



The Effect of Serum Proteins in *Acinetobacter baumannii* Strains on in-vitro Antibiotic Synergy Tests

Acinetobacter baumannii Suşlarında Serum Proteinlerinin in-vitro Antibiyotik Sinerji Testleri Üzerine Etkisi

İhsan Hakkı Çiftçi¹ | Elmas Pınar Kahraman Kılbaş² | İmdat Kılbaş³

¹Sakarya University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sakarya, Türkiye

²Fenerbahçe University, Vocational School of Health Services, Medical Laboratory Techniques Program, Istanbul, Türkiye

³Fenerbahçe University, Vocational School of Health Services, Dental Prosthesis Technology Program, Istanbul, Türkiye

ORCID: İHÇ: 0000-0002-9812-134X, EPKK: 0000-0003-1348-625X, İK: 0000-0002-8909-4140

Sorumlu Yazar | Correspondence Author

Elmas Pınar Kahraman Kılbaş

elmspnrkk@gmail.com

Address for Correspondence: Fenerbahçe University, Vocational School of Health Services, Medical Laboratory Techniques Program, Istanbul, Türkiye

Makale Bilgisi | Article Information

Makale Türü | Article Type: Araştırma Makalesi | Research Article

Doi: <https://doi.org/10.52827/hititmedj.1790145>

Geliş Tarihi | Received: 24.09.2025

Kabul Tarihi | Accepted: 27.01.2026

Yayın Tarihi | Published: 27.02.2026

Atıf | Cite As

Çiftçi İH, Kahraman Kılbaş EP, Kılbaş İ. The Effect of Serum Proteins in *Acinetobacter baumannii* Strains on in vitro Antibiotic Synergy Tests. Hitit Medical Journal 2026;8(1):95-102. <https://doi.org/10.52827/hititmedj.1790145>

Hakem Değerlendirmesi: Alan editörü tarafından atanan en az iki farklı kurumda çalışan bağımsız hakemler tarafından değerlendirilmiştir.

Etik Beyanı: Gerek yoktur.

İntihal Kontrolleri: Evet (intihal.net)

Çıkar Çatışması: Yazarlar çalışma ile ilgili çıkar çatışması beyan etmemiştir.

Şikayetler: hmj@hitit.edu.tr

Katkı Beyanı: Fikir/Hipotez: İHÇ; Tasarım: EPKK, İK; Veri Toplama/Veri İşleme: İHÇ, EPKK, İK; Veri Analizi: İHÇ, EPKK; Makalenin Hazırlanması: İHÇ, EPKK, İK

Hasta Onamı: Gerek yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2016-08-06-009 numarasıyla finanse edilmiştir.

Telif Hakkı & Lisans: Dergi ile yayın yapan yazarlar, CC BY-NC 4.0 kapsamında lisanslanan çalışmalarının telif hakkını elinde tutar.

Peer Review: Evaluated by independent reviewers working in at least two different institutions appointed by the field editor.

Ethical Statement: Not applicable

Plagiarism Check: Yes (intihal.net)

Conflict of Interest: The authors declared that they have no conflict of interest.

Complaints: hmj@hitit.edu.tr

Authorship Contribution: Idea/Hypothesis: İHÇ; Design: EPKK, İK; Data Collection/Data Gathering: İHÇ, EPKK, İK; Data Analysis: İHÇ, EPKK; Manuscript Preparation: İHÇ, EPKK, İK

Informed Consent: Not applicable

Financial Disclosure: This study was funded by the Sakarya University Scientific Research Projects Coordination with project number 2016-08-06-009.

Copyright & License: Authors publishing with the journal retain the copyright of their work licensed under CC BY-NC 4.0.

The Effect of Serum Proteins in *Acinetobacter baumannii* Strains on in vitro Antibiotic Synergy Tests

ABSTRACT

Objective: Antimicrobial resistance poses a critical threat to global health and significantly compromises the effectiveness of empirical antibiotic therapy. Therefore, the accuracy and reliability of antimicrobial susceptibility testing are of paramount importance. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of *Acinetobacter baumannii* strains against carbapenem group antibiotics and ampicillin-sulbactam combinations and the synergistic effects of these combinations in the presence of fetal bovine serum (FBS).

Material and Method: A total of 18 multidrug-resistant and two standard *A. baumannii* strains were included in the study. These strains were resistant to the carbapenem antibiotics meropenem (MEM), imipenem (IPM), and doripenem (DOR); the aminoglycosides gentamicin and tobramycin; and the quinolones ciprofloxacin and levofloxacin. Minimum inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration index (FICI) tests were performed in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Synergy analyses were conducted using the broth microdilution method, and tests were repeated following adaptation in FBS-supplemented medium.

Results: Resistance rates among the *A. baumannii* isolates were found to be 95% for IPM and MEM, 90% for DOR, and 85% for ampicillin-sulbactam (SAM). MIC₅₀/MIC₉₀ values were calculated as follows: SAM: 8/32 µg/mL, IPM: 32/32 µg/mL, MEM: 32/32 µg/mL, and DOR: 32/32 µg/mL. Among the combination therapies, SAM-DOR demonstrated the highest efficacy, exhibiting 15% synergy and 45% partial synergy. An increase in the MIC values of the antibiotics was observed in the presence of fetal bovine serum.

Conclusion: As a result of the study, although some antibiotic combinations showed synergistic effects, it was concluded that the evaluation of antibiotic combinations requires test protocols that take into account not only microbiological data but also host factors.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Antibiotic combination, Minimum inhibitory concentration, Synergy.

Acinetobacter baumannii Suşlarında Serum Proteinlerinin in vitro Antibiyotik Sinerji Testleri Üzerine Etkisi

ÖZ

Amaç: Antimikrobiyal direnç, küresel sağlık açısından kritik bir tehdit olup ampirik antibiyotik tedavisinin etkinliğini ciddi biçimde azaltmaktadır. Bu nedenle, antibiyotik duyarlılık testlerinin doğruluğu ve güvenilirliği büyük önem taşır. Bu çalışmanın amacı, *Acinetobacter baumannii* suşlarının karbapenem grubu antibiyotikler ve ampicilin-sulbaktam kombinasyonlarına karşı *in vitro* etkinliğini ve fetal bovin serum (FBS) varlığında bu kombinasyonların sinerjistik etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya 18 çoklu dirençli ve iki standart *A. baumannii* suşu dahil edildi. Bu suşlar, karbapenem grubu antibiyotiklerden meropenem (MEM), imipenem (IPM) ve doripenem (DOR); aminoglikozid grubundan gentamisin ve tobramisine; kinolon grubundan siprofloksasin ve levofloksasine dirençliydi. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) testleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) rehberine uygun olarak uygulandı. Sinerji analizleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle yapılmış ve FBS ortamında adaptasyon sonrası testler tekrarlandı.

Bulgular: *Acinetobacter baumannii* izolatlarında direnç oranları IPM ve MEM için %95, DOR için %90, sulbaktam-ampicilin (SAM) için %85 olarak saptandı. MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri sırasıyla SAM: 8/32, IPM: 32/32, MEM: 32/32, DOR: 32/32 µg/mL olarak hesaplandı. Kombinasyon testlerinde SAM-DOR kombinasyonu %15 sinerji ve %45 kısmi sinerji ile en etkili çift olarak bulundu. Fetal bovin serum içeren ortamda antibiyotiklerin MİK değerlerinin arttığı gözlemlendi.

Sonuç: Çalışma sonucunda, bazı antibiyotik kombinasyonları sinerjik etki gösterse de sonuç olarak, antibiyotik kombinasyonlarının değerlendirilmesinde sadece mikrobiyolojik veriler değil, aynı zamanda konak faktörlerinin de dikkate alındığı test protokollerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, Antibiyotik kombinasyonu, sinerji, Minimum inhibitör konsantrasyon,

Giriş

Antimikrobiyal direnç, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tanımladığı küresel sağlık hizmetleriyle ilişkili en önemli problemler arasında bulunmaktadır. Çağımızda sessiz pandemi olarak belirtilen antibiyotik direnci beklenenin üzerinde bir duruma ulaşmıştır. Ampirik antibiyotik tedavisinin yaklaşık %40'ının başarısız olması pek çok tıbbi uygulama için önemli zorluklara yol açmıştır (1, 2). Tedavideki başarısızlıklar nedeniyle enfeksiyon yönetiminde uygun antibiyotik seçimine ek olarak, tedavi kararında kritik olan laboratuvar testlerinin de doğru, güvenilir ve etkin bir şekilde yürütülmesi gerekmektedir. Zira, bu süreçte ortaya çıkacak hatalar klinik sonuçları olumsuz etkilemenin yanı sıra, antimikrobiyal direncin hastane ve toplum genelinde hızla yayılmasına da neden olabilir.

Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) testi, bakterilerin üremesini durdurmak için gerekli olan en düşük antibiyotik konsantrasyonunu belirleyerek tedavi sürecinde optimum ilaç ve dozajın seçilmesini sağlar (3). Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK), incelenen mikroorganizmanın %99,9'unu öldüren en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu (mg/L veya µg/ml) olarak tanımlanır (4). Minimum Bakterisidal Konsantrasyon testi, serum bakterisidal titre (SBT) ve time-kill eğrisinin belirlenmesi gibi aşamalardan oluşur. Ancak, teknik olarak zordur ve yorumlama standartları tartışmalıdır. Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyon (FİK) değeri ise, antimikrobiyaller için sinerji belirleyicisi olarak bilinir (5). Kombine antibiyotiklerin sinerjistik, aditif veya antagonist etkilerini belirlemeye yardımcı olur.

Bu testler, teorik olarak etkili görünse de pratikte çeşitli teknik sorunlarla karşılaşılmaktadır. Özellikle mikroorganizma ve antimikrobiyal maddenin 0,1 mL veya daha düşük hacimlerde aktarılması sırasında hacim kontrolü, viskozite, yüzey gerilimi ve kullanılan pipet sistemlerinin standardizasyonu gibi zorluklar testlerin doğruluğunu olumsuz etkileyebilmektedir (6, 7).

Bu teknik problemlere ek olarak, biyolojik faktörler de antimikrobiyal duyarlılık testlerinin

sonuçlarını etkileyebilmektedir. Özellikle serum proteinlerine bağlanma, antimikrobiyallerin serbest fraksiyonunu azaltarak ilacın hedef bölgeye ulaşmasını ve farmakolojik etkisini sınırlandırabilir. Bazı çalışmalarda, MİK ile gerçek serum konsantrasyonları arasındaki uyumsuzluğun tedavi başarısızlıklarına yol açabileceği belirtilmektedir (8-10). Serum proteinlerine bağlanma özelliği olan antibakteriyel ilaçların etkinliği, serum içeren ortamlarda standart mikrobiyolojik ortamlara kıyasla daha belirgin biçimde azalmaktadır (11).

Bu çerçevede, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin güvenilirliğini etkileyen metodolojik ve biyolojik değişkenlerin değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Testlerin uygulanmasında karşılaşılan hacimsel aktarım sorunları ve kullanılan pipetleme sistemlerinin standardizasyonundaki yetersizlikler test sonuçlarında önemli sapmalara yol açabilmektedir. Ayrıca, duyarlılık testi sonuçlarında serum proteini gibi biyolojik bileşenlerin dikkate alınmaması, antimikrobiyal ajanların serbest fraksiyonunun yanlış değerlendirilmesine neden olabilir. Bu tür değişkenlerin göz ardı edilmesi, MİK ve FİK gibi değerlerin güvenilirliğini azaltmakta ve laboratuvar testlerinin tekrarlanabilirliğini sınırlamaktadır. Bu bağlamda, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde hem teknik doğruluğu artıracak uygulamaların belirlenmesi hem de deneysel koşulların optimize edilerek daha standardize hale getirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı, *A. baumannii* suşları üzerinde ampicilin-sulbaktam (SAM), imipenem (IPM), meropenem (MEM) ve doripenem (DOR) antibiyotiklerinin tek başına ve kombinasyon halinde *in vitro* etkinliklerinin değerlendirilmesi, FBS varlığının antibiyotik duyarlılığı ve kombinasyon sinerjisi üzerindeki etkilerinin ortaya konmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2016-08-06-009 numarasıyla finanse edildi.

Çalışmada kullanılan tüm materyaller (bakteri kökenleri, serum vb.) laboratuvar araştırmaları için üretilen ticari ürünlerden oluşmakta olup, deneyler boyunca hiçbir insan ya da hayvandan örnek alınmadı. Bu nedenle, etik kurul onayı veya bilgilendirilmiş onam gerekmemektedir. Çalışmaya İhsan Hakkı Çiftçi'nin anonimleştirilmiş kişisel bakteri koleksiyonundan alınan 18 çoklu ilaca dirençli (ÇİD) ve iki standart suş dahil edildi. Standart suşların biri (*A. baumannii* ATCC 19606) duyarlı, diğeri (*A. baumannii* ATCC BAA-1605) ÇİD idi.

Minimum inhibitör konsantrasyon testlerinde preanalitik hataların ortadan kaldırılması ve mikropklara eşit miktarda, hızlı ve güvenilir sıvı transferi için;

- Çok kanallı otomatik pipetler,
- Steril silikon yüzeyli plastik pipet uçları,
- Steril plastik pipet uçları kullanıldı.

Çalışmada kullanılan *A. baumannii* suşları, -80°C'de boncuklu besiyerinde saklanan izolatlardan temin edildi. Deney öncesi, bakteriler Mueller-Hinton agar (MHA) ortamında çizgi plaka yöntemiyle inoküle edilerek 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Ardından, petride üremiş olan kolonilerin serum fizyolojik içerisinde süspansiyonu hazırlanarak, 0,5 McFarland standardına (10^8 cfu /ml) göre bulanıklığı ayarlandı.

Bakterilerin serum ortamına adaptasyonu için kültürlerden her 24 saatte bir 1:10 oranında taze %10 FBS içeren Katyon Ayarlanmış Mueller-Hinton Sıvı Besiyeri (CAMHB) ortamına pasaj yapıldı. Bu işlem toplamda üç ardışık gün boyunca tekrarlandı. Her pasaj sonunda kültürlerin bulanıklığı spektrofotometre ile kontrol edildi. Adaptasyon sürecinin sonunda elde edilen FBS ile adapte bakteri süspansiyonları antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanıldı.

Suşların SAM, IPM, MEM ve DOR antibiyotiklerine karşı antibiyotik duyarlılıkları altın standart kabul edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI önerileri doğrultusunda saptandı ve her antibiyotiğin bazal MİK değeri hesaplandı (12). Mikrodilüsyon için ilk olarak, tüm kuyucuklara CAMHB eklendi. Antibiyotiklerin uygun

çözücülerde stok solüsyonları hazırlandı. İlk kuyucuğa 0,1 ml antibiyotik süspansiyonu eklenerek, iki kat dilüsyonlar yapıldı ve en son kuyucuktan 0,1 ml dışarı atıldı. 0,5 McFarland standardında hazırlanmış olan bakteri süspansiyonları her bir kuyucukta antibiyotik çözeltisi ile inkübe edildi. Her plakta bir sterilite kontrol (negatif kontrol) ve bir de üreme kontrol (pozitif kontrol) kuyucuğu bırakıldı. 37°C'de 18-24 saat süren inkübasyonun ardından, üremenin olmadığı kuyucuk, MİK değeri olarak tespit edildi.

Çalışmamızda, spektrofotometre ile 450 nm'de başlangıç optik yoğunluklar (OD) saptandı. Sonrasında 20 izolat 35°C'de 18 saat inkübe edildi ve final OD değerleri spektrofotometrik olarak (mikrodilüsyon kuyucuğundan çıkan ışık şiddetinin kuyucuğa giren ışık şiddetine oranı (I/I_0), transmittans (T)) kaydedildi (13).

Aynı deneyler çoklu pasajlarla inaktive FBS'de üremeye adapte edilen 20 izolatla tekrarlanarak, SAM, IPM, MEM ve DOR için MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptandı. Böylece, serumun antibiyotik duyarlılığına etkisi ve FİK değerleri ortaya konmaya çalışıldı. Çoklu pasajlarla FBS'de üremeye adapte edilen bakteri izolatlarıyla yapılan deneyde, 20 izolat %5'lik FBS içeren CAMHB besiyerine aktarıldı ve inkübe edildi. Her 24 saatte bir, bakteri kültürleri yeni FBS içeren besiyerine aktarıldı. Bu işlem, bakterilerin çevreye uyum sağlayabilmesi için beş pasaj boyunca tekrarlandı. Sonrasında, adaptasyon sürecinden geçen bakteriler üzerinde antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı.

İzolatlar üzerinde SAM-IPM, SAM-MEM, ve SAM-DOR antibiyotik kombinasyonlarının etkileri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile test edildi. FİK değerleri:

- $FİK_A = B$ 'nin varlığında A'nın MİK değeri / Tek başına A'nın MİK değeri
- $FİK_B = A$ 'nın varlığında B'nin MİK değeri / Tek başına B'nin MİK değeri

$$\Sigma FİK \text{ indeksi} = FİK_A + FİK_B$$

Kombinasyonlarda;

- $\Sigma FİK \leq 0,5$ ise sinerji;
- $0,5 < \Sigma FİK > 1$ ise görece sinerji;

- $\Sigma_{FIK} = 1$ ise aditif;
- $1 < \Sigma_{FIK} < 4$ ise etkisiz,
- $\Sigma_{FIK} \geq 4$ ise antagonistik etki olarak ifade edildi (14).

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS yazılımı (IBM SPSS Statistics, Version 25.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Bakterilerin antibiyotiklere direnç oranları frekans ve yüzde dağılımları ile tanımlandı. $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri, antibiyotiklerin etki düzeylerini temsil edecek şekilde tanımlayıcı istatistiklerle belirlendi. Kombinasyon çalışmalarında sinerji, kısmi sinerji, antagonizma, aditif etki ve etkisizlik yorumları fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (Σ_{FIK}) hesaplanarak değerlendirildi. Kombinasyonlar arasındaki sinerjik etki düzeylerinin karşılaştırılmasında ve farklı koşullarda saptanan Σ_{FIK} değerlerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi uygulandı. Normal dağılım varsayımı sağlanmayan veriler için parametrik olmayan testler tercih edildi. Tüm analizlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 18 *A. baumannii* suşunda IPM, MEM, DOR ve SAM için direnç oranları sırasıyla %95, %95, %90 ve %85 olarak saptandı. Kullanılan antibiyotiklerin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri Tablo I'de gösterildi.

Tablo I. *Acinetobacter baumannii* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı saptanan $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri.

Antibiyotik	$MİK_{50}$ ($\mu g/mL$)	$MİK_{90}$ ($\mu g/mL$)
SAM	8	32
IPM	32	32
MEM	32	32
DOR	32	32

*DOR: Doripenem, IPM: İmipenem, MEM: Meropenem, SAM: Ampisilin-sulbaktam.

Kombinasyon deneyleri sonucunda antagonistik etki saptanmazken, SAM-IPM, SAM-MEM ve SAM-DOR kombinasyonlarında kısmi sinerji saptandı. SAM-DOR kombinasyonunda diğer kombinasyonlardan daha yüksek sinerji

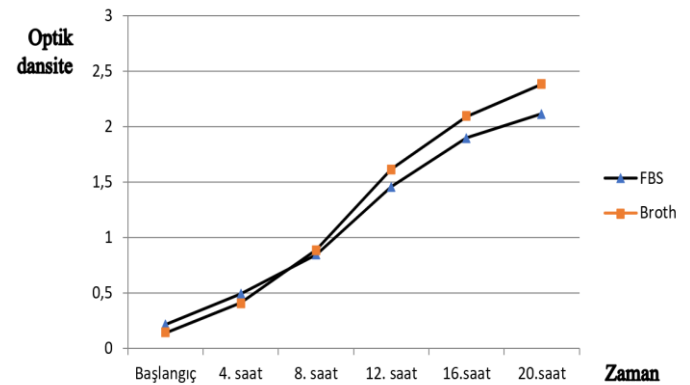
bulundu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$). En düşük sinerji ve kısmi sinerji oranı SAM-IPM kombinasyonunda bulundu. Antibiyotik kombinasyonları ile irdelenen kökenlere ait tüm Σ_{FIK} değerleri Tablo II'de gösterildi.

Tablo II. Antibiyotik kombinasyonlarının Σ_{FIK} verileri.

Kombinasyon	Sinerji	Kısmi sinerji	Aditif	Etkisiz	Antagonizma	Toplam
SAM-IPM	2 (%10)	6 (%30)	-	14 (%60)	-	20
SAM-MEM	2 (%10)	7 (%35)	1 (%5)	11 (%50)	-	20
SAM-DOR	3 (%15)	9 (%45)	2 (%10)	6 (%30)	-	20

*DOR: Doripenem, IPM: İmipenem, MEM: Meropenem, SAM: Ampisilin-sulbaktam.

Spektrofotometrik ölçümlerde; inaktive FBS içinde üreyen mikroorganizma yoğunluğu ile sıvı besiyerinde üreyen mikroorganizma yoğunlukları arasında farklılık saptanmadı. Hem inaktive FBS hem de sıvı besiyeri için elde edilen OD/zaman eğrileri Şekil I'de verildi.



Şekil I. Sıvı Besiyeri ve FBS Ortamında Mikroorganizmaların Üremeleri için OD Değerleri

FBS ile yapılan çalışmalarda SAM-IPM, SAM-MEM, ve SAM-DOR için sinerji ve kısmi sinerjik etkide ciddi azalma saptandı ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). SAM-IPM, SAM-MEM ve SAM-DOR kombinasyonlarında kısmi antagonizma olarak yorumlanabilecek değerler bulundu. Fetal bovin serumun sinerji ya da kısmi sinerji yönündeki etkiyi azalttığı, göreceli olarak antagonizma yönünde etkiyi arttırdığı gözlemlendi. Elde edilen veriler Tablo III'te özetlendi.

Tablo III. Fetal bovin serum ortamında üreyen suşların antibiyotik kombinasyonlarının $\Sigma_{\text{FİK}}$ verileri.

Kombinasyon	Sinerji	Kısmi sinerji	Aditif	Etkisiz	Antagonizma	Toplam
SAM-IPM	1 (%5)	2 (%10)	1 (%5)	13 (%65)	3 (%15)	20
SAM-MEM	1 (%5)	2 (%10)	3 (%15)	12 (%60)	2 (%10)	20
SAM-DOR	1 (%5)	3 (%15)	2 (%10)	12 (%60)	2 (%10)	20

*DOR: Doripenem, IPM: İmipenem, MEM: Meropenem, SAM: Ampisilin-sulbaktam.

Tartışma

Gram negatif bakterilerde artan antibiyotik direncine nedeniyle, mevcut antimikrobiyal ajanların etkinliğinin artırılması amacıyla alternatif kullanım stratejileri giderek daha fazla değerlendirilmektedir. Antibiyotikler arasında sinerjik aktivite oluşturarak antimikrobiyal aktiviteyi artırmak ve tedavi süresince direnç gelişimini azaltmak amacıyla kombine tedaviler gündeme gelmiştir (15).

Karbapenemlere dirençli *A. baumannii* izolatları, tedavi seçeneklerini ciddi şekilde sınırlayan ve mortalite oranlarını artıran ÇİD bakteriler arasında yer alması nedeniyle günümüzde en kritik patojen gruplarından biridir (16). Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin CRAB enfeksiyonlarının tedavisine ilişkin Kılavuzu'na (2024) göre, en az iki etkenin kombinasyonu önerilmektedir. Ayrıca, bu kombinasyonlarda en az bir antibiyotığın sulbaktam bazlı olması önerilmektedir (17). Yapılan çalışmalarda, sulbaktam ile kombine edilen karbapenemlerin sınırlı düzeyde sinerjik etki gösterdiği bildirilmiş olsa da; ampisilin-sulbaktam ile doripenem, imipenem ve meropenem gibi karbapenem grubu antibiyotiklerin etkileşim mekanizmalarının moleküler düzeyde karakterizasyonu açıklığa kavuşturulması gereken bir konudur (18, 19). Ülkemizde karbapenemlere dirençli *A. baumannii* izolatlarında kolistin - ampisilin - sulbaktam kombinasyonunun *in vitro* etkinliğini değerlendiren bir çalışmada, sinerjik etkinin özellikle kolistine dirençli suşlarda daha belirgin olduğu, kolistine duyarlı izolatlarda ise antagonistik etki görüldüğü bildirilmiştir (20). Başka bir araştırmada, ÇİD *A. baumannii* suşlarında imipenem ve ampisilin-sulbaktam

(%15), imipenem ve amikasin (%7,5) kombinasyonlarının sinerjik veya kısmi sinerjik etki oluşturduğu bildirilmiştir (21). Ayrıca, literatürde sulbaktam-durlobaktam kombinasyonunun, *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleks izolatlarının %98,3'ünde inhibisyon sağladığı, özellikle ÇİD ve genişletilmiş ilaç dirençli izolatlarda yüksek etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının %80'inden fazlasında, sulbaktamın tek başına kullanımına kıyasla dört kat daha düşük MİK değerleri gözlemlendiği de ifade edilmiştir (22).

Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine veya alternatif tedavi stratejilerinin uygulanmasına rağmen, *A. baumannii* izolatları kromozomal mutasyonlar, plazmidler, transpozonlar ve integronlar gibi genetik elemanlar aracılığıyla antimikrobiyal direnç kazanımına son derece yatkındır (23). Bu durum, direnç mekanizmalarının hızla yayılmasına neden olmaktadır. Ayrıca, antimikrobiyal direnç gelişiminin en önemli etkenlerinden olan yanlış, gereksiz veya uygunsuz antibiyotik kullanımı, antibiyoterapi planlamasında mutlaka dikkate alınması gereken kritik bir risk faktörüdür (24).

Çalışmamıza dahil edilen *A. baumannii* suşlarında %90'ın üzerinde karbapenem direnci saptandı. İmipenem, meropenem ve doripeneme karşı gözlenen yüksek direnç oranları, bu ajanların monoterapi olarak etkinliğini sınırlamaktadır. Buna karşılık, ampisilin-sulbaktama karşı saptanan nispeten daha düşük direnç oranı ve daha düşük MIC₅₀ değeri, bu ajanın özellikle kombinasyon tedavilerinde potansiyel bir seçenek olabileceğine işaret etmektedir. Kombinasyon testlerinde, en yüksek *in vitro* etkinlik ampisilin-sulbaktam-doripenem kombinasyonunda gözlenmiştir. Elde edilen veriler, ampisilin-sulbaktam bazlı kombinasyonların umut vaat ettiğini göstermekte, ancak bu etkinliğin klinik düzeyde doğrulanması için güncel *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, ÇİD *A. baumannii* izolatlarında antibiyotik direnci sorununa çözüm arayışının yanı sıra, tartışmalı olan antimikrobiyal-serum proteinleri ilişkisi de incelenmiştir. Elde edilen veriler, kombinasyon tedavilerinde serum

proteinlerinin antibiyotik etkinliği üzerinde potansiyel olarak olumsuz etkiler oluşturabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu verilerin desteklenmesi için ileri çalışmalarda biyokimyasal ve farmakolojik açıdan daha detaylı analizlerle desteklenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, mikroorganizmaların genetik özelliklerinin bu etkileşimler üzerindeki rolü de önemli bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmaktadır.

Antibiyotiklerin farmakokinetik özellikleri, plazma proteinlerine bağlanma derecelerine bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik göstermektedir (25). Albümin, glikoproteinler, lipoproteinler ve çeşitli globulin fraksiyonları gibi serum bileşenlerine bağlanan antibiyotiklerin serbest fraksiyonları azaldıkça, antimikrobiyal etkinliklerinde de belirgin bir düşüş gözlenmektedir. *Enterobacter cloacae* ve *Staphylococcus aureus* suşlarında ertapenemin insan serumunda proteinlere bağlanma oranlarının arttıkça serbest ilaç konsantrasyonlarının düştüğü ve antibakteriyel etkinliğin azaldığı bildirilmiştir. İnsan serumunun arttığı ortamlarda, antibiyotiklerin etkinliğinin sabit kaldığı, ancak ilaçların proteinlere bağlı kısmı arttıkça EC₅₀ değeri yükseldiği ifade edilmiştir (11). Son yıllarda dirençli bakterilere karşı potansiyel tedavi ajanları olarak öne çıkan antimikrobiyal polimerlerin etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, FBS ortamında polimerlerin *S. aureus* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini artırdığı, *Escherichia coli* üzerindeki etkinliğini azalttığı bildirilmiştir (26). Literatürde yer alan farklı bulgular, kullanılan ortam koşulları, antimikrobiyaller ve bakteri türüne bağlı olarak serumun etkisinin değişebileceğini göstermektedir. Başka bir çalışmada, sefazolinin farklı tür canlılardan (insan, sığır, sıçan) elde edilen plazmalardaki bağlanma oranları ve bu durumun *E. coli* üzerindeki üreme inhibisyonuna etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçlar, özellikle yüksek plazma oranlarında (%70) bakteri üremesinde anlamlı azalma olduğunu, ancak düşük plazma oranlarında bağlanmanın antibiyotik etkinliğini sınırlayarak bakteri üremesini artırabildiğini ortaya koymuştur. Türler arasındaki protein bağlanma farklılıkları, prelinik

modellerden elde edilen farmakokinetik ve farmakodinamik bulguların insanlar üzerinde yapılan uygulamalara doğrudan aktarılmasında önemli bir sınırlılık oluşturmakta ve bu nedenle translasyonel süreçlerde bu sınırlılık göz önünde bulundurulmalıdır (27).

Çalışmamızda, serum içeren ortam koşullarında yapılan kombinasyon testlerinde sinerjik etkinliğin anlamlı düzeyde azaldığı ve antagonistik etkilerin arttığı saptanmıştır. Bu durum, antibiyotiklerin özellikle serum albüminine bağlanma eğilimlerinin, *in vitro* test sonuçlarını etkileyebilecek önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Özellikle karbapenemlerin serum proteinlerine büyük oranda bağlanma eğilimi, bu ajanların serbest ve biyolojik olarak aktif fraksiyonlarını azaltmakta ve böylece antibakteriyel etkilerini sınırlamaktadır (15). Bu bağlamda, serum içeren ortamların kullanımı, antibiyotiklerin gerçek biyoyararlanımlarını ve klinik etkinliklerini daha doğru yansıtan *in vitro* değerlendirmeler yapılmasını mümkün kılmaktadır.

Sonuç

İncelenen suşlarda karbapenemlere yüksek direnç oranları saptanmış ve ampisilin-sulbaktam-karbapenem kombinasyonlarında *in vitro* kısmi sinerji saptanmıştır. Bununla birlikte, FBS içeren ortamda antibiyotiklerin sinerji/kısmi sinerji etkisinin anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Standart *in vitro* deney ortamında elde edilen sinerji sonuçlarının, konakla ilişkili faktörleri yansıtan ortam koşullarının dikkate alınması önerilmektedir.

Ayrıca, çalışmamız yürütüldüğü dönemde ülkemizde geçerli olan CLSI rehberlerine göre gerçekleştirilmiş olup, gelecekte yapılacak çalışmalarda metodun EUCAST rehberi kullanılarak planlanmasının literatüre ek katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022;399:629-655.
2. World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). Geneva: World Health Organization; 2022.
3. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Definitive document: Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:291-296.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. CLSI; 1999.
5. Hall MJ, Middleton RF, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J Antimicrob Chemother* 1983;11:427-433.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S24. CLSI; 2014.
7. Stratton CW, Weinstein MP, Reller LB. Correlation of serum bactericidal activity with antimicrobial agent level and minimal bactericidal concentration. *J Infect Dis* 1982;145:160-168.
8. Yalçın N, Akkaya M, Demirkan K. Ekstrakorporeal membran oksijenizasyonunda ilaç ve doz optimizasyonu. *J Turk Soc Intens Care* 2024;22:1-14.
9. Chambers HF, Mills J, Drake TA, Sande MA. Failure of a once daily regimen of cefonicid for treatment of endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Rev Infect Dis* 1984;6:870-874.
10. Reller LB. The serum bactericidal test. *Rev Infect Dis* 1986;8:803-808.
11. Nix DE, Matthias KR, Ferguson EC. Effect of ertapenem protein binding on killing of bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3419-3424.
12. Choi JY, Park YS, Cho CH, et al. Synergic in-vitro activity of imipenem and sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:1098-1101.
13. Gavin JJ. Analytical microbiology: I. The test organism. *Appl Microbiol* 1956;4:323-331.
14. Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 1995;47:331-385.
15. Si Z, Pethe K, Chan-Park MB. Chemical Basis of Combination Therapy to Combat Antibiotic Resistance. *JACS Au* 2023;3(2):276-292.
16. Boutzoukas A, Doi Y. The global epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *JAC Antimicrob Resist*. 2025;7(4):dlaf134.
17. Tamma PD, Heil EL, Justo JA, Mathers AJ, Satlin MJ, Bonomo RA. Infectious Diseases Society of America 2024 Guidance on the Treatment of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections. *Clin Infect Dis* 2024;Ahead of Print:ciae403
18. Spervovasilis N, Ishak A, Tsioutis C, Alon-Ellenbogen D, Agouridis AP, Mazonakis N. Sulbactam for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a literature review. *JAC Antimicrob Resist* 2025;7(2):dlaf055.
19. Yilmaz GR, Guven T, Guner R, Kocak Tufan Z, Izdes S, Tasyaran MA, et al. Colistin alone or combined with sulbactam or carbapenem against *A. baumannii* in ventilator-associated pneumonia. *J Infect Dev Ctries* 2015;9(5):476-485.
20. Çıkman A, Ceylan MR, Parlak M, Karahocagil MK, Berktaş M. İmipeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında kolistin-ampisilin/sulbaktam kombinasyonu etkinliğinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2013;47:147-151.
21. Alada DM, Altıparlak U, Coskun MV. Çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının *Acinetobacter* suşları üzerine in vitro etkinliğinin araştırılması. *ANKEM Derg* 2017;31:23-31.
22. Karlowsky JA, Hackel MA, McLeod SM, Miller AA. In vitro activity of sulbactam-durlobactam against global isolates of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex collected from 2016 to 2021. *Antimicrob Agents Chemother* 2022;66:e0078122.
23. Emamgholizadeh Malekshah F, Gholami M, Pahlavanian, M, Goli HR. Investigating the prevalence of class 1, 2, and 3 integrons in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wound infections. *Sci Rep* 2025;15:31857.
24. Shi J, Mao X, Sun F, et al. Epidemiological characteristics and antimicrobial resistance of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in ICU wards. *Microbiol Spectr* 2025;13:e0261924.
25. Tanaka R. Pharmacokinetic variability and significance of therapeutic drug monitoring for broad-spectrum antimicrobials in critically ill patients. *J Pharm Health Care Sci* 2025;11(1):21.
26. Sovadinová I, Kuroda K, Palermo EF. Unexpected enhancement of antimicrobial polymer activity against *Staphylococcus aureus* in the presence of fetal bovine serum. *Molecules* 2021;26:4512.
27. Ahmed H, Böhmendorfer M, Eberl S, Jäger W, Zeitlinger M. Interspecies variability in protein binding of antibiotics basis for translational PK/PD studies-a case study using cefazolin. *Antimicrob Agents Chemother* 2024;68:e0164723.