

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ



**KARBAPENEM DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* İLE  
FARELERDE OLUŞTURULAN DENEYSEL SEPSİSDE TEDAVİ  
SEÇENEKLERİ**

**Proje No: TSA-11-3649**

NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**

Emine ALP MEŞE

Tıp Fakültesi/Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

Gökçen DİNÇ

Tıp Fakültesi/Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Hayati DEMİRASLAN

Tıp Fakültesi/Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

Mehmet DOĞANAY

Tıp Fakültesi/Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

Ferhan ELMALI

Biyoistatistik Ve Tıbbi Bilişimi AD.

Haziran 20103

KAYSERİ



## TEŞEKKÜR

Laboratuvar hayvanlarıyla çalıőmalarımızı destekleyen Sayın Profesör Dr. Fahrettin Keleştemur'a, çalışma süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) yönetimi ve personeline, projenin (TSA-11-3649) gerçekleşmesinde maddi olarak destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BAP) ve çalışmada kullanılan karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* suşunu bize gönderme inceliğinde bulunan Sayın Doçent Dr. Zerrin Aktaş'a teşekkür ediyoruz.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM	7
2. GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	11
4. BULGULAR	13
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	13
6. KAYNAKLAR	16
7. EKLER	19

## ÖZET

Son yıllarda dünya genelinde karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* suşları nedeniyle oluşan hastane enfeksiyonları artmaktadır. Karbapenemlere dirençli mikroorganizmalara karşı tedavi seçenekleri kısıtlıdır ve bu tedavilerde kullanılan etken maddelerin etkinlik durumlarına dair yeterli *in vivo* çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatu ile farelerde deneysel sepsis oluşturularak imipenem silastatin, sulbaktam, kolistin, tigesiklin ve bu antibiyotiklerin farklı kombinasyonları ile tedavi seçeneklerinin uygulanarak karşılaştırılması ve en etkin tedavi seçeneğinin belirlenmesi amaçlandı. Balb-c farelerde (8-10 haftalık), karbapeneme dirençli *A. baumannii* (OXA-51, OXA-58, PER-1 pozitif) 0.5 ml 10<sup>8</sup> cfu/ml dozda intraperitoneal (*ip*) yoldan verilerek deneysel sepsis oluşturuldu. Fareler negatif kontrol, pozitif kontrol ve tedavi grubu olarak ayrıldı. Tedavi grubu; imipenem silastatin, kolistin, tigesiklin, sulbaktam, imipenem silastatin+sulbaktam, kolistin+sulbaktam, tigesiklin+sulbaktam olmak üzere alt gruplara ayrıldı. Tedavi alt gruplarında *ip* bakteri süspansiyonu verildikten 2 saat sonra *ip* antibiyotik başlandı. Her alt gruptaki fareler eşit sayıda olmak üzere 24, 48 ve 72 saatlik gözlem sonunda kurban edildiler ve kalp, akciğer, karaciğer, dalaktan ekim yapıldı. Ayrıca akciğer ve karaciğerden alınan doku örneklerinde bakteri yükü cfu/gr olarak hesaplandı. Karbapeneme dirençli *A. baumannii* ile farelerde oluşturulan deneysel sepsiste kolistin ve sulbaktamın tek başına kullanıldığında 48. saatten itibaren akciğer ve karaciğerden bakteriyel yükü eradike etmeye başladığı, 72. saatte tamamen eradike ettiği belirlendi. Sulbaktamın, imipenem ile kombine edilmesi imipenemin etkinliğini artırdığı fakat sulbaktamın, tigesiklin veya kolistinle kombine edilmesinin bu antibiyotiklerin *in vivo* etkinliğini artırmadığı gözlemlendi.

Anahtar sözcükler: *A. baumannii*, antibiyotik tedavisi, deneysel enfeksiyon, sepsis

## ABSTRACT

In recent years, nosocomial infections caused by carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* is increasing in all around the world. Therapeutic options for carbapenem resistant strains are limited and there are no sufficient *in vivo* study about effectiveness of these therapeutic agents. In present study, we aimed that to create an experimental sepsis with carbapenem resistant *A. baumannii* in mice and to compare different treatment options with imipenem cilastatin, sulbactam, tigecycline, colistin alone and different combinations of them for determine the most effective option. Experimental sepsis was created in Balb-c mice (8-10 weeks old) with intraperitoneal (*ip*) injection of 0,5 ml  $10^8$  cfu/ml carbapenem resistant *A. baumannii* (OXA-51, OXA-58, PER-1 positive) suspension. All mice were divided into groups as negative control, positive control and treatment groups. Treatment groups were divided as imipenem cilastatin, colistin, tigecycline, sulbactam, imipenem cilastatin+sulbactam, colistin+sulbaktam, tigecycline+sulbaktam. Two hours later from *ip* injection of bacterial suspension, antibiotic treatments were started. All mouses in subgroups that are equally divided were sacrificed after 24, 48, 72 hours observation and cultures were made from heart, lung, liver and spleen. Also bacterial loads of lung and liver samples were calculated as cfu/g. In experimental sepsis with carbapenem-resistant *A. baumannii* in mice, when colistin and sulbactam were used alone, after 48 hours they started to eradicate bacterial load in lung and liver and at 72th hours they eradicated all of it. The combining of sulbactam with imipenem cilastatin increased the efficiency of imipenem cilastatin but the combining of sulbactam with tigecycline or colistin did not increase the *in vivo* efficiency of these antibiotics.

Key words: *A. baumannii*, antibiotic therapy, experimental infection, sepsis

## 1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM

*Acinetobacter* spp. hastane enfeksiyonlarına yol açan etkenler içerisinde önemli bir yer tutmaktadır. Tüm *Acinetobacter* türleri arasında en sık ve en ciddi klinik tablolara yol açan etken *A. baumannii*'dir. Sağlıklı bireylerde nadiren hastalık oluştururken özellikle invazif girişim ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının yaygın olduğu yoğun bakım ünitelerinde, immun sistemi baskılanmış hastalarda her sistem ve organda hastalık oluşturabilirler. Bunlardan bazıları alt solunum yolu, üriner sistem, santral sinir sistemi enfeksiyonları, sepsis, cerrahi yara ve yumuşak doku enfeksiyonları şeklinde sıralanabilir. Son yıllarda özellikle yoğun bakım ünitelerinde çoklu direnç gösteren *A. baumannii* nedenli hastane enfeksiyonları dünya genelinde önemli bir sorun oluşturmaktadır ve tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Birçok fırsatçı Gram negatif etkende olduğu gibi artan antibiyotik direnci, *Acinetobacter* türleri nedeniyle oluşan hastane enfeksiyonlarının tedavisini engellemektedir. *A. baumannii* antibiyotiklere en sık direnç geliştiren türdür. Yeni ilaçların uygunsuz ve aşırı kullanımı direncin ortaya çıkışına katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle söz konusu dirençli mikroorganizmalara karşı çok az tedavi seçeneği kalmıştır. Özellikle çoklu dirençli suşlarla oluşan salgınları kontrol etmek zor olmaktadır. Hastane enfeksiyonlarına neden olan bakteriler, bunların antibiyotik duyarlılıkları ve direnç profillerinin izlenmesi, hem direncin engellenmesi için önlem alınabilmesine, hem de erken ve etkili antibiyotik tedavisine olanak verebilir. Günümüzde karbapenemler tedavide tek seçenek olarak kalmaktadır; ancak son yıllarda dünya üzerinde karbapenemlere daha az duyarlı veya dirençli *A. baumannii* suşları nedeniyle oluşan hastane enfeksiyonları artmaktadır. Bu nedenle söz konusu dirençli mikroorganizmalara karşı tedavi seçenekleri kısıtlıdır ve bu tedavilerde kullanılan etken maddelerin etkinlik durumlarına dair yeterli *in vivo* çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatu ile farelerde deneysel sepsis oluşturarak sulbaktam, kolistin, tigesiklin, imipenem silastatin ve bu antibiyotiklerin farklı kombinasyonlarının etkinliğini araştırmak ve en etkin seçeneğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Balb-c fareler karbapenem dirençli *A. baumannii* suşu ile enfekte edilerek septisemi oluşturuldu. Septisemi şekillenmesini takiben imipenem silastatin, sulbaktam, kolistin, tigesiklin ve bu antibiyotiklerin farklı kombinasyonları gruplar halinde, farelere uygulandı. Tedavi süresinin sonunda farelere otopsi yapılarak kalp, akciğer, dalak ve karaciğerden örnekler alınarak ekim yapıldı. Kantitatif kültür sonuçları istatistiksel analizlerle karşılaştırıldı.

## 2. GENEL BİLGİLER

*Acinetobacter*'ler, *Moraxella* ve *Psicobacter*'ler ile birlikte *Moraxellaceae* ailesi içinde bulunan kısa, daha çok kokoid formda gram negatif çomaklardır. DNA hibridizasyon çalışmalarına göre *Acinetobacter* genusu heterojen özellik gösterir. DNA-DNA homolojisine göre şimdiye kadar 32 genomik tür saptanmıştır. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, genomik tür 3 ve 13TU arasında benzerlik vardır. Dolayısıyla birçok araştırmacı grubu tarafından *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks olarak tanımlanmıştır. *A. baumannii* hastane enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan genomik türdür. *Acinetobacter Iwoffii* ve *Acinetobacter johnsonii* de *A. baumannii*'den sonra en sık karşılaşılan türlerdir (1, 2). *Acinetobacter* türleri hastane personelinin derisinde sürekli taşınan en yaygın Gram negatif mikroorganizma olarak tanımlanmaktadır. Rezervuar insanlar ve hastane çevresindeki cansız materyeller, hastalar arasında geçiş için elverişli bir durum sağlamaktadır (3). Bakterinin hastane çevresinde uzun süre canlı kalabilmesinin nedeni kuruluğa dayanıklı olmasından kaynaklanmaktadır. Kuru ortamda 21-30 gün canlı kalabilmektedir (4). Ayrıca farklı ısı ve pH derecelerinde yaşayabilmesi de dayanıklı olmasının diğer nedenlerini oluşturmaktadır (5). *Acinetobacter* türleri çoğunlukla toprakta ve suda bulunurlar. İnsanlarda vücudun nemli bölgelerinin florasında yer alırlar. Sağlıklı kişilerin yaklaşık %25'i normal floralarında bu bakterileri taşırlar. Bazen sağlıklı kişilerin oral kavitesinde ve solunum yollarında da bulunur. Ancak yine de sağlıklı kişilerde taşıyıcılık hastanelerde yatanlara göre oldukça azdır (1). Çevresel ortamlar dikkate alındığında, *Acinetobacter* türleri hastane havası, buhar makinesi, musluk, periton diyalizat banyoları, yataklar, tansiyon aletleri, anjiyografi kateteri ve ekipmanı, solunum tedavisi solüsyonları ve mekanik ventilasyon cihazından izole edildiği bildirilmiştir (2,6). *A. baumannii*, nozokomiyal enfeksiyonlarda geniş bir spektrumda etken olarak karşımıza çıkar. Bu enfeksiyonlar; bakteriyemi, menenjitler, üriner sistem enfeksiyonları ve hastane kökenli pnömonilerdir (7). Nozokomiyal enfeksiyonlar arasında kan dolaşımı enfeksiyonları önemli bir yer tutmaktadır. Nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarında tıbbi teknoloji ve antimikrobiyal tedavideki gelişmelere rağmen ölüm oranı hala çok yüksektir. Bu konuda yapılan çalışmalara göre kaba ölüm oranı %12- 80 arasında değişmekte, ortalama olarak %35 verilmektedir. Enfeksiyon için ölüm oranı ise %27 olarak bildirilmektedir (1). Nozokomiyal bakteriyemi, hastalarda ölüm riski ile beraber, hastanede yatış süresini uzatmakta ve tedavi maliyetini de arttırmaktadır. Nozokomiyal bakteriyemi YBÜ'nde



geliştiğinde hasta 24 gün daha uzun hastanede kalmakta, ek tedavi maliyeti getirmektedir (8). Hastane enfeksiyonu etkeni olarak saptanan mikroorganizmalar arasında *S. aureus* %17.7 (82/432) ve *P. aeruginosa* %14.5 (67/432) oranıyla ilk iki sırada yer alırken *Acinetobacter* türleri %12.9 (60/432) oranıyla üçüncü sırada yer almaktadır. Tüm Gram negatif hastane enfeksiyon etkenleri içinde ise *Acinetobacter spp.* %25.8'lik (60/232) oran ile ikinci sırada yer almaktadır. Bu enfeksiyonlar ise sıklıkla hastane ekipmanının kontaminasyonu veya hastane çalışanlarının kolonize elleriyle çapraz geçiş ile ilişkili bulunmuştur (9). *Acinetobacter* türlerinde birçok antibiyotiğe karşı hızla direnç gelişmektedir. Çoklu antibiyotik direnci en sık *A. baumannii* / *calcoaceticus* kompleksi ve *A. haemolyticus*'da görülmektedir. İntrinsik veya kazanılmış direnç mekanizmaları nedeniyle bu enfeksiyonların tedavisi oldukça güçleşmiştir (10). Üçüncü kuşak sefalosporinler, aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının artmasıyla *Acinetobacter* türleri antibiyotiklere dirençli hale gelmiştir. *A. baumannii* en dirençli türdür. *A. iwoffii*, *A. johnsonii* ve *A. junii* gibi türler genellikle daha duyarlıdır. Karbapenemler *Acinetobacter* türlerine en etkili antibiyotikler olarak görülmekle birlikte, direnç oranları giderek artmaktadır. Üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımının dirençli suşların ortaya çıkmasında rol oynadığı gösterilmiştir (11). Betalaktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde beta-laktamaz yapımı, penisilin bağlayıcı proteinlerde değişiklik veya dış membran proteinleri içinden hücre içine girişte azalma söz konusudur. Dirençli bakteriler genellikle penisilinleri etkileyen TEM -1, TEM -2 ve CARB -5 gibi betaaktamazlara sahiptir. Sefalosporinleri etkileyen 4 farklı *Acinetobacter* kromozomal enzimi (ACE 1 -4) beta laktamlara direnç gelişiminde önemli rol oynamaktadır (12). Dünyada *Acinetobacter* türleri arasında genişlemiş spektrumlu betalaktamazlara (GSBL) bağlı direnç çok az bildirilmektedir. Ülkemizde ise hastane kökenli izolatların %40'ında PER -1 (GSBL) türü direnç bulunmaktadır. Bunun önemi ise, bu tür izolatların ampisilin ve sefoperazonun sulbaktam kombinasyonlarına dirençli hale gelmesidir (13). Aminoglikozidlere direnç gelişiminden temel olarak enzimatik modifikasyon sorumludur. GyrA ve parC genlerindeki mutasyonlar ise kinolonlara karşı direnç gelişiminde en önemli mekanizmalardır. Karbapenemlere etkili olan enzimler ise ARI -1 (*Acinetobacter* resistant imipenem) ve ARI -2 enzimleridir. Karbapenemleri inaktive eden bir metallo-beta laktamaz enzimi varlığı da gösterilmiştir (12).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen 224 *A. baumannii* suşunun antibiyotiklere direnci incelenmiştir. Suşlarda kolistine direnç saptanmamış, amikasine % 59, tetrasikline % 67, imipenem, sefoperazon-sulbaktam ve siprofloksasine % 75, gentamisine % 79, seftazidime % 80, piperasilin-tazobaktama % 81, sefepime % 86 ve sefotaksime % 96 oranında direnç saptanmıştır. Kolistin ve amikasinin diğer antibiyotiklere göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (13). Mansur ve ark. (14) 2008 yılında hastanede yatan hastalardan 147 adet *Acinetobacter* suşu izole etmişler ve yaptıkları *in vitro* duyarlılık çalışmasında izole edilen suşların en duyarlı oldukları antibiyotikleri sırasıyla tigesiklin, kolistin, imipenem ve meropenem olarak belirlemişlerdir. Antibiyotiklere direnç oranlarının yüksekliği ile tigesiklin ve kolistin bu dirençli suşlardaki etkinliğinin de dikkat çekici olduğunu bildirmişlerdir. Özdemir ve ark. (15) hastane enfeksiyonu tanısı alan hastalardan 217 *Acinetobacter* suşu izole etmişler, bunların 214'ünün *A. baumannii* olduğunu bildirmişlerdir. Bu suşların *in vitro* duyarlılıklarını incelediklerinde kolistine %100, tigesikline %99, netilmisine %75, sefoperazon/sulbaktama %40, imipeneme %30, amikasine %24, gentamisine %18, siprofloksasine %14, seftazidime %11, piperasilin/tazobaktama %10, sefepime %7 ve sefotaksime %4 oranında duyarlı olduklarını saptamışlardır. Ülkemizde 2010 yılında yapılan bir çalışmada hastane enfeksiyon etkeni olarak tanımlanan 79 *A. baumannii* suşunun *in vitro* antibiyotik duyarlılığı incelendiğinde suşların üçüncü kuşak sefalosporinlere % 95'in üzerinde direnç saptanmıştır. Tetrasikline %92, piperasilin/tazobaktama %84, siprofloksasine %82, ampisilin/sulbaktama %81, trimetoprim/sulfametoksazole %78, levofloksasine %76, tobramisine %71, amikasine %66, meropeneme %63 ve imipeneme %49 direnç bulunmuştur (16). Montero ve ark. (17) yaptıkları bir çalışmada farelerde çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* suşu ile pneumoni oluşturarak kolistin, imipenem, sulbaktam, rifampin ve tobramisinele tedavi seçeneklerini denemişler, kolistin yalnız başına yeterli olmadığını diğer seçeneklerin rifampinle kombine kullanımının daha uygun olduğunu önermişlerdir. Farelerde çoklu direnç gösteren *A. baumannii* ile deneysel pneumoni oluşturulan bir çalışmada rifampisin, imipenem ve sulbaktam ile tedavi seçenekleri *in vivo* olarak ve antibiyotiklerin izolat üzerindeki etkisi ise *in vitro* olarak araştırılmış ve yalnızca rifampisin kullanımının izolatların direnç durumunu arttırdığını, rifampisin sulbaktam yada imipenemle kombine kullanımının ise tedavide daha etkin olduklarını bildirmişlerdir (18). Hernandez ve ark. (19) immunkompetent farelerde *A. baumannii* ile deneysel pneumoni oluşturularak imipenem ve sulbaktamın etkinliğini incelemişler ve her iki antibiyotik de etkili olduğunu saptamışlardır.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanı

Bu çalışmada 8–10 haftalık, 20-25g ağırlığındaki BALB-C fareler kullanıldı. Hayvanların deneyde kullanımı, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi ve Kurul'dan onay alındı (No: 11/64). Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden temin edilen fareler ayrı kafeslerde 5'erli gruplar şeklinde tutularak, düzenli sularının verilmesi ve ad libitum beslenmeleri sağlandı.

#### 3.2. Bakteri İzolatı

Hastane kökenli sepsis tanısı alan bir hastadan izole edilen karbapenem dirençli (OXA-51, OXA-58 ve PER-1 pozitif) *Acinetobacter baumannii* izolatı, İstanbul Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD'dan temin edildi. Çalışmada kullanılabilecek –20 °C'de saklanmakta olan izolat canlandırılmak için Triptik Soy Agarda (TSA, Merck, Almanya) kültüre edilerek saf koloniler üretildi ve bakteriyel süspansiyon hazırlanmasında kullanıldı. İmipenem silastatin, sulbaktam, tigesiklin ve kolistin için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri Etest ve broth dilüsyon metodu kullanılarak CLSI önerilerine göre belirlendi (20).

#### 3.3. Antibiyotikler

Çalışmada; imipenem silastatin (Tienam 500 mg flakon, MSD, Türkiye) sulbaktam (β-Lactam 1 g flakon, Mustafa Nevzat, Türkiye), kolistin (Colimycin 150 mg flakon, Koçak Farma, Türkiye), tigesiklin (Tygacil 50 mg flakon, Wyeth, İngiltere) antibiyotikleri kullanıldı. İlaç dozları daha önce yapılan deneysel hayvan modeli çalışmalarından alındı (21).

#### 3.4. *In vitro* çalışmalar

**MİK değerlerinin belirlenmesi:** Bakteri için imipenem silastatin, kolistin, tigesiklin, sulbaktam antibiyotiklerinin MİK değerleri Etest ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak belirlendi. Etest (Diagnostic Liofilchem, İtalya ve Oxoid Ltd, İngiltere) ile üretici firma direktifleri doğrultusunda çalışıldı. İlgili antibiyotikler için ayrı ayrı petrielerde hazırlanan Müeller Hinton ağara (Lab M Ltd, İngiltere) 0.5 MacFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonundan yayma ekim yapıldıktan sonra antibiyotik stripleri

yerleştirildi ve 37 °C'de 18-24 saatlik inkübasyona konuldu. İnkübasyon sonrası stripler ve inhibisyon zonları değerlendirildi. Broth dilüsyon yöntemi ile antibiyotiklerin MİK değerlerinin belirlenmesinde tüm antibiyotikler için 0,125 µg/ml ile 256 µg/ml arasındaki konsantrasyonları çalışıldı, kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı ve CLSI M07-A9 standardı kullanılarak çalışıldı (22). MİK sınırları olarak *Acinetobacter spp.* için tigesikline karşı duyarlı ≤1 ve dirençli >2 mg/L olarak, kolistine karşı sınırları; duyarlı, ≤2 µg/ml; dirençli >2 µg/ml, imipenem silastatin için duyarlı ≤2 µg/ml; dirençli > 8 µg/ml ve sulbaktam için dirençli ≥16, duyarlı ≤4 µg/ml değerler kullanıldı (22, 23).

### 3.5. *In vivo* çalışmalar

Çalışmada fareler negatif kontrol, pozitif kontrol ve tedavi grubu olarak ayrıldı. Tedavi grubu; imipenem silastatin, kolistin, tigesiklin, sulbaktam, imipenem silastatin+sulbaktam, kolistin+sulbaktam, tigesiklin+sulbaktam olmak üzere alt gruplara ayrıldı (Tablo 1). Negatif kontrol grubuna yalnızca intraperitoneal (*ip*) yolla serum fizyolojik verilirken pozitif kontrole *ip* bakteri süspansiyonu verildi ve herhangi bir tedavi uygulanmadı, tedavi grupları ise bakteri süspansiyonunu ve ilgili antibiyotikleri *ip* yolla aldı. Çalışmada deneysel sepsis oluşturmak için ön çalışma ile 10<sup>8</sup> cfu/ml olarak belirlenen inokulum dozu farelere *ip* olarak 0.5 ml verildi. Tedavi alt gruplarında *ip* bakteri süspansiyonu verildikten 2 saat sonra *ip* antibiyotik başlandı. Antibiyotik dozları Tablo 1'de sunuldu. Her alt gruptaki fareler eşit sayıda olmak üzere 24, 48 ve 72 saatlik gözlem sonunda yüksek doz ketamine hydrochloride (150 mg/kg, Pfizer, Türkiye) kullanılarak sakrifiye edildiler. Ölen veya sakrifiye edilen farelerden kalp, akciğer, karaciğer, dalaktan ekimler yapılarak septisemi gelişip gelişmediği kontrol edildi. Ayrıca 24., 48. ve 72. saatlerde akciğer ve karaciğerden alınan doku örnekleri 1 ml serum fizyolojik (SF) içinde homojenize edildi (Heidolph SilentCrusher M, Schwabach, Germany) ve 10 kat sulandırarak TSA'ya ekildi. Koloniler 37 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası sayıldı. Bakteri yükü cfu/gr olarak hesaplandı.

### 3.6. İstatistiksel analiz

SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılarak analiz edildi. Bakteri sayıları ve antibiyotik ilişkileri incelenmesinde logaritmik transformasyon yapıldı. Veriler, ortalama± standart sapma olarak verildi. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve T test normal dağılımlarda kullanıldı. P <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *İn vitro* çalışma

OXA-51, OXA-58, PER-1 pozitif *A. baumannii* suşu için MİK değerleri; kolistin için 1 µg/ml, tigesiklin için 1 µg/ml, sulbaktam için 16 µg/ml ve imipenem silastatin için ise >256 µg/ml olarak bulundu.

### 4.2. *İn vivo* çalışma

Deneyde toplam 135 fare kullanıldı. Her bir tedavi grubunda 15 fare, bunların alt grubunda 5'er fare deneye alındı (Tablo 1). Karaciğer ve akciğer dokusunda bakteriyel yükler belirlendi (Şekil 1 ve 2). Akciğerin 24, 48, 72 saatlik kantitatif kültürleri gruplara göre karşılaştırıldığında; imipenem silastatin ve pozitif kontrol grubu arasında farklılık saptanmadı. Diğer tedavi grupları ile kontrol ve imipenem silastatin grupları arasındaki farklılık anlamlı bulundu ( $P > 0.001$ ). İmipenem silastatin ile imipenem silastatin+sulbaktam grupları arasındaki farklılık ise anlamlı bulundu. Kolistin ile kolistin+sulbaktam grubu karşılaştırmasında bir farklılık saptanmadı. Tigesiklin ile tigesiklin+sulbaktam grubu karşılaştırmasında da anlamlı bir fark yoktu.

Karaciğerin 24, 48, 72 saatlik kantitatif kültür sonuçları karşılaştırıldığında; kontrol ve imipenem grubu arasında farklılık bulunmazken, diğer gruplara göre sonuçlar arası farklılığın anlamlı olduğu belirlendi. İmipenem silastatin ile imipenem silastatin+sulbaktam grupları arasındaki farklılık anlamlı bulundu ( $P > 0.001$ ). Kolistin ile kolistin+sulbaktam grubu karşılaştırmasında farklılık anlamsız bulundu. Tigesiklin ile tigesiklin+sulbaktam grubu karşılaştırmasında da bir farklılık saptanmadı.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Acinetobacter* cinsi bakteriler antibiyotiklere karşı çoğul direnç geliştirmiş olmaları nedeniyle önemli hastane enfeksiyonu etkenlerindedir. Çeşitli direnç mekanizmaları ile aminoglikozitler, sefalosporinler, kinolonlara karşı direnç kazandıklarından sağaltımlarında güçlüklerle karşılaşmaktadır (24). *A. baumannii* antibiyotiklere en sık direnç geliştiren türdür ve bazı merkezlerde aminoglikozid dirençleri %80'e varmaktadır (25, 26). Son yıllarda *Acinetobacter* nedenli enfeksiyonlarda en etkin ajan olan imipenem için de direnç geliştiği hatta karbapenemlere dirençli *A. baumannii* susları nedeniyle oluşan hastane enfeksiyonlarının

arttığı bildirilmektedir. Çoklu ilaç direncindeki artış nedeniyle *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde güçlük yaşanmaktadır (27, 28, 29). Yapılan çeşitli araştırmalarda monoterapi ile başarı oranlarının düşük olması nedeniyle, özellikle dirençli kökenlerin ortaya çıkışının önlenmesi açısından kombine antibiyotik kullanımı önerilmiştir (24). Bu çalışmada da karbapenem dirençli *A. baumannii* ile deneysel sepsis oluşturulmuş farelerde imipenem silastatin, sulbaktam, kolistin, tigesiklin ve bu antibiyotiklerin farklı kombinasyonlarının etkinliği değerlendirilmiştir.

Lee ve arkadaşları (30), bakteriyemi ve menenjit etkeni olan çoğul dirençli *A. baumannii* suşlarında sulbaktam/kolistin kombinasyonunun etkinliğini araştırmış ve sulbaktama dirençli suşlarda bu kombinasyonunun sinerjik etkinlik gösterdiğini ve iyi bir tedavi seçeneği olabileceğini bildirmiştir. Çıkman ve ark. (31), imipeneme dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında alternatif olarak kolistin-ampisilin/sulbaktam kombinasyonunun sinerjistik aktivitesini araştırmışlar ve bu kombinasyonun imipeneme dirençli *A. baumannii* suşlarının %45 (15/33)'i üzerinde sinerjik etkinlik gösterdiği, %27'sinde ise antagonist etkileşim oluşturduğunu ve kolistine dirençli suşlarda, kolistin ampisilin/sulbaktam ile yüksek oranda sinerjik etki gösterdiğini, buna karşın kolistine duyarlı suşlarda bu kombinasyonun antagonist etki oluşturduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada ise karbapeneme dirençli bazı *A. baumannii* suşlarında antimikrobiyal ajanların kolistin ile kombine edilmesinin akvitede azalmaya ve antibiyotik direncine neden olduğu saptanmıştır (32). Bu çalışmada ise kolistin ve sulbaktamın yalnız başına kullanıldıklarında 48.saatten itibaren eradikasyonu başlattığı ancak sulbaktamla kombine edildiğinde etkinlik artışına neden olmadığı belirlenmiştir. Principe ve ark (33) bu antibiyotik direncinin *A. baumannii* suşlarında birden çok mekanizma ile karmaşık etkileşimler sonucunda geliştiğini göstermiştir. Bu nedenle direncin önüne geçmek ve antagonist etkileşimi azaltmak için kolistin ile yapılan kombinasyon terapisinin iyi belirlenmesi gerekmektedir (31). Ko ve ark (34), *A. baumannii* ile enfekte ettikleri farelere meropenem ve sulbaktam tedavisi uygulamışlar ve ilgili antibiyotiklerin kombinasyon halinde kullanıldıklarında antimikrobiyal etkinliğin arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da imipenem ile sulbaktam kombine edildiğinde benzer sonucun elde edildiği gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada çoğul ilaç dirençli *A. baumannii* suşu ile farelerde pneumoni modeli oluşturulmuş ve tigesiklin, kolistin, tigesiklin+kolistin kombinasyonlarının *in vivo* etkinlikleri incelenmiş, gruplar arasında tedavide farklılık olmadığı fakat kombine grubun bakteriyel yükü diğerlerine göre daha hızlı azalttığını bildirmişlerdir (35). Bu çalışmada ise kolistin ile

tigesiklin arasında ilk 24 ve 48 saatte tedavi açısından bir farklılık olmadığı, tigesiklinin sulbaktamla kombine edildiğinde antibiyotik etkinliğinde artış olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, karbapeneme dirençli *A. baumannii* ile oluşturulan deneysel sepsiste kolistin ve sulbaktamın tek başına kullanıldığında 48. saatten itibaren akciğer ve karaciğerden bakteriyel yükü eradike etmeye başladığı, 72. saatte tamamen eradike ettiği görülmektedir. Sulbaktamın, imipenem ile kombine edilmesi imipenemin etkinliğini artırmaktadır. Sulbaktamın, tigesiklin veya kolistinle kombine edilmesi bu antibiyotiklerin *in vivo* etkinliğini artırmadığı gözlenmektedir. Karbapenem dirençli *A. baumannii* nedenli enfeksiyonların tedavisi için bu verilerin geniş kapsamlı ileri klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- 1) Başustaoğlu A, Özyurt M. Nozokomiyal patojen olarak Acinetobakter'lerin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. Hastane İnfeksiyonları Dergisi. 1998; 2: 88 -93.
- 2) Bartual S.G., Seifert H., Hippler C., Luzon M.A.D., Wisplinghoff H., Rodriguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J Clin Microbiol 2005; 43:7382-4390.
- 3) Bergogne-Berezin E. and Towner K.J. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological and epidemiological features. Clin Microbiol Rew. 1996; 148-165
- 4)Javad A., Seifert H., Snelling A.M., Heritage J., Hawkwy P.M. Survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. J Clin Microbiol 1998; 36: 1938-1941
- 5) Karşılıgil T., Balcı . Nozokomiyal Acinetobacter izolatlarında antibiyotik direnci. İnfeksiyon Dergisi 2000; 14: 511-514
- 6) D'Agata E.M.C., Thayer V., Schaffner W. An outbreak of Acinetobacter baumannii: The importance of cross-transmission. Infect Control Hosp Epidemiol 2000; 21: 588-591
- 7) Taşova Y, Akgün Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar İH. Nozokomiyal Acinetobacter Enfeksiyonları. Flora, 1999; 4: 170 -176.
- 8) Karchmer AW. Nosocomial bloodstream infections: Organism, risk factors, and implications. Clin Infect Dis, 2000; 31: 139 -143.
- 9) Bou G., Cervero G., Dominguez M.A., Quereda C., Martinez-Beltran J. PCR based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis charecterization of a nosocomial outbreak caused by imipenemand meropenem-resistant Acinetobacter baumannii. Clin Microbiol Infect 2000; 6:635-643.
- 10)Schreckenberger P.C, Daneshvar M.I., Weyant R.S., Hollis D.G. Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C, Yolken R.H. (Eds.). Manuel of Clinical Microbiology. 7 th ed. Washington ASM Pres 2002: 749-775.
- 11)Towner KJ. Clinical importance antibiotic resistance of Acinetobacter spp. J Med Microbiol 1997; 46: 721 -746.
- 12)Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün G. Widespread detection of PER-1-type extended spectrum beta-lactamases among nosocomial Acinetobacter and Pseudomonas aeruginosa isolates in Turkey: A nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother, 1997; 41: 2265 -2269.



- 13) Türk Dağı H., Arslan U., Tuncer İ. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Acinetobacter Baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direnci. ANKEM Derg 2011;25:22-26.
- 14) Mansur A, Kuzucu Ç, Ersoy Y, Yetkin F. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde 2008 yılında yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, ANKEM Derg 2009;23:177-81.
- 15) Özdemir M., Erayman İ., Gündem N., Baykan M., Baysal B. Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Acinetobacter* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması. ANKEM Derg 2009;23:127-132.
- 16) Balcı M, Bitirgen M., Kandemir B., Türk Arıbaş E., Erayman İ. Nozokomiyal *Acinetobacter Baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılığı. ANKEM Derg 2010;24:28-33.
- 17) Montero A, Ariza J., Corbella X, Doménech A., Cabellos C, Ayats J., Tubau F., Ardanuy C., Gudiol F. Efficacy of Colistin versus  $\beta$ -Lactams, Aminoglycosides, and Rifampin as Monotherapy in a Mouse Model of Pneumonia Caused by Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Antimicrob Agents Chemother, 2002; 1946–1952.
- 18) Pacho'n-Iba'nez M, Ferná'ndez-Cuenca F., Docobo-Pe'rez F., Pacho'ni J, Pascual A. Prevention of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* in an experimental pneumonia murine model, using rifampicin associated with imipenem or sulbactam. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 689–692.
- 19) Hernandez M., Cuberoz L., Pichardo C., Cabellero F., Moreno I., Jimenez-Mejiaz M., Garcia-Curiel A., Pachon J. Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. J Antimicrob Chemother 2001; 47: 479–482.
- 20) CLSI CaLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S21. Wayne PA 2011.
- 21) Song JY, Cheong HJ, Lee J, Sung AK, Kim WJ. Efficacy of monotherapy and combined antibiotic therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in an immunosuppressed mouse model. Int J Antimicrob Agents. 2009;33:33-9.
- 22) CLSI CaLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. M07-A9. Wayne, Pennsylvania 2012.
- 23) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013.
- 24) Şener A G, Türk M, Afşar İ, Türker M. Çoğul Dirençli *Acinetobacter* Kökenlerinde Ampisilin/Sulbaktam – Siprofloksasin, Ampisilin/Sulbaktam - Amikasin, İmipenem–

Siprofloksasin, İmipenem - Amikasin Kombinasyonlarının In Vitro Etkileşimlerinin Araştırılması. İnfek Derg, 2005;19, 107-110.

25) Bergogne-Berezin E., Joly-Guillou M.L. Hospital infection with *Acinetobacter* spp: an increasing problem. J Hosp Infect, 1991;18, 250-255.

26) Hanberger H., Garcia-Rodriguez J.A., Gobernado M., Goossens H., Nilsson L.E., Struelens M.J. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in five European countries. JAMA,1999; 281, 67-71,

27) Aksaray S., Dokuzoguz B., Güvener E. Et al. Surveillance study of antimicrobial resistance among Gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. J Antimicrob Chemother; 2000;45, 695-699.

28) Günseren F., Mamıkoglu L., Öztürk S. et al. Surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. J Antimicrob Chemother, 1999;43, 373-378,.

29) Roberts S.A., Findlay R., Lang S.D.R. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. J Hosp Infect, 2001;48, 228-232.

30) Lee CH, Tang YF, Su LH, Chien CC, Liu JW. Antimicrobial effects of varied combinations of meropenem, sulbactam, and colistin on a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate that caused meningitis and bacteremia. Microb Drug Resist 2008; 14(3): 233-7.

31) Çıkman A., Ceylan M. R., Parlak M., Karahocagil M. K., Berktaş M. İmipeneme Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Kolistin-Ampisilin/Sulbaktam Kombinasyonu Etkinliğinin Değerlendirilmesi Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 147-151.

32) Rodriguez CH, De Ambrosio A, Bajuk M, et al. In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. J Infect Dev Ctries 2010; 4(3): 164-7.

33) Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. Invitroactivity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multi drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2009; 8: 18.

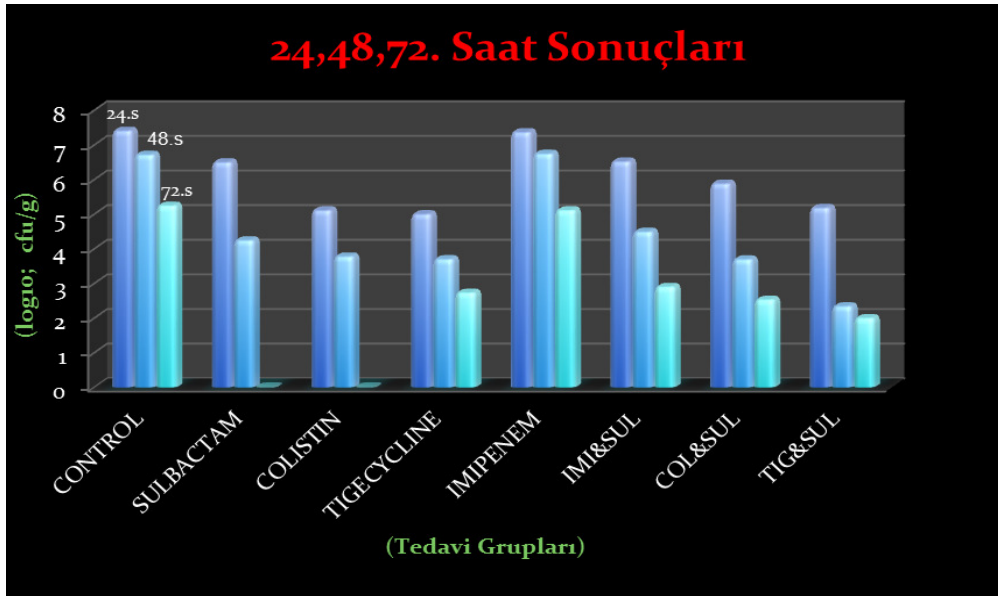
34) Ko W-C; Lee H-C; Chiang S-R; Yan J-Y; Wu J; Lu C; Chuang Y. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain.J Antimic Chemother 2004;53:393-395.

35) Mutlu Yılmaz E, Sunbul M, Aksoy A, Yılmaz H, Guney AK, Guvenc T. Efficacy of tigecycline/colistin combination in a pneumonia model caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 2012 ;40 (4):332-6.

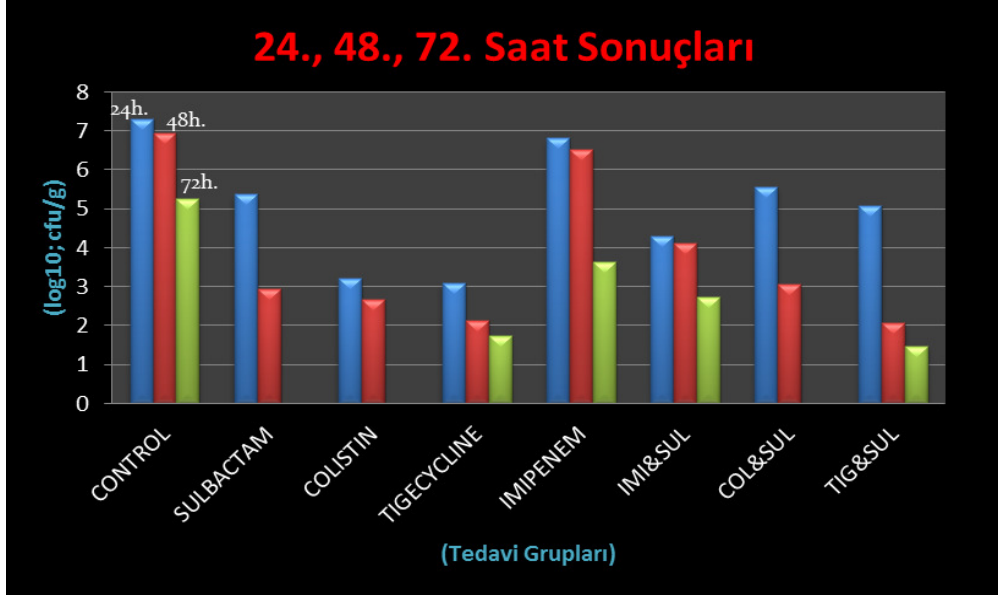
## 7. EKLER

Tablo 1. Denei gruplarına göre farelerin dağılımı

	24. saat	48. saat	72. saat
<b>Kontrol grupları</b> (n: 15 [+], n: 15 [-])	5(+), 5(-)	5(+), 5(-)	5(+), 5(-)
<b>Sulbaktam g. (n:15)</b>	5	5	5
<b>Kolistin g. (n:15)</b>	5	5	5
<b>İmipenem silastatin g. (n:15)</b>	5	5	5
<b>Tigesiklin g. (n:15)</b>	5	5	5
<b>Kolistin+Sulbaktam g.(n:15)</b>	5	5	5
<b>İmipenem+Sulbaktam g. (n:15)</b>	5	5	5
<b>Tigesiklin+Sulbaktam g. (n:15)</b>	5	5	5



İmi&Sul: İmipenem+sulbaktam, Col&Sul: Kolistin+sulbaktam, Tig&Sul: Tigesiklin+sulbaktam  
Şekil 1. Akciğere ait 24.,48. ve 72. saatlere ait karşılaştırmalı bakteri yükleri (cfu/g)



Imi&Sul: İmipenem+sulbaktam, Col&Sul: Kolistin+sulbaktam, Tig&Sul: Tigesiklin+sulbaktam

Şekil 2. Karaciğere ait 24.,48. ve 72. saatlere ait karşılaştırmalı bakteri yükleri (cfu/g)