	≤ 2	–	≥ 4
Rifampin	≤ 1	2	≥ 4

S:duyarlı I:orta duyarlı R:dirençli

Plak üzerindeki 1H kuyucuğu besiyeri kontrolü (BK) için kullanılmış ve bu kuyucuğa 100 µl KAMHB besiyeri eklenmiş, 12H kuyucuğu üreme kontrolü (ÜK) için kullanılmış ve buraya da 50 µl KAMHB besiyeri eklenmiştir. Bu iki kuyucuğa antibiyotik pipetlenmemiştir. Şekil-1'de her bir izolat için çalışmada kullanılan antibiyotiklerin MİK değerlerini belirlerken kullanılan 96 kuyucuklu plağın temsili şekli görülmektedir.

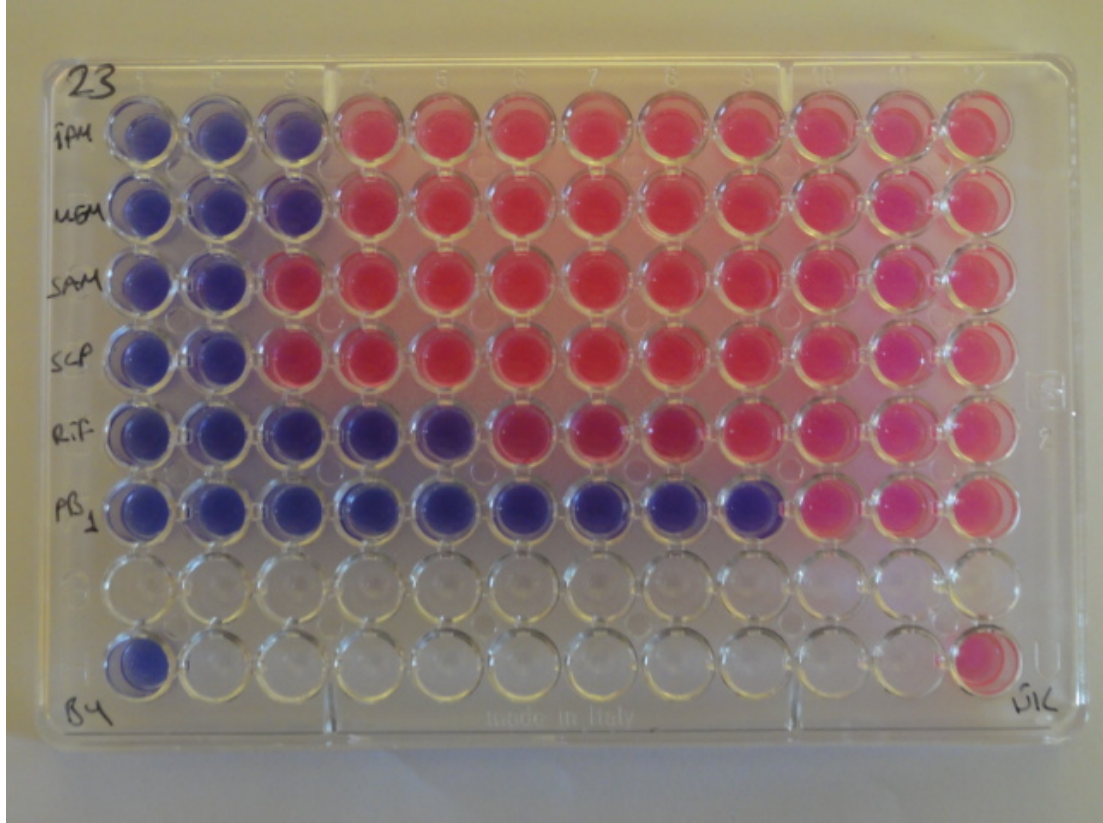
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
İPM	A	64	32	16	8	4	2	1	.50	.25	.125	.06	.03	µg/ml
MEM	B	64	32	16	8	4	2	1	.50	.25	.125	.06	.03	µg/ml
SAM	C	128	64	32	16	8	4	2	1	.50	.25	.125	.06	µg/ml
SCP	D	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	.50	.25	µg/ml
RİF	E	32	16	8	4	2	1	.50	.25	.125	.06	.03	.01	µg/ml
PB	F	4	2	1	.50	.25	.125	.06	.03	.01	.007	.003	.001	µg/ml
	G													
	H	BK											ÜK	

**Şekil 1.** İzolatların her bir antibiyotik için MİK değerleri belirlenirken kullanılan plağın temsili şekli

Daha sonra, testin 48 saat öncesinde, muhafaza edildiği -80°C'den çıkarılıp oda ısısına gelmesi beklendikten sonra %5 koyun kanlı EMB agar besiyerine pasajlanan ve 35 ± 2°C'de 24 saat inkübe edilip üreyen saf kolonilerden yine %5 koyun kanlı agar besiyerine ikinci kez taze pasajı yapılan ve yine 35 ± 2°C'de 24 saat inkübe edilip üretilen, test edilecek bakteri kolonilerinden 3cc KAMHB içinde BD Phoenix Spec Nephelometer cihazı ile 0,5 McFarland bulanıklığa eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon, 1/100 oranında yine KAMHB

ile sulandırılarak, son bakteri inokulum konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  CFU/ml olacak şekilde üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her bir kuyucuğa 50 µl eklenmiştir. Besiyeri kontrol kuyucuğuna bakteri süspansiyonu pipetlenmemiştir. Daha sonra plağın üstü kapatılarak  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. 19 saatlik inkübasyondan sonra plak etüvden çıkarılmış, kuyucuklar gözle değerlendirilmiş ve üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu o ilacın çalışılan bakteri için MİK değeri olarak saptanmıştır.

Daha sonra üreme kontrol indikatörü olarak hazırlanan %0,01'lik resazurin sodium solüsyonu her kuyucuğa 20 µl olacak şekilde pipetlenmiş, tüm kuyucukların mavi renkte boyandığı gözlenmiş ve plağın üstü kapatılarak 1 saat daha  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır.



**Resim 1.** Bir izolattan elde edilen antibiyotik MİK sonuçlarını gösteren plak

İnkübasyon sonrası plak tekrar değerlendirilmiş, üreme olan kuyucuklar pembe, üreme olmayan kuyucuklar mavi renkte gözlenmiştir. Mavi renkte gözlenen en düşük antibiyotik konsantrasyonu, test edilen bakteri için o antibiyotiğin MİK

değeri olarak belirlenmiştir. Resim-1’de çalışmamızda kullanılan bir izolatin antibiyotik MİK sonuçları görülmektedir.

Yöntem boyunca uygulanan pipetajların tamamı UV (ultraviolet) ile temizlenmiş ortamda ve steril pipet uçları kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamızda standart suş olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılmıştır.

### 3.10. Dama Tahtası (Checkerboard) Yöntemi

Çalışmamızda kullanılan her bir bakteri için 8 farklı ilaç kombinasyonunun etkinliği bu yöntemle test edilmiştir. Her bir ilacın her bir bakteri için belirlenmiş olan MİK değeri esas alınarak, bu MİK değerinin 2-3 kat dilüsyon üstünden, 4-8 kat dilüsyon altına kadar olan değerlerini içeren antibiyotik dilüsyonları kullanılmıştır.

-80°C muhafaza ortamından çıkarılıp oda ısısına getirilen antibiyotik stok solüsyonları, ayrı ayrı steril tüplerde çift kat seri dilüsyonları, her antibiyotiğin kendine has sulandırıcısı ile yapılarak (bkz tablo-4) kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Her antibiyotiğin başlangıç konsantrasyonu (1. tüp) kombinasyonda elde edilmek istenen başlangıç (en yüksek) konsantrasyonunun 4 katı fazla konsantrasyonda antibiyotik içerecek şekilde hazırlanmıştır (plak üzerindeki kuyucuğa antibiyotik eklenecek ve üzerine kombine edilecek olan ikinci antibiyotik aynı miktarda eklendiğinde ilacımız bir kat dilüe olacak ve en son her iki antibiyotiğin toplam miktarı kadar bakteri inokulumu pipetlendiğinde bir kat daha dilüe olacak).

Örneğin; İPM MİK değeri 16 µg/ml ve SAM MİK değeri 32 µg/ml olan bir bakterimizi çalışırken, İPM için 8 tüp, SAM için 10 tüp hazırladık. İPM için kuyucuktaki en yüksek başlangıç konsantrasyonumuzun 16’nın 2 dilüsyon üstü yani 64 µg/ml olmasını istiyoruz. Başlangıç tüpümüze bu değer 2 dilüsyon üstü olan 256 µg/ml konsantrasyonda İPM hazırlamamız gerekiyor. Daha sonra İPM için önerilen dilüsyon sıvısı kullanılarak ilk tüpten başlayıp 8. tüpe kadar çift kat seri dilüsyon yaptık. Son tüpte ki (8. tüp) ilaç konsantrasyonumuz 2 µg/ml (kuyucuğa eklendiğinde 0,5 µg/ml yani MİK değerinin 5 kat altı) oldu. Aynı şekilde MİK değeri 32 µg/ml olan SAM için kuyucuktaki başlangıç konsantrasyonumuzun 128 µg/ml (2 dilüsyon üstü) olmasını istiyoruz. Bunu elde etmek için ilk tüpümüze 512 µg/ml

konsantrasyonda SAM hazırladık. Daha sonra ilk tüpten başlayarak 10. tüpe kadar çift kat seri sulandırımını SAM için önerilen dilüsyon sıvısı ile yaptık. Son tüpteki (10. tüp) ilaç konsantrasyonumuz 1 µg/ml (kuyucuğa eklendiğinde 0,25 µg/ml yani MİK değerinin 7 kat altı) oldu.

Kombinasyonda kullanılacak her iki ilacın dilüsyonları hazırlandıktan sonra, 96 kuyucuklu steril U tabanlı plak alınarak, plağın A12 çukuru besiyeri kontrolü (BK), H12 çukuru ise üreme kontrolü (ÜK) olarak işaretlenmiş ve bu kuyucuklara antibiyotik eklenmemiştir. Besiyeri kontrol kuyucuğuna 100 µl KAMHB, üreme kontrol kuyucuğuna ise 50 µl KAMHB besiyeri pipetlenmiştir. Kombinasyondaki iki antibiyotikten ilki (A ilacı) için 8 yatay sıra (A-B-C-D-E-F-G-H) 1'den 10'a kadar (10. kuyucuk dahil) kullanılmış, ikinci antibiyotik (B ilacı) için ise 10 dikey sıra (1-2-3-4-5-6-7-8-9-10) A'dan H'ye kadar (H dahil) kullanılmıştır.

A ilacının test edilmek istenen en yüksek konsantrasyonu (1. tüp) plaktaki A yatay sırasındaki kuyucuklara 1'den 10. kuyucuğa kadar her kuyucuğa 25 µl olacak şekilde pipetlenmiş, B yatay sırasındaki kuyucuklara 2. tüpteki konsantrasyonu, aynı şekilde 1'den 10. kuyucuğa kadar 25'er µl pipetlenmiş, aynı işlemler 3. tüp için C yatay sırasına, 4. tüp için D yatay sırasına, 5. tüp için E, 6. tüp için F, 7. tüp için G ve son olarak 8. tüp (ilacın en düşük konsantrasyonu) için H yatay sırasındaki 1'den 10'a kadar olan kuyucuklara aynı şekilde 25'er µl pipetlenmiştir.

Daha sonra kombinasyondaki ikinci antibiyotiğin (B ilacı) test edilmek istenen en düşük konsantrasyonu (10. tüp) plağın 1 no'lu dikey sütununa A'dan H'ye kadar olan kuyucuklara 25'er µl pipetlenmiş, 9. tüpteki konsantrasyonu 2 no'lu dikey sütuna, 8. tüpteki konsantrasyonu 3 no'lu sütuna, bu şekilde çift kat artan dilüsyonları sıra ile sütunlara pipetlenerek, en son ilacın en yüksek konsantrasyonu (1. tüp) 10 no'lu dikey sütundaki kuyucuklara 25'er µl pipetlenmiştir.

Örneğin MİK değeri 16 µg/ml bulunan A ilacı ve MİK değeri 32 µg/ml bulunan B ilacı için yapılan pipetaajlar şekil-2'de görüldüğü gibi yapılmıştır.

Böylece 1H kuyucuğu her iki ilaç için de kombinasyondaki en düşük konsantrasyonu içerirken, 10A kuyucuğu her iki ilaç için de en yüksek konsantrasyonu içermektedir.

Her çalışma gününde bir bakteri suşu test edilmiş ve her bir bakteri suşu için 8 ayrı kombinasyon test edildiğinden, bu işlemler her bir ilaç kombinasyonu için tekrarlanmış ve her çalışma gününde toplam 8 adet plak hazırlanmıştır. Her çalışma gününde artan antibiyotik stok solüsyonu dökülmüş, her yeni çalışma gününde aynı gün  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılıp çözündürülen yeni stok solüsyonu kullanılmıştır.

Hazırlanan her plak, bakteri pipetlenene kadar üstü kapatılarak buzdolabında  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiş, bakteri eklenmeden önce oda ısısına getirilmiştir.

Daha sonra, çalışmanın 48 saat öncesinde muhafaza edildiği  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılıp oda ısısına gelmesi beklendikten sonra %5 koyun kanlı EMB agar besiyerine pasajlanan ve  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilip saf üreyen bakteri kolonilerinden yine %5 koyun kanlı agara ikinci kez taze pasajı yapılan ve yine  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilip üretilen, test edilecek bakteri kolonilerinden 2-3 tanesi steril yuvarlak uçlu öze ile alınarak 3cc KAMHB içinde karıştırılıp iyice vortekslenerek homojenize edildikten sonra, BD Phoenix Spec Nephelometer cihazı ile 0.5 McFarland bulanıklığa eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon, son bakteri inokulüm konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  CFU/ml olacak şekilde yine KAMHB ile 1/100 oranında dilüe edilmiştir. Elde edilen bakteri inokulümü, antibiyotikleri pipetlediğimiz plaklara (toplam 8 plak), üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde pipetlenmiştir. Besiyeri kontrol kuyucuğuna bakteri süspansiyonu pipetlenmemiştir.

A ilacı ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	64 0.25	64 0.5	64 1	64 2	64 4	64 8	64 16	64 32	64 64	64 128		BK
B	32 0.25	32 0.5	32 1	32 2	32 4	32 8	32 16	32 32	32 64	32 128		
C	16 0.25	16 0.5	16 1	16 2	16 4	16 8	16 16	16 32	16 64	16 128		
D	8 0.25	8 0.5	8 1	8 2	8 4	8 8	8 16	8 32	8 64	8 128		
E	4 0.25	4 0.5	4 1	4 2	4 4	4 8	4 16	4 32	4 64	4 128		
F	2 0.25	2 0.5	2 1	2 2	2 4	2 8	2 16	2 32	2 64	2 128		
G	1 0.25	1 0.5	1 1	1 2	1 4	1 8	1 16	1 32	1 64	1 128		
H	0.5 0.25	0.5 0.5	0.5 1	0.5 2	0.5 4	0.5 8	0.5 16	0.5 32	0.5 64	0.5 128		ÜK

←B ilacı

Şekil 2. A ve B ilaçları için pipetaj formatı

Kullanılan bakteri inokulümünün son konsantrasyonunun  $5 \times 10^5$  CFU/ml olduğundan emin olmak için, inokulüm süspansiyonlarının koloni sayımını yapmak amacıyla pipetaj bitiminde CLSI önerilerine göre (98), üreme kontrol kuyucuğundan 0,01 ml'lik bir hacim alınıp, 10 ml steril FTS (fizyolojik tuzlu su) da sulandırılmış (1/1000 dilüsyon) vortexle iyice karıştırılıp homojenize edildikten sonra, bu sulandırmadan 0.1 ml lik miktar koyun kanlı agar besiyerine ekilerek, besiyerinin tüm alanına homojen bir şekilde yayılmış ve  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyonun sonunda ortalama 50 koloninin varlığı hedeflenmiştir ( $50 \text{ koloni} = 5 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$ ). Çalışmamızda 24 saat inkübasyon sonrası 60 koloninin üstünde ve 40 koloninin altında olan inokulüm kontrol üremelerinde test sonuçları değerlendirmeye alınmamış ve test tekrarlanmıştır.

Plaklara bakteri pipetlendikten sonra üstleri kapatılarak, üst üste 4 plaktan fazla olmayacak şekilde  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 19 saatlik inkübasyonun sonunda üreme olan kuyucuklar gözle değerlendirilip daha önceden her kombinasyon için ayrı ayrı hazırlanan ve 96 kuyucuklu plağı temsil eden şekillerin olduğu kağıtlara kaydedilmiş (şekil-3), daha sonra üreme kontrol indikatörü olarak hazırlanan %0,01'lik resazurin sodium solüsyonu her kuyucuğa 20 µl olacak şekilde tüm kuyucuklara (besiyeri kontrol ve üreme kontrol kuyucuğu da dahil) pipetlenmiş ve plaklar 1 saat daha  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası üremenin olduğu kuyucuklar pembe renkte, üreme olmayan kuyucuklar mavi renkte gözlenmiştir. Üreme olan pembe renkteki kuyucuklar kaydedilmiş, daha önce gözle değerlendirmede üreme tespit edilen kuyucuklarla karşılaştırılmıştır. Sonuçlar %98,2 oranında uyumlu bulunmuş, uyumsuz bulunan kuyucuklardan %5 koyun kanlı agara ekimler yapılmış ve 24 saat  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilerek uyumsuz sonuçlar netleştirilmiştir.

İPM/SAM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												BK
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												ÜK

**Şekil 3.** 96 kuyucuklu plağı temsil eden üremelerin kaydedildiği örnek format

Çalışmamızda standart suş olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Tüm çalışma sürecinde uygulanan pipetajlar, UV ile temizlenmiş ortamda ve steril pipet uçları kullanılarak yapılmıştır.

### 3.11. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntem

Kombinasyon çalışmamızdan elde edilen veriler değerlendirilirken kombinasyondaki her ilacın Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) değerlerinin ve kombinasyonun Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksi ( $\Sigma$ FİK) değerinin tespit edilmesi esas alınmıştır. Bu amaçla; kombine edilen A ve B ilaçları için aşağıdaki formüller kullanılmıştır (94).

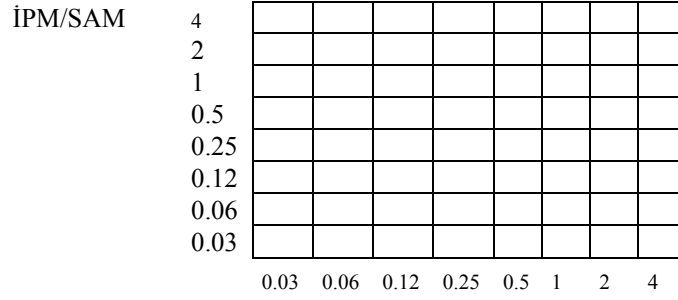
FİK A = A ilacının kombinasyondaki MİK değeri / A ilacının tek başına MİK değeri

FİK B = B ilacının kombinasyondaki MİK değeri / B ilacının tek başına MİK değeri

Daha sonra her iki ilacın FİK değerleri toplanarak FİK indeksi ( $\Sigma$ FİK) bulunmuştur.

$$\Sigma\text{FİK} = \text{FİK A} + \text{FİK B}$$

Değerlendirme yapılırken elde edilen en düşük  $\Sigma$ FİK değeri kullanılmıştır. Bu amaçla üreme olmayan tüm kuyucuklar taranarak, en düşük  $\Sigma$ FİK'nin hesaplandığı kuyucuk değerlendirmeye alınmış ve o kuyucukta ki en düşük  $\Sigma$ FİK değeri kullanılmıştır. Bu yöntem Anon'un Klinik Mikrobiyoloji Prosedürleri El Kitabı'nda tanımlanmıştır (99,100). Değerlendirmelerin ve hesaplamaların daha kolay yapılabilmesi için, çalışmalar tamamlandıkça şekil-3'te gösterilen formatlara kaydedilen üremeler, çalışılan bakterinin her bir antibakteriyel ilaç için elde edilen MİK değerleri baz alınarak bu değerlerin 2 kat üstü dilüsyon (FİK değeri 4 çıkan) ve 5 kat altı dilüsyon (FİK değeri 0,03 çıkan) değerlerini gösteren şekil-4'teki yeni bir tabloya aktarılmıştır.



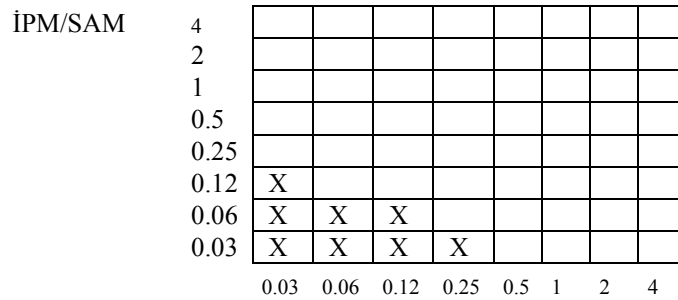
**Şekil 4.** Kombinasyondaki ilaçların FİK değerlerini gösteren şekil

Örneğin, İPM için MİK değeri 16 µg/ml ve SAM için MİK değeri 32 µg/ml olarak bulunan bir bakteri için İPM/SAM kombinasyonu için elde edilen dama tahtası plağı aşağıda şekil-5'te görüldüğü gibi ise;

İPM		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	64	A											
	32	B											
	16	C											
	8	D											
	4	E	X										
	2	F	X	X	X								
	1	G	X	X	X	X	X						
	0.5	H	X	X	X	X	X	X					
		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128		SAM

**Şekil 5.** İPM/SAM için örnek dama tahtası plağı

Bu sonuçların şekil-4'teki FİK değerlerini gösteren grafiğe aktarılmış hali şekil-6'daki gibidir.



**Şekil 6.** Örneğin FİK değerlerini gösteren şekil

Bu grafikler kullanılarak çalışmada kullanılan tüm suşların 8 ayrı ilaç kombinasyonları değerlendirilmiştir. Yukarıdaki şekil-5 ve 6'daki örnek için bulunan değerleri yöntemimize uygularsak,



Üreme olmayan kuyucuklardaki en düşük  $\Sigma FİK$  değeri:  $0.12+0.06= 0.18$  olarak bulunur (bkz. Şekil-7).

İPM/SAM	4							
	2							
	1							
	0.5							
	0.25							
	0.12	X	⊖					
	0.06	X	X	X				
	0.03	X	X	X	X			
		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2
								4

⊖: en düşük  $\Sigma FİK$  hesaplanan üremenin olmadığı kuyucuk

**Şekil 7.** Kullanılan yöntemin şekil üzerinde gösterilmesi

Çalışmamızda kullanılan tüm bakteri suşlarında 8 ayrı antibakteriyel kombinasyon için elde edilen  $\Sigma FİK$  değerleri kaydedilmiş ve buna göre kombinasyonun etkinliği belirlenmiştir.

$\Sigma FİK \leq 0,50$  ise sinerjistik etkileşim

$1 > \Sigma FİK > 0,5$  ise aditif etkileşim

$4 > \Sigma FİK > 1$  ise tanımlanamayan etkileşim (indiferans)

$\Sigma FİK \geq 4$  ise antagonistik etkileşim olarak değerlendirilmiştir (94).

## 4. BULGULAR

### 4.1. *A.baumannii* İzolatlarının Klinik Özellikleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmamızda kullanılan 34 *A.baumannii* izolatının 23 tanesi (%67,6) Anestezi Yoğun Bakımda, 9 tanesi (%26,5) Nöroloji Yoğun Bakımda, 1 tanesi (%2,9) Dahiliye Yoğun Bakımda ve 1 tanesi de (%2,9) Koroner Yoğun Bakımda yatan farklı hastaların klinik örneklerinden izole edilmiştir. Örneklerin 17 tanesi (%50) trakeal aspirat, 16 tanesi (%47) kan kültürü ve 1 tanesi de (%3) derin doku/püy idi. Çalışmamızda kullanılan *A.baumannii* suşlarının izole edildiği örneklerin gönderildikleri kliniklere göre dağılımı tablo-6'da verilmiştir.

**Tablo 6.** Bakterilerin izole edildiği klinik örneklerin gönderildikleri ünitelere göre dağılımı

	Hasta sayısı	Klinik örnekler		
		Kan kültürü	Trakeal aspirat	Derin doku/püy
Anestezi YB	23	11	11	1
Nöroloji YB	9	4	5	-
Dahiliye YB	1	1	-	-
Koroner YB	1	-	1	-
Toplam	34	16	17	1

Yoğun Bakım ünitelerinde tedavi gören ve bu örneklerin alındığı toplam 34 farklı hastanın 24'ü (%70,6) erkek, 10 tanesi (%29,4) kadındı ve hastaların yaş ortalaması 62 (26-83) idi.

İzolatların tamamı (%100) imipenem, meropenem, tikarsilin, sefepim, amikasin ve siprofloksasine dirençli olarak bulunmuş, %97'si seftazidim'e, %94,1'i ampisilin/sulbaktam, %79,4'ü gentamisin ve trimetoprim/sülfametoksazole, %44,2'si minosiklin'e dirençli bulunmuştur. Disk difüzyon testi ile duyarlı, orta duyarlı, dirençli olarak belirlenen *A.baumannii* izolatlarının antibiyogram sonuçları tablo-7'de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** *A.baumannii* suşlarının disk difüzyon testi ile antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

Antibiyotikler	Duyarlı (S) (n / %)	Orta Duyarlı (I) (n / %)	Dirençli (R) (n / %)
İPM	–	–	34 (%100)
MEM	–	–	34 (%100)
SAM	–	2 (%5,9)	32 (%94,1)
TİC	–	–	34 (%100)
CN	5 (%14,7)	2 (%5,9)	27 (%79,4)
FEP	–	–	34 (%100)
AK	–	–	34 (%100)
MI	16 (%47)	3 (%8,8)	15 (%44,2)
CİP	–	–	34 (%100)
SXT	4 (%11,8)	3 (%8,8)	27 (%79,4)
CAZ	1 (%3)	–	33 (%97)

#### 4.2. Kombinasyonda Kullanılan Antibiyotiklerin MİK Sonuçları

Çalışmamızda kullanılan toplam 34 *A.baumannii* izolatının her birinin broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak, imipenem (İPM), meropenem (MEM), ampisilin/sulbaktam (SAM), sefoperazon/sulbaktam (SCP), rifampin (RİF) ve polimiksin B (PB) için MİK değerleri saptanmıştır.

Buna göre, çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının tamamında (%100) İPM, MEM ve SAM için dirençli MİK değerleri bulunmuştur. SCP için sadece bir izolat (%2,9) orta duyarlı olarak test edilmiş, diğer 33 izolat (%97,1) dirençli bulunmuştur. RİF için izolatlarımızın 24 tanesi (%70,6) orta duyarlı MİK değerine (2 µg/ml) sahipken, diğer 10 tanesinin MİK değeri (%29,4) dirençli aralıkta tespit edilmiştir. İzolatların tamamı (%100) PB'ye duyarlı bulunmuştur.

Çalışmamızda değerlendirilen toplam 34 *A.baumannii* izolatının İPM, MEM, SAM, SCP, RİF ve PB için bulunan MİK değerlerinin dağılımı tablo-8'deki gibidir.

**Tablo 8.** *A.baumannii* suşlarının broth mikrodilüsyon testi ile bulunan MİK sonuçları

İlaç konsantrasyonu (µg/ml)	İPM (n/%)	MEM (n/%)	SAM (n/%)	SCP (n/%)	RİF (n/%)	PB (n/%)
512				<b>3 (8,8)</b>		
256				<b>7 (20,6)</b>		
128		<b>2 (5,9)</b>	<b>2 (5,9)</b>	<b>14 (41,2)</b>		
64	<b>4 (11,8)</b>	<b>13 (38,2)</b>	<b>15 (44,1)</b>	<b>9 (26,5)</b>	<b>1 (2,9)</b>	
32	<b>17 (50)</b>	<b>6 (17,7)</b>	<b>17 (50)</b>	1 (2,9)		
16	<b>13 (38,2)</b>	<b>13 (38,2)</b>			<b>1 (2,9)</b>	
4					<b>8 (23,6)</b>	
2					24 (70,6)	
0.125						3 (8,8)
0.062						1 (2,9)
0.031						3 (8,8)
0.015						20 (58,9)
0.007						7 (20,6)

### 4.3. Kombinasyonlardan Elde Edilen Etkileşimler

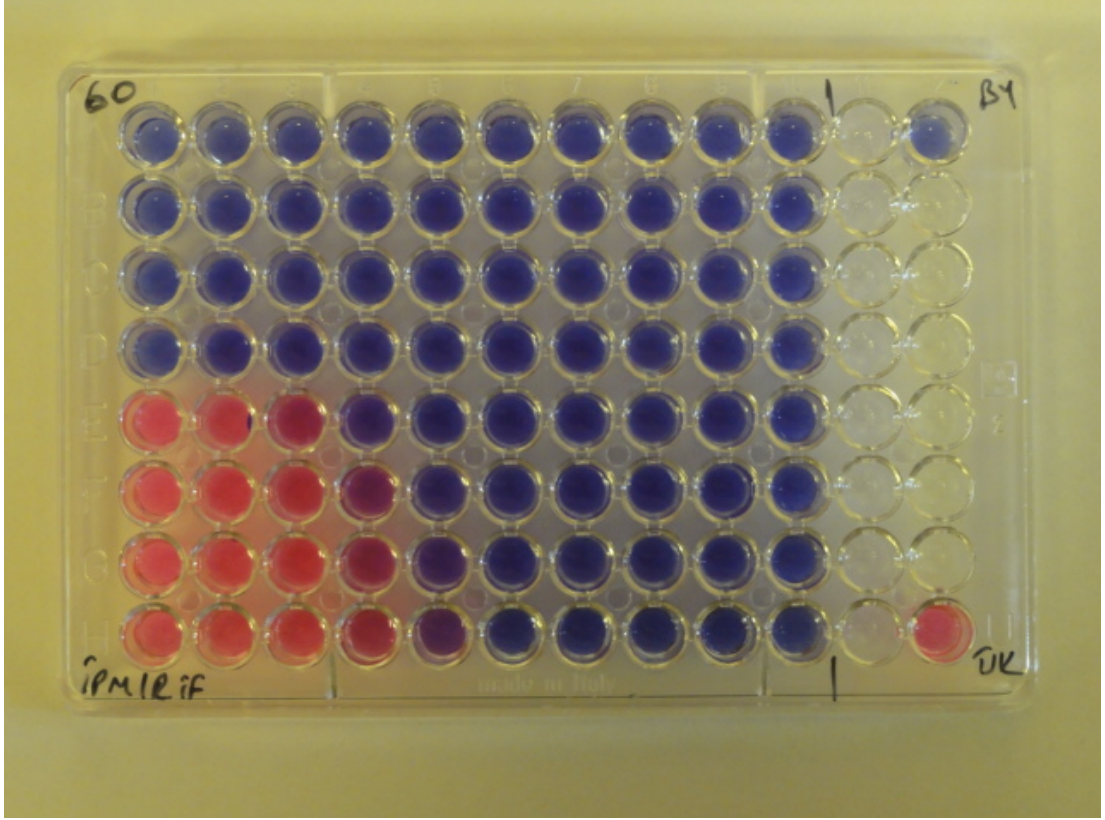
**İPM/SAM kombinasyonu** için, 30 izolatta (%88,2) sinerjistik ve 4 izolatta (%11,8) aditif etkileşim saptanırken, antagonistik ve tanımlanamayan etkileşim gözlenmemiştir.

**İPM/SCP kombinasyonu** için, 24 izolatta (%70,6) sinerjistik, 8 izolatta (%23,5) aditif etkileşim ve 2 izolatta da (%5,9) tanımlanamayan etkileşim tespit edilirken, antagonistik etkileşim gözlenmemiştir.

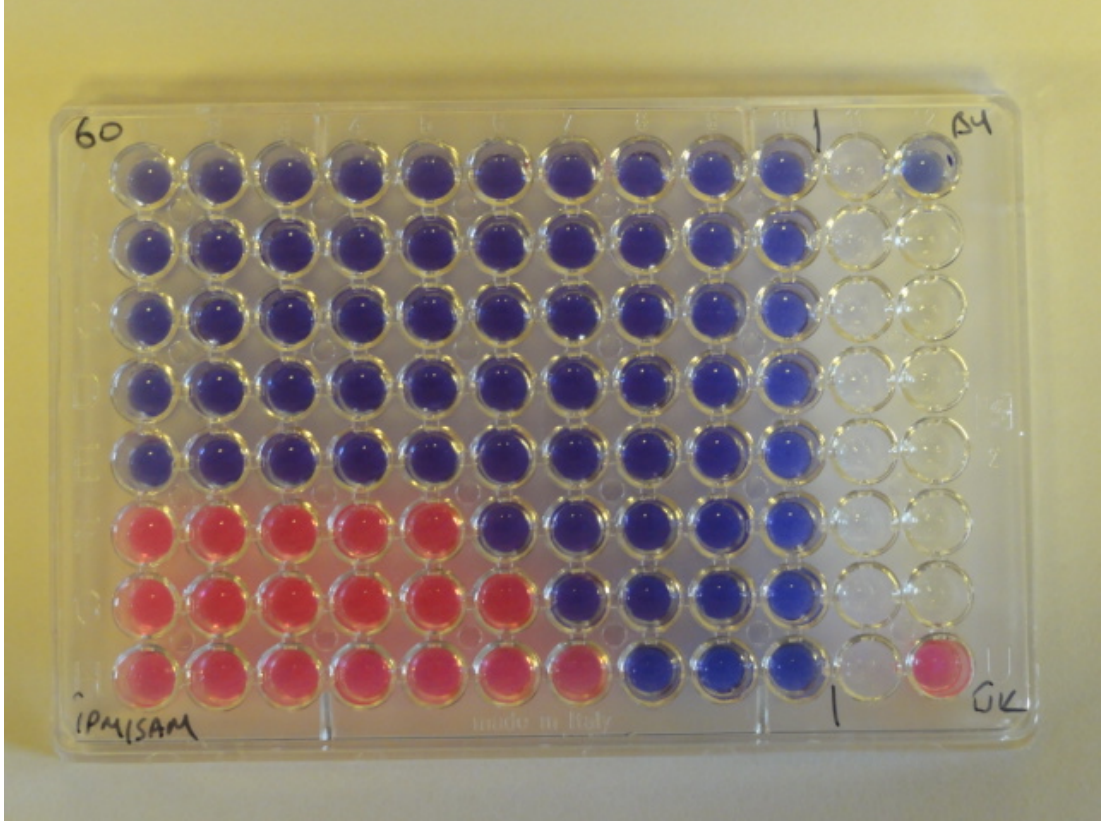
**İPM/RİF kombinasyonu** için, 25 izolatta (%73,5) sinerjistik ve 9 izolatta (%26,5) aditif etkileşim tespit edilirken, bu kombinasyonda tanımlanamayan ve antagonistik etkileşimler gözlenmemiştir.

**İPM/PB kombinasyonu** için, 13 izolatta (%38,2) sinerjizm, 19 (%55,9) izolatta aditif etkileşim ve 2 izolatta (%5,9) tanımlanamayan etkileşim saptanırken, antagonistik etkileşim gözlenmemiştir.

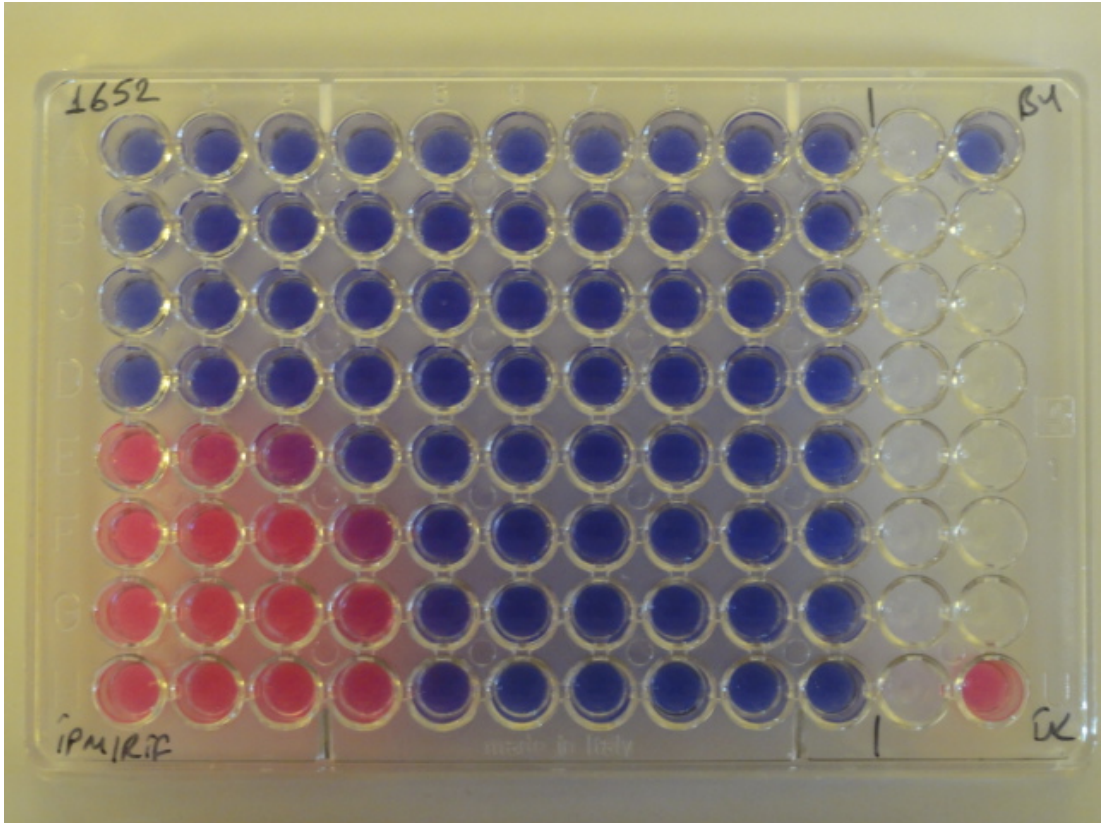
Aşağıda çalışmamızda kullanılan bazı izolatlar için çeşitli İPM kombinasyonlarından elde edilen dama tahtası plaklarının resimleri görülmektedir (resim 2-3-4 ve 5).



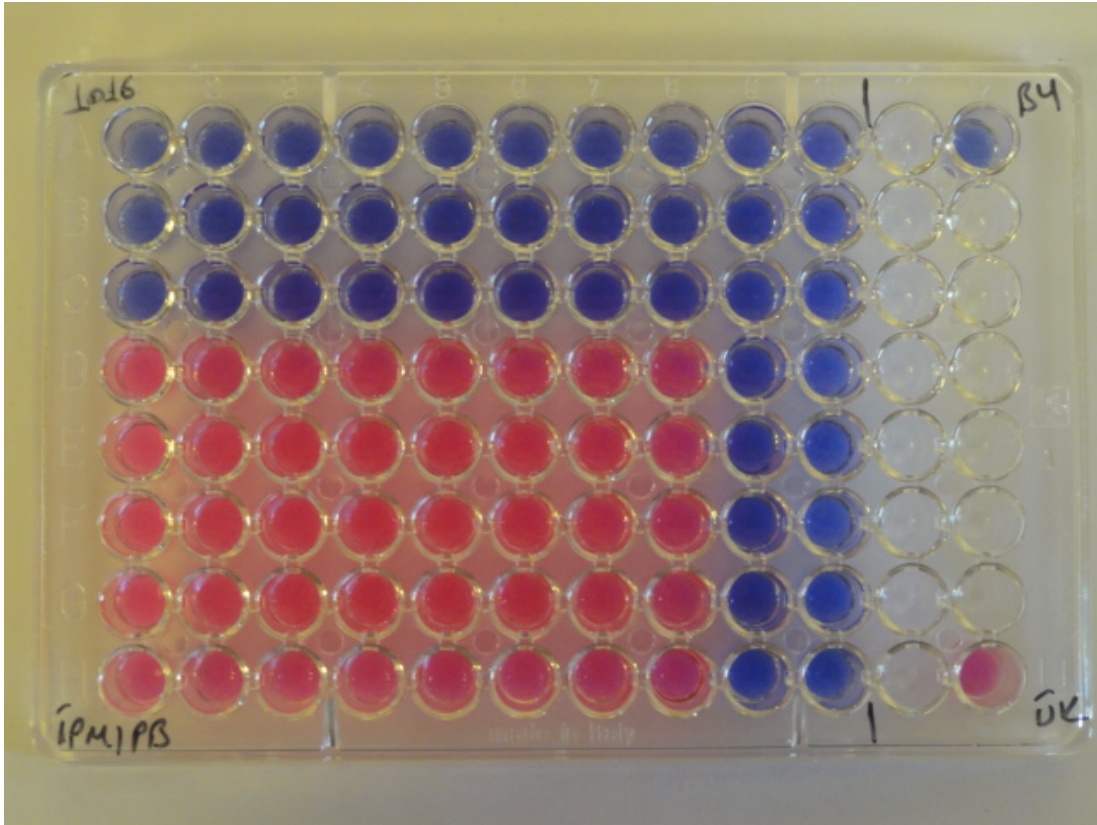
**Resim 2.** Aditif etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.



**Resim 3.** Sinerjistik etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.



**Resim 4.** Sinerjistik etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.



**Resim 5.** Aditif etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.

**MEM/SAM kombinasyonu** için, 32 izolatta (%94,1) sinerjistik ve 2 izolatta (%5,9) aditif etkileşim tespit edilirken, tanımlanamayan ve antagonistik etkileşimler gözlenmemiştir.

**MEM/SCP kombinasyonu** için, 3 izolatta (%8,8) sinerjistik, 22 izolatta (%64,7) aditif etkileşim ve 9 izolatta (%26,5) tanımlanamayan etkileşim saptanırken, antagonistik etkileşim gözlenmemiştir.

**MEM/RİF kombinasyonu** için, 6 izolatta (%17,6) sinerjistik, 26 izolatta (%76,5) aditif etkileşim ve 2 izolatta (%5,9) tanımlanamayan etkileşim saptanırken, antagonistik etkileşim gözlenmemiştir.

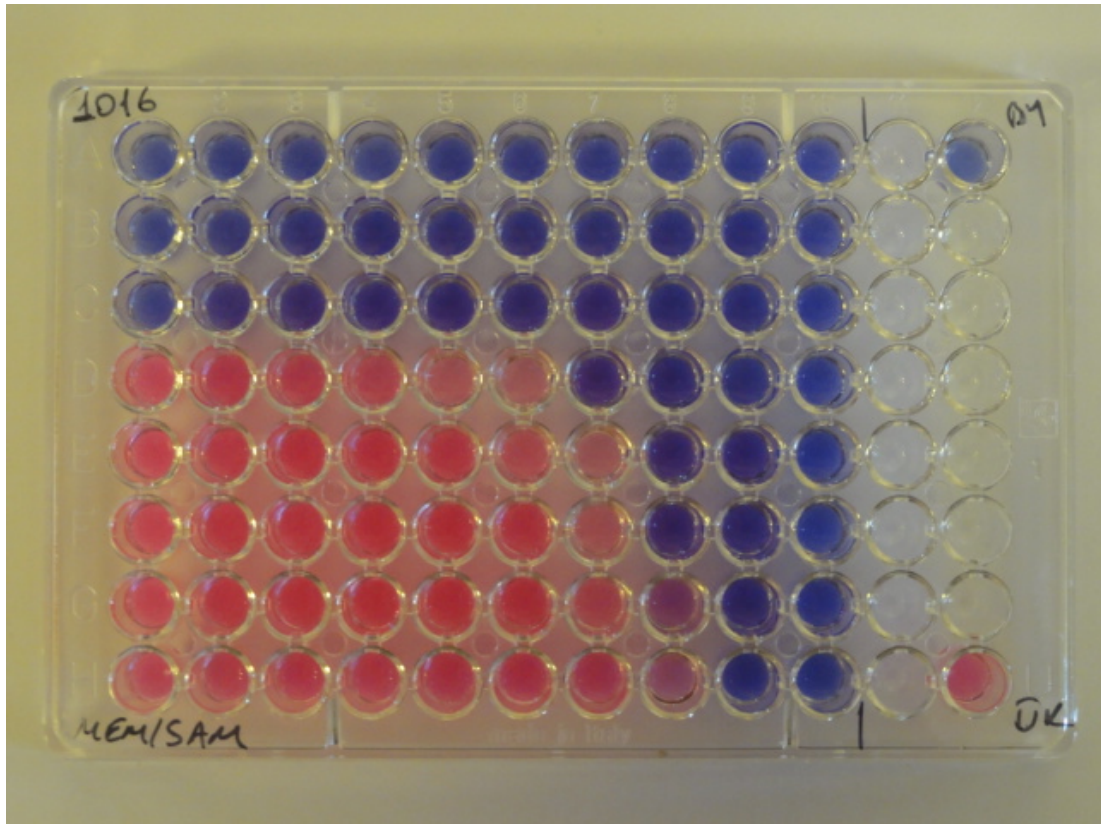
**MEM/PB kombinasyonu** için, 1 izolatta (%2,9) sinerjistik, 22 izolatta (%64,7) aditif etkileşim, 11 izolatta (%32,4) tanımlanamayan etkileşim tespit edilirken, izolatların hiçbirinde antagonizma saptanmamıştır.

Tablo-9'da çalışmada kullanılan kombinasyonlardan elde edilen etkileşimlerin sayısı ve oranları görülmektedir.

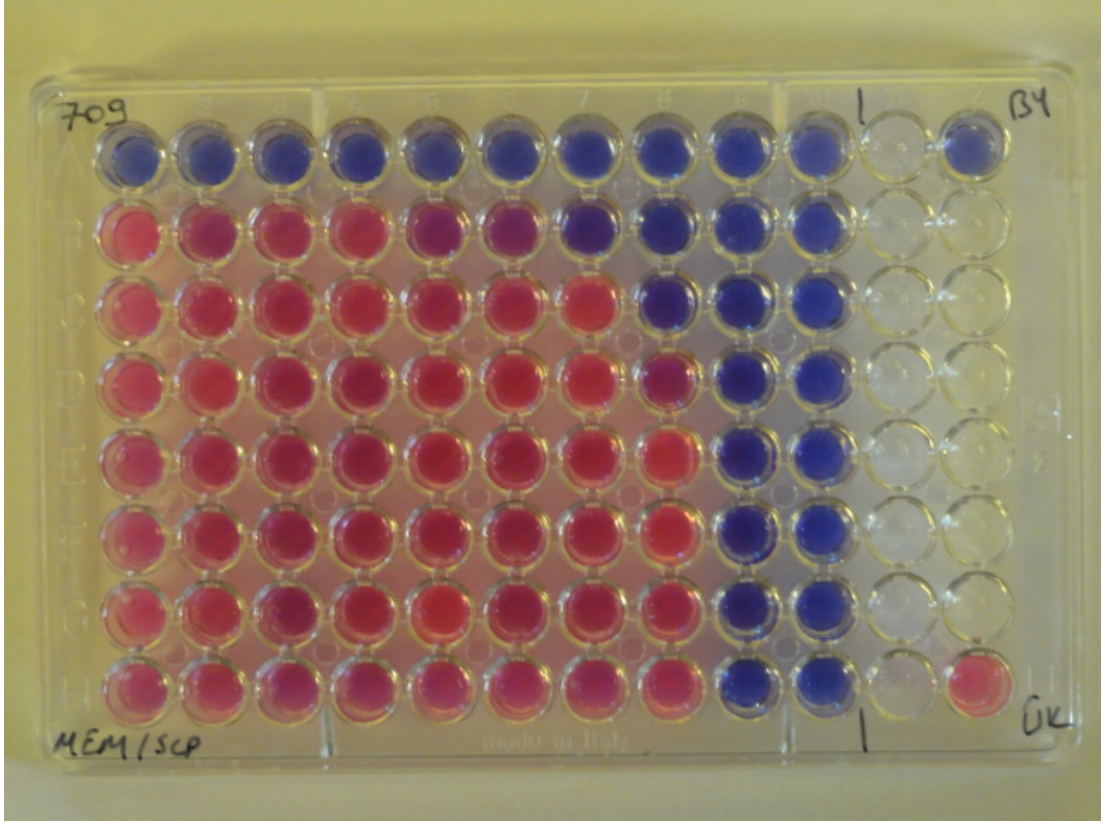
**Tablo 9.** Kombinasyonlardan elde edilen etkileşimler

	Sinerji (n/%)	Aditif (n/%)	Tanımlanamayan (n/%)	Antagonizma
İPM/SAM	30 (%88,2)	4 (%11,8)	-	-
İPM/SCP	24 (%70,6)	8 (%23,5)	2 (%5,9)	-
İPM/RİF	25 (%73,5)	9 (%26,5)	-	-
İPM/PB	13 (%38,2)	19 (%55,9)	2 (%5,9)	-
MEM/SAM	32 (%94,1)	2 (%5,9)	-	-
MEM/SCP	3 (%8,8)	22 (%64,7)	9 (%26,5)	-
MEM/RİF	6 (%17,6)	26 (%76,5)	2 (%5,9)	-
MEM/PB	1 (%2,9)	22 (%64,7)	11(%32,4)	-

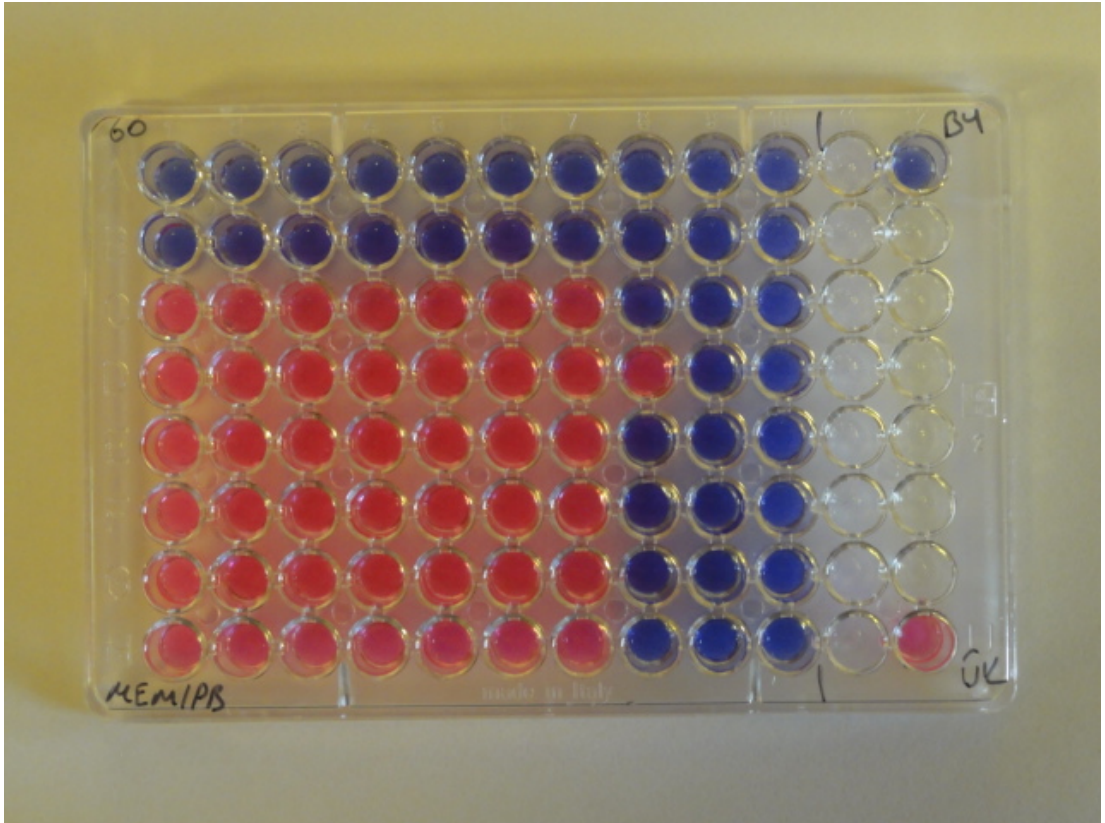
Aşağıda çalışmamızda kullanılan bazı izolatlar için çeşitli MEM kombinasyonlarından elde edilen dama tahtası plaklarının resimleri görülmektedir (resim 6-7 ve 8).

**Resim 6.** Sinerjistik etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.





**Resim 7.** Tanımlanamayan etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.



**Resim 8.** Aditif etkileşim tespit edilen bir plağın görünümü.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbapenemler güvenlik profilleri nedeniyle MDR Gram negatif bakteri infeksiyonlarında tercih edilen en önemli ilaç grubudur. Birçok durumda karbapenemlerin bu infeksiyonların tedavisinde ilk seçenek ilaç olduğu kanıtlanmıştır (101-103). Ancak dünyada gün geçtikte artan düzeyde karbapenem dirençli MDR *A.baumannii* suşlarının görüldüğünü rapor eden birçok yayın vardır (68, 104-106). Sürveyans çalışmaları karbapenemlere duyarlılık oranlarının ülkeden ülkeye değiştiğini bildirmektedir. En düşük duyarlılık oranları İtalya, İngiltere ve Türkiye’de saptanmıştır (101). Bu oranlar, coğrafi bölgeye ve test edilen karbapeneme göre %32’den %90’lara kadar değişkenlik göstermektedir (40,107). 2006 yılında, 14 aylık bir süreçte SDÜ Tıp Fak. Hastanesi YBÜ ve Cerrahi kliniklerinden izole edilen 66 *A.baumannii* kökeni ile yapılan epidemiyolojik bir çalışmada izolatların %47’sinin karbapenemlerden en az birine dirençli olduğu tespit edilmiştir (108). Ancak yine de karbapenemler *A.baumannii*’ye karşı en aktif ajanlar olarak kabul edilirler (109,110).

MDR *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde direnç gelişimini önlemek ve tedavi etkinliğini artırmak amacıyla kombine antibiyotik kullanımı önerilmektedir (103). Dirençli Gram negatif bakteriler için piyasaya yeni ilaçlar çıkmamakta, bu nedenle araştırmacılar mevcut ilaçları farklı uygulama yolları ile ya da etkili olabilecek farklı gruptan ilaçlarla kombinasyon halinde değerlendiren çalışmalara yönelmektedir. MDR *A.baumannii* izolatları için sinerji çalışmaları bu temele dayanmaktadır (111). Biz de bu bilgilerin ışığında, karbapenemleri baz alarak ajanlardan biri imipenem veya meropenem olmak koşuluyla 8 farklı ilaç kombinasyonunun (İPM/SAM, İPM/SCP, İPM/RİF, İPM/PB, MEM/SAM, MEM/SCP/ MEM/RİF ve MEM/PB) etkinliğini dama tahtası yöntemiyle test ettik.

Sulbaktam, minimal yan etkisiyle beta laktamaz inhibitörleri içinde, *A.baumannii*’ye karşı en yüksek intrinsek antibakteriyal aktivite gösteren ajandır. İn vitro olarak *A.baumannii*’ye karşı amoksisilin-klavulonik asit ve piperasilin-tazobaktamdan daha iyi aktivite gösterdiği bildirilmiştir (4). Ampisilin-sulbaktam veya tek başına sulbaktamın karbapenemlerle kombinasyonunun MDR *A.baumannii* türlerine karşı beta laktamların aktivitesini belirgin bir şekilde geliştirdiği rapor

edilmiştir (68,112,113). Sulbaktam ilaç olarak tek başına bulunmamakta, ampisilin veya sefoperazon ile kombine olarak klinik kullanıma sunulmaktadır. Biz de çalışmamızda sulbaktamı, ampisilin ve sefoperazon katkılı haliyle karbapenemlerle kombine olarak test ettik ve literatürlerle uyumlu olarak en yüksek sinerji oranlarını karbapenemlerin, sulbaktam içeren SAM ve SCP ile olan kombinasyonlarında gözlemledik. Bu oranı MEM/SAM için %94,1 (32/34), İPM/SAM için %88,2 (30/34) ve İPM/SCP için %70,6 (24/34) olarak tespit ettik. Çalışmamızda MEM/SAM kombinasyonu için elde ettiğimiz sinerji oranına uyumlu olarak, Kiffer ve arkadaşları (12), 48 MDR *A.baumannii* izolatının, meropenem ve sulbaktam kombinasyonu için ilaç etkileşimlerini in vitro olarak dama tahtası yöntemi ile araştırdıkları çalışmalarında izolatların %77,1'inde sinerjistik ve parsiyel sinerjistik etkileşim saptamışlardır. Çalışmada kullandıkları MEM ve sulbaktam MİK değerleri yüksek olan izolatlarda bile ( $\geq 16\mu\text{g/ml}$ ) yüksek oranda sinerjizm ve parsiyel sinerjizm tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada Sarıgüzel ve ark. (114), İPM, MEM ve SCP için MİK değerleri dirençli sınırlar içerisinde bulunan 100 *A.baumannii* izolatına İPM/SCP ve MEM/SCP kombinasyonlarının etkinliklerini E test yöntemiyle araştırmışlar ve bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, imipenem ve sefoperazon/sulbaktam kombinasyonunun izolatların %43'ünde sinerjistik, %22'sinde kısmi sinerjistik, %19'unda aditif, %16'sında tanımlanamayan aktivite gösterdiğini, meropenem ve sefoperazon/sulbaktam kombinasyonunun ise %49'unda sinerjistik, %30'unda kısmi sinerjistik, %8'inde aditif, %13'ünde tanımlanamayan aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Her iki kombinasyon için de hiçbir izolatta antagonistik etkileşim gözlemediklerini rapor etmişlerdir.

Bununla birlikte MEM/SCP kombinasyonunda gözlemlediğimiz sinerji oranı diğer sulbaktam içeren kombinasyonlarımızdan daha düşüktü (%8,8)(3/34). Çalışmamızda sinerjiyi tanımlarken  $\Sigma\text{FİK}$  değeri 0,5'e eşit ve altında olan değerleri kullandık. 0,5-1 arasındaki değerleri de aditif etkileşim (parsiyel sinerji) olarak değerlendirdik. MEM/SCP kombinasyonu için sinerji oranlarımız düşük olsa da, izolatların büyük çoğunluğunda bu kombinasyon aditif etkileşim göstermiştir (%64,7). Yani izolatların birçoğu için MEM/SCP kombinasyonunda elde edilen  $\Sigma\text{FİK}$  değeri 1'nin altındadır ve bu da kombinasyondaki MEM ve SCP'nin MİK değerlerinin başlangıç MİK değerlerine göre oldukça düşmüş olduğunu

göstermektedir. Sinerji oranlarımıza test ettiğimiz aditif etkileşimlerimizi de dahil edersek, MEM/SCP kombinasyonu için bulunan düşük sinerji oranı göreceli olarak aslında diğer sulbaktam içeren kombinasyonlarımızdan elde ettiğimiz sinerji oranlarına yakın değerlerde olacaktır. Nitekim sinerji tanımlamasında  $\Sigma FIK \leq 1$  değerini kriter olarak (10,115-117) kullanan bazı kaynaklar bu yaklaşımımızı desteklemektedir.

MDR *A.baumannii* kökenlerinin meydana getirdiği infeksiyonların tedavisinde klinisyenlere alternatif bir seçenek sunabilmek adına karbapenem/sulbaktam antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik aktivitesini araştıran başka birçok çalışma yapılmıştır (9,13,68,115,118). Ko ve ark. (68), meropenem/sulbaktam kombinasyonunun aktivitesini in vitro olarak time kill metoduyla ve in vivo olarak farelerde araştırmışlar, her bir ilacı tek başına kullanımlarıyla karşılaştırınca, time kill ile 48 saat sonra koloni sayısında belirgin azalma, fare modelinde oluşturdukları MDR *A.baumannii* infeksiyonunda ise kombinasyon tedavisi alan grubun sağ kalım oranlarının (%87), tek başına meropenem (%35) veya sulbaktam (%30) alan gruplara göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Pongpech ve ark. (115) tamamı imipenem ve meropeneme dirençli, 30 MDR *A.baumannii* izolatında, meropenem, imipenem, kolistin ve sulbaktamın ikili kombinasyonlarının etkinliğini time kill ve dama tahtası yöntemi ile incelemişler ve özellikle imipenem/kolistin kombinasyonunda %100 oranında sinerjizm, meropenem/sulbaktam kombinasyonunda %70 sinerjizm tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar imipenem, meropenem, kolistin veya sulbaktamın MDR *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde tek başlarına kullanımlarının yetersiz olduğunu ve pek çok MDR suşunda terapötik düzeyde tek ajan uygulandıktan 24 saat sonra yeniden üreme ve yetersiz antibakteriyel etkinlik gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Song ve ark. (13) immün süprese fare modellerinde karbapenem dirençli *A.baumannii* pnömonisi oluşturarak monoterapi ve kombinasyon tedavilerinin etkinliğini araştırmışlar ve imipenem/sulbaktam kombinasyonunun MDR *A.baumannii* pnömonisinin tedavisinde etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Kiratisin ve ark. (118) 40 MDR *A.baumannii* klinik izolatında karbapenemlerle (İPM, MEM, doripenem), diğer yaygın kullanılmayan ajanların (SCP, RİF, NET, doksisisiklin ve moksifloksasin) kombinasyonlarının sinerjistik aktivitelerini E test yöntemi ile araştırmışlar ve sonuçta her bir karbapenemin SCP ile kombinasyonunda yüksek düzeylerde (%17,5-%32,5) sinerjistik aktivite gözlendiğini bildirmişler, İPM/SCP için 25 MDR *A.baumannii* izolatının 10 tanesinde sinerji, MEM/SCP içinse 11 tanesinde sinerji tespit etmişlerdir. Kombinasyonların hiçbirinde antagonizma tespit etmeyen araştırmacılar, sinerjinin SCP ile bir karbapenem arasında test ettikleri diğer kombinasyonlara göre daha sık gözlendiğini ve tedavide daha etkin olabileceğini bildirmişlerdir.

Çok az sayıda olan klinik çalışmalardan birinde Lee ve ark. (14) imipenem ve meropeneme dirençli *A.baumannii* ile infekte 4 hastada karbapenem/sulbaktam kombinasyon tedavisi ile başarılı sonuçlar rapor etmişlerdir. Çalışmamızda karbapenemlerin sulbaktam içeren ajanlarla kombinasyonunda elde ettiğimiz yüksek sinerji oranları, bu gibi klinik veriler de göz önüne alındığında karbapenem dirençli MDR *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde bu kombinasyonların iyi bir seçenek olacağını düşündürmüştür.

MDR *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisi için, kombinasyon rejimlerinin etkinliklerini test ederken, pek çok araştırmacı rifampin gibi geleneksel olmayan ajanları da test etmişlerdir. Rifampin, hidrofobik özelliği, negatif yükü ve büyük molekül boyutu nedeniyle Gram negatif bakterilerdeki dış membran geçirgenliğinin azalmasından dolayı bu bakterilere karşı inaktif kabul edilir (119). Bununla birlikte, rifampinin antibakteriyel aktivitesini değerlendiren bir araştırma, bu ilacın *A.baumannii*'ye karşı in vitro bakterisidal aktivitesinin olduğunu göstermiştir (120). Ancak karbapenem dirençli *A.baumannii* kökenlerine karşı rifampin oldukça etkili olmasına rağmen birçok çalışmada rifampine karşı direnç gelişimi ile ilgili çelişkili raporlar bulunmaktadır. Montero ve ark. (11) bir *A.baumannii* pnömoni modelinde tedaviden 48 saat sonra rifampine direnç gelişmediğini rapor etmişler, fakat Pachon Ibanez ve ark. (121) rifampin tek başına uygulandığında 48-72 saat sonra rifampin dirençli mutantlar ( $MİK \geq 128\text{mg/L}$ ) gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Yazarlar, kombinasyon tedavisinin bakteriyel direnç gelişimini önlediğini ve tek ilaçla direnç gelişimi beklenen Gram negatif bakterilerle infekte ağır hastalarda kombine

tedavilerle iyi sonuçlar alınabileceğini savunmuşlardır (122,123). Ayrıca birçok in vitro çalışmada Gram negatif bakterilerin tedavisinde kullanılan karbapenemler, SAM ve polimiksinler gibi ajanlarla rifampinin kombine edilmesinin MDR ve özellikle de yüksek düzeyde karbapenem dirençli *A.baumannii*'ye karşı sinerjistik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (71,72,124-128).

Bu veriler doğrultusunda biz de karbapenem bazlı yaptığımız kombinasyon çalışmamızda imipenem ve meropenemin rifampinle olan kombinasyonlarının etkinliğini de test ettik. İPM/RİF için %73,5 oranında (25/34) sinerjistik etkileşim saptadık. Sinerji oranı MEM/RİF kombinasyonu için ise daha düşük olarak saptandı (%17,6). Rifampinin her iki karbapenemle olan kombinasyonunda da antagonistik etkileşim görmedik. Bulgularımızı destekleyen şekilde, Tripodi ve ark. (74), imipenem ve rifampinin tek başlarına kullanıldıklarında 24 saat sonrasında yeniden üreme gözlemlendiğini, ancak imipeneme hem düşük hem de yüksek direnç gösteren izolatların hepsinde İPM ve RİF arasında belirgin sinerji tespit edildiğini, ayrıca RİF tek başına kullanıldığında hızla gelişen direncin, rifampine imipenem eklenmesiyle köreltilendiğini ve kombinasyon tedavilerinin in vitro olarak monoterapiden daha etkin olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca hayvan modelleri üzerinde oluşturulan çeşitli *A.baumannii* infeksiyonlarında RİF'in etkinliğini araştıran çalışmalar da yapılmıştır (72,119,121). Pachon Ibanez ve ark. (121) MDR *A.baumannii* izolatları ile hayvan modelleri üzerinde oluşturdukları menenjit ve pnömoni infeksiyonlarında rifampinin tek başına ve imipenem, sulbaktam ve kolistinle olan kombinasyonlarının etkinliklerini test ettikleri time kill çalışmasında, bu modeller üzerinde rifampinin hem tek başına hem de kombinasyonda etkili olduğunu ancak, rifampin tek başına uygulandığında 48-72 saat sonra  $3 \times 10^{-6}$  oranında rifampin dirençli mutantlar ( $MİK \geq 128 \text{mg/L}$ ) geliştiğini ve bu nedenle MDR *A.baumannii* infeksiyonlarında rifampinin imipenem gibi diğer etkili ajanlarla kombine kullanılması gerektiğini rapor etmişlerdir. Yine, Wolff ve ark. (72) in vivo olarak *A.baumannii* infeksiyonu oluşturdukları fare modellerinde, rifampinin beta laktamlar ve beta laktamaz inhibitörleriyle kombinasyonlarının etkinliğini araştırmışlar, ve RİF içeren antimikrobiyal ajan kombinasyonlarının MDR *A.baumannii* kökenlerine karşı in vitro olarak sinerji ve aditif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Çarpıcı olarak, Song ve ark. (119) immün süprese fare modellerinde

karbapenem dirençli *A.baumannii* pnömonisi oluşturarak monoterapi ve kombinasyon tedavilerinin etkinliğini araştırmışlar ve tedavide tekli ajan olarak rifampinin, kombinasyon olarak da imipenem/rifampin tedavisinin en etkili seçenekler olduğunu bildirmişler ve MDR *A.baumannii* tedavisinde imipeneme rifampin eklenmesini önermişlerdir.

Çalışılan popülasyon az ve heterojen olmasına rağmen rifampin ile yapılan klinik bir çalışmada Saballs ve ark. (129) karbapenem dirençli *A.baumannii* ile infekte 10 hastanın İPM/RİF kombinasyon tedavisi ile 7 tanesinde (%70) klinik iyileşme tespit etmişler ve karbapenem dirençli *A.baumannii* kökenlerine bağlı ciddi enfeksiyonu olan hastalarda bu kombinasyonun kullanılmasının klinik olarak anlamlı olacağını bildirmişlerdir (129).

Diğer taraftan, Kiratisin ve ark. (90) bir kısmı MDR olan 40 *A.baumannii* klinik izolatında karbapenemlerle (İPM, MEM, doripenem), diğer yaygın kullanılmayan ajanların (SCP, RİF, NET, doksisiklin ve moksifloksasin) kombinasyonlarının sinerjistik aktivitelerini araştırmışlar ve bizim bulgularımızdan farklı olarak MDR izolatlar için İPM/RİF ve MEM/RİF arasında sinerji tespit edilmediğini ancak bu kombinasyonlar için antagonizma da gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda özellikle İPM/RİF kombinasyonu için tespit ettiğimiz yüksek sinerji oranı, her ne kadar Gram negatif bakterilerin tedavisinde rifampin kullanımının endikasyonu olmasa da, özellikle bizim çalışmamızda kullandığımız izolatlar gibi karbapenemler için yüksek MİK değerleri taşıyan karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatlarında rifampinin daha fazla düzeyde sinerji gösterdiğini rapor eden yayınlarla korelasyon göstermektedir (74). Karbapenem dirençli izolatlarda rifampin ile kombinasyon sonucunda elde etmiş olduğumuz yüksek sinerji oranları Li ve ark.'nın (130) rapor ettikleri gibi, karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatlarında bakteri dış membranında meydana gelen ciddi değişiklikler sonucu Gram negatif bakteri hücre duvarından rifampinin geçememesine neden olduğu bilinen hücre duvarı hidrofobik özelliği ve negatif yükünün değişmesinin muhtemel bir sonucu olabilir.

Çalışmamızda RİF'in İPM ve MEM ile olan sinerji oranları birbirlerinden oldukça farklı düzeylerde çıkmasına rağmen (sırasıyla %73,5 ve %17,6), MEM/RİF kombinasyonu için bulunan aditif etkileşim, yani parsiyel sinerji oranı İPM/RİF kombinasyonundan yüksektir (sırasıyla %76,5 ve %26,5). Parsiyel sinerji oranlarımızı sinerji ile birleştirirsek, rifampinin her iki karbapenem için de bulunan etkinlik oranları birbirine yakın olacaktır (%94,1 ve %100). Ayrıca her iki kombinasyonda da antagonizmanın tespit edilmemiş olması önemli bir bulgudur. Daha önce tanımlandığı gibi İPM ve MEM ile tedavi kararı alırken, her ikisi için de uygun koşullarda duyarlılık testlerinin ayrı ayrı yapılması gerekmektedir. İPM duyarlılık sonuçları MEM'e uygulanamaz (40). Bu yüzden İPM ve MEM'in, RİF ile kombinasyon etkinlik oranlarının farklı çıkması sürpriz değildir. Bu kombinasyonlarla ilgili elde ettiğimiz bulgularımız doğrultusunda MDR *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde İPM/RİF ve MEM/RİF kombinasyonlarının iyi birer alternatif tedavi seçeneği olacağını düşündük.

MDR suşların çoğunluğunun polimiksinlere duyarlı bulunması nedeniyle bu ilacın kurtarıcı ajan olarak görülmesi ilacın toksisitesine yönelik kaygılara rağmen MDR *A.baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde klinisyenlerin polimiksinlere olan ilgisini artırmıştır (40,70). Antimikrobiyal duyarlılık testleri polimiksin B ve kolistin için eşit düzeyde ve yüksek duyarlılık oranları göstermektedir (30,131-136). Ancak polimiksin tedavisi sırasında direnç gelişimi ve potansiyel toksisiteleri tek başına polimiksinlerin doz artırılarak kullanımından çok kombine kullanımlarını ön plana çıkarmıştır. Bu amaçla sıklıkla tercih edilen antimikrobiyal imipenem, meropenem veya doripenem gibi bir karbapenemdir. Birçok in vitro çalışma karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatlarında bir karbapenem ve bir polimiksini kombine olarak test etmiştir (10,14,74,115,137-139). Biz de çalışmamızda imipenem ve meropenemi PB ile kombine olarak test ettik. İPM/PB ile %38,2 (13/34) ve MEM/PB ile %2,9 (1/34) sinerjizm gözlemledik. Her iki kombinasyonda da aditif etkileşimlerin oranı yüksek bulundu (sırasıyla %55,9 ve %64,7). Bu sinerji değerleri karbapenem bazlı diğer kombinasyonlarımızdan elde ettiğimiz sinerji oranlarımızdan daha düşüktür. Bu durumun muhtemel sebebi, çalışmada kullandığımız izolatların tamamının PB'ye çok düşük MİK değerleri ile duyarlı olmasıdır ( $MİK \leq 0,125 \mu g/ml$ ). PB için tek başına başlangıç MİK değerlerimiz zaten çok düşük olduğu için kombinasyondaki MİK



değerinde sinerji için olması gereken 4 kat düşüş, beklediğimizden daha az düzeyde gerçekleşti. Her ne kadar PB ile kombine ettiğimiz karbapenemlerin kombinasyondaki MİK değeri, izolatların pek çoğu için 4 kat düşmüş olsa da, ΣFİK hesaplanırken her iki ilacın FİK değeri toplandığı için, sinerji ile sonuçlanan bulgu sayısı azdı.

Hastanemizde yapılan iki ayrı çalışmada, YBÜ ve cerrahi kliniklerinden izole edilen MDR *A.baumannii* kökenlerinin büyük kısmının iki farklı klona ait olduğunu bildiren verilerle, hastanemizde MDR *A.baumannii* tedavisinde PB'nin tercih edilen bir tedavi rejimi olmadığı bilgisini birleştirirsek, gözlenen infeksiyonlardan izole edilen kökenlerin henüz PB'ye azalmış duyarlılıklarının olmaması normaldir (108,140). Yine de özellikle İPM/PB için elde ettiğimiz sinerji oranı (%38,2) küçümsenmeyecek düzeydedir ve Wareham ve ark.'nın (138) İPM dirençli ve PB duyarlı MDR *A.baumannii* izolatlarında E test metodu ile yaptıkları çalışmada İPM/PB kombinasyonu için bildirdikleri %40 (2/5) oranındaki sinerjistik aktivite düzeyiyle paralellik göstermektedir.

Ayrıca Yoon ve ark. (10) polimiksin B, imipenem ve rifampinin ikili ve üçlü kombinasyonlarının İPM dirençli ve PB duyarlı 8 *A.baumannii* izolatı üzerindeki etkinliğini dama tahtası ve time kill yöntemleri ile araştırdıkları çalışmaları sonucunda bizim bulduğumuz sinerji oranından daha yüksek olarak, polimiksin B-imipenem kombinasyonunun 8 izolatın 7'sinde bakterisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

İPM/PB kombinasyonu için gözlediğimiz bu sinerjinin mekanizması, polimiksinlerin primer olarak Gram negatif bakteri hücre duvarına etki ederek, dış membranda harabiyet ve permeabilizasyon değişikliği yaratması sonucu bakteriyel hücre duvarından hücre içine giren yüksek düzeyde imipenem ile ilişkilidir (141). Pongpech ve ark. (115) tamamı imipenem ve meropeneme dirençli 30 MDR *A.baumannii* izolatında dama tahtası ve time kill yöntemiyle imipenem-kolistin kombinasyonunda %100 oranında sinerjistik etkileşim gözlemlemişler ve bu sinerjinin kolistinin etkisiyle bakteri hücre duvarının ve membranının zayıflamasına bağlı olduğunu belirtmişler ve bu morfolojik hasarları da elektron mikroskop bulgularıyla göstermişlerdir. Aynı çalışmada meropenem kolistin arasında az da olsa

antagonistik etkileşim tanımlanmıştır. Bizim çalışmamızda MEM/PB kombinasyonu için sinerji oranı çok düşük düzeyde (%2,9) olsa da, çalışmamızda test ettiğimiz diğer tüm kombinasyonlarda olduğu gibi MEM/PB ile de antagonizma saptamadık. Ancak bizim MEM/PB için test ettiğimiz sinerji oranından bu kombinasyon için çok daha yüksek düzeyde sinerji bildiren çalışmalar vardır. Pankey ve ark. (139) genetik olarak aynı kökenden gelen meropenem dirençli 8 *A.baumannii* izolatının meropenem- polimiksin B kombinasyonunu E test ve time kill yöntemleri ile test etmişler ve time kill ile %100 ve E-test ile %63 oranında sinerji tespit etmişlerdir.

Pankuch ve ark. (137) time kill yöntemi kullanarak yaptıkları bir in vitro çalışmada meropenem ve kolistin sub inhibitör dozlarında bile, 52 *A.baumannii* izolatının 18 tanesinde sinerjistik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kullandığımız klinik izolatlarla aynı ilaç duyarlılığı gösteren (tamamı İPM ve MEM dirençli, yine tamamı kolistine duyarlı) 9 MDR *A.baumannii* izolatıyla Tripodi ve ark.'nın (74) yaptıkları time kill çalışmasında, kolistin hem tek başına hem de imipenemle kombinasyonunda bakterisidal aktivite bildirilmiş, ancak kolistin tek başına uygulandığında elde edilen bakterisidal aktivitenin, imipenemle kombine edildiğinde in vitro olarak ek bir avantaj sağlamadığı rapor edilmiştir. Bu bağlamda, eğer bakteri, kombinasyondaki ilaçlardan birine duyarlıysa, kombinasyon terapisi yerine duyarlı olan ajanla monoterapi tercih edilebilir. Ancak akciğer epitel sıvısına zayıf difüzyonu nedeniyle özellikle *A.baumannii* pnömonilerinde polimiksinlerin tek ajan olarak kullanılması yetersiz olabilir (142). Ayrıca Landman ve ark. (143) yaptıkları bir süzveyans çalışmasında sadece polimiksinlere duyarlı *A.baumannii* infeksiyonu bulunan hastaların tedavisinde tek ajan olarak polimiksin kullanımının, polimiksin dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının insidansında bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

Yaptıkları klinik bir çalışmada Falagas ve ark. da (144), kolistin diğer ajanlarla kombinasyonları kullanılarak tedavi edilen hastalara oranla kolistin-meropenem kombinasyonu ile tedavi edilenlerde daha iyi sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir. Aynı yazarlar daha sonra, tedavide kolistin tek başına kullanılmasıyla meropenemle kombine kullanılması arasında klinik sonuç olarak önemli bir istatistiksel fark olmamasına rağmen, heteroresistansın önlenmesi

açısından kolistinın tek başına değil de, başka bir ajanla kombine olarak kullanımının tercih edilmesi gerektiğini not etmişlerdir. Sonuçta, çalışmamızda her iki kombinasyon için de antagonizma saptanmamış olması, MDR *A.baumannii* tedavisinde bu kombinasyonların alternatif bir seçenek olabileceğini göstermektedir. Ayrıca tedaviye polimiksin dozajını yükseltmeden maksimum dozda bir karbapenem eklenmesi, hem bakterisidal etkiyi sağlayacak hem de kolistinın toksisitesini azaltacaktır.

Dama tahtası sinerji testleri değerlendirilirken, temel olarak dört farklı yöntem tanımlanmıştır (99). Birinci yöntem, bizim de çalışmamızda kullandığımız, Anon'un Klinik Mikrobiyoloji Prosedürleri El Kitabı'nda tanımlanan kombinasyondaki en düşük fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksinin ( $\Sigma FİK$ ) kullanılması esasına dayanan yöntemdir (100). Bu yöntemde kombinasyon plağındaki üreme olmayan tüm kuyucuklar taranarak, en düşük  $\Sigma FİK$ 'nin hesaplandığı kuyucuk değerlendirmeye alınır ve o kuyucuktaki en düşük  $\Sigma FİK$  değeri kullanılır.

İkinci yöntem, ortalama fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksinin esas alındığı yöntemdir. Bu yöntemde, tüm satır ve sütunlardaki üreme olmayan en düşük ilaç konsantrasyonunun olduğu kuyucuklar değerlendirmeye alınır, bu kuyucukların her biri için A ve B ilacının FİK'leri hesaplanır ve her kuyucuk için ayrı ayrı  $\Sigma FİK$  hesaplanarak, elde edilen değerler toplanır ve kuyucuk sayısına bölünerek  $\Sigma FİK$ 'nin ortalaması alınır. Bu yöntem 1998 yılında Den Hollander ve arkadaşlarının yaptığı ve yine 2000 yılında Bonapace ve arkadaşlarının yaptığı sinerji çalışmalarında kullanılmıştır (2,145).

Üçüncü yöntemde, tüm satır ve sütunlar taranarak, tüm satır boyunca ve tüm sütun boyunca üreme olmayan satır ve sütunlar değerlendirmeye alınır. Ve buralardaki kuyucukların  $\Sigma FİK$ 'leri toplanarak ortalamaları alınır. Bu yöntem Eliopoulos tarafından tanımlanmıştır (146).

Dördüncü yöntemde,  $\Sigma FİK$ 'i hesaplaması yoktur. Kombinasyon plağındaki 2 kuyucuk değerlendirmeye alınır. Kuyucuklardan bir tanesi her iki ilaç için de FİK'nin 0,25 olduğu ortak kuyucuk, diğeri her ilaç içinde FİK'nin 2 olduğu ortak kuyucuktur. FİK 0,25 olan kesişim kuyucuğunda üreme yoksa sinerjistik etkileşim,

FİK 2 olan kesişim kuyucuğunda üreme varsa antagonistik etkileşim olarak değerlendirilir. Diğer tüm durumlar aditif/tanımlanamayan etkileşim olarak sınıflandırılır. Bu yöntem Marymont & Marymont ve Eliopoulos tarafından tanımlanmıştır (147,148).

Bahsettiğimiz tüm yöntemlerin kolay anlaşılabilmesi için, çalışılan bakterinin her bir antibakteriyel ilaç için elde edilen MİK değerleri baz alınarak bu değerlerin 2 kat üstü dilüsyon (FİK değeri 4 çıkan) ve 5 kat altı dilüsyon (FİK değeri 0,03 çıkan) değerlerini gösteren şekil-8'deki tablo incelenmelidir. Bu tabloda her bir yöntem için değerlendirilmeye alınan kuyucuklar o yöntemin numarası ile belirtilmiştir.

4					3			
2					3		4	
1	2,3	3	3	3	3	3	3	3
0.5	X	2			3			
0.25	X	X	2	4	3			
0.12	X	X	X	2	3			
0.06	X	X	X	1,2	3			
0.03	X	X	X	X	2,3			
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4

**Şekil 8.** Yöntemlerin şekil üzerinde gösterilmesi.

Bu dört farklı değerlendirme yöntemi ile bulunacak sinerji oranlarının birbirlerinden oldukça farklı olacağı görülmektedir. Bu yöntemler içerisinde sinerjiyi en fazla tespit eden, bizim de çalışmamızda kullandığımız birinci yöntemdir. Hemen hemen aynı özellikleri taşıyan bakterilerle aynı ilaç kombinasyonlarının test edildiği farklı çalışmalardan farklı düzeyde sinerji oranları bildirilmesinin, değerlendirme yöntemindeki bu farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Kullanılan metodlar dışında ayrıca test edilen izolatlarla bağlı olarak da sinerjistik aktivite oranları değişmektedir. İzolatın, test edilen antimikrobiyal ajana yüksek direnç veya duyarlılık oranları göstermesi, sinerjistik aktiviteyi değiştirebilmektedir. Bu nedenle,

kombinasyon tedavisi uygulanacaksa, daha önceden yapılmış in vitro çalışmalar ışığında etkili olabilecek kombinasyonlar ampirik olarak tercih edilebilirse de, hastada etken olan izolatın kullanılan kombinasyona duyarlılığının sinerji testleri ile belirlenmesinin tedavinin doğru yönlendirilmesinde gerekli olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda imipenem ile belirgin olmak üzere bir karbapenem ile SAM, SCP, RİF ve PB kombinasyonlarında değişik oranlarda sinerjistik etkileşimlerin tespit edilmiş olması ve antagonistik etkileşimlerin gözlenmemesi nedeniyle bu kombinasyonların hatırı sayılır bir ilgiyi hak ettiği düşünülmüştür. İleri klinik çalışmalarla desteklenmesi koşuluyla, bu kombinasyonların yenilikçi ve etkili tedavi seçenekleri için temel oluşturabileceklerini ve iyi birer alternatif olabileceklerini söyleyebiliriz.

## ÖZET

### **Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olarak Belirlenmiş, Çoklu Antibiyotik Direnci Gösteren *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarının İmipenem ve Meropenemin, Sefoperazon-Sulbaktam, Ampisilin-Sulbaktam, Polimiksin B ve Rifampin İle Kombinasyonlarına Duyarlılığının İn vitro Araştırılması**

Son yıllarda, özellikle yoğun bakım ünitelerinde antimikrobiyal ajanların çoklu ilaç dirençli (MDR) *Acinetobacter baumannii* infeksiyonlarının tedavisindeki yetersizliği, klinisyenleri zorlamakta ve kombinasyon tedavilerine yönlendirmektedir. Bu çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Servislerinden izole edilmiş olan, 34 MDR *A.baumannii* izolatının, imipenem (İPM) ve meropenemin (MEM), sefoperazon/sulbaktam (SCP), ampisilin/sulbaktam (SAM), polimiksin B (PB) ve rifampin (RİF) ile olan kombinasyonlarına duyarlılığı in vitro olarak dama tahtası yöntemi ile araştırıldı.

MDR *A.baumannii* en fazla trakeal aspirat (%50) kültürlerinden soyutlandı. Disk difüzyonla, izolatların tamamı imipenem, meropenem, tikarsilin, sefepim, amikasin ve siprofloksasine dirençli bulundu. En düşük direnç oranı minosiklin (%44,2) için saptandı. İzolatların tamamında (%100) imipenem, meropenem, ampisilin/sulbaktam ve sefoperazon/sulbaktam için dirençli ve polimiksin B için duyarlı sınırlarda MİK değerleri bulundu.

Sinerji oranları MEM/SAM kombinasyonunda en yüksek (%94,1) bulunurken daha sonra sırasıyla, İPM/SAM (%88,2), İPM/RİF (%73,5), İPM/SCP (%70,6), İPM/PB (%38,2), MEM/RİF (%17,6), MEM/SCP (%8,8) ve MEM/PB (%2,9) olarak saptandı. Kombinasyonların hiçbirinde antagonizma gözlenmedi. Bu yüzden, bu sinerjistik kombinasyonlarla ilgili bulgularımızın yoğun ilgiyi hak ettiğini ve çoğul ilaç dirençli bu organizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda, yenilikçi ve etkili tedavi seçeneklerine temel olabileceğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak MDR *A.baumannii* kökenlerine karşı kullanılan antibiyotik kombinasyonlarının etkinliği ile ilgili birçok in vitro çalışmada olumlu sonuçlar bildirilmiş olsa da bu verilerin klinik bulgularla da desteklendiği geniş kapsamlı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Çoklu ilaç direnci, *Acinetobacter baumannii*, antibiyotik kombinasyonları, karbapenemler, sulbaktam, rifampin, polimiksin B, dama tahtası yöntemi.

## SUMMARY

### **In Vitro Susceptibility Testing Of Imipenem And Meropenem In Combination With Cefoperazone-Sulbactam, Ampicillin-Sulbactam, Polymyxin B and Rifampin Against Clinical Isolates Of Multidrug Resistant *Acinetobacter Baumannii*, Associated With Nosocomial Infections**

In recent years, the inadequacy of antimicrobial agents available to treat infections particularly in ICU's due to MDR *Acinetobacter baumannii*, has constrained clinicians and forced them to use combination therapies. In this study, the antibacterial effect of imipenem and meropenem in combination with cefoperazone/sulbactam, ampicillin/sulbactam, polymyxin B and rifampin has been evaluated in vitro by the checkerboard microdilution method against 34 clinical isolates of multidrug resistant (MDR) *A.baumannii*, all collected from the Intensive Care Units of Süleyman Demirel University Hospital.

Most of the MDR *A.baumannii* strains (50%) were isolated from the tracheal aspirate cultures. All of the isolates were found to be resistant to imipenem, meropenem, ticarcillin, cefepime, amikacin and ciprofloxacin by disc diffusion method. The lowest resistance rate was established for minocycline (44.2%). In all of the isolates (100%) the MIC values were within the resistance range for imipenem, meropenem, ampicillin/sulbactam and cefoperazone/sulbactam and susceptibility range for polymyxin B.

The combination of meropenem with sulbactam showed synergy against 94.1% of MDR *A.baumannii* while the synergy rates for combinations of imipenem and sulbactam, imipenem and rifampin, imipenem and cefoperazon/sulbactam, imipenem and polymyxin B, meropenem and rifampin, meropenem and cefoperazon/sulbactam and meropenem and polymyxin B were 88.2%, 73.5%, 70.6%, 38.2%, 17.6%, 8.8% and 2.9%, respectively. Antagonism was not observed in any of the combinations. Hence, our findings about these synergistic combinations are of considerable interest and may provide a rationale for innovative and effective therapeutic options for infections caused by these MDR organisms.

In conclusion, although favourable outcomes have been reported in several in vitro studies about the efficacy of antibiotic combinations used against MDR *A.baumannii* strains, further comprehensive studies with clinical evidence are warranted to confirm these data.

**Keywords:** Multi-drug resistance, *Acinetobacter baumannii*, antimicrobial combination, carbapenems, sulbactam, rifampin, polymyxin B, checkerboard assay.

## KAYNAKLAR

1. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH. (Eds.). *Manuel of Clinical Microbiology* 9th ed. Washington ASM Pres 2007;770- 802.
2. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E-test, time-kill and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 43-50.
3. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*; 6'th ed. Lippincott Philadelphia. 2006;316–355.
4. Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 1449–1459.
5. Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ, Quinn JP, Doern GV. Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Bacilli Causing Infections In Intensive Care Unit Patients In The United States Between 1993 and 2004, *J Clinical Microbiology* 2007; 45(10): 3352-3359.
6. Ferrara AM. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2006;27: 183-95.
7. Yaman A, Tasova Y, Kibar F, Inal AS, Saltoglu N, Buyukcelik O, Kurtaran B, Dundar IH. Investigation of the antibiotic susceptibility patterns of pathogens causing nosocomial infections. *Saudi Med J* 2004; 25: 1403-1409
8. Gülay Z. Antibiyotik kombinasyonlarının in-vitro etkinliğini ölçen testler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu (ADTS) çalışma grubu*. İstanbul 1997.
9. Choi JY, Park YS, Cho CH, Park YS, Shin SY, Song YG, Yong D, Lee K, Kim JM. Synergic in-vitro activity of imipenem and sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 1098-1101.
10. Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 753-757.
11. Montero A, Ariza J, Corbella X, Domenech A, Cabellos C, Ayats J, Tubau F, Borraz C, Gudiol F. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 1085-1091.
12. Kiffer CR, Sampaio JL, Oplustil CP, Koga PC, Arruda AC, Turner PJ, Mendes C. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2005, 52: 317-322.
13. Song JY, Kee SY, Hwang IS, Seo YB, Jeong HW, Kim WJ, Cheong HJ. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 317-322.



14. Lee NY, Wang CL, Chuang YC, Yu WL, Lee HC, Chang CM, Wang LR, Ko WC. Combination carbapenem-sulbactam therapy for critically ill patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia: four case reports and an in vitro combination synergy study. *Pharmacotherapy* 2007; 27: 1506-1511.
15. Falagas ME, Bliziotis IA. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int. J Antimicrob Agents* 2007; 630-636.
16. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 21: 8: 18.
17. Haddad FA, Van Horn K, Carbonaro C, Agüero-Rosenfeld M, Wormser GP. Evaluation antibiotic combinations against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* using E-test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 577- 579.
18. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews* 2008; 21: 538–582.
19. Brisou J, Prevot AR. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1954; 86: 722–728.
20. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol* 1968; 95: 1520–1541.
21. Lautrop H. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Co. Baltimore, MD.
22. 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 description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* 1986; 36: 228–240.
23. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010, 35: 219-226.
24. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 148–165.
25. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2974–2976.
26. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 692– 699.
27. Nemeč A, Dijkshoorn L and van der Reijden TJ. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 2004; 53: 147– 153.
28. Wroblewska MM, Towner KJ, Marchel H, Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 490–496

29. Unal S and 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* 2005; 53: 265–271.
30. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 315–321.
31. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 848–854.
32. Go ES, Urban C, Burns J, Kreiswirth B, Eisner W, Mariano N, Mosinka-Snipas K, Rahal JJ. Clinical and molecular epidemiology of acinetobacter infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet* 1994; 344: 1329–1332.
33. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, Oztas S, Poulain J, Segurens B, Robert C, Abergel C, Claverie JM, Raoult D, Medigue C, Weissenbach J, Cruveiller S. Comparative analysis of *Acinetobacter*s: three genomes for three lifestyles. *PLoS One* 2008; 19: e1805.
34. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 49–54.
35. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 2009; 4: 273–8.
36. Obana Y. Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice. *Microbiol Immunol* 1986; 30: 645–657.
37. Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I, Kocazeybek B, Tatman-Otkun M, Leblebicioglu H, Ozinel MA, Akalin H, Kocagoz S, Korten V. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type) producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol* 2001; 50: 642–645.
38. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, Fernández-Cuenca F, Cisneros JM, Pachón J, Pascual A, Martínez-Martínez L, McQueary C, Actis LA, Vila J; Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 276–278.
39. Özdemir M, Erayman İ, Gündem NS, Baykan M, Baysal B. Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. *Ankem Derg* 2009; 23: 127-132.
40. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 79–84.
41. Beck-Sague CM, Jarvis WR, Brook JH, Culver DH, Potts A, Gay E, Shotts BW, Hill B, Anderson RL, Weinstein MP. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care unit. *Am J Epidemiol* 1990; 132: 723– 733.
42. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest* 2006; 129: 102–109.

43. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309–317.
44. Johnson EN, Burns TC, Hayda RA, Hospenthal DR, Murray CK. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 409–415.
45. Menon T, Shanmugasundaram S, Nandhakumar B, Nalina K, Balasubramaniam. Infective endocarditis due to *Acinetobacter baumannii* complex—a case report. *Indian J Pathol Microbiol* 2006; 49: 576–578.
46. Post V, Hall RM. AbaR5, a large multiple-antibiotic resistance region found in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2667–2671.
47. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 106–119.
48. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. Prevalence of IS(*Aba1*) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 2007; 274: 63–66.
49. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM and Pitt TL. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 258: 72–77.
50. Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S, Zhao W. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 241–243.
51. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Yong D, Woo GJ, Lee JH, Jung HI, Jang SJ, Sung KH, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2005; 59: 242–8.
52. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2006; 2:e7.
53. Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline efflux as a mechanism for non-susceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2065–2069.
54. Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1001–1004.
55. Srinivasan VB, Rajamohan G, Gebreyes WA. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5312–5316.
56. Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microb Rev* 1995; 8: 557–84.
57. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*(SIM-1), in a class I integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4485–4491.

58. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 3375–3380.
59. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 757–62.
60. Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37: 102–109
61. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3628–3634.
62. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010; 8: 71–93.
63. Oliveira MS, Prado GV, Costa SF, Grinbaum RS, Levin AS. Ampicillin/ sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1369–1375.
64. Levin AS, Levy CE, Manrique AE, Medeiros EA, Costa SF. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 58–62.
65. Smolyakov R, Borer A, Riesenberk K, Schlaeffer F, Alkan M, Porath A, Rimar D, Almog Y, Gilad J. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin–sulbactam treatment. *J Hosp Infect* 2003; 54: 32–8.
66. Urban C, Go E, Mariano N, Berger BJ, Avraham I, Rubin D, Rahal JJ. Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype anitratus. *J Infect Dis* 1993; 167: 448-451
67. Betrosian AP, Frantzeskaki F, Xanthaki A, Douzinas EE. Efficacy and safety of high-dose ampicillin/sulbactam vs. colistin as monotherapy for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J Infect* 2008; 56: 432–436.
68. Ko WC, Lee HC, Chiang SR, Yan JJ, Wu JJ, Lu CL, Chuang YC. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against amultidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 393–395.
69. Lesho E, Wortmann G, Moran K, Craft D. Fatal *Acinetobacter baumannii* infection with discordant carbapenem susceptibility. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 758-759.
70. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1333–1341.
71. Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H. Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40: 117–20.
72. Wolff M, Joly-Guillou ML, Farinotti R, Carbon C. In vivo efficacies of combinations of beta-lactams, beta-lactamase inhibitors, and rifampin against *Acinetobacter*

- baumannii* in a mouse pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1406–1411.
73. Montero A, Ariza J, Corbella X, Domenech A, Cabellos C, Ayats J, Tubau F, Ardanuy C, Gudiol F. Efficacy of colistin versus beta-lactams, aminoglycosides, and rifampin as mono therapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1946–1952.
  74. Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R, Utili R, Zarrilli R. Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 537–540.
  75. Pachón-Ibáñez ME, Fernández-Cuenca F, Docobo-Pérez F, Pachón J, Pascual A. Prevention of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* in an experimental pneumonia murine model, using rifampicin associated with imipenem or sulbactam. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 689–692.
  76. Dizbay M, Tozlu DK, Cirak MY, Isik Y, Ozdemir K, Arman D. In vitro synergistic activity of tigecycline and colistin against XDR-*Acinetobacter baumannii*. *J Antibiot (Tokyo)* 2010; 63: 51–53.
  77. 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* 2010; 4: 164–167.
  78. Pantopoulou A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogannis M, Tsaganos T, Dontas I, Koutoukas P, Baziaka F, Giamarellou H, Perrea D. Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the significance of co-administration of rifampicin. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 51–5.
  79. Bassetti M, Repetto E, Righi E, Boni S, Diverio M, Molinari MP, Mussap M, Artioli S, Ansaldi F, Durando P, Orengo G, Bobbio Pallavicini F, Viscoli C. Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 417–420.
  80. Song JY, Lee J, Heo JY, Noh JY, Kim WJ, Cheong HJ, Hwang IS. Colistin and rifampicin combination in the treatment of ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 281–284.
  81. Gounden R, Bamford C, van Zyl-Smit R, Cohen K, Maartens G. Safety and effectiveness of colistin compared with tobramycin for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 26.
  82. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.
  83. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing. Version 9.1 March 2010. Birmingham, UK: BSAC; 2010. p. 32. [http://www.bsac.org.uk/Resources/BSAC/Version 9.1 March 2010 final.pdf](http://www.bsac.org.uk/Resources/BSAC/Version%209.1%20March%202010%20final.pdf) [accessed 29 October 2010].
  84. Li C, Kuti JL, Nightingale CH, Nicolau DP. Population pharmacokinetic analysis and dosing regimen optimization of meropenem in adult patients. *J Clin Pharmacol* 2006; 46: 1171–1178.

85. Cirioni O, Silvestri C, Ghiselli R, Orlando F, Riva A, Gabrielli E, Mocchegiani F, Cianforlini N, Trombettoni MM, Saba V, Scalise G, Giacometti A. Therapeutic efficacy of buforin II and rifampin in a rat model of *Acinetobacter baumannii* sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37: 1403–1407.
86. Conlon JM, Ahmed E, Pal T, Sonnevend A. Potent and rapid bactericidal action of alyteserin-1c and its [E4K] analog against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 2010; 31: 1806–10.
87. Routsias JG, Karagounis P, Parvulesku G, Legakis NJ, Tsakris A. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides* 2010; 31: 1654–60.
88. Petrosillo N, Ioannidou E, Falagas ME. Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 816–827.
89. Falagas ME, Rafailidis PI, Kasiakou SK, Hatzopoulou P, Michalopoulos A. Effectiveness and nephrotoxicity of colistin monotherapy vs. colistin-meropenem combination therapy for multidrug-resistant Gram negative bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 1227-1230
90. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1914–1918.
91. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manuel of Clinical Microbiology*. 9th Ed. Mary Jane Ferraro and John D. Tenover Chapter V 74: 1183-4
92. Sabath LD. Synergy of antibacterial substances by apparently known mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1968; 1867: 210-217.
93. Garrod LP, Waterworth PM. Methods of testing combined antibiotic bactericidal action and the significance of the results. *J Clin Pathol* 1962; 15: 328-338
94. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. *Antimicrobial Combinations in Antibiotics in Laboratory Medicine*. Fifth Edition Victor Lorian MD, Editor. 2005 by Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia USA. Chapter 9: 365-440
95. Anonymous. Instructions to authors. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: i-xxi.
96. Johnson MD, MacDougal C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 693-715
97. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1
98. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Aerob Üreyen Bakteriler İçin Dilüsyon Yöntemi ile Antimikrobik Duyarlılık Testleri; Onaylanmış Standart-Yedinci Baskı*. 2006. Doküman M7-A7. Cilt 26 Sayı 2.
99. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2002; 44: 363-366.
100. Anon. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: HD Isenberg (Ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (pp. 5.18.1–5.18.28). American Society for Microbiology, 1992. Washington, DC. (151).

101. Turner PJ, Greenhalgh JM; MYSTIC Study Group (Europe). The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997–2000. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 563–567.
102. Spence RP, Towner KJ, Henwood CJ, James D, Woodford N, Livermore DM. Population structure and antibiotic resistance of *Acinetobacter* DNA group 2 and 13TU isolates from hospitals in the UK. *J Med Microbiol* 2002; 51: 1107– 1112.
103. Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB, Waites KB. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 881– 885.
104. Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4086-4095.
105. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A.baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3299–3305.
106. Weinbren MJ, Johnson AP, Kaufmann ME, Livermore DM. *Acinetobacter* spp. isolates with reduced susceptibilities to carbapenems in a UK burns unit. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 574– 576.
107. Norskov-Lauritsen N, Marchandin H, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility of tigecycline and comparators against bacterial isolates collected as part of the TEST study in Europe (2004-2007). *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 121-130.
108. Sesli Cetin E, Durmaz R, Tetik T, Otlu B, Kaya S, Çalışkan A. Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *Am J Infect Control* 2009; 37: 56-64.
109. Levin AS. Treatment of *Acinetobacter* spp. infections. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 1289–96.
110. Van Looveren M, Goossens H; ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10: 684–704.
111. Klastersky J, Meunier-Carpentier F, Prevost JM. Significance of antimicrobial synergism for the outcome of gram-negative sepsis. *Am J Med Sci* 1977;273: 157–167.
112. Sader HS, Jones RN. Comprehensive in vitro evaluation of cefepime combined with aztreonam or ampicillin/sulbactam against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 380–4.
113. Wang FD, Lin ML, Lee WS, Liu CY. In vitro activities of beta-lactam antibiotics alone and in combination with sulbactam against Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 590–595.
114. Sargüzel FM, Sümerkan B, Metan G. Karbapenem Sefaperazon/Sulbaktam Kombinasyonlarının *Acinetobacter Baumannii* Suşları Üzerine in vitro aktivitesi. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 2010; 32(1): 015-018.
115. Pongpech P, Amornopparattanakul S, Panapakdee S, Fungwithaya S, Nannha P, Dhiraputra C, Leelarasamee A. Antibacterial activity of carbapenem-based

- combinations against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Med Assoc Thai 2010; 93 (2): 161-71.
116. Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. J Infect Dis 1978; 137: 122–130.
  117. Yu VL, Felegie TP, Yee RB, Pasculle AW, Taylor FH. Synergistic interaction in vitro with use of three antibiotics simultaneously against *Pseudomonas maltophilia*. J Infect Dis 1980; 142: 602–607.
  118. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Kaewdaeng S. Synergistic activities between carbapenems and other antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* including multidrug-resistant and extensively drug-resistant isolates. International Journal of Antimicrobial Agents 2010; 36: 243–246.
  119. Song JY, Cheong HJ, Lee J, Sung AK, Kim WJ. Efficacy of monotherapy and combined antibiotic therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in an immunosuppressed mouse model. Int J Antimicrob Agents 2009; 33: 33-39.
  120. Thornsberry C, Hill BC, Swenson JM, McDougal LK. Rifampin: spectrum of antibacterial activity. Rev Infect Dis 1983; 5(Suppl.3): S412–417.
  121. Pachón-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, Jiménez-Mejías ME, García-Curiel A, Pichardo C, Jiménez L, Pachón J. Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3): 1165-72.
  122. Chow JW, Yu VL. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for gram-negative bacteraemia: a commentary. Int J Antimicrob Agents 1999; 11: 7–12.
  123. Mouton JW. Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. Infection 1999; 27: S24–S28.
  124. Giamarellos-Bourboulis EJ, Sambatakou H, Galani I, Giamarellou H. In vitro interaction of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Chemother 2003; 15: 235–238.
  125. Hogg GM, Barr JG, Webb CH. In-vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 494–495.
  126. Tascini C, Menichetti F, Bozza S, Del Favero A, Bistoni F. Evaluation of the activities of two-drug combinations of rifampicin, polymyxin B and ampicillin/sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 270–271.
  127. Tascini C, Gemignani G, Ferranti S, Tagliaferri E, Leonildi A, Lucarini A, Menichetti F. Microbiological activity and clinical efficacy of a colistin and rifampin combination in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Chemother 2004; 16: 282–287.
  128. Bergogne-Berezin E. The increasing role of *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. Curr Infect Dis Rep 2001; 3: 440–444.
  129. Saballs M, Pujol M, Tubau F, Peñna C, Montero A, Domínguez MA, Gudiol F, Ariza J. Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 697–700.



130. Li J, Nation RL, Owen RJ, Wong S, Spelman D, Franklin C. Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. *Clin Infect Dis* 2007;45:594–8.
131. Duenas-Diez AI, Bratos-Perez MA, Eiros-Bouza JM, Almaraz-Gomez A, Gutierrez-Rodriguez P, Miguel-Gomez MA, Orduna-Domingo A, Rodriguez-Torres A. Susceptibility of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*A.baumannii* complex to imipenem, meropenem, sulbactam and colistin. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 487–493.
132. Dizbay M, Altuncekcic A, Sezer BE, Ozdemir K, Arman D. Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 29–32.
133. Mezzatesta ML, Trovato G, Gona F, Nicolosi VM, Nicolosi D, Carattoli A, Fadda G, Nicoletti G, Stefani S. In vitro activity of tigecycline and comparators against carbapenem-susceptible and resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008; 7:4.
134. Reis AO, Luz DAM, Tognim MCB, Sader HS, Gales AC. Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next? *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1025–1026.
135. Landman D, Bratu S, Kochar S, Panwar M, Trehan M, Doymaz M, Quale J. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, N.Y. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 60: 78–82.
136. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 31: 101–106.
137. 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* 2008; 52: 333–336.
138. Wareham DW, Bean DC. In-vitro activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5:10.
139. Pankey GA, Ashcraft DS. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest® and time-kill assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2009; 63: 228–232
140. Osman Kılınç, Buket Cicioğlu Arıdoğan. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım ve Cerrahi servis hastalarından izole edilen MDR *Acinetobacter baumannii* izolatlarının rep-PCR ve PFGE yöntemleri ile kökenlerinin araştırılması. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi. 2011.
141. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1317–1323.
142. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ, Barrero-Almodóvar AE, García-Garmendia JL, Bernabeu-Wittell M, Gallego-Lara SL, Madrazo-Osuna J. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1111–1118.

143. Landman D, Bratu S, Alam M, Quale J. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 55: 954-957
144. Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, Alexiou VG, Matthaiou DK, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Nikita D, Michalopoulos A. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 194–9.
145. Den Hollander JG, Mouton JW, Verbrugh HA. (1998). Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 744–748.
146. Eliopoulos GM. (1989). Synergism and antagonism. *Infect Dis Clin N Am*, 3,399–406.
147. Marymont JJ. Jr, Marymont J. (1981). Laboratory evaluation of antibiotic combinations: a review of methods and problems. *Lab Med*,12, 47–55.
148. Eliopoulos GM, Moellering RC. (1996). Antimicrobial combinations, In V. Lorian (Ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. (pp. 330–396) The Williams & Wilkins Co. Baltimore.