

T. C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII*
SUŞLARINDA ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİK
KOMBİNASYONLARININ IN-VITRO ETKİNLİĞİ**

UZMANLIK TEZİ

DR.RIDVAN GÜÇKAN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SEMRA KURUTEPE

MANİSA, 2010

ÖNSÖZ

Çok değerli anne ve babama,

Hayat arkadaşım; sevgili eşim Sezin'e,

Tıbbi Mikrobiyoloji ihtisasım boyunca bilimsel bir eğitim ve araştırma ortamı sağlayan, her zaman destek ve hoşgörüsünü gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu'na, bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan başta tez danışmanım sayın Doç. Dr. Semra Kurutepe olmak üzere anabilim dalımızın öğretim üyeleri; Prof. Dr. Beril Özbakkaloğlu'na, Prof. Dr. Tamer Şanlıdağ'a, Doç. Dr. Kenan Değerli'ye, Doç. Dr. Sinem Akçalı'ya, Doç. Dr. Hörü Gazi'ye, Doç. Dr. Nuri Özkütük'e, Yard. Doç. Dr. Talat Ecemiş'e,

Ayrıca asistanlık eğitimim süresince benden klinik tecrübelerini esirgemeyen Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri; sayın Prof. Dr. Özlem Tünger ve Doç. Dr. Banu Çetin'e, tezimin istatistik çalışmalarında yardımcı olan Halk Sağlığı anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gönül Dinç Horasanlı'ya, ihtisasım sırasında her zaman uyum içinde çalışmalarıyla huzurlu bir iş ortamını paylaştığım asistan arkadaşlarıma, laborant arkadaşlarıma, isimlerini saymadığım üniversitemizin tüm çalışanlarına, sonsuz teşekkürler ederim.

Dr. Rıdvan Güçkan

İÇİNDEKİLER

ÖZET

ABSTRACT

KISALTMALAR

TABLO LİSTESİ

ŞEKİL LİSTESİ

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
<i>Acinetobacter</i> Türleri	2
Taksonomi ve Tarihçe	2
Genel Mikrobiyolojik Özellikler	3
Patogenez ve Virülans	4
Epidemiyoloji	5
<i>Acinetobacter</i> Nedenli Hastane İnfeksiyonları	6
<i>Acinetobacter</i> İnfeksiyonlarının Tedavisi	7
<i>Acinetobacter</i> Cinsi Bakterilerde Direnç Mekanizmaları	8
Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları	9
Aminoglikozidlere Direnç Mekanizmaları	10
Kinolonlara Direnç Mekanizmaları	10
Tetrasiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları	10
Polimiksinlere Karşı Direnç Mekanizmaları	11
Tigesiklin Direnci	11
Antibiyotik Duyarlılık Yöntemleri	11
Difüzyon Testleri	12
Dilüsyon Testleri	13
Sinerj Testleri ve Özellikleri	14
İki Boyutlu Sulandırım (Dama Tahtası “Checkerboard”) yöntemleri	15
Time-Kill (Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği) yöntemi	20

3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
6.KAYNAKLAR	50

ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARINDA ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ IN-VITRO ETKİNLİĞİ

ÖZET

Acinetobacter cinsi bakteriler son yıllarda özellikle yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere hastane infeksiyonlarında en sık izole edilen etkenlerin başında gelmektedir. Günümüzde *Acinetobacter baumannii* suşlarına bağlı olarak oluşan infeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı giderek artan direnç tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. *Acinetobacter baumannii*'nin gittikçe daha sık infeksiyon etkeni olması ve antimikrobiyal direnç oranlarının artması tedavide yeni seçenek ilaçların araştırılmasını gerektirmiştir

Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda 2005-2009 yılları arasında çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 50 *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) kökeni çalışmaya alındı. Bakterilerin tanımlanması BBL Crystal Enterik/ Nonfermenter ID Kit (Becton Dickinson, ABD) veya Phoneix 100 BD sistemi (Becton Dickinson Microbiology Systems) kullanılarak tür düzeyinde yapıldı. *A. baumannii* kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Antibiyotik duyarlılık sınırları CLSI kriterlerine göre okundu. Çoğul ilaç dirençli 10 *A. baumannii* suşunda kolistin/ rifampisin , kolistin/ imipenem , tigesiklin/rifampisin, tigesiklin/imipenem kombinasyonlarının etkinliği checkerboard ve E-test yöntemleriyle araştırıldı ve iki yöntemin birbiriyle tutarlılığı karşılaştırıldı. Değerlendirmeler checkerboard yöntemini referans olarak yapıldı.

Araştırılan dört kombinasyon için checkerboard ile elde edilen FİK indeks değerlerine göre en iyi kombinasyonun kolistin/rifampisin (% 80 sinerji) ve kolistin/imipenem'de (% 80 sinerji) olduğu bulundu. Bunu tigesiklin/rifampisin (%60 sinerji) ve tigesiklin/imipenem (%10 sinerji) kombinasyonu izlemekteydi. Ülkemizde kolistin henüz kullanıma girmediği

için MDR *A.baumannii* suşlarının neden olduğu infeksiyonlarının tedavisinde tigesiklin/rifampisin kombinasyonunun iyi bir seçenek olabileceği düşünöldü.

Kombinasyonların E-test yöntemiyle saptanan etkinliklerinin Chekerboard yöntemiyle tutarlılıkları karşılaştırıldığında; tutarlılık %52.5 (%10-70) olarak bulundu. E-test yönteminin antibiyotik kombinasyonların etkinliğini saptamada kullanılabilmesi için checkerboard ve time-kill yöntemleriyle daha çok karşılaştırılmalı çalışma sonuçlarına ihtiyaç olduğu düşünöldü.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, sinerji, chekerboard, E-test, kolistin, tigesiklin

IN-VITRO EFFECT OF VARIOUS ANTIMICROBIALS IN COMBINATION AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*

ABSTRACT

In recent years, *Acinetobacter spp.* have emerged as one of the most important nosocomial pathogens, especially in patients admitted to an intensive care unit (ICU). The progressively increasing resistance of *A. baumannii* to widely used antibiotics is now a major problem in our country like worldwide. Due to antibiotic resistance with *Acinetobacter baumannii* has increased and leads clinicians to find alternative antibiotics.

In this study, 50 *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) isolated from various clinical specimens from June 2005 to September 2009 in Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Bacteriology Laboratory were investigated. Isolation and identification were performed by conventional biochemical tests as well as by BBL Crystal GN; N/F ID (Becton Dickinson, USA) or Phoenix 100 BD systems (Becton Dickinson Microbiology Systems). The antibiotic susceptibilities of the strains were investigated by the disk diffusion method according to the recommendations of the CLSI.

The present study aimed at evaluating the interaction between colistin/rifampicin, colistin/imipenem, tigecycline/rifampicin and tigecycline/imipenem through microdilution checkerboard and E-test method against ten MDR *A. baumannii* strains. The secondary objective was to examine the degree of agreement of a possible new method utilizing the E-test with the checkerboard method.

According to our *in-vitro* study results, the checkerboard method with the combination regimens of colistin/rifampicin and colistin/imipenem each showed 80% synergistic activity. Due to colistin is not currently in use in our country, combinations of tigecycline/rifampicin could be promising

alternatives for the treatment of infections due to MDR strains of *A. baumannii*.

The agreement between the checkerboard tests and Etest method was 52.5% (range 10–70%). Further comparison studies of the E test synergy technique with the checkerboard and time-kill methods are warranted.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, synergy, checkerboard, E-test, colistin, and tigecycline

KISALTMALAR

AYBÜ	Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi
CAMHB	Kasyon Ayarlı Mueller Hinton Broth
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EMB	Eosin Metilen Blue
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
FİK	Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu beta-laktamaz
IPM	İmipenem
KOL	Kolistin
MHA	Mueller Hinton Agar
MIK	Minimum İnhibitor Konsantrasyon
MDR	Multidrug Resistance
MYSTIC	Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RF	Rifampisin
TG	Tigesiklin
TMP/SMX	Trimetoprim/Sulfametoksazol
YBÜ	Yoğun Bakım Ünitesi

TABLO LİSTESİ

- Tablo-1. Sık saptanan *Acinetobacter* türlerinin ayırımında kullanılan temel parametreler
- Tablo-2. Mikrodilüsyon “ dama tahtası ” panel örneği
- Tablo-3. *A. baumannii* suşlarının CLSI tarafından önerilen disk difüzyon duyarlılık zon çapları
- Tablo-4. Çözücü ve sulandırıcılar
- Tablo-5. *A.baumannii*'nin (n=50) izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları
- Tablo-6. Suşların Broth (sıvı) dilüsyon MİK değerleri (µg/mL) ve duyarlılık değerlendirilmesi
- Tablo-7. Suşların Broth (sıvı) dilüsyon MİK değerleri (µg/mL) ve duyarlılık değerlendirilmesi
- Tablo-8. Checkerboard yöntemiyle suşların ilaç kombinasyon etkinlikleri
- Tablo-9. Checkerboard ve E-test yöntemiyle MDR *Acinetobacter baumannii* suşları (n=10)'nın ilaç kombinasyon etkinlikleri
- Tablo-10. Kolistin/imipenem kombinasyonu için gözlenen tutarlılık
- Tablo-11. Kolistin/rifampisin kombinasyonu için gözlenen tutarlılık
- Tablo-12. Tigesiklin/rifampisin kombinasyonu için gözlenen tutarlılık
- Tablo-13. Tigesiklin/imipenem kombinasyonu için gözlenen tutarlılık
- Tablo-14. Kolistinin ve tigesiklinin kombinasyon etkinliği

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil -1. Tigesiklin / rifampisin kombinasyonu
- Şekil -2. Kolistin/imipenem kombinasyonu
- Şekil -3. Tigesiklin / imipenem kombinasyonu
- Şekil- 4. Checkerboard kombinasyon uygulaması
- Şekil- 5. E-test kombinasyon yöntemi
- Şekil- 6. E-test ile Tigesiklin /imipenem kombinasyonu
- Şekil- 7. E-test ile kolistin/imipenem kombinasyonu

GİRİŞ VE AMAÇ

Hastane infeksiyonlarına yol açan etkenler arasında *Acinetobacter* cinsi bakteriler önemli bir yer tutmaktadırlar (1). Bu etkenlerin hastane infeksiyonlarında sık saptanmalarının nedeni, çevre koşullarına dayanıklı olmaları ve antibiyotiklere karşı kolay direnç kazanabilmeleridir. *Acinetobacter baumannii* hastalardan ve hastane çevresinden en sık izole edilen *Acinetobacter* türü olarak bildirilmektedir (2).

Son yıllarda özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının artışı ile birlikte *Acinetobacter* türleri antibiyotiklere dirençli hale gelmiştir. Bu direnç tedavide ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Özellikle girişimsel uygulamaların (entübasyon, üriner ve damar içi katater vb) yoğun uygulandığı ve antibiyotik kullanımının yüksek olduğu yoğun bakım ünitelerinde önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (3).

Mikroorganizmalarda görülen direnç oranının artması nedeniyle, farklı tedavi protokolleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kombinasyon tedavileri ve yeni antibiyotiklerin üretilmesi bu çalışmalara örnek verilebilir. Antimikrobiyal ilaç kombinasyonları geniş spektrum elde etmek, dirençli mutantların gelişmesini önlemek, toksisiteyi minimize indirmek ve iki ilaç arasında sinerjik etki elde etmek amacıyla kullanılırlar.

Antibiyotik kombinasyonlarının etkileşimlerinin anlaşılabilmesi için uygulanan tüm *in-vitro* duyarlılık işlemlerine sinerji testleri denilmektedir. Bu amaçla iki boyutlu sulandırım (Checkerboard yöntemi), zamana bağlı öldürme kinetiği (time-kill) yöntemi ve E-test difüzyon yöntemleri uygulanabilmektedir (4, 5).

Bu çalışmada, hastanemizin çeşitli servislerinde yatmakta olan hastalarda mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen, çoğul dirençli *A. baumannii* suşlarına karşı; ülkemizde yeni kullanıma giren tigesiklinin imipenem ve rifampisinle, yine kolistinim imipenem ve rifampisinle kombinasyonlarının *in-vitro* etkinliklerinin Checkerboard ve E-test yöntemleriyle araştırılıp, yöntemlerin birbiri ile tutarlılıklarının karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

***Acinetobacter* Türleri**

Acinetobacter türleri özellikle vücudun nemli bölgeleri başta olmak üzere normal deri florasında yer alabilmektedirler. Normal bireylerin yaklaşık %25'inin derilerinde *Acinetobacter* türlerini taşıdıkları düşünülmektedir (6). Hastanede yatan hastalarda taşıyıcılık oranı daha yüksektir. Bunun nedeni çapraz kontaminasyon ve hastane ortamının kaynak oluşturmasıdır. Genellikle fırsatçı patojen olarak ifade edilirler ve son zamanlarda hastanede yatan hastalarda septisemi, pnömoni, yaraya bağlı sepsis, endokardit, menenjit, ürogenital, cerrahi alan infeksiyonu gibi birçok nozokomiyal infeksiyon salgınlarına neden oldukları bildirilmektedir. Toplumdan kazanılmış infeksiyonlara da neden oldukları bildirilmiştir (1).

Taksonomi ve Tarihçe

İlk kez Beijerinck tarafından 1911'de izole edilen *Acinetobacter* türleri, *Micrococcus calco-aceticus* olarak adlandırılmıştır (6, 7). 1939 yılında DeBord'un gram negatif kokobasilleri üretral örnekten izole etmesiyle birkaç isim daha almış, 1950'de *Acinetobacter* olarak tanımlanmaya başlanmıştır (8). Günümüze kadar *Micrococcus calcoaceticus*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Alcaligenes*, *Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii* gibi 15'in üzerinde farklı isimle anılmıştır. Taksonomik çalışmalar sonucu *Acinetobacter* cinsi günümüzde *Moraxella*, *Psychrobacter* ve ilgili diğer cins bakterilerle birlikte *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almaktadır (1). DNA benzerlikleri temel alınarak yapılan çalışmalarda *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter radiorezistens*, *Acinetobacter schindleri*, *Acinetobacter ursingii* ile birlikte 19'dan fazla tür belirlenmiştir (6, 9). Tüm bu türler arasında en sık infeksiyonlara yol açan etken *A. baumannii* dir (1).

Genel Mikrobiyolojik Özellikler

Acinetobacter türleri non-fermentatif, aerobik, oksidaz negatif, hareketsiz, sporsuz, genellikle nitrat negatif, gram negatif basillerdir. 1-1.5µm x 1.5-2.5 µm boyutlamda ve genellikle çift olarak bulunmaktadırlar. Pozitif kan kültürlerinden hazırlanan preparatlarda gram pozitif kok olarak da görülebilmektedir, DNase ve indol negatif, katalaz pozitifdir (6). Temel üretim besiyerlerinde 35- 37°C' de kolayca üretilebilirler. Kanlı agardaki kolonileri 24 saat sonunda 2-3 mm çapına ulaşırlar ve bazı türler hemolitik özellik gösterebilirler. MacConkey agarda ve Eozin Metilen Blue agar' da laktoz negatif koloniler oluştururlar. *Enterobacter*'lerden daha küçük, opak, pigmentsiz, S tipi koloniler meydana getirirler ve bazı türler pigment oluşturabilir (6). Zor üreyen bir mikroorganizma değildir ve besinsel olarak fakir ortamlarda hatta antiseptiklerin varlığında bile yaşamaktadır. Permeabilite bariyeri vardır ve bu şekilde bazı antibiyotiklere karşı intrensek dirençlidir. Çeşitli plazmidler ve kromozomal enzimleri nedeniyle birden fazla antibiyotiğe direnç kazanabilmektedir (3). *Acinetobacter* türlerini klinik örneklerden izole etmek için temel besiyerleri kullanılabildiği gibi diğer mikroorganizmaların üremesini inhibe eden seçici besiyerleri de kullanılabilmektedir. Çevre taramalarından elde edilen örnekler; özellikle de az sayıda mikroorganizma bulunanlar sıvı zenginleştirilmiş besiyerlerine ekilebilmektedir (1). Biyokimyasal ve üreme özelliklerine göre tür ayrımı yapılabilmektedir. Bu ayırimda glukoz oksidatif etki, 44°C' de üreyebilme ve hemoliz özelliklerinden yararlanılır. Klinik izolatlar arasında en sık izole edilen dört *Acinetobacter* türünün özellikleri Tablo 1' de gösterilmiştir (10).

Tablo-1: Sık saptanan *Acinetobacter* türlerinin ayırımında kullanılan temel parametreler

	Glukoz	Laktoz	44°C' de üreme	Hemoliz
<i>A. calcoaceticus</i>	+	+	-	-
<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-
<i>A. lwoffii</i>	-	-	-	-
<i>A. haemolyticus</i>	Değişken	-	-	+

Klasik yöntemler dışında otomotize sistemlerle tür ayırımını fenotipik olarak yapılabilmektedir. Moleküler yöntemler (PZR, ribotipleme, Pulsed Field Gel Electrophoresis) ise genotiplendirme amacı ile kullanılmaktadır (1).

Patogenez ve Virülans

Acinetobacter cinsi bakteriler virülansı düşük kabul edilen patojenlerdir. Normal konak savunma mekanizmasına sahip kişilerde infeksiyon oluşturmaları oldukça güçtür. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı infeksiyonlara neden olurlar. *Acinetobacter* türlerinin kolonizasyonu için başlıca risk faktörleri (6):

- Uzun süre yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) kalma
- Geniş spektrumlu ve uzun süre antibiyotik kullanımı
- Mekanik ventilatör uygulanması
- Damar içi kateterizasyon
- İdrar kateteri
- Endotrakeal tüp uygulanması
- Trakeostomi
- Enteral beslenme

YBÜ'nde *Acinetobacter* suşları ventilatör ekipmanı ve çalışanların elleri yoluyla yayılmaktadır. Yapılan bir salgın çalışmasında her üç hastane personelinden birinde birden fazla *A. baumannii* suşu ile geçici el kolonizasyonu tespit edilmiştir (11).

Acinetobacter düşük virölanslı bir bakteri olarak tanımlanmasına rağmen bazı özellikleri virölansını arttırmaktadır:

1. Polisakkarit kapsül varlığı: L-ramnoz, D-glukoz, D-glukronik asit ve D-mannoz yapısındadır ve bakteriyi fagositozdan korur.
2. Fimbria ve/veya polisakkarit kapsül varlığında insan epitel hücrelerine adezyon özelliği
3. Doku lipit hasarı yapabilen enzim üretimi
4. Hücre duvarının lipopolisakkarit içeriği ve lipit A varlığının toksik rolü
5. Aerobaktin gibi sideroforlar ve demir tutucu dış membran reseptör proteinleri (1, 12)

Epidemiyoloji

Acinetobacter cinsi bakteriler doğada toprakta, su ve yiyeceklerde bulunur. Diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında *Acinetobacter* türleri kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH derecelerinde yaşayabilme özellikleri ile cansız yüzeylerde günlerce canlılıklarını sürdürebilmektedirler (1, 13). Hastanede yatan hastalarda deri kolonizasyonunun %40'ın üzerinde olduğu rapor edilmiştir (14). Salgın dönemlerinde ise %7-18 oranında boğaz taşıyıcılığı saptanırken, trakeostomi sürüntülerinde bu oran %45' dir (1). Sağlıklı insanların normal deri florasında, düşük yoğunlukta, kısa süreli olarak bulunabildikleri belirlenmiş, bunun dışında ağız florasında, üst solunum yollarında, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinde de bulunduğu gösterilmiştir (1, 13, 15). *Acinetobacter* türleri hastane havası, buhar makinesi, periton diyaliz banyoları, musluklar, yatak kenarları, tansiyon aletleri, anjiyografi kateterleri, mekanik ventilasyon cihazlarından izole edilmiştir (1, 16). Sağlık personeli, rezervuar insanlar ve cansız materyaller, hastalar arasında geçiş için uygun bir ortam sağlamaktadır (1).

***Acinetobacter* Kaynaklı Hastane İnfeksiyonları**

Acinetobacter türleri genellikle hastane kaynaklı infeksiyonlara neden olurlar. Tüm organlarda süperatif infeksiyonlara neden olabilirler. *Acinetobacter* türleri arasında en sık ve en ciddi klinik tablolara neden olan etken *A. baumannii*' dir (13). *A. baumannii* nin neden olduğu infeksiyonlar daha çok yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda görülmektedir. Uzun süreli bakım merkezlerinde, özellikle de ventilatöre bağlı hastaların bakımının yapıldığı merkezlerde bulunan hastalarda risk yüksektir.

Acinetobacter infeksiyonunun en sık lokalizasyonu ve en önemli kolonizasyon yeri solunum yollarıdır. Kolonizasyonunun burun delikleri, nazofarenks ve trakeostomi yerinde olduğu bildirilmiştir (14). Ülkemizde yapılan bir çalışmada *A. baumannii* hastane kökenli pnömoni etkenleri arasında (%24) ilk sırada yer almıştır, bu olguların önemli bir kısmının ventilatörle ilişkili pnömoni olduğu dikkati çekmektedir (17).

Acinetobacter pnömonileri genellikle multiloberdir. Kavitasyon, plevral effüzyon ve bronkopulmoner fistül gelişebilir. Üç gün içerisinde uygun antibiyotik tedavisi başlanan hastalarda mortalite azalmakta, sekonder bakteriyemi ve septik şok gelişenlerde mortalite artmaktadır. Prognoz altta yatan hastalık ve risk faktörleriyle yakından ilişkilidir. Mortalite oranları %20-60 arasında değişmektedir (17).

Acinetobacter 'e bağlı bakteriyemi en sık pnömonilere sekonder gelişir. *Acinetobacter* 'in neden olduğu bakteriyemi tüm bakteriyemilerin %8.4'ünü oluşturmaktadır. Nozokomiyal *Acinetobacter* bakteriyemisi sıklıkla solunum yolu infeksiyonu, intravenöz kateter kullanımı, daha az olarak üriner sistem, yara, cilt ve abdominal infeksiyonlarla ilişkilidir. *Acinetobacter* bakteriyemisine bağlı mortalite oranı %17-46 arasında bildirilmiştir. *Acinetobacter* bakteriyemisi tek patojenli veya polimikrobiyal bakteriyemi şeklinde görülebilir (13).

Acinetobacter primer menenjitli vakalarda görülmesine rağmen özellikle beyin cerrahisi uygulamalarından sonra, travma, lomber ponksiyon, ventrikülografi ve miyelografi sonrası gelişen sekonder menenjit olgularında

baskın form olarak saptanmaktadır (1). Mortalite %34-54 arasında değişmektedir (17).

Acinetobacter'e bağlı üriner sistem infeksiyonları genellikle immün sistemi baskılanmış, yaşlı, kalıcı üriner kateteri olan ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda görülmektedir. Üriner kateter taşıyan hastalardan *Acinetobacter* izolasyonunda kolonizasyon olasılığının da unutulmaması gerekir (1,18).

Acinetobacter' e bağlı yumuşak doku infeksiyonları gelişiminde başlıca risk oluşturan faktörler; cerrahi insizyon ve damar içi kateter uygulamaları, travmatik yaralar, yanıklar sayılabilir (1). Bu infeksiyonların çoğu polimikrobiyal gelişim gösterir.

Keratokonjunktivit, endoftalmit, protez kalp kapağı endokarditi, periton dializi ile ilişkili peritonit, pankreas ve karaciğer apseleri, otolog kemik iliği transplatasyonundan sonra gelişen osteomyeliti ve septik artrit *Acinetobacter* cinsi bakterilerin sebep olduğu diğer infeksiyonlardır (1,13).

***Acinetobacter* İnfeksiyonlarının Tedavisi**

Günümüzde *Acinetobacter 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 (19, 20). Ciddi hastane infeksiyonu salgınlarına neden olmaları ve tedavi sırasında birçok antibiyotiğe karşı kısa sürede direnç geliştirmeleri nedeniyle bu etkenlerle oluşan infeksiyonların sağaltımında farklı antibiyotik kombinasyonların kullanımını gündeme getirmiştir (21, 22).

Acinetobacter türlerine etkili ilaçlar (1, 23);

- ✓ Betalaktam- Beta Laktamaz İnhibitörleri
- ✓ Sefalosporinler (3 ve 4. kuşak)
- ✓ Karbapenemler
- ✓ Kinolonlar
- ✓ Aminoglikozidler
- ✓ Trimetoprim- Sülfametoksazol,
- ✓ Tetrasiklinler
- ✓ Kolistin
- ✓ Kloramfenikol

Bakterinin tedavi esnasında hızla direnç geliştirebilme olasılığı ve tedavide yeterince başarı sağlanamaması nedeniyle tedavinin tek bir antimikrobiyal ajan kullanılarak yapılması önerilmemektedir (1, 23). En sık kullanılan kombinasyon, düşük direnç oranları ve *in-vitro* sinerji göstermesinden dolayı imipenem+amikasindir. Sefaperazon + sulbaktam, seftazidim+aminoglikozid/florokinolon kombinasyonları da etkin seçeneklerdendir. İmipenem+siprofloksasin kombinasyonunun da *in-vitro* etkinliği gösterilmiştir (24). İmipenem ve meropeneme orta düzeyde dirençli *A. baumannii* suşlarında kolistin+rifampisin kombinasyonunun *in-vitro* sinerjik olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (25).

***Acinetobacter* Cinsi Bakterilerde Direnç Mekanizmaları**

Acinetobacter cinsi bakterilerde antibiyotik direnci giderek artmakta ve tedavide zorluklarla karşılaşmaktadır (26). Penisilin, ampisilin ve sefalotine hemen hemen tüm grup üyelerinde direnç gözlenmekte olup, suşların çoğu kloramfenikole de dirençlidir (27). Aminoglikozidler, üreidopenisilinler, florokinolonlar ve üçüncü kuşak sefalosporinler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı *Acinetobacter* türlerini antibiyotiklere dirençli hale getirmiştir (28). Çoklu dirençli *Acinetobacter*'lere karşı aktif olduğu gösterilen tek antibakteriyel ajan kolistindir (29).

Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam ilaçlar, kimyasal yapılarında ortak bir beta-laktam halkası taşıyan ve hücre duvar sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubunu oluşturmaktadır. Bu grupta penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, bir monobaktam olan aztreonam yer almaktadır (30). Beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç dört farklı mekanizma ile gelişmektedir; bunlar beta-laktamaz enzimleriyle antibiyotiğin parçalanması, beta-laktam antibiyotiğin hücre içine girişinin engellenmesi, penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) oluşan değişiklikler ve eflüks pompasının aktive olmasıdır. Genellikle bu mekanizmaların bir veya birkaçının bir arada işlemesi sonucu direnç gelişimi gözlenmektedir (31).

Acinetobacter kökenlerinde beta-laktam direnci büyük ölçüde beta-laktamaz enzimlerin varlığına bağlıdır. Bu bakterilerde 1980'lerin sonunda %81'e varan oranlarda beta-laktamaza bağlı antibiyotik direnci bildirilmiştir. Kromozomal beta-laktamazlar sefalosporinaz aktivitesi gösteren enzimler olup yapılan çalışmalarda *A. baumannii* izolatlarının %98'inde sefalosporinaz aktivitesi gösterilmiştir. *Acinetobacter* türleri genellikle penisilinleri etkileyen TEM-1, TEM-2, CARB-5 ve sefalosporinleri etkileyen ACE 1-4 gibi beta laktamazlara sahiptirler (24). *Acinetobacter* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) olan PER-1 enzimi ise ilk kez ülkemizden bildirilmiştir (26). PBP'lere afinite azalması da beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminde önemli bir mekanizmadır (32).

Eflüks pompaları ise beta-laktam antibiyotikleri uzaklaştırmanın yanı sıra kinolonları, tetrasiklinleri ve kloramfenikölü etkin bir biçimde dışarı atar (7, 33).

Karbapenem direnci dış membran proteinlerinde veya penisilin bağlayan proteinlerdeki değişiklik ile geçirgenliğin azalması, metallo-beta-laktamazlar ve oksasilinazları içeren karbapenem hidrolize eden beta-laktamazlar (karbapenemazlar) nedeniyle oluşabilmektedir (34, 35, 36).

A. baumannii suşlarında en sık bildirilen metallo beta-laktamazlar; IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-9 ve oksasilineazlar; OXA-58 ve OXA-24'dür (37).

Aminoglikozidlere Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter infeksiyonlarının tedavisinde aminoglikozitlerin sıklıkla kullanılması sonucunda bu antibiyotiklere direnç gelişimi hızla artmaktadır (1). Aminoglikozidlere direnç gelişiminde temel olarak enzimatik modifikasyon sorumludur (24).

En önemli direnç mekanizması plazmid kaynaklı enzimlerin (asetiltransferaz, fosfotransferaz, adeniltransferaz) oluşmasıyla aminoglikozidlerin asetilasyon, fosforilasyon ya da adenilasyon gibi işlemlerle inaktive olmalarıdır (38).

Kinolonlara Direnç Mekanizmaları

Kinolonlara karşı direnç gelişiminde en önemli mekanizma *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonlardır (24). Direnç genleri plazmidler tarafından taşınmaktadır (38).

Tetrasiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları

A.baumannii'de yaygın olan tetrasiklin direncinin iki farklı mekanizması tanımlanmıştır. TetA ve tetB spesifik transpozon aracılı eflüks pompalarıdır; tetB tetrasiklin ve minosiklinin her ikisinin de eflüksünü belirlerken, tetA sadece tetrasiklinin eflüksünü yürütmektedir.

İkinci mekanizma ribozomal koruyucu proteindir; ribozomları tetrasiklinin etkisinden korur. Tetrasiklin, minosiklin ve doksisisiklinin ribozomları koruyan protein tetM olarak kodlanmıştır (1, 39).

Polimiksinlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Polimiksinler (B ve E) MDR *A. baumannii*'nin sebep olduğu infeksiyonların tedavisinde son yıllarda kullanımı artan peptid antibiyotiklerdir. *A. baumannii*'nin lipopolisakkaritindeki modifikasyon kolistin direncindeki olası mekanizmadır (39,40).

Diğer gram-negatif bakterilerde de mutasyon ya da adaptasyon yolu ile kolistine karşı direnç gelişebilmektedir (41).

Tigesiklin Direnci

Tigesiklin tetrasiklinlerin ribozomlardaki bağlanma noktasına bağlanır. Ancak tigesiklin bu bağlanma bölgesine tetrasiklinden beş kat daha kuvvetli bağlanır. Bu kuvvetli bağlanma tetrasiklinlere karşı gelişen ribozomal korunmadan tigesiklinlerin etkilenmemesini sağlamaktadır. Glisilsiklinlerin efluks pompası ile hücre dışına atılımı yapılamadığından tigesiklin bu direnç mekanizmasından etkilenmemektedir. Tüm antimikrobiyallerde olduğu gibi tigesiklinin tedavide artan oranlarda yaygın olarak kullanılmaya başlamasıyla bu antibiyotiğe dirençli bakteri gelişimi söz konusu olabilir (42, 43, 44).

Antibiyotik Duyarlılık Yöntemleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı *in-vitro* etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Klinikte antimikrobiyal tedavinin, duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre belirlenmesi esastır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde difüzyon ve dilüsyon olmak üzere başlıca iki yöntem kullanılmaktadır (45).

Difüzyon Testleri

a. Disk Difüzyon Testi

Rutin laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılıklarının saptanmasında en sık olarak kullanılan yöntemdir. Standardize, ucuz ve uygulanması basit olan bu yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiş olup ve bu isimle anılmaktadır. Bu test kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin duyarlılığı araştırılan bakterinin inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır.

Bu amaçla belli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler test edilecek olan mikroorganizmanın yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyerine yerleştirilir. Disklerdeki antibiyotikler bir süre sonra çözünüp agara doğru difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizmada çoğalmaya başlar. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra ilacın inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı noktada diskin çevresinde üreme oluşmaz. Mikroorganizma ilaca ne kadar duyarlı ise diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş oluşur. İnhibisyon zonunun çapı ölçülerek uluslararası standart verilere (CLSI'nin standart zon tabloları) göre değerlendirme yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajana karşı duyarlılığı belirlenir.

Bu yöntemde incelenecek olan mikroorganizma süspansiyonu 0.5 McFarland = 10^8 CFU/ml (McFarland; sıvı besiyerinde bulunan bakteri sayısı) göre ayarlanır. Bu süspansiyondan steril bir eküvyon yardımıyla alınan örnek Mueller-Hinton agar yüzeyine inoküle edilir. Takiben farklı antibiyotik diskleri steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirilir. Oluşacak zonların birbiri üzerine gelmemesi için diskler arası en az 22mm, petri kenarından ise 14 mm uzaklık olmasına dikkat edilmelidir. Besiyerleri 18-24 saat 35⁰C de inkübe edilir ve oluşan inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirilir (45).

b. E-test

Katı besiyerinde difüzyon yoluyla MİK (minimum inhibitör konsantrasyonu) değerlerinin saptanmasına olanak sağlayan yöntemlerden biridir. MİK bir mikroorganizmanın üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır.

E-test yönteminde test edilecek bakteri süspansiyonu 0.5 McFarland yoğunluğuna getirilip Mueller-Hinton agar yüzeyine steril bir eküvyonla yayılır. Takiben agar yüzeyine belli bir antibiyotiği gradient şeklinde içeren E-test şeritleri yerleştirilir. Plaklar 18-24 saat 35⁰C de inkübe edilip, şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta MİK değeri olarak belirlenir (45).

Dilüsyon testleri

Dilüsyon testleri sıvı dilüsyon ve agar dilüsyon olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır. Antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizma üzerindeki bakterisidal (üremenin inhibisyonu) ve/ veya bakterisid (öldürmek) etkinliğini saptamak için uygulanır (45).

a. Tüp dilüsyon

Tüp dilüsyon makro ve mikro olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Her iki yöntemin ilkesi aynıdır. Makrodilüsyonda test tüpleri, mikrodilüsyonda ise U tabanlı mikropleytlar kullanılır. Dilüsyon testlerinde besiyeri olarak katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller-Hinton buyyon kullanılır.

Test edilecek olan antibiyotikler çözücüleri ve sulandırıcıları içinde çözdürülerek stok solüsyonlarının hazırlanmasını takiben sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırmaları yapılır. Mikroorganizmaların standart bir inokulumu hazırlanıp antimikrobiyal ajanın çeşitli dilüsyonlarını içeren her bir kuyucuğa eşit miktarlarda eklenir. Aynı solüsyon antibiyotik içermeyen kontrol tüpüne

de eklenir. Bakteri inoküle edilmemiş, sadece besiyeri konmuş bir çukur da besiyeri kontrolü olarak hazırlanır. Besiyerleri 35C⁰ de bir gecelik inkübasyondan sonra bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenir. Bakterinin üremesini önleyen gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilir (45).

b. Agar dilüsyon

Agar dilüsyon yönteminin prensipleri tüp dilüsyon yöntemiyle benzerdir. Bu yöntemde antibiyotik sulandırılmaları agar (Mueller-Hinton besiyeri) içine konulup, antibiyotik içeren besiyeri petri plaklarına dökülür. Her plakta antibiyotiğin farklı konsantrasyonları bulunur (45).

Sinerj Testleri ve Özellikleri

İnfeksiyon sağaltımı sırasında çeşitli nedenlerle iki veya daha fazla antibiyotiğin bir arada kullanılması gerekebilir. Bu nedenler arasında; antibiyotik duyarlılık özellikleri birbirinden farklı birden fazla mikroorganizmanın etken olduğu infeksiyonların sağaltımı, toksisite potansiyeli olan antibiyotiklerin tedavi dozlarının azaltılması, mikroorganizmanın intrinsik duyarlılık özellikleri nedeniyle bir antibiyotik kombinasyonunun tedavi etkinliğinin bir antibiyotiğin tek başına kullanımından daha fazla olduğu infeksiyon hastalıklarının sağaltımı olabilir. Bunlar dışında antibiyotik kombinasyonları direnç gelişiminin önlenmesi veya geciktirilmesi içinde kullanılabilir. Antibiyotik kombinasyonları genellikle ciddi infeksiyonların tedavisinde kullanıldığı için kombinasyonda yer alan ilaçlarının etkileşiminin önceden değerlendirebileceği *in-vitro* yöntemlerin uygulanması önem taşımaktadır. Bu amaçla çeşitli yöntemler geliştirilmesine rağmen günümüzde standart bir yaklaşım bulunmamaktadır.

Antibiyotik kombinasyonlarının etkileşimlerinin anlaşılabilmesi için uygulanan tüm *in-vitro* duyarlılık işlemlerine sinerji testleri denilmektedir. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST) ve

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tanımlarına göre antibiyotik kombinasyonlarının *in-vitro* etkinliği aynı ilaçlar tek başına kullanıldığında elde edilen etkinlikler toplamından daha yüksek ise buna sinerjistik etkileşim (sinerjizm), eşit ise aditif etkileşim adı verilmektedir. Kombinasyonla elde edilen sonuç tek başına en etkin ilaç ile elde edilen sonuca eşit ise etkisiz durum (indifference); daha düşük ise antagonistik etkileşimden (antagonizm)'den söz edilir (46).

Sinerji testleri

Antibiyotik kombinasyonlarının *in-vitro* etkinliğinin ölçümünde üç farklı yöntemler kullanılmaktadır (46).

1. İki Boyutlu Sulandırım Yöntemi(Dama Tahtası "Checkerboard)
2. E-test
- 3.Time-Kill Yöntemi

İki Boyutlu Sulandırım (Dama Tahtası "Checkerboard") yöntemleri

Sinerji değerlendirilmesinde kullanılan makro ve mikro dilüsyon yöntemleri inhibitör ve bakterisidal konsantrasyonların saptanmasında ve antibiyotik duyarlılığının ölçümünde CLSI'nın buyyon dilüsyon yöntemlerine benzer çalışılmaktadır. Ancak burada antibiyotikler hem tek başlarına hem de diğer ajanlar ile birlikte etkinlikleri değerlendirilmektedir. *In-vitro* etkileşimler fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksi ile değerlendirilir. Kombinasyon ile elde edilen antibakteriyel etkinlik, her antibiyotik tek başına iken saptanan MİK değerleri ile kıyaslanır ve elde edilen değer FİK olarak ifade edilir. FİK değeri sinerjistik, etkisiz veya antagonistik şeklinde yorumlanır. Bunun yanı sıra *in-vitro* etkileşimler izobologramlar çizilerek grafik üzerinde gösterilebilir (46).

Mikrodilüsyon Yöntemi

Antibiyotik kombinasyonlarının etkilerinin incelenmesinde en sık mikrodilüsyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde, kombinasyonda yer alan iki antibiyotiğin bir mikrotitrasyon plağında farklı düzlemlerde sulandırımı ve bunun sonucunda plaktaki her kuyucukta değişen konsantrasyonlarda olmak üzere bir araya gelmeleri söz konusudur. Bu sulandırım nedeniyle mikrodilüsyon tekniğine dama tahtası (checkerboard) yöntemi de denmektedir (46).

Yöntem Basamakları

Kanlı agarda üretilmiş ve aynı morfolojide olan kolonilerden 3-5 adet seçilir. Donmuş veya stok koşullarında saklanan izolatların çalışılabilmesi için ard arda iki pasaj yapılması önerilmektedir (46).

Gerekli materyal

1. Besiyeri: çabuk üreyen fakültatif anaerob bakteriler için katyon eklenmiş (12.5 mg/L Mg, 25 mg/L Ca) Mueller-Hinton buyyonu kullanılmaktadır.
2. Antimikrobik ajanların stok solüsyonları
3. Bakteri sulandırımı için %0.85 NaCl solüsyonu
4. Steril distile su
5. Mikrodilüsyon plakları ekim ve sulandırım için gerekli diğer gereçler
6. McFarland 0.5 bulanıklık eşeli ($1-5 \times 10^8$ CFU/ml eş değeridir)

Kalite kontrol yöntemleri

Antibiyotik kombinasyonları için kesin kalite kontrol parametreleri belirlenmemiştir. Bu nedenle kalite kontrolü her antibiyotik için ayrı ayrı uygulanmaktadır.

1. Kalite kontrol suşları

Denenecek antibiyotiklere göre kalite kontrol suşları belirlenir. Her kalite kontrol suşu hasta izolatlarının test edildiği standart protokol ile deneye alınır. Kalite kontrol suşlarının MİK değerleri saptanır ve beklenen değerler ile karşılaştırılır. Böylelikle deney şartlarının uygunluğu ve ilaç sulandırımının doğruluğu denetlenmektedir (46).

2. Üreme kontrolü

Her deneye bakteri inokulumunun canlılığının kontrolü için mikroorganizma üreme kontrolü eklenir. Üreme kontrolünde yoğun üreme olmalıdır (46).

3. Sterilite kontrolü

Tüm mikrodilüsyon panellerinde içinde antibiyotik ve bakteri bulunmayan, sadece katyon eklenmiş Mueller-Hinton buyyonu içeren bir sterilite kontrol kuyucuğu bulunmalıdır. Deney süresince sterilite kontrolünde üreme saptanmaması gereklidir (46).

4. Saf inokulum kontrolü

Saf üremenin belirlenmesi için yapılan ekimlerde tek tip bakteri olmalı kontaminant bakteri bulunmamalıdır (46).

5. İnokulum kontrolü

İnokulumdaki bakteri sayısının belirlenmesi amacıyla kontrol ekimi yapılan plaklarda 75-100 koloni bulunmalıdır. Bu uygulamalar sonucunda, eğer kalite kontrol suşlarının MİK değerleri kabul edilebilir sınırlarda ve üreme ile inokulum kontrollerinde uygun üremeler saptanırsa deney şartlarının geçerli olduğu düşünülür (46).

Yöntemin uygulanması

Mikrodilüsyon panelleri hazırlanır

1-Panel için kullanılacak antibiyotik son konsantrasyonları hesaplanır:

Bu amaçla

- a. Terapötik konsantrasyonlar
- b. Test edilen mikroorganizmanın MİK değerleri
- c. Panel sayısı
- d. Hazırlama yöntemi göz önüne alınmalıdır.

Antibiyotiklerin deneneceği standart bir konsantrasyon dağılımı bulunmamaktadır. Bazı araştırmacılar antibiyotiklerin serum düzeyine bazıları da subinhibitör konsantrasyonlarına göre denenecek sulandırımıları saptanmaktadır. Genellikle terapötik sınırlar içinde kalan değerler seçilir. Sinerji ve antagonizmanın varlığının ve derecesinin görülebilmesi için 1/8 MİK – 4xMİK değerlerinin bulunması gereklidir.

2- Antibiyotik solüsyonları hazırlanır

Öncelikle kuyucukta bulunması istenen son konsantrasyonun dört katı yoğunlukta olan ara sulandırım hazırlanır.

3- Antimikrobik ajanlar 50 µl/kuyucuk olacak şekilde plaklara dağıtılır.
Her kuyucuktaki son hacim 0.1 ml olacaktır (A ilacı 50µl+B ilacı 50 µl)

a. A antibiyotiğinin dağıtılması (Tablo-2)

1. A solüsyonundan (ör: azlosilin 1µg/ ml) 0.05 ml ikinci kolondaki tüm kuyucuklara aktarılır.

2. Üçüncü kolondaki tüm kuyucuklara A' nın bir üst yoğunluğundaki (azlosilin 2µg/ ml) solüsyonundan 0.05 ml aktarılır.

3. Son kolona kadar A antibiyotiğinin bir yüksek konsantrasyondaki sulandırımından olacak şekilde dağılımına devam edilir.

4. H12 kuyucuğuna ilaç konulmaz (sterilite kontrolü)

b. B antibiyotiğinin dağıtılması (Tablo-2)

1.B sırasındaki tüm kuyucuklara 0.05 ml B antibiyotiği dağıtılır (ör: amikasin 2µg/ ml).

2 C sırasındaki tüm kuyucuklara B' nin ikinci dilüsyonundan 0.05 ml aktarılır.

3. H sırasına dahil olmak üzere (H12 hariç) tüm sıralara B antibiyotiğinin birbirini izleyen dilüsyonlarından 0.05 ml dağıtılır.

Tablo-2. Mikrodilüsyon “ dama tahtası ” panel örneği

A1	A2	A3									A12
B 1	B2	B3									
C1	C2	C3									
H1	H2										H12

c. Antibiyotikler mikropleylerdeki kuyucuklara eklendikten sonra 0.5 Mc Farland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanıp 100 µl/kuyucuk olacak şekilde tüm kuyucuklara dağıtılır. Plaklar 35 C de 16-20 saat inkübe edilir (46).

Değerlendirme

1. Kontrol kuyuları değerlendirilir.

A1 (üreme kontrolü):Yoğun bulanıklık olmalıdır

H12 (besiyeri kontrolü):Üreme olmamalıdır.

2. A ve B antibiyotikleri için MİK değeri saptanır.

3. A ve B antibiyotiklerinin bir arada bulunduğu kuyucuklar üreme açısından değerlendirilir.

4. Her bir kombinasyon için FİK değeri bulunur ve sonuçlar FİK indeksine göre değerlendirilir (46).

Time-Kill (Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği) yöntemi

Antibiyotik kombinasyonlarının zamana ve konsantrasyona bağımlı bakterisidal aktivitelerinin incelenmesinde kullanılır. Yeni antimikrobik ajanların veya ilaç kombinasyonlarının etkinliğinin araştırılmasında diğer *in-vitro* testlerde görülen paradoksal etki, persistan ve tolerans fenomenlerinin doğrulanmasında, tedavide bakterisidal etkinliğin önemli olduğu özel durumlarda tedavi başarısızlığını açıklamada yardımcı bir yöntemdir.

Test suşu antibiyotik içermeyen ve çeşitli yoğunluklarda bir antibiyotik veya antibiyotiklerin kombinasyonlarını içeren sıvı besiyerine aktarılır. İnokülasyon başlangıcında ve bunu takip eden zaman aralıklarında örnek alınır. Canlı organizma sayısı katı besiyerine pasaj yapılarak belirlenir. Alınan sonuçlar koloni sayısının zaman içindeki değişimini gösterecek şekilde bir grafiğe kaydedilir. Besiyeri olarak katyon eklenmiş Mueller-Hinton buyyonu kullanılır. Son inokulum konsantrasyonu bakterilerde $6 + 10^5$ CFU/ml olmalıdır. İnokulum hazırlanırken kullanılan mikroorganizmalar logaritmik üreme fazında olmalıdır. MİK'in 1/2, 1/4, 1, 2, 4 katı gibi konsantrasyondaki

antimikrobik dilüsyonları ile çalıştırılır. MİK saptama yöntemi makrodilüsyondur. İnkübasyon ısı 35⁰C 'dir. Makrodilüsyon tüplerinden alınan örneklerden 0, 4, 8, 24 saatlerde dilüsyonlar hazırlanıp katı besiyerine ekim yapılır. Değerlendirme katı besiyerinde üreyen koloni sayısına göre yapılır (46).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri Kökenleri

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda 2005-2009 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 *A. baumannii* kökeni çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan kökenlerin farklı kliniklerden ve farklı tarihlerde yatan hastalara ait olmasına dikkat edildi. Her hastadan bir klinik izolat çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan bu kökenlerden en az üç antibiyotik sınıfına direnç gösteren ve farklı hastalardan izole edilmiş ve duyarlılık profilleri farklılık gösteren 10 *A. baumannii* kökeni kombinasyon testlerinin değerlendirilmesi için seçildi.

Çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Fakülte Etik Kurulu'nun 18.06.2009 tarihli oturumun 390 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Kökenleri tanımlanması

Besiyerinde saf koloni şeklinde üreyen, gram negatif, aerob, hareketsiz, diplokok veya kokobasil morfolojisinde, katalaz pozitif, oksidaz negatif, glukoz ve laktöz fermentasyonu gözlenmeyen bütün suşlar olası gram negatif non-fermentatif izolat olarak değerlendirilerek ileri identifikasyon testlerine alındı. Bu izolatlar BBL Crystal Enterik/ Nonfermenter ID Kit (Becton Dickinson, ABD) veya Phoneix 100 BD sistemi (Becton Dickinson Microbiology Systems) kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı. Bakteriler çalışma zamanına kadar -80°C de mikrotüplerde saklandı.

Kökenlerin Antibiyotik Direncinin Saptanması

a. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi

Klinik örneklerden izole edilen 50 *A.baumannii* suşunun antibiyotiklere duyarlılıkları, CLSI standartları doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapıldı (47). Duyarlılıkları araştırılan antibiyotikler *Acinetobacter spp.* suşları için CLSI tarafından rutin test ve bildirimlerde önerilen ve antimikrobik ilaç gruplamalarında grup A ve grup B'de yer alanlardan seçildi. Netilmisin bildirim grubu O olarak belirtilmekte olup, grup O ("diğer"), mikroorganizma grubu için klinik endikasyonu olup Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde test ve bildirimde aday olmayan ilaçları içermektedir (47). Ülkemizde kullanılmakta olan sefoperazon-sulbaktam CLSI bildirim grubunda yer almamakta olup bu antibiyotik duyarlılık zonu için *Enterobacteriaceae* için belirlenmiş sefoperazonun değerleri ($15 \geq$ dirençli, 16-20 orta duyarlı, $21 \leq$ duyarlı) baz alındı (47).

.Kullanılan antibiyotik diskleri:

İmipenem (IPM, 10µg),

Meropenem (MEM, 10µg),

Seftazidim (CAZ, 30µg),

Seftriakson (CRO, 30µg),

Amikasin (AK, 30µg),

Netilmisin (NET, 30µg),

Tobramisin (TOB, 10µg),

Siprofloksasin (CIP, 5µg),

Tetrasiklin (TE, 30µg),

Trimetoprim-Sülfometoksazol (SXT, 1.25/23.75µg).

Piperasilin-Tazobaktam (TZP, 100/10µg),

Sefoperazon-Sulbaktam (SCF)

Mikrotüplerde -80°C de saklanan suşlar hazır dökülmüş Eosin Metilen Blue (EMB) ve koyun kanlı agar besiyerlerine aktarılarak bir gece 35°C 'de inkübe

edildi. İnkübasyon sonrası taze kültürdeki kolonilerden % 0.9 serum fizyolojik içerisinde Mc Farland 0.5 (10^8 cfu/mL) olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan steril eküvyon yardımıyla 4 mm kalınlığındaki Mueller-Hinton agar besiyerine ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri 22 mm aralıklarla yerleştirildi. 35°C'de 18-24 saat etüvde bekletilen plaklar değerlendirildi. CLSI tarafından önerilen disk difüzyon duyarlılık zon çaplarına göre duyarlı (D), orta duyarlı (OD) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi (Tablo-3).

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

Antibiyotik	Duyarlı (S)mm	Orta duyarlı (I) mm	Dirençli (R)mm
Tikarsilin	≥ 20	15-19	≤ 14
Piperasilin	≥21	18-20	≤17
Ampisilin/sulbaktam	≥15	12-14	≤11
Piperasilin/tazobaktam	≥21	18-20	≤17
Tikarsilin/klavulanik asit	≥20	15-19	≤14
Seftazidim	≥18	15-17	≤14
Sefepim	≥18	15-17	≤14
Sefotaksim	≥23	15-22	≤14
Seftriakson	≥21	14-20	≤13
İmipenem	≥16	14-15	≤13
Meropenem	≥16	14-15	≤13
Gentamisin	≥15	13-14	≤12
Amikasin	≥17	15-16	≤14
Tobramisin	≥15	13-14	≤12
Tetrasiklin	≥15	12-14	≤11
Doksisiklin	≥13	10-12	≤9
Siprofloksasin	≥21	16-20	≤15
Levofloksasin	≥17	14-16	≤13
Trimetoprim/sülfametoksazol	≥16	11-15	≤10

Çalışmaya alınan suşlardan en az üç antibiyotik sınıfına direnç gösteren ve duyarlılık profili farklı olan 10 *A. baumannii* kökeni kombinasyon

testleri için seçilerek çalışma gününe kadar -80⁰C'de saklandı. Kalite kontrol için *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *E.coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı.

Sinerji Testleri

Broth dilüsyon, E-test ve kombinasyon yöntemleri çalışma öncesinde 10 *A. baumannii* kökeni -80⁰C'den çıkarılarak EMB ve koyun kanlı agar besiyerlerine aktarıldı. Aerobik ortamda, 35⁰C'de 18-20 saat inkübasyon sonrası taze kültür pasajlarından elde edilen bakteri kolonileri testler için kullanıldı.

Broth Mikrodilüsyon Yöntemi ile MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Acinetobacter baumannii kökenlerinin kolistin, tigesiklin, imipenem ve rifampisine karşı MİK değerlerinin saptanmasında broth mikrodilüsyon yöntemi CLSI/2006 kriterleri doğrultusunda uygulandı. Kolistin sülfat, imipenem monohidrat ve rifampisin aktif maddeleri Sigma Aldrich (ABD)'den ve tigesiklin aktif maddesi Wyeth Research Laboratories (ABD) firmasından temin edildi. Antibiyotik aktif maddeleri Tablo-4'te belirtilen çözücü ve sulandırıcılar kullanılarak stok solusyonları hazırlandı (47).

Tablo-4 Çözücü ve Sulandırıcılar

Antmikrobik ilaç	Çözücü	Sulandırıcı
Kolistin	Su	Su
İmipenem	Fosfat tamponu Ph 7.2, 0.01mol/l	Fosfat tamponu ph 7.2, 0.01mol/l
Tigesiklin	Su	Su
Rifampisin	Metanol	Su (karıştırılarak)

Antibiyotik stok solüsyon hazırlanması:

- ✓ Test edilecek mikroroganizma için antibiyotiğin konsantrasyon (dilüsyon) aralığı belirlendi.

İmipenem dilüsyon aralığı: 0.125- 64 µg/ml

Kolistin dilüsyon aralığı: 0.03- 32 µg/ml

Tigesiklin dilüsyon aralığı: 0.125- 64 µg/ml

Rifampisin dilüsyon aralığı: 0.125- 64 µg/ml olarak çalışıldı.

Stok solüsyon hazırlama (Formül-1)

$$\frac{1000}{P} \times V \times C = W$$

P= Potens (µg/mg)

V= Volüm

C= Final konsantrasyon (mg/L)

W= Dilüe edilecek antibiyotik ağırlığı

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{hacim (ml)} \times \text{konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Potens (µg/mg)}} \quad (48)$$

Örneğin:

Stok slüsyonu= 10,000 mg/L olması istenen antibiyotiğin potensi = 980 µg/mg ise 20mL lik çözeltisi için tartılması gereken ağırlık:

$$\frac{1000 \times 20 \times 10}{980} = 204.08 \text{ mg antibiyotik tozundan tartılmalıdır.}$$

Kolistin stok solüsyonu:

15.000Ü/mg olan potens değeri µg/mg'a çevrildi.

Potens = 15.000Ü/mg x 0.0333 = 499.95 µg/mg bulundu. Antibiyotik konsantrasyonu 6400 µg/ml olacak şekilde 10 mL distile suya 0. 499 potensi olan 128 mg antibiyotik tozu eklendi (Formül-1).

Tigesiklin stok solüsyonu:

Potensi %100 olan antibiyotik tozundan 12.800 µg/ml olacak şekilde 10 mL distile suya 128mg eklendi (Formül-1).

İmipenem stok solüsyonu:

Potensi %98 olan antibiyotik tozundan 2560 µg/ml olacak şekilde 9.5mL fosfat tampona (pH= 7,2, 0,01 mol/l) 25mg eklendi (Formül-1).

Rifampisin stok solüsyonu:

Potensi %97 olan antibiyotik tozundan 12.800 µg/ml olacak şekilde 10mL metanole 132 mg eklendi (Formül-1)

Mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için antibiyotik stok solüsyonları 0.2 µm pore çapındaki sellüloz asetat filtrelerden (Sartorius AG, Goettingen, Germany) geçirildi. Daha sonra bu stok solüsyonlar Tablo-4'te belirtilen sulandırıcılar ile 1/10 oranında dilüe edildi. Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (CAMHB, Oxoid, UK) hazırlamak için CLSI önerileri doğrultusunda 20-25 mg/L Ca⁺⁺ ve 10-12.5 mg/L Mg⁺⁺ eklenerek, katyon ayarı yapıldı (47). İlk olarak tigesiklin, imipenem, rifampisinin 0.25 -128 µg/mL (final konsantrasyon 0.125 - 64 µg/mL) ve kolistinin 0.06- 32 µg/mL (final konsantrasyon 0.03 - 16 µg/mL) olacak şekilde CAMHB ile 10 farklı konsantrasyonu hazırlandı. Daha sonra mikro plate'in 1-11. kuyucuklarına (12./son kuyucuk hariç=üreme kontrol) hazırladığımız antibiyotik süspansiyonlarından 50 µl kondu.

İnokulum hazırlanması:

Koyun kanlı agarda pasajlanmış mikroorganizmaların 18–24 saatlik taze kültürlerinden öze yardımı ile koloniler alınarak 2 ml tuzlu suda Mc Farland 0.5 ($1-2 \times 10^8$ cfu/mL) standardına göre süspansiyonları hazırlandı.

Daha sonra hazırlanan süspansiyon 1/10 x 2 kez CAMHB ile dilüe edildi ve 1×10^6 CFU/ml şeklinde bakteri konsantrasyonu oluşturuldu. Doksanaltı (8 X 12) kuyucuklu ve kuyucuk hacmi 0,2 ml olan mikroplate plaklarının 11.sıra hariç her bir kuyucuğuna 50 µl bakteri süspansiyonu eklendi. İnoküle edilen bakteri final konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml oldu.

Mikroplate'lerin

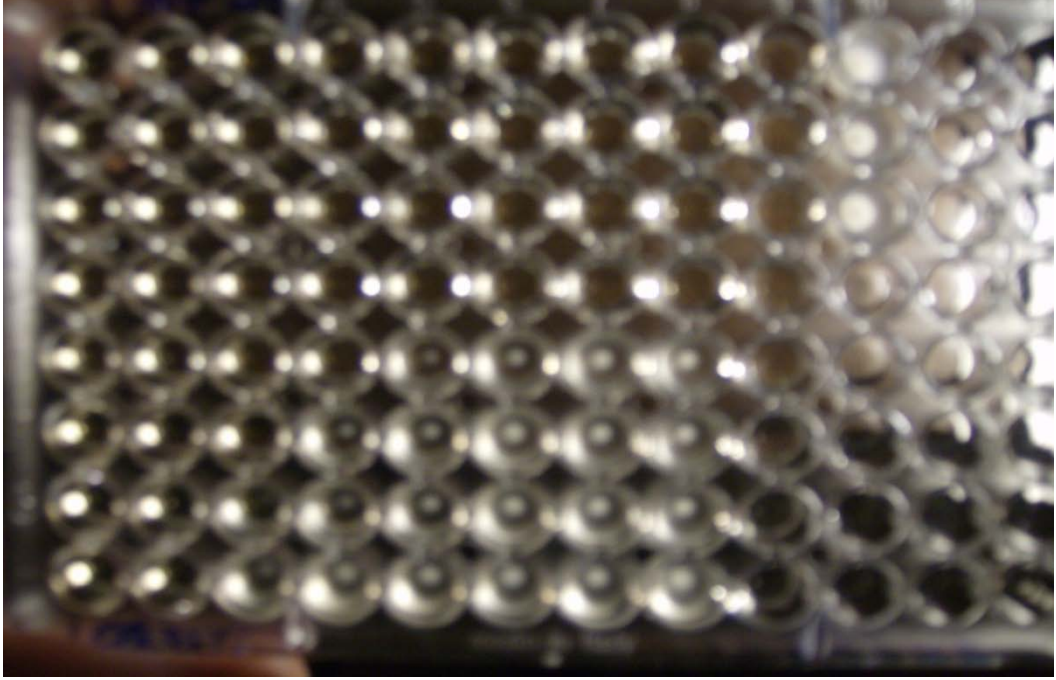
1-10 kuyucuklar = antibiyotik dilüsyonları + bakteri inokulumu

11. kuyucuk = antibiyotik dilüsyonları (steril/negatif kontrol)

12. kuyucuk = bakteri inokulumu (üreme kontrol)

Hazırlanan plakların üstü folyo ile kaplanarak 16- 18 saat 35 ± 2 °C'de aerob ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreme olan kuyucuklarda dipte çökelti şeklinde bakteriler izlendi (Şekil-1, 2, 3). Üreme gözlenmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu içeren kuyucuk bakterinin MİK değeri olarak belirlendi.

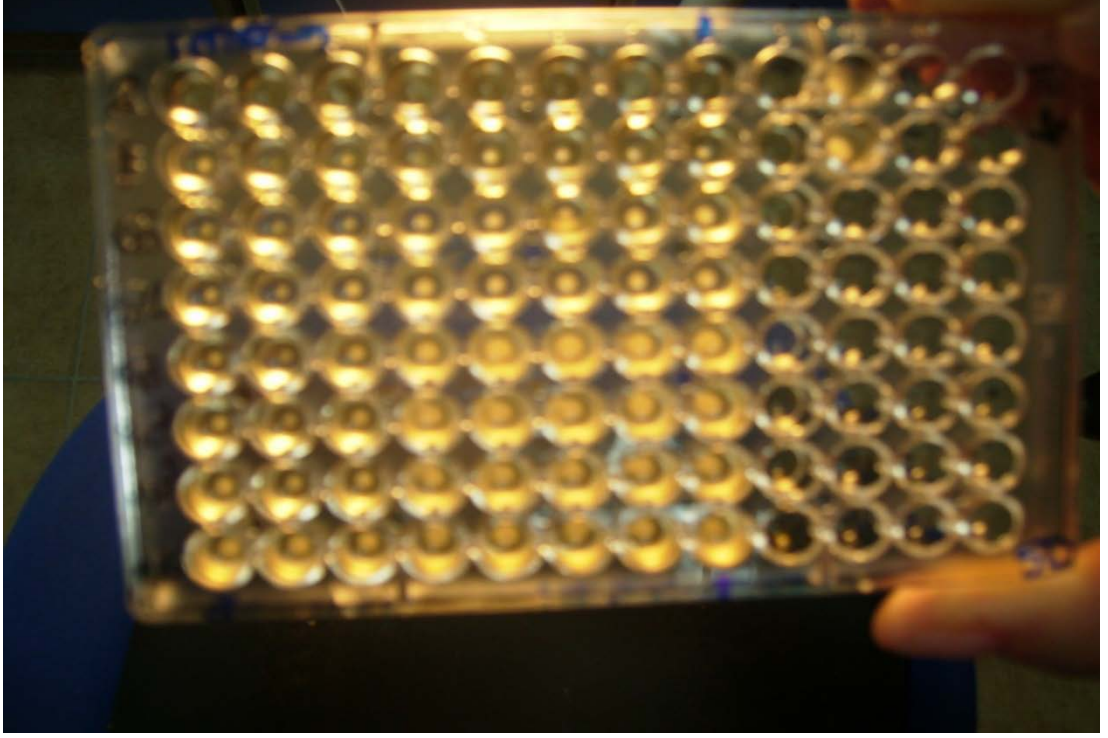
Şekil -1 Tigesiklin/rifampisin kombinasyonu



Şekil -2 Kolistin/imipenem kombinasyonu



Şekil -3 Tigesiklin/imipenem kombinasyonu



E-Test Yöntemiyle MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmaya alınan 10 *A.baumannii* suşunun bir gecelik taze kültürdeki kolonilerinden 1-2 tane alınarak Mc Farland 0.5 (10^8 cfu/mL) standardına göre tuzlu suda süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlardan Mueller Hinton agar (MHA) besiyerine eküvyonla yüzeyel ekim yapıldı ve bir süre kurumayı bekledikten sonra kolistin, tigesiklin, imipenem ve rifampisin E-test stripleri (BIODISK, AB BioMérieux, France) besiyerine yerleştirildi. Plaklar 16-18 saat 35 ± 2 °C' de aerob ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda inhibisyon zonunun E-test şeridini kestiği noktadaki konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. MİK değerlerinin duyarlılık durumları CLSI standartlarına göre yorumlandı. Tigesiklin için Food and Drug Administration (FDA) standartları kriter alındı. Tigesiklin için E-test MİK değeri FDA

kriterlerine göre; ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$: dirençli, 4-6 $\mu\text{g/ml}$: orta derecede duyarlı ve ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$: duyarlı olarak değerlendirildi.

Sinerji Testleri

Çalışmaya alınan 10 *A. baumannii* suşunda kolistin ile imipenem ve rifampisin, tigesiklin ile imipenem ve rifampisin antibiyotiklerinin sinerjistik etkinlikleri Checkerboard ve E- test yöntemiyle değerlendirildi.

Checkerboard Yöntemiyle Kolistin ve Tigesiklinin, İmipenem ve Rifampisin İle Kombinasyonlarının Değerlendirilmesi

Broth mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerleri belirlenen her bir köken ve denenecek her antibiyotik için; 96 çukurlu ve U tabanlı bir adet steril mikropleyt kullanılarak aşağıda belirtilen antibiyotik kombinasyonlarının etkileşimi dama tahtası (checkerboard) yöntemi ile araştırıldı.

Çalışmada kullanılan kombinasyonlar;

Kolistin-imipenem

Kolistin-rifampin

Tigesiklin-imipenem

Tigesiklin-rifampin

Antibiyotik dilüsyonu

Stok solüsyonlar belirtilen sulandırıcılar ile 1/10 oranında sulandırıldı. Her suşun her antibiyotiğe broth mikrodilüsyonla belirlenen MİK değerinin MİK/32 – 4xMİK arasındaki sekiz dilüsyon değeri belirlendi. Bu çift kat antibiyotik dilüsyonları CAMHB ile hazırlandı. Her bir köken için hazırlanan antibiyotik dilüsyonları yukarıda belirtilen kombinasyonlar şeklinde 96 (8X12) kuyucuklu mikrolate'lere her antibiyotik dilüsyonundan 50 μl konuldu. Kombinasyonlardaki iki antibiyotikten ilki için ilk yatay sıra (A sırası), ikincisi için ise ilk dikey sıra (1 no'lu sütun) kullanılarak antibiyotiklerin MİK değeri saptanmıştır. İlk antibiyotiğin dört kat dilüsyonu mikrodilüsyon plağının 1 nolu

sütundan başlayarak (ör; KOL) 8. sütuna kadar dağıtılmıştır. İkinci antibiyotiğin çalışılacak aralıktaki dört katlı dilüsyonları (ör; IMP) ise her bir dilüsyon bir satırın tümüne konulmak üzere mikrodilüsyon plağının A-H sıralarına eklenmiştir. A9 çukuru besiyeri kontrolü A10 ise çukuru üreme kontrolü olarak kullanıldığından antibiyotik eklenmemiştir. (Şekil-4).

Şekil-4: Checkerboard Kombinasyon Uygulaması

	1	2	3									
A	0.25 0.25	0.5 0.25	1 0.25	2 0.25	4 0.25	8 0.25	16 0.25	32 0.25	NK	PK		
B	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				
C	0.25 1	0.5 1	1 1	2 1								
D	0.25 2	0.5 2	1 2	2 2								
E	0.25 4	0.5 4			4 4							
F	0.25 8	0.5 8										
G	0.25 16	0.5 16										
H	0.25 32	0.5 32										

İnokulum hazırlanması:

Koyun kanlı agarda pasajlanmış mikroorganizmaların 18–24 saatlik taze kültürlerinden öze yardımı ile koloniler alınarak 2 ml tuzlu suda Mc Farland 0.5 ($1-2 \times 10^8$ cfu/mL) standardına göre süspansiyonları hazırlandı. Daha sonra hazırlanan süspansiyon 1/10 x 2 kez CAMHB ile dilüe edildi ve 1×10^6 CFU/ml şeklinde bakteri konsantrasyonu oluşturuldu. Doksanaltı (8 X

12) kuyucuklu ve kuyucuk hacmi 0,2 ml olan mikroplate plaklarının A-H'ye 1-8, sıralardaki her bir kuyucuğa 100µl bakteri süspansiyonu eklendi. İnoküle edilen bakteri final konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml oldu. 35°C de 18-24 saat inkübasyondan sonra her iki antibiyotiğin kombinasyondaki MİK değeri belirlendi. Kombinasyonların etkinliğini belirlemek için FİK indeksi kullanıldı.

E-TEST Yöntemiyle Kolistin ve Tigesiklinin, İmipenem ve Rifampisin İle Kombinasyonlarının Değerlendirilmesi

Öncelikle Etest yöntemiyle MİK değerleri belirlenen *A.baumannii* suşlarının kolistin-imipenem, kolistin-rifampin, tigesiklin-imipenem ve tigesiklin-rifampin kombinasyonlarının etkileşimi E-test yöntemiyle araştırıldı.

Suşların taze kültürdeki kolonilerinden Mc Farland 0.5 (10^8 cfu/mL) standardına göre tuzlu suda süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlardan Mueller Hinton agar (MHA) besiyerine eküvyonla yüzeyel ekim yapıldı ve bir süre kuruması beklendikten sonra etkileşimi incelenecek antibiyotik stripleri birbirini MİK değerlerinden 90 derecelik bir açıyla kesecek şekilde besiyeri üzerine yerleştirildi (şekil-5, 6, 7). 35°C de 18-24 saat inkübasyondan sonra her iki E-test stiripinde zon çaplarının stirip kenarını kestiği nokta MİK değeri olarak kaydedildi (49).

Şekil-5: E-test kombinasyon yöntemi

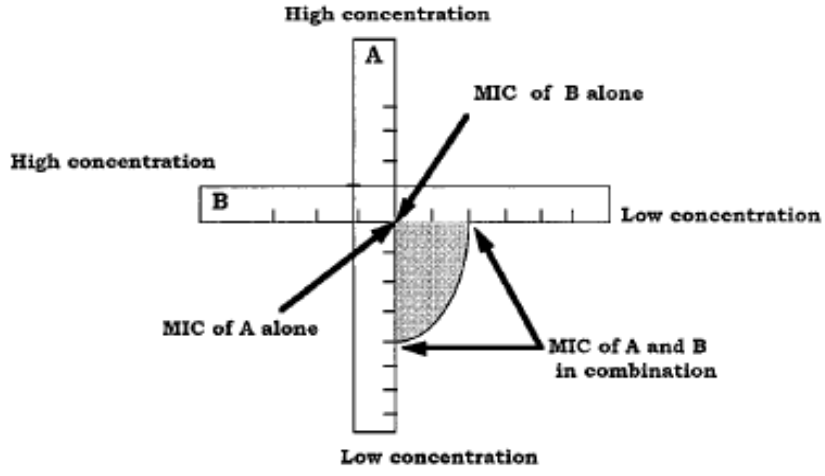
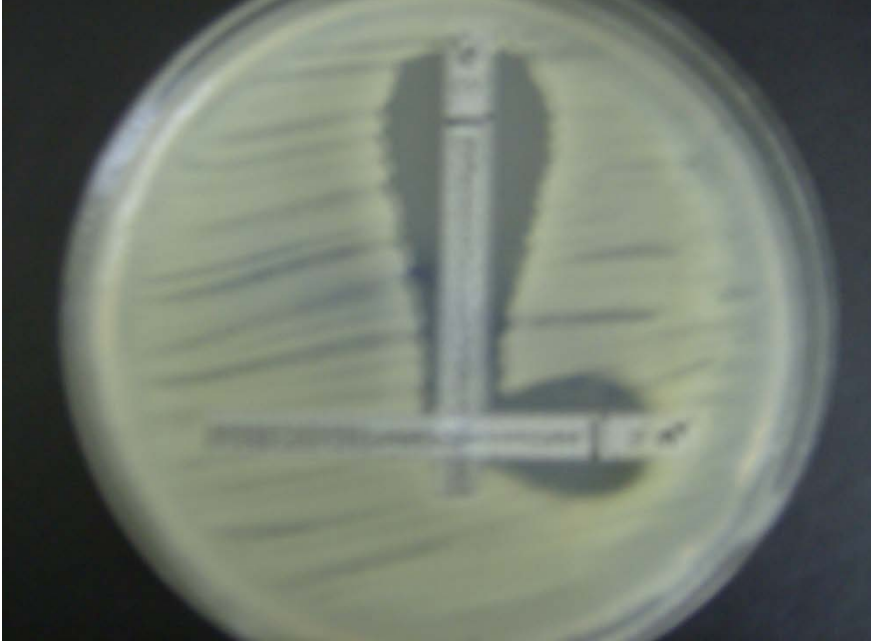


FIG. 1. Diagram of strip placement for E test synergy method.

Şekil-6 E-test ile Tigesiklin/imipenem kombinasyonu



Şekil-7 E-test ile kolistin/imipenem kombinasyonu



FİK İndeksi - Kombinasyon etkinlik değerlendirilmesi

Her iki yöntemde kombinasyonların etkinliğini belirlemek için FİK indeksi aşağıdaki formüle göre uygulandı (46).

FİK indeksinin hesaplanması

$$\text{FİK A} = \frac{\text{B' nin varlığında A' nin MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına A' nin MİK sayısal değeri}}$$

$$\text{FİK B} = \frac{\text{A' nin varlığında B' nin MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına B' nin MİK sayısal değeri}}$$

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

$\Sigma \text{ FİK indeksi} \leq 0.5$ sinerji (4 kat azalma)

$\Sigma \text{ FİK indeksi} \geq 1$ ve $4 \leq$ indifferens

$\Sigma \text{ FİK indeksi} > 4$ antagonizma

Bu çalışmaya alınan 10 çoklu dirençli A.baumannii klinik izolatında denenen dört antibiyotik kombinasyonu için FİK değerleri hesaplanıp etkileşimler sinerji, indiferens ve antagonizma olarak kaydedildi.

İstatiksel analizler

Kombinasyonların etkinlik verileri SPSS 11.5 (SPSS Incorporated, Chicago) programında Fisher'in ki-kare testi kullanılarak değerlendirildi. P değerinin 0,05' den küçük olması anlamlı kabul edildi

Yöntemler arasındaki tutarlılığın karşılaştırılmasında Kappa değerinin istatistiksel olarak anlamlılığı test edilmiş, ayrıca kappa değerinin büyüklüğü ve işaretine göre de yorum yapıldı. Buna göre kappa değeri (-0.3)- (+0.3) arasında ise tutarlılık yok, (+0.3)- (+0.5) arasında ise pozitif yönde zayıf tutarlılık, (+0.5- +0.7 arasında ise pozitif yönde orta düzeyde tutarlılık ve +0.7den fazla ise pozitif yönde güçlü tutarlılık bulunduğu kabul edildi..

BULGULAR

Bu çalışma 2005-2009 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda 2005-2009 yılları arasında farklı kliniklerden, farklı tarihlerde yatan hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 50 *A. baumannii* kökeninin disk difüzyonla duyarlılıkları araştırıldı. Çalışmaya alınan bu kökenlerden en az üç antibiyotik sınıfına direnç gösteren ve duyarlılık profilleri farklı olan 10 *A. baumannii* kökeni kombinasyon testleri için seçildi.

Çalışmamızda, hastanemizde izole edilen *Acinetobacter* kökenlerinin (n:50) 27'si (%54) anestezi yoğun bakım ünitesi (AYBÜ), 8'i (%16) göğüs hastalıkları, 7'si (%14) nöroloji, 4'ü (%8) genel cerrahi, 4'ü (%8) beyin cerrahisinde yatan hastalardan izole edilmiştir.

Çalışmaya alınan *Acinetobacter*'lerin 39'u (%78) kandan, 6'sı (%12) solunum örneklerinden, 5'i (%10) çeşitli klinik örneklerden izole edildi. Çalışmada incelenen *A. baumannii* kökenlerinin disk difüzyon yöntemiyle yapılan antibiyogram sonuçlarına göre en yüksek direnç %88 ile seftriaksona, en düşük direnç %38 ile netilmisine karşı izlendi.

Duyarlı, orta duyarlı, dirençli olarak belirlenen *A. baumannii* izolatlarının antibiyogram sonuçları Tablo 5'de gösterildi.

Tablo 5. *A.baumannii*'nin (n=50) izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Duyarlı		Orta duyarlı		Dirençli	
	n	%	n	%	n	%
İmipenem	14	28	1	2	35	70
Meropenem	12	24	2	4	36	72
Amikasin	11	22	2	4	37	74
Tobramisin	11	22	2	4	37	74
Netilmisin	31	62	-	-	19	38
Seftazidim	6	12	1	2	43	86
Seftriakson	2	4	4	8	44	88
Sefaperazon/Sulbaktam	13	26	16	32	21	42
Piperasilin/Tazobaktam	5	10	4	8	41	82
Siprofloksasin	8	16	4	8	38	76
TMP/SMX*	7	14	-	-	43	86
Tetrasiklin	8	16	4	8	38	76

* TMP/SMX: Trimetoprim/Sulfametoksazol

Seçilen çoklu ilaç dirençli 10 *A. baumannii* suşunda kolistin-imipenem, kolistin-rifampin, tigesiklin-imipenem ve tigesiklin-rifampin kombinasyonlarının etkinliği araştırıldı. Öncelikle suşların broth mikrodilüsyonla MİK değerleri incelendiğinde tüm suşlar kolistin ve tigesikline duyarlı olup MİK₅₀ değerleri sırasıyla 0.07 µg/mL ve 0.7 µg/mL olarak bulundu. Çalışmaya alınan 10 kökenin 8 'i imipeneme dirençli bulundu (Tablo-6)

Tablo-6: Suşların broth dilüsyon MİK değerleri (µg/mL) ve duyarlılık değerlendirilmesi

Suş No	KOL		TG		IMP		RF*	
	MİK		MİK		MİK		MİK	
D1	0.06	S	1	S	1	S	16	R
D2	0.03	S	0.5	S	64	R	4	R
D3	0.03	S	0.25	S	64	R	16	R
D4	0.06	S	0.5	S	16	R	2	S
D5	0.125	S	1	S	16	R	32	R
D6	0.06	S	0.5	S	16	R	2	S
D7	0.125	S	0.125	S	1	S	8	R
D8	0.06	S	1	S	32	R	2	S
D9	0.125	S	0.25	S	64	R	2	S
D10	0.06	S	0.5	S	32	R	2	S

S: duyarlı, R:dirençli, *RF duyarlı S ≤ 2, dirençli R ≥ 4 (50)

A. baumannii izolatlarının kolistin, tigesiklin, imipenem ve rifampisin E-test ve broth mikrodilüsyon yöntemleriyle elde edilen MİK sonuçları Tablo-7'de gösterilmiştir.

Tablo-7:Suşların broth dilüsyon MİK değerleri (µg/mL) ve duyarlılık değerlendirilmesi

Suş No	KOL		TG		IMP		RF	
	Broth	Etest	Broth	Etest	Broth	Etest	Broth	Etest
D1	0.06	0.125	1	0.25	1	0.125	16	32
D2	0.03	0.125	0.5	0.75	64	>32	4	4
D3	0.03	0.125	0.25	0.25	64	>32	16	32
D4	0.06	0.09	0.5	0.5	16	>32	2	3
D5	0.125	0.19	1	0.5	16	>32	32	32
D6	0.06	0.09	0.5	0.5	16	>32	2	2
D7	0.125	0.125	0.125	0.125	1	0.5	8	4
D8	0.06	0.125	1	1.5	32	>32	2	3
D9	0.125	0.38	0.25	0.19	64	>32	16	32
D10	0.06	0.125	0.5	0.5	32	>32	2	3

Değerlendirmeye alınan kombinasyonların checkerboard yöntemiyle etkinlikleri incelendiğinde en yüksek sinerji kolistinin imipenem ve rifampisin (%80) ile kombinasyonunda saptanırken, bunu %60'la tigesiklin/rifampisin kombinasyonu izlemektedir. Tigesiklin/ imipenem en düşük sinerjik (%10) etkinlik ve aynı zamanda en yüksek antagonisitik etkinin (%30) görüldüğü kombinasyondur (Tablo-8, Tablo-9).

Tablo-8: Checkerboard yöntemiyle suşların ilaç kombinasyon etkinlikleri

MDR <i>Acinetobacter baumannii</i> suşları (n=10)						
İlaç kombinasyonu	Sinerji		İndifferens		Antagonist	
	n	%	n	%	n	%
Kolistin/ imipenem	8	80	2	20	-	-
Kolistin/ rifampisin	8	80	2	20	-	-
Tigesiklin/imipenem	1	10	6	60	3	30
Tigesiklin/rifampisin	6	60	4	40	-	-

Kombinasyonların checkerboard ve E-test yöntemiyle suşlara gösterdiği etkinlik ve FİK değerleri Tablo-9' da verildi.

Tablo-9: Checkerboard ve E-test yöntemiyle MDR *Acinetobacter baumannii* suşları (n=10)'nın ilaç kombinasyon etkinlikleri

No	İlaç kombinasyonu İlaç A/ İlaç B	Broth		Etest	
		FİK	Değerlendirme	FİK	Değerlendirme
D1	Kolistin/ imipenem	0.75	İndiferens	0.43	Sinerji
	Kolistin/ rifampisin	0.43	Sinerji	0.36	Sinerji
	Tigesiklin/ imipenem	1.03	İndiferens	2.50	İndiferens
	Tigesiklin/ rifampisin	0.09	Sinerji	0.27	Sinerji
D2	Kolistin/ imipenem	0.15	Sinerji	2.0	İndiferens
	Kolistin/ rifampisin	0.43	Sinerji	0.53	İndiferens
	Tigesiklin/ imipenem	2.12	İndiferens	2.0	İndiferens
	Tigesiklin/ rifampisin	0.28	Sinerji	0.41	Sinerji
D3	Kolistin/ imipenem	0.28	Sinerji	1.5	İndiferens
	Kolistin/ rifampisin	0.43	Sinerji	2.0	İndiferens
	Tigesiklin/ imipenem	4.03	Antagonist	2.0	İndiferens
	Tigesiklin/ rifampisin	0.28	Sinerji	2.0	İndiferens
D4	Kolistin/ imipenem	0.15	Sinerji	2.0	İndiferens
	Kolistin/ rifampisin	0.43	Sinerji	0.4	Sinerji
	Tigesiklin/ imipenem	4.03	Antagonist	1.75	İndiferens
	Tigesiklin/ rifampisin	0.28	Sinerji	0.3	Sinerji
D5	Kolistin/ imipenem	0.28	Sinerji	1.6	İndiferens
	Kolistin/ rifampisin	2.0	İndiferens	2.0	İndiferens
	Tigesiklin/ imipenem	0.28	Sinerji	2.0	İndiferens
	Tigesiklin/ rifampisin	0.12	Sinerji	2.0	İndiferens
D6	Kolistin/ imipenem	0.28	Sinerji	2.0	İndiferens
	Kolistin/ rifampisin	0.43	Sinerji	0.7	İndiferens
	Tigesiklin/ imipenem	2.0	İndiferens	2.0	İndiferens
	Tigesiklin/ rifampisin	3.0	İndiferens	0.5	Sinerji
D7	Kolistin/ imipenem	0.56	İndiferens	0.75	İndiferens
	Kolistin/ rifampisin	0.43	Sinerji	0.43	Sinerji
	Tigesiklin/ imipenem	4.03	Antagonist	4.25	Antagonist
	Tigesiklin/ rifampisin	0.6	İndiferens	1.0	İndiferens
D8	Kolistin/ imipenem	0.50	Sinerji	1.75	İndiferens
	Kolistin/ rifampisin	0.43	Sinerji	0.39	Sinerji
	Tigesiklin/ imipenem	1.03	İndiferens	2.0	İndiferens
	Tigesiklin/ rifampisin	0.15	Sinerji	0.28	Sinerji
D9	Kolistin/ imipenem	0.28	Sinerji	2.0	İndiferens
	Kolistin/ rifampisin	0.43	Sinerji	0.34	Sinerji
	Tigesiklin/ imipenem	1.25	İndiferens	2.0	İndiferens
	Tigesiklin/ rifampisin	1.25	İndiferens	1.2	İndiferens
D10	Kolistin/ imipenem	0.28	Sinerji	2.0	İndiferens
	Kolistin/ rifampisin	2.0	İndiferens	4.12	Antagonist
	Tigesiklin/ imipenem	1.03	İndiferens	2.0	İndiferens
	Tigesiklin/ rifampisin	2.06	İndiferens	2.0	İndiferens

Yöntemlerin kombinasyonlar bazında tutarlılıkları incelendiğinde; kolistin/imipenem kombinasyonunda checkerboard yöntemiyle sinerjik saptanan 8 suş E-test yönteminde indifferens bulundu. İki yöntem arasındaki gözlenen en düşük tutarlılık olup %10 bulunmuştur ($K = -0.21$ $p = 0.03$) (Tablo-9 ve Tablo-10) .

Tablo- 10. Kolistin/imipenem kombinasyonu için elde edilen sonuçlar

Broth	E test		
	Sinerji	İndiferens	Antagonist
Sinerji	0.0	80.0	0.0
İndiferens	10.0	10.0	0.0
Antagonist	0.0	0.0	0.0

$K = -0.21$ $p = 0.03$, Gözlenen tutarlılık= %10

Kolistin-rifampisin kombinasyonunda checkerboard yöntemiyle sinerjik saptanan sekiz suşun E-test yöntemiyle beşi sinerjik, üçü indifferens , bulunurken gözlenen tutarlılık %60 bulunmuştur (Tablo-9, Tablo-11).

Tablo- 11. Kolistin/rifampisin kombinasyonu için elde edilen sonuçlar

Broth	E test		
	Sinerji	İndiferens	Antagonist
Sinerji	50.0	30.0	0.0
İndiferens	0.0	10.0	10.0
Antagonist	0.0	0.0	0.0

K^* , Gözlenen tutarlılık= %60

Tigesiklin-rifampisin kombinasyonunda sinerjik olan altı suşun E-test ile dördü sinerjik, ikisi indifferens saptandı Gözlenen tutarlılık %70, zayıf pozitif olarak değerlendirildi ($K = 0.40$ $p = 0.19$) (Tablo-9 ve Tablo-12).

Tablo- 12. Tigesiklin/rifampisin kombinasyonu için elde edilen sonuçlar

Broth	E test		
	Sinerji	İndiferens	Antagonist
Sinerji	40.0	20.0	0.0
İndiferens	10.0	30.0	0.0
Antagonist	0.0	0.0	0.0

$K = 0.40$ $p = 0.19$ Gözlenen tutarlılık= %70

Checkerboard yöntemiyle çalışmaya alınan suşlarda tigesiklin/imipenem kombinasyonunda indiferens bulunan altı suşun tamamı E-test yöntemi ile indiferens saptanırken, antagonizma saptanan üç suşun sadece birinde E-test ile antagonizma gözlenmiştir (Tablo-9 ve Tablo-13). İki yöntem arasındaki gözlenen tutarlılık %70 bulundu.

Tablo- 13. Tigesiklin/imipenem kombinasyonu için elde edilen sonuçlar

Broth	E test		
	Sinerji	İndiferens	Antagonist
Sinerji	0.0	10.0	0.0
İndiferens	0.0	60.0	0.0
Antagonist	0.0	20.0	10.0

K* , Gözlenen tutarlılık= %70.0

K*: Tamı testlerinin alt etkinlik kategorileri birebir eşleşmediğinden kappa değeri hesaplanamamıştır.

K değerlerinin yorumu:

(-0.3) (+0.3) tutarsız

+0.3) (+0.5) zayıf pozitif yönde

+0.5 (+0.7) orta pozitif

0.7 üstü güçlü pozitif

Ki kare testinin gözlerde (kombinasyonların etkinlikleri) beklenen değerlerle ilgili varsayımı yerine getirilemediğinden kombinasyonlara göre broth değerlerinin yüzdesi karşılaştırılamamıştır. Bu nedenle kolistin ve tigesiklin kombinasyonları birleştirilerek analiz yapılmıştır. Kolistin ve tigesiklinin kombinasyonlarının (imipenem ve rifampisinle) birleşik etkinlikleri karşılaştırıldığında kolistin kombinasyon etkinliği tigesikline göre iki katı sinerjik bulunmuştur ($p \leq 0.05$) (Tablo-14).

Tablo-14. Kolistin ve tigesiklinin kombinasyon etkinliği

Kombinasyon	Checkerboard							
	Sinerji		İnd		Antagonist		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Kol+kombi	16	80	4	20	0	0	20	100
Tig+kombi	7	35	10	50	3	15	20	100
Total	23	57.5	14	35	3	7.5	40	100

TARTIŞMA

A. baumannii son 15 yıldır önemli nozokomiyal patojenler olarak sıklıkla izole edilmektedir. *Acinetobacter* türleri sağlıklı erişkinlerin %20'sinde deride kolonize olan fırsatçı patojenler olup hastane personellerinin de derilerinden en sık izole edilen gram-negatif mikro-organizmalardır. Bakteri hastadan hastaya geçebilmektedir (51). Yoğun bakım ünitelerinde personelin derisine kolonize olmalarının yanı sıra mekanik aletlerin yüzeylerinden de izole edilmekte ve özellikle bu birimlerde yatan hastaların uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi almaları bu birimlerden sıklıkla dirençli suşların izole edilmelerine neden olmaktadır (52). Mortalitesi yüksek infeksiyonlara neden olan *A. baumannii*'nin kullanılan birçok antibiyotiğe dirençli olması oldukça ciddi bir sorundur (53).

Acinetobacter suşlarının izole edildiği örneklerin dağılımı çeşitli çalışmalarda farklılıklar göstermektedir. Çolpan ve ark. (54)'nin Ankara'da yaptıkları çalışmada örneklerin % 36.1'i aspirat, % 25'i kan, % 22.2'si idrar, % 8.3'ü dekübitis yara yeri, % 8.3'ü ise cerrahi yara; İstanbul'da Aygün ve ark.(55)'nin çalışmasında 50 örnekten 38'i solunum sistemi materyali, 10'u kan, ikisi yara materyali; Düzce'de Yavuz ve ark.(56)'nin çalışmasında örneklerin % 27'si trakeal aspirat, % 21'i idrar, % 16'sı balgam, % 13'ü yara yeri materyali, % 8'i kan olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 50 örneğin 39'u (%78) kandan, altısı (%12) solunum örneklerinden, beşi (%10) ise çeşitli klinik örneklerden izole edilmiştir.

Gaziantep Tıp Fakültesinde yapılan bir çalışmada ise izole edilen 200 örneğin, 110'u (%55) yoğun bakım ünitelerinden, yedisi (%3.5) genel cerrahi servisinden, 10'u (%5) kalp ve damar cerrahisi, 12'si (%6) anestezi ve reanimasyon, altısı (%3) ortopedi ve travmatoloji, sekizi (%4) göğüs cerrahisi, üçü (%1.5) göğüs hastalıkları, beşi (%2.5) infeksiyon hastalıkları, 15'i (%7.5) pediatri, 14'ü (%7) beyin cerrahisi ve 10'u (%5) diğer servislerde yatmakta olan hastalardan izole edilmişlerdir (57).

Acinetobacter kökenlerinin, yoğun bakım, anestezi ve reanimasyon ile diğer cerrahi kliniklerde daha sık hastane infeksiyonu etkeni olarak karşımıza

çıkmasının nedeni, bu kliniklerde kritik hastaların olması ve bu hastalara uygulanan mekanik ventilasyon, trakeostomi, entübasyon, damar içi kateterizasyon ve üriner kateter gibi invaziv girişimlerin daha sık olması ile ilişkilendirilmiştir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çoğul ilaç dirençli suşların izole edilmeye başlaması ve direncin giderek artması, *A. baumannii* infeksiyonu şüphesi ile yatan hastalarda klinisyenlerin ampirik tedavi seçeneklerini giderek azaltmaktadır (56, 58).

Yüksek direnç oranlarına rağmen, halen geniş spektrumlu penisilinler, 3. kuşak sefalosporinler, karbapenemler veya bu grup antimikrobiyallerin bir aminoglikozid veya kinolon grubu antibiyotik ile kombinasyonu *A. baumannii* infeksiyonlarında en sık kullanılan tedavi rejimleridir (59, 60, 61). Karbapenemler tüm beta-laktam antibiyotikler içinde antibakteriyel etkisi en geniş spektrumlu olan antibiyotiklerdir (62). Karbapenemler bugün için *A. baumannii*'nin sebep olduğu ciddi infeksiyonların tedavisinde altın standart gibi gözükmekle birlikte, *Acinetobacter* türlerinde dünyada giderek artan karbapenem direnci bildirilmektedir. Karbapenem dirençli *A. baumannii* ilk olarak 1991 yılında rapor edilmiştir (63). Ülkemizdeki imipenem direnci coğrafik bölgelere göre farklılık göstermekte ve %8 ile %70 arasında değişmektedir (64).

Ülkemizin de içinde bulunduğu 11 Avrupa ülkesinde, 30 merkezde yapılan 1997-2000 Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) programında imipenem ve meropenem en etkili antibiyotik olarak bildirilmiş, ancak sulbaktam/ampisilin ve kolistin bu programda test edilmemiştir. Çeşitli ülkelerde farklı direnç varyasyonları rapor edilmiştir. Çalışmaya katılan 11 ülke (Belçika, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Almanya, İtalya, Polonya, Rusya, İsveç, İsviçre, Türkiye ve Büyük Britanya) arasında Türkiye, hemen hemen test edilen tüm antibiyotiklere en yüksek direnci göstermiştir, Türkiye'yi İtalya ve Büyük Britanya izlemiştir (65). Daha yakın zamanda, 2006 yılında, 12 ülke ve 40 merkezde yapılan MYSTIC programında ise imipenem (%42.5) ve meropenem (%43.4) direncinde hatırı sayılır bir artış olduğunu açıklamışlardır (65).

. Eraksoy ve arkadaşları (66) tarafından 2007 yılında yayımlanan MYSTIC sürveyans çalışmasının Türkiye sonuçlarına göre, *Acinetobacter* spp. üzerine en yüksek etkinliğe sahip antibiyotiklerin, karbapenemler olduğu gözlenmiştir. Avrupa genelinde yapılan 2007 MYSTIC çalışmasında ise *Acinetobacter* spp. türlerindeki direnç oranlarında, 2006 yılının verilerine göre azalma olduğu bildirilmiştir. Bunun sebebi olarak, 2007 yılındaki bu çalışmaya, Türkiye ve Yunanistan'ın katılmaması gösterilmektedir (67).

Altı farklı merkezde yürütülen Hitit çalışmasında ise kan, steril vücut sıvıları, idrar, solunum yollarından izole edilen *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının geniş spektrumlu beta-laktamlara duyarlılık oranları incelenmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre karbapenemler *Enterobacteriaceae* üyelerinde etkinliklerini korurken, suşların izole edildiği hastane birimine göre değişmekle birlikte *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında direnç oranlarının % 40'a ulaştığı görülmektedir (64).

Bizim çalışmamızda ise 50 *A.baumannii*'ni suşunun 35'i (%70) imipeneme, 36'sı (%72) meropeneme dirençli bulundu. Daha önce hastanemizde yapılmış bir çalışmada ise Gazi ve ark'ları imipenem ve meropeneme sırasıyla %62.2 ve %55.9 duyarlılık bildirmişlerdir. Bizim sonucumuzla karşılaştırdığımızda hastanemizde *A.baumannii*'nin karbapenemlere karşı direnç oranının arttığını söyleyebiliriz (68).

Çalışmamızda incelenen *A. baumannii* kökenlerinin disk difüzyon yöntemiyle yapılan antibiyogram sonuçlarına göre seftriaksona %88, seftazidime ve trimetoprim/sulfametaksazol'e %86, piperasilin/tazobaktam'a %82, tetrasiklin'e %76, siprofloksasin'e %76, amikasin ve tobramisine %74 direnç saptandı. En düşük direnç %42 ile sefaperazon/sulbaktam ve %38 ile netilmisinde izlendi.

Çetin ve arkadaşlarının (69) 2005-2006 verilerini yansıttığı 129 *A. baumannii* izolatu üzerinde yaptıkları çalışmada, tobramisine %94,6, netilmisine %86,8, imipeneme %66,7, amikasin %51,2, meropeneme %50,4 ve seftazidime %14,7 oranında duyarlılık saptamışlardır.

İzmir'de Arda ve arkadaşları (70) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *A.baumannii* suşlarında antibiyotik direnç oranlarını 1995 ve 1999 yıllarında

imipenem için %6 ve %63, seftazidim için %61 ve %93, piperasilin/tazobaktam için % 78 ve % 100, siprofloksasin için % 44 ve % 97, gentamisin için %33 ve %87, amikasin için %22 ve %83 olarak bildirmişlerdir.

Çoğul dirençli *A. baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde hem başarıyı sağlamak hem de direnç gelişimini önlemek amacıyla kombine antibiyotik kullanımı önerilmektedir (71).

Biz de bu çalışmamızda hastanemiz izolatlarında çeşitli antibiyotiklerin *in-vitro* kombinasyon etkinliğini araştırmayı planladık. Bu amaçla 50 *A. baumannii* suşundan direnç profilleri farklı olan 10 suşta, kolistin/ rifampisin, kolistin/imipenem, tigesiklin/rifampisin, tigesiklin/imipenem kombinasyonlarının etkinliğini checkerboard ve E-test yöntemleriyle araştırıldı ve yöntemlerin birbiriyle tutarlılıkları karşılaştırıldı. Suşların öncelikle broth mikrodilüsyon ve E-test yöntemiyle MİK değerleri saptandı. MİK değerleri incelendiğinde tüm suşlar kolistin ve tigesikline duyarlı iken sekiz suş (%80) imipeneme dirençli saptandı. Değerlendirmeler checkerboard yöntemini referans olarak yapıldı.

Kolistin/ rifampisin kombinasyonu 10 suşun 8 (%80) 'i sinerji, ikisi (%20) indifferens bulundu. Checkerboard yöntemiyle G. M. Hogg ve ark'ları (24) 13 izolatla yaptıkları çalışmada 11'inde sinerji, ikisinde indifferens saptarken, ülkemizden Timurkaynak F ve ark'larının (72) 25 izolatla yaptıkları çalışmada ise tüm suşlarda (%100) sinerji saptamışlardır.

Giamarellos EJ ve ark'larının (73) 2001 yılında 39 suşta time-kill yöntemiyle yaptıkları çalışmada kolistin/ rifampisin kombinasyonu 24. saatte 1x MIC olarak %51.3, 4x MIC olarak %66.7 sinerji bulmuşlardır. Tripodi ve ark'ları (74) ise 2007 yılında dokuz izolatta time-kill yöntemiyle yaptıkları çalışmada kolistin/ rifampisin kombinasyonunda %100 sinerji saptamışlardır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise 25 farklı hastadan izole edilen *A.baumannii* izolatında E- test yöntemiyle kolistin/rifampisin kombinasyonunu % 60 oranında sinerji saptanmıştır (75).

Tüm bu çalışmalar dikkate alındığında çalışmamızdaki sonuçların bildirilen sonuçlarla uyumlu bulunduğu ve kolistin/rifampisin kombinasyonunun etkin bir kombinasyon olduğu düşünüldü.

Checkerboard yöntemiyle uyguladığımız kolistin/imipenem kombinasyonunu sekiz suşta (% 80) sinerjik, iki suşta (%20) indifferens saptandı. Tayland 'da 2010 yılında Pongpech ve ark' ları tarafından 30 izolatta checkerboard yöntemiyle yaptıkları çalışmada kolistin/imipenem kombinasyonunu % 100 sinerjik saptamışlardır (76).

Haddad ve arkadaşları ise 1999 ile 2003 yılları arasında New York metropolitan bölgesindeki 10 farklı hastadan izole edilen ve rutin tüm antibiyotiklere dirençli 10 *A.baumannii* izolatıyla yaptıkları çalışmada, E- test yöntemiyle uyguladıkları kolistin/imipenem kombinasyonunu % 50 oranında sinerji saptamışlardır (77).

Tüm bu çalışmalarda ve özellikle bizim çalışmamızda imipenem dirençli suşlarda dahil olmak üzere saptanan yüksek sinerji oranları kolistin/imipenem kombinasyonunda etkin bir kombinasyon olduğu düşünüldü.

Checkerboard yöntemiyle uyguladığımız tigesiklin/rifampisin kombinasyonu altı suşta (%60) sinerjik, dört suşta (%40) indifferens saptandı. Petersen ve ark 'ları tarafından 2005 yılında dokuz suşta checkerboard yöntemiyle yaptıkları çalışmada tigesiklin/rifampisin kombinasyonunu bir suşta sinerjik saptamışlardır (78). Dizbay ve ark'ları (75) ise E- test yöntemiyle tigesiklin/rifampisin kombinasyonunda % 12 oranında sinerji saptamışlardır. Bizim izolatlarımızda bu kombinasyonda diğer çalışmalara göre daha yüksek sinerjik etkinlik olduğu görüldü.

Tigesiklin/imipenem kombinasyonunda ise bir suşta (% 10) sinerji , altı suşta (%60) indifferens ve üç suşta (%30) antagonist etkinlik saptandı. Principe ve ark 'ları (79) tarafından 2009 yılında 22 izolatta checkerboard yöntemiyle yaptıkları çalışmada tigesiklin/imipenem kombinasyonu için %8.3 sinerji saptamışlardır.

Bu sonuçlar dikkate alındığında tigesiklin/imipenem kombinasyonunun tedavide etkin bir seçenek olmayacağı düşünüldü. Buna karşın kolistin/imipenem kombinasyonu özellikle karbapenem dirençli suşlarda yüksek sinerji oranları ile etkin bir kombinasyon olarak görülmektedir.

Kolistin/rifampisin, kolistin/ imipenem, tigesiklin/ rifampisin, tigesiklin/imipenem kombinasyonlarının E-test yöntemiyle etkinlikleri araştırılıp, iki yöntemin her bir kombinasyonda birbiriyle tutarlılığı araştırıldı.

Kolistin/rifampisin kombinasyonunu E-test ile çalıştığımızda beş suшта (%50) sinerji, dört suшта (%40) indifferens, bir suшта (%10) antagonist etki saptandı. E-test ile saptanan beş sinerjik etkileşim checkerboard ile saptanan sinerjik suşlarla aynı suşlardı. Checkerboard' da indifferens çıkan bir suş ise E-test ile antagonist bulundu. Checkerboard' da saptanan 3 sinerjik etkileşim E-test' de indifferens bulundu. Bu kombinasyon da gözlenen tutarlılık %60 bulundu.

Kolistin/ imipenem kombinasyonunu E-test ile çalıştığımızda bir suшта sinerji (%10), dokuz suшта (%90) indeferens etki saptandı. E-test ile saptanan bir sinerjik etkileşim checkerboard'da indeferens saptandı. Checkerboard'da saptanan sekiz sinerjik etkileşimin tümü E-test' de indifferens bulundu. İki yöntem arasındaki en düşük tutarlılık %10' ile bu kombinasyonda bulundu. (K=-0.21 p=0.03).

Tigesiklin/rifampisin kombinasyonunu E-test ile çalıştığımızda beş suшта sinerji (%50), beş suшта (%50) indeferens etki saptandı. E- test ile saptanan beş sinerjik etkileşimden dördü checkerboard da saptanan sinerjik suşlarla aynıydı. Sadece bir suş E-test de sinerji saptanmasına rağmen checkerboardda indeferens bulundu. E-test ile saptanan beş indeferens etkileşimden üçü checkerboard da saptanan indeferens suşlarla aynıydı. Bu kombinasyon da gözlenen tutarlılık %70 olup, zayıf pozitif olarak değerlendirildi (K= 0.4 p=0.19).

Tigesiklin/imipenem kombinasyonu E-test ile çalıştığımızda, dokuz suшта (%90) indeferens, bir suшта (%10) antagonist etki saptandı. Checkerboard ile saptanan üç antagonist etkileşimden E-test'de biri antagonist diğer ikisi indeferens bulundu. Checkerboard ile saptanan bir

sinerjik etkileşim E- test 'de indeferens saptandı ve gözlenen tutarlılık %70 bulundu

Kombinasyonların E-test yöntemiyle saptanan etkinliklerinin Checkerboard yöntemiyle tutarlılıkları karşılaştırıldığında; tutarlılık %52.5 (%10-70) olarak bulundu. Araştırdığımız kombinasyonlarda E-test ve checkerboard yöntemlerinin birbiriyle tutarlılıklarının karşılaştırıldığı benzer çalışmalar literatürde bulunamadı. Bonapace CR ve ark'ları (60) time–kill, E-test ve checkerboard yöntemlerinin birbiriyle tutarlılıklarını 10 *A. baumannii* izolatında trovafloksasin veya tobramisin, sefepim veya piperasilin kombinasyonlarında karşılaştırmışlardır. Time kill ve E-test arasındaki uyum %72, time-kill ve checkerboard arasındaki uyumu %51 bulmuşlardır.

Grzybowska W, ve ark'larının (80) 2005 yılında çeşitli antibiyotik kombinasyonlarıyla yaptıkları çalışmada E-test ve checkerboard sonuçlarını % 55 uyumlu bulmuşlardır.

Sonuç olarak MDR *A.baumannii* suşları hastanelerde önemli bir sorundur ve tedavi seçenekleri sınırlıdır. Çalışmamızda izolatların kolistin/ imipenem ve kolistin/rifampisin kombinasyonları için elde edilen yüksek sinerji oranları nedeniyle bu kombinasyonların karbapenem dirençli MDR *A. baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde iyi bir seçim olabileceğini düşünüldü. Ülkemizde kolistin henüz kullanıma girmediği için tigesiklin/ rifampisin kombinasyonun çoklu ilaç dirençli *A.baumannii* suşlarının infeksiyonlarının tedavisinde alternatif bir seçenek olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Kolistin ve tigesiklin için *in-vitro* deneyimlerin kısıtlı olması nedeniyle daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. *A. baumannii* izolatlarının birçok antibiyotiğe yüksek oranda dirençli olması nedeniyle, kritik durumdaki hastalara başlanacak ampirik antibiyotik seçimlerinde sürveyans sonuçları dikkate alınmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148-165.
2. Roberts S.A., Findlay R., Lang S.D.R. Investigation of an outbreak of multi-drugresistant Acinetobacter baumannii in an intensive care burns unit. Journal of Hospital Infection 2001; 48: 228-232
3. Chastre J. Infections due to Acinetobacter baumannii in the ICU. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2003; 24:number 1: 69-77
4. Moody J. Susceptibility tests to evaluate synergism. In: Isenberg HD, editor. Clinical microbiology procedures handbook. Washington, DC: ASM Press; 2004. pp. 5.12.1– 23.
5. 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- 9.
6. Schreckenberger PC, Graevenitz A. Acinetobacter, Achromobacter, Alcaligenes, Moraxella, Methylobacterium and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds). Manual of Clinical Microbiology. 7 th ed. Washington DC: ASM press, 1999: 539-560.
7. Muñoz-Price L, Weinstein R. Acinetobacter Infection. N Engl J Med. 2008;358:1271-81

8. Bilgin Y. *Escherichiae coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Staphylococcus aureus* Suşlarında Çeşitli Aminoglikozidlerin Duyarlılıklarının Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Haseki Araştırma Hastanesi. İstanbul. 2006. s.22.
9. Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2008; 2195-2201
10. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th (International) Ed. Baltimore: Williams and Wilkins 1994: 129.
11. Buxton A.E., Anderson R.L., Werdegar D., Atlas E. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*: epidemiologic characteristics. *Am J Med* 1978; 65:507-513
12. Goel KV, Kapil A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane Proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiol* 2001; 1: 16- 23.
13. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, ed(s). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2000; 5th ed. 2339- 2344
14. Hartzel DJ, Kim SA, Kortepeter MG, Moran KA. *Acinetobacter* Pneumonia: A Review. *Med Gen Med*. 2007;9(3):4-11.
15. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical, and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* 2003; 54: 39–45.

16. D'Agata E.M.C., Thayer V., Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2000; 21: 588-591
17. Akalın H, Özakın C, Kahveci F, Sütçü Ş, Helvacı S, Gedikoğlu S ve ark. Hastane kökenli pnömoniler. *Flora* 1999;4(4): 253-7
18. Taşova Y, AkgünY, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar İH.Nozokomiyal *Acinetobacter* İnfeksiyonları *Flora* 1999;4:170-6
19. Başustaoğlu A, Özyurt M. Nozokomiyal Patojen Olarak *Acinetobacter*'lerin Mikrobiyolojik, Klinik ve Epidemiyolojik Özellikleri. *Hastane İnfeks Derg* 1998;2:2:88-93
20. Ferrara M. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 183-95
- 21 Yaman A , Taşova Y, Kibar F, Inal AS, Saltoglu N, Buyukcelik O et al. Investigation of the antibiotic susceptibility patterns of pathogens causing nosocomial infections. *Saudi Med J* 2004; 25: 1403-9
22. Saballs M, Pujol M, Tubau F, Pena C, Montero A, Dominguez MA et al. Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 697-700.
23. Sader HS, Rhomberg PR, Jones RN. In vitro activity of betalactam antimicrobial agents in combination with aztreonam tested against metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Chemother* 2005; 17: 622-7

24. Akalın H. Çoğul Dirençli Gram Negatif Bakteriler. İn. Doğanay M, Ünal S.Hastane İnfeksiyonları. Ankara: Bilim TıpYayınevi 2003:269-289)
25. 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
26. Erben N, Kiremitçi A, Özgüneş İ. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter* Türlerinde Genişletilmiş Spektrumlu Beta-laktamaz ve İndüklenebilir Beta-laktamaz Sıklığının ve Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirmesi. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2006;28(3):135-146
27. Seifert H, Baginski R, Schulze A, et al. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:750–753
28. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J: Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: Citywide 84 prevalence, inter-institutional spread and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* 2000;31:101–6.
29. Jiemenez-Mejias ME, Pichardo-Guerrero C, Marquez-Rivas FJ, et al. Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:212–214
30. Meriç M., Wilke A., Çağlayan Ç., Toker K. intensive care unit-acquired infections: incidence, risk factors and associated mortality in a Turkish University Hospital. *Jpn. J. Infect. Dis*. 2005; 58: 297-302

31. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32:106–119
32. Chambers HF, Neu HC. Other b-lactam antibiotics, p:264-272. In Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (ed), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone,.
33. Peleg AY, Adams J, Peterson DL. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2065-2069
34. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran 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
35. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:565-574
36. Lolans K, Rice TW, Munoz-Price SL, Quinn JP. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:2941-2945.
37. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:223-232

38. Dökmeci İ. Kenoterapötik ilaçlar. Farmakoloji ilaç uygulamalarında temel kavramlar İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri;1992 s.705-786
39. Perez F, Hujer AM, Hujer MK, Decker KB, Rather NP, Bonomo AR. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(10):3471-3484
40. Looveren VM, Goossens H, the ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:684–704
41. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram Negative Bacterial Infections. *Clin Infec Dis.* 2005;40:1333–41
42. Pullukçu H, Ulusoy S. Tigesiklin. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi.* 2008;13;ek 3.
43. Çalık N, Akova M. Tigesiklin. *Ankem Dergisi.* 2007;21(Ek 2):29-33.
44. Ulusoy S. Tigesiklin. *Ankem Dergisi.* 2006;20(Ek 2):117-119.
45. Şener B. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvar eğitim kitabı Hacettepe Üniversitesi yayınları 2003 s 212-217
46. Gülay Z. Antibiyotik kombinasyonlarının İn-Vitro Etkinliğini Ölçen Testler Antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyon toplantısı kongre kitabı 1997 s: 85-100
47. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Antimikrobik Disk Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Onaylanmış Standart M2-A9 ve M7-A7

48. NCCLS Aerop Üreyen bakteriler için dilüsyon yöntemi ile antimikrobik duyarlılık testleri; onaylanmış standart - altıncı baskı 2003 s 1-17
49. Roger L.White, Comparison of Three Different In Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test Antimicrobial Agents and Chemoterapy , Aug. 1996, p. 1914–1918,
50. C.J. Henwood, T. Gatward, M. Warner, D. James, M.W. Stockdale, R.P. Spence, K.J. Towner, D.M. Livermore and N. Woodford, Antibiotic resistance among clinical isolates of Acinetobacter in the UK, and in vitro evaluation of tigecycline (GAR-936), J. Antimicrob. Chemother. 49 (2002), pp. 479–487.
51. Saltoğlu N. Acinetobacter baumannii infeksiyonları ve tedavisi. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 14-18 Mart 2007, Antalya kitabında. İstanbul: KLİMİK Derneği, 2007: 204-7.
52. Mulin B, Talon D, Viel JF, et al. Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant Acinetobacter baumannii. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14: 569-76
53. Pachon Ibanez ME, Jimenez Mejias ME, Pichardo C, Llanos AC, Pachon J. Activity of tigecycline (GAR-936) against Acinetobacter baumannii strains, including those resistant to imipenem. Antimicrob Agent Chemother 2004; 48: 4479-81
54. Çolpan A, Güngör Ş, Baykam N, Dokuzoğuz B: Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Acinetobacter suşlarının antibiyotik direnç durumlarının karşılaştırılması İnfeksiyon Dergisi 2002;16(1):55-8.

55. Aygün G, Dikmen Y, Mete B ve ark: Yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları, ANKEM Derg 2002;16(1):85-8
56. Yavuz MT, Şahin İ, Behçet M, Öztürk E, Kaya D: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, ANKEM Dergisi 2006;20(2):107-10.
57. . Çoğul Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Tigesiklin, Kolistin ve Polimiksin Direncinin Saptanmasında Disk Difüzyon, E Test ve Broth Mikrodilüsyon Yöntemlerinin Karşılaştırması Uzmanlık Tezi Dr. Fatma Ebru ÖZGÜR AKIN
58. Çetin ES, Kaya S, Tetik T, Arıdoğan BC. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının örneklere göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2006; 20: 202-5
59. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Tocalli L, Gismondo MR. In vitro selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with beta-lactams and amikacin. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 353-9.
60. Bonapece CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic sinerji against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill and checkerboard methods. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 38: 43-50.
61. Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Clin Infect Dis 2006; 43: 95-99

62. Yu Y, Yang Q, Xu XW, Kong HS, Xu GY, Zhong BY. Typing and characterization of carbapenem resistant *Acinetobacter calcoaceticus*–*baumannii* complex in a Chinese hospital. *J Med Microbiol* 2004;53:653–656.
63. Akıncı E, Mumcuoğlu İ, Öngörü P, Bayazıt FN, Ersoy S, Erbay A, et al. In Vitro Activity of Tigecycline Against *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated From Nosocomial Infections. *Turk J Med Sci*. 2008;38(6):583-586.
64. Gülay Z. Gram Negatif Çomaklarda Antibiyotik Direnci: 2003-2004 Türkiye Haritası. *Ankem Dergisi*. 2005;19(Ek 2):66-77
65. . Souli M, Galani I, Giamarellou H . Emergence of extensively drug - resistant and pan drug - resistant Gram - negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance*. 2008;13:47
66. Eraksoy H, Basustaoglu A, Korten V, et al. Susceptibility of bacterial isolates from Turkey-a report from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC). *Program. J Chemother*. 2007;19(6):650-7
67. Turner PJ. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;63(2):217-22
68. Gazi H, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, İnmez E, Dinç G, Özbakkaloğlu B. Yoğun Bakım Ünitesi ve Diğer Ünitelerde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında İn-Vitro Antibiyotik Direnci *Ankem Dergisi*. 2005;19(3):115-118
69. Çetin Sesli E, Kaya S, Tetik T, Arıdoğan Cicioğlu B. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Örneklere Göre Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2006;20:202-205

70. Arda B, Yamazhan T, Ulusoy S, Özinel MA. Yoğun bakım ünitelerinden izoleedilen *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinin antibiyotik duyarlılığındaki dört yıllık değişim (1995 ve 1999). *Hastane infeksiyon Derg.* 2001;5(1):49–53

71. Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PM, 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- 5

72. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units *Int J Antimicrob Agents.* 2006 Mar;27(3):224-8

73. Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H. Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001 Jul;40(3):117-20

74. Tripodi MF, Emanuele Durante-Mangoni, 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 Dec;30(6):537-40

75. Dizbay M, Tozlu DK, Özdemir K, Arman D, *Acinetobacter Baumannii* İzolatlarında Tigesiklin ve Kolistin Kombinasyonunun İn-Vitro Sinerjik Aktivitesi *ANKEM Derg* 2009;23(Ek 1)

76. Pongpech P PhD, Amornopparattanakul S MSc, Panapakdee S MSc, Fungwithaya S MSc, Nannha P MSc, Dhiraputra C MD, Leelarasamee A MD
Antibacterial Activity of Carbapenem-Based Combinations Against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* *J Med Assoc Thai* 2010; 93 (2): 161-71
77. Haddad FA, Horn KV, Carbonaro C, Rosenfeld MA, Wormser GP.
Evaluation of antibiotic combinations against multidrug - resistant *Acinetobacter baumannii* using the E-test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24: 577-579
78. Peter J. Petersen, Ponpen Labthavikul, C. Hal Jones and Patricia A
In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis *Bradford Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2006) 57, 573–576
79. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Nicola Petrosillo and Paolo Visca
In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2009, 8:18
80. Grzybowska W, Banaszczyk-Ruś M, Tyski S. [Comparison of the checkerboard and E-test methods used for the analysis of two antibiotics combination] *Med Dosw Mikrobiol.* 2005;57(1):65-75.