



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

***Acinetobacter baumannii* İZOLATLARINDA
PLAZMİT ARACILI PAMC VE BETA-LAKTAMAZ
DİRENÇ GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

Rand Kamil Majeed JAWAHERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR-ŞUBAT/2024



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

Acinetobacter baumannii İZOLATLARINDA
PLAZMİT ARACILI PAMC VE BETA-LAKTAMAZ
DİRENÇ GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Rand Kamil Majeed JAWAHERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU

KIRŞEHİR-ŞUBAT/2024

Bu çalışma, 12.02.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Organik Kimya Programında Yüksek Lisans tezi/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

Samsun Üniversitesi

Prof. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Rand Kamil Majeed JAWAHERİ



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başlamamda ve yüksek lisans ders sürecinde kendisini tanıdığım günden bu yana gösterdiği sakin ve sabırlı hali ile her zaman bana örnek olmasının yanı sıra bir bilim insanının nasıl çalışması gerektiğini kendisinden öğrendiğim değerli danışmanım Prof. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU'na, Tıp Fakültesi Temel Tıp Bölümleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cihat ÖZTÜRK'e, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Elif SEVİM'e, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Fatma FİLİZ'e ve Uzm. Dr. Rukiye AKYOL'a büyük bir içtenlikle teşekkür ederim.

Tezimi, benim her zorluğumda yanımda olan canım aileme ithaf ederim.

Rand Kamil Majeed JAWAHERI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Tarihçesi	5
2.2. <i>Acinetobacter</i> 'in Genel Özellikleri	6
2.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Genel Özellikleri	7
2.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Genetik Özelliği	8
2.3. Epidemiyoloji	9
2.4. Patoloji	10
2.4.1. Biyofilm Oluşumu	11
2.4.2. Dış Zar Proteinleri.....	12
2.4.3. Biyofilmle İlişkili Protein.....	12
2.4.4. Kapsül	12
2.4.5. Lipopolisakkarit (LPS).....	13
2.4.6. Penisilin Bağlayıcı Proteinler	13
2.5. Antibiyotikler	13
2.5.1. Beta-Laktamlar	14
2.5.1.1. Penisilin	14
2.5.1.2. Sefalosporinler	14
2.5.1.3. Karbapenemler	15
2.5.1.4. Monobaktamlar	15
2.5.2. Aminoglikozitler	15
2.5.3. Kinolonlar.....	16
2.6. Antibiyotik Direncinin Ana Mekanizmaları	16
2.6.1. Direnç Mekanizmaları.....	16

2.6.1.1. β -Laktamaz Enziminin Üretimi	16
2.6.1.2. Dış Zar Proteinlerindeki (OMP) Değişiklikler	18
2.6.1.3. Hedef Sitelerdeki PBP'lerin Değiştirilmesi.....	19
2.6.1.4. Akış Pompaları	19
2.6.1.5. Konjugasyon	20
3. GEREÇ-YÖNTEM.....	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> İzolatları	21
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	22
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	22
3.1.4. Agaroza Jel.....	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Beta-Laktam Direnç Genlerinin Belirlenmesi	24
3.2.2. Konjugasyon.....	28
3.2.3. Plazmid DNA Ekstraksiyonu	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA-SONUÇ	37
KAYNAKLAR	44
EKLER	64
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Beta-laktam antibiyotiğin temel yapıları.....	14
Şekil 4.1. Pozitif β -laktamaz ve pAmpC direnç genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	33
Şekil 4.2. Muller-Hinton agar üzerinde transgonjuge edilmiş <i>Acinetobacter baumannii</i> örneklerinin antibiyotik duyarlılık testi.....	34
Şekil 4.3: BlaTEM, blaSHV genlerinin etidyum bromür ile agaroz jel elektroforez sistemine taşınmasıyla elde edilen görüntü.....	35
Şekil 4.4: blaTEM, blaSHV, blaOXA-1 ve balCTX-m1 genlerinin etidyum bromürlü agaroz jel elektroforez sistemine taşınmasıyla elde edilen görüntü.....	35
Şekil 4.5: balCTX-m2 geninin etidyum bromür ile agaroz jel elektroforez sistemine taşınmasıyla elde edilen görüntü.....	36

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: <i>A. baumannii</i> izolatlarının elde edildiği klinik örnek türleri.....	21
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan cihazlar.....	22
Tablo 3.3: Araştırmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar.....	23
Tablo 3.4: <i>A. baumannii</i> izolatlarında plazmid aracılı beta-laktamaz direnç genleri.....	26
Tablo 3.5: <i>A. baumannii</i> izolatlarında beta-laktamaz direnç genlerinin amplifikasyonu için yapılan 35 siklusa uygulanan termal döngü cihazı şartları.....	27
Tablo 3.6: <i>A. baumannii</i> izolatlarında pAmpC genlerinin tespiti için kullanılan Multiplex PCR’da kullanılan karışımlar.....	27
Tablo 4.1: Örnek türüne göre örnek dağılımı.....	29
Tablo 4.2: Hastane Karmed sisteminde çalışmada kullanılan <i>A. baumannii</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.....	29
Tablo 4.3.A: <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarından PCR ile tespit edilen plazmid aracılı B-laktam direnç genlerinin dağılımı.....	30
Tablo 4.3.B: <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarından PCR ile tespit edilen plazmid aracılı AmpC direnç genlerinin dağılımı.....	31
Tablo 4.4: Mueller-Hinton agarda Tc24-Tc26- Tc28 ve E.coli j53 numuneleri için transkonjugasyon yapılan numunelerin antibiyotiklerle uygulanan testi (Kirby Bauer yöntemi).....	33

KISALTMA LİSTESİ

ABC	:ATP Bağlayıcı Kaset Ailesi
ADC	:Acinetobacter Türevi Sefalosporinaz
ARDS	:Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS)
ATP	:Adenozin Trifosfat
Bp	:Base Pair (Baz çifti)
BAP	:Biyofilmle İlişkili Protein
DNA	:Deoksiriboz Nükleik Asit
dNTP	:Deoxy Nucleotide Triphosphate (DeoksiNükleotit Trifosfat)
Taq	:Thermus aquaticus
CMT	:Sitoplazmik Membran Taşıyıcı
CRAB	:Carbapenem Resistance <i>A.Baumannii</i> (Carbapenem'e dirençli <i>A. baumannii</i>)
EPS	:Extracellular Polymeric Substance (hücre dışı polimerik madde)
ESBL	:Genişletilmiş Spektrumlu Beta-laktamaz Enzimleri
ESKAPE	: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , and <i>Enterobacter spp.</i>
HAI	:Healthcare-Associated Infections (Sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonlar)
MATE	:Çoklu İlaç ve Toksik Bileşik Ekstrüzyon
MBL	:Metallo-Beta-Laktamazlar
MDR	:Multidrug-Resistant
MFP	:Membran füzyon Proteini
MFS	:Ana Kolaylaştırıcı Süper (MFS)
MgCl₂	:Magnesium Chloride (Magnezyum Klorür)
OMF	:Dış Membran Faktörü

OMP	:Dış Zar Proteinleri
OMV	:Dış Zar Kesecikleri
OXA	:Oksasilinaz Enzimleri (OXA)
PBP	:Penicillin Binding Protein (Penisilin Bağlayıcı Protein)
PCR	:Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RND	:Direnç-Nodülasyon-Hücre Bölünmesi
SMR	:Küçük Çoklu İlaç Direnci
Tra	:Transfer
TSI	:Iron -Sugar Triple (Demir şekerli üçlü agar)
WHO	:World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
YBÜ	:Yoğun Bakım Ünitesi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Acinetobacter baumannii İZOLATLARINDA PLAZMİT ARACILI PAMC VE BETA-LAKTAMAZ DİRENÇ GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Rand Kamil Majeed JAWAHERİ

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU

Acinetobacter (A.) *baumannii*'nin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlar, tüm dünyada halk sağlığı için ciddi bir tehdit olarak kabul edilmektedir. *A. baumannii* birçok beta-laktam antibiyotiğe karşı direncinin gelişmesi ve artması nedeniyle günümüzde tedavisi güç olan ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu çalışmada, Kırşehir Eğitim-Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda stoklanan Beta-laktam dirençli 29 *A. baumannii* izolatlarında plazmid aracılı pAMC (blaMOX, blaCIT, blaDHA, blaACC, blaEBC, blaFOX) ve Beta-laktam direnç genlerinin (blaTEM, blaSHV, blaCTX-M1, blaCTX-M2, blaGES, blaVEB, blaOXA-1) varlığını araştırmak amaçlanmıştır. Plazmid aracılı pAMC ve Beta-laktam genlerini belirlemek için konvansiyonel PCR kullanılmıştır. İzolatların tamamının imipenem, piperasilin/tazobaktam ve seftazidime dirençli iken tigesikline duyarlı olduğu belirlenmiştir. *A. baumannii* izolatlarında Beta-laktamaz direnç genlerinden blaTEM, blaSHV, blaCTX-m1, blaCTX-m2, blaOXA-1 ve blaGES genleri sırasıyla 9 (%31), 16 (%55.1), 2 (%6.8), 10 (%34.4), 2 (%6.8) ve 20 (68.9) olarak tespit edilmiştir. İzolatlarda plazmid aracılı pAMC direnç genlerinden ise sadece 1 izolatta blaDHA geni belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıkları belirlenen bu izolatların birinin 8 farklı antibiyotiğe (Ampisilin, seftriakson, amoksisilin-klavulanik asit, sefotaksin, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, aztreonam ve trimethoprim) dirençli olduğu tespit edilirken, diğer ikisinin sadece iki antibiyotiğe (ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit) dirençli olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak; yapılan bu çalışmada *A. baumannii* izolatlarında konjugatif plazmid varlığının potansiyel olarak antibiyotik direncin yayılmasında potansiyel ciddi riskler meydana getirdiği tespit edilmiş ve konu ile alakalı daha kapsamlı analizlerin yapılacağı araştırmaların gerektiği düşünülmektedir.

Şubat 2024, 65 Sayfa

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, beta laktamaz, pAMC, konjugatif plazmid.

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

DETECTION OF PLASMID MEDIATED PAMC AND BETA- LACTAMASE RESISTANCE GENES IN *Acinetobacter baumannii* ISOLATES

Rand Kamil Majeed JAWAHERI

Kirsehir Ahi Evran University

Health Sciences Institute

Department of Molecular Medicine

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU

Nosocomial infections caused by *Acinetobacter* (*A.*) *baumannii* are recognized as a serious threat to public health worldwide. *A. baumannii* causes serious infections that are difficult to treat today due to the development and increase of resistance to many beta-lactam antibiotics. In this study, beta-lactam resistant 29 *A. baumannii* isolates isolated from different clinical samples stored in Kırşehir Ahi Evran University Medical Microbiology Laboratory culture collection were aimed to detect plasmid mediated pAMC (blaMOX , blaCIT , blaDHA, blaACC, blaFOB) and beta-lactam resistance genes (blaTEM, blaSHV, blaCTX-M1, blaCTX-M2, blaGES, blaVEB, blaOXA-1). Conventional PCR was used to identify beta-lactam resistance genes and plasmid mediated pAMC genes. All of the isolates were resistant to imipenem, piperacillin/tazobactam and ceftazidime, while tigecycline was susceptible. Among the beta-lactamase resistance genes in *A. baumannii* isolates, blaTEM, blaSHV, blaCTX-m1, blaCTX-m2, blaOXA-1 and blaGES genes were determined as 9 (%31), 16 (%55.1), 2 (%6.8), 10 (%34.4), 2 (%6.8) and 20 (68.9), respectively. Among the plasmid-mediated pAMC resistance genes in isolates, blaDHA gene was determined in only one isolate. Conjugative plasmid was detected in 3 isolates examined in the study. One of these isolates, whose antibiotic susceptibility was determined by disc diffusion method, was found to be resistant to 8 different antibiotics (Ampicillin, ceftriaxone, amoxicillin-clavulanic acid, cefotaxime, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, aztreonam and trimethoprim), while the other two were only resistant to two antibiotics (ampicillin and amoxicillin-clavulonic acid) was found to be resistant.

In conclusion; In this study, it is thought that the presence of conjugative plasmid in *A. baumannii* isolates potentially poses serious risks in the spread of antibiotic resistance, so more comprehensive analyzes should be conducted on the subject.

February 2024, 65 pages.

Keywords: *Acinetobacter baumannii* , β -Lactamases, pAmpC, conjugative plasmid.



1. GİRİŞ

Sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonlar (HAI) olarak adlandırılan nozokomiyal enfeksiyonlar; başvuru sırasında mevcut olmayan, sağlık hizmeti alma sürecinde edinilen enfeksiyonlardır. Hastaneler, uzun süreli bakım tesisleri ve ayaktan tedavi ortamları gibi sağlık hizmeti sunumunun farklı alanlarında ortaya çıkabileceği gibi taburcu olduktan sonra da ortaya çıkabilirler. HAI'ler ayrıca personeli etkileyebilecek mesleki enfeksiyonları da içerir. Enfeksiyon, patojen duyarlı bir konakçıya yayıldığında meydana gelir. Modern sağlık hizmetlerinde invaziv prosedürler ve cerrahi, kalıcı tıbbi cihazlar ve protez cihazlar bu enfeksiyonlarla ilişkilidir [1].

HAI, sağlık hizmetlerinde hasta güvenliğini etkileyen en yaygın olumsuz olaydır. Hastalar, aileler ve sağlık sistemleri üzerinde önemli morbidite, mortalite ve mali yüke neden olurlar. HAI'nin etiyojisi enfeksiyonun kaynağına veya türüne ve bakteriyel, viral veya fungal olabilen sorumlu patojene dayanır. Çoklu ilaca dirençli organizmaların ortaya çıkması HAI'de görülen bir başka komplikasyondur. HAI, Amerika Birleşik Devletleri'nde hastaneye yatırılan tüm hastaların %3,2'sini, Avrupa Birliği/Avrupa Ekonomik Alanı'nda ise %6,5'ini etkilemektedir ve dünya çapında yaygınlığı muhtemelen çok daha yüksektir [2]. HAI'lere yönelik sürveyans sistemlerinin bulunmaması nedeniyle dünya çapında HAI'lerin yükü bilinmemektedir. Ancak enfeksiyon önleme ve kontrol programlarında sürveyans sistemleri ve enfeksiyon kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi için büyük çaba sarf edilmektedir [3].

Antibiyotikler, bazı mikroorganizmaların diğer organizmalara karşı savunma amacıyla ürettiği metabolik yan ürünlerdir. Bakterileri tamamen öldürme (bakterisidal) veya büyümesini engelleme (bakteriostatik) yeteneğine sahiptirler [4]. Penisilinler, sefalosporin, karbapenem ve monobaktam gibi β -Laktam antibiyotikler bakterisidal antibiyotiklerdir ve en yaygın olarak reçete edilen ilaç gruplarından. Bu grup, beta-laktam halkası ile karakterize edilir ve bu antibiyotiklerin temel yapısının bir parçasıdır. β -Laktam Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP) üzerinde çalışır. β -laktam PBP'ye bağlanır, böylece PBP peptidoglikan zincirlerini birbirine bağlayamaz. Dolayısıyla bakteriler hücre duvarını sentezleyemez ve bakteriyel lizise yol açar [5].

Acinetobacter baumannii birçok antibiyotiğe karşı direnç gösteren en patojenik bakterilerden biridir [5]. Bu bağlamda Çoklu İlaç Direnci (MDR) patojeni olarak da sınıflandırılır. Bazı yayınlar Çoklu İlaç Dirençli patojenler arasında en yaygın olanları “ESKAPE” kısaltmasıyla değerlendirmektedir [6]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) antimikrobiyal direnci insan sağlığı açısından en önemli üç sorundan biri olarak ilan etmektedir [7]. ESKAPE grubu olarak bilinen (*Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*) başlıca altı antibiyotiğe dirençli bakterilerdir ve nozokomiyal antibiyotiklere dirençli hastalıklara neden olurlar [8].

Acinetobacter baumannii Gram negatif, aerobik, hareketsiz ve aynı zamanda fermente olmayan laktoz bakterisidir. *Acinetobacter spp.* Moraxellaceae familyasına dahildir [9]. *Acinetobacter baumannii*, 20-30 santigrat derece arasındaki sıcaklıklarda çoğalan diğer bakterilerle karşılaştırıldığında, 44 santigrat dereceye kadar sıcaklıklarda çoğalabilmeleri nedeniyle virülanslarını artıran faktörlerden biri olan ısıya dayanıklı patojenlerdir [10]. *Acinetobacter baumannii* aynı zamanda zorlu çevre koşullarında yaşayan ve nadir karbon bileşikleri üzerinde gelişen asi bir bakteridir [11]. *Acinetobacter baumannii*, hastanelerin ve cerrahi aletlerin yüzeylerinde ve kuru ortamda, cansız yüzeylerde bir aydan fazla bir süre boyunca hayatta kalabilmektedir [12]. Bu bakterilerin doğal yaşam alanı su, toprak ve insan vücudunun ve hayvanların yumuşak dokularıdır [13].

Geçmiş yıllarda MDR-A'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde en önemli ajanların karbapenemler olduğu düşünülmekteydi. Carbapenem'e dirençli *A. baumannii* (CRAB) artık potansiyel bir tehdit olarak ortaya çıkmaktadır ve genellikle bu organizmaya karşı umut veren kolistin ve tigesiklin dışında hemen hemen tüm antimikrobiyal sınıflara karşı dirençlidir [14].

Acinetobacter baumannii, protein ve polisakkaritler üreterek mikrobiyal hücrelerin bir araya gelerek canlı ve cansız yüzeylerde birbirleriyle birleşmeleri sonucu biyofilm oluşturma yeteneği de dahil olmak üzere yeni antibiyotik direnç mekanizmaları geliştirme yeteneğine sahiptir [15]. Antibiyotikleri hücreden dışarı atan Eflux pompalarıyla zarar geçirgenliğini kontrol edebilme özelliğinden dolayı en tehlikeli direnç mekanizmalarından biri olarak kabul edilen dış zar proteinlerini ve antibiyotiklerin hedef bölgelerini değiştirme yeteneğine sahiptir [16]. Aynı zamanda beta-laktamaz

enzimlerinin üretimi ve bir grup Aminoglikozit ve Flor kinolon antibiyotiğine karşı çoklu direnç geliştirmiştir [17].

Acinetobacter baumannii, antibiyotiklere karşı artan çoklu direnci ve neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinin zorluğu nedeniyle 21. yüzyılın en tehlikeli patojenlerinden biri olarak kabul edilmektedir [18]

Umut verici tedavi yöntemlerinden biri, doğadaki bakteri sayısını kontrol etmedeki rolüyle bilinen Lytic fajın kullanılmasıdır; faj, bakteriyel enfeksiyonları kontrol etmek için bakteri hücrelerini istila edip çoğalır [19].

Acinetobacter baumannii'nin 1970'li yıllarda çoğu antibiyotiğe duyarlı olduğu düşünülürken, günümüzde tedavide ilk seçenek olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğuna karşı direnç geliştirmiştir [20]. Bilinen antibiyotiklere karşı olağanüstü direnç geliştirme yeteneğine sahip olan *Acinetobacter baumannii*, “kırmızı alarm” insan patojeni olarak bilinmeye başlamıştır [21]. *A. baumannii*'nin porin kaybı, β -laktamaz sentezi, akış pompası ekspresyonunun artması, antibiyotik değiştirici enzimlerin varlığı, hedef bölge mutasyonu, ribozomal mutasyonlar ve değişiklikler, lipopolisakkarit mutasyonu gibi özellikleri direnç açısından en önemli mekanizmaları arasında bilinmektedir [22].

Plazmidler en yaygın kullanılan bakteriyel klonlama vektörleridir [23]. Bu klonlama vektörleri, DNA (Deoksiriboz Nükleik Asit) fragmanlarının eklenmesine izin veren bir bölge içerir; örneğin, DNA fragmanlarının bağlanabileceği, yaygın olarak kullanılan çeşitli kısıtlama bölgelerine sahip çoklu bir klonlama bölgesi veya polilinkerdir. İlgilenilen gen yerleştirildikten sonra plazmidler, dönüşüm adı verilen bir işlemle bakterilere aktarılır. Bu plazmidler, bakterilere belirli antibiyotikleri içeren seçici bir büyüme ortamında hayatta kalma ve çoğalma yeteneği kazandıran, genellikle bir antibiyotik direnç geni olan seçilebilir bir işaretleyici içerir. Transformasyondan sonra hücreler seçici ortama maruz bırakılır ve yalnızca plazmidi içeren hücreler hayatta kalabilir. Bu şekilde antibiyotikler yalnızca plazmid DNA'yı içeren bakterileri seçmek için bir filtre görevi görür. Vektör ayrıca klonlanmış eklentilere sahip plazmidlerin seçimini kolaylaştırmak için başka işaretleyici genler veya raportör genler de içerebilir. Plazmidi içeren bakteriler daha sonra büyük miktarlarda büyütülebilir, toplanabilir ve ilgili plazmid daha sonra çeşitli plazmid hazırlama yöntemleri kullanılarak izole edilebilir [24].

Tedavisi zor ciddi enfeksiyonlara neden olan *Acinetobacter baumannii* enfeksiyon oranı yıldan yıla artmaktadır ve aynı zamanda dünya çapında hastane enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olarak kabul edilmektedir. Biyofilm oluşturma yeteneğiyle de bilinen bu bakteri, güçlü bir çevresel adaptasyona ve çoklu ilaç direnci özelliklerine sahiptir. Aslında tamamen dirençli profiller gösteren suşlar, klinik terapötik tedavide endişe verici bir sorunu temsil etmektedir. Ayrıca son literatürde *A. baumannii* ile ilişkili veteriner hastane enfeksiyonları da rapor edilmiştir. Özellikle karbapeneme dirençli *A. baumannii*, veteriner hekimliğin yanı sıra beşeri tıpta da yeni ortaya çıkan fırsatçı bir patojen olarak değerlendirilebilir. Beta laktam genlerinin önemi antibiyotığın yapısını bozarak antibiyotik direncini sağlamasıdır. Bu antibiyotiklerin hepsinin moleküler yapısında beta-laktam (β -laktam) halkası olarak bilinen dört atomlu bir halka bulunur. Hidroliz yoluyla, laktamaz enzimi β -laktam halkasını kırarak molekülün antibakteriyel özelliklerini devre dışı bırakır. Beta-laktam antibiyotikler tipik olarak geniş bir gram-pozitif ve gram-negatif bakteri spektrumunu hedeflemek için kullanılır [25].

Bu çalışmada plazmid aracılı β -laktamaz (*bla* TEM, *bla*SHV, *bla*OXA-1, *bla*GES, *bla*VEB, *bla*CTX-M1 ve M2) ve pAMC (*bla*MOX, *bla*CIT, *bla*DHA, *bla*ACC, *bla*EBC, *bla*FOX) direnç genlerini tespit etmektir. Plazmid aracılı pAMC ve Beta-laktam genlerini belirlemek için konvansiyonel PCR kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter baumannii*'nin Tarihçesi

1911 yılında Hollandalı bir mikrobiyolog Beijerick, kalsiyum asetat içeren minimal zenginleştirme ortamını topraktan izole ettiğinde buna *Micrococcus calcoaceticus* adını vermiştir [26]. 1954 yılında iki bilim adamı Prévot ve Brisou, onu *Achromobacter* cinsi içindeki hareketli bakterilerden ayırmak için Yunanca'da Hareketli-Non anlamına gelen *Acinetobacter* adını önermişlerdir [27].

Acinetobacter spp cinsi, Baumann'ın 1968 yılında *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Mpraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum* gibi organizmalar üzerinde kapsamlı bir çalışma yapmasından sonra kabul görmüş ve daha da yaygınlaşmıştır. Fenotipik özelliklere göre farklı türlerde daha fazla alt sınıf sınıflandırmak mümkün değildir [28]. *Acinetobacter* cinsi, glukoz oksidasyonu ve asit üretimine bağlı olarak birinci tip *Acinetobacter calcoaceticus* ve ikinci tip *Acinetobacter Lowffi* olmak üzere iki türe ayrılabilir [29].

1971 yılında taksonomi alt komitesi Moraxella, 1968 Baumann çalışmasının sonuçlarına dayanarak *Acinetobacter* cinsini resmen tanımıştır [28]. 1974 yılında, *Acinetobacter spp* cinsi, tanınan bakteriler listesinde bir tür olan *Acinetobacter calcoaceticus* da dahil olmak üzere Bergy manuel bakteriyoloji sınıflandırmasına yerleştirilmiştir (30, 31).

1986 yılında Bouvet ve Grimont tarafından DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına dayalı olarak 12 grup veya genotür ayırt edilmiştir. Bunlardan bazılarına *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* ve *A. junii* dahil olmak üzere resmi tür isimleri verilmiştir [32]. *A.baumannii*, *A.pittii*, *A.nosocomialis*, *A.dijkshoorniae* ve *A.seifertii* gibi cinslerin fenotipik olarak (dıştan) ayrıştırılması zor olanlar *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobater baumanii* Kompleksi (ACB) adı verilen bir grupta adlandırılırlar [33].

***Acinetobacter baumannii*'nin en yeni taksonomisi şöyledir:**

Alan: Bacteria

Bölüm: Proteobacteria

Sınıf: Gammaproteobacteria

Düzen: Pseudomonales

Aile: Moraxellaceae

Türler: Baumannii

2.2. *Acinetobacter*'in Genel Özellikleri

Acinetobacter spp cinsinin üyeleri gram-negatif, zorunlu aerobik, polimorfik, fermente etmeyen, hareket etmeyen, katalaz testi pozitif, oksidaz testi negatif olarak karakterize edilir ve %39 ila %47 arasında G+C'den oluşan bir DNA içeriğine sahiptir [28]. İndol ve nitrat testi negatif çıkan bu bakterilerin üremesi için optimum sıcaklık 20-37 °C arasında değişmektedir. Bu bakteriler hareketsiz olmalarına rağmen bazı türleri kayma veya seğirme olarak adlandırılan bir tür hareket gösterirler [34]. Bu bakteriler Gram-negatif olmalarına rağmen bazen lekeleri kolayca kaybetmezler ve Gram-pozitif olarak çıkarlar [35].

Acinetobacter türünün üyeleri, log fazında şişmiş basiller olarak görünür, uzunlukları 1,5-2,5 µm ve çapı 1-1,5 µm arasındadır. Sabit faz sırasında küresel kokoid olarak görünürler [36].

Bakteri izolatlarının çoğu, tek nitrojen kaynağı olarak amonyum veya nitrat tuzları ve tek karbon kaynağı olarak asetat, piruvat veya laktat içeren kültür ortamlarında büyüme yeteneğine sahiptirler [37]. *Acinetobacter spp* suşları, *Acinetobacter haemolyticus* türü dışında kanlı agarda hemolitik olmayan, pürüzsüz, dışbükey ve kremsi beyaz renkte görüldüğü için kültür besiyerinde kolaylıkla üreyebilir. MacConkey kanlı agar besiyerinde isehemolitiktir ve mor zemin üzerine açık pembe renkte görünür, bu da laktozun fermente olmadığını gösterir [10]. Bu yönüyle laktozu fermente etmeyen *Enterobacteriaceae* familyası üyelerine benzerler. Bakteriler zorunlu aerobik bakteriler oldukları için besiyerinin dibinde büyüyemezken, *Enterobacteriaceae* ailesi bunu yapabildiğinden, her biri TSI (demir şekerli üçlü agar) üzerinde yetiştirilerek iki grup arasında kolayca ayırım yapılabilir [38]. *Acinetobacter* türleri ise doğada yaygın olarak

bulunur, serbest yaşar veya saprofitiktir. Toprakta, sudan ve kanalizasyon atıklarından kolayca izole edilirler [39].

Bakteriler, Bifenil, Fenol, Ham petrol ve Klorlu bifenil gibi çok çeşitli kirleticileri uzaklaştırma ve yok etme yetenekleri nedeniyle bir dizi çevresel kirleticinin biyolojik olarak parçalanma sürecine girerler. Bu kirletici kimyasal bileşikler büyüme için temel materyaller olarak kullanarak topraktan fosfatları ve ağır metalleri uzaklaştırmaya çalıştığı için çevre alanında ve biyolojik tekniklerde önemi vardır. Bunu yapabilmesi lipaz, proteaz ve biyoemülgatör enzimleri üretme yeteneğinden kaynaklanmaktadır [40, 41].

2.2.1. *Acinetobacter baumannii*'nin Genel Özellikleri

Acinetobacter baumannii, özellikle yoğun bakım ünitelerinde bağışıklık sistemi baskılanmış hastaları etkileyen enfeksiyonlara neden olan yaygın fırsatçı bir patojen olduğundan tıbbi düzeyde *Acinetobacter spp*'nin en önemli türlerinden biridir. Bu tür ilk kez (1968) bilim adamı Baumann tarafından toprak ve sudan ve et, sebze gibi gıda örneklerinden de izole edildiği gibi, insanların kan gibi çeşitli patolojik örneklerinden de izole edilmiştir. Balgam, plevra sıvısı ve idrarda kokobasil oluşturması ve Gram negatif ve zorunlu aerobik bakteri olmasıyla diğerlerinden ayırt edilir [35].

Son zamanlarda ABD ordusu saflarında kaydedilen yaralanmalardan sonra *Acinetobacter baumannii*'ye ilgi artmıştır. Raporlarda belirtildiğine göre bu bakteri, Irak ve Afganistan'da ABD ordusunda çok sayıda ağır yaralanmaya neden olduğu için Irak bakterisi olarak adlandırılmıştır [16].

Acinetobacter baumannii klinik olarak tedavi edilmesi en zor patojenlerden biri olarak kabul edilir, çünkü kuru koşullarda birkaç aya kadar varabilen uzun bir süre boyunca hayatta kalabilme yeteneği nedeniyle *Pseudomonas* türlerinden sonra ikinci en zor negatif patojendir [42, 43]. 44 °C sıcaklıkta büyüebilme özelliğine sahiptir ve bu onu aynı cinsin diğer türlerinden ayıran en önemli özelliğidir [10]. Aynı zamanda mutasyonlar veya plazmidler, transpozonlar veya direnç adaları gibi genetik elementler yoluyla MDR (Çoklu İlaç Direnci) yeteneği ile de karakterize edilir, bu da bunların ortadan kaldırılmasını zorlaştırır [44].

2.2.2. *Acinetobacter baumannii*'nin Genetik Özelliği

Acinetobacter genomu, Abar olarak bilinen patojen direnç adacıklarını içerir; bu adalar, kanın pıhtılaşmasını, toksin oluşumunu, antibiyotik direncini vb. kodlayan genleri içeren, bir patojenin virülansını artıran, tüm patojenik bakterilerde, özellikle de cins içinde yaygın olan genleri içeren genetik yapılardır [45]. *Acinetobacter baumannii* kromozomu 3.976.747 baz çifti içeren, 3.454 baz çifti protein üretimini kodlayan, 3830 açık okuma çerçevesine (ORF) ve %39 ila %47 arasında G+C'den oluşan bir DNA içeriğine sahiptir [46]. *A. baumannii* birçok suş içerir ve en bilinen suşu, 86Kpb'lik bir direnç bölgesi içeren suştur. Bu dirençli adaya AbaR1 adı verilir. Genom serisinin analizi, direnç adalarının çoğunun birleştiğini göstermektedir. Plazmidler veya fajlar yoluyla, ileri düzeyde iletileme yeteneğine sahip birçok hareketli genetik element (MGE) (plazmidler, transpozonlar ve integronlar gibi) vardır ve MGE'nin kökeninin *Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* bakterilerine dayandığına inanılmaktadır [20].

A. baumannii'nin kromozomunda antibiyotik direncini kodlayan temel genleri içeren AbaR1 direnç bölgelerindeki [47] 45 direnç geninden, 25'i Tetrasiklin, Kloramfenikol, Kotrimaksazol, Aminoglikozidler gibi birçok antibiyotiğe karşı direnci kodladığı gibi arsenik ve cıva gibi ağır metallere de direnci kodlamaktadır (48). Ayrıca bu direnç genlerinden 14'ü, bakteri kromozomunda gen ekspresyonu, rekombinasyon ve entegrasyon yeteneğine sahip bölümler olan birinci sınıf integronları da kodlamaktadır [20].

A. baumannii direnç adası ayrıca sırasıyla 28.2 ve 64.3 baz çift boyutunda iki plazmid (pACICU1 ve pACICU2) içerir. pACICU1 plazmidi herhangi bir antibiyotik direnç geni taşımazken, pACICU2 plazmidi oxa58'i kodlayan karbapenem direnç geninin iki kopyasını taşır ve buna ek olarak ISaba125 taşır ve tra (transfer) genlerinden oluşan yaklaşık 20 kilo baz çifti içeren bir bölge içerir [49, 50].

Acinetobacter baumannii suşları antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında önemli rol oynayan çok sayıda plazmid içermesine rağmen bu plazmidlerin biyolojisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. *A. baumannii* direnç adası 200 kb olup (T4SS) tip IV konjugatif sekresyon mekanizmasını kodlayan lokus; İki TetR transkripsiyonel düzenleyicinin kodlama bölgesi; ve antibiyotik direnç genlerini içeren ve T6SS aktivitesini düzenleyen bölge olarak üç bölgede sınıflandırılan ve transpozon açısından zengin bir direnç adasıdır [51].

2.3. Epidemiyoloji

Acinetobacter, sağlık hizmetleriyle ilgili en önemli patojenlerden biridir. Birçok çalışma, bunun nozokomiyal enfeksiyonların ilk nedeni olduğunu ve sepsisemi, bakteriyemi, pnömoni, yara sepsisi, menenjit dahil olmak üzere bazen ölüme yol açabilen birçok ciddi komplikasyona neden olduğunu göstermiştir [52].

Son yıllarda özellikle çoklu dirençli ve geniş dirençli izolatların ortaya çıkması ve bunları tedavi edecek antibiyotiklerin bulunmaması sonrasında hastanelerde, özellikle yoğun bakım ünitelerinde, yanık ve yara ünitelerinde yatan hastalarda bu bakterinin neden olduğu enfeksiyon oranları artmıştır [36]. *A. baumannii*'nin antibiyotiklere direncini artıran faktörler, özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) antibiyotik tedavisi gören ve plastik kateter kullanımına maruz kalan ve ayrıca immünsüpresif ilaç kullanan kötü huylu tümörlü hastaların uzun süreli hastanede yatması ve hastanede solunum cihazı ve cerrahi aletler gibi enfeksiyon görülme sıklığının artmasında büyük rol oynayan kontamine aletlerin kullanılmasıdır [53, 54, 55].

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre antibiyotik direnci insan sağlığını etkileyen en büyük üç sorundan biridir. Dienç gösteren başlıca bakterileri adlandırmak için kullanılan ESKAPE adı en yaygın ve tehlikeli MDR patojenlerini tanımlamak için kullanılmıştır. Bu adlandırma, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter spp*'ye atıfta bulunmaktadır [28].

Riyad'daki askeri hastanenin yoğun bakım ünitesinde enfeksiyonlara neden olan çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin yaygınlığı üzerine yapılan bir araştırma, yoğun bakım hastalarından izole edilen bakteriler arasında en sık görülen türün *A. baumannii* olduğunu göstermiştir [56]. Bir başka çalışmada *A. baumannii* izolatlarının yüzdesi %40,9 olarak bulunmuştur [57].

Bakterilerin, havanın hastane ortamına girip çıkmasından kaynaklanan kontrolsüz hareketi yoluyla bulaşması; hapşırma, öksürme, konuşma, çevreye yayılan sıvı ve hastane malzemeleriyle temas yoluyla daha da kolaylaşmıştır [58]. *A. baumannii* ile enfekte kişilerin yoğun bakım ünitesindeki ölüm oranının yaklaşık %8-%23 olduğu tahmin edilmektedir [59].

2.4. Patoloji

"Patojenite" terimi, bir organizmanın bir konakçıyı enfekte etme ve hastalık üretme kapasitesini ifade eder; ancak "patojenik" ve "patojenik olmayan" tanımları, bir organizmanın göreceli virülansını veya belirli durumlarda hastalık üretme kapasitesini tanımlar [60]. Bu yetenek, organizmanın özelliklerinin yanı sıra, konağın bağışıklığı ve kendisini enfeksiyondan koruma yeteneğinden de etkilenir. *A. baumannii* fırsatçı bir patojendir ve hastanede yatan hastalarda neden olduğu ciddi enfeksiyonlar nedeniyle insanlar için risk faktörüdür. Bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonun meydana geldiği mekanizma, çok sayıda araştırmaya rağmen netleştirilememiştir ve patojeniteyle ilgili en önemli virülans faktörlerinin dış zar proteinleri, biyofilm oluşumu ve fosfolipaz ve dış zar enzimlerinin olduğu bilinmekle birlikte mevcut bilgiler hala azdır [21].

Acinetobacter baumannii enfeksiyonuna en duyarlı olanlar, diyabet gibi kronik hastalıkları olan yaşlılar ve bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaç kullanan kişilerdir. Hastanede uzun süre kalmak, mekanik ventilasyonun olmayışı, kateter gibi damar içi cihazların kullanılması, cerrahi operasyonlar ve yanıklar sırasında yaraların iltihaplanması bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonu arttıran faktörler arasında yer almaktadır. *Acinetobacter baumannii*; idrar yolu enfeksiyonu, zatürre gibi solunum yolu enfeksiyonu, gastroenterit, özellikle yanıklar sırasında oluşan cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ve ayrıca birincil bakteriyemi gibi ciddi birçok enfeksiyona neden olabilmektedir [61].

Acinetobacter baumannii, kan dolaşımı enfeksiyonu, yumuşak doku nekrozu, septik şok ve akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) başta olmak üzere solunum yolu hastalıkları gibi ikincil komplikasyonlara yol açabilmektedir. Bu komplikasyonlar, etkilenen organların çoğunda çoklu organ yetmezliğine yol açmakta ve bu da sonuçta ölüme yol açabilmektedir [61]. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde *Acinetobacter baumannii*'nin neden olduğu en yaygın enfeksiyon türü ventilatör ilişkili pnömonidir (VAP) ve ölümlerin büyük bir yüzdesi bu türle ilişkilidir [62].

Yanık ve yara enfeksiyonları ünitelerinde *Acinetobacter baumannii*'nin deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının ana nedenlerinden biri olduğu bir çok araştırmada tespit edilmiştir [63, 64]. Yoğun bakım ünitelerinde morbidite ve mortalitenin üçüncü nedeni ise *A.baumannii*'nin neden olduğu bakteriyemidir [65]. Bu bakterinin patojenitesinin artmasının ana nedeni, penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler gibi beta-laktam

grubu dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe ve ayrıca florokinolonlara karşı olan direncidir [66].

Acinetobacter baumannii bakterisinin genetik ve fenotipik analizine göre, bu bakterinin patojenitesini önemli ölçüde artıran çeşitli virülans faktörlerine sahip olduğu ortaya çıkmıştır [189]. Biyofilmin gelişimi, porinler olarak bilinen dış zar proteinleri (OMP), jelatinaz aktivitesi, kapsül polisakarit ve lipopolisakkarit üretimi, fosfolipaz enziminin ve penisilin bağlayıcı proteinlerin salgılanması ve dış zar keseciklerinin (OMV) salgılanması, *Acinetobacter baumannii* bakterisinin virülans faktörleri arasında yer almaktadır [67].

2.4.1. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, mikrobiyal hücrelerin bir araya gelerek proteinler, karbonhidratlar ve amino asitler içeren hücre dışı polimerik madde (EPS) üreterek birbirlerine yapışmasından oluşan karmaşık ve oldukça organize bir yapıdır [68]. Bunun *Acinetobacter baumannii*'nin hastalıklara neden olabileceği mekanizmanın olduğu düşünülmektedir. Biyofilm, klinik organizmaların hayatta kalması ve insan epitel dokuları da dahil olmak üzere canlı ve cansız yüzeylere yapışması ve bunların kuraklık koşullarına, deterjanlara ve antibiyotiklere karşı direnç oluşturmaları için etkili bir araçtır, çünkü biyofilm bakterilerin direncini diğer ürünlere göre 1000 kat artırır [69, 70].

Biyofilm, orta kulak enfeksiyonları, kistik fibroz, kan dolaşımı enfeksiyonları, diş çürüğü ve idrar yolu enfeksiyonları gibi *Acinetobacter baumannii*'nin neden olduğu mikrobiyal enfeksiyonların %80'ine neden olur [71, 72]. Biyofilm antikorun hücrelere nüfuzunu azaltır, ayrıca β -laktam antibiyotiklerin penetrasyonu durumunda lizis üzerinde çalıştığı için β -laktamaz enzimlerinin (EPS) içerisinde yoğunlaşmasına ve aynı zamanda glikosidik içeriğin de artmasına neden olur. Bunlara ek olarak anti-Glikoprotein gibi yüksek yüklü antioksidanlar, maddelerin hücrelere geçişini engelleyen bir bariyer görevi görür [73]. Biyofilm, bakterilerin yüzeye tutunması, mikrokoloni oluşumu, biyofilm olgunlaşması ve ayrılma aşaması olmak üzere dört aşamadan oluşur [74, 75].

Biyofilm, hücrelerin Van der Waals kuvvetleri aracılığıyla yüzeylere ilk yapışması, ardından *csuA* tarafından lipoproteinler tarafından kodlanan silia ve flagella lipoproteinler aracılığıyla ters yapışma, çarpma ve birleştirme ardından EPS üretimi ile karakterize edilen birkaç aşamadan oluşur. Bundan sonra biyofilmin olgunlaşma ve

gelişme aşaması başlar. Hücrelerin dış kısmı polisakkaritlerle çevrenmiş, üç boyutlu karmaşık bir yapı oluşturmakta, içinden su ve besinlerin geçtiği kanalları içermektedir. Son aşama ise enfeksiyonun başka yerlerde yayılması ve biyofilmin yeniden oluşması için bazı hücrelerin biyofilmden ayrılarak çoğalmasdır [76, 77].

Bakteri hücreleri, virölans faktörleri ve antibiyotik direncinin gelişimi de dahil olmak üzere tüm fizyolojik süreçleri kontrol eden Otoindüktörler adı verilen özel sinyaller göndererek Quorum algılama sistemi aracılığıyla biyofilm içerisinde birbirleriyle iletişim kurarlar [78, 79].

2.4.2. Dış Zar Proteinleri

Acinetobacter baumannii 'nin dış zarında bulunan protein, molekül ağırlığı 38 kilo Dalton olan en önemli proteinlerden biridir ve ompA geni tarafından kodlanır [80].

Fibronektine bağlanarak epitel hücrelerinin yapışması ve istila edilmesi sürecinde önemli bir role sahiptir [81, 82]. OmpA mitokondriyi hedef alarak ve Sitokrom C ve apoptoz indükleyici faktör gibi apoptotik molekülleri serbest bırakarak insan epitel hücrelerinin apoptozuna yol açar [83]. Antibiyotikleri uzaklaştırıp harici Eflux sistemine iletmeye çalıştığı için *Acinetobacter baumannii* 'nin kloramfenikol ve aztreonam gibi antibiyotiklere karşı direncini artırır [81]. Protein aynı zamanda *A.baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* için en önemli virölans faktörü olan ve laboratuvar farelerinde ciddi pnömoniye neden olan omp38 proteini olarak da adlandırılmaktadır [84].

2.4.3. Biyofilmle İlişkili Protein

Biyofilmle ilişkili protein *Acinetobacter baumannii* izolatlarının çoğunda bulunan BAP (Biyofilmle ilişkili protein) geni tarafından parçalanmış 8.620 amino asitten oluşan, hücre yüzeyine dağılmış büyük bir proteindir. Konakçı ve cansız yüzeylere yapışma sürecinde [85, 86] ve G+ ve G- de biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır. Ayrıca *S.aureus* bakterisindeki transpozonda ve *E.faecali* bakterisindeki patojenik adalarda bulunduğundan aksesuar genom bileşenlerinin bir parçası olarak kabul edilmektedir [87, 88].

2.4.4. Kapsül

Kapsül, *Acinetobacter* 'in sahip olduğu en önemli virölans faktörlerinden biridir. Bakterileri saran, onu dehidrasyondan, fagositozdan ve tüm deterjan ve antibiyotiklerden

koruyan yapışkan bir tabakadır. Ayrıca bakterilerin hastanelerdeki tıbbi cihaz ve cerrahi aletler gibi yüzeylere yapışmasını sağlamak için de çalışır [89, 90, 91, 92].

Kapsül, bakteriyel hücre duvarına bağlı uzun bir polisakkarit zincirinden oluşur ve *Streptococcus pneumonia*, *Neisseria meningitides*, *Hemophilus influenza*, *Klebsiella pneumonia* vb. Gibi diğer patojenik suşlarda da bulunur [93].

2.4.5. Lipopolisakkarit (LPS)

Lipopolisakkarit Gram-negatif patolojik türlerin çoğunda bulunur ve bakterilerin dış kabuğunun en önemli ve en büyük bileşenlerinden biridir [94].

LPS, A lipid, oligosakkarit çekirdek ve O antijeninden oluşur [95]. *A.baumannii*'nin virülansında ve hayatta kalmasında önemli bir rol oynar [96]. LPS'deki herhangi bir değişiklik, bakterilerin antibiyotiklere karşı direncinin artmasına neden olur [97].

2.4.6. Penisilin Bağlayıcı Proteinler

Bu protein, bakteri hücre duvarının ana bileşeni olan peptidoglikan tabakasının oluşumunda yer alır ve bakteri hücre duvarındaki beta-laktamların hedefi olarak kabul edilir.

Acinetobacter baumannii'nin penisilin bağlayan proteinlerde bazı değişiklikler veya modifikasyonlar yapması, *Acinetobacter*'in başta karbapenem olmak üzere beta-laktam grubu dahil antibiyotiklere karşı direnç kazanmasına yol açmıştır [98].

2.5. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bazı organizmaların diğer bakterilere karşı savunma amacıyla ürettiği metabolik yan ürünlerdir. Bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen, bakterileri tamamen öldürme (bakterisidal) veya bakterilerin büyümesini engelleme (bakteriostatik) [99] yeteneğine sahip organik kimyasallar olarak da tanımlanabilir [100, 101].

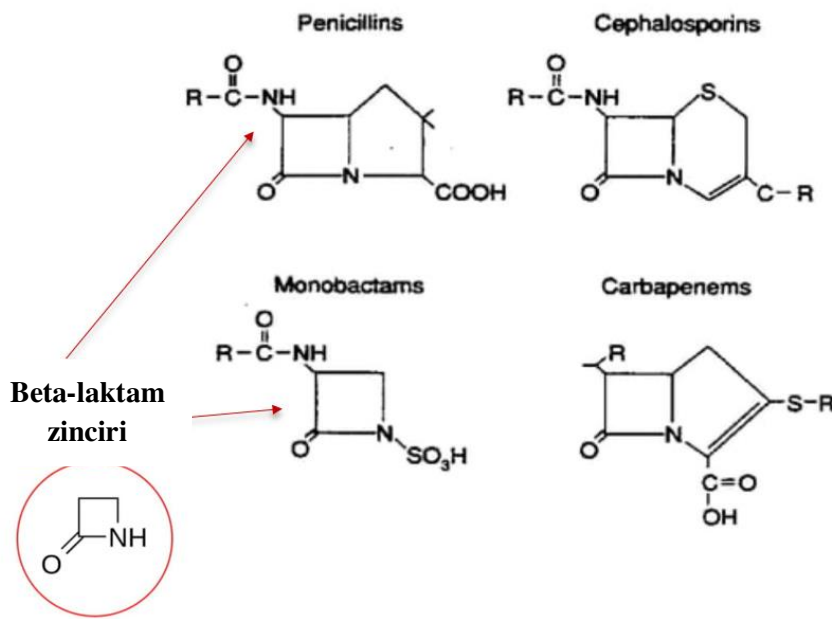
Antibiyotiklerin tıbbi talimatlara dikkat edilmeden aşırı kullanımı, antibiyotik dirençli suşların oluşmasına yol açmıştır [102].

Antibiyotikleri sınıflandırmanın birçok yolu vardır, popüler sınıflandırma Beta-laktamlar, Kinolonlar, Aminoglikozitler gibi kimyasal veya moleküler yapılara dayanmaktadır (Şekil 2.1) [103, 104].

2.5.1. Beta-Laktamlar

Beta-laktam antibiyotikler en yaygın reçete edilen ilaç gruplarından biridir. Bu grup, antibiyotiklerin temel yapısının bir parçası olan beta-laktam halkası ile karakterize edilir [105, 106, 107].

Bu antibiyotikler bakteri hücre duvarının sentezini engeller ve ardından bakteri hücresinin ölümünü sağlar. Bu antibiyotikler, penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanır ve peptidoglikan tabakasının oluşumunda rol oynayan transpeptidaz enziminin etkisini inhibe eder [108, 109].



Şekil 2.1. Beta-laktam antibiyotiğin temel yapıları.

2.5.1.1. Penisilin

Penisilinin Fenoksi metil (penisilin V) ve Benzil penisilin (penisilin G) gibi doğal antibiyotik olan ve Karbenisilin ve Tikarsilin gibi Karboksi penisilin antibiyotikleri dahil genişletilmiş spektrumlu penisilin içeren yarı sentetik penisilin türleri vardır [99].

2.5.1.2. Sefalosporinler

Bunlar, beta-laktam halkasına bağlı bir Dihidrotiyozin halkasına sahip olmaları nedeniyle penisilinden farklı olan yarı sentetik antibiyotiklerdir. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere, özellikle de penisiline dirençli olanlara karşı penisilinden daha etkindirler.

Penisilin duyarlılığı olan hastalar için alternatif bir tedavi olarak kabul edilirler [110, 111].

Sefalosporinler etkinliğine ve kimyasal bileşimine bağlı olarak birkaç nesile ayrılır:

Birinci kuşak sefalosporinler:

Intramüsküler enjeksiyonla: Sefalotin, Sefazolin ve Sefapirin

Ağız yoluyla alınanlar: Sefalekssin, Sefaklor ve Sefradin [112].

İkinci kuşak sefalosporinler:

Sefotetan, Sefoksitin ve Sefotetan gibi daha stabil olan antibiyotikleri içerir [113].

Üçüncü kuşak sefalosporinler:

Sefiksime, Sefitibuten, Seftriakson ve Seftezidim, Sefotaksim’I içerir [113]

Dördüncü kuşak sefalosporinler:

Bakterilerin dış duvarına nüfuz eder. Sefepim ve seftiprom bunlara örnek verilebilir [35].

Beşinci kuşak sefalosporinler:

Bu gruba ise Seftobiprol ve Seftorolin dahildir [114].

2.5.1.3. Karbapenemler

Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu aktivite ile karakterizedir. Diğer beta-laktam antibiyotik türleri gibi penisilin bağlayan proteinleri inhibe etmekte ve böylece bakteri hücre duvarının bozulmasına yol açmaktadır.

İmipenem, Meropenem ve Faropenem’den oluşan birçok bakteri türüne karşı daha etkili olduğu için son tedavi olarak kabul edilmektedir [115]. Bu tedavi sınıfı genel olarak, *A. baumannii*’yi tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [106].

2.5.1.4. Monobaktamlar

Aztreonam bu gruptaki ilk antibiyotiktir. Gram pozitif değil, gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Penisilin bağlayıcı proteine bağlanarak diğer beta-laktam türlerine benzer şekilde çalışır [116].

2.5.2. Aminoglikozitler

Bu grup çoğu Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri üzerindeki öldürücü etkisi ile karakterize edilir. Bu grup antibiyotikler arasında Amikasin, Gentamisin, Tobramisin,

Neomisin, Streptomisin ve Kanamisin bulunur. Bu antibiyotikler, mRNA'yı okuyarak bakteriyel proteinlerin sentezi üzerinde çalışır, bu da büyümelerinin durmasına ve dolayısıyla bakteri hücresinin ölümüne yol açar [117].

2.5.3. Kinolonlar

Ciddi bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan etkili antibiyotiklerdir. Bu antibiyotikler, DNA giraz ve Topoizomera IV'ü ve DNA sentezini inhibe eder. Bu da DNA iplikçiklerinin aşırı soğumasını bloke eder ve böylece bakteri sentezini engeller. Bu grup şu antibiyotikleri içerir: Siprofloksasin Norfloksasin, Levofloksasin ve moksifloksasin [118, 119, 120].

2.6. Antibiyotik Direncinin Ana Mekanizmaları

Acinetobacter türleri, çeşitli çevre koşullarında hayatta kalabilmeleri ve yeni genetik faktörler kazanabilmeleri nedeniyle çok çeşitli antibiyotik direnç mekanizmaları sergilerler [34].

Acinetobacter çoklu ilaç direnci özelliğine sahiptir. Karbapenemler ve sefalosporin antibiyotikler başta olmak üzere beta-laktamlar grubuna karşı yüksek dirence sahiptirler [121].

Bunun nedeni, aktarılabılır plazmidler ve integronlar gibi hareketli genetik elementlerin bulunması veya bakterilerin gen ifadesinde ve antibiyotiklerin hedeflerinin lokasyonunda bir değişikliğe neden olan mutasyonlar sonucu yeni genetik özelliklerin kazanılmasıdır [122].

2.6.1. Direnç Mekanizmaları

2.6.1.1. β -Laktamaz Enziminin Üretimi

Beta-laktam antibiyotikler, bakteriyel hücre duvarında bakteri hücresinin parçalanmasına yol açan peptidoglikan tabakasının üretimini önlemek için çalıştıkları için moleküler yapılarında beta-laktam halkası içeren bakterisidal antibiyotiklerdir [123].

Acinetobacter baumannii tarafından üretilen beta-laktamaz enzimleri, beta-laktam halkasındaki amidi gibi antibiyotik moleküllerinin parçalanması üzerinde çalışır, bu da antibiyotiklerin yok olmasına yol açar ve etkisiz bir bileşik üretilir. Penisilinin

parçalanması sonucu penisilloik asit, sefalosporinlerin parçalanması sonucu ise sefalosporinik asit oluşur [124, 125].

Beta-laktam antibiyotiklerin etkinliği, bakteri tarafından üretilen enzimin yeri ve miktarı ile fizyokimyasal koşullardan etkilenir [125].

Negatif ve pozitif bakteriler tarafından üretilen beta-laktamaz enzimlerinin 340 tane farklı türü vardır ve bu durum bu enzimlerin sınıflandırılmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Bu enzimler için iki sınıflandırma sistemi vardır; amino asit dizilerindeki benzerliğe dayanan Ambler ve substrat inhibitör profiline dayanan Bush-Jacoby-Mederios sınıflandırma sistemidir [126, 127].

Ambler Sınıflandırması

A Sınıfları

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz enzimleri (ESBL'ler) olarak bilinen SHV, TEM, CTX-M ve PER-1 enzimlerini içerir. Başlangıçta bu sınıflar geniş spektrumlu enzimler olmamakla birlikte yavaş yavaş gelişerek ve enzimin aktif tarafını etkileyen nokta mutasyonları sonucunda geniş spektrumlu enzimler haline gelmiştir [128]. Bu enzimler plazmidler ve transpozonlar tarafından kodlanır [127].

TEM ve SHV enzimlerinin penisilin ve üç nesil sefalosporinleri parçalama yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur [129].

B Sınıfları

Metalo-beta-laktamazlar (MBL) olarak da bilinen B sınıfları aynı zamanda geniş spektrumlu enzimlerdir ve aztreonam hariç karbapenemler dahil tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize etme yeteneğine sahiptirler.

Bu grup, aktif bölgede metal iyonu olarak çinko içermesiyle ayırt edilir ve VIM, IMP, SPM, SIM, NDM-1 enzimlerinden oluşmaktadır [130, 131].

C Sınıfları

Acinetobacter sefalosporin enzimini kodlayan AmpC genine sahiptir. Buna Acinetobacter Türevi Sefalosporinaz (ADC) denir. Bu enzim Klavulanik asit tarafından inhibe edilmez ancak Kloksasilin tarafından inhibe edilebilir [132, 133].

AmpC geni genellikle Gram negatif bakterilerin, özellikle de *Acinetobacter*'in kromozomları üzerinde kodlanır. Buna ek olarak plazmidler üzerinde taşınan ve özellikle *Enterobacteriaceae* familyasına yayılan genler de bulunmaktadır [134].

D Sınıfları

Bu sınıf enzimler Oksasilinaz enzimleri (OXA) olarak da adlandırılır [135]. *A. baumannii*'de en yaygın B laktamaz enzimidirler.

A.baumannii'de B sınıfı (MBL) ve D sınıfı (OXA) enzimlerinin üretimi karbapenem direnç mekanizmasının en yaygın yoludur [34].

Bu sınıf, İrlanda, İtalya, İran ve Suudi Arabistan gibi dünyanın birçok ülkesinde *A.baumannii*'de bulunan OXA 58, OXA 51, OXA24 ve OXA23 enzimlerini içermektedir [136].

Bush-Jacoby –Medeiros Sınıflandırması

Sınıf 1: Klavulanik asit tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilen (moleküler sınıf C'ye ait) kromozomal olarak kodlanan sefalosporinazları içerir.

Sınıf 2: Penisilinaz, sefalosporinaz veya her ikisini de ve ister plazmid ister kromozom tarafından kodlanmış olsun, karbapenemaz içindeki geniş ölçüde uzmanlaşmış enzimleri içerir. Bunlar klavulanik asit ve diğer tüm beta-laktamaz inhibitörlerini engellerler (A ve D moleküler sınıflarına eşit).

Sınıf 3: Meta β -Laktamazları içerir. Hiçbir beta-laktam inhibitörlerinden etkilenmeyen penisilin, sefalosporinler ve karbapenemleri parçalama yeteneğine sahiptir (B moleküler sınıflarına eşit).

Sınıf 4: Bu grup, klavulanik asitten etkilenmeyen veya inhibe olmayan bazı penisilinaz enzimlerini içerir [137].

2.6.1.2. Dış Zar Proteinlerindeki (OMP) Değişiklikler

Acinetobacter, dış zarının geçirgenliğini değiştirme yeteneğiyle karakterize edilir, bu da onun birçok antibiyotiğe karşı direncine yol açmaktadır. *Acinetobacter* de dahil olmak üzere Gram-negatif bakterilerin çoğunun dış zarlarında, dış zar proteinleri (Omps) adı verilen proteinler bulunur. Bu bakteriler, CarO, Omp22, Omp23, Omp 33-36 Omp 43-44

dahil olmak üzere karbapenem antibiyotiklerine dirençleriyle ilişkili proteinler üretirler. Bu proteinler, besinleri ve antibiyotikleri bakteri hücresinin içine taşıyan porin adı verilen kanalların oluşumundan sorumludur. Araştırmalar, porinler veya Omps ile *Acinetobacter*'in antibiyotiklere direnci arasında, bu porinlerin genlerinin ekspresyonunu veya mutasyonlarını azaltıp bu deliklerin daralmasına ve sayısının azalmasına yol açarak geçişin engellenmesi yoluyla bir ilişki olduğunu doğrulamıştır [16, 137].

Araştırmalar, direnç enzimleri ile dış membrane proteini arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir; Omp29'un kaybı durumunda, bakterilerin imipenem'e karşı dirençten sorumlu olan Omp23Like ve Omp51Like enzimlerinin üretimi başlatılmaktadır [139]. CarO ve OmpA proteininin kaybı durumunda ise karbapeneme dirençli bakteriler ortaya çıkmaktadır [140].

2.6.1.3. Hedef Sitelerdeki PBP'lerin Değiştirilmesi

Acinetobacter baumannii'ye karşı enzimatik olmayan önemli direnç mekanizmalarından biri, beta-laktam antibiyotiklerin hücre duvarına bağlanmasını önleyen veya azaltan modifikasyonlar yoluyla PBP'ler tarafından temsil edilen hedef bölgenin modifikasyonudur [141].

Herhangi bir küçük değişiklik, özellikle karbapenemaz üretmeyen izolatlarda, karbapenemlere karşı *Acinetobacter* direncine katkıda bulunur [142].

2.6.1.4. Akış Pompaları

Akış pompaları, antibiyotiği bakteri hücresinin dışına itmesi nedeniyle birçok antibiyotiğe direnç göstermek için *Acinetobacter* tarafından geliştirilen enzimatik olmayan mekanizmalardan biridir [143, 144].

MDR akış pompası proteininin 5 ailesi vardır

- a) Direnç-nodülasyon-hücre bölünmesi ailesi (RND).
- b) ATP bağlayıcı kaset ailesi (ABC).
- c) Küçük çoklu ilaç direnci ailesi (SMR).
- d) Ana kolaylaştırıcı süper aile (MFS)
- e) Çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon ailesi (MATE) [145].

Bu sistemler (Dış membran faktörü) OMF, (Membran füzyon Proteini) MFP ve (Sitoplazmik Membran Taşıyıcı) CMT olmak üzere üç bölümden oluşur ve antibiyotiği sitoplazmadan hücrenin dışına çıkaracak bir kanal oluşturmak için çalışır. En önemli aile RND'dir ve özellikle ABC genleridir çünkü bu genler *Acinetobacter baumannii* izolatlarının yaklaşık %80'inde mevcuttur [146, 147]. Bu genlerin aşırı ekspresyonu karbapenem direncinin yanı sıra aminoglikozit direncine de yol açmaktadır [148].

2.6.1.5. Konjugasyon

Konjugasyonun ilk keşfi 1946'da Edward Tatum ve Joshua Lederberg tarafından yapılmış ve bakterilerin DNA'yı donörden alıcı hücrelere, doğurganlık (F) faktörü olarak adlandırılan tek yönlü transfer yoluyla aktarabildiğini keşfedilmiştir [149].

Konjugasyon, replikasyon için gerekli tüm genleri içeren konjugatif plazmidin birincil yatay aktarımıdır. Transferler sırasında, antibiyotik direnç genleri ve bir bakteriyel çağrıdan diğerine genomik DNA, iki bakteri arasındaki doğrudan temasla aktarılır ve böylece iki bakteri, bir bakteri olarak hizmet eder. Genetik materyalin donörünün F faktörü içermesi, diğerinin ise alıcı görevi görmesi nedeniyle konjugatif plazmid, patojen bakteri türleri arasında antibiyotik direncinin yayılmasını artıran ana faktörlerden biridir [150, 151]. Konjugasyon süreci, bakteri suşlarının çevresel koşullara adaptasyonunu kolaylaştırır ve simbiyotik yaşam tarsi gibi, ağır metallere ve antimikrobiyallere direnç gibi yararlı metabolik özellikleri yayarak virülanslarını artırır [152, 153].

E.coli'nin J53 (F-met pro Azir) suşu, sodium asit direnci olan ortak alıcı suş olarak çeşitli konjugasyon deneylerinde yaygın olarak kullanılmıştır. Bu suş ilk kez izole edilen *E.coli* K-12'den türetilmiştir (1922'de difteri hastasının dışkı örneğinden). Bundan sonra genel laboratuvar kullanımı için birçok mutant K-12 suşu türetilmiştir. Öncelikle J53(F+ met pro) mutant suşu türetilmiş, daha sonra J53 (F-met pro) elde edecek şekilde modifikasyon yapılmış ve son olarak doğrudan mutasyonlar sonrasında J53(F-met pro Azir)'e dönüşmüştür [154].

3. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. *Acinetobacter baumannii* İzolatları

Bu çalışmada kullanılan Beta-laktam dirençli *A. baumannii* izolatları Kırşehir Eğitim-Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. İzolatların antibiyotik direnç durumları, izole edildikleri klinik örnek türleri ve örneğin gönderildiği bölüm Hastane KARMED sisteminden elde edilmiştir (Tablo 3.1). Araştırmada kullanılan bakteriler Kırşehir Eğitim-Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarından Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarına soğuk zincirde getirildi. Bakterilerde beta-laktam direncinin teyidi için Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi tıbbi biyoloji laboratuvarına getirildikten sonra ampisilinli (50ug/ml) Luria-Bertani (LB) agara ekim yapılarak kontrol yapılmış ve sistemde beta-laktam dirençli olduğu tespit edilen 29 izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

Araştırmada, Na-Azid dirençli *E. coli* J53 suşu (F-met pro Azir) konjugasyon deneylerinde alıcı hücre olarak kullanıldı. *E. coli* ATTC 25922 suşu antibiyogram çalışmalarında kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1. *A. baumannii* izolatlarının elde edildiği klinik örnek türleri.

Örnek Tipi	Örnek Sayısı
Kan Kültürü	6
Katater Kültürü	1
Yara Kültürü	7
Balgam Kültürü	7
İdrar Kültürü	2
Diğer*	6
Toplam	29

*: Karmed sisteminde idrar, yara veya balgam olabilir olarak kaydedilmiş

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

Bu çalışma Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Tıbbi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarlarında bulunan alet ve ekipmanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Makina/techizat adı	Markası	Model
Otoklav	JSR	JSAC 60
Su Banyosu	Memmert	WNB22
Distile Su Cihazı	GFL	2001/4
Karıştırıcılı inkübatör	Memmert	Model 55
Vorteks	Scilogex	MX-S
Magnetik Karıştırıcı	Scilogex	MS-H-S
Analitik Terazı	Ohaus AV 264C	
pH metre	Hanna	HI2211-02
Blok Isıtıcı	Boeco	DBI
Termal cycler	BioRad	T-100
Elektroforez Sistemi ve Güç kaynağı	Tecne	Tecne B2
UV translimünatör	Daihan	WUV-L50
Buzdolabı	Vestel P	NF620
Derin Dondurucu	Vestel W	DDP-S1101
Mikrodalga Fırın	Vestel	MW 20-MV
Mikrosantrifüj	Sigma	Sigma 1-14
Laminar flow hood	Arma	
Jel görüntüleme sistemi	BioRad	

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Araştırmada *A. baumannii* izolatlarının canlandırılması, DNA ekstraksiyonu, antibiyotik duyarlılıkları ve konjugasyon deneyleri için çeşitli besiyerleri ve kimyasallar kullanılmıştır (Tablo 3.3).

Besiyerlerinin hazırlanması üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Dehidre besiyerleri üretici firmanın belirtmiş olduğu miktarda alınarak distile su ile çözüldükten sonra otoklavda 121 °C’de 15 dakika süre bekletilerek steril edilmiştir. Daha sonra 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra katı besiyerleri petri kutularına ve sıvı besiyerleri ise cam tüplere steril sınıf 2 kabin içerisinde aseptik şartlarda aktarılmıştır.

Son olarak sterilizasyon kontrolü için besiyerleri bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakılmış ve üreme gözlenmediği teyit edildikten sonra çalışmalarda kullanılmıştır.

Tablo 3.3. Araştırmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar.

No	Besiyeri/Kimyasal	Üretildiği Firma
1	<i>Luria-Bertani</i> (LB) Agar	Microbiology –USA
2	Eozin-Metilen-Blue Agar	Himedia – India
3	Muller-Hinton Agar	Himedia – India
4	<i>Luria-Bertani</i> (LB) Broth	Microbiology –USA
5	Nutrient Agar	Microbiology-Germany
6	Agarose	Biomax _ EEC
7	DNA Ladder	Life Science-USA
8	Gliserol	Sigma-USA
9	TAE Buffer	Life Science-USA
10	Ethidium Bromide	Sigma-USA
11	Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
12	10x PCR Buffer	Life Science-USA
13	50mM MgCl ₂	Life Science-USA
14	5mM dNTP Mix	Life Science-USA
15	Taq DNA polimeraz	Life Science-USA

3.1.4. Agaroz Jel

Araştırmada PCR sonrası ampliconları görüntülemek için yapılacak elektroforez işleminde kullanılmak üzere %0,9’luk agaroz jel hazırlanmıştır. Bu amaçla, 0,9 gr agaroz 100 µl 1X TAE buffer solüsyonu içerisinde partikül kalmayacak şekilde çözdürülmüştür. Daha sonra 50-60 °C’ye soğutulduktan sonra içerisine 5 µl etidium bromid eklendi ve yavaşça karıştırıldıktan sonra agaroz jel tankı içerisinde baloncuk oluşmadan uygun DNA kuyucukları oluşturulacak şekilde dökülmüş ve polimerize olana kadar oda ısısında inkübe edilmiştir. Agaroz jel polimerize olduktan sonra 1X TAE buffer içeren agaroz jel elektroforez tankına elektriksel akımın yönüne dikkat edilerek yerleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. *A. baumannii* İzolatlarının Beta-Laktam Direnç Genlerinin Belirlenmesi

DNA Ekstraksiyonu: Beta-laktam dirençli olduğu belirlenen 29 *A. baumannii* izolatının total DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemiyle yapılmıştır. Bu amaçla, LB ağara ekilip taze kültürleri hazırlanan izolatlardan bir öze dolusu alınmış ve 300 µl steril distile su ile ependorf tüplerde vorteksenerek süspansiyon edilmiştir. Ependorf tüpleri 100°C’de 10 dk. boyunca kuru blok ısıtıcıda kaynatılmıştır. Ependorf tüpler buzdolabında 5 dk bekletildikten sonra 10 dk. 10.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant total DNA olarak belirlenmek istenen genlerin çoğaltılmasında kullanılmıştır. Elde edilen total DNA’lar kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır [188].

PCR Reaksiyonu: Beta-laktam dirençli *A. baumannii* izolatlarında tablo 4’de bildirilen beta laktamaz direnç genlerine (blaTEM, blaSHV, blaCTX-M1, blaCTX-M2, blaGES, blaVEB, blaOXA-1) spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Bu amaçla yapılan PCR çalışmasında genlerin amplifikasyonunda son hacim 25 µl olacak şekilde Beta -laktamaz genlerinden her bir gen için 10XTaq buffer (2.5 µl), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPmix (200 µM), primer çifti (0.2 pmol/µl), Taq DNA polimeraz (1.5 U), steril distile su (13.6 µl) ve total DNA (5 µl) ilave edilerek hazırlanmış ve termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. Termal döngü cihazında genlerin amplifikasyonu için 95 C’de 3 dk ön denatürasyon sonrasında yapılan 35 siklusta her bir gen için tablo 4’te verilen denatürasyon, bağlanma, uzama sıcaklıkları ve süreleri uygulandıktan sonra 72 C’de 5 dk final uzama yapılarak amplifikasyon tamamlanmıştır.

Gradient PCR Reaksiyonu: Çalışmada pAmpC genleri (blaMOX , blaCIT , blaDHA, blaACC, blaFOX, and blaEBC) için yapılacak multipleks PCR reaksiyonunda primerler için uygun bağlanma sıcaklığını optimize etmek için gradient PCR yapılmıştır. Bu amaçla 50°C-64°C arası farklı sıcaklıklarda bağlanma sıcaklıkları ve 25 ile 35 siklus arası yapılan temel PCR aşamalarından sonra multipleks PCR reaksiyonu 25 siklus ve 64°C en uygun şart olarak optimize edilmiştir.

Multipleks PCR Reaksiyonu: Beta-laktam antibiyotiklere dirençli *A. baumannii* izolatlarında pAmpC direnç genlerinin (blaMOX , blaCIT , blaDHA, blaACC, blaFOX, and blaEBC) tespiti tablo 3.4’de bildirilen spesifik primerler kullanılarak yapılan multipleks PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla yapılan PCR’da genlerin

amplifikasyonunda son hacim 50 µl olacak şekilde yapılan multipleks PCR karışımında her bir gen için tablo 3.5’de verilen miktarlarda 10XTaq buffer, MgCl₂, dNTPmix, primer, Taq DNA polimeraz, steril distile su ve total DNA ilave edilerek hazırlanmış ve termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. Termal döngü cihazında genlerin amplifikasyonu için 95 C’de 3 dk ön denatürasyon sonrasında yapılan 25 siklusta 94 C 30 sn denatürasyon, 64 C’de 30 sn bağlanma, 72 C’de 60 sn uzama protokolü uygulandıktan sonra 72 C’de 5 dk final uzama yapılarak amplifikasyon tamamlanmıştır.

PCR ürünlerinin elektroforez sisteminde görüntülenmesi: Çalışmada *A. baumannii* izolatlarında incelenen direnç genlerinin tümünün görüntülenmesi amacıyla PCR ürünleri içerisinde 1X TAE buffer bulunan agaroz jel elektroforez sisteminde koşturulmuştur. Bu amaçla agaroz jel elektroforez sisteminde birinci kuyucuğa marker ve açılan diğer kuyucuklara 8 µl PCR ürünü 2 µl yükleme boyası eklendikten sonra sırasıyla jel kuyucuklarına yüklenmiş ve 100V’da 30 dk koşturulduktan sonra jel görüntüleme sisteminde incelenmiştir.

Tablo 3.4. *A. baumannii* izolatlarında plazmid aracılı beta-laktamaz direnç genleri.

Gen adı	Primer	Primer Sekansı (5'-3')	Amplikon uzunluğu (bp)
bla _{TEM}	F	AGTATTCAACATTTYCGTGT	847
	R	TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	
bla _{SHV}	F	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	843
	R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC	
bla _{CTX-M1}	F	GCGTGATAACCACTTCACCTC	260
	R	TGAAGTAAGTGACCAGAATC	
bla _{CTX-M2}	F	TGATACCACCACGCCGCTC	341
	R	TATTGCATCAGAAACCGTGGG	
bla _{VEB}	F	ATTTCCCGATGCAAAGCGT	542
	R	TTATTCCGGAAGTCCCTGT	
bla _{GES}	F	ATGCGCTTCATTCACGCAC	863
	R	CTATTTGTCCGTGCTCAGGA	
bla _{OXA-1}	F	TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT	519
	R	TTTCTTGCTTTTATGCTTG	
bla _{MOX}	F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520
	R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	
bla _{CIT}	F	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462
	R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
bla _{DHA}	F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
	R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
bla _{ACC}	F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346
	R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	
bla _{EBC}	F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302
	R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	
bla _{FOX}	F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190
	R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	

[190, 191]

Tablo 3.5. *A. baumannii* izolatlarında beta-laktamaz direnç genlerinin amplifikasyonu için yapılan 35 siklуста uygulanan termal döngü cihazı şartları.

Genler	Bağlanma Sıcaklığı (°C) / Süresi (sn)	Denatürasyon Sıcaklığı (°C) / Süresi (sn)	Uzama Sıcaklığı (°C) / Süresi (sn)
bla _{TEM}	50/60	95/30	72/60
bla _{SHV}	56/50	95/50	72/60
bla _{CTX-M1}	54/45	95/45	72/30
bla _{CTX-M2}	59/45		
bla _{OXA-1}	51/45	95/30	72/30
bla _{GES}	59/45	95/45	72/50
bla _{VEB}	55	95/50	72/60

sn: saniye

Tablo 3.6. *A. baumannii* izolatlarında pAmpC genlerinin tespiti için kullanılan Multipleks PCR’da kullanılan karışımlar.

Reaksiyon Karışımı	Hacim	
10x Taq buffer	1X	2.5 µl
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 µl
dNTPmix	200 µM	1 µl
MoxF	0.6 µM	0.5 µl
MoxR	0.6 µM	0.5 µl
CITF	0.6 µM	0.5 µl
CITR	0.6 µM	0.5 µl
DHAF	0.6 µM	0.5 µl
DHAR	0.6 µM	0.5 µl
ACCF	0.5 µM	0.5 µl
ACCR	0.5 µM	0.5 µl
EBCF	0.5 µM	0.5 µl
EBCR	0.5 µM	0.5 µl
FoxF	0.4 µM	0.5 µl
FoxR	0.4 µM	0.5 µl
Taq DNA Polimeraz	1.25 U	0.4 µl
Template DNA	5 µl	
ddH ₂ O	33,6	
Total	50 µl	

3.2.2. Konjugasyon

Araştırmada tespit edilen direnç genlerinin konjugatif bir plazmid üzerinde taşınıp taşınmadığını belirlemek amacıyla Broth mating [193] yöntemi kullanılarak konjugasyon deneyleri yapılmıştır. Alıcı hücre olarak *E. coli* J53 (met pro Azir), verici hücre olarak ise *A. baumannii* izolatları kullanılmıştır. Tüm hücreler LB Agar besiyerinde bir gecelik kültürleri yapılarak canlandırılmıştır. Hücrelerden tek koloni alınarak LB broth besiyerinde bir gece büyütülmüş ve ertesi gün kültürlerden 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak çalkalamasız ortamda 37°C’de bir gece inkübe edilmiştir. Daha sonra karışık kültürden 10-1 dilüsyon gerçekleştirilip 100 µl Na-Azid (100µg/ml) ve Ampisilin (50 µg/ml) içeren LB agar petri kaplarının üzerine yayma ekimleri gerçekleştirilmiştir. Petri kapları 37°C’de bir gece inkübe edilerek üreyen koloniler gözlemlenmiştir. Transkonjugant kolonilerden seçilerek üç farklı besiyerine (LB Agar+ 50µg/ml ampisilin, LB Agar 100 µg/ml Na-Azid, LB Agar+ 100 µg Na-Azid+ 50 µg/ml ampisilin) replika ekimleri gerçekleştirilmiştir. Her üç besiyerinde üreyen koloniler transkonjugant olarak belirlenmiştir. Seçilen transkonjugant hücre Na-Azid ve Ampisilin içeren LB broth besiyerlerinde büyütülmüş ve plazmid DNA’sı Mini-prep plazmid DNA isolation Kit (ThermoScientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Transkonjugant hücrelerin taşıdığı antibiyotik direnç genleri izole edilen plazmidler kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonları ile belirlenmiştir.

3.2.3. Plazmid DNA Ekstraksiyonu

Dirençli *A. baumannii* izolatlarında direnç genleri PCR ile belirledikten sonra, izolatlarda tespit edilen direnç genlerinin plazmid üzerinde olup olmadığını belirlemek amacıyla plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla Thermo Scientific firmasının (USA) Gene JET Miniprep Kit aracılığıyla yapılmıştır. Plazmid DNA ekstraksiyonu firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ile Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilen bir grup farklı klinik kaynaktan izole edilen beta-laktam dirençli *Acinetobacter baumannii* bakterisinin kullanımı yer almıştır. Bakterileri tanımlamak ve antibiyotiklere duyarlılıklarını belirlemek için otomatik bakteri tanımlama cihazı (Vitek 2) kullanılmıştır.

Tablo 4.1: Örnek türüne göre örnek dağılımı.

Örnek Türü	No	%
Kan Kültürü	6	20.6%
Kateter Kültürü	1	3.4%
Yara Kültürü	7	24.1%
Balgam	7	24.1%
İdrar	2	6.8%
Diğerleri	6	20.6%
Toplam	29	100%

29 *A. baumannii* izolatı enfeksiyon kaynaklarına göre dağıtılmış ve sonuçlar, izolatların en büyük yüzdesini oluşturan yaraların ve balgamin her birinden 7 izolatın geldiği, ardından 6 izolatın kan örneğinden ve 2 izolatın idrar örneğinden geldiği görülmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4.2: Hastane Karmed sisteminde çalışmada kullanılan *Acinobacter baumannii* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

Antibiyotikler	A.baumannii İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları	
	Direnç n (%)	Hassasiyet n (%)
Piperasilin/Tazobaktam	29 (100)	0
Seftazidim	29 (100)	0

Piperasilin/tazobaktam ve seftazidim olmak üzere iki antibiyotik kullanılarak antibiyotik duyarlılık testi yapılmış ve beta-laktamaz üreten enzim tanısı konulmuştur. Bu testin sonuçlarına göre tüm örneklerin sırasıyla >64 ve >32 çaplı antijenlere karşı direnç verdiği yönündedir. *A. baumannii*'nin sahip olduğu plazmid aracılı beta-laktam ve plazmid aracılı

pAmpC direnç genleri, gene spesifik primerler kullanılarak PCR ile 29 örnekte tanımlanmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.3.A: *Acinetobacter baumannii* izolatlarından PCR ile tespit edilen plazmid aracılı B-laktam direnç genlerinin dağılımı.

Örnek No	<i>blaGES</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaCTX-m1</i>	<i>blaCTX-m2</i>	<i>blaOXA-1</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaVEB</i>
AB1	+	-	-	-	-	-	-
AB2	+	-	-	-	-	-	-
AB3	+	+	-	+	-	-	-
AB4	+	-	-	-	-	-	-
AB5	+	-	-	-	-	-	-
AB6	+	+	-	-	-	-	-
AB7	+	+	-	-	-	-	-
AB8	+	-	-	-	-	-	-
AB9	+	+	-	+	-	-	-
AB10	+	+	-	-	-	-	-
AB11	-	+	-	+	-	-	-
AB12	-	+	-	+	-	-	-
AB13	+	+	-	+	-	-	-
AB14	+	+	+	-	+	+	-
AB15	+	+	-	-	-	-	-
AB16	+	-	-	-	-	-	-
AB17	+	+	-	-	-	-	-
AB18	-	-	-	+	-	-	-
AB19	-	-	-	-	-	+	-

Tablo 4.3.A (devam): *Acinetobacter baumannii* izolatlarından PCR ile tespit edilen plazmid aracılı B-laktam direnç genlerinin dağılımı.

Örnek No	<i>blaGES</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaCTX-m1</i>	<i>blaCTX-m2</i>	<i>blaOXA-1</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaVEB</i>
AB20	+	-	-	-	-	+	-
AB21	+	-	-	-	-	+	-
AB22	+	-	-	+	-	+	-
AB23	+	+	-	+	-	-	-
AB24	+	+	-	-	-	+	-
AB25	-	-	-	+	-	-	-
AB26	-	+	+	-	+	+	-
AB27	-	+	-	-	-	+	-
AB28	-	-	-	+	-	-	-
AB29	-	+	-	-	-	+	-

Tablo 4.3.A’da, 29 *A. baumannii* izolatlarının değişen oranlarda B-laktamaz genlere sahip olduğu, 20 izolatta *blaGES* geni, 16 izolatta *blaSHV* geni, 10 izolatta *blaCTX-m2*, 9 izolatta *blaTEM* geni, 16 izolatta *blaSHV* geni ve yalnızca ikisinde *blaCTX-m1* ve *blaOXA-1* genleri tespit edildiği görülmektedir.

Tablo 4.3.B: *Acinetobacter baumannii* izolatlarından PCR ile tespit edilen plazmid aracılı AmpC direnç genlerinin dağılımı.

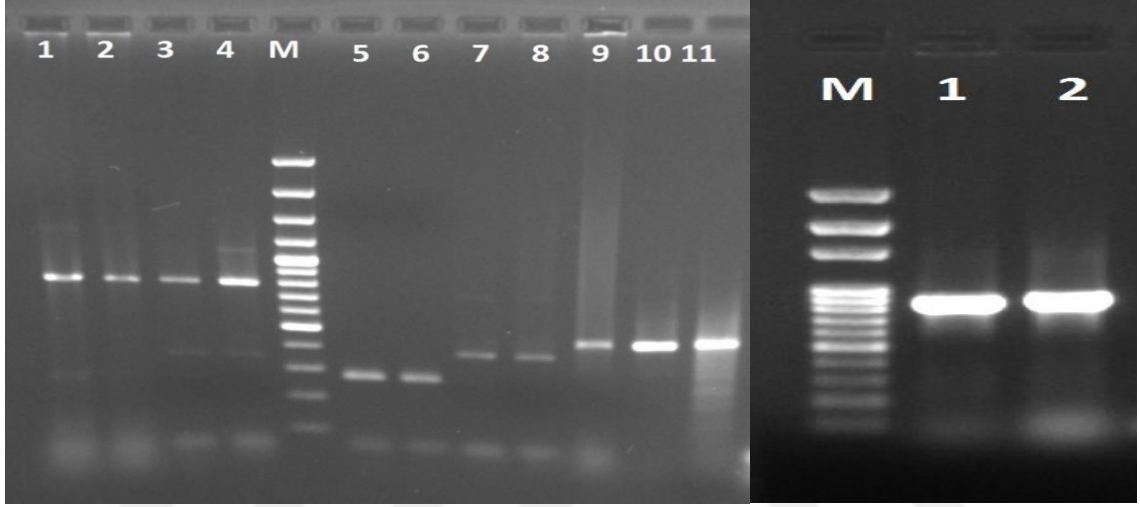
Örnek No	<i>blaMOX</i>	<i>blaCIX</i>	<i>blaDHA</i>	<i>blaACC</i>	<i>blaEBC</i>	<i>blaFOX</i>
AB1	-	-	-	-	-	-
AB2	-	-	-	-	-	-
AB3	-	-	-	-	-	-
AB4	-	-	-	-	-	-
AB5	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.3.B (devam): *Acinetobacter baumannii* izolatlarından PCR ile tespit edilen plazmid aracılı AmpC direnç genlerinin dağılımı.

Örnek No	<i>blaMOX</i>	<i>blaCIX</i>	<i>blaDHA</i>	<i>blaACC</i>	<i>blaEBC</i>	<i>blaFOX</i>
AB6	-	-	-	-	-	-
AB7	-	-	-	-	-	-
AB8	-	-	-	-	-	-
AB9	-	-	-	-	-	-
AB10	-	-	-	-	-	-
AB11	-	-	-	-	-	-
AB12	-	-	-	-	-	-
AB13	-	-	-	-	-	-
AB14	-	-	-	-	-	-
AB15	-	-	-	-	-	-
AB16	-	-	-	-	-	-
AB17	-	-	-	-	-	-
AB18	-	-	-	-	-	-
AB19	-	-	-	-	-	-
AB20	-	-	-	-	-	-
AB21	-	-	-	-	-	-
AB22	-	-	-	-	-	-
AB23	-	-	+	-	-	-
AB24	-	-	-	-	-	-
AB25	-	-	-	-	-	-
AB26	-	-	-	-	-	-
AB27	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.3.B (devam): *Acinetobacter baumannii* izolatlarından PCR ile tespit edilen plazmid aracılı AmpC direnç genlerinin dağılımı.

Örnek No	<i>blaMOX</i>	<i>blaCIX</i>	<i>blaDHA</i>	<i>blaACC</i>	<i>blaEBC</i>	<i>blaFOX</i>
AB28	-	-	-	-	-	-
AB29	-	-	-	-	-	-

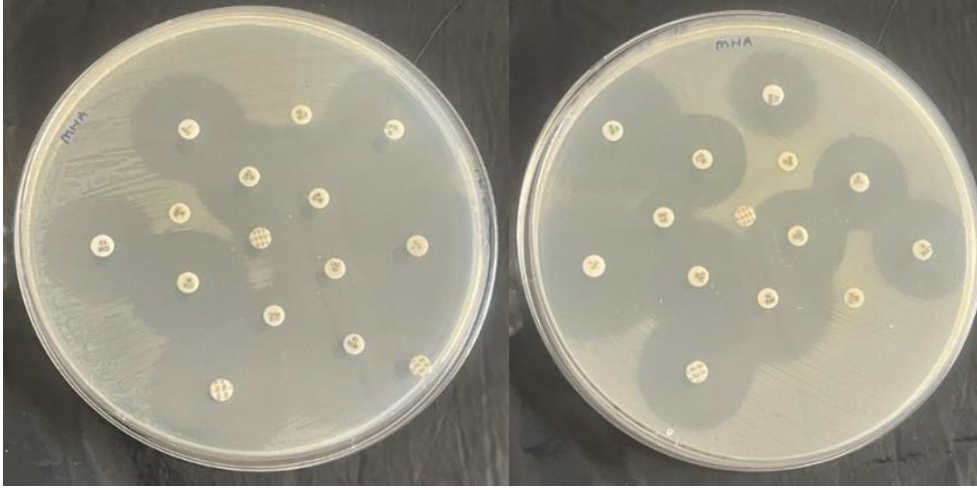


Şekil 4.1: Pozitif β -laktamaz ve pAmpC direnç genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Bu çalışmada plazmid aracılı AmpC genlerinden sadece birinde *blaDHA* geni tespit edilmiş ve 29 *A. baumannii* izolatının hiçbirinde *blaMOX*, *blaCIT*, *blaACC*, *blaEBC* ve *blaFOX* genleri tespit edilememiştir (Tablo 4.3.B) (Şekil 4.1).

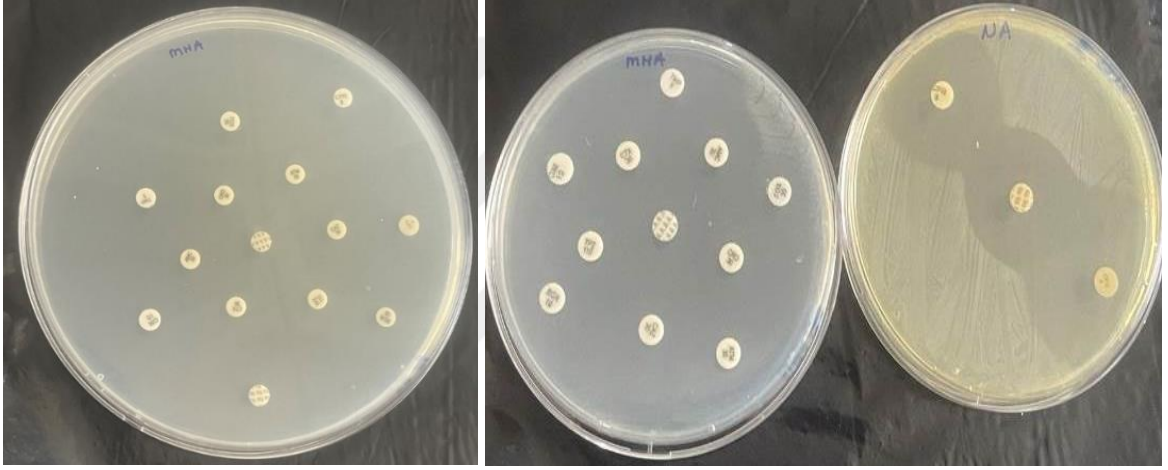
Tablo 4.4: Mueller-Hinton agarda Tc24-Tc26- Tc28 ve *E.coli* j53 numuneleri için transkonjugasyon yapılan numunelerin antibiyotiklerle uygulanan testi (Kirby Bauer yöntemi).

Antibiyotikler	Tc24	Tc26	Tc28	<i>E.coli</i> J53
Ampisilin	R (0)	R (0)	R(0)	S(30)
Seftriakson	R (0)	S(30)	S(30)	S(30)
Amoksisilin-Klavulanik Asit	R (0)	R (0)	R(0)	S(30)
Sefotaksim	R (0)	S(30)	S(30)	S(30)
Piperasilin-Tazobaktam	R (0)	S(30)	S(24)	S(30)
Seftazidim	R (0)	S(30)	S(30)	S(30)
Aztreonam	R (0)	S(30)	S(30)	S(30)
Trimetoprim	R (0)	S(30)	S(30)	S(30)



A

B



C

D

Şekil 4.2: Muller-Hinton agar üzerinde transgonjuge edilmiş *Acinetobacter baumannii* örneklerinin antibiyotik duyarlılık testi (Kirby-Bauer yöntemi).

A: TC 28 sadece Ampisilin ve Amoksisilin-Klavulanik asit için dirençlidir.

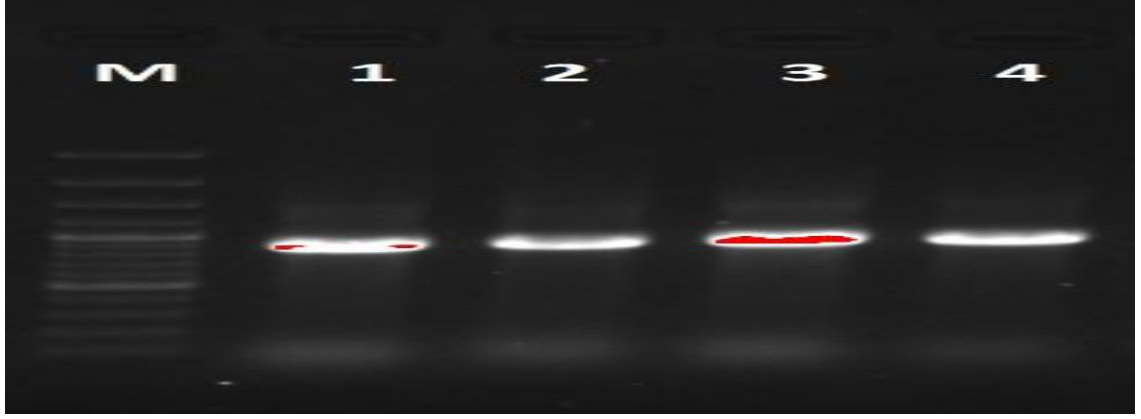
B: TC 26 sadece Ampisilin ve Amoksisilin-Klavulanik asit için dirençlidir.

C : TC 24 8 antibiyotiğin tamamına dirençlidir.

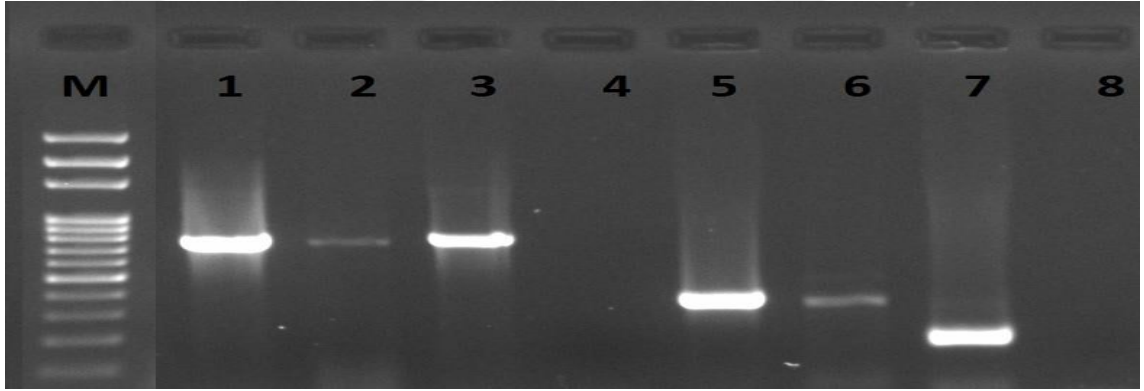
D: *E.coli* j53, 8 antibiyotiğin tamamına duyarlıdır.

29 adet *A. baumannii* izolatında antibiyotik direnç genlerinin aktarılabilirliğini tespit etmek amacıyla yapılan konjugasyon deneyleri sonucunda, eşleştirme adımları gerçekleştirilerek 8 farklı antibiyotik için disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılığı test edilmiştir. Sonuçlar, Tc24 izolasyonunun sekiz antibiyotiğin tümüne

dirençli olduğunu ve Tc26 ve Tc28 izolasyonunun yalnızca ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit dirençli olduğunu göstermiştir (Tablo 4.4) (Şekil 4.2).



Şekil 4.3: BlaTEM, blaSHV genlerinin etidyum bromür ile agaroz jel elektroforez sistemine taşınmasıyla elde edilen görüntü.



Şekil 4.4: blaTEM, blaSHV, blaOXA-1 ve blaCTX-m1 genlerinin etidyum bromürlü agaroz jel elektroforez sistemine taşınmasıyla elde edilen görüntü.



Şekil 4.5: balCTX-m2 geninin etidyum bromür ile agaroz jel elektroforez sistemine taşınmasıyla elde edilen görüntü.

A. baumannii izolatlarının transfer edilebilir plazmid aracılı antibiyotik direnç genleri taşıyıp taşımadığını belirlemek için polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmıştır. Tc24 izolatının konjugatif plazmid taşıdığı ve blaTEM ve blaSHV genini taşıdığı (Şekil 4.3), Tc26 izolatının blaTEM ve blaOXA-1 genini taşıdığı (Şekil 4.4), Tc28 izolatının blaCTX-m2 genini taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.5).

A. baumannii izolatlarının aktarılabılır plazmid aracılı antibiyotik direnç genleri taşıyıp taşımadığını belirlemek için polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmıştır.

5. TARTIŞMA-SONUÇ

Acinetobacter baumannii antibiyotiklere karşı giderek daha dirençli hale geldiğinden ve tedavisi zor ciddi hastalıklara neden olduğundan, 21. yüzyılın en ölümcül patojenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. *A. baumannii*, tıbbi tesislerin yüzeyleri ve cerrahi aletler gibi cansız nesneler üzerinde kuru bir ortamda bir aydan fazla dayanabilir. *A. baumannii*, mikrobiyal hücrelerin hem canlı hem de cansız yüzeylerde toplanıp birbirine yapışarak bir biyofilm oluşturmak için proteinler ve polisakkaritler üretebilir. *Acinetobacter baumannii*'ni en ciddi fırsatçı nozokomiyal patojenlerden biri olduğu, çoklu ilaca dirençli olduğu ve günümüzde yaygın olduğu göz önüne alındığında, Beta-laktamaz enzimi üretmesi ve floro-kinolonlar ve aminoglikozidlere karşı direnci nedeniyle MDR olarak değerlendirilmektedir [17]. *Acinetobacter baumannii*, daha çok yoğun bakım ünitelerinde mekanik ventilasyon ihtiyacı olan ve yara veya yanık gibi durumlarda enfeksiyona neden olan bir nozokomiyal patojendir. Bu bakteri, bakteriyemi, pnömoni, menenjit, idrar yolu ve yara enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır [155]. Epidemiyolojik incelemelerle tespit edilen salgınlarda çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* izolatlarının yayılımında hastanedeki kontamine yüzeyler bu patojen için önemli bir kaynak olduğu görülmektedir. Hastane enfeksiyonu sürveyansı ile ilişkili raporlarda bu bakterinin yanık ünitelerinde yatan hastalarda görülen enfeksiyonlarda insidansının arttığı, ölümcül sepsis şok ve bakteriyemi gibi klinik tablolara neden olduğu gözlenmiştir. Hastanelerde çoklu ve yaygın ilaç dirençli *A. baumannii* klonlarının kontrol altına alınması, yeni kontrol önlemlerinin geliştirilmesi, hastalar arası çapraz kontaminasyonların önlenmesi, gerçek bir salgının zamanında ve doğru tanımlanıp kaynağının tespit edilmesi için, klonal düzeyde ayırım yapabilen moleküler epidemiyolojik analiz yöntemlerinin kullanılması önem taşımaktadır. *Acinetobacter baumannii*, antimikrobiyal ilaç direncinde direnç genleri taşıyan plazmidleri, transposonları veya integronları elde etmek için önemli bir yeteneğe sahiptir ve bu yetenek çoklu ve yaygın ilaç direncine yol açar. *A. baumannii*'de ilaç direncinin kontrolü, sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle tıbbi bir sorundur [156]. Bu çalışma ile *Acinetobacter baumannii* izolatlarında β -laktamaz ve AmpC plazmidlerini farklı klinik kaynakların aracılık ettiği direnç genlerinden izole edilmesi, ayrıca bu

genlerin başka bir bakteri türüyle konjugasyon süreci yoluyla transfer etme ve yayma yeteneği araştırılmıştır.

Araştırmanın sonuçlarına göre, 29 izolatın en büyük yüzdesinin yaralardan ve balgamdan olmak üzere bunların her birinden 7 izolatın geldiği (%24,1), ardından 6 izolatın kan örneğinden (%20,6) ve 2 izolatın idrar örneğinden (%6,8) geldiği görülmüştür. Çalışmamızın sonucuyla uyumlu olan bir çalışmada en büyük *A.baumannii* yüzdesi (%10,6) yara sürüntülerinden alınan izolatlardan bulunmuştur [157]. Yine en büyük yüzdeye sahip izolatın yaralardan elde edildiğini bulan bir çalışmada bunun nedeninin, bu bakterilerin fırsatçı olması, hastane, ameliyathane ve yoğun bakım ünitelerinde hijyen ve sterilizasyonun ihmal edilmesi olabileceği düşünülmüştür [158]. Benzer bir çalışmada %38 oranla 15 *Acinetobacter* bakteri izolatının en büyük izolat yüzdesinin balgam örneklerinden elde edildiği sonucuna ulaşılmıştır [159]. *A. baumannii*, sıklıkla hastanede yatan ağır/düşkün hastalarda pnömoni, yara yeri enfeksiyonu, üriner sistem enfeksiyonu, bakteremi ve menenjit gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır, bu nedenle balgam izolatlarında daha çok tespit edilmektedir. Bu bakterinin yaralarda bulunma nedenleri olarak ise; epitel hücrelerine tutunmada rol alan adezyon molekülleri, K1 tipi kapsül yapısı, lipolitik ve sitotoksik aktivite gösteren ekstraselüler enzimlerin varlığı, epitel hücreleri üzerinde apoptotik etki gösteren dış membran proteini, biyofilm oluşumu ve abiyotik yüzeylerde uygun olmayan çevresel koşullarda (kuruluk, düşük ısı, sınırlı besin miktarı) uzun süre yaşayabilmesine olanak sağlayan hücresel komponentlerinin varlığı sayılabilir.

Çalışmamızın sonucu idrar örneklerinden elde edilen iki izolatta bakteri bulan araştırma ile aynı fikirdeyken [157], en yüksek bakteri oranını 15 (%30) kan örneklerindeki izolattan elde eden çalışma ile uyumlu değildir [160], Buna rağmen, bu bakteri idrar yolu enfeksiyonlarının yaygın nedenlerinden olduğu da bilinmektedir. *A.baumannii* bakterisi, idrar sondası işlemi sırasında, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar ve yaşlılar olmak üzere üretraya ulaşabilir, çünkü bu bakteri, antibiyotiklere ve sterilizatörlere direnç gösterme ve cerrahi aletlerin ve ameliyathanelerin yüzeylerini kolonize etme ve bir bakteri oluşturma yeteneği ile karakterize edilir [161].

Acinobacter baumannii izolatlarından PCR ile tespit edilen plazmid aracılı B-laktam direnç genlerinin dağılımına bakıldığında çalışmada elde edilen bulgulara göre, diğer genlere göre en yüksek yüzdeyi %68,9 ile blaGES geni verirken, bunu %55,1 ile blaSHV geni, %34,4 ile blaCTX-m2 geni ve %31 ile blaTEM geni izlemiştir. Beta-laktam

antibiyotiklerin bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanımı, mikropların sürekli olarak antibiyotik direnç genleri geliştirme yeteneği ve Beta-laktamaz enzimlerinin üretimi nedeniyle hedef organizmalarda direnç gelişimi nedeniyle karmaşık hale gelmiş ve gelmeye devam etmektedir. İzolatların moleküler analizlerine göre *A.baumannii* izolatlarında aktarılabilir direnç genleri üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır. 2006 yılında Çin'de yapılan bir araştırmada *A. baumannii*'nin blaTEM geninin %33,3 olduğu, bunu blaCTX-m1 ve blaOXA-1 genleri takip etmekte olup her iki gen de %6,8 oranında izlenmiştir ve hiçbir izolatta blaVEB genine dair kanıt bulunamamıştır [162].

Bulgularımız SHV geninin blaTEM geninden daha yaygın olduğunu bulan Huang ve ark. (2014) ve Pooshaneh ve ark. (2011)'nın çalışmasıyla uyumludur [123, 163]. Buna karşılık Sharif ve ark.'nın 2014'te Tahran'da yaptığı bir araştırmada bakteri izolatlarındaki yaygın genlerin sırasıyla %56 ve %63'ünün blaTEM ve blaSHV olduğunu bildirirken Taherikalani ve ark. (2012) *Acinetobacter*'de bu genlerin hiçbirine dair hiçbir kanıt bulamamıştır [164]. Jin ve ark. (2009) *A.baumannii* izolatları arasında blaTEM ve blaOXA pozitif örneklerin sırasıyla %81 ve %25 olduğunu, Danes ve ark., (2002) izolatlar arasında blaTEM ve blaOXA pozitif örneklerin sırasıyla %44,4 ve %35 olduğunu bulmuşlardır [165, 166].

Dai ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada *A.baumannii*'nin 39 izolatında; 15 suşta blaTEM-1 geni, 2 suşta blaSHV geni, 17 suşta blaOXA geni ve 23 suşta AmpC geni tespit edilmiştir [167]. Adams-Haduch tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada ise *Acinetobacter baumannii*'nin 49 izolatında B-Laktamaz genleri araştırılmış ve 36 izolatında blaTEM geni, 5 izolatında blaCTX-M2 geni bulunmuş ve hiçbir izolatta blaSHV geni tespit edilmemiştir [168]. 2004 yılında yapılan bir araştırmada *A. baumannii* suşları tarafından üretilen blaCTX-M2 ESBL geninin bir nöroşirurji servisi izolatında tespit edilmiş, 2014 yılında Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise blaGES genlerinin yaygın olduğu bulunmuştur [169, 170]. Çalışmada ayrıca 101 izolatın 24'ünün %23,7 oranında blaOXA-51 geni taşıdığı, 79 izolatın blaOXA-23 ve yalnızca bir izolatın blaOXA-40 geni taşıdığı tespit edilmiştir [170]. *A.baumannii* suşunun geleneksel PCR teknolojisiyle yapılan diğer çalışmalarda, blaGES geni için %100 (63/63) ve %33,3 (9/27) prevalans oranları belirlenmiştir [171, 172]. 2011 yılında Tayland'da yapılan ve *E. coli* bakterisinde polimeraz zincir reaksiyonu ile Beta-laktamaz genlerinin tespit edildiği bir çalışmada, genlerin yaygınlık oranları blaTEM %72,2, blaCTX-M-like %52,8, blaVEB %16,7 olarak bulunmuş ve blaSHV geni hiç bir izolatta tespit edilmemiştir [173]. Bu

sonuçlarla uyumlu olan bazı çalışmalarda, *A. baumannii* suşunda Beta-laktamaz genlerinin korkutucu derecede yayıldığı, *A.baumannii*'de blaTEM, blaSHV, blaGES, blaCTX-M, blaPER ve diğerleri gibi geniş bir ESBL aralığının rapor edildiği kaydedilmiştir [174, 175, 176]. Ambler Sınıf A'da bulunan ESBL enzimleri, *A. baumannii* gibi fermentize olmayan gram-negatif patojenlerde giderek yaygınlaşmaktadır. Bu türlerde en yaygın olanı PER, VEB ve GES türleridir [177]. Ayrıca, aztreonam ve seftazidime karşı güçlendirilmiş GES tipi ESBL'ler, *A. baumannii*'de 2010 yılından itibaren arttığı tespit edilmiştir [156]. Son yıllarda *Acinetobacter* türlerinde aminoglikozidlere, kinolonlara ve karbapenemlere direnci de kapsayan çoğul dirençli suşlar, karbapenem duyarlı ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten *Acinetobacter baumannii* izolatlarında 40'dan fazla bulunan direnç genleri ve bu suşların genetik değişkenliği var olan bir gerçektir. Bu özellikler bakteriyeye, antibiyotik baskısı devam ettiği sürece çeşitli direnç mekanizmalarından faydalanma yeteneği vermekte ve aynı izolatta birkaç direnç mekanizması bulunabilmektedir. ESBL genleri çoğunlukla plazmid aracılıdır ve bu nedenle diğer bakterilere kolaylıkla aktarılır. Bakteriler arasındaki bu genetik transfer, ESBL üreten suşların daha hızlı yayılmasına neden olur. Dolayısıyla çalışmaların yapıldığı bölgelerin farklı olması, direnç genleri taşıyan patojenik suşların özellikle hastanelerdeki yaygınlığının farklı olması, hastaların antimikrobiyal ilaçları kötüye/aşırı kullanması, çalışma tasarımı ve metodoloji ve örneklem açısından farklı çalışmaların sonuçları farklılık gösterebilmektedir. Yine farklı gen oranları bulunması çalışmaların zamanlarındaki farklılıklara ve buna bağlı olarak antibiyotik reçetelerindeki değişikliklere bağlı olabilir. β -laktamaz üreten izolatların prevalansı ve bunların yaşamı tehdit eden enfeksiyonlardan izolasyonu dünya çapında dramatik bir şekilde artmaktadır. Hastaların antimikrobiyal ilaç kullanımına yönelik yoğun baskısı, normal floranın ortadan kalkmasına ve MDR izolatlarının ikame edilmesine yol açmıştır. Bu çalışma, β -laktamaz üreten *A. baumannii* suşlarının hastanelerde özellikle de yoğun bakım ünitelerinde yeni ortaya çıkan bir tehdit olduğunu ve bunların ciddi sonuçlarının ve hastalardaki ölüm oranlarının azaltılmasına yardımcı olacak zamanında tanımlama ve sıkı izolasyon yöntemlerinin uygulanmasıyla denetlenmesi gerektiğini göstermiştir.

Bu çalışmada Disk difüzyon yöntemi kullanılarak 8 antibiyotiğe duyarlılık testi yapılmış ve Ampisilin, Seftriakson, Amoksisilin-Klavulanik asit, Sefotaksim, Piperasilin-Tazobaktam, Seftazidim, Aztreonam ve Trimetoprim antibiyotikleri dahil edilmiştir.

Sonuçlar, Tc24 izolasyonunun sekiz antibiyotiğin tümüne dirençli olduğunu ve Tc26 ve Tc28 izolasyonunun yalnızca ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asite dirençli olduğunu göstermiştir. Ayrıca *A.baumannii* bakterisinin, Piperasilin/tazobaktam ve seftazidime direnç oranının %100 olduğu bulunmuştur. Goudarzi ve ark., (2015)'nin yaptığı çalışmada *A. baumannii* bakterisinin ampisiline direnç oranının %100 olduğu, (Maraki ve ark., (2016)'nin araştırmasında *A. baumannii* direncinin %92 ve Zhou ve ark., (2011)'nin yaptığı başka bir çalışmada, *A. baumannii* %78,5 olduğu bulunmuştur [178, 179, 180].

Dina Dawood, (2023) tarafından yapılan çalışmada bakterilerin sefotaksim ve seftazidime direnci %33 olarak bulunmuş iken Salman ve diğerleri, (2021) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre bakteriler her iki antibiyotiğe de %100 dirençli olarak bulunmuştur [181, 182]. Aynı şekilde direnç oranını Al-Dahlaki ve ark., (2020) tarafından yapılan çalışmada, sefotaksime %100 ve seftazidime %90 olarak, Mahdi (2019)'nin yaptığı çalışmada ise sefotaksim antibiyotiğine ise %50 olarak tespit edilmiştir [183, 159]. Görüldüğü üzere dünya genelinde yapılan araştırmalardaki direnç oranlarında oldukça farklılık gözlenmektedir. Bu farklılıkların nedenleri arasında antibiyotik kullanımındaki yanlışlar veya aşırı antibiyotik kullanımı sayılabilir. Antibiyotiklerin yaygın ve hatalı kullanımı, antibiyotik dozunun iyi ayarlanmaması gibi nedenlerden dolayı direnç oranları artmakta ve tedaviler zorlaşmaktadır. Buna ek olarak veteriner hekimlikteki yüksek antibiyotik kullanım oranı direnç artışının nedenlerindendir. Karbapenemaz sentezleyen izolatların dağılımlarının takip edilmesi ve uygun tedaviye karar vermek için bu izolatların tespiti son derece önemlidir. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında karbapenemaz varlığının ve gen varlığının belirlenmesinde hızlı, tekrar edilebilir ve yüksek doğruluk oranıyla saptanmasını sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Fenotipik yöntemlerle karbapeneme direnci tespit edilen Gram-negatif bakterilerde direnç genlerinin moleküler yöntemlerle de incelenmesi, tedavi seçimi ve enfeksiyon kontrolünde fayda sağlayacaktır. Bunun için, daha fazla sayıda bakteri suşunda fenotipik yöntemlerle genotipik yöntemlerin kıyaslandığı başka araştırmalara da gereksinim olduğu düşünülmektedir [184].

Çalışmamızda *A. baumannii*'nin, Seftriakson, Piperasilin-Tazobaktam, Aztreonam ve Trimetoprim antibiyotiklerinin her birine karşı direnç oranı %33,3 olarak bulunmuştur. Araştırmacının yaptığı çalışmada Piperasilin-Tazobaktam'a karşı direnç oranı %100 olarak bulunmuştur [183]. Benzer araştırmalarda Seftriakson direnci %68 ve %96 olarak

bulunmuştur [185, 186]. Bu durum bizim çalışmamızda ulaştığımız %33'lük oran ile örtüşmemektedir. Sefalosporin grubu antibiyotiklere (Seftriakson, Seftazidim ve Sefotaksim) direnç oranlarındaki bu farklılığın nedeninin, bu sınıftaki antibiyotiklerin aşırı ve yaygın kullanımı, ayrıca kromozomal sefalosporinaz enzimlerinin yüksek oranda üretilmesi olduğu düşünülmektedir [187]. Direnç oranının antibiyotikler arasındaki farklılığının nedeni son dönemde nadiren reçetelenmesi olabilir. sonuçlardaki farklılık, izolat türlerindeki çeşitliliğe, kullanılan antibiyotik disklerindeki çeşitliliğe ve çalışmaların coğrafi bölgeleri ile enfeksiyon kontrol politikalarının farklılığına bağlanabilir. Bu nedenle *A. baumannii*'nin antibiyotik duyarlılığının bölgesel olarak belirlenmesi, rutin antibiyotiklerin etkin kullanımı için uygun bir rehber görevi görebilir.

Antibiyotik direnci, dünya çapında tıp ve sağlık sektörünün karşı karşıya olduğu en önemli sorunlardan biri olup, *A. baumannii* bakterisinin direnci sürekli artmaktadır ve bunun temel nedeni, antibiyotiklerin gelişigüzel kullanılmasının yanı sıra antibiyotiklere karşı bağışıklığın gelişmesidir. Bakterilerin döngüyü kırma yeteneğine sahip olan Beta-laktamaz antijenlerine sahip olmaları ve sürekli gelişmeleri gibi yeni genetik faktörler kazanmaları, antikorun içerdiği Beta-laktamları etkisiz hale getirmektedir. Araştırmalar, seftazidim ve sefitaksim antibiyotiklerini yok eden ve bunlara direnç gösteren beta-laktamaz enzimlerini kodlayan TEM-2 genlerine sahip olduğunu göstermiştir [187].

Bu çalışmadan şu sonuçlar elde edilmiştir:

Acinetobacter baumannii izolatları plazmid bağlantılı β -laktam antibiyotiklere karşı blaTEM, blaCTX-M2 blaSHV ve blaOXA direnç genleri dahil olmak üzere birçok direnç genine sahiptir ve bunlar konjugatif plazmidler tarafından aktarılmaktadır. Bu plazmidlerin β -laktam direnç genlerini yerleştirme yeteneği, ülkemizdeki hastanelerde *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavi ve kontrolünde büyük sorunlar yaratabilir.

Araştırmamızda, üç yeni trans konjuge hücre hattının, genişlemiş spektrumlu β -laktamaz üretimini kodlayan genler içerdiği görülmektedir. Trans konjuge hücre hatlarından biri çalışmada kullanılan 8 antibiyotiğin tamamına (ampisilin, seftriakson, amoksisilin-klavulanik asit, sefotaksim, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, aztreonam ve trimetoprim) dirençli bulunmuştur. Diğer ikisi ise sadece iki antibiyotiğe (ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit) dirençli olarak bulunmuştur.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre şu önerilerde bulunulmuştur:

Beta-laktam antibiyotiklerin (örneğin penisilinler, tam nesil sefalosporinler, karbapenemler ve monomisinler) aşırı kullanımı önerilmez.

Hem mevcut veriler hem de bulgularımız, plazmid aracılı β -laktam direncinin belirleyicilerinin moleküler analiz yoluyla tanımlanmasının ve direnç gelişimine yol açan mekanizmaların karakterize edilmesinin gerekliliğini ve önemini vurgulamaktadır.

Ayrıca ülkemizde ve dünyada geniş çaplı süveyans çalışmaları ile plazmid aracılı beta-laktam direnci prevalansının doğru bir şekilde belirlenmesinin, sorunun boyutunun belirlenmesine ve hastalığın hızla yayılmasının önlenmesi için harekete geçilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sikora J, Rowe J, Barat S, Bean JL, Brady M, Désert JM, Stürmer J. Updated Planetary Mass Constraints of the Young V1298 Tau System Using MAROON-X. *The Astronomical Journal*. 2023; 165(6):250.
2. Magill SS, O'Leary E, Janelle SJ, Thompson DL, Dumyati G, et al. Emerging infections program hospital prevalence survey Team. Changes in Prevalence of Health Care-Associated Infections in U.S. Hospitals. *N Engl J Med*. 2018; 379(18):1732-1744.
3. Storr J, Twyman A, Zingg W, Damani N, Kilpatrick C, et al. WHO Guidelines Development Group. Core components for effective infection prevention and control programmes: new WHO evidence-based recommendations. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:6.
4. Holten KB, Onusko EM. Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *Am Fam Physician*. 2000; 62(3): 611-620.
5. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev*. 2017; 30(1):409-447.
6. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008 Apr 15;197(8):1079-81.
7. Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M. New treatment options against gram-negative organisms. *Crit Care*. 2011;15:215.
8. Antunes LC, Visca P, Towner KJ. Towner *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis*. 2014; 71(3): 292–301.
9. Chittawatanarat K, Jaipakdee W, Chotirosniramit N, Chandacham K, Jirapongcharoenlap T. Microbiology, resistance patterns, and risk factors of mortality in ventilator-associated bacterial pneumonia a Northern Thai tertiary-care university based general surgical intensive care unit. *Infect Drug Resist*. 2014; 7:203-210.

10. Asif M, Alvi IA, Rehman SU. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and Drug resistance*. 2018; 11:1249-1260.
11. Yakkala H, Samantarrai D, Gribskov M, Siddavattam D. Comparative genome analysis reveals niche-specific genome expansion in *Acinetobacter baumannii* strains. *PLoS One*. 2019; 14(6):1-26.
12. Dinç U, Bayramoğlu G, Buruk K, Ulusoy H, Tosun I, Kaklikkaya N. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex isolated from clinical specimens at an intensive care unit. *Saudi Med J*. 2010; 31(4):453–455.
13. Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, JolyGuillou ML. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int. J. Infect. Dis*. 2013; 17:802-805.
14. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12:826–36.
15. Dekic S, Hrenovic J, Hunjak B, Kazazic S, Tibljas D, Ivankovic T. Virulence factors of *Acinetobacter baumannii* environmental isolates and their inhibition by natural zeolite. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2017; 6(3):1697-1709.
16. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:55.
17. Xie R, Zhang XD, Zhao Q, Peng B, Zheng J. Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7(1):31.
18. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat. Rev. Microbiol*. 2018; 16:91–102.
19. Mathur MD, Vidhani S, Mehndiratta PL. Bacteriophage therapy: an alternative to conventional antibiotics. *J Assoc Physicians India*. 2003; 51:593-6.
20. Fournier PE, Richet H, Weinstein RA. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 42(5):692-699.

21. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life*. 2011; 63:1055-1060.
22. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 70(1):119-23.
23. Geoghegan J. The value of open spaces in residential land use. *Land use policy*, 2002; 19(1):91-98.
24. Preston DL, Shimizu Y, Pierce DA, Suyama A, Mabuchi K. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. *Radiat Res*. 2003; 160(4):381-407.
25. Neu HC. Effect of β -lactamase location in *Escherichia coli* on penicillin synergy. *Applied Microbiology*. 1969; 17(6):783-786.
26. Sepahvand S, Doudi M, Davarpanah MA, Bahador A, Ahmadi M. Analyzing *pmrA* and *pmrB* genes in *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin in Shahid Rajai Shiraz, Iran Hospital by PCR: First report in Iran. *Pak J Pharm Sci*. 2016; 29(4):1401-6.
27. Gonzalez-Villoria AM, Valverde-Garduno VV. Antibiotic resistant *acinetobacter baumannii* increasing success remains challengea nosocomial pathogen. *Journal Pathogens*, 2016; 10.
28. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 2012; 3(3):243-250.
29. Nandi D, Arjuna A. *Acinetobacter* main cause of hospital acquired infections: a review. *Asian J. Pharm. Clin. Res*. 2017; 10(5):53-56.
30. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes and Environments* 2011; 26(2):101-112.
31. Blachandran P, Theiler J, Rondinelli J. Materials Prediction via Classification Learning. *Sci Rep*. 2015;5:1-16.
32. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. *IUBMB Life*. 2011; 63(12):1048-54.

33. Ramette A, Kronenberg A; the Swiss Centre for Antibiotic Resistance (ANRESIS). Prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from 2005 to 2016 in Switzerland. *BMC Infect Dis.* 2018; 18(1):159.
34. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. *World J. Clin. Cases.* 2014; 2:787–814.
35. Al-Kobaisi MF. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology: 24th Edition. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2007; 7(3):273–5.
36. Jung J, Park W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99(6):2533-48.
37. Bergonge-Berezin E, Towner K. *Acinetobacter* SPP. As nosocomial pathogen: microbiological, clinical and epidemiological features. *Journal of Clinical Microbiology.* 1996; 9:148-165.
38. Constantiniu S, Romaniuc A, Iancu L, Tarasi I. 2004. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp strains isolated from hospital units . *The Journal of Preventive Medicine.* 2004; 12:35-42.
39. King LB, Swiatlo E, Swiatlo A, McDaniel LS. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 55(3):414-21.
40. Gutnick DL, Bach H. Potential application of *acinetobacter* in biotechnology. Gerischer U, editor. *Acinetobacter Molecular Biology.* United Kingdom: Caister Academic Press Norfolk; 2008; 203.
41. Abd-Al-Haleem D. *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *African Journal of Biotechnology.* 2003; 2(4):71-75.
42. Talukdar A, Hodiwala AB, Sharma R. A Microbiological study of *Acinetobacter baumannii* with special reference to multi-drug resistance. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2018; 7(2):1176-1186.
43. Cheng VC, Wong SC, Chen JH, So SY, Wong SC, Ho PL, Yuen KY. Control of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Hong Kong: Role of environmental

surveillance in communal areas after a hospital outbreak. *American journal of infection control*. 2018; 46(1):60-66.

44. Gallego L. *Acinetobacter baumannii*: factors involved in its high adaptability to adverse environmental conditions. *J. Microbiol Exp*. 2016; 3(2):1-4.

45. Leungtongkam U, Thummeepak R, Tasanapak K, Sitthisak S. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2018; 13(12):1-12

46. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, Snyder M. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev*. 2007; 21(5):601-14.

47. Lean SS, Yeo CC, Suhaili Z, Thong KL. Whole-genome analysis of an extensively drug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* AC12: insights into the mechanisms of resistance of an ST195 clone from Malaysia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015; 45(2):178-182.

48. Kholodii G, Mindlin S, Gorlenko Z, Petrova M, Hobman J, Nikiforov V. Translocation of transposition-deficient (TndPKLH2- like) transposons in the natural environment: Mechanistic insights from the study of adjacent DNA sequences. *Microbiology*. 2004; 150:979–992.

49. Iacono ML, Villa D, Fortini R, Bordoni F, Imperi R. J. et al. Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 2008; 52:2616-2625.

50. Imperi F, Antunes LC, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P, Carattoli A. The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life*. 2011; 63(12):1068-74.

51. Di Venzio G, Moon KH, Weber BS, Lopez J, Ly PM, Potter RF, Feldman MF. Multidrug-resistant plasmids repress chromosomally encoded T6SS to enable their dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019; 116(4):1378-1383.

52. Al-Masaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018; 25(3):586-596.
53. Lahiri KK, Mani NS, Purai SS. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogen: Clinical significance and antimicrobial sensitivity. *Medical Journal Armed Forces India*. 2004; 60(1):7-10.
54. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA spacer region *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(4):1632–1639.
55. Gutnick DL, Bach H. Potential application of *acinetobacter* in biotechnology. Gerischer U, editor. *Acinetobacter Molecular Biology*. United Kingdom: Caister Academic Press Norfolk; 2008; 230.
56. Kamolvit W, Sidjabat HE, Paterson DL. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance of *Acinetobacter* spp. in Asia and Oceania. *Microb Drug Resist*. 2015; 21(4):424-34.
57. Saeed NK, Kambal AM, El-Khizzi NA. Antimicrobial-resistant bacteria in a general intensive care unit in Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2010; 31(12):1341-9.
58. Solomon FB, Wadilo F, Tufa EG, Mitiku M. Extended spectrum and metallo beta-lactamase producing airborne *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in restricted settings of a referral hospital: a neglected condition. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017; 6:106.
59. Stefan-Mikić S. Antimicrobial susceptibility pattern of *Acinetobacter* spp in the period 2012-2015. *Medicinski Pregled*. 2017; 70(3- 4): 99-106.
60. Luke NR, Saubaran SL, Russo TA, Beanan JM, Olson R, Loehfelme TW, Cox AD, St Michael F, Vinogradov EV, Campagnari AA. Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect Immun*. 2010; 78(5):2017-23.

61. Al-Anazi KA, Abdalhamid B, Alshibani Z, Awad K, Alzayed A, Hassan H, Alsayiegh M. *Acinetobacter baumannii* Septicemia in a Recipient of an Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Case Rep Transplant*. 2012; 2012:1-5.
62. Falagas ME, Bliziotis IA. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era?. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007; 29(6):630-636.
63. Albrecht MC, Griffith ME, Murray CK, Chung KK, Horvath EE, Ward JA, Hospenthal DR, Holcomb JB, Wolf SE. Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. *J. Am. Coll. Surg*. 2006; 203(4): 546-550.
64. Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clin Infect Dis*. 2008; 47(4):444-9.
65. Oliveira VD, Rubio FG, Almeida MT, Nogueira MC, Pignatari AC. Trends of 9,416 multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Rev Assoc Med Bras*. 2015; 61(3):244-249.
66. Cho M, Hu G, Caza M, Horianopoulos LC, Kronstad JW, Jung WH. Vacuolar zinc transporter Zrc1 is required for detoxification of excess intracellular zinc in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Microbiol*. 2018; 56(1):65-71.
67. Park YK, Jung SI, Park KH, Kim SH, Ko KS. Characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39(1):81-5.
68. Donlan RM, Costerton SJW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15:167-193.
69. Martí S, Rodríguez-Baño J, Catel-Ferreira M, Jouenne T, Vila J, Seifert H, Dé E. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res Notes*. 2011; 4(5):1-4.
70. Lin MF, Lin YY, Lan CY. Characterization of biofilm production in different strains of *Acinetobacter baumannii* and the effects of chemical compounds on biofilm formation. *PeerJ*. 2020; 8:1-20.
71. Singh R, Nadhe S, Wadhwani S, Shedbalkar U, Chopade BA. Nanoparticles for control of biofilms of *Acinetobacter* species. *Materials*. 2016; 9(5):383.

72. Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, Zamin FR, Zinjarde SS, Chopade BA. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011; 62(3):328-38.
73. Carpentier B, Cerf O. Biofilm and their consequence, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 1993; 75:499-511.
74. Crouzet M, Le Senechal C, Brözel VS, Costaglioli P, Barthe C, Bonneu M, Garbay B, Vilain S. Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. *BMC Microbiol*. 2014; 14:253.
75. Gupta R, Malik A, Rizvi M, Ahmed M. Presence of metallo-beta-lactamases (MBL), extended-spectrum betalactamase (ESBL) & AmpC positive non-fermenting Gram-negative bacilli among Intensive Care Unit patients with special reference to molecular detection of blaCTX-M & blaAmpC genes. *Indian journal of Medical Research*. 2016; 144(2):271-275.
76. Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan MFR, Ha SD. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015; 14(4):491-509.
77. De Beer D, Stoodley P, Lewandowski Z. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*. 1994; 44:636-641.
78. Subhadra B, Oh MH, Choi CH. Quorum sensing in *Acinetobacter*: with special emphasis on antibiotic resistance, biofilm formation and quorum quenching. *AIMS Microbiol*. 2016; 2:27-41.
79. Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*. 2012; 12(3):2519-2538.
80. Hood MI, Jacobs AC, Sayood K, Dunman PM, Skaar EP. *Acinetobacter baumannii* increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(3):1029-41.
81. Smani Y, Fàbrega A, Roca I, Sánchez-Encinales V, Vila J, Pachón J. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(3):1806-8.

82. Sato Y, Unno Y, Kawakami S, Ubagai T, Ono Y. Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. *J Med Microbiol.* 2017; 66(2):203-212.
83. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol.* 2016; 7:895.
84. Sánchez-Encinales V, Álvarez-Marín R, Pachón-Ibáñez ME, Fernández-Cuenca F, Pascual A, et al. Overproduction of Outer Membrane Protein A by *Acinetobacter baumannii* as a Risk Factor for Nosocomial Pneumonia, Bacteremia, and Mortality Rate Increase. *J Infect Dis.* 2017; 215(6):966-974.
85. Alejandro HMD, Humberto MOM, Fidel GL, Antonio GLM, Eduardo SG. Inhibition of *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation by Methanolic Extract of *Nothoscordum bivalve*. *Advances in Microbiology.* 2018; 8(05):422-438.
86. Goh HM, Beatson SA, Totsika M, Moriel DG, Phan MD, Szubert J. et al. Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79:6535– 6543.
87. Ubeda C, Tormo MA, Cucarella C, Trottonda P, Foster TJ, Lasa I, Penadés JR. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol.* 2003; 49(1):193-210.
88. Płoneczka-Janeczko K, Lis P, Bierowiec K, Rypuła K, Chorbiński P. Identification of *bap* and *icaA* genes involved in biofilm formation in coagulase negative staphylococci isolated from feline conjunctiva. *Vet Res Commun.* 2014; 38(4):337-46.
89. Kandi V. Bacterial capsule, colony morphology, functions, and its relation to virulence and diagnosis. *Annals of Tropical Medicine and Public Health.* 2015; 8(4):151-153.
90. Braun G, Vidotto M. Evaluation of Adherence, Hemagglutination, and Presence of Genes Codifying for Virulence Factors of *Acinetobacter baumannii* Causing Urinary Tract Infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2004; 99(8):839-844.

91. Zhang YL, Lau YL, Arakawa E, Leung KY. Detection and genetic analysis of group II capsules in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*. 2003; 149(4):1051-1060.
92. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. 2003; 149(12):3473-3484.
93. Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals*. 2014; 42(1):1-7.
94. Erridge C, Moncayo-Nieto L, Morgan R, Young M, Poxton IR. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56:165– 171.
95. Lee CR, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013; 10:4274–4305.
96. McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, Barlow M, Actis LA, Craft DW, Zurawski DV. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *J Microbiol.* 2012; 50(3):434-43.
97. Boll JM, Tucker AT, Klein DR, Beltran AM, Brodbelt JS, Davies BW, Trent MS. Reinforcing lipid A acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. *MBio*. 2015; 6:1-11.
98. Vashist J, Tiwari V, Das R, Kapil A, Rajeswari MR. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Res*. 2011; 133(3):332-8.
99. Olesen SW, Barnett ML, MacFadden DR, Brownstein JS, Hernández-Díaz S, Lipsitch M, Grad YH. The distribution of antibiotic use and its association with antibiotic resistance. *Elife*. 2018; 7:1-15.
100. Holten KB, Onusko EM. Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *Am Fam Physician*. 2000; 62(3):611-20.
101. Kang HK, Park Y. Glycopeptide antibiotics: Structure and mechanism of action. *J Bacteriol Virol* 2015; 45(2):67-78.

102. Le Page S, Dubourg G, Baron SA, Rolain JM, Raoult D. No global increase in resistance to antibiotics: a snapshot of resistance from 2001 to 2016 in Marseille, France. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019; 38(2):395-407.
103. Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol*. 2011; 2:203.
104. Adzitey F. Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry; a mini review. *World Vet. J*. 2015; 5 (3):36-41.
105. Gomez J, Garcia-Vazquez E, Hernandez-Torres A. Betalactams in clinical practice . *Revista espanola de quimioterapia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*. 2015; 28(1):1.
106. Qin W, Panunzio M, Biondi S. β -Lactam Antibiotics Renaissance. *Antibiotics (Basel)*. 2014; 3(2):193-215.
107. Brandt C, Braun SD, Stein C, Slickers P, Ehricht R, Pletz MW, Makarewicz O. In silico serine β -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species. *Scientific reports*. 2017; 7:1-13.
108. Zervosen A, Sauvage E, Frère JM, Charlier P, Luxen A. Development of new drugs for an old target: the penicillin binding proteins. *Molecules*. 2012; 17(11):12478-505.
109. Balsalobre L, Blanco A, Alarcón T. Beta- Lactams. *Antibiotic Drug Resistance*. 2019; 3:57-72.
110. Hancu G, Kelemen H, Rusu A, Gyéresi Á. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of cephalosporins. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2013; 78(9):1413-1423.
111. Atlas RM, Parks LC, Brown AE. *Laboratory manual experimental microbiology*, Mosby .U.S.A. 1995.
112. Al Rahmany D, Albeloushi A, Alreesi I, Alzaabi A, Alreesi M, Pontiggia L, Ghazi IM. Exploring bacterial resistance in Northern Oman, a foundation for implementing evidence-based antimicrobial stewardship program. *Int J Infect Dis*. 2019; 83:77-82.

113. Mehta D, Sharma AK. Cephalosporins: A review on imperative class of antibiotics. *Inventi Rapid: Molecular Pharmacology*. 2016; 1:1-6.
114. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we?. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2013; 12:1-15.
115. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic advances in infectious disease*. 2016; 3(1):15-21.
116. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. *Medical Microbiology*. 25th.ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2010.
117. Larson D. *Clinical chemistry: Fundamentals and Laboratory techniques*, Elsevier Health Sciences. UK. 2015.
118. Francis S, Smith F, Malkinson J. *Integrated Pharmacy case studies*, Pharmaceutical Press, London. 2015.
119. Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. *Journal of Medical Microbiology*. 2017; 66(5): 551-559.
120. Forrest A, Weir M, Plaisance KI, Drusano GL, Leslie J, Standiford HC. Relationships between renal function and disposition of oral ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32(10):1537-1540.
121. Prashanth K, Badrinath S. Simplified phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* spp. and their antimicrobial susceptibility status. *J Med Microbiol*. 2000; 49(9):773-778.
122. Kabbaj MH, Singh RK, Gonzalez M, Gunjan A. Novel E3 ubiquitin ligases that regulate histone protein levels in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 2012; 7(5):1-10.
123. Huang W, Yao Y, Long Q, Yang X, Sun W, et al. Immunization against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* effectively protects mice in both pneumonia and sepsis models. *PLoS One*. 2014; 9(6):1-13.

124. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4):657-86.
125. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett. 2006; 258(1):72-7.
126. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β lactamase inhibitors. Clinical Microbiology Reviews. 2010; 23(1):160-201.
127. Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A. Classification of Beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models. PLoS One. 2015; 10(2):1-23.
128. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. IUBMB Life. 2011; 63(12):1061-7.
129. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. Curr Issues Mol Biol. 2015; 17: 11-22.
130. Amudhan M, Senthil H, Begum H, Hebbar K. A review on phytochemical and pharmacological potential of Areca catechu L. Seed. An International Journal published monthly. 2012; 13:4151-4157.
131. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(3):440-458.
132. Liu Y, Liu X. Detection of AmpC β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in the Xuzhou region and analysis of drug resistance. Exp Ther Med. 2015; 10(3):933-936.
133. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int. J. Antimicrob. Agents. 2010; 35:219–226.
134. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, et al. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC7 β -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49: 2941-2948.

135. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, Jeong BC, Lee SH. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(5):9654- 9692.
136. Ibrahimagić A, Kamberović F, Uzunović S, Bedenić B, Idrizović E. Molecular characteristics and antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* beta-lactamase-producing isolates, a predominance of intrinsic blaOXA-51, and detection of TEM and CTX-M genes. *Turk J Med Sci.* 2017; 47(2):715-720.
137. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010; 54: 969–976.
138. Novovic K, Mihajlovic S, Vasiljevic Z, Filipic B, Begovic J, Jovcic B. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: revision of CarO classification. *PLoS One.* 2015; 10(3):1-16.
139. Fonseca EL, Scheidegger E, Freitas FS, Cipriano R, Vicente AC. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of carO alleles expression and blaOXA-23 gene. *BMC Microbiol.* 2013; 13:245.
140. Wu X, Chavez JD, Schweppe DK, Zheng C, Weisbrod CR, et al. In vivo protein interaction network analysis reveals porin-localized antibiotic inactivation in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Nat Commun.* 2016; 7:1.
141. Guilfoile PG, Alcamo E, Heymann D. Antibiotic – Resistance bacteria. New York: Chelsea House Publishers; 2007.
142. Georgopapadakou NH. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1993; 37(10):2045-2053.
143. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(10):3471-3484.
144. Jassim KA, Ghaima KK, Saadedin SMK. AdeABC efflux pump genes in multidrug resistant *acinetobacter baumannii* isolates . *Avicenna J. Clin. Microb. Infec.* 2016; 3(4):1.
145. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(2):382-402.

146. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(9):3298-304.
147. Marqué S, Poirel L, Héritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, Coman G, Naas T, Nordmann P. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(9):4885-8.
148. Abbott I, Cerqueira GM, Bhuiyan S, Peleg AY. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2013; 11(4):395–409.
149. Lederberg J, Tatum EL. Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature*. 1946; 158(4016):558.
150. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*. 2004; 10(12):122-S129.
151. Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009; 364(1527):2275-89.
152. Lawrence JG. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol*. 1999; 2:519–523.
153. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000; 405(6784):299-304.
154. Yi H, Cho YJ, Yong D, Chun J. Genome sequence of *Escherichia coli* J53, a reference strain for genetic studies. *J Bacteriol*. 2012; 194(14):3742-3.
155. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect*. 2009; 73(4):355-63.
156. Pekince B. Yaygın dirençli *acinetobacter baumannii* izolatlarının pulsed field jel elektroforez yöntemi ile genotiplendirilmesi [Yükseklisans Tezi]. Konya: Selçuk Üniversitesi; 2018.

157. Taha RA. Genetic and Molecular study of *Acinetobacter baumannii* isolated from different infection with relationship of Phage in Diyala rovince [Yükseklisans Tezi]. Irak: Yüksek Öğrenim ve Bilimsel Araştırma Bakanlığı Diyala Üniversitesi; 2018.
158. Goering RV, Dockrell HM, Wakelin D, Zuckerman M, Chiodini PL, et al. Mims medical microbiology. 4th ed. China: Mosby; 2008.
159. Mahdi AA. Investigation of some antibiotic resistance genes and their expression Genetic in *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical cases [Yükseklisans Tezi]. Irak: Irak Cumhuriyeti Yüksek Öğrenim ve Bilimsel Araştırma Bakanlığı. Saf Bilim Eğitim Koleji - İbn El-Haitham. Biyoloji Bölümü; 2019.
160. Mohammed YM. Design and Using of Antimicrobial Peptides Against , Antibiotic Resistant *Acinetobacter baumannii* [Yükseklisans Tezi]. Irak: Irak Cumhuriyeti Yüksek Öğrenim ve Bilimsel Araştırma Bakanlığı, Bağdat Üniversitesi, Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü; 2016.
161. Gurung J, Khyriem AB, Banik A, Lyngdoh WV, Choudhury B, Bhattacharyya P. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. Indian. J. Crit. Care Med. 2013; 17:214-218.
162. Asadollahi K, Taherikalani M, Maleki A, Alizadeh E, Valadbaigi H, Soroush S, Maleki H, Asadollahi P, Emaneini M. Diversity of aminoglycoside modifying enzyme genes among multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes isolated from nosocomial infections in Tehran hospitals and their association with class 1 integrons. Acta Microbiol Immunol Hung. 2011; 58(4):359-370.
163. Pooshaneh S, Farajnia S, Soleimani Dorjag M, Rahbarnia L, Ansarin KH, Sohrabi N, et.al; Prevalence of Extended-Spectrum β -lactamase class A among *Acinetobacter baumannii* isolates from Imam Reza hospital Tabriz, Pharmaceutical Science. 2011; 17 (4):225-32.
164. Taherikalani M, Sekawi Z, Azizi-Jalilian F, Keshavarz B, Soroush S, et al. Distribution of extended spectrum beta-lactamase resistance genes among nosocomial imipenem resistant *A. Baumannii* strains harboring BLAoxa-23 carbapenemases isolated from Ilam and Tehran. J Biol Regul Homeost Agents. 2013; 27(3):883-9.

165. Jin H, Xu XM, Mi ZH, Mou Y, Liu P. Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. *Chin Med J*. 2009; 122(3):301-306.
166. Danes C, Navia MM, Ruiz J, Marco F, Jurado A, Jimenez de Anta MT, Vila J. Distribution of β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) on the MICs of different β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 50(2):261-264.
167. Dai N, Li DZ, Chen JC, Chen YS, Geng R, Hu YH, Gao ZC. Drug-resistant genes carried by *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with lower respiratory tract infection. *Chinese Medical Journal*. 2010; 123(18):2571-2575.
168. Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, et al. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(11):3837-43.
169. Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(9):3978-84.
170. Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Düzgün AO, Peleg AY, Sandallı C. OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014; 20(5):410-415.
171. Bonnin RA, Rotimi VO, Al Hubail M, Gasiorowski E, Al Sweih N, Nordmann P, Poirel L. Wide dissemination of GES-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Kuwait. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57(1):183-188.
172. Al-Agamy MH, Jeannot K, El-Mahdy TS, Shibl AM, Kattan W, et al. First detection of GES-5 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolate. *Microbial Drug Resistance*. 2017; 23(5):556-562.
173. Udomsantisuk N, Nunthapisud P, Tirawatanapong T, Dansuputra M. Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Assoc Thai*. 2011; 94(12):1504-12.

174. Naiemi NA, Duim B, Savelkoul PH, Spanjaard L, de Jonge E, et al. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(9):4862-4.
175. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(1):178-82.
176. Endmiani A, Luzzaro F, Migliavacca R, Mantengoli E, Hujer AM, et al. Spread in an Italian Hospital of a Clonal *A. baumannii* Strain Producing the TEM-92 Extended-Spectrum β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007; 51(6):2211–2214.
177. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015; 45(6):568-85.
178. Goudarzi H, Mirsamadi E, Ghalavand E, Hakemi M, Mirjalali M, et al. Molecular detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical isolates of *acinetobacter baumannii*. *Journ pure and applied microbiology*, 2015; 9(2): 145-151.
179. Maraki S, Mantadakis E, Mavromanolaki VE, Kofteridis DP, Samonis G. A 5-year Surveillance Study on Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from a Tertiary Greek Hospital. *Infect Chemother.* 2016; 48(3):190-198.
180. Zhou H, Zhang T, Yu D, Pi B, Yang Q, Zhou J, Hu S, Yu Y. Genomic analysis of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain MDR-ZJ06 widely spread in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10):4506-12.
181. Dawood D, Sayed MM, Tohamy THK, Nossier ES. New Thiophenyl-pyrazolyl-thiazole Hybrids as DHFR Inhibitors: Design, Synthesis, Antimicrobial Evaluation, Molecular Modeling, and Biodistribution Studies *ACS Omega.* 2023; 8:39250–39268.
182. Salman DD. Molecular study of *acinetobacter baumannii* isolated from different clinical specimens in Baqubah city [Yükseklisans Tezi]. Irak: Yüksek Öğretim ve Bilimsel Araştırma Bakanlığı Diyala Bilim Üniversitesi. Biyoloji Bölümü; 2021.

183. AL-Dahlaki SMM. Molecular detection and gene expression for hcp and blaOXA-51 genes in *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical sources [Yükseklisans tezi]. Irak: Diyala Bilim Üniversitesi; 2020.
184. Tarhan G, Şahin F, Cesur S. Investigation of the presence of OXA 48 and mcr-1 genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* strains by in house-PCR method. *Journal Medicine Palliat Care* 2021; 2(4):118-123.
185. Al-Bajlany, Safa MM. Detection of extended spectrum beta-lactam resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical sources. [Yükseklisan tezi]. Irak: Diyala Bilim Üniversitesi; 2015.
186. Javed A, Zafar A, Ejaz H, Zubair M. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species isolated from blood samples of paediatric patients . *Pakistan J. Med. Sci.* 2012; 28(3): 363-366.
187. Nishida K, Kunugita C, Uji T, Higashitani F, Hyodo A, Unemi N, Maiti SN, Phillips OA, Spevak P, Atchison KP, Salama SM, Atwal H, Micetich RG. In vitro and in vivo activities of Syn2190, a novel beta-lactamase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(8):1895-900.
188. Ausubel FM, Katagiri F, Mindrinos M, Glazebrook J. Use of *Arabidopsis thaliana* defense-related mutants to dissect the plant response to pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995; 92(10), 4189-4196.
189. McConnell MJ, Pérez-Ordóñez A, Pérez-Romero P, Valencia R, Lepe JA, Vázquez-Barba I, Pachón J. Quantitative real-time PCR for detection of *Acinetobacter baumannii* colonization in the hospital environment. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4):1412-4.
190. Iraz M, Özad Düzgün A, Sandallı C, Doymaz MZ, Akkoyunlu Y, Saral A, Peleg AY, Özgümüş OB, Beriş FŞ, Karaoğlu H, Çopur Çiçek A. Distribution of β -lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. *Ann Lab Med.* 2015; 35(6):595-601.
191. Mol PR, Bindayna KM, Shanthi G. Evaluation of Two Phenotypic Methods for the Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases among Enterobacteriaceae Isolates. *J Lab Physicians.* 2021; 13(2):151-155.

192. Sharif M, Mirnejad R, Amirmozafari N. Molecular identification of TEM and SHV extended spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Tehran hospitals. *J Gen Microb Immun.* 2014; 2(1):1-9.
193. Özgümüş OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N. Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. *J Microbiol.* 2009; 47(1):19-27.



EKLER

Ek1. Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2023-08/64 çalışma izin kararı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU				
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Klinik Örneklerden İzole Edilen Acinetobacter Baumannii İzolatlarında Plazmit Aracılı pAmpC ve B-Laktamaz Direnç Genlerinin Belirlenmesi"		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	18.04.2023	2	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BİYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER:	☐			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2023-08/64	Tarih: 25/04/2023		
	Yukanda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, toplantıya katılan Etik Kurul üye tamsayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	RAND KAMIL MAJEED JAWAHERI
Doğum Yeri	IRAK
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer:



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bağdat Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoteknoloji
Mezuniyet Yılı	2019

Yüksek Lisans	
Üniversite	Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü Adı	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Tıp
Programı	
Mezuniyet Tarihi	Devam ediyor

Makale ve Bildiriler	
1. Jawaheri RKM, Dağlıoğlu YK, Öztürk C, Sevim E, Akyol R. Acinetobacter baumannii izolatlarında plazmit aracılı Pampc ve Beta-laktamaz direnç genlerinin belirlenmesi, IGSCONG'23.	