



# ACINETOBACTER SPP. İZOLATLARINDA DIŞA ATIM POMPASI (DAP) İNHİBİTÖRLERİNİN MEROPENEMİN ETKİNLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

*EFFECT OF EFFLUX PUMP (DAP) INHIBITORS TO EFFICACY OF MEROPENEM ON ACINETOBACTER SPP. CLINICAL ISOLATES*

Suzan ÖKTEN<sup>1</sup> , Alparslan Semih SALAN<sup>1\*</sup> , Gülcan KUYUCUKLU<sup>2</sup> ,  
Fatma KAYNAK ONURDAĞ<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 22030, Edirne, Türkiye

<sup>2</sup>Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 22030, Edirne, Türkiye

## ÖZ

**Amaç:** Dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için yeni antimikrobiyal bileşiklerin sentezlenmesi çalışmalarının yanısıra, inhibitör moleküllerin antibiyotiklerle kombine kullanılmasına yönelik araştırmalar da yapılmaktadır. Çalışmamızda, fenilalanin-arjininbeta-naftilamid (PAβN), karbonil-siyanid m-klorofenilhidrazon (CCCP) ve 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP)'nin *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarında, meropenemin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) üzerine etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda kullanılmak üzere Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen *A. baumannii* izolatlarından meropeneme dirençli olduğu doğrulanan 50 *A. baumannii* izolatu çalışmaya alınmıştır. Meropenem duyarlılığı PAβN, CCCP ve NMP varlığında yeniden araştırılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri mikrodilüsyon yöntemi ile yapılmıştır. Dama tahtası testi sonuçlarına göre FİK indeksleri hesaplanmış ve kombinasyonun etkisi sinerjik ya da aditif olarak tanımlanmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Sonuç olarak, izolatlarda meropenemin MİK değerlerini düşüren ideal konsantrasyonlar belirlenmiş olmakla birlikte, meropenemin miktarındaki artışın inhibitör konsantrasyonundaki azalmayla ya da inhibitör konsantrasyonundaki artışın meropenem konsantrasyonundaki azalmayla birlikte seyrettiği tespit edilmiştir. MİK değerlerinde ise, 8 kata kadar azalma görülmekle birlikte, meropenemin MİK değerini direnç sınırının altına düşüren inhibitör konsantrasyonu saptanmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, DAP inhibitörü, meropenem

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Alparslan Semih Salan  
e-posta / e-mail: asln1339@gmail.com

**ABSTRACT**

**Objective:** In addition to the synthesis of new antimicrobial compounds for the treatment of resistant bacterial infections, there are also studies on the use of inhibitor molecules in combination with antibiotics. In our study, it was aimed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide (PAβN), carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) and 1- (1-naphthylmethyl) - piperazine (NMP) on *Acinetobacter baumannii* clinical isolates (MIC).

**Material and Method:** To be used in our study, 50 *A. baumannii* isolates from *A. baumannii* isolates obtained from Trakya University Health Research and Application Center, which were confirmed to be resistant to meropenem, were included in the study. Meropenem susceptibility was re-investigated in the presence of PAβN, CCCP and NMP. Antimicrobial susceptibility tests were performed by microdilution method. FIC indexes were calculated according to the checkerboard test results and the effect of the combination was defined as synergistic or additive.

**Result and Discussion:** As a result, although ideal concentrations of meropenem that decrease MIC values were determined in isolates, it was determined that the increase in the amount of meropenem was accompanied by the decrease in the inhibitor concentration or the increase in the inhibitor concentration with the decrease in the meropenem concentration. Although the MIC values decrease upto 8 times, the inhibitor concentration that lowered the MIC value of meropenem below the resistance limit was not detected.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, DAP inhibitor, meropenem

**GİRİŞ**

Farklı nedenlerle hastanede hizmet alan bir hastada, hastaneye başvurduğu sırada kuluçka döneminde olmayan ve hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra veya hastaneden ayrıldıktan sonraki 10 gün içinde gelişen enfeksiyonlar hastane enfeksiyonlarıdır [1-2]. *Acinetobacter spp.* son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olarak ortaya çıkan; non-fermentatif, Gram-negatif kokobasillerdir [3]. Oksidaz negatif olmaları ile *Pseudomonas* türlerinden ayrılır. *A. baumannii*'yi diğer türlerinden ayıran en önemli özelliği 44°C'de üreyebilme yeteneğidir [4]. *A. baumannii* enfeksiyonları sebebiyle hastaların ölüm oranları, genel hastane servislerinde %5 iken, yoğun bakım ünitelerinde %54 olabilmektedir [5]. Türkiye'de yoğun bakım ünitelerinde hastane enfeksiyonlarına neden olan Gram negatiflerin araştırılması amacıyla yapılan çok merkezli bir çalışmada; *Acinetobacter* türleri, Gram negatif basiller arasında üçüncü sıradadır ve antibiyotik direnç oranları da oldukça yüksektir [6]. Aynı zamanda son yıllarda yoğun bakım ünitelerinde ventilatörle ilişkili pnömonilerin etkeni olarak gösterilmektedir [7]. Yine yapılan bir çalışmada hastane kaynaklı pnömonilerin nedenleri arasında ilk sırada bildirilmiştir [8]. Trakya Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde de, *Acinetobacter* türleri sıklıkla izole edilmekte ve özellikle yoğun bakım ve cerrahi servislerinde ciddi problemlere neden olmaktadır. *A. baumannii* doğada ve insan deri florasında da bulunabildiğinden klinik örneklerden izole edilmektedir [9-10].

*Acinetobacter baumannii*, neden olduğu enfeksiyonlar açısından en önemli türdür. Bu suşların neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direnç, tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Çoğul antibiyotik direncinin artması tedavi olanağını azaltmaktadır [11,12]. Birçok *Acinetobacter* türü kinolonlar, karbapenemler ve sefalosporinler gibi antibiyotiklere

direnç göstermektedir. Kolistin tek tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda kolistine dirençli suşlar da bildirilmiştir. Bu durum, tedavide yeni arayışlara gidilmesi gerektiğini göstermektedir [11,13].

*Acinetobacter baumannii*'nin direnç mekanizmaları arasında; antimikrobiyal ajanların enzimatik modifikasyonu, membran geçirgenliğindeki değişiklikler, alternatif metabolik yollar, antimikrobiyal etki bölgesinde değişiklikler ve hücre içi ilaç konsantrasyonunun dışa atım pompa proteinleri yoluyla azaltılması sayılabilir [14].

DAP sistemi, oluşan direncin önemli faktörlerinden biridir çünkü bu sistemle ilacın hücre dışına atılması sağlanmaktadır [15]. Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler ATP'ye bağımlı aktif pompa sistemlerine sahiptir. Aktif pompa sistemlerinden bazıları mutasyonla indüklenebilir. Bu sistemler düzenleyici genlerle kontrol edilir. Düzenleyici genlerde görülen mutasyonlar DAP sisteminin fazla çalışmasına sebep olur. Bu durum antimikrobiyal ajanların dışarı atılmasına neden olmaktadır [15,16].

DAP proteinleri yüksek miktarda sentezlendiklerinde, birçok antimikrobiyal ajana karşı tek adımda yüksek düzey çoklu ilaç direncine sebep olmaktadır. DAP proteinleri bakterilerde yapısal düzeyde sentezlendiklerinde, metabolik son ürünlerin hücre dışına atılmasını ve bakterilerin birbirleriyle çevreleriyle ilişkilerini düzenlemesinde etkin rol oynar [17]. Bu proteinler sitoplazmik membranda yerleşim gösterirler. DAP proteinleri dış membran kanalı, periplazmik lipoprotein ve iç membran taşıyıcısı olmak üzere üç bileşen içerir [18]. DAP proteinleri aminoasit dizilimleri baz alınarak 5 süper protein ailesinde toplanmaktadır: "ATP binding cassette" süper ailesi (ABC), "Major facilitator" süper ailesi (MFS), "Small multi drug resistance" süper ailesi (SMR), "Çoklu ilaç ve toksik bileşik eldesi (Multi drug and toxic compound extrusion-MATE)" süper ailesi, "Resistance-nodulation-celldivision" (RND) süper ailesi [19].

RND süper ailesinde yer alan AdeABC, AdeDE, AdeIJK ve AdeFGH dışa atım pompaları *A. baumannii*'de çoklu ilaç direnci (MDR) gelişiminde önemli bir rol oynar [9].

İlk tanımlanmış RND sistemi AdeABC (*Acinetobacter* drug efflux ABC)'dir. ATP bağımlı bir dışa atım pompasıdır. AdeABC pompası, enerji kaynağı olarak proton motive edici gücü kullanmaktadır. İlaç molekülü hücre dışına pompalanırken gereken enerji, hücreye dış ortamda bir H<sup>+</sup> iyonunun alınmasıyla sağlanır. AdeABC aktif ilaç pompasının substrat profili oldukça geniştir. Bu ilaç pompası; aminoglikozidler, florokinolonlar, tetrasiklinler, tigesiklin, kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim, bazı betalaktamlar ve çok sayıda toksik maddeyi içerir [9,18,20].

Son yıllarda keşfedilen birçok bileşiğin dışa atım pompasını inhibe ettiği gösterilmiştir. NMP, CCCP ve PAβN gibi bileşiklerin dirençli Gram negatif bakterilerde meropenemin MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) değerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır [21,22]. Antibiyotik kombinasyonlarının, toksisite ve stabilite sorunlarından dolayı pompa inhibitörleri ile birlikte kullanılmasının tedavi için iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda devam eden

çalışmalar vardır. Bu çalışmaların sonucunda amaçlanan ise antibiyotik etkilerinin geri kazanımı ve dirençli bakterilerin önemli ölçüde azalmasıdır.

NMP ve PAβN, Gram negatif bakterilerde çoklu ilaç direncine neden olan RND pompa sistemlerini inhibe eder [6,23]. CCCP, bir diğer dışa atım pompası inhibitörüdür. CCCP protein pompasından madde geçişini arttırarak antibiyotiğin aktivitesinin artmasını sağlar. Yani proton iyonoforudur. ATP sentezini azaltmaktadır [21].

DAP inhibitörü maddeler DAP ilişkili direncin gösterilmesinde de kullanılmaktadır [21].

Tedavi için kombine antibiyotiklerin kullanılması veya antibiyotiğe karşı oluşan direnci inhibe eden bileşiklerin eklenmesi, son yıllarda tercih edilen yöntemler arasındadır [8]. Mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda bu inhibitörlerin bazı antimikrobiyal ajanların minimum inhibitör konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [22].

Sinerji testleri kombine bileşiklerin antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanmasında uygulanır. Dama tahtası testi sıklıkla kullanılan sinerji testlerinden biridir [24].

Dama tahtası testinde, ilaçların konsantrasyonları 96 kuyucuklu plak üzerinde karşılaştırılarak kombinasyon etkinlikleri test edilir. İlaçların kombinasyondan elde edilen MİK değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri oranlanır ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) bulunur. Ardından kombinasyondaki ilaçların FİK değerleri toplanır ve FİK indeksi (FİKİ) hesaplanır. Her antimikrobiyal maddenin FİK değeri, üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı suşa karşı saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilir [24,25].

Bu çalışmada, meropeneme dirençli *A. baumannii* klinik izolatlarında, PAβN, NMP ve CCCP DAP inhibitörlerinin, meropenemin MİK değeri üzerine etkisinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, dama tahtası testi kullanılarak meropenem-inhibitör kombinasyonlarının FİK indeksleri hesaplanmış ve kombinasyonun etkisi sinerjik ya da aditif olarak tanımlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda CLSI M100-S25 [26] ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST) [27] tarafından önerilen kalite kontrol suşları olarak; *Pseudomonas aeruginosa* Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection- ATCC) 27853, *A. baumannii* ATCC 17978 ve Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 50 *A. baumannii* izolatı kullanılmıştır.

## Yöntem

### Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

PAβN, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde, CCCP, NMP ve meropenem distile suda çözülerek stok solüsyonları hazırlanmıştır. Çalışmada Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck) ve Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck) kullanılmıştır. Besiyerleri 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [26]. Antimikrobiyal duyarlılık testi, CLSI M100-S25 önerileri doğrultusunda yapılmıştır [26]. MHA plaklarında üretilmiş olan *A. baumannii* kolonilerinden MHB besiyerlerine pasaj yapıp sıvı besiyerleri 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiş ve kültürün bulanıklığı, 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklığa ulaşınca kadar üzerine sıvı besiyeri eklenerek ayarlanmıştır. McFarland yoğunluğu densitometre cihazı (Biosan) kullanılarak belirlenmiştir. Bakteri süspansiyonu McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra 1:100 oranında dilüe edilerek  $5 \times 10^5$  CFU/mL yoğunluğunda kullanılmıştır. Stok solüsyonları hazırlanan meropenem(Sigma), CCCP, NMP ve PAβN mikrodilüsyon plaklarının ilk kuyucuklarına 100 µL hacimde eklenerek, stok solüsyondaki madde konsantrasyonu çift katlı olarak sulandırılmıştır. Çok kanallı mikropipet kullanılarak çift katlı dilüsyona devam edilip mikrodilüsyon plaklarının takip eden kuyucuklarında da madde konsantrasyonu her defasında yarı yarıya azaltılmıştır. Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra, mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum süspansiyonlarından 10 µL inokülasyon yapılmıştır. Ayrıca kullanılan tüm çözücülerin antimikrobiyal etkileri kontrol edilmiştir. Bakteri inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. MİK, mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu olarak saptanmıştır. Böylece izolatların meropeneme olan duyarlılıkları ve MİK değerleri saptanmıştır.

### Dama Tahtası Yöntemi

CCCP, NMP ve PAβN’in etkisinin araştırılması için izolatlar ile “meropenem ve PAβN”, “meropenem ve CCCP” ve “meropenem ve NMP” kullanılarak dama tahtası testi yapılmıştır. Çalışmamızda, antibiyotik konsantrasyonlarının standartlarda verilen MİK değerleri ile de yakın ve uyumlu olarak devam etmesi amaçlandığından konsantrasyonların çok küçülmesi istenmemektedir. Bu nedenle, kombinasyondaki inhibitör madde solüsyonu aynı plakta değil ayrı bir plakta dilüe edilerek, ilk maddenin konsantrasyonunun sütunda sabit kalmasını sağlanmıştır. Bu nedenle doksan altı kuyucuklu, U tabanlı mikropaklarda gerçekleştirilen dama tahtası yönteminde; mikropakların soldan sağa ilk 10 kuyucuğuna meropenemin seri sulandırılmaları, bir başka mikroplağın yukarıdan aşağı ilk 8 kuyucuğuna ise inhibitör maddenin seri sulandırılmaları dağıtılmış ve bu iki plağın içerikleri başka bir mikropakta birleştirilmiştir. Meropenem için kullanılacak ilaç sulandırım aralığı MİK değerlerine göre tespit edilmiştir. Kombinasyon testinin değerlendirilmesi fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) indeksine göre yapılmıştır.

### Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları

Mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri MİK değeri  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  ise duyarlı,  $>8\mu\text{g/mL}$  ise dirençli olarak kabul edilmiştir [27]. İzolatların hepsinin meropeneme dirençli olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen MİK değerleri 16  $\mu\text{g/mL}$ 'nin üzerindedir.

İzolatların tamamında, NMP-meropenem ve CCCP-meropenem kombinasyonları aditif etki göstermiştir. Her iki inhibitörün meropenem ile kombinasyonunda MİK değerleri 2-8  $\mu\text{g/mL}$  arasında değişmektedir. PA $\beta$ N-meropenem kombinasyonu için, 49 izolata karşı aditif etki tespit edilirken, bu kombinasyonda tespit edilen aditif etkide de, MİK değerleri de 2-8  $\mu\text{g/mL}$  aralığındadır. Ayrıca, bu kombinasyonda, 11 numaralı izolata karşı sinerjik etki tespit edilmiştir.

NMP, CCCP ve PA $\beta$ N'in 3,125  $\mu\text{g/mL}$  ve 6,25  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonları varlığında meropenemin MİK değerlerinde sırasıyla 2-8 kat, 4-8 kat ve 2-4 kat azalmıştır.

Sinerjik etki tespit edilen izolat için "meropenem ve PA $\beta$ N" kullanılarak yapılan dama tahtası testi sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** 11 numaralı izolat için meropenem-PA $\beta$ N kombinasyonunun MİK değerleri

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0.5/0	0.25/0
0/25	256/25	128/25	64/25	32/25	16/25	8/25*	4/25*	2/25*	1/25*	0.5/25*	0.25/25*
0/12.5	256/12.5	128/12.5	64/12.5	32/12.5	16/12.5	8/12.5*	4/12.5*	2/12.5*	1/12.5*	0.5/12.5*	0.25/12.5*
0/6.25	256/6.25	128/6.25	64/6.25	32/6.25	16/6.25	8/6.25*	4/6.25*	2/6.25*	1/6.25*	0.5/6.25*	0.25/6.25*
0/3.125	256/3.125	128/3.125	64/3.125	32/3.125	16/3.125	8/3.125*	4/3.125*	2/3.125*	1/3.125*	0.5/3.125*	0.25/3.125*
0/1.5625	256/1.5625	128/1.5625	64/1.5625	32/1.5625	16/1.5625	8/1.5625*	4/1.5625*	2/1.5625	1/1.5625	0.5/1.5625	0.25/1.5625
0/0.78125	256/0.78125	128/0.78125	64/0.78125	32/0.78125	16/0.78125	8/0.78125*	4/0.78125*	2/0.78125	1/0.78125	0.5/0.78125	0.25/0.78125
0/0.390625	256/0.390625	128/0.390625	64/0.390625	32/0.390625	16/0.390625	8/0.390625*	4/0.390625*	2/0.390625	1/0.390625	0.5/0.390625	0.25/0.390625

\* T Direnç sınırının altındaki meropenem MİK değerleri

Tablo 96 kuyucuklu mikroplağı temsil etmektedir. Tabloda koyu renk ile işaretlenen kuyucuklar üremenin olduğu, beyaz kuyucuklar üremenin olmadığı kuyucuklardır. FİK değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [28-30]. PA $\beta$ N'in, meropenemin MİK değerlerini direnç sınırının altına düşürdüğü konsantrasyonları da Tablo 1'de verilmiştir.

$$FİK M = MİK M_{\text{kombinasyon}}/MİK M$$

$$FİK P = MİK P_{\text{kombinasyon}}/MİK P$$

$$FİK = 4/256 + 0.390625/1.5625 = 0.015625 + 0.25 = 0.265625 \leq 0,5 \text{ sinerjik etki}$$

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Son yıllarda hastane enfeksiyonları tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmektedir. Antimikrobiyal ajanlara dirençli *Acinetobacter* türleri hastane enfeksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu enfeksiyonları tedavi edebilmek için yeni bileşikler araştırılmaktadır ancak bakteriler bu bileşiklere direnç geliştirebilmektedir. Bu sebeple son yıllarda üzerinde durulan çalışmalar gelişen direncin inhibe edilmesine yönelik araştırmalar olmaktadır [31].

*A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotiklerin tek başına kullanılmaması tedavide yeni arayışlara ihtiyacı zorunlu hale getirmiştir. Tedavinin düzenlenmesinde antibiyotik duyarlılık testleri önemini korumaktadır, özellikle tedavi seçiminde antibiyotiklerle inhibitör bileşiklerin, antibiyotik duyarlılık çalışmalarının yapılması tedavinin sonuçlarını daha doğru etkileyecektir.

MYSTIC çalışması, 2003 yılında *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direncinin %14-16'ya ulaştığını göstermektedir [32]. Otuz yedi ülkede gerçekleştirilen bu araştırmada karbapenemlere en yüksek direnç oranı %27-38 ile ülkemizde görülmüştür [17-33]. *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direnci ülkemizde yapılan çalışmalarda yıllar içerisinde farklı sonuçlar göstermiştir. Güriz ve ark. (34) 1999 yılında yaptıkları çalışmada, hastane enfeksiyonu etkeni olan 65 *Acinetobacter* spp. İzolatında imipenem direnç bulunmazken, 2008-2010 yılları arasında yapılan üç farklı çalışmada direnç oranları sırasıyla %70, %83 ve %84 olarak tespit edilmiştir [35]. Kurtoğlu ve ark [36], yaptıkları çalışmada karbapenem direncinin ise yıllara göre %50-83 oranında olduğunu saptamıştır. Ruiz ve ark. [37] altı yıllık bir periyotta 1532 *Acinetobacter* suşu ile yaptıkları çalışmada imipenem direncinin % 1.3'ten % 80'e çıktığını bildirmişlerdir.

*Acinetobacter baumannii* izolatları kromozomal ve plazmid kaynaklı farklı mekanizmalar ile antibiyotiklere direnç geliştirebilir. Dışa atım pompa (DAP) sistemleri ile gelişen direnç mekanizması son yıllarda önem kazanmıştır [38,39].

PAβN, tek başına kullanıldığında antibakteriyel etkisi olmamasına karşın Gram negatif bakterilerde RND tipi pompa sistemini inhibe ettiği bilinmektedir. NMP de RND pompa sistemlerini inhibe ederek Gram negatif bakterilerde çoklu ilaç direncine sebep olur. CCCP ise protein pompasından madde geçişini artırarak antibiyotiğin etkisini arttırmaktadır.

Perez-Varela ve ark. [14]; *A. baumannii* izolatlarında sodyum dodesil sülfat, deoksikolat bileşikleri ile antibiyotikler arasında sinerjik etki olup olmadığını araştırmış, bileşiklerin eritromisin,

gentamisin ve kloramfenikol ile birlikte kullanıldıklarında bakterilerin duyarlılıklarında bir farklılığa neden olmadığını bildirmişlerdir.

Marshall ve ark. [40] tarafından yapılan çalışmada; kloramfenikol, tetrasiklin ve nalidiksik asitin dışa atım pompası inhibitörleri ile birlikte elde edilen MİK değerleri saptanmıştır. Çalışmada tanımlanan inhibitörlerin, kloramfenikolün MİK değerini *Salmonella* ve *E. coli* için, direnç sınır değerinin altına düşürdüğü bildirilmiştir. Enterobacterales için; dışa atım pompa inhibitörlerinin tetrasiklin veya nalidiksik asit ile kullanımı arasında da herhangi bir etki olmadığı belirtilmiştir. *Acinetobacter* spp. And *Pseudomonas* spp. için; dışa atım pompa inhibitörleri ile kloramfenikol, tetrasiklin, nalidiksik asit kullanımının direnç sınır değerlerine etkisinin belirlenemediği bildirilmiştir.

Çetinkaya ve ark. [41] çalışmaya aldıkları 58 *A. baumannii* izolatının %15,5'inde 25 mg/L PaβN varlığında siprofloksasin MİK değerlerinde 4 kat ve daha fazla azalma tespit etmiş ve 100 mg/L PaβN varlığında bu oranın %39,6'ya çıktığını bildirmişlerdir. Ancak çalışmaya alınan tüm izolatlar siprofloksasine dirençli değildir ve dokuz izolatın siprofloksasine dirençli iken duyarlı hale geldiği bildirilmiştir. Çoban ve ark [42]; çalışmaya aldıkları 42 *A. baumannii* izolatının 19'unun siprofloksasine duyarlı, 17 izolatın ise siprofloksasine dirençli olduğunu bildirmiş ve NMP varlığında siprofloksasin duyarlılığını disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile tekrar çalışmışlardır. On yedi dirençli izolatın 16'sının orta duyarlı iken duyarlı hale geldiğini, 1 dirençli izolatın da orta duyarlı hale geldiğini bildirmişlerdir. 100mg/L NMP varlığında tüm izolatlarda MİK değerlerinde 4 kat ve daha fazla azalma tespit etmişlerdir.

Pannek ve ark. [43], *Acinetobacter baumannii* ve NMP ile yaptıkları çalışmada, 25 mg/L NMP varlığında konsantrasyonlarda kayda değer bir azalma tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Çalışmada 100 mg/L NMP kullanıldığında daha fazla izolatın MİK değerlerinde azalma tespit edilmiştir.

Cortez-Cordova ve ark. [44] tarafından yapılan bir çalışmada; PaβN'in *Acinetobacter baumannii* suşlarının direnç gelişimi üzerine etkisi araştırılmış olup bu inhibitör maddenin AdeFGH dışa atım pompasını inhibe ederek trimetoprim, kloramfenikol ve klindamisinine karşı direnç gelişimini engellediği belirtilmiştir.

Vera-Leiva ve ark. [45] ise yaptığı çalışmada; *Klebsiella* izolatlarında, PaβN varlığında karbapenem MİK değerlerinin beklenilenin aksine arttığını göstermiştir. Çalışmamızda, PaβN varlığında meropenem MİK değerinin azaldığı hatta direnç sınırının altına düştüğü gözlemlenmiştir. Sonuçlarımızda inhibitör etkinin görülmesi, çalışmaya aldığımız izolatlarda direnç mekanizmasının DAP proteinlerinin aşırı ekspresyonu sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, izolatlarda meropenemin MİK değerlerini düşüren ideal konsantrasyonlar belirlenmiş olmakla birlikte, kombinasyondaki konsantrasyonlara bakıldığında meropenemin miktarındaki artışın inhibitör konsantrasyonundaki azalmayla ya da inhibitör konsantrasyonundaki artışın meropenem konsantrasyonundaki azalmayla birlikte seyrettiği tespit edilmiştir. Ancak,



meropenemin konsantrasyonunun direnç sınırının altında olduğu konsantrasyonların tedavide tercih edilmesinin daha uygun olduğu düşünülmektedir. İnhibitörlerle yapılan çalışmalar, etkili olan yüksek ilaç konsantrasyonlarının direnç sınırının altına inmesine ve tedaviye tekrar kazandırılmalarına olanak sağlayabilir. Bununla birlikte Xu ve ark. [46] da belirttiği gibi, etkili ilaç konsantrasyonları düşürülerek toksik etki de azaltılabilir.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: S.Ö., A.S.S.; Tasarım: S.Ö., F.K.O.; Denetim: S.Ö., F.K.O.; Kaynaklar: S.Ö., F.K.O.; Malzemeler: A.S.S., G.K., S.Ö.; Veri Toplama ve/veya işleme: A.S.S., G.K.; Analiz ve/veya yorumlama: A.S.S., G.K., S.Ö., F.K.O.; Literatür taraması: A.S.S., G.K.; Makalenin yazılması: A.S.S., G.K.; Kritik inceleme: F.K.O., S.Ö.; Diğer: -

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## ETİK KURUL ONAYI

Çalışmamız için T.C. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 29.04.2015 tarihinde onay alınmıştır. Karar no: TUTF-BAEK-2015/55-08/10.

## KAYNAKLAR

1. Karagöl, Ç. (2008). Tıpta Uzmanlık Tezi. Hastane Kökenli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları ve İmipenem Dirençli İzolatların Genotiplenmesi. Tıp Fakültesi, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye.
2. Erbay, A. (2009). Yüksek Lisans Tezi. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Hastaneden Edinilmiş *Acinetobacter baumannii* Bakteriyemilerinde Fatalite Hızı ve İlgili Risk Etmenleri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
3. Zarrili, R., Giannouli, M., Tomasone, F., Triassi, M., Tsakris, A. (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *Journal of Infection in Developing Countries*, 1;3(5), 335-341. [CrossRef]
4. Yıldırım, Mustafa İ. (2006). Tıpta Uzmanlık Tezi. Sefaperazon-Sulbaktam, İmipenem ve Sefepimin Antibiyoterapi Etkinliklerinin Çoğul Dirençli ve Duyarlı *Acinetobacter baumannii* ile Oluşturulan Deneysel İkili Apse Modelinde Karşılaştırılması. Tıp Fakültesi, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye.

5. Moubareck, A.C., Halat, H.D. (2020). In sights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*, 12;9(3), 119. [\[CrossRef\]](#)
6. Yücesoy, M., Yuluğ, N., Kocagöz, S., Ünal, S., Çetin, S., Çalungu, S. And Study Group. (2000). Antimicrobial resistance of Gram-negative isolates from intensive care units in Turkey. Comparison to previous three years. *Journal of Chemotherapy*, 12, 294-298. [\[CrossRef\]](#)
7. Azap, Ö. (2012). MDR *Acinetobacter* infeksiyonlarında epidemiyolojik anlamda güncel durum. *ANKEM Dergisi*, 26, 283-286.
8. Dede, B., Kadanalı, A., Karagöz, G., Çomoğlu, Ş., Bektaşoğlu, M.F., Yücel, F.M. (2013). Yoğun bakım ünitesinde izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik dirençlerinin araştırılması. *Bakırköy Tıp Dergisi*, 9(1), 20-23. [\[CrossRef\]](#)
9. Dal, T., Dal, M., Agır, İ. (2012). *Acinetobacter baumannii*'de antibiyotik direnci ve AdeABC aktif pompa sistemleri: *Van Tıp Dergisi*, 19(3), 137-148.
10. Keyik, Ş. (2013). Yüksek Lisans Tez. *Acinetobacter baumannii* Suşlarında OXA-23 ve OXA-58 Tipi Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması ve PFGE Yöntemiyle Klonal Yakınlığının İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye.
11. Yolbaş, İ., Tekin, R., Güneş, A., Kelekçi, S., Şen, V., Tan, İ., Uluca, Ü. (2013). Bir üniversite hastanesindeki *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 4(3), 318-321. [\[CrossRef\]](#)
12. Özseven, A.G., Çetin-Sesli E., Arıdoğan, Cicioğlu B. (2012). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik direnç profilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 42(2), 55-60.
13. Saçar, S., Turgut, H., Cenger, H.D., Coşkun, E., Asan, A., Kaleli, İ. (2008). Post travmatik çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter baumannii* menenjitli olguda yüksek doz meropenem ile başarılı tedavi. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 1, 39-41.
14. Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J., Barbéa, J. (2019). Roles of efflux pumps from different superfamilies in the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 63, e02190-18. [\[CrossRef\]](#)
15. Işık, Y. (2008). Yüksek Lisans Tez. *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Kinolon Direncinin Moleküler Olarak Saptanması. Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
16. Pazarlı, O. (2010). Tıpta Uzmanlık Tezi. Kinolon Dirençli *Escherichiacoli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarında Direnç Genlerinin Araştırılması. Tıp Fakültesi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, Türkiye.
17. Coyne, S., Courvalin, P., Pe'richon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 947-953. [\[CrossRef\]](#)
18. Abdi, N.S., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Ashgarzadeh, M., Kafil, Samedi H. (2020). *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infectionand Drug Resistance*, 13, 423-434. [\[CrossRef\]](#)

19. Kor, S.B., Tou, B.S.Y., Chieng, C.K.L., Hiew, M.S.Y., Chew, C.H. (2014). Distribution of the multi drug efflux pump genes *adeA*, *adeI*, *adeJ*, *adeY* and integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Malaysian Hospitals. *Biomedical Research*, 25(2), 143-148.
20. Xing, L., Barnie, P.A., Su, Z., Xu, H. (2014). Development of efflux pumps and inhibitors (EPIs) in *A. baumannii*. *Clinical Microbiology*, 3, 135.
21. Dal, T., Dal, M., Ağır, İ. (2012). *Acinetobacter baumannii*'de antibiyotik Direnci ve AdeABC aktif pompa sistemleri, *Van Tıp Dergisi*, 19(3), 137-148.
22. Aygül, A. (2015). Antibiyotik direncinde dışa atım sistemlerinin ve dirençle mücadelede dışa atım pompa inhibitörlerinin önemi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(2), 278-291. [\[CrossRef\]](#)
23. Çoban, A.Y., Bayram, Z., Sezgin, F.M., Durupınar, B. (2009). Effect of efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazineto MIC values of ciprofloxacin in ciprofloxacin resistant Gram negative bacteria. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 43(3), 457-461.
24. Özseven, G.A., Çetin-Sesli E., Özseven, L. (2012). Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu? *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(3), 410-420.
25. Döşler, S., Gürler, B. (2006). Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin tek başına ve kombinasyon halindeki etkilerinin araştırılması. *ANKEM Dergisi*, 20(3), 173-179.
26. Clinical Laboratory Standards Institute. (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty first informational supplement. M100-S25. Wayne, Philadelphia.
27. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 2, July 2017.
28. Pendland, S.L., Messick, C.R., Jung, R. (2002). In vitro synergy testing of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin in combination with aztreonam, ceftazidime, or piperacillin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42, 75-78. [\[CrossRef\]](#)
29. Giacometti, A., Cirioni, O., Kamysz, W., D'Amato, G., Silvestri, C., Licci, A., Nadolski, P., Riva, A., Lukasiak, J., Scalise, G. (2005). In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for blood stream infections in neutropenic patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 235-240. [\[CrossRef\]](#)
30. Chan, B.C.L., Ip, M., Lau, C.B.S., Lui S.L., Jolivald, C., Ganem-Elbaz, C., Litaudon, M., Reiner, E N., Gong, H., See, H R., Fung, P K., Leung P C. (2011). Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA-overexpressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvatekinase. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 767-773. [\[CrossRef\]](#)
31. Yılmaz, S., Altınkanat-Gelmez, G., Bolelli, K., Guneser-Merdan, G., Over-Hasdemir, M.U., Yıldız, İ., Yalçın, İ., Akı-Yalçın, E. (2014). Pharmacophore generation of 2-substituted benzothiazoles as AdeABC efflux pump inhibitors in *A. baumannii*. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 25(7), 551-63. [\[CrossRef\]](#)

32. Turner, P.J., Greenhalgh, J.M. (2003). MYSTIC Study Group (Europe): The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 563-567. [\[CrossRef\]](#)
33. Sader, H.S., Castanheira, M., Mendes, R.E., Toleman, M., Walsh, T.R., Jones, R.N. (2005). Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *International Journal Antimicrobial Agents*, 25(1), 57-61. [\[CrossRef\]](#)
34. Güriz, H., Aysev, D., Yavuzdemir, Ş. (1999). Hastane enfeksiyonlarından etken olarak izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antimikrobilyallere duyarlılıkları. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 33(4), 289-296.
35. Çevik, F.Ç., Naz, H., Aykın, N., Korkmaz, P. (2010). Yunus Emre Devlet Hastanesi yoğun bakım ünitelerindeki *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları. 3.Türkiye EKMUD Kongresi, 12-16 Mayıs 2010, Ankara, p.120.
36. Kurtoğlu, M.G., Opuş, A., Kaya, M., Keşli, R., Güzelant, A., Yüksekaya, Ş. (2011). Bir eğitim ve araştırma hastanesinde klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibakteriyel direnç (2008-2010). *ANKEM Dergisi*, 25(1), 35-39. [\[CrossRef\]](#)
37. Ruiz, J., Núñez, M.L., Pérez, J., Simarro, E., Martínez-Campos, L., Gómez, J. (1999). Evolution of resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* over a 6-year period. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*, 18, 292-5. [\[CrossRef\]](#)
38. Van, Bambeke F., Balzi, E., Tulkens, M.P. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60(4), 457-70. [\[CrossRef\]](#)
39. Hasdemir, U. (2007). Çoklu İlaç Direncinde Bakteri Hücre Duvarı Organizasyonu ve Aktif Pompa Sistemlerinin Rolü. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 41, 309-327.
40. Marshall, R.L., Lloyd, G.S., Lawler, A.J. Element, J S., Kaur, J., Ciusa, Laura M., Ricci, V., Tschumi, A., Kühne, H., Alderwick, J L., Piddock, V J L. (2020). New Multi drug Efflux Inhibitors for Gram-Negative Bacteria. *ASM Journals/ mBio*, 11, e0134020. [\[CrossRef\]](#)
41. Çetinkaya, E., Çoban, A.Y., Durupinar, B. (2008). Investigation of the effect of efflux pump inhibitors to MIC values of ciprofloxacin in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 42(4), 553-561.
42. Coban, A.Y., Guney, K.A., Cayci, T.Y., Durupinar, B. (2011). Effect of 1-(1-Naphthylmethyl)piperazine, an Efflux Pump Inhibitor, on Antimicrobial Drug Susceptibilities of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Current Microbiology*, 62, 508-511. [\[CrossRef\]](#)
43. Pannek, S., Higgins, G.P., Steinke, P., Jonas, D., Akova, M., Bohnert, A, J., Seifert, H., Kern, V W. (2006). Multi drug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 970-974. [\[CrossRef\]](#)
44. Cortez-Cordova, J., Kumar, A. (2011). Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine - arginine  $\beta$ -naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, 420-424. [\[CrossRef\]](#)

45. Vera-Leiva, A., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C.A., Villagra, N., Domínguez, M., Bella-Toledo, H., González-Rocha, G. (2018). The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine  $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) increases resistance to carbapenems in Chilean clinical isolates of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, 73-76. [\[CrossRef\]](#)
46. Xu, C., Bilya, R.S., Xu, W. (2019). *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. Elsevier Ltd, *New Microbes and New Infections*, 30, 100549. [\[CrossRef\]](#)