



ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINDA DNA GYRASE DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF DNA GYRASE RESISTANCE GENES IN ACINETOBACTER BAUMANNII ISOLATES

Uğur KAYIŞ^{1*} , Tammam SİPAHİ² , Suzan ÖKTEN³ ,
Fatma KAYNAK ONURDAĞ³ 

¹Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Pazaryeri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri, 11800, Bilecik, Türkiye

²Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, 22030, Edirne, Türkiye

³Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 22030, Edirne, Türkiye

ÖZ

Amaç: Hastane ortamındaki antimikrobiyal ajanlara dirençli bakterilerin topluma yayılabileceği bilinmektedir. *Acinetobacter baumannii*, antibiyotik direnç genleri sebebiyle tedavisi oldukça zor olan bir mikroorganizmadır. Florokinolonlar da dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe dirençlidir. *A. baumannii*'nin kinolon direnci DNA giraz ve topoizomerez IV genlerindeki mutasyonlarının belirlenmesiyle tespit edilir. Çalışmamızda Real Time PCR yöntemi kullanılarak, *A. baumannii* izolatlarında kinolon direncine sebep olan (*gyrA*, *gyrB*, *parC*) DNA giraz direnç genlerine ait mutasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 73 adet *A. baumannii* dirençli klinik izolatu kullanıldı. *A. baumannii* *gyrA*, *parC*, *gyrB* genlerine ait primerler kullanılarak amplifiye edildi. HRM analizi kullanarak *gyrA*, *gyrB*, *parC* geni Real-Time PCR ampliconları DNA sekanslarına göre gruplara ayrıldı. *A. baumannii* izolatları farklı HRM profillerine göre P1, P2, P3, GA1, GA2, GA3, GB1 ve GB2 olarak gruplandırıldı ve her gruptan 2 farklı Real-Time PCR ürününün DNA dizi analizi yapıldı.

Sonuç ve Tartışma: GA1, GA2, GA3 genotipinde mutasyonu tespit edildi. P1, P2, P3 ve GB1, GB2 genotiplerinde mutasyon gözlemlenmedi.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, DNA giraz, HRM, RT-PCR

ABSTRACT

Objective: It is known that bacteria resistant to antimicrobial agents can spread to the community in the hospital environment. *Acinetobacter baumannii* is a difficult-to-treat pathogen due to its antibiotic resistance genes. It is resistant to many antibiotics, including fluoroquinolones. By identifying mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes, quinolone resistance of *A. baumannii* is found. Our study, aimed to determine mutations in DNA gyrase resistance genes that cause quinolone resistance (*gyrA*, *gyrB*, *parC*) in *A. baumannii* isolates using the real-time PCR method.

Material and Method: 73 *A. baumannii* resistant clinical isolates were used in the study. *A. baumannii* was amplified using primers for *gyrA*, *parC*, *gyrB* genes. Using HRM analysis, *gyrA*, *gyrB*, *parC* gene Real-Time PCR amplicons were grouped according to their DNA sequences. *A. baumannii* isolates were grouped as P1, P2, P3, GA1, GA2, GA3, GB1 and GB2 according to

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Uğur Kayış
e-posta / e-mail: uur.kayis@gmail.com, Tel. / Phone: +905383365291

different HRM profiles, DNA sequence analysis of 2 different Real-Time PCR products from each group was performed.

Result and Discussion: Mutations were detected in GA1, GA2, GA3 genotypes. No mutations were observed in the P1, P2, P3 and, GB1, GB2 genotypes.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, DNA gyrase, HRM, RT-PCR

GİRİŞ

Acinetobacter türleri ürogenital sistemde, gastrointestinal sistemde, ağız içi florada, solunum yollarında ve deri florasında bulunur. *Acinetobacter baumannii* ise deri florasında az rastlanan bir tür olmasına rağmen sağlıklı kişilerin %40'ının taşıyıcı olduğu saptanmıştır [1]. Sağlıklı kişilerde az rastlanan bir türdür fakat hastanede yatan immün sistemi düşük ve yaşlı kişilerde hastane enfeksiyonlarına sebep olur [2]. *A. baumannii*, hastane enfeksiyonlarında sıkça rastlanan türlerden biridir [3]. *A. baumannii* dünyada antibiyotik direnci sebebiyle ölüme yol açan dördüncü türdür fakat standart bir tedavisi hala yoktur ve enfeksiyonlarının tedavisi kinolonlar, aminoglikozidler ve karbapenemler ile gerçekleştirilir. Çoğu antibiyotiğe dirençli olmasına rağmen en sık kinolonlara direnç gösterir [4-7]. Kinolonlar DNA giraz ve topoizomeraz IV enzim aktivitesini engelleyerek çalışır. Bu iki enzim tip II topoizomeraz olarak adlandırılır ve kromozom süpersarmalını kontrol eder. Kinolon grubu antibiyotikler DNA ipliğinin tekrar bağlanmasını engelleyip hücre bölünmesini durdurarak etki eder [8]. DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişmesine sebep olur. Özellikle DNA giraz alt birimi A (gyr A) ve topoizomeraz IV alt birimi C (par C) genlerinde meydana gelen mutasyonlar ilaç hedef bölgesindeki değişiklikleri sebebiyle kinolon direnci ile ilişkilendirilir [9]. *A. baumannii*'de siprofloksasin ve nalidiksik aside karşı direnç, gyrA ve parC'nin kinolon direncini belirleyen bölgelerindeki koromozom direnci ile meydana gelir. gyrA ve gyrB tarafından kodlanan DNA giraz, parC ve parE tarafından kodlanan topoizomeraz IV'da meydana gelen hedef enzimindeki değişikliğe sebep olan mutasyon en yaygın gözlemlenen ilaca direnç mutasyonudur. GyrA'daki tek amino asit değişikliği (Ser83Leu), siprofloksasin ve nalidiksik aside karşı yüksek düzeyde dirençle ilişkilidir. ParC'de çoğunlukla Ser80Leu olmak üzere ek bir amino asit değişikliği, *A. baumannii*'de daha yüksek dirençle ilişkilidir [10].

Bu çalışmamızda *A. baumannii* DNA Gyrase direnç genleri olan gyrA, gyrB ve parC'de meydana gelen mutasyonların neden olduğu ilaç direncinin Real Time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle araştırılmasını amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan 73 adet *A. baumannii* dirençli klinik izolatu, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi. Bu kültür örnekleri farklı klinik örneklerden izole edildi ve merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda otomatize sistem ile tanımlaması yapıldı. İzolatlar çalışmaya alınmadan önce API20E (Biomerieux) identifikasyonu kiti kullanılarak identifikasyonu doğrulandı. Daha sonra DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Tablo 1'de belirtildiği üzere, izolasyonu gerçekleştirilen örneklerde uygun primerler kullanılarak DNA giraz direncini kodlayan gyrA, gyrB ve parC gen bölgeleri amplifiye edildi.

Tablo 1. RT-PCR'de kullanılan gen bölgelerine ait primer dizileri

Gen bölgesi	Primer dizisi	
	Forward	Reverse
gyrA	5'-AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGT-3'	5'-GCCATACCTACGGCGATACC-3'
gyrB	5'-CGTGCGCGCTTTGATAAAAT-3'	5'-ACAGTTACACGTGGCCAGTA-3'
parC	5'-ATGAGCGAGCTAGGCTTAAA -3'	5'-TTAAGTTGTCCTTGCCATTCA-3'

Cihazda optimizasyon şu şekilde ayarlanmıştır:

- 1 döngü 5 dk - 95 °C,
- 45 döngü 10 sn - 95 °C,
- 10 sn - 55°C,
- 20 sn - 72°C.

Sadece hedef bölgenin çoğaltıldığını belirlemek ve HRM analizi için, RT-PCR sırasında 65°C-95°C arasında 0.2 sn rampa hızı ile erime eğrisi analizi yapıldı. Biospeedy HRM Analyzer (Bioeksen, Türkiye) yazılımı ile, erime eğrisi verileri değerlendirildi. HRM analiz yöntemi, RT-PCR ile farklı kültürlerden çoğaltılan gen dizilerini DNA dizilimlerine göre gruplandırma yaptığı için tercih edildi. Dolayısıyla HRM analizinden yararlanılarak parC, gyrA ve gyrB genlerinin RT-PCR'da çoğaltılan bölgeleri DNA dizilerine göre gruplandırıldı. Yapılan analiz sonucunda ise *A. baumannii* kültürleri farklı HRM profillerine göre P1, P2, P3, GA1, GA2, GA3, GB1 ve GB2 olarak gruplara ayrıldı. Ayrılan gruplardan her bir gen bölgesi için iki adet örnek alındı ve sekans analizi yapıldı. Alınan örneklerin gen bankasında en çok benzer olduğu DNA dizilimlerinin verileri ise Tablo 2'de verildiği gibi sonuçlandı.

Tablo 2. Farklı genotiplerin DNA dizilimlerinin BLAST analizi sonuçları

Gen	Gen bankasında en çok benzediği DNA dizisi		
	Genotip	Numarası	Benzerlik yüzdesi (%)
gyrA	GA1	EU886740.1	100
	GA2	DQ270238.1	99
	GA3	AY596923.1	100
parC	P1	CP010779.1	98
	P2	CP010779.1	97
	P3	CP007549.3	97
gyrB	GB1	CP000863.1	100
	GB2	AP014649.1	99

Dizi analizleri, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak Sanger yöntemiyle, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da belirlendi [11]. Dizi analizi iki yönlü uygulandı ve ulaşılan diziler 4peaks yazılımı kullanılarak değerlendirildi. NCBI BLAST programı vasıtasıyla, dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu dizilerin yüzdeleri belirlendi [12,13]. Son olarak, Clustal W2 ile elde edilen dizilerdeki parC (S80L, S80W ve S84K), gyrA (S83L), ve gyrB (E479D, D644Y ve A677V) mutasyonları karşılaştırmalı olarak incelendi [14].

SONUÇ VE TARTIŞMA

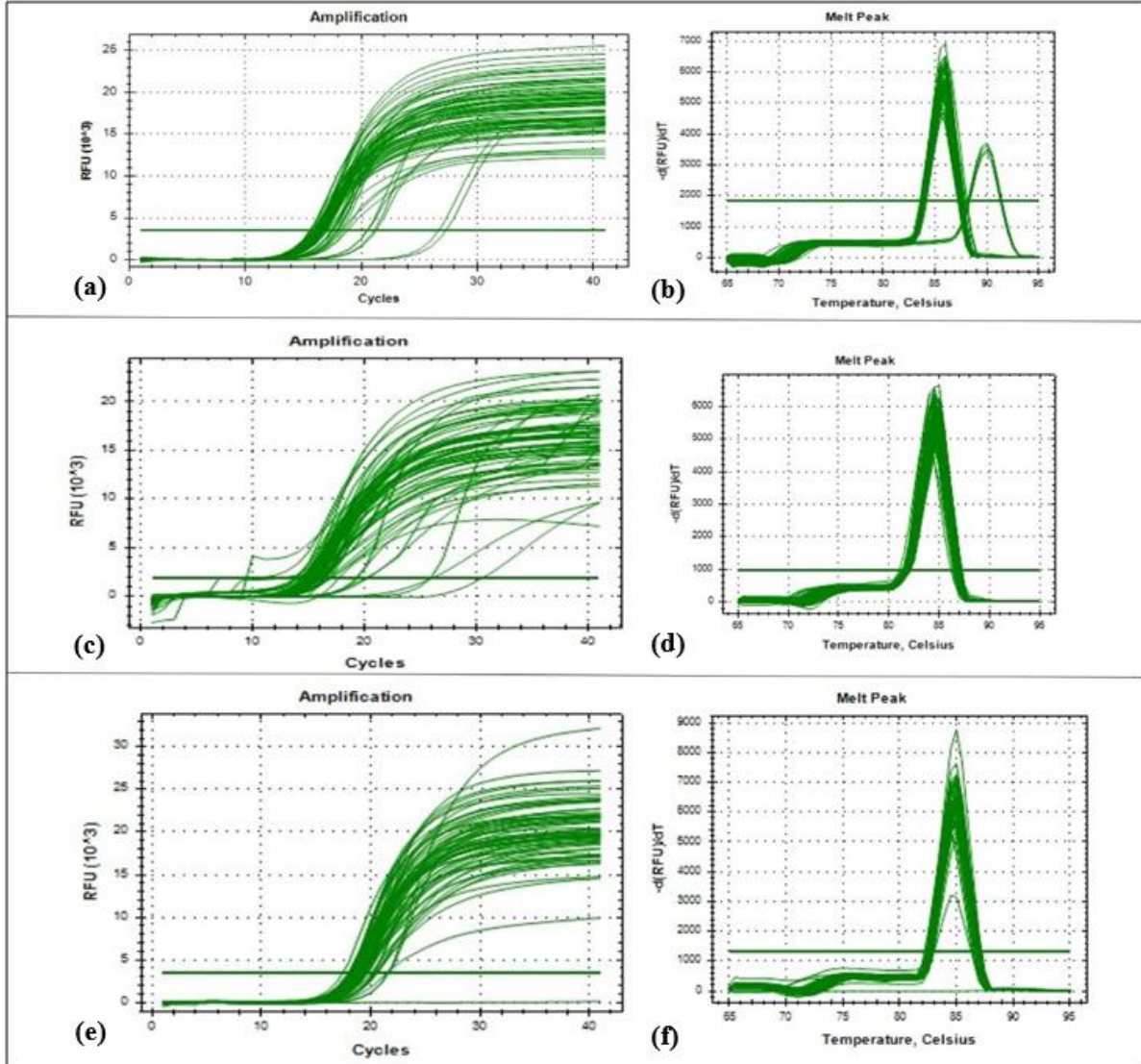
Şekil 1'de RT-PCR uygulanan genlerin erime ve çoğalma eğrileri verilmiştir. Negatif kontrol örneklerde çoğalma tespit edilmemiştir. RT-PCR sonuçlarında, Ct sonuçlarının 30 altında olması ve Tm sonuçlarının ise sabit olması uygun genlerin doğru çoğaldığını göstermektedir.

Farklı kültürlerden elde edilen genlerin DNA dizilimine göre gruplandırması HRM analizi ile yapılmıştır. RT-PCR ile çoğaltılan DNA ürünleri HRM profilleri Şekil 2'de verilmiştir. Tablo 3'te ise HRM gruplandırması verilmiştir.

HRM gruplarına göre oluşan iki adet örneğin DNA dizisi çıkarılmıştır. DNA dizileri her bir grup için aynı DNA dizilimini göstermiştir.

Elde edilen dizilerde parC S80(TCG)'nin L80(TTG) veya W80(TGG) mutasyonu, E84(GAA)'nin K84(AAA) mutasyonu; gyrA S83(TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu; ve gyrB E479(GAA)'nin D479(GAT) mutasyonu, D644(GAT)'nin Y644(TAT) mutasyonu, A677(GCG)'nin V677(GTG) mutasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada elde edilen DNA dizileri ile mutasyon içermeyen referans diziler Clustal W2 programı ile karşılaştırılmış böylece hangi dizilerin mutasyon içerdiği tespit edilmiştir. parC için referans dizi gen bankası ulaşım numarası HM570038.1, gyrA için

referans dizi gen bankası ulaşım numarası DQ270238.1 ve gyrB için referans dizi gen bankası ulaşım numarası CU468230.2'dir. DNA karşılaştırmaları ve referans gen dizilimleri Şekil 3, Şekil 4 ve Şekil 5'te verilmiştir. Sarı ile işaretlenmiş bölgeler, DNA dizilimleri üzerinde analiz edilecek mutasyon noktaları olarak belirtilmiştir. Şekillerdeki verilere göre, GA2, GA1, ve GA3 genotipinin her üçünde de S83 (TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu tespit edilmiş iken parC ve gyrB genotiplerinde mutasyon gözlemlenmemiştir.

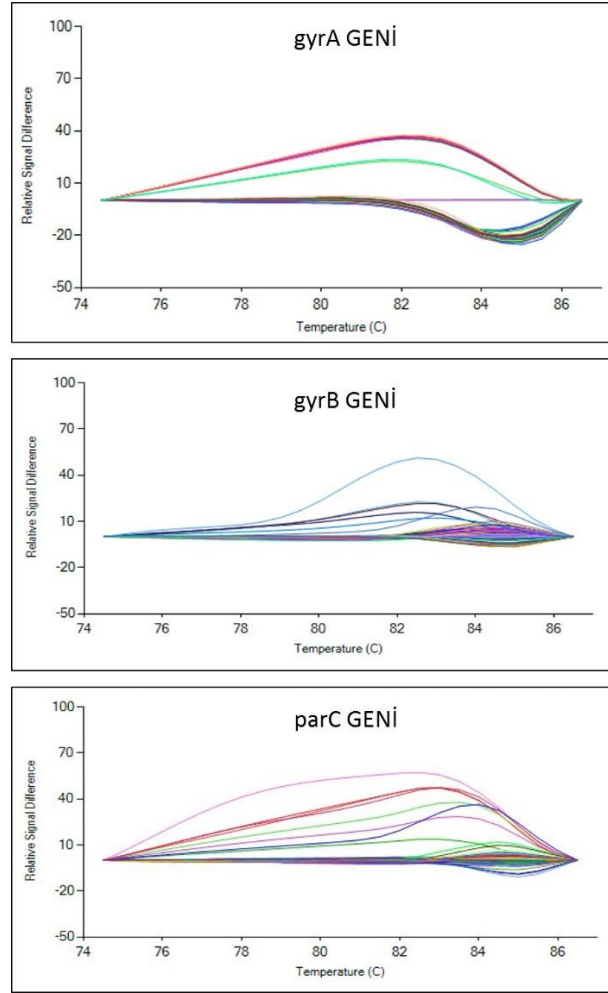


Şekil 1. RT-PCR çoğalma (a, c, e) ve erime (b, d, f) eğrileri; (a-b): gyrA hedefli, (c-d): gyrB hedefli, (e-f): parC hedefli

2009 yılında Wang-Huei Sheng ve ark. tarafından, Tayvan Taipei hastanesinde 2005-2006 yılları arasında 82 adet izole edilen *A. baumannii* üzerinde çalışma yapılmıştır. Siprofloksasin duyarlılık testleri sonucunda ise, 49 adet *A. baumannii* izolatının gyrA geninde Leu83 (TTA) mutasyonuna rastlanmıştır. Ser83 (TCA)-Leu83 (TTA) mutasyonunu siprofiloksisine karşı direnç gelişimini desteklediği şeklinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızdaki S83 (TCA)-L83 (TTA) mutasyonu ile Wang-Huei Sheng ve ark. tarafından yapılan çalışma ile uyumludur [15].

Mohamed Elshahat ve ark. 2021 yılında Al-Azhar Üniversitesinden 100 *A. baumannii* izolatu üzerinde çalışmıştır. Çalışmada gyrA, gyrB, parC ve parE alt birimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonu

saptanmıştır. Sonucunda ise florokinolonlara dirençli *A. baumannii*'de en sık gyrA ve parC mutasyonları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki gyrA mutasyonu ile örtüşmektedir [16].



Şekil 2. RT-PCR ampliconlarından elde edilen HRM profilleri

Tablo 3. RT-PCR ampliconlarından elde edilen HRM profillerine göre gruplandırma

Genotip Grubu		Numune No
gyrA	GA1	3,4,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,58,59,61,62,75,76,77,78,79,81,82,84,86,87,88.
	GA2	5,57,60,80,85.
	GA3	1,2.
gyrB	GB1	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,28,29,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,58,59,61,62,75,76,77,78,79,80,81,82,84,85,86,87,88.
	GB2	30,57,60.
parC	P1	1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,14,15,17,18,19,20,21,22,24,25,26,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,75,76,77,78,79,81,82,84,85,86,87,88.
	P2	12,13,23.
	P3	5,80.

GA2	-----TATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	24
DQ270238.1	AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGSTAAATATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	60
GA1	-----CCCATGGTGACTTAGCT	17
GA3	AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGSTAAATATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	60
GA2	GTTTATGAAACCATTGTTCGTTGGTGACGTAATCGSTAAATATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	84
DQ270238.1	GTTTATGAAACCATTGTTCGTTGGTGACGTAATCGSTAAATATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	120
GA1	GTTTATGAAACCATTGTTCGTTGGTGACGTAATCGSTAAATATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	77
GA3	GTTTATGAAACCATTGTTCGTTGGTGACGTAATCGSTAAATATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	120
GA2	GGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCCGCAATGTGTTATACCGAA	144
DQ270238.1	GGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCCGCAATGTGTTATACCGAA	180
GA1	GGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCCGCAATGTGTTATACCGAA	137
GA3	GGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCCGCAATGTGTTATACCGAA	180
GA2	GTCGSTATGAATAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGCACAGTTGAC	204
DQ270238.1	GTCGSTATGAATAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGCACAGTTGAC	240
GA1	GTCGSTATGAATAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGCACAGTTGAC	197
GA3	GTCGSTATGAATAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGCACAGTTGAC	240
GA2	TGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA	264
DQ270238.1	TGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA	300
GA1	TGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA	257
GA3	TGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA	300
GA2	AACITGTTAATTAACGGTGTCTGCTGGTATCGC-----	296
DQ270238.1	AACITGTTAATTAACGGTGTCTGCTGGTATCGC-----	344
GA1	AACITGTTAATTAACGGTGTCTGCTGGTATCGC-----	289
GA3	AACITGTTAATTAACGGTGTCTGCTGGTATCGC-----	339

Şekil 3. gyrA DNA dizilimi karşılaştırılması

P3	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT	60
P2	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT	60
P1	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT	60
HMS70038.1	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT	60
P3	GATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC	120
P2	GATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC	120
P1	GATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC	120
HMS70038.1	GATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC	120
P3	ACGGCTTCGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTGAGGGGAACGTTGGTTCA	180
P2	ACGGCTTCGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTGAGGGGAACGTTGGTTCA	180
P1	ATGGCTCAGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTGAGGGGAACGTTGGTTCA	180
HMS70038.1	ATGGCTCAGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTGAGGGGAACGTTGGTTCA	180
P3	CCAGATGATCCTAAATCTTTTCTGCGATGCGTATACCGAAGCCAACTTTCGGCTTAT	240
P2	CCAGATGATCCTAAATCTTTTCTGCGATGCGTATACCGAAGCCAACTTTCGGCTTAT	240
P1	CCAGATGATCCTAAATCTTTTCTGCGATGCGTATACCGAAGCCAACTTTCGGCTTAT	240
HMS70038.1	CCAGATGATCCTAAATCTTTTCTGCGATGCGTATACCGAAGCCAACTTTCGGCTTAT	240
P3	AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTGAGGGCACTAGTGAATGGCAGGACAAC	294
P2	AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTGAGGGCACTAGTGAATGGCAGGACAAC	294
P1	AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTGAGGGCACTAGTGAATGGCAGGACAAC	294
HMS70038.1	AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTGAGGGCACTAGTGAATGGCAGGACAAC	294

Şekil 4. parC DNA dizilimi karşılaştırılması

Choong Ki Hong ve ark. 2017-2019 yılları arasında 98 *A. baumannii* izolatu ile çalışmıştır. Yapılan çalışmada gyrA ve ParC sekans analizine bakılmıştır. *A. baumannii*'nin 50 suşunun tamamında gyrA dizisinde Ser83 (TCA)'ün Leu83 (TTA)'ye yer değiştirdiği sonucuna varılmış, 43 suşta parC dizisinde Ser80 (TCG)'ün Leu (TTG) ile yer değiştirdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bizim çalışmamızda gyrA dizisinde Ser83 (TCA)'ün Leu83 (TTA)'ye yer değiştirdiği sonucuyla örtüşmekte fakat çalışmada bulunan parC mutasyonu bizim çalışmamızla örtüşmemektedir [17].

Enas A. Tantawy ve ark. 2020 yılında yaptığı çalışmada 106 yoğun bakım hastasından izole edilen *A. baumannii* izolatu üzerinde çalışmıştır. Yapılan çalışmada gyrA ve parC mutasyonlarını taramış ve her iki gen bölgesinde de tüm kültürlerde gyrA dizisinde Ser83 (TCA) - Leu83 (TTA), parC

dizisinde ise Ser80 (TCG) - Leu (TTG) mutasyonuna rastlamıştır. Bizim çalışmamızda S83 (TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu belirlenmiştir. Yapılan çalışma gyrA dizisinde Ser83 (TCA) - Leu83 (TTA) mutasyonu ile örtüşmekte fakat parC mutasyonu sonucumuz örtüşmemektedir [18].

GB1	TTCCGTCAAATGCCGGAGTTGGTGGAACTGGTCATATTTATATTGCACAGCCACCTTTG	240
GB2	TTCCGTCAAATGCCGGAGTTGGTGGAACTGGTCATATTTATATTGCACAGCCACCTTTG	240
CU468230.2	TTCCGTCAAATGCCGGAGTTGGTGGAACTGGTCATATTTATATTGCACAGCCACCTTTG	240
GB1	TATAAGCTCAAAAAGGTAAGCAAGAGCAATATATATAAGATAACGACGCATTAGAAACT	300
GB2	TATAAGCTCAAAAAGGTAAGCAAGAGCAATATATATAAGATAACGACGCATTAGAAACT	300
CU468230.2	TATAAGCTCAAAAAGGTAAGCAAGAGCAATATATATAAGATAACGACGCATTAGAAACT	300
GB1	TACTTGATTTCAAATGCGATTGATGAGCTTGCITATATATTAGTGCTGATGCGCCTGCA	360
GB2	TACTTGATTTCAAATGCGATTGATGAGCTTGCITATATATTAGTGCTGATGCGCCTGCA	360
CU468230.2	TACTTGATTTCAAATGCGATTGATGAGCTTGCITATATATTAGTGCTGATGCGCCTGCA	360
GB1	ATTACAGGTGAAGCGCTGGCAAAAGTAATTCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCTTA	420
GB2	ATTACAGGTGAAGCGCTGGCAAAAGTAATTCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCTTA	420
CU468230.2	ATTACAGGTGAAGCGCTGGCAAAAGTAATTCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCTTA	420
GB1	CAACGCTTAACGTTACGTTATCCAGCAAGCTTACTTGATGCATTACTCGAAGTCGACGCA	480
GB2	CAACGCTTAACGTTACGTTATCCAGCAAGCTTACTTGATGCATTACTCGAAGTCGACGCA	480
CU468230.2	CAACGCTTAACGTTACGTTATCCAGCAAGCTTACTTGATGCATTACTCGAAGTCGACGCA	480
GB1	TTTAAAGCAGATCAAACCATGATCAAGCTTATGTACAACAATGGGCGGATCAAGTACGT	540
GB2	TTTAAAGCAGATCAAACCATGATCAAGCTTATGTACAACAATGGGCGGATCAAGTACGT	540
CU468230.2	TTTAAAGCAGATCAAACCATGATCAAGCTTATGTACAACAATGGGCGGATCAAGTACGT	540
GB1	GAACTGTACAAGACTACAGCCAAGTTTGGCCCTGAAATACGCTTGAACATTGAA	600
GB2	GAACTGTACAAGACTACAGCCAAGTTTGGCCCTGAAATACGCTTGAACATTGAA	600
CU468230.2	GAACTGTACAAGACTACAGCCAAGTTTGGCCCTGAAATACGCTTGAACATTGAA	600
GB1	CGCGAGAATGCTCAAGGCGAGAAATCTGGCCATTACTGGCCACGTGTAAGTGT	653
GB2	CGCGAGAATGCTCAAGGCGAGAAATCTGGCCATTACTGGCCACGTGTAAGTGT	653
CU468230.2	CGCGAGAATGCTCAAGGCGAGAAATCTGGCCATTACTGGCCACGTGTAAGTGT	653

Şekil 5. gyrB DNA dizilimi karşılaştırılması

Park ve ark. 56 adet farklı *A. baumannii* izolatında parC (S80L, S80W, S84K), gyrA (S83L) ve gyrB (E479D, D644Y, A677V) mutasyonlarını araştırmıştır. Çalışmada bulunan gyrA (S83L) mutasyonu bizim çalışmamızla uyumludur [9].

Marich Amilia Rizka ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada 7 *A. baumannii* klinik izolatı üzerinde gyrB mutasyonu araştırılmıştır. Sonuçlarına göre 7 izolattan 5 tanesinde tek nokta mutasyonuna rastlanmış ve gyrB geninde meydana gelen mutasyon nedeniyle siprofiloksasine dirençli olduğu sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda ise gyrB gen bölgesinde mutasyona rastlanmamıştır [19].

Cheng-Hsun Chiu ve ark. çalışmalarına 35 adet *A. baumannii* izolatı dahil etmiştir. parC ve gyrA gen mutasyonlarının dışa atım pompası gen ekspresyonuyla (AdeB) ilişkisi incelenmiş olup parC (S80L, L59G) ve gyrA (S83L) mutasyonları belirlenmiştir. Mutasyonlu gene sahip kültürlerde siprofloksasin direnci gözlemlenmiştir. Meydana gelen mutasyonların siprofiloksasine direnç gelişimine katkı sağladığı sonucuna ulaşılmıştır. İzolatların tamamında parC (S80L) mutasyonu saptanmıştır. 13 adet dirençli izolatın, 9 tanesinde parC (L59G) mutasyonu ve 11 tanesinde gyrA (S83L) mutasyonu saptanmıştır. parC (S80L) mutasyonu sonucunda, *A. baumannii* direncinin geliştiği belirlenmiştir. Çalışmamızdaki gyrA (S83L) mutasyonu ile sonuçlar uyuşmakta fakat parC mutasyon sonucu ile uyuşmamaktadır [20].

Ahmed Hamouda ve ark. tarafından yapılan çalışmada İskoçya'da bulunan 5 hastaneden 9 adet *A. baumannii* dirençli izolatta parC ve gyrA gen mutasyonlarının siprofloksasin direncine sebep olup olmadığı araştırılmıştır. 9 adet dirençli izolatın tamamında gyrA geninde mutasyon tespit edilmiş fakat yalnızca 2 örnekte parC geninde mutasyon saptanmıştır. Yani İki kültürde iki gen bölgesinde de mutasyon saptanmıştır. Her iki gen bölgesinde mutasyon saptanan izolatların aynı zamanda MİK

değerleri de yüksek bulunmuştur. Bu sebeple gyrA ve parC'de meydana gelen mutasyonların siprofloksasin direncine sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmadaki sonuçlara göre, bizim çalışmamızda sadece gyrA geninde meydana gelen mutasyon sonucu ile uyumludur [21].

2005 yılında Jeom Kyu Lee ve ark., Kore'de farklı hastanelerden toplanan 59 adet *A. baumannii* izolatı üzerinde çalışmıştır. Siprofloksasin direnci ile gyrA-parC genlerinin mutasyonları arasındaki ilişkiyi araştırılmıştır. gyrA genindeki (S83L) mutasyonu ve parC geninde S80L mutasyonu siprofloksasin direnci ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda gyrA (S83L) mutasyonu ile örtüşmektedir fakat parC mutasyonu ile örtüşmemektedir [22].

Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak yapılan çalışmalarda yalnızca gyrA (S83L) gen bölgesinde meydana gelen mutasyon ile elde ettiğimiz sonuçlar örtüşmektedir.

Çalışmamızda 73 *A. baumannii* dirençli klinik izolatı kullanıldı. Bu kültürlerle DNA izolasyonu yapıldı ve Real Time PCR uygulanarak gyrA, gyrB ve parC mutasyonu HRM analizi vasıtasıyla gruplara ayrıldı. Ayrılan gruplardan her bir gen bölgesi için iki adet örnek alındı. Sekans analizi uygulandı ve sonucunda bütün izolatlarda gyrA (S83L) gen bölgesinde mutasyon saptandı fakat gyrB ve parC gen bölgelerinde mutasyona rastlanmadı. Bu sebeple elde edilen bulgular doğrultusunda belirlediğimiz hipotezin doğru olduğu sonucuna ulaşılabilir. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmamızda, siprofloksasin direnci gyrA (S83L) gen bölgesinde meydana gelen mutasyon ile ilişkilendirilmiştir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.; Tasarım: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.; Denetim: T.S., S.Ö., F.K.O.; Kaynaklar: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.; Malzemeler: T.S., S.Ö., F.K.O.; Veri Toplama ve/veya İşleme: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.; Analiz ve/veya Yorumlama: T.S., S.Ö., F.K.O.; Literatür Taraması: U.K.; Makalenin Yazılması: U.K.; Kritik İnceleme: S.Ö., T.S., F.K.O.; Diğer: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

ETİK KURUL ONAYI

Çalışmamız için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 22.10.2014 tarihinde onay alınmıştır. Karar no: 19/06

KAYNAKLAR

1. Kayış, A. (2018). Doktora Tezi. KSÜ araştırma ve uygulama hastanesi'nde hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Acinetobacter baumannii* izolatlarının hızlı moleküler epidemiyolojik tanısı. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, Türkiye.
2. Tünay, A. (2012). Tıpta Uzmanlık Tezi. Hastane kaynaklı pan drug resistant *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarında risk faktörlerinin araştırılması. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, Türkiye.
3. Şahin, A.R., Doğruer, D., Nazik, S., Aktemur, A., Öksüz, H., Aral, M., Ateş, S. (2019). Hastane kökenli patojenlerde artan antimikrobiyal direnç sorunu: *Acinetobacter baumannii*. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi, 4(2), 156-169. [CrossRef]
4. Azap, Ö.K., Timurkaynak, F., Arslan, H., Karaman, S.Ö. (2004). Hastane enfeksiyon etkeni olarak izole edilen non-fermentatif gram negatif bakterilerde siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasinin *in-vitro* etkinliğinin karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 57(4), 189-194. [CrossRef]
5. Uğur, M., Genç, S. (2019). Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının üç yıllık direnç profili. Turkish Journal of Intensive Care, 17(3), 130-137. [CrossRef]
6. Serapide, F., Guastalegname, M., Gulli, S.P., Lionello, R., Bruni, A., Garofalo, E., Longhini, F., Treçarichi, E.M., Russo, A. (2024). Antibiotic treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in view of the newly developed β -Lactams: A narrative review of the existing evidence. Antibiotics, 13, 1-16. [CrossRef]

7. Özgür, Ö., Aksaray, N. (2014). Acinetobacter infections and treatment. *Journal of Pediatric Infection*, 8(1), 28-32. [\[CrossRef\]](#)
8. Abdallah, D.N.A. (2024). Yüksek Lisans Tezi. Kinolon dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında plazmit aracılı kinolon direnç genlerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye.
9. Park, S., Lee, K.M., Yoo, Y.S., Yoo, J.S., Yoo, J.I., Kim H.S., Lee, Y.S., Chung, G.T. (2011). Alterations of gyrA, gyrB, and parC and activity of efflux pump in fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 2(3), 164-170. [\[CrossRef\]](#)
10. Liu, Y.H., Kuo, S.C., Lee, Y.T., Chang, I.C.Y., Yang, S.P., Chen, T.L., Fung, C.P. (2012). Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in gyrA and parC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45, 108-112. [\[CrossRef\]](#)
11. Giles, J., Hardick, J., Yuenger, J., Dan, M., Reich, K., Zenilman, J. (2004). Use of applied biosystems 7900HT sequence detection system and taqman assay for detection of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3281-3283. [\[CrossRef\]](#)
12. Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., Madden, T.L. (2008). NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36, 5-9. [\[CrossRef\]](#)
13. Ye, J., McGinnis, S., Madden, T.L. (2006). BLAST: Improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 34, 6-9. [\[CrossRef\]](#)
14. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948. [\[CrossRef\]](#)
15. Sheng, W.H., Lin, Y.C., Wang, J.T., Chen, Y.C., Chang, S.C., Hsia, K.C., Wu, R.J., Li, S.Y. (2009). Identification of distinct ciprofloxacin susceptibility in *Acinetobacter* spp. by detection of the gyrA gene mutation using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 23(3-4), 154-156. [\[CrossRef\]](#)
16. Shahhat, M.S.A., Gaballa, E.A.E.Y., Rohman, R.Z.A.E., Mohamme, M.N., Yassin, A.S. (2021). Association between mutations in GyrA/B and ParC/E genes of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and fluoroquinolones resistance. *Microbes and Infectious Diseases*, 2 (2), 343-351. [\[CrossRef\]](#)
17. Hong, C.K., Kim, J., Kim, G.Y. (2021). Characteristics of quinolone resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from general hospitals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 14(3), e115128. [\[CrossRef\]](#)
18. Tantawy, E.A., Sayed, H.M.E., Matar, H.M., Azhary, B.A.E. (2020). Multi and extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* in ICUs: Risk factors, antimicrobial resistance profiles and cohabiting of gyrA and parC mutations. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 29(4), 109-116.
19. Rizka, M.A., Hasmono, D., Kuntaman. (2014). The profile of genetic mutation of the gyrB gene on clinical isolation of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *Folia Medica Indonesiana*, 50(4), 215-218.
20. Chiu, C.H., Lee, H.Y., Tseng, L.Y., Chen, C.L., Chia, J.H., Su, L.H., Liu, S.Y. (2010). Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipenem in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 382-386. [\[CrossRef\]](#)
21. Hamouda, A., Amyes, S.G.B. (2004). Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(3), 695-696. [\[CrossRef\]](#)
22. Lee, J.K., Lee, Y.S., Park, Y.K., Kim, B.S. (2005). Mutations in the gyrA and parC genes in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiology and Immunology*, 49(7), 647-653. [\[CrossRef\]](#)