



T.C.

SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ACİNETOBACTER BAUMANNII'NİN KOLİSTİN DİRENÇLİ VE
DUYARLI SUŞLARININ METABOLOMİK PROFİL
KARŞILAŞTIRMASI**

BYDAA ATRON

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİVAS-2022

T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Acinetobacter baumannii'nin Kolistin Dirençli ve Duyarlı Suşlarının
Metabolomik Profil Karşılaştırması**

BYDAA ATRON

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr.Öğr.Üyesi MÜRŞİT HASBEK

SİVAS-2022



Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu’nun 8.10.2022 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

Özet

Acinetobacter baumannii'nin Kolistin Dirençli ve Duyarlı Suşlarının Metabolomik Profil Karşılaştırması

Bydaa ATRON

Yüksek lisans Tezi

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Mürşit HASBEK

2022, 65 sayfa

Acinetobacter baumannii kritik bir hastane patojenidir. Solunum yolu enfeksiyonu, sepsis, idrar yolu ve yara enfeksiyonları gibi birçok ciddi enfeksiyondan sorumludur. Kolistin (CST) dahil olmak üzere mevcut tüm antimikrobiyallere direnç geliştirme yeteneği nedeniyle terapötik seçenekler son derece azdır. Metabolomik yöntem, ilaca dirençli bakteriler hakkında ek bilgi veren düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin ve bunlarla ilgili biyokimyasal yolların gözlemlenmesine yardımcı olabilir. Bu çalışmanın amacı, *A. baumannii*'nin kolistine duyarlı ve dirençli klinik suşları arasındaki metabolitlerin farklılıkların ekspresyonunu karşılaştırmaktır. Toplam 18 izolat (9 duyarlı suş ve 9 dirençli suş) analiz edildi. Metabolik profil oluşturma, Q-TOF LC/MS kütle spektrometresi (UPLC Q-TOF/MS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri toplama, sınıflandırma ve tanımlama LC-MS/MS verilerinin elde edilmesi için Agilent MassHunter yazılımı kullanıldı. Veri ön işleme, normalleştirme, görselleştirme ve tepe hizalama, XCMS ve Mass profiler Proffesional yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Tanımlanan metabolitlerin açıklaması, MetaboAnalyst 5.0 yazılımı KEGG aracılığıyla yapıldı. Metabolik yol analizi için çevrimiçi yazılımlar ve veritabanları kullanılmıştır. Bunlar şunları içerir: PubChem, MetaCyc, ChEBI. Küresel metabolomik profillememiz, test edilen suşlar arasında önemli bir fark gösterdi. Bu çalışma, ilaç direncini anlamak ve/veya *A. baumannii*'ye karşı yeni tedavilerin keşfi hakkında tamamlayıcı araştırmalar için değerli bir bilgi kaynağı olabilir.

Anahtar Kelimeler

Acinetobacter baumannii, Kolistin Direnci, Metabolomik, HPLC Q-TOF/MS

Abstract

Comparison of The Metabolomic Profile Between Colistin-Sensitive Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* strains

Bydaa ATRON

Master. Thesis

Department of Medical Microbiology

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Mürşit HASBEK ,

2022, 65 pages

Acinetobacter baumannii, a gram negative bacteria, has emerged as a critical nosocomial pathogen. It is responsible for many serious infections such as pneumonia, sepsis, urinary tract and wound infections. The therapeutic options are extremely limited because of its ability to develop resistance to all available antimicrobials, including colistin (CST). Metabolomics tools may aid in the observation of the low molecular weight compounds in biochemical pathways yielding additional information about drug-resistant bacteria. The objective of this work was to compare the differential expression of metabolites between colistin-susceptible and resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. A total of 18 isolates (9 susceptible strains and 9 resistant strains) was analyzed. Metabolic profiling was performed using the Q-TOF LC/MS mass spectrometer (UPLC Q-TOF/MS). Agilent MassHunter software was used for acquisition of LC-MS/MS data. Data preprocessing, normalization, visualization and peak alignment, was carried out using XCMS and Mass profiler Professional software. Annotation of identified metabolites was performed via MetaboAnalyst 5.0 software and KEGG. Online softwares and databases was utilized for pathway analysis. They include: PubChem, MetaCyc, ChEBI. Our global metabolomic profiling showed a significant difference between the tested strains. This study can be a valuable source of information to complementary research on drug resistance and/or the development of novel therapeutic interventions to defeat *Acinetobacter baumannii* 's infections.

Keywords

Acinetobacter baumannii, Colistin Resistance, Metabolomics, HPLC Q-TOF/MS

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇ KAPAK.....	i
YÖNERGE.....	iii
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
1.2 Araştırma Amacı.....	1
1.2.1 Ana amaç	1
1.2.2 Spesifik amaç	1
1.3 Araştırma Hipotezi	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Metabolomik.....	2
2.2 Metabolomik çalışmalara yaklaşımlar	2
2.2.1 Hedefli metabolomik	3
2.2.2 Hedefsiz metabolomik	3
2.3 Analitik teknikler	3
2.3.1 Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR).....	3
2.3.2 Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS)	4
2.3.3 Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS).	4
2.4 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-Dört kutuplu uçuş süresi kütle spektrometrisi (HPLC-QTOF-MS)	5
2.5 Veri analizi	5
2.6 Mikrobiyal Metabolomik.....	6
2.6.1 Hücre Dışı Mikrobiyal Metabolomik (Metabolic footprinting).....	6

2.6.2 Hücre İçi Mikrobiyal Metabolomikler (fingerprinting)	6
2.6.3 İnsan Ekosistemleri	6
2.6.4 Çevresel Ekosistemler	6
2.7 Acinetobacter Cinsi	7
2.8 Acinetobacter baumannii	8
2.9 Bulaşma, İlişkili Enfeksiyonlar ve A. baumannii'nin Klinik Etkisi	8
2.9.1 Solunum Enfeksiyonları	9
2.9.2 Kan Dolaşımı Enfeksiyonları	9
2.9.3 İdrar Yolu Enfeksiyonları	10
2.9.4 Menenjit	10
2.10 Virülans Faktörleri	10
2.10.1 Yapışma	10
2.10.2 Dış zar proteinleri	11
2.10.3 Protein Salgı Sistemleri	11
2.10.4 Hücre Zarf Faktörleri (LPS ve Kapsül)	12
2.10.5 Mikrobesein Toplama Sistemleri	12
2.10.6 Quorum sensing	13
2.10.7 Biyofilm Oluşumu	13
2.11 Mevcut tedavi seçenekleri	14
2.12 A. baumannii'nin antibiyotik direnci	15
2.13 Kolistin (Polimiksin E)	16
2.14 Mikrobiyal Metabolomik literatürde	18
2.14.1 Çeşitli büyüme ortamlarında bakterilerin metabolomik yanıtı	18
2.14.2 Metabolizma üzerindeki antibiyotik etkisi (Birey veya kombinasyonları olarak)	19
2.14.3 Virulan ve avirulan suşlar arasındaki fark	20
2.14.4 Bağırsak Mikrobiyota Profili	21
2.14.5 Biyofilm	21
2.14.6 Antibiyotiklere bakteriyel yanıt	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1 Araştırmanın Tipi	23
3.2 Araştırmanın Yapıldığı Yeri	23
3.3 Araştırmanın Evreni	23

3.4 Araştırmanın Etik Yönü.....	23
3.5 Örnek boyutu	23
3.6 Dahil edilme kriterleri	23
3.7 Dışlama kriterleri	23
3.8 Tür Teyidi	23
3.9 Bakteri kültürü hazırlama	24
3.10 Hücresel metabolit ekstraktlarının hazırlanması	24
3.11 Metabolitlerin LC-MS analizi	25
3.12 LC-MS/MS analizi	25
3.13 Veri işleme, biyoinformatik ve istatistiksel analizler	26
4. BULGULAR	28
4.1 Mass Hunter Profesyonel Sonuçları	28
4.2 Test edilen <i>A. baumannii</i> Suşlarının metabolik profilleri.....	33
5. TARTIŞMA	35
5.1 Metabolit tanımlama.....	35
5.2 Farmakolojik olarak aktif Metabolitler.....	36
5.3 Önemli Metabolik Yollarla İlgili Metabolitler	37
5.3.1 Hücre duvarı biyosentezi	37
5.3.2 Enzim Kofaktör Biyosentezi.....	37
5.3.3 Mikrobiyal astaksantin biyosentezi.....	38
5.3.4 Nükleotid metabolizması	38
5.4 Lipidomik Profil	39
5.5 Virülans ile ilgili metabolitler.....	39
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR.....	41

KISALTMALAR

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AMEs	Aminoglycoside modifying enzymes (Aminoglikozit modifiye edici enzimler)
AmpC	Ambler class C cephalosporinases (Ambler C sınıfı sefalosporinazlar)
ANN	Artificial neural networks (yapay sınır ağları)
BAP	Biofilm-associated protein (Biyofilm ilişkili protein)
BLP-1	BAP Like protein -1 (BAP benzeri protein-1)
ÇİD	Çoklu ilaca direnç
ESBLs	Extended-spectrum β -lactamases (Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz)
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry (Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi)
HCA	Hierarchical cluster analysis (Hiyerarşik küme analizi)
HPLC	High-performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry (Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi)
LPS	Lipopolysaccharide (Lipopolisakkarit)
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (Matris destekli lazer desorpsiyon uçuş süresi)
MBLs	Metallo- β -lactamases (Metallo-beta-laktamaz)
MDR	Multidrug Resistance (Çoklu ilaç direnci)
MHB	Mueller Hinton broth (Mueller Hinton buyyon)
MICs	Minimal inhibitory concentrations (Minimum inhibitör konsantrasyon)
MS	Mass spectrometry (kütle spektrometrisi)
NLM	Nonlinear mapping (Doğrusal olmayan eşleme)
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy

	(Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi)
OmpA	Outer membrane protein A (Dış zar proteini A)
RAMP	Resistance-associated macrophage protein (Dirençle ilişkili makrofaj proteini)
BAP	Biofilm-associated protein (Biyofilmle ilişkili protein)
PCA	Principal component analysis (Temel bileşekler analizi)
PetN	Phosphoethanolamine (Fosfoetanolamin)
PLS-DA	Partial least squares discriminant analysis (En küçük kareler diskriminant kısmi analizi)
QTOF	Quadrupole time-of-fligh (Dört kutuplu uçuş süresi)
VİP	Ventilatörle-ilşkili pnömoni
XDR	Extensively drug-resistant (Kapsamlı ilaç direnci)

1.GİRİŞ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Acinetobacter baumannii, yoğun bakım hastalarındaki ventilatörle ilişkili ve kan dolaşımı enfeksiyonlarında ve çoklu ilaca dirençli olması nedeniyle endişe sebebidir (Al-Gethamy ve diğerleri, 2017). Bu çalışmada, kolistine duyarlı ve dirençli klinik *A. baumannii* suşları arasındaki metabolit farklılıkları metabolomik yöntemlerle araştırıldı.

Çalışmamız *A. baumannii* için yeni terapötik ve teşhis stratejilerinin belirlenmesine ışık tutabilecek olan kolistin direnci mekanizmasının anlaşılmasında, metabolik yollara ilişkin değerli bilgiler sağlayacaktır. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, kolistine duyarlı ve kolistine dirençli izolatlar arasındaki metabolik farklılıkları ortaya koyan ülkemizdeki ilk çalışmadır.

1.2 Araştırma Amacı

1.2.1 Ana amaç

A. baumani'nin kolistine duyarlı ve kolistine dirençli klinik suşları arasındaki metabolomik profili karşılaştırmak.

1.2.2 Spesifik amaç

- I. Direnç ile ilişkili anahtar yollarını belirlemek
- II. Potansiyel ilaç ve aşı hedeflerini belirlemek
- III. Direnç biyobelirteçlerini belirlemek

1.3 Araştırma Hipotezi

A. baumani'nin kolistine duyarlı ve kolistine dirençli izolatları arasında metabolomik profile önemli bir fark var mıdır?

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Metabolomik

Metabolomik biyolojik bir sistemdeki metabolitlerin sistematik incelenmesi olarak tanımlanır. Genomik, transkriptomik ve proteomik dahil olmak üzere “omik” ailesindeki en yeni yaklaşımdır. Metabolom, belirli fizyolojik koşullar altında biyolojik bir sistemde verilen tüm metabolitlerin toplamı olarak tanımlanır. Ekzometabolom (hücre dışındaki metabolitler) ve endometabolom (hücre içi metabolitler) olarak ikiye ayrılabilir (Rochfort, 2005).

Metabolomik terimi 1999 yılında Jeremy Nicholson tarafından "canlı sistemlerin patofizyolojik uyaranlara veya genetik modifikasyona dinamik multiparametrik metabolik tepkisinin kantitatif ölçümü" olarak tanımlanmıştır (Nicholson, Lindon ve Holmes, 1999). Metabolitler, transkriptlerin ve proteinlerin aksine genomda kodlanmazlar ve çevreye oldukça bağımlıdır. Bu da bir organizmada bulunan belirli sayıda metabolitin analizini karmaşık hale getirir (Morrow Jr, 2010).

Klasik biyolojik görüşte bilgi, genlerden transkriptler yoluyla, metabolizma gibi hücresel işlevleri yerine getiren proteinlere akar. Metabolomik çalışmalar fenotipik olarak gözlemlenen seviyelere en yakın bilgiyi sağlayabilir (Fiehn, 2002).

2.2 Metabolomik çalışmalara yaklaşımlar

Belirli bir hastalık durumu veya tedavisi ile ilişkili metabolik değişiklikler, hedeflenmiş, yarı hedeflenmiş veya hedeflenmemiş metabolomik yaklaşımlar kullanılarak incelenebilir. Bu yaklaşımlardan herhangi biri arasındaki seçim, kantitasyon gereksinimine, beklenen kesinlik ve doğruluk seviyelerine, numune karmaşıklığına ve ilgili metabolitlerin sayısına bağlıdır (Zhou ve Yin, 2016).

2.2.1 Hedefli metabolomik

Hedefli metabolomik yaklaşımlar, analitik tekniklerin yüksek hassasiyet, doğrulanabilirlik ve seçicilik için optimize edilmesini sağlayan birkaç bilinen metabolitle ilgilenir. Bu nedenle hedeflenen metabolomikler esas olarak ölçülebilir niteliktedir (Koal & Deigner, 2010). Tersine, yarı hedefli veya hedefsiz yaklaşımlar daha az ölçülebilir niteliktedir. Temel amaçları hipotez üretimi için belirli bir örnekte tespit edilen tüm metabolitleri tanımlamaktır. Bu nedenle hedeflenmiş yaklaşımlar, gözlemlenen biyolojik fenomenler hakkında kesin kanıtlar elde etmek için hedefsiz veya yarı hedefli çalışmalardan oluşturulan hipotezleri kullanır (Burgess ve arkadaşları, 2011).

2.2.2 Hedefsiz metabolomik

Hedefsiz metabolomikler, beklenen metabolit profilleri hakkında sınırlı veya önceden bilgi sahibi olmadan belirli bir numune setinde binlerce metabolitin saptanmasıyla ilgilenir (Miller ve arkadaşları, 2015). Bu çalışmalardan yapılan gözlemler, araştırmacının, hedefli analizler sırasında daha sonraki bir aşamada test etmek için hipotezler türetmesine olanak tanır. Normalde çok sayıda metabolit söz konusu olduğundan, hedeflenmemiş yöntemler normalde daha az kantitatif ve çoğu durumda metabolitlerin bazıları kolayca tanımlanamaz (Miller, 2015; Patti, 2011).

2.3 Analitik teknikler

Sistem biyolojisinin ayrılmaz bir parçası olarak, metabolomikteki araştırma nesnelerinin çoğu, bağlı moleküler ağırlığı 1000 kDa'den az olan küçük moleküllerdir (Yang ve diğerleri, 2019).

Metabolomik araştırmalar için analitik araçlar şunları içerir:

2.3.1 Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

Nükleer manyetik rezonans (Nuclear magnetic resonance spectroscopy NMR), tıpta on yıllardır çoğunlukla idrar ve plazma için profil oluşturma yöntemi olarak kullanılmaktadır. En fazla bulunan metabolitlerin tanımlanmasına ve kantitasyonuna izin verir. Bu yöntemin fiziksel temeli, manyetik bir alanda titreşen çekirdeklerin gevşemesinin ölçülmesidir (Lambert, Mazzola ve Ridge, 2019).

NMR nicel ve nitel bilgi verir ve kolayca otomatikleştirilebilir. Kütle spektrometrisi (Mass spectrometry MS) ile karşılaştırıldığında en büyük dezavantajı yalnızca en bol metabolitleri tespit edebilmesidir, Tepe kaymaları üst üste gelebileceğinden net bir tanımlama her zaman mümkün

değildir. Profil oluşturma'nın yanı sıra NMR, saflaştırılmış metabolitlerin yapı aydınlatması için de kullanılır. MS ile birlikte kullanıldığında metabolitlerin doğrulanmasına veya *de novo* tanımına izin verebilmesi muhtemeldir (Beltran ve diğerleri, 2012).

2.3.2 Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS)

Gaz kromatografisi (GC), hareketli faz olarak bir soy gaz kullanır. GC'de en yaygın olarak kullanılan gazlar arasında nitrojen, helyum ve hidrojen bulunur. Gazın mobil faz olarak kullanılması GC ve LC arasındaki en temel farktır. Modern GC sistemlerinde kullanılan kolonlar, iç duvar üzerine kaplanmış sabit fazlar içeren uzun kılcal kolonlardır. Sabit faz kaplamaları polaritelerine göre değişir. Polar olanlar carbowax fazlarını içerir. Metil silikon fazları ise daha az polardır (Bedair ve Sumner, 2008).

Durağan fazları polariteleri ve farklı analitlerin analizi için uygunlukları açısından 13 farklılık gösteren bir dizi ticari GC kolonu mevcuttur. Numuneler, konsantrasyonlarına bağlı olarak bölünmüş veya bölünmemiş modda enjekte edilebilir; analiz edilen metabolitlerin çok düşük seviyelerini içeren numuneler için bölünmemiş mod tercih edilir (Krone ve arkadaşları, 2010).

GC-MS, bir kapiler GC kolonunun yüksek ayırma verimini (kromatografik çözünürlük) ve kütle spektrometresinin yüksek hassasiyetini ve sağlamlığını birleştirdiği için metabolomik araştırmalarda tercih edilen tekniklerden biridir (Wittmann, 2007).

2.3.3 Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS).

Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (Liquid chromatography-mass spectrometry: LC-MS), metabolomikte en yaygın kullanılan tekniktir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High-performance liquid chromatography HPLC) ve ultra-HPLC (UHPLC), GC-MS'den daha kapsamlı olarak kabul edilir. Çünkü bu yöntemler peptidlere, hidrofilik organik asitlere, hatta hidrofobik lipidlere kadar daha geniş bir metabolit yelpazesinin analizine izin verir. (Rochat, 2016) .

LC'yi uçuş süresi (Time of flight: TOF), dört kutuplu uçuş süresi (Quadrupole time-of-flight QTOF), Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı ve yörünge iyon tuzakları gibi yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisine bağlamak, büyük bir özgüllük ve hassasiyet sağlar. Böylece Metabolom verilerinin kalitesini artırır Bu ilerlemeler, LC-MS'nin büyük ölçekli numune setlerinden binlerce farklı kimyasal özelliğin hedefsiz bir şekilde rutin olarak ayrılması ve ölçülmesi için kullanılmasına izin verir (Gorochategui ve arkadaşları, 2016).

2.4 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-Dört kutuplu uçuş süresi kütle spektrometrisi (HPLC-QTOF-MS)

Dört kutuplu uçuş süresi kütle spektrometrisi (QTOF-MS), hem öncü hem de ürün iyonları için yüksek hassasiyet ve kütle doğruluğunu bir araya getirerek, ana ve parça iyonlarının elementel bileşiminin anlaşılmasını sağlayabilir. Bu özellik bileşiklerin tam olarak tanımlanmasına ve izobarik bileşikler arasında ayırım yapılmasına yardımcı olur. HPLC-QTOF-MS'nin kalitatif amaçlar için potansiyeli çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır (Gómez-Romero ve diğerleri, 2011; Rodríguez-Medina ve arkadaşları, 2009).

METLIN, 10.000'den fazla metaboliti kapsayan, yüksek çözünürlüklü tandem kütle spektrumlarının en büyük kütüphanesi kullanıcıya öncü iyonu, onun parçalarını ve nötr kayıplarını arama yeteneği sağlayarak metabolitlerin karakterizasyonu büyük ölçüde artırılır (Zhu ve arkadaşları, 2013).

2.5 Veri analizi

Metabolomik araştırmaların orijinal haritası karmaşık ve veri hacmi büyük olduğundan, geleneksel veri işleme yöntemleriyle analiz edilemesi pek mümkün değildir. Bu nedenle metabolomik analiz üç adımlı bir analizi içerir; veri çıkarma, veri ön işleme ve örüntü tanıma. Veri çıkarma, haritanın görselleştirilmesi olarak tanımlanabilir. Veri ön işleme ise gürültü filtrelemeyi, tepe çözünürlüğünü örtüştürmeyi, tepe hizalamayı, tepe eşleştirmeyi, normalleştirme vb basamakları içerir. Örüntü tanıma, denetimli bir mod veya denetimsiz bir mod kullanılarak gerçekleştirilebilir. Denetimsiz modeller, temel bileşen analizini (Principal component analysis PCA), hiyerarşik küme analizi küme analizini (Hierarchical cluster analysis HCA) ve doğrusal olmayan haritalamayı (Nonlinear mapping NLM) içerir. Denetimli modelleri arasında ise yapay sinir ağları (Artificial neural networks ANN) , kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (Partial least squares discriminant analysis PLS-DA) bulunur (Yang, 2019).

Metabolomik çalışmalarda büyük miktarda ham veriyi işlenmekte ve istatistiksel yöntemler yoluyla verilerdeki potansiyel bilgiler çıkarılarak metabolomik araştırmaların anahtarı olabilecek biyolojik değeri açıklamak hedeflenir. Metabolik örneklerdeki bilgileri derinlemesine araştırmak için istatistiksel araçların kullanılması, metabolomik teknolojisinin gelişimini güçlü bir şekilde destekleyecektir (Hendriks ve diğerleri, 2011).

2.6 Mikrobiyal Metabolomik

2.6.1 Hücre Dışı Mikrobiyal Metabolomik (Metabolic footprinting)

Hücre dışı metabolomik, mikrobiyal hücreler tarafından çevrelerine, yani kültür ortamına salgılanan düşük moleküler ağırlıklı hücre dışı metabolitlerin incelenmesidir. Bu metabolitlerin tüm tamamlayıcısı genellikle ekzometabolom olarak adlandırılır. Ekzometabolom mikrobiyal hücrenin dışında salgılanan tüm metabolitlerin yanı sıra süpernatanda bulunan mikrobiyal kültür ortamı bileşenlerini de içerir (Mapelli, Olsson ve Nielsen, 2008). Hücre dışı metabolitlerin mikrobiyal hücrelerden ve bunların hücre içi metabolitlerinden ayrılması, santrifüjleme ve filtrasyon gibi basit tekniklerle sağlanabilir (Tredwell, Edwards-Jones, Leak ve Bundy, 2011).

2.6.2 Hücre İçi Mikrobiyal Metabolomikler (fingerprinting)

Hücre içi metabolitler mekanik bir bariyer, hücre zarı veya hücre zarfı içinde bulunur. Hücre içi metabolitleri tanımlamak ve ölçmek için hücre içi metabolitlerin mikrobiyal hücrelerden ekstraksiyonu gerekmektedir ve bu da karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte, hücre zarını gözenekli hale getiren ekstraksiyon çözücüler (organik, inorganik susuz veya ikisinin karışımı) çözücülerin hücre içi ortama nüfuz etmesine izin verir ve hücre içi metabolitlerin geri kazanımını artırır (Pinu ve arkadaşları, 2017).

2.6.3 İnsan Ekosistemleri

Son on yılda bakteriler ve insanlar arasındaki etkileşimlerin algılanmasında bariz bir değişiklik olmuştur. İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasından sonra, insan vücudu içinde ve üzerinde yaşayan mikroorganizmaların (yani mikrobiyota) insan hücrelerinden on kat daha fazla olduğu kısa sürede anlaşılmıştır (Gill ve ark., 2006). Buradan hareketle insanların metabolik özelliklerinin de mikrobiyotadan etkilenmesi muhtemeldir (Gevers ve arkadaşları, 2012).

Daha önceki metagenomik çalışmalar bilinmeyen ve kültürlenmemiş birçok takson da dahil olmak üzere, mikrobiyomun (mikrobiyota genomlarının) insan sağlığı için çok önemli olduğu fikrini desteklemiştir (Ventura ve arkadaşları, 2009).

2.6.4 Çevresel Ekosistemler

Mikrobiyal topluluklar ekosistemlerin önemli bir bileşenidir. Yakın zamana kadar, bu toplulukların anlaşılması büyük ölçüde kültürlenebilen mikroorganizmalarla sınırlıydı (Smith, 2002). DNA dizileme teknolojilerinin ve yeni yaklaşımların geliştirilmesi, kültürlenmemiş üyeler de dahil

olmak üzere tüm mikroorganizmaların çalışılmasına izin vererek çevresel mikrobiyoloji alanında devrim yaratmıştır (Torsvik, 2002).

Mikrobiyal ekosistem, çeşitli faktörlerden etkilenen dinamiktir bir ortamdır; bu faktörler çevre koşulları (örn. sıcaklık, nem), kimyasal bileşimler (örn. asitlik, besin konsantrasyonları) ve çevrenin yapısını (örn. katı, sıvı) içerir. Bu nedenle, topluluk içindeki bileşenler ve etkileşimler basitten (iyi kontrol edilen bir büyüme koşulunda bir veya iki tür) karmaşığa (örneğin, toprak, okyanus, rizosfer, atık su) kadar değişir (Raes ve arkadaşları, 2008).

Canlılar arasındaki etkileşimler genellikle simbiyotik, karşılıklı veya rekabetçi olarak kategorize edilir. Etkileşimlerde her üyenin metabolik aktiviteleri rol alır (Tang, 2011). Bu nedenle metabolomik, mikrobiyal ekosistemlerdeki popülasyonları ve etkileşimleri anlamada çok önemli bir rol oynar. Diğer “omiklerden” elde edilen sonuçlardan ve gelişmelerden yararlanır ve ayrıca topluluk işlevlerine ilişkin içgörüler sağlar (Jiao ve arkadaşları, 2010).

2.7 *Acinetobacter* Cinsi

En son taksonomik çalışmalara göre, *Acinetobacter* cinsi *Moraxellaceae* ailesinin *Proteobacteria* alt sınıfına aittir (Visca ve arkadaşları, 2011). *Acinetobacter* cinsi, glikozu fermente etmeyen, hareketsiz, güç üreyen, katalaz pozitif, oksidatif negatif, aerobik Gram negatif kokobasillerdir (Winn, 2006, pp 385). Çoğunluğu patojenik olmayan çevresel organizmalardır. Nemli toprak/çamur, sulak alanlar, göletler, su arıtma tesisleri, balık çiftlikleri, atık su ve hatta deniz suyu dahil olmak üzere ıslak ortamlarda bulunur (Wong ve arkadaşları, 2017). Bu çevresel suşlar genellikle karbapenemazlar ve geniş spektrumlu β -laktamazlar (ESBL'ler) dahil olmak üzere antibiyotik direnç mekanizmalarını barındırır ve bu nedenle klinik olarak önemli ve dirençli suşlara dönüşen elemanları için çevresel rezervuarlar olarak bulunur (Berlau ve Pitt, 1999).

A. calcoaceticus, *A. lwoffii*, *A. Nosocomialis* ve *A. Pittiis* gibi bazı türler sebzeler, et, süt ürünleri ve insan derisinde bulunmuştur (Malta ve arkadaşları, 2020). Ayrıca *A. baumannii* suşları, et, sebze ve çeşitli hayvan türleri dahil olmak üzere ticari gıdaları kontamine etmiş ve insan popülasyonlarına birden fazla çevresel bulaşma yolu olduğunu düşündürmüştür (W.-J. Zhang ve arkadaşları, 2013).

Enfeksiyonlara neden olan en yaygın tür *A. Baumannii*'dir, bunu takiben *A. Calcoaceticus* ve *A. Lwoffii* izlemektedir (Wong ve arkadaşları 2017). *A. haemolyticus*, *A.*

johnsonii, *A. junii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. schindleri*, and *A. Ursingii* gibi bazı türler zaman zaman patojen olarak rapor edilmiştir. *A. Seifertii* Asya'da ortaya çıkan bir patojendir ve *A. baumannii* ile genetik olarak yakından ilişkilidir (Visca ve arkadaşları, 2011).

2.8 Acinetobacter baumannii

A. baumannii fırsatçı bir patojendir ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde farklı hastane enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilir (Castilho, 2017). *Acinetobacter* cinsinin diğer üyelerinden farklı olarak *A.baumannii* her yerde bulunmaz ve hastane dışında bilinen bir doğal habitatı yoktur (Hrenovic ve arkadaşları, 2014). *A. baumannii* esas olarak hastane enfeksiyonlarına ve nadiren toplum kökenli enfeksiyonlara neden olur (Peleg ve arkadaşları, 2008).

Bu organizma temel olarak bağışıklığı baskılanmış hastalar ve ventilatörle ilişkili hastane kökenli pnömonisi olan yoğun bakım ve yanık ünitelerindeki hastalarında hastane enfeksiyonlarının nedenidir (Sievert, 2013). *A. baumannii*'nin neden olduğu kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları, beyin cerrahisi sonrası menenjit, yara ve idrar yolu enfeksiyonları da gözlenmiştir (Ginawi, 2014). Neden olduğu hastane enfeksiyonlarında %30-75 arasında ölüm oranları gözlemlenmiştir. Majör cerrahi, majör travma, yanıklar, erken doğum, daha önce hastaneye yatış, yoğun bakım ünitesinde kalış, hastanede veya yoğun bakım ünitesinde kalış süresi, mekanik ventilasyon, kalıcı yabancı cihazlar, gerçekleştirilen invaziv prosedürlerin sayısı risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (Al-Getham, 2017).

2.9 Bulaşma, İlişkili Enfeksiyonlar ve A. baumannii'nin Klinik Etkisi

A. baumannii, sıklıkla çevresel yüzeylerde kalıcılık ve sağlık çalışanlarının ellerinin geçici kolonizasyonu yoluyla hastalara bulaşabilir (Spellberg ve Bonomo, 2013). Bununla birlikte, enfekte veya kolonize hastalardan aerosol haline gelmiş bakteriler tarafından hastane kaynaklı yayılım bildirilmiştir (Whitman ve arkadaşları, 2008). *A. baumannii*'nin öncelikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda enfeksiyonlara neden olma kabiliyetine sahip olduğu yaygın olarak iddia edilse de, geniş spektrumlu antibiyotiklere maruz kalma yoluyla seçim, kateter veya endotrakeal tüpler, deride travmatik veya cerrahi yaralanma gibi anatomik bariyerlerin bozulması diğer hasta gruplarında da enfeksiyona eğilimi artırır (Chopra ve arkadaşları, 2014). Klinik olarak *Acinetobacter* enfeksiyonları, mekanik ventilasyon, intravenöz ve üriner kateterizasyon, cerrahi, invaziv prosedürler ve uzun süreli geniş spektrumlu antimikrobiyallerle, özellikle yanıkları olan,

travma geçiren veya yoğun bakım ünitesindeki hastalarda ilişkilidir (M. Freire ve arkadaşları, 2016). Ayrıca toplum kökenli pnömoni ve bakteriyemi, özellikle sıcak ve nemli tropik iklimlerde ortaya çıkabilir (McDonald ve arkadaşları, 1999).

Yukarıda bahsedildiği gibi, *A. baumannii*'nin birden fazla antibiyotik sınıfına direnç eğilimi vardır. Bu durum mikroorganizmanın canlılığını sürdürebilmesi ve hastane patojeni olarak özellikle kritik hastalarda yayılmasını sağlayarak artan morbidite ve mortaliteye katkıda bulunur (L. Antunes ve arkadaşları, 2014). *A. baumannii* edinimi için risk faktörlerini ele alan önceki çalışmalarda uzun süre YBÜ'de kalış, tekrar yatışlarda hastanede veya YBÜ'de kalış, yatış öncesi antimikrobiyal tedavi, mekanik ventilasyon, cihaz kullanımı (kalıcı kateterler, endotrakeal tüp veya nazogastrik tüp), ileri yaş, majör veya acil cerrahi, düşük doğum ağırlığı veya prematürite, diyaliz ve total parenteral beslenme veya intravenöz lipidlerin uzun süreli kullanımı gibi faktörler sıralanmıştır (Djordjevic ve arkadaşları, 2016).

2.9.1 Solunum Enfeksiyonları

Çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *A. baumannii*'nin neden olduğu Ventilatör ilişkili pnömoni, kritik hastalarda yüksek ölüm oranının önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir (Jaruratanasirikul ve arkadaşları, 2019). 29 ülkeyi kapsayan yakın tarihli bir meta-analizde, hastane kökenli pnömoniye ve VIP'e neden olan *A. baumannii* arasında ÇİD fenotipinin yaygınlığının %80'e yakın olduğu bildirilmiştir. Orta Amerika, Latin Amerika ve Karayipler en yüksek prevalansa sahipken, Doğu Asya en düşük prevalansa sahipti (Y. Zhang ve arkadaşları, 2021).

A. baumannii'nin neden olduğu Ventilatör ilişkili pnömoninin kritik yoğun bakım hastalar için enfeksiyon etkeni olarak görünse de, bu organizmaya bağlı toplum kökenli pnömoni giderek artan bir endişe nedenidir (Dexter ve arkadaşları, 2015).

2.9.2 Kan Dolaşımı Enfeksiyonları

A. baumannii, intravenöz kateterlerin sıklıkla kullanılması nedeniyle ile sağlık bakım ortamlarında kan dolaşımı enfeksiyonlarının önde gelen bir nedeni haline gelmiştir. *A. baumannii*'nin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarına bağlı ölüm oranı %40'a yaklaşmaktadır (Wisplinghoff ve arkadaşları, 2012).

A. baumannii'ye bağlı yüksek bakteriyemi insidansı kanser hastalarında rapor edilmiştir ve Brezilyada yapılan bir çalışmada kanser hastalarında bu organizmanın etken olduğu bakteriyemi

vakaları toplam vakaların yaklaşık %68'ini oluşturmaktadır. Ne yazık ki bu türün neden olduğu bakteriyemiler kanser hastaları arasında yüksek bir ölüm oranına yol açmaktadır. Bu hastalarda enfeksiyonla bağlı ölümlerde risk faktörlerinin, nötropeni ve tümör bölgesi enfeksiyonu gibi kanser popülasyonunun has özelliklerinden ziyade, bakteriyemi yönetimiyle daha yakından bağlantılı olduğu görülmüştür (Freire ve arkadaşları, 2016). Beyin cerrahisi geçirenlerde ise 10 yıllık bir süre boyunca kan dolaşımı enfeksiyonlarının yaklaşık %13'ü, *A. baumannii*'ye (%90'ı karbapenem dirençli olan) atfedilmiştir (Tsitsopoulos ve arkadaşları, 2016).

2.9.3 İdrar Yolu Enfeksiyonları

A. baumannii enfeksiyonlarına ilişkin araştırmalar öncelikle pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına odaklanmış olsa da, son iddialar izole edilen her beş *A. baumannii* suşundan birinin özellikle kalıcı idrar sondaları ile idrar bölgelerinden izole edildiği yönündedir (Di Venanzio ve arkadaşları, 2019).

2.9.4 Menenjit

A. baumannii'ye bağlı menenjit, yatan hastalarda özellikle kalıcı ventrikülostomi tüpleri veya beyin omurilik fistülü bulunan ve ameliyat sonrası antimikrobiyal tedavi alan hastalarda (Siegman-Igra, Bar) %70'e yaklaşan mortalite ile yoğun bakım beyin cerrahisi ünitelerinde artan bir tehdit olmaya devam etmektedir (Yosef ve arkadaşları, 1993).

2.10 Virülans Faktörleri

Son yıllarda genomik, fenotipik ve enfeksiyon modeli analizlerini içeren yaklaşımlar, *A. baumannii* patojenitesi için önemli olan virülans faktörlerinin tanımlanmasına yardımcı olmuştur (Antunes ve arkadaşları, 2011).

2.10.1 Yapışma

Bir mikroorganizmanın hücreye girip enfeksiyon oluşturmaya, hücreden hücreye yapışmayı gerektirir; ancak, *A. baumannii*'nin diğer mikroorganizmalara *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica* ve *Helicobacter pylori* gibi kıyasla bu yeteneği düşüktür (Asif ve arkadaşları, 2018).

A. baumannii'nin hücreden hücreye yapışma özelliği diğer mikroorganizmalara kıyasla düşük olsa da, damar içi cihazlarda kullanılan plastikler gibi yabancı maddelere tutunma sağlayan

hidrofobik bir yeteneğe sahip olması konak açısından enfeksiyona yatkınlığı artırmaktadır. Yüzey hidrofobikliğinin, cildin normal florasına kıyasla hastalardan izole edilen suşlarda yüksek oranda ifade edildiği kanıtlanmıştır (Mortensen ve Skaar, 2012).

2.10.2 Dış zar proteinleri

Gram-negatif bakterilerin dış zar proteinleri, genellikle çevresel etkileşim ve adaptasyonda çok önemli bir role sahiptir ve virülans anahtar oyuncularındır (Lin, Huang ve Zhang, 2002). *A. baumannii*'nin ana dış zar proteini olan OmpA, biyofilm oluşumu, kan dolaşımına yayılma ve esas olarak ta konakçının fibronektin rezervini kullanılarak epitel hücreleri ile etkileşimde rol alır. OmpA *A. baumannii*'nin serum direnci olarak bilinir (Perez ve arkadaşları, 2011).

A. baumannii'nin bir başka dış zar proteini, su için kanal görevi gören ve salınımı karbapenem antibiyotiklere dirençle ilişkili olan Omp 33-36-kDa proteinidir (Smani, 2013). Omp33-36, *A. baumannii*'nin virülansı için önemli bir rol oynar (Rumbo ve arkadaşları, 2014). Omp 33-36 gibi, CarO proteini de *A. baumannii*'in karbapenem direncinde rol oynar; Artan CarO ekspresyonunun, trakea ve akciğerlerde proinflamatuvar yanıtların zayıflaması yoluyla pulmoner nötrofillerin infiltrasyonunu geciktirdiği, bakteriyel proliferasyona izin verdiği ve bu döngünün ciddi pnömoni ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Sato ve arkadaşları, 2017).

2.10.3 Protein Salgı Sistemleri

A. baumannii'de hücre yüzey yapılarından proteinlerin salgılanması, patojenin çevre ve konakçılarla etkileşimine izin verir ve bu nedenle tedavi için ilaç hedeflerini temsil eder (Weber ve arkadaşları, 2017).

Trimerik ototransporter (Ata), *A. baumannii*'de açıklanan ilk salgılama sistemidir. İnsan matriks bileşenlerine özellikle de kollajene bağlanmaya aracılık eder ve ayrıca biyofilm oluşumu/koruması ve virülansı ile de ilgilidir (Bentancor ve arkadaşları, 2012).

A. baumannii ayrıca çoklu efektör proteinleri dışa aktarmak için bir tip II salgılama sistemi (T2SS) kullanır. Bu iki aşamalı salgılama sürecinde, genel salgı yolu (Sec) veya İkiz-arginin (Tat) sistemi, patojenin iç zarı boyunca bir N-terminal salgı sinyali ile proteinler iletir. Daha sonra salgı sinyali kaldırılır ve T2SS makinesi katlanmış proteinleri hücrenin dışına salgılar (Green ve Mecsas, 2016).

T2SS efektörleri olan enfeksiyon bölgesindeki proteazlar, fosfolipazlar, süperoksitler (Dismutaz ve katalaz) lokal doğuştan gelen bağışıklık tepkisini hızlandırır ve sonuçta doku hasarına yol açar. Dış zar vezikülleri ayrıca abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunu da artırır (Nho ve arkadaşları, 2015).

2.10.4 Hücre Zarf Faktörleri (LPS ve Kapsül)

Gram negatif insan patojenlerinde, hücre duvarı polisakkariti (LPS), hastalık sürecinin birçok aşamasında yer alan virülans faktörlerinden biridir. *A. baumannii* LPS, normal insan serumuna direnç için önemlidir ve in vivo hayatta kalma için rekabet avantajı sağlar. Ayrıca hayvan modellerinde proinflamatuvar bir yanıt ortaya çıkarabilir (Bentancor ve arkadaşları, 2012).

LPS'nin antijenik O-polisakkariti, pili ile birlikte, kolonizasyonun ilk adımı olarak konakçı hücrelere yapışmayı teşvik edebilir (Haseley ve arkadaşları, 1997).

LPS'nin ötesinde, *A. baumannii* virülansının ana hücre yapısının belirleyicisi, bakteri yüzeyinin etrafındaki bir kapsülün varlığıdır. Kapsülün tekrarlayan birbirine yakın paketlenmiş şeker birimleri, kuruluk ve dezenfeksiyon gibi çevresel koşullara ve fagositoz gibi bağışıklık sistemi reaksiyonlarına karşı bir bariyer oluşturur. Aynı zamanda bazı antimikrobiyallere karşı da koruma sağlar (Singh, Adams, ve Brown, 2019).

2.10.5 Mikrobelerin Toplama Sistemleri

A. baumannii'nin hastane patojeni olarak kalıcılığına katkıda bulunan önemli bir faktör, demir, manganez ve çinko da dahil olmak üzere konakçı besinleri yakalama ve böylece konakçı tarafından dayatılan metalle sınırlı ortama uyum sağlama yeteneğidir (Tipton ve Tersine, 2017).

A. baumannii tarafından demiri yakalamak için kullanılan ana bileşim, sideroforlar olarak bilinen beş yüksek afiniteli demir şelatlayıcı molekül kümesidir. Ek olarak *A. baumannii*, FecA ve FecI gibi demir kullanımına izin veren doğrudan demir alımı için taşıyıcılara ve reseptörlere sahiptir (Morris, Dexter, Kostoulas, Uddin ve Peleg, 2019). *A. baumannii* de bulunan demir taşıyıcılarının hasar oluşturulan modellerinde, biyofilm üretiminin ve oksidatif strese karşı direncin azalarak virülansın azaldığı gösterilmiştir (Ajiboye ve arkadaşları, 2018).

Ayrıca, *A. baumannii*, ZnuABC taşıyıcı ve ZigA GTPaz'dan oluşan yüksek kapasiteli bir çinko temizleme sistemine sahiptir. ZnuABC hücre içi çinko alımını sağlarken, ZigA çinko metabolizmasından sorumludur (Moore ve arkadaşları, 2014). *A. baumannii*, bakteri üremesini engelleyen bir bağışıklık sistemi proteini olan kalprotektini (Çinko kompleksi) atlatılabilir (Nairn ve arkadaşları, 2016).

A. baumannii tarafından manganez sınırlamasının üstesinden gelmek için kullanılan mekanizmalar daha az anlaşılmış olsa da, dirençle ilişkili makrofaj proteini (NRAMP) ailesine ait bir taşıyıcının kalprotektin varlığında manganez birikimini ve büyümesini kolaylaştırdığı varsayılmaktadır (Juttukonda ve arkadaşları, 2016).

2.10.6 Quorum sensing

Çekirdek algılama, bakterilerin değişen çevreye ortaklaşa yanıt vermek için komşu meslektaşlarıyla iletişim kurma yeteneğidir. Bakteriler popülasyon yoğunluklarını gözlemlemek ve sürekli değişen bir ortama uyum sağlamak için otoindükleyiciler olarak ta bilinen, kolayca yayılabilen küçük hormon benzeri moleküller üretirler (Prescott ve Decho, 2020).

Diğer Gram negatif basiller gibi *A. baumannii* de türler arası ve türler arası iletişim için sinyal molekülleri olarak asilhomoserin laktonları salgılar. Ayrıca diketopiperazinler, 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon ve retansiyon faktörü 1 gibi daha az çalışılmış sinyal molekülleri üretir (Asif ve arkadaşları, 2018).

2.10.7 Biyofilm Oluşumu

A. baumannii'nin biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturması iyi çalışılmış bir direnç mekanizmasıdır. Olumsuz koşullarda hayatta kalmak için biyofilmlerin daha derin katmanlarında metabolik olarak inert hale gelir. Zayıf penetrasyon ve antibiyotiklerin metabolik olarak inert bakteriler üzerinde etkili olmaması virülansını artırır (Greene ve arkadaşları, 2016).

Salgınlara yol açan *A. baumannii*, biyolojik yüzeylerde yüksek düzeyde kuruma direnci ve biyofilm oluşturma yeteneği gösterir. *A. baumannii*'nin biyofilm oluşturma yeteneği, polisakkaritlerin, biyofilmle ilişkili protein (BAP), dış zar proteini (Outer membrane protein A

OmpA), BAP benzeri protein-1 (BAP Like protein -1 BLP-1) ve BAP benzeri protein-2'nin (BAP Like protein -2 BLP-2) varlığından kaynaklanmaktadır. (Gaddy ve Actis, 2009).

2.11 Mevcut tedavi seçenekleri

Antibiyotiklere direnç geliştirme eğilimi nedeniyle *Acinetobacter* için mevcut tedavi stratejileri son derece sınırlıdır. β -laktam antibiyotikler duyarlı suşlar için tercih edilen antibakteriyel seçimdir. *A.baumannii*'in neden olduğu enfeksiyonlarda duyarlı suşlar tedaviye hızlı yanıt verir. Ancak ÇİD *A. baumannii*'in neden olduğu enfeksiyonlarda kolistin ve tigesiklin son tedavi seçenekleri olarak elimizde bulunmaktadır (Karakonstantis, 2020).

Duyarlı organizmalar için birinci basamak tedavi, imipenem-silastatin, meropenem veya doripenem gibi bir karbapenemden oluşur. İmipenem ile klinik kür oranları *A. baumannii* ile oluşan VİP'de %57 ila %83 arasındadır. İmipeneme duyarlı izolatlar meropeneme dirençli olabileceğinden ve bunun tersi de olabileceğinden, klinik kullanımdan önce spesifik karbapeneme duyarlılığın test edilmesi tavsiye edilir (Fishbain ve Peleg, 2010). Bununla birlikte bilindiği üzere *A. baumannii* için karbapenem direnç oranları dünya çapında çarpıcı biçimde artmakta, kullanılabilecek antibiyotikler daha kısıtlı hale gelmekte ve klinik uygulamada alternatif ajanlara gereksinim duyulmaktadır (Wong ve arkadaşları, 2017). Bunlardan kolistin (polimiksin E) ve polimiksin B, bakteriyemi ve menenjit tedavisi için kullanılmaktadır (Garnacho-Montero ve diğerleri, 2003).

Kolistin'in klinik kullanımında, yüksek nefrotoksisite ve nörotoksisite oranlarının yanı sıra akciğer dokusuna zayıf penetrasyondan dolayı antibakteriyel etkinin zayıflaması, önemli bir kısıtlamadır (ME Falagas ve Kasiakou, 2006). Diğer bir alternatif ajan ise, *A. baumannii*'in etken olduğu VİP'li hastalar ve ayrıca deri ve yumuşak doku enfeksiyonları için başarılı klinik ve mikrobiyolojik sonuçların bildirildiği minosiklinidir (ME Falagas ve Kasiakou, 2006). *A. baumannii*'nin ÇİD ve büyük ölçüde ilaca dirençli (Extensively drug resistant XDR) suşları için alternatif bir antibiyotik olan tigesiklin, değişken başarı oranlarıyla kullanılmıştır (Lee ve arkadaşları, 2013). Bu ajanın *A. baumannii*'ye karşı makul in vitro aktivitesine rağmen, klinik veriler sınırlı kalmaktadır. Spesifik olarak, *A. bauamnii* VİP ve bakteriyemi ile yapılan klinik çalışmalarda, tigesiklin ile tedavi başarısı sağlanan hasta sonuçları diğer ajanlardan daha düşük olmuştur (Freire ve arkadaşları, 2010). Tedavi seçenekleri arasında Minosiklin ve tigesikline

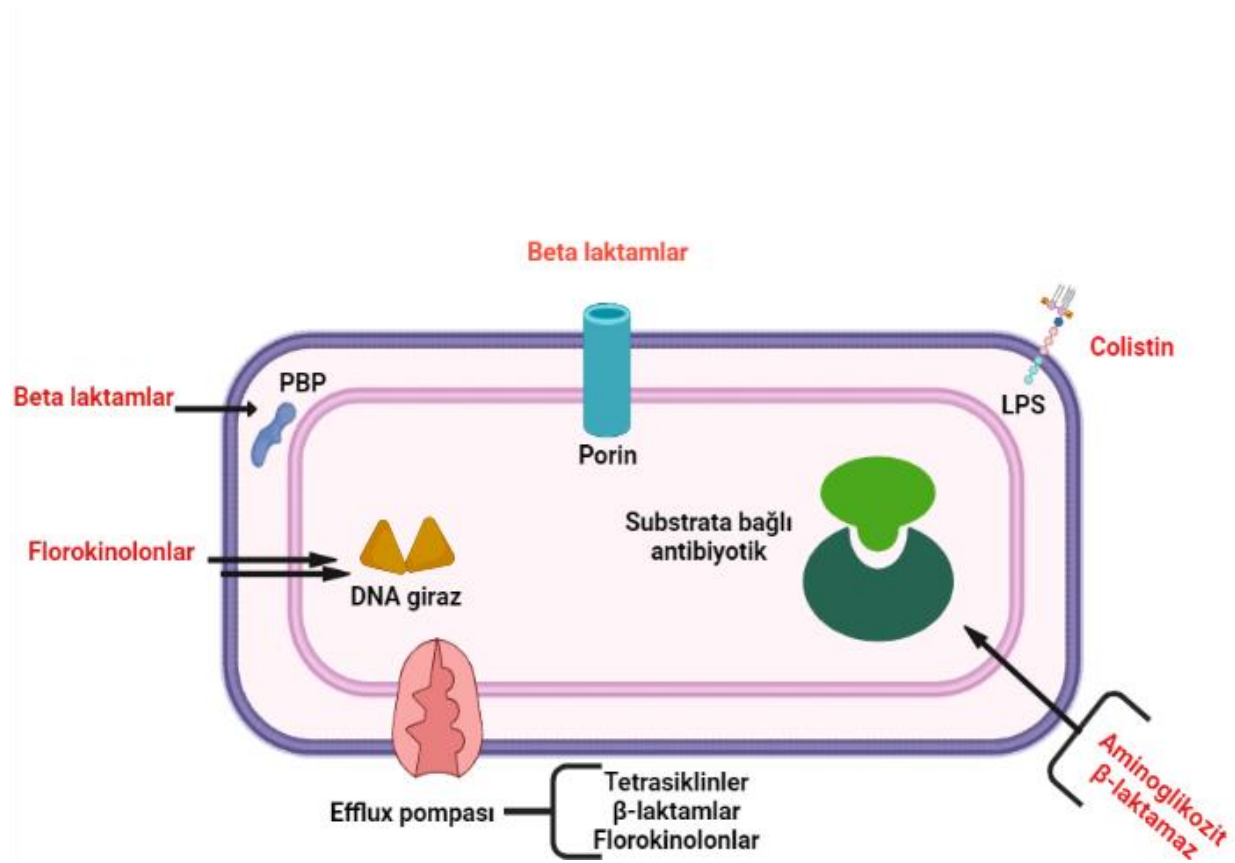
alternatif olabilecek β -laktamaz inhibitörü olan sulbaktam ise *A. baumannii*'in penisilin bağlayıcı proteinlere içsel afinitesi yoluyla *A. baumannii*'ye karşı doğrudan antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Wong ve arkadaşları, 2017). Sulbaktamın önemli bir dezavantajı, ortaya çıkan direncin yanı sıra, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde ampisilin ile kombinasyon halinde mevcut olması ve bu ajanın klinik kullanımına ilişkin daha fazla araştırma yapılmasının gerekliliğidir (Penwell ve arkadaşları, 2015).

Kombinasyon tedavisi, *A. baumannii* enfeksiyonlarında, ilaç duyarlılık testi sonuçları bilinmeden antibiyotik kapsamını artırmak, direnç riskini azaltmak ve hasta sonuçlarını iyileştirmek için bir strateji olarak sıklıkla kullanılır. Bununla birlikte, bu amaçlar için kullanımını destekleyecek kesin bir klinik veri yoktur ve insan deneylerinden elde edilen sonuçlar sınırlıdır (Garnacho-Montero ve arkadaşları, 2003). Örneğin, polimiksin B ile birlikte kullanılabilir ek bir ajanla (imipenem, meropenem, rifampin, ampisilin-sulbaktam veya diğerleri) tedavi, polimiksin B monoterapisinden daha düşük bir ölüm oranı ile ilişkilendirilmiştir (Rigatto ve arkadaşları, 2015). Kolistin ve rifampin kombinasyonunun mikrobiyal eradikasyon yeteneklerini arttırdığı bulunmuştur (Durante-Mangoni ve arkadaşları, 2013). Diğer kombinasyon rejimleri, sulbaktamın sefepim, meropenem, imipenem, amikasin veya rifampin kombinasyonu ile artan etkinliğini önermektedir (Spellberg & Bonomo, 2015). Alternatif kombinasyonlar arasında kolistin-tigesiklin ve kolistin-karbapenem tedavisi denenmiş ve belki de kolistin ve tigesiklin kombinasyonu en çok desteklenen kombinasyon olmuş ve birkaç çalışmada önerilmiştir (Shi, Lee, Park, Ko ve Eom, 2019). Ayrıca, yakın zamanda yapılan bir araştırma, kolistin ve vankomisin arasında dikkate değer bir sinerjik etkileşimin altını çizmiştir (Sertçelik ve arkadaşları, 2020).

2.12 *A. baumannii*'nin antibiyotik direnci

Halihazırda mevcut tüm antimikrobiyallere dirençli *A. baumannii* izolatları rapor edilmiştir (M. Falagas ve Karveli, 2007). *Acinetobacter* antimikrobiyal direncin hızlı gelişimi için uygun genetik yapıya sahiptir ve bu nedenle doğal bir dönüştürücü olarak bilinir. Bilimsel literatür en zorlu bakterilerden biri olduğunu belirten raporlarla doludur (L. Antunes ve arkadaşları, 2014). 1970'lerin başına kadar *Acinetobacter* enfeksiyonları ampisilin, karbenisilin, gentamisin ve nalidiksik asit ile monoterapi veya kombinasyon tedavisi olarak tedavi edilebilir durumda iken özellikle 1975'ten sonra yüksek direnç oranları fark edilmeye başlanmıştır (Antunes ve arkadaşları, 2014). Günümüzde üreidopenisilin, aminopenisilinler, dar spektrumlu ve hatta geniş spektrumlu

sefalosporin, tetrasiklin, kloramfenikol, sefoksitin gibi sefamisinler ve çoğu aminoglikozid gibi birçok değerli ilaç, asinetobakterlere karşı etkinliklerini kaybetmiştir (Sievert ve arkadaşları, 2013).



Şekil 2. *Acinetobacter baumannii*'nin antimikrobiyal ajanlara karşı çeşitli direnç mekanizmalarının şeması.

LPS = Lipopolysaccharide (Lipopolisakkarit); PBP = Penicillin-binding proteins (Penisilin bağlayıcı protein)

2.13 Kolistin (Polimiksin E)

Kolistin olarak da bilinen Polimiksin E, ilk olarak 1950'lerde tanıtılan polimiksin ailesine ait eski bir antibiyotiktir; böbrek fonksiyonu üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle kullanımı birçok ülke tarafından yasaklanmıştır (Hameed ve arkadaşları, 2019). Bununla birlikte, *A. baumannii*'de karbapenemler de dahil olmak üzere birden fazla antibiyotiğe karşı direncin hızla ortaya çıkması,

kolistin kullanımına olan ilgiyi yeniden canlandırmıştır. Günümüzde *A. baumannii*'in kolistin'e karşı da direnci artmaktadır (Lima ve arkadaşları, 2018).

A. baumannii'deki birincil kolistin direnç aşağıdaki mekanizmaları kromozomal olarak kodlanmıştır.

- (i) Yapısını değiştiren dış zarın lipid A'sına fosfoetanolamin (PetN) eklenmesi
- (ii) Lipid A sentezi için gerekli genlerin mutasyonu sonucu hedefin kaybolması
- (iii) Dış zar stabilitesi için gereken proteinlerin düşük ekspresyonu
- (iv) LPS sentez kofaktörlerinin eksik ifadesi (Lima ve arkadaşları, 2018).

Polimiksinler katyonik amfipatik bileşiklerdir ve başlangıçta LPS'nin negatif yüklü lipid A bileşeni ile etkileşime girerler. PetN gibi pozitif yüklü kalıntıların LPS'ye kontrollü eklenmesi, bakteri yüzeyindeki negatif yükü azaltır ve bu nedenle polimiksin ile LPS arasındaki etkileşimi sınırlar (Moffatt ve arkadaşları, 2019). *A. baumannii*'nin klinik izolatlarındaki Colistin direnci, pmrCAB operonundaki değişikliklerle ilişkilidir. PmrC'nin aşırı ekspresyonunu indükleyerek, lipid A'nın PetN ile modifikasyonuna ve kolistin direncine yol açar (Trebosc ve arkadaşları, 2019). *A. baumannii* suşları lipid A biyosentezindeki spontan mutasyonlar yoluyla polimiksinlere karşı oldukça dirençli hale gelebilir (Moffatt ve arkadaşları, 2010).

Son zamanlarda ek genlerin (lpsB, lptD ve vacJ) *A. baumannii*'deki polimiksin direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu genler akışkanlığı azaltır ve dış zarın ozmotik direncini artırır. Bu genlerin aşırı ekspresyon mutasyonlarında *A. baumannii*'de polimiksin direnci oluşur (Whitfield ve arkadaşları, 2014).

A. baumannii'deki polimiksinlere duyarlılık için biyotin seviyeleri esastır. Bir diğer deyişle Biotin seviyelerinin düşmesi kolistin direncini artırmaktadır. Şöyle ki; Biotin yağ asidi sentezinde hız sınırlayıcı bir aşamada yer alan lipid metabolizmasının bir ko-faktörüdür. Buna göre yüksek biyotin seviyeleri, kolistine karşı daha yüksek hassasiyetle artan lipid A sentezini teşvik eder. Öte yandan biyotin sentezi için gerekli genlerdeki mutasyonlar, kolistinin etkinliğini azaltır (Whitfield ve arkadaşları, 2014). Hood ve arkadaşları, biyotin biyosentezinde yer alan belirli bir lpsB lokusunun çıkarılmasının, *A. baumannii* 'da kolistin direncine neden olabileceğini göstermiştir (Hood ve arkadaşları, 2013).

A. baumannii'deki kolistine direnci başlangıçta hızlı dağılımını ve yayılmasını sınırlayan kromozomal kaynaklı dirençtir (Lima, 2018). *A.baumannii*'de kolistin direncinin iki farklı mekanizması karakterize edilmiştir. İlk mekanizma, lipid A biyosentetik yolunun tamamen inaktivasyonunu ve dış membran LPS'nin kaybını içerir. Bu yol, üç genden herhangi birinde (*lpxA*, *px* ve *lpxD*) silinmeler, nokta mutasyonları veya eklemeler ile etkisiz hale getirilebilir (Beceiro ve arkadaşları, 2014). Sonuç olarak, LPS ve kolistin arasındaki etkileşim, kolistin minimal inhibitör konsantrasyonlarında (MIC) bir artışa yol açarak önlenabilir. LPS inaktivasyonuna bağlı kolistin direnci, laboratuvar mutantlarında ve son klinik izolatlarda tanımlanmıştır (Beceiro ve ark., 2014). Kolistin direncinin ikinci mekanizmasına *PmrAB* iki bileşenli sistem aracılık eder. *PmrB*'deki mutasyonların, kolistine karşı hücre duyarlılığını 100 kattan fazla arttırdığı gösterilmiştir (Adams ve arkadaşları, 2009). Son zamanlarda, *Escherichia coli*'de plazmit aracılı bir kolistin direnç geni olan MCR-1 bildirilmiştir (Elnahriry ve arkadaşları, 2016).

A. baumannii enfeksiyonlarındaki kolistin direncindeki sorunun, potansiyel büyüklüğüne rağmen kolistin direncinin klinik, moleküler ve metabolomik özelliklerine ilişkin veriler yeterli değildir. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, kolistine karşı farklı duyarlılığa sahip *A. baumannii* suşlarının metabolomik profili hakkında kapsamlı bir fikir sağlamaktır.

2.14 Mikrobiyal Metabolomik literatürde

2.14.1 Çeşitli büyüme ortamlarında bakterilerin metabolomik yanıtı

Mikroorganizmalar büyüme sırasında çevrelerindeki karbon içeren bileşikleri katabolize ederek, uçucu bileşikler olarak metabolik yan ürünlerin bir alt kümesini serbest bırakırlar. Rees ve diğerleri tarafından yürütülen bir çalışmada büyüme ortamı ve uçucu bileşiklerin üretimi arasındaki ilişki, *Klebsiella pneumoniae* suşlarında uçucu metabolomun çekirdek ve ortama özgü bileşenlerini dört in vitro kültür ortamında büyüme yoluyla değerlendirmişlerdir. Dört zengin ortamdaki (Kalp beyin infüzyon agar, lizojen sıvısı, Mueller-Hinton buyyon ve triptik soya buyyon) sonuçlar aşağıdaki gibi bulunmuştur. Toplam 365 uçucu bileşik, tüm ortamlarda *K. pneumoniae* büyümesi ile ilişkilendirilmiştir, bunların 36'sı (%10) tüm yetiştirme ortamları için ortak ve 148'i (%41) tek bir ortama özeldi. Sonuçlar, *K. pneumoniae*'nin metabolik profilini belirlemede ortamın önemini göstermiştir (Rees ve arkadaşları, 2017).

2.14.2 Metabolizma üzerindeki antibiyotik etkisi (Birey veya kombinasyonları olarak)

Foschi ve ark, farklı direnç paternleri ile karakterize edilen birkaç *K. pneumoniae* suşunun metabolomunu analiz etmek için bir çalışma yürütmüştür. Çalışmaya Karbapenemaz negatif ve karbapenemaz pozitif suşlar dahil edilmiştir ve metabolik özellikleri bazal koşullarda değerlendirilmiştir. Ayrıca öldürücü olmayan meropenem konsantrasyonlarının, bakteri metabolizması üzerindeki etkisini değerlendirmek için 4 vahşi tip suş ve 4 karbapenemaz üreticisi suş rastgele olarak seçilmiştir. Metabolomik analiz, hem filtrelenmiş süpernatantlar hem de hücre lizatları üzerinde NMR spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Hücre içi ve hücre dışı metabolomda sırasıyla toplam 40 ve 20 molekül ölçülmüştür. Bazal koşullarda beş metabolit, karbapenemaz pozitif ve negatif suşlar arasında önemli farklılıklar gösterirken, meropenem kullanımının tüm bakteri metabolizması üzerinde derin bir etkisi gözlenmiştir. Hücre içi bölmede, farklı taşıma metabolitlerinde ve organik asitlerde (örn. format, asetat, izobütirat) bir azalma fark edilirken, hücre dışı metabolomda çeşitli organik asitlerin (örn. süksinat, asetat, format, laktat) seviyeleri farklılık göstermiştir. Karbapenemaz pozitif ve negatif suşlar, bozulan metabolitlerin sayısı ve türü açısından meropeneme farklı tepki vermiştir. Vahşi tip suşlarda, meropenem metan, alanin, aspartat ve glutamat metabolizması ile ilgili metabolik yollar üzerinde büyük bir etkiye sahipken, karbapenemaz üreticilerinde bu etki piruvat metabolizması üzerinde yoğunlaşmıştır (Foschi ve arkadaşları, 2018).

Geçmiş yıllarda yapılan bir çalışmada kolistin/doripenem kombinasyonunun *A. baumannii* metabolomu üzerindeki sinerjik etkisi araştırılmıştır. Metabolit seviyeleri, tek başına kolistin (2mg/L) veya doripenem (25mg/L) ve bunların kombinasyonu ile 15 dakika, 1 saat ve 4 saatte (n=4) tedaviyi takiben LC-MS kullanılarak ölçüldü. Kolistin, gliserofosfolipidlerin ve yağ asitlerinin bozulması yoluyla bakteri dış zarının ve hücre duvarının erken (15 dakika ve 1 saat) hasarına neden olmuştur. Tek başına doripenem ise etki mekanizmasını yansıtacak şekilde, peptidoglikan biyosentez metabolitlerinin konsantrasyonlarını 4 saatte azaltmıştır. Kolistin/doripenem kombinasyonu, her iki monoterapiye göre daha önemli metabolik yollarda önemli değişikliklere neden olmuştur. Hücre duvarı biyosentezinin (D-sedoheptuloz 7-fosfat yoluyla) ve nükleotid metabolizmasının (D-riboz 5-fosfat yoluyla) aşağı regülasyonu, pentoz fosfat yolunda başlangıçta kolistin (15 dakika ve 1 saat) ve daha sonra doripenem tarafından indüklenen hasarla ilişkilendirilmiştir. Kombinasyonun farklı anahtar metabolik yolların zamana bağlı

inhibisyonu yoluyla *A. baumannii*'yi sinerjik olarak öldürdüğünü keşfetmişlerdir (Maifiah ve arkadaşları, 2017).

Bir başka karşılaştırmalı Metabolomik çalışma, kolistin ve sulbaktam kombinasyonunun ÇİD *A. baumannii*'ye karşı sinerjik etkisi ile ilişkili anahtar yolları ortaya koymaktadır. kolistin-sulbaktam kombinasyonunun sinerjistik aktivitesi başlangıçta kolistin tarafından 1 saatte yağ asidi ve fosfolipid seviyelerinin bozulması yoluyla yönlendirilmiştir. Hücre duvarı biyosentezi, tek başına sulbaktam ve kombinasyon ile 24 saat boyunca bozulmuştur. İki önemli öncünün, üridin difosfat-N-asetilglukozamin ve üridin difosfat-N-asetilmuramatın azalmış seviyeleri ile birlikte bozulmuş lizin ve amino şeker metabolizması ortaya çıkmıştır. Ayrıca tek başına sulbaktam ve kombinasyon, nükleotid metabolizmasını ve ilişkili arginin biyosentezini, glutamat metabolizmasını ve pentoz fosfat yolunu önemli ölçüde tüketmiştir. Colistin-sulbaktam kombinasyonunun amino asit ve nükleotid seviyelerini her iki monoterapiye kıyasla 4 saatte daha dramatik bir şekilde azalttığı bulunmuştur. Kolistin ve sulbaktamın *A. baumannii*'ye karşı zamana bağlı sinerjistik aktivitesi, hücre duvarı biyosentezinin inhibisyonu yoluyla büyük ölçüde sulbaktam tarafından yönlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarının hastalarda sinerjik kolistin kombinasyonlarını optimize etmeye yardımcı olabileceği belirtilmiştir (Han ve diğerleri, 2019).

2.14.3 Virulan ve avirulan suşlar arasındaki fark

Bakteriler küçük molekülü sekonder metabolitler tarafından şekillendirilen, önemli genomik ve fenotipik çeşitlilik gösterir. Virülans fenotiplerinin ayrımı, patojenlerin teşhisi ve prognozu ile oldukça ilgilidir. Önceki bir çalışmada *Pseudomonas aeruginosa*'nın virulan ve avirulan klinik suşları arasında ayrım yapmak için Hedefsiz LC-MS metabolomikleri uygulanmıştır. Klinik suşlar, virülans ve biyofilm fenotipi açısından karakterize edilen standart koşullar altında test edilerek metabolomları hedefsiz LC-MS ile araştırılmıştır. Veriler hem bireysel aday belirteçler için çıkarılmış, hem de metabolomik verilerden virülans fenotipini çıkarmak yoluyla istatistiksel modeller oluşturmak için kullanılmıştır.

Virülansları ve biyofilm fenotipleri bakımından farklılık gösteren klinik suşların (*P. aeruginosa*) metabolomlarında, her iki yönde de 1.5'ten büyük kat değişiklikleriyle önemli ölçüde farklı şekilde bol olan 332 metabolit için belirgin bir farklılık olduğunu bulunmuştur. Ramnolipidler, alkil kinolonlar veya fenazinler gibi virülansla ilişkili önemli sekonder metabolitlerin, virulent suşlarda güçlü bir şekilde yukarı regüle edildiği bulunmuştur. Buna

karşılık, birincil metabolizmada çok az değişiklik gözlemlenmiştir. Araştırmacıların bulguları, hedeflenmemiş metabolomiklerin *P. aeruginosa* virülansını karakterize etmek ve klinik olarak önemli fenotipik özellikler ile bakteriyel metabolom arasındaki karşılıklı ilişkileri araştırmak için değerli bir araç olduğunu göstermektedir (Depke ve arkadaşları, 2020).

2.14.4 Bağırsak Mikrobiyota Profili

Bağırsak mikrobiyotası, mikrop seçiminde ve metabolik bir sinyal ağının inşasında önemli bir rol oynayan, çok miktarda bileşik üreten çok sayıda farklı bakteriden oluşur. Mikrobiyal aktiviteler, konak metabolomunu ve insan sağlığını etkileyen çok sayıda bileşiğin oluşumuna yol açan çevresel uyarılardan etkilenir. Gerçekten de, bağırsak mikrobiyotasıyla ilgili metabolit profilleri, yaşam tarzı ve diyet faktörlerinin kronik ve akut hastalıklar üzerindeki etkisi hakkında geniş bilgiler sağlayabilir. Bağırsak mikrobiyotasıyla ilgili araştırmalardaki metabolomik çalışmalar, beslenme ve kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesine potansiyel olarak uygulanabilir. Anlamlı hipotezlerin geliştirilmesine yol açabilecek yeni biyobelirteçlerin üretilmesine odaklanan çalışmalar artmaktadır (Vernocchi ve arkadaşları, 2016).

2.14.5 Biyofilm

Patojen bir mikroorganizma biyofilm oluşturuyorsa, neden olduğu hastalıkların tedavisi zor olabilir. Biyofilm oluşumunun morfolojisi, fizyolojisi ve genomu üzerine onlarca yıl süren kapsamlı araştırmalardan yapılmıştır. Özellikle son yıllarda, bir planktonik hücrenin bir biyofilme dönüşümünü anlamak için dikkatler hücresel metabolomun analizine yönelmiştir. Metabolomik, biyofilmlerin yapısı, oluşumu ve antibiyotik direnci ile ilgili temel biyolojik süreçleri anlamamız için paha biçilmez bir rol oynayabilir (Zhang ve arkadaşları, 2012).

Biyofilm oluşumunun karmaşıklığının, planktonik hücrelerden biyofilme geçişte çeşitli çevresel faktörlerin yanı sıra etanol, oleik asit, glukoz, UDP-N-asetilglukozamin gibi spesifik bileşiklerin varlığından etkilenmesine bağlanabileceği literatürde belirtilmektedir (Knobloch, 2001; Campbell, 1983; Mack, 1992; Gerke, 1998).

2.14.6 Antibiyotiklere bakteriyel yanıt

Metabolomik araçlar, ilaca dirençli bakteriler hakkında ek bilgi veren biyokimyasal yollardaki düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin akışının gözlemlenmesine yardımcı olabilir.

Mielko ve ark. antibiyotiklere duyarlı ve dirençli olmak üzere iki *P. aeruginosa* suşunun metabolizmalarını karşılaştırmışlardır. Analiz hem hücre içi hem de hücre dışı metabolitler üzerinde yapılmıştır. Çalışmada NMR yöntemi, çok değişkenli ve tek değişkenli veri analizi ile birlikte kullanılmıştır ve ayrıca FELLA paketi ile metabolik yolların analizi yapılmıştır. Sonuçlar, antibiyotiklere dirençli ve antibiyotiklere duyarlı suşların *P. aeruginosa* metabolizmasındaki farklılıkları ortaya koymuştur ve farklı antibiyotik türleri için *P. aeruginosa* yanıtı hakkında doğrudan moleküler bilgi sağlamıştır. En önemli farklılıklar, amino asit metabolizmadaki sentez yollarında bulunmuştur (Mielko ve arkadaşları, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu tanımlayıcı bir kesitsel çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yapıldığı Yeri

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesinde yapıldı.

3.3 Araştırmanın Evreni

İdrar, kan, enfekte yaralar ve balgamdan elde edilen *A. baumannii*'nin klinik izolatları.

3.4 Araştırmanın Etik Yönü

Çalışmamız Helsinki Deklarasyonu Prensiplerine uygun olarak yapılmıştır. Ayrıca bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İnvaziv Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 19.08.2021 tarih ve 2021-08/35 karar numarası ile etik kurulu onayı alındı.

3.5 Örnek boyutu

Toplam 18 klinik izolat (9 duyarlı suş ve 9 dirençli suş) test edildi. LC-MS analizlerinin toplam sayısı iki modda ayrı ayrı ölçülür: Negatif iyonizasyon modu (-ESI) ve pozitif iyonizasyon modu (+ESI). Nihai örneklem büyüklüğü $18 \times 2 = 36$ olmuştur (Cech & Enke, 2001).

3.6 Dahil edilme kriterleri

Tüm *A. baumani* izolatları dahil edildi.

3.7 Dışlama kriterleri

A. baumani dışındaki organizmalar.

3.8 Tür Teyidi

Bruker Microflex' LT MALDI-TOF MS cihazı ve flexControl 3.0 yazılımı (Bruker Almanya, ABD) ve MALDI Biotyper® 3.0 yazılımı.

Mikroorganizma tanımlaması için optimize edilmiş uygun yöntem ile 2.000-20.000 Da kütle aralığında lineer pozitif iyon modunda ölçümler yapıldı. İyon kaynağı olarak 340 nm'de 60 Hz nitrojen lazer kullanıldı. Spektrumları elde etmek için her numunenin ölçümünde toplam 240 adet olmak üzere 40 paketten oluşan lazer darbeleri gerçekleştirildi. Sistem ölçüm sonuçlarına göre 0-3 arasında puan verir. Üreticiye firma önerileri doğrultusunda 1,7'nin altındaki puan değerleri güvenilirlik seviyesini geçemedi ve 1,7 ile 2,0 arasındaki puan değerleri cins düzeyinde güvenilirlikti. 2,0 ile 3,0 arasındaki puan değerleri ise hem cins hem de tür seviyelerinde güvenilirlikti. Suşlar ayrıca BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, Sparks, ABD) cihazında antimikrobiyal duyarlılık incelemesine alındı. Antimikrobiyal duyarlılık değerlendirmesi, ilgili döneme ait Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST) rehberlerinde yer alan öneriler doğrultusunda yapıldı (EUCAST, 2021).

3.9 Bakteri kültürü hazırlama

Dondurulmuş stoktan alınarak ve 16–18 saat 37 °C'de inkübe edilerek bir besleyici agara üretildi. Besleyici agarda üretilen bakteriden bir koloni 15mL Mueller Hinton buyyon'ye bir gece inkübe edildi. Başlangıç inokulumunu $\sim 10^8$ cfu/mL elde etmek için optik yoğunluk 600nm'de (OD600) ~ 0.5 olarak ayarlandı (Lingwood ve Simons, 2010).

3.10 Hücresel metabolit ekstraktlarının hazırlanması

A. baumannii'nin hücresel metabolitleri, hafif modifikasyonlarla önceden optimize edilmiş yöntemle ekstrakte edildi. 15 mL bakteri kültürü toplandı ve hemen buz üzerine aktarıldı. Tüm numuneler hızlı bir şekilde kuru buz/etanol banyosunda korundu ve sonraki tüm adımlar için buz üzerinde gerçekleştirildi. Numuneler 10 dakika 3,220g'de 4°C'de santrifüjlendi. Süpernatantlar 0.22 µm'lik bir membran filtreden hızla süzüldü ve 10 µL süpernatant 250 µL kloroform:metanol:su (1:3:1 v/v) ile karıştırıldı ve 14.000 g'de 10 dakika 4°C'de santrifüjlendi ve LC-MS analizi için partikülsüz süpernatant toplandı.

Blank numune, sadece IS'leri içeren bir mobil faz karışımı ile hazırlanmıştır. Ayrıca, sistem kararlılığını ve performansını sağlamak için her numuneden 5 µL ekstrakte edilmiş çözelti karıştırılarak kalite kontrol (Quality control QC) numuneleri hazırlandı. Alet veya ortamdan

herhangi bir etkileşimi gözlemlemek için boş numune enjekte edildi. Analizler numune hazırlandıktan hemen sonra yapıldı (Lingwood ve Simons, 2010).

3.11 Metabolitlerin LC-MS analizi

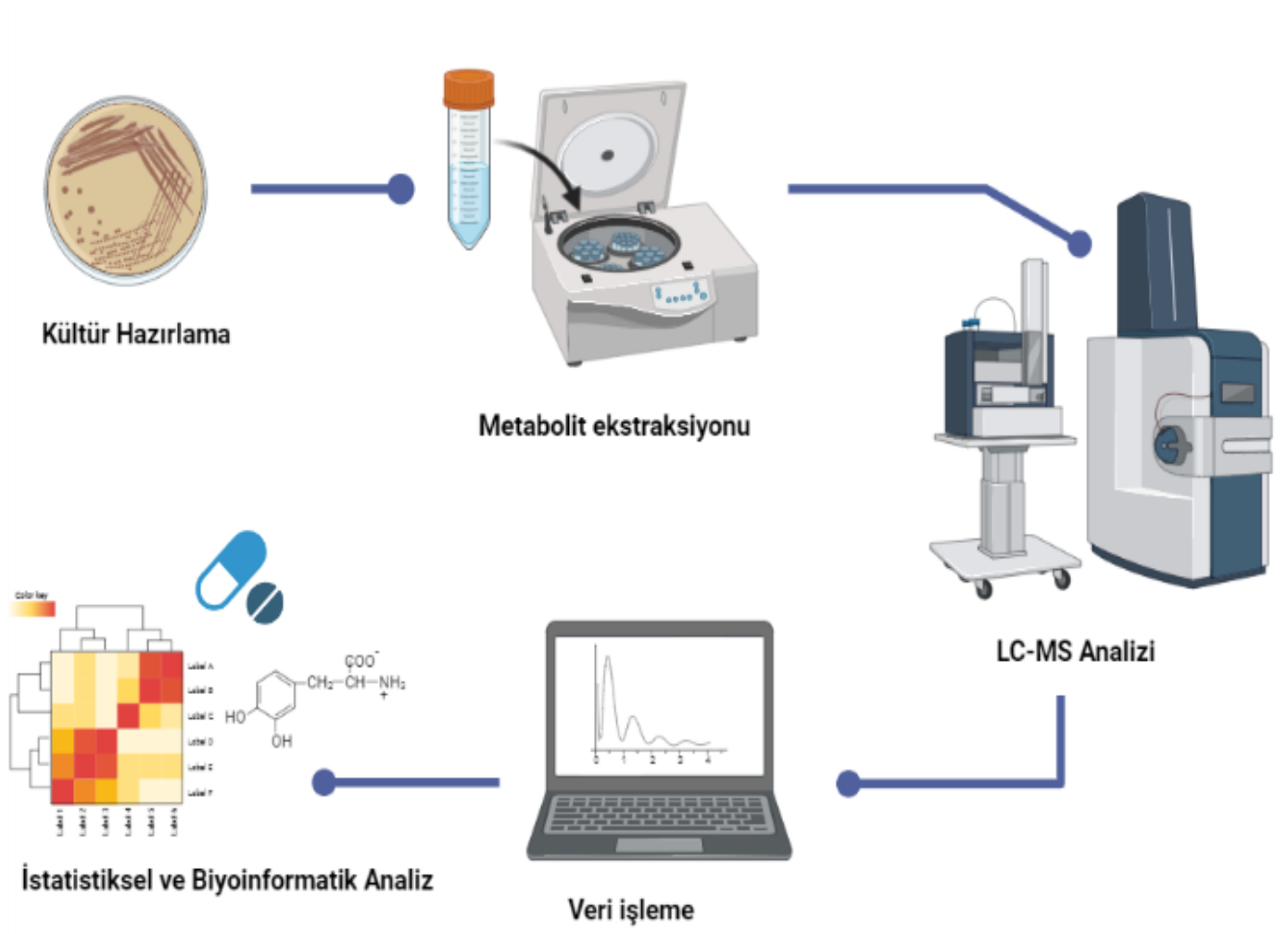
LC/Q-TOF/MS sistemi, Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF kütle spektrometresi (Agilent, ABD) ve ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 95Å, 2.1 x 100 mm, 1.8 kolon ile birleştirilmiş Agilent 1290 Infinity LC sisteminden oluşuyordu. (Agilent, ABD). Mobil faz sistemi, su (A) ve asetonitril (B) içinde aşağıdaki gibi bir gradyan elüsyonu kullanılarak %0.1 formik asitten oluşturuldu: Toplam 12 dakikalık çalışma süresinde gradyan elüsyonu için 0.4 mL/dk'lık bir mobil faz akış hızı kullanıldı. Akış: 0–0.5 dakika, %2 B; 0,5-4 dakika, %20 B; 4-8 dakika, %50 B; 4-6 dakika, %95 B; 8-9 dakika, %95 B; 9-9.25 dk %2 B ve 9.25-12 dk, kolonun dengelenmesi için %2 B. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 55 °C'ye ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 4.0 uL idi. Tarama modunda kütle aralığı 50-1000 m/z arasındaydı. Kapiler voltaj 3.5 kV idi İyon kaynağı Elektron Püskürtme İyonizasyonu (ESI) idi. MS absorbans eşiği 2000'e ayarlanmıştır. Gazı sıcaklığı 350 °C; gazı akışı, 11 L/dak; nebulizatör, 40 psi olarak ayarkandı. Voltaj 275V idi. Tüm numuneler ve kalite kontroller bu yöntem kullanılarak analiz edilmiştir (Sawyer ve arkadaşları, 2015).

3.12 LC-MS/MS analizi

Kalite kontrol numuneleri MS/MS yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kromatografik koşullar, Q-TOF MS analizindeki ile aynıydı. Çarpışma enerjisi 10V olarak ayarlandı. Yinelenen- Veriye Bağlı Toplama (I-DDA) iş akışı takip edildi. Öncüler için kütle aralıkları 50-270, 270-500, 500-750 ve 750-1000 m/z olarak düzenlendi (Doménech, 2020).

3.13 Veri işleme, biyoinformatik ve istatistiksel analizler

LC-MS/MS verilerinin alınması için Agilent MassHunter toplama yazılımı (B.08.00, Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Veri ön işleme, normalleştirme, görselleştirme ve tepe hizalaması, XCMS ve Agilent Mass profiler Proffesional yazılımı (G3835-64000, Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) (Dossin) kullanılarak gerçekleştirildi. Tanımlanan metabolitlerin açıklamaları MetaboAnalyst 5.0 yazılımı (Pang ve diğerleri, 2021) ve KEGG (Kyoto genlerin ve genomların ansiklopedisi) (Kanehisa ve arkadaşları, 2007) aracılığıyla yapıldı. Ayrıca, yol analizi için çevrimiçi yazılımlardan ve veritabanlarından yararlanıldı. Bu veri tabanları şunları içermektedir: PubChem (Kim ve arkadaşları, 2019), MetaCyc (Caspi ve arkadaşları, 2020), ChEBI (Hastings ve arkadaşları, 2016).



Şekil 2. Çalışmanın iş akışı

4. BULGULAR

4.1 Mass Hunter Profesyonel Sonuçları

A. baumannii'deki virölansla ilişkili sekonder metabolitlerin tüm ana gruplarını tek bir LC-MS yönteminde tespit edilebilmesi aşağıda ayrıntılarını belirteceğimiz şekilde *A. baumannii* virülansı ve ilaç direnci ile ilgili metabolomik düzeyinde bilgiler sağlamaktadır.

Pozitif polarite modu için keşif veri seti, 167'sinin yapısal olarak açıklamalı olduğu 1313 komponent içeriyordu. 68 metabolit, her iki yönde 1.5'ten büyük kat değişiklikleriyle ve Benjamini-Hochberg tarafından düzeltilmiş p değeri 0.05'ten küçük olduğunda, önemli ölçüde farklıydı. Negatif polarite modu, 56'sının yapısal olarak açıklamalı olduğu ve 61 komponent içermekte idi. Colistin'e duyarlı ve kolistin dirençli suşlar arasında önemli ölçüde farklı olan 24 metabolit (Her iki yönde 1.5'ten büyük kat değişiklikleriyle ve Benjamini-Hochberg tarafından düzeltilmiş p değeri 0.05'ten küçük olduğunda) tespit edilmiştir (Tablo 1 ve 2).

Genel olarak, tanımlanan metabolitlerin 15'i (%24) lipit, 6'sı (%10) peptit, 14'ü (%22) karbonhidrat, 11'i (%18) fitokimyasal idi. 17'si ise (%26) çeşitli metabolitlerden (benzopiranlar, karotenoidler, kinonlar, karotenler) oluşuyordu (Şekil 3).

Tablo 1. Önemli ölçüde farklı tanımlanmış metabolitlerin listesi (Pozitif Mod)

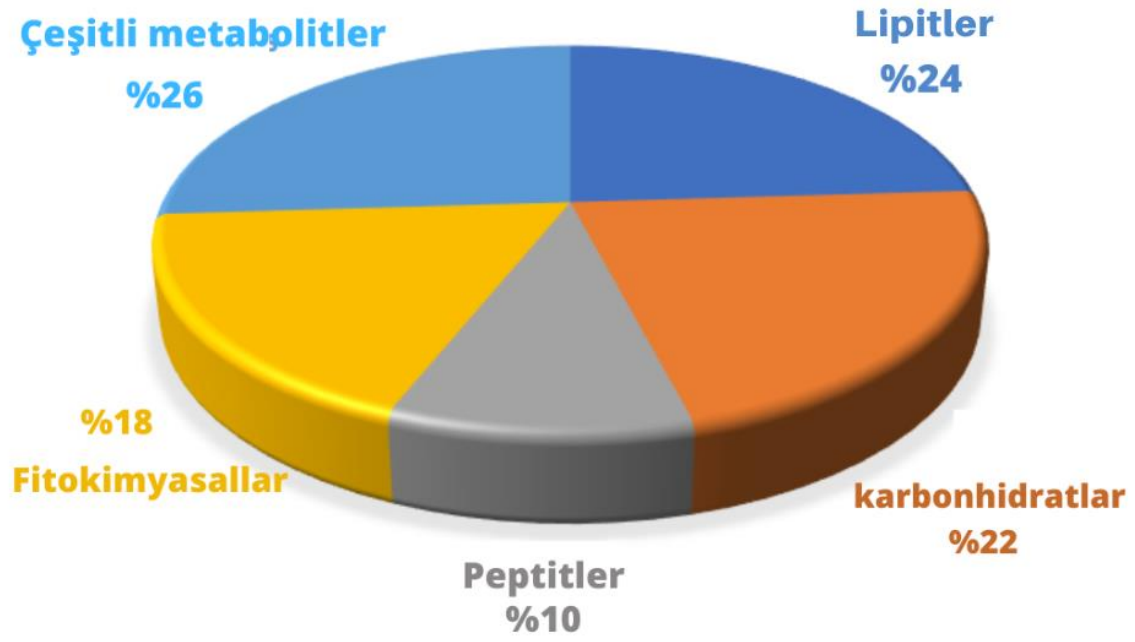
KEGG ID	HMDB ID	Compound	Exact Mass	Log FC	M/Z	Retention Time	P-value	Regulation
NA	HMDB38633	(-)-3-Cyanomethyl-3-hydroxy-1H-indol-2(3H)-one	188.0575	-0.16896594	211.0486	188.05	5.02E-23	down
C08286	NA	(+)-gamma-Hydroxy-L-homoarginine	204.1221	-0.16821712	205.1313	5.68	2.99E-25	down
C19769	NA	1,6-Anhydro-N-acetyl-beta-muramate	275.0995	1.2842257	293.1357	8.06	2.99E-25	up
NA	HMDB40405	26-Glucosyl-1,3,11,22-tetrahydroxyergosta-5,24-dien-26-oate	638.3637	-4.6820855	661.361	6.61	2.89E-07	down
C15202	NA	2'-Chloro-4-biphenylol	204.0320	-0.16166449	227.0232	8.35	8.60E-15	down
C15976	HMDB06866	2-Methyl-1-hydroxypropyl-ThPP	497.1014238	0.1306957	520.0938	9.47	8.60E-15	up
NA	HMDB38565	3'-N-Acetyl-4'-O-(14-methylheptadecanoyl)fusarochromanone	600.4110	4.663839	601.4234	6.34	1.00E-06	up
C14237	NA	4-[2,2-Dichloro-1-(4-methoxyphenyl)ethenyl]phenol	294.0196	1.6436332	295.0292	5.81	0.002554966	up
NA	HMDB36242	4-O-alpha-L-Rhamnopyranosylglucosinalbin	571.0985	5.0671387	572.1145	6.42	6.50E-23	up
C11667	NA	8-epi-11-Hydroxyiridodial glucoside pentaacetate	556.2152	5.6722574	574.254	5.88	7.24E-28	up
NA	HMDB39479	Acetylsoyasaponin A3	1244.5878	5.078142	623.2995	6.53	1.55E-26	up
NA	HMDB40791	Acrimarine N	557.2009	-3.6805296	575.2365	5.87	4.09E-04	down
NA	HMDB31164	Acutoside B	1190.6096	-0.73897433	596.3148	6.51	0.009183321	down
C15750	NA	Aeruginopeptin 917S-C	1022.5290	0.5474852	1023.5448	7.12	3.61E-04	up
C07773	HMDB15254	Ambenonium	536.2660	-5.6066294	537.2795	5.83	1.45E-29	down
C08607	HMDB36874	Amiodarone	645.0197	-3.6149573	668.0141	7.17	0.00179014	down
C08927	NA	Avenacin B-2	1048.5304	3.9604464	525.2676	6.46	6.13E-05	up
C11963	NA	Avermectin B1b aglycone	570.31609	-5.3630447	571.3317	6.45	1.99E-08	down
C00825	NA	Becanamycin	483.2513	0.0109483	501.29	6.07	7.32E-29	up
C21273	NA	Benfluralin	335.1098	-0.14024961	168.5634	5.37	1.77E-17	down
NA	HMDB36287	Campesteryl linoleate	662.5968	-0.1689995	680.6382	6.40	2.86E-25	down
C06882	HMDB15423	Cefonicid	542.0333	5.275524	543.0459	6.13	2.67E-20	up
C11203	NA	Cefozopran	516.0830	-0.17552996	539.0756	6.41	1.54E-20	down
NA	HMDB40604	Cicerin 7-(6-malonylglucoside)	578.1250	-4.950845	579.1324	5.88	3.87E-07	down
C06909	NA	Cidofovir	279.0599	-3.9778347	302.0513	8.8362	6.41E-05	down
NA	HMDB32823	Corchoroside A	698.3508	-0.03209871	716.3896	5.51	1.71E-24	down
C11817	NA	Deoxytubulosine	459.2875	-0.78889036	482.28	6.21	1.60E-05	down
C11669	NA	Deutzioside pentaacetate	556.1785	-2.9280314	579.171	5.17	0.001261142	down
NA	HMDB39458	Di-2-propenyl heptasulfide	305.8801	4.236305	634.7496	6.36	1.35E-05	up
C01023	NA	Dihydrostreptomycin	583.2839	-0.1861574	584.2847	6.88	6.72E-15	down
C12981	NA	dl-alpha-Tocopherol nicotinate	535.4001	5.211487	536.4137	6.39	7.94E-27	up

C12011	NA	DMG-MINO	557.2460	5.164558	580.2419	8.54	1.04E-23	up
C01348	NA	dXTP	507.9754	0.0816077	526.0141	8.69	7.89E-19	up
C01348	NA	dXTP Esi+8.616	507.9770	5.137422	526.0149	8.61	3.32E-10	up
NA	HMDB41885	ebrotidine	475.9767	-0.1665439	498.968	6.06	2.07E-25	down
C18506	NA	Furamethrin	286.1551	-0.1670863	287.1652	8.26	2.75E-24	down
NA	HMDB31124	Glycerol 1,2-didodecanoate 3-tetradecanoate	666.5781	-0.1765297	684.6173	6.69	2.60E-18	down
NA	HMDB40537	Kaempferol 3-(2",3"-diacetyl-4"-p-coumaroylrhamnoside)	662.1626	-5.2851195	685.1523	6.25	1.86E-29	down
NA	HMDB29265	Kaempferol 3-O-sinapoyl-caffeoyl-sophoroside 7-O-glucoside	1140.2901	-4.0564413	588.1802	8.41	6.26E-05	down
C18823	NA	Landomycin B	972.3999	5.1769466	487.2055	6.22	3.95E-27	up
C04230	HMDB10379	LysoPC(14:0)	468.3069	-4.332945	486.345	6.42	2.15E-06	down
NA	HMDB14560	Metocurine Iodide	650.3345	2.6289172	651.3473	8.27	0.002216928	up
NA	HMDB35697	Momordicoside E	696.4051	2.770618	697.4181	7.05	4.28E-05	up
NA	HMDB00793	Monoiodothyronine	398.9932	5.0207376	400.0039	5.93	0.002148062	up
NA	HMDB30559	m-Trigallic acid	474.0440	-0.17130733	492.0798	6.05	2.21E-26	down
C18070		N1,N5,N10-Tricaffeoyl spermidine	631.2502	4.8688207	649.2912	8.00	1.66E-21	up
	HMDB40820	Nb-Pentacosanoyltryptamine	524.4676	-0.17154235	542.5015	6.39	1.21E-13	down
C08607	NA	Neurosporaxanthin	564.3962	-3.2180321	283.2073	5.23	5.39E-25	down
NA	HMDB02235	O-6-deoxy-aL-galactopyranosyl-(1-2)-ObD-galactopyranosyl-(1-3)-2-(acetylamino)-1,5-anhydro-2-deoxy-D-arabino-Hex-1-enitol	511.1865	0.043729722	529.2283	6.46	2.49E-04	up
NA	HMDB34038	Palmidin A	510.1277	-3.3387337	1043.2448	7.31	4.82E-04	down
C06606	HMDB13035	Paraoxon	275.0561	-5.666149	298.0472	0.77	4.56E-30	down
C06606	HMDB13035	Paraoxon Esi+3.5160003	275.0563	-5.5287247	298.0472	3.51	1.05E-30	down
C15967	NA	Phoenicoxanthin/ Adonirubin/ 3-Hydroxycanthaxanthin	580.3877	-0.18200725	581.407	6.42	4.13E-04	down
NA	HMDB30129	Plastoquinone 8	680.5517	-0.17184395	703.5409	7.16	2.04E-11	down
C13745	NA	Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid	510.9754	5.2947216	549.9397	6.47	4.45E-25	up
NA	HMDB42005	Quinaprilat	410.1855	5.12922	433.1733	5.60	2.86E-08	up
C19701	NA	Rebeccamycin	569.0730	-0.16907656	587.1123	6.46	6.44E-25	down
C06540	HMDB15311	Rescinnamine	634.2879	-0.17257774	652.3262	9.74	4.99E-24	down
NA	HMDB32503	Silica aerogel	438.1046	-4.063344	439.1109	6.1	1.32E-20	down
NA	HMDB32739	S-Methyl methanesulfinothioate	109.9859	-5.3238096	132.9761	6.337	5.15E-05	down
C18023	NA	Sophoraflavanone B	340.1305	5.381953	363.1174	5.50	2.09E-28	up
NA	HMDB37470	Spinacetin 3-rutinoside	654.1774	-5.2540216	672.2175	6.62	5.82E-26	down
C08459	NA	Stearolic acid	280.2414	-0.16018176	281.2503	0.77	7.94E-27	down

C08080	HMDB14396	Terconazole	531.1760	-5.2371025	554.1727	6.40	6.35E-26	down
C08459	HMDB05047	trans- Δ^2 -11-methyl-Dodecenoic Acid	280.2414	-5.516754	281.2503	0.77	2.19E-08	down
NA	HMDB35888	Tyromycic acid	452.3269	5.347106	470.3649	6.02	8.38E-24	up
NA	NA	Verproside	498.1365	4.862042	521.1309	8.61	2.65E-27	up
C16276	NA	ϵ -Carotene	536.4374	-0.21110904	537.4447	6.68	7.55E-07	down

Tablo 2. Önemli ölçüde farklı tanımlanmış metabolitlerin listesi (Negatif Mod)

KEGG ID	HMDB ID	Compound	Exact Mass	M/Z	Log FC	Retention Time	p-value	FC	Regulation
NA	NA	Doisynoestrol	298.1592	297.1525	1.0517602	9.87	0.02413994	2.1	up
NA	HMDB41201	Panaquinquecol 7	276.1727	275.1655	-1.3112862	7.6	0.004493823	-2.5	down
C06882	NA	Tetradecyl sulfate	294.1880	353.2019	-1.2757385	9.40	0.022632668	-2.4	down
NA	HMDB32879	all-trans-Carophyll yellow	460.3325	505.3306	3.5024662	8.99	3.48E-04	-3.0	down
NA	HMDB34909	7-Methyl-1,4,5-naphthalenetriol 4-[xylosyl-(1-6)-glucoside]	484.1602	241.0728	-1.6104231	9.98	1.91E-07	24.8	up
NA	HMDB15662	Fosaprepitant	614.1185	673.132	4.6357336	7.03	0.04423952	-3.7	down
NA	HMDB33703	Coroloside	666.3622	332.1741	-1.0915761	9.88	1.23E-08	-42.5	down
NA	HMDB32879	all-trans-Carophyll yellow Esi-9.082188	460.3371	505.3353	3.3125963	9.08	0.002661217	-13.5	down
C09123	NA	Athamantin	430.2005	429.1935	-1.922447	8.87	5.00E-04	-13.7	down
C09622	NA	Botrydial	310.1813	309.174	-5.410754	8.70	1.58E-15	-1.2	down
C11166	HMDB05004	Lauryl hydrogen sulfate	266.1552	265.148	-5.3967495	6.676	1.80E-18	-1.2	down

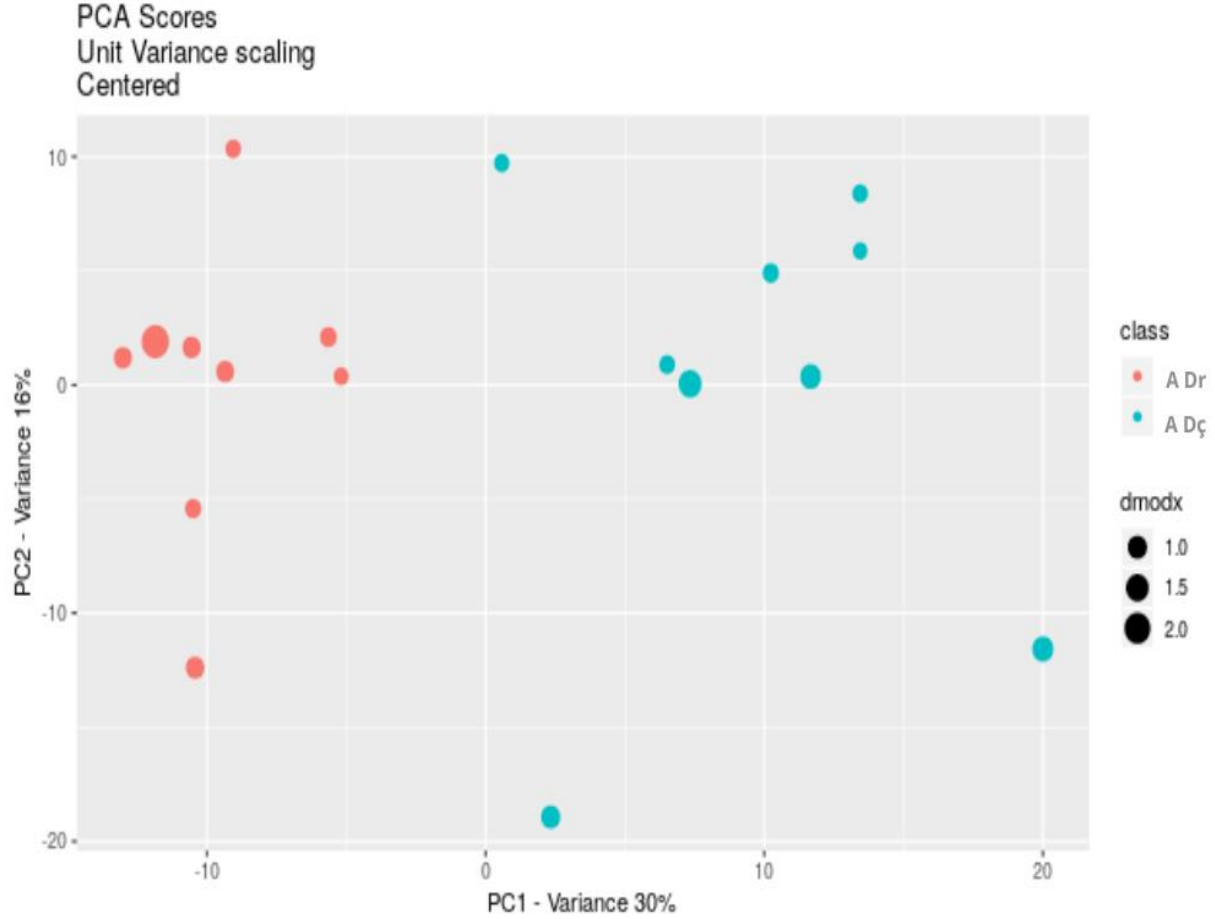


Şekil 3. Tanımlanan metabolitlerin sınıfları

4.2 Test edilen *A. baumannii* Suşlarının metabolik profilleri

Hedeflenmemiş metabolomik veri setindeki genel varyasyon (algılanan tüm sinyallere göre normalleştirme ve filtrelemeden sonra gruplar arasındaki ve gruplar içindeki sinyal bolluklarının farklılıkları) PCA kullanılarak değerlendirilmiştir. Denetimsiz bir yöntem olarak PCA sınıf bilgilerini kullanmaz, böylece numune grupları arasındaki ayrımı değerlendirirken olası yanlılığı önler. Yalnızca tanımlanmış metabolitleri dikkate alan bir PCA puanları grafiği, test edilen gruplar arasında iyi bir ayrım sağlamaktadır (Yang, 2019). Verilerimize ait PCA puanları grafiği Şekil 3'de verilmiştir.





Şekil 1. Temel bileşen analizi puan grafiği. Keşif veri setindeki tüm örnekler, değişkenlerin merkezlenmesi ve döndürülmesiyle bir temel bileşenler analizine tabi tutulmuştur. Numuneler, koordinatlar olarak ana bileşenler 1 ve 2 kullanılarak çizildi. Grupların iyi bir ayrımı, ağırlıklı olarak veri setindeki varyasyonun %30'unu açıklayan ana bileşen 1'de görülebilir.

A Dr: Kolistine duyarlı *Acinetobacter baumannii*

A Dç: Kolistine dirençli *Acinetobacter baumannii*

5. TARTIŞMA

A. baumannii'nin küresel yayılımı endişe vericidir ve antibiyotik direncinin ayrıntılı mekanizmalarını anlamak çok önemlidir. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki bakteriyel metabolik profil farklılıkları, son teknoloji metabolomiklerle yeterli seviyede incelenmemiştir. Bakteri hücrelerinin metabolomunun deşifre edilmesi, potansiyel olarak direnç mekanizmasının ve etkili antibakteriyel tedavi için yenilikçi stratejilerin geliştirilmesine zemin oluşturabilir. (Velkov ve arkadaşları, 2013).

Hücre dışı metabolomik, mikrobiyal hücreler tarafından çevrelerine, yani kültür ortamına salgılanan düşük moleküler ağırlıklı hücre dışı metabolitlerin incelenmesidir. Bu metabolitlerin tüm tamamlayıcısı genellikle ekzometabolom olarak adlandırılır. Mikrobiyal hücrenin dışında salgılanan tüm metabolitleri ve ayrıca süpernatanda bulunan mikrobiyal kültür ortamı bileşenlerini içerir (Mapelli ve diğerleri, 2008). Ekzometabolom analizi, mikrobiyal metabolizmaya genel bir bakış sağlayan mikrobiyal aktiviteler hakkında bilgi verir. Bununla birlikte artan kanıtlar bakteri metabolizması üzerindeki nadiren keşfedilen etkilerin, antibiyotiklerin antibakteriyel aktivitesi için çok önemli olduğunu göstermektedir (Villas-Bôas ve arkadaşları, 2006).

Sonuçlarımız kolistin duyarlı ve kolistin dirençli *A. baumannii* suşlarının farklı metabolik profillere sahip olduğunu ortaya koydu.

Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma ülkemizde çeşitli enfeksiyonlara maruz kalmış hastalardan izole edilen Kolistin duyarlı ve kolistin dirençli *A. baumannii* suşlarının metabolomundaki sistematik farklılıkları araştıran ilk çalışmadır.

5.1 Metabolit tanımlama

Tam kapsamlı bir metabolit tanımlaması sağlamak için, İki iyonizasyon modu ayarlanmıştır. Her polarite moduna farklı metabolitler tanımlanmıştır. Pozitif iyon modunda (ESI+) çoğu bileşiğin bu modda iyonlaşması beklenir. Negatif iyon modunun (ESI-) en büyük avantajları, gelişmiş hassasiyet ve daha düşük arka plan gürültüsüdür (Chaleckis ve arkadaşları, 2019).

Tanımlanan metabolitlerin, amino asit, karbonhidrat, lipid ve nükleotit metabolizması gibi çoklu biyokimyasal yollarda yer aldığı bulunmuştur. Bununla birlikte LC-MS metabolomiklerindeki bilinmeyenlerin yorumlanmasında dikkatli olunması gerekir. Çünkü bunlar

aslında diğ er metabolitlerden türetilbilir veya artefaktları temsil edebilir (Chaleckis ve arkadaşları, 2019).

5.2 Farmakolojik olarak aktif Metabolitler

Bu çalışmanın sonuçlarına göre ilaç keşfi ve geliştirilmesinde rol oynayabilecek farmakolojik bir potansiyele sahip olan metabolitler aşağıda sıralanmıştır; Botrydial, Avermektin B1b aglikon, Bekanamisin, Landomisin B, dl-alfa-Tokoferol nikotinat.

Potansiyel olarak antibakteriyel etkiye sahip olabilecek ilk açıklamalı metabolit Botrydial'dir. Bir fitopatojen olan *Botrytis cinerea* ile enfekte olmuş bitki dokularından izole edilen sitotoksik bir mantar metabolitidir (Moraga ve arkadaşları, 2016).  nceki  alışmalar, bu metabolitin *Bacillus spp* ve *Pseudomonas spp*'ye karşı önemli antimikrobiyal aktivite potansiyelini öngörmüştür (Vignatti ve arkadaşları, 2020). Avermektinler, bir aktinomisetler olan *Streptomyces avermitilis*'in fermente edilmesinin bir ürünü olarak doğıal olarak oluşan bir ilaç grubudur. Genellikle antihelmintik etkilerinin yanı sıra pestisit olarak ta kullanılırlar (Jayakumar, 2009). Ek olarak, antikanser, anti-diyabetik, antiviral, antifungal etkileri vardır ve çeşitli metabolik bozuklukların tedavisinde de kullanılırlar (Pitterna, 2009). Bekanamisin, *Streptomyces kanamyceticus*'tan türetilen *Apis cerana*'da bulunan, antibakteriyel aktiviteye sahip bir aminoglikozit antibiyotiktir. Bekanamisin, bakteriyel 30S ribozomal alt birimine geri dönüşümsüz olarak bağılanır. Spesifik olarak, bu antibiyotik, 30S alt birimi içinde 16S rRNA ve S12 proteini arasında etkileşimde bulunur. Bu da translasyon başlatma kompleksi ile etkileşime, mRNA'nın yanlış okunmasına, dolayısıyla protein sentezini engellemeye ve bakterisidal etkiye yol açar. (Ni ve arkadaşları, 2011). Landomycin B bir oligosakkarittir. Landomycinler, *Streptomyces*'ten izole edilen angusiklin antibiyotiklerdir (Henkel, 1990). dl-alpha-Tocopherol nikotinat, E vitamininin doğıal olarak oluşan bir formudur.

5.3 Önemli Metabolik Yollarla İlgili Metabolitler

5.3.1 Hücre duvarı biyosentezi

1,6-Anhidro-N-asetilmuramik Asit Geri Dönüşümü: Bu yol, peptidoglikan biyosentezi için önemlidir. Çoğu bakteri duvarı, hücre duvarını koruyan ve stabilize eden mureinden oluşur yeni bakteri oluşumunda mureinin yarısından fazlası parçalanır ve bir sonraki nesil için geri dönüştürülür (Margolin, 2009). Hücre duvarı geri dönüşümü, belirli antibiyotiklere karşı bir direnç tepkisini kolaylaştırır (Wiedemann ve arkadaşları, 1998). Büyüme sırasında, litik transglikosidazlar ve endopeptidazlar tarafından mureinden üretilen başlıca muropeptit, GlcNAc-anhidro-N-asetilmuramik asit (anhMurNAc)-l-Ala-y-d-Glu-meso-Dap-d-Ala'dır (Höltje, 1998). Ana muropeptid, AmpG permeaz ile sitoplazmaya giren GlcNAc-anhidro-N-asetilmuramik asit (anhMurNAc)-l-Ala-y-d-Glu-mezo-Dap-d-Ala'dır (Cheng & Park, 2002). Peptit daha sonra muropeptitten salınır. 1,6-Anhidro-N-asetilmuramik asit (anhMurNAc), N-asetilglukozamin-fosfata (GlcNAc-P) dönüştürülmesiyle geri dönüştürülür. Şeker önce anhidro-N-asetilmuramik asit kinaz (AnmK) ile fosforile edilir. Bu bileşiğin bolluğu, bakteri hücrelerinin aktif bölünmesini (büyümesini) gösterir (Uehara ve arkadaşları, 2005).

Metabolomik verilerimiz, kolistine duyarlı suşlarda 1,6-Anhidro-N-asetilmuramik asit (P değeri = $2.99E-25$) bolluğunda çarpıcı bir artış gösterdi. Bu durum duyarlı suşların dirençli olanlardan daha aktif olarak bölündüğünü göstermektedir. Bakterilerde büyüme hızının bazı antibiyotiklere duyarlılığı güçlü bir şekilde etkileyebileceği yani duyarlılığı artıracığı bilinmektedir (Greulich, Scott, Evans ve Allen, 2015). Ayrıca 1,6-Anhidro-N-asetilmuramik asidin konakçı tarafından bağışıklık tepkileri ortaya çıkardığı bulunmuştur (Cho ve arkadaşları, 2007). Bu metabolitin bol olduğu *A. baumannii* suşlarında hem metabolitin konakçı hücrede bağışık sistemi aktive etmesi hem de antibiyotiğin antibakteriyel etkisi ile birlikte bir sinerjistik etki ortaya çıkması ve bu olaylar zinciri sonucunda da duyarlılık artışı akla yatkın bir çıkarım olarak görünmektedir.

5.3.2 Enzim Kofaktör Biyosentezi

Tanımlanan metabolitlerden biri Aeroginopeptin 917S-C'dir. Bu peptit, (NiFe) hidrojenazlar biyosentezinde yer alan bir siklodepsipeptittir (Manor ve arkadaşları, 2013). (NiFe) hidrojenazlar, demir-kükürt kümeleri içeren metalloenzimlerdir, bakterilerde yaygın olarak bulunurlar (Sun ve arkadaşları, 2010). Hidrojenazlar, protonların, elektronlarının tersine çevrilebilir ara dönüşümünü katalize ederek, iki protona H_2 oksidasyonu veya ters yönde, protonların indirgenmesiyle

moleküler hidrojen üretimi ile sonuçlanır (Dutta ve arkadaşları, 2014). Bulgularımıza göre, bu metabolitin kolistine duyarlı suşlarda daha bol olduğu bulunmuştur.

5.3.3 Mikrobiyal astaksantin biyosentezi

Fenikoksantin, astaksantin biyosentezinde yer alan bir metabolittir. Astaksantin, konakçıları çevresel strese ve olumsuz koşullara karşı koruyan mikroalgler ve bakteriler tarafından üretilir (Zhang ve arkadaşları, 2020). Astaksantin üreticileri olarak bilinen bakteriler, çevresel bakterileri içerir; *Paracoccus* spp. ve *Brevundimonas* spp (Ide ve arkadaşları, 2012).

Astaksantin biyosentezi için bir yol Fraser ve diğerleri tarafından önerilmiştir. Araştırmacılar *Escherichia coli* suşlarında astaksantin biyosentezinde yer alan ilgili enzimleri karakterize etmişlerdir (Fraser ve arkadaşları, 1997). Bu metabolit çoğunlukla antioksidan özellikleri ile bilinir (Higuera-Ciapara ve arkadaşları, 2006).

Bu özellikler Astaksantin'in bir antikanser ilacı olarak etkinliğini, kardiyovasküler hastalıkları önlemesini veya bağışıklık sistemini güçlendirici olarak test etmeyi amaçlayan bir dizi klinik öncesi denemenin başlatılmasına yol açmıştır (Makino ve arkadaşları, 2008). Çalışmamızda Fenikoksantin dirençli suşlarda duyarlı suşlara göre daha bol bulunmuştur. Literatürde bu metabolitin direnç mekanizmalarıyla bağlantısına dair veri bulunamamıştır.

5.3.4 Nükleotid metabolizması

Çalışmamızdaki metabolitlerden biri purin ribonükleosit trifosfat olan “D Ksantosin 5'-trifosfat” olarak tanımlanmıştır. Pürin bazlarının deaminasyonu sonucunda ortaya çıkar. D Xanthosine 5'-trifosfat gibi deamine nükleotitler, nükleotit havuzlarında birikebilir, DNA ve RNA'ya dahil olabilir bu da nükleik asit yapısının ve genetik bilginin değişmesine yol açar (Davies, Mendes ve arkadaşları, 2012). Bu durum kolistin'e duyarlı suşlar arasında D Ksantosin 5'-trifosfat'ın yukarı regülasyonunu açıklayabilir. Çünkü bu ürünlerin birikmesi nükleik asitlerdeki hasarı ifade edebilir.

Çalışmamızda kolistine duyarlı ve dirençli suşlar arasında farklı bulunan metabolitlerden birisi de “2-Metil-1-hidroksipropil-ThPP” (2-metil-1-hidroksipropiltiamin difosfat) olarak isimlendirilen nükleotid metabolizmasına bağlı başka bir metabolittir. Bir pirimidin türevidir. İzobutiril-CoA'nın sentezinde sondan ikinci adımdır (Bi ve arkadaşları, 2013). Çalışmamızda, bu metabolitin kolistine duyarlı suşlarda yukarı regüle olduğu bulunmuştur.

5.4 Lipidomik Profil

Metabolomiklerin bir alt alanı olarak kabul edilen lipidomik, lipidomun yani bir hücre, organ veya biyolojik sistem içindeki toplam lipid içeriğinin incelenmesidir (Wang ve arkadaşları, 2019). Lipitler basitçe genellikle organik çözücülerde çözünen hidrofobik biyolojik maddeler olarak tanımlanır (Au, 2018). Bununla birlikte lipidler, yapısal veya biyosentetik kriterlere dayalı olarak daha doğru bir şekilde karakterize edilebilir (Fahy ve arkadaşları, 2005). Sonuçlarımız, tanımlanan metabolitlerin %24'ünün lipid olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmamızda bulunan lipidomik sınıfları aşağıda sıralanmıştır: Triaçilgliseroller (Gliserol 1,2-didodekanoat, 3-tetradekanoat), fosfolipid (LysoPC) Steroidler (Oisynoestrol, 26-Glucosil-1,3,11,22-tetrahidroksi ergosta-5,24-dien-26-oat) , yağ alkolleri (panaquinquecol), Yağ asitleri (Stearolik asit, all-trans-Karofil sarısı), Prenol lipidleri (Acutosid B, Deutzioside pentaasetat), steroid esterler (Campesterol linoleate), Steroidal Glikozidler (Momordicoside E).

5.5 Virülans ile ilgili metabolitler

Çekirdek algılama, hücre popülasyon yoğunluğundaki dalgalanmalara yanıt olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesidir. Çekirdek algılayan bakteriler, hücre yoğunluğunun bir fonksiyonu olarak konsantrasyonu artan otoindükleyiciler olarak adlandırılan kimyasal sinyal molekülleri üretir ve serbest bırakır. Bakteriler çeşitli fizyolojik aktiviteleri düzenlemek için çekirdek algılama iletişim devrelerini kullanır. Bu süreçler simbiyoz, virülans, yeterlilik, antibiyotik üretimi, hareketlilik, sporülasyon ve biyofilm oluşumunu içerir (Miller ve arkadaşları, 2001).

Çalışmamızda hücre-hücre iletişimi için önemli bir sinyal molekülü tespit edilmiştir Trans- Δ^2 -11-metil-Dodekenoik asit, hücre dışı mikrobiyal ve mantar iletişim sistemlerinde yayılabilir bir sinyal faktördür. Yapısal olarak trans- Δ^2 -11-metil-Dodekenoik asit, cis- Δ^2 -11-metil-dodekenoik asidin konformasyonel izomeridir. İncelenen suşlarımızda bu molekül kolistin dirençli suşlarda daha bol bulunmuştur. Bu sonuç, bakteriyel sinyal ağlarının (Quorum Sensing) antibiyotik tepkilerini ve direnç düzenlemesini etkileyebileceğini gösteren önceki çalışma ile uyumludur (Miller ve arkadaşları, 2001).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma, *A. baumani*'nin kolistine duyarlı ve kolistine dirençli suşları arasındaki metabolomik profil farkını ortaya koyan ilk metabolomik çalışmadır. Çalışmamız test edilen suşlar arasında metabolomda önemli bir fark olduğunu göstermiştir.

Sonuçlarımız incelenen suşlar arasında metabolik profilde önemli bir fark olduğunu göstermiştir. Metabolik profildeki bu farklılık aminoasit, karbonhidrat, lipid, hücre duvarı ve nükleotid metabolizması gibi bakteri hücresi içinde hayati öneme sahip yapıların sentezinde anahtar bir rol oynayabilir. Tanımlanan önemli metabolitlerden biri 1,6-Anhidro-N-asetilmuramik asittir ve peptidoglikan biyosenteziyle ilgili bir metabolittir. Kolistine duyarlı suşlarda arttığı bulunmuştur. Nükleotid metabolizması ile ilgili iki metabolitin de duyarlı suşlarda yukarı regüle edildiği bulunmuştur (D Ksantosin 5'-trifosfat ve 2-metil-1-hidroksipropiltiamin difosfat). Diğer taraftan dirençli suşlarda virulans faktörlerinin yukarı regüle olduğu bulunmuştur. Tanımlanan virulansla ilgili metabolit (Trans- Δ^2 -11-metil-Dodekenoik asit) önemli bir sinyal faktörüdür. Bu bulgular, hedefsiz metabolomiklerin *A. baumannii*'nin direncini karakterize etmek ve klinik olarak anlamlı fenotipik özellikler ile bakteriyel metabolom arasındaki ilişkileri araştırmak için değerli bir araç olduğunu göstermektedir.

Araştırmamız sonucunda elde ettiğimiz verilerin, direnç mekanizmalarının gelişiminde ve ilaç hedeflerinin belirlenmesinde metabolitlerin rolü hakkında daha ileri araştırmalar için bir temel sağlayacağını düşünmekteyiz. Hedefsiz bir metabolomik çalışma olan araştırmamızın sonucunda elde edilen veriler ışığında yapılabilecek hedefli metabolomik çalışmalarla, hem direnç mekanizmalarını tanımlayabilmek adına hem de yeni tedavi seçenekleri oluşturabilmek için bir zemin oluşacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- Adams, MD., Nickel, G.C., Bajaksouzian, S., Lavender, H., Murthy, A.R., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A. (2009). Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(9), 3628-3634.
- Ajiboye, T., Skiebe, E., Wilharm, G. (2018). Contributions of ferric uptake regulator Fur to the sensitivity and oxidative response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics. *Mic patho*, 119, 35-41.
- Al-Gethamy, M.M, Faidah., H.S, Adetunji., H.A., Haseeb, A., Ashgar, SS, Mohammed, TK., Hassali, M.A. (2017). Risk factors associated with multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections at a tertiary care hospital in Makkah, Saudi Arabia-a matched case-control study. *nt J Med Res*, 45(3), 1181-1189.
- Antunes, L., Visca, P., Towner, KJ (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Patho dis*, 71(3), 292-301.
- Antunes, L.C., Imperi, F., Carattoli, A., Visca, P. (2011). Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One*, 6(8), e22674.
- Asif, M., Alvi, IA, Rehman, SU (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Inf dru res*, 11, 1249.
- Au, A. (2018). Metabolomics and lipidomics of ischemic stroke. *Adv in clin chem*, 85, 31-69.
- Beceiro, A., Moreno, A., Fernández, N., Vallejo, JA, Aranda, J., Adler, B., . Bou, G. (2014). Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob agen chemother*, 58(1), 518-526.
- Bedair, M., Sumner, LW (2008). Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 238-250.
- Beltran, A., Suarez, M., Rodríguez, MA, Vinaixa, M., Samino, S., Arola, L., . . . Yanes, O. (2012). Assessment of compatibility between extraction methods for NMR-and LC/MS-based metabolomics. *Analytical chemistry*, 84(14), 5838-5844.
- Bentancor, LV, Camacho-Peiro, A., Bozkurt-Guzel, C., Pier, GB, & Maira-Litrán, T. (2012). Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, 194(15), 3950-3960.
- Berlau, J., Aucken, H., Houang, E., & Pitt, T. (1999). Isolation of *Acinetobacter* spp including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection*, 42(3), 201-204.

- Bi, H., Bai, Y., Cai, T., Zhuang, Y., Liang, X., Zhang, X., Ma, Y. (2013). Engineered short branched-chain acyl-CoA synthesis in *E. coli* and acylation of chloramphenicol to branched-chain derivatives. *App micro biotech*, 97(24), 10339-10348.
- Burgess, K., Creek, D., Dewsbury, P., Cook, K., Barrett, MP (2011). Semi-targeted analysis of metabolites using capillary-flow ion chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communi in Mass Spectro*, 25(22), 3447-3452.
- Campbell, I., Crozier, D., Pawagi, A., & Buivids, I. (1983). In vitro response of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis patients to combinations of linoleic and oleic acids added to nutrient medium. *J clini micro*, 18(2), 408-415.
- Casadevall, A., Pirofski, L. (2009). Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. *J water health*, 7(S1), S2-S18.
- Caspi, R., Billington, R., Keseler, IM, Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, PE, Karp, P.D. (2020). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes-a 2019 update. *Nuc aciD res*, 48(D1), D445-D453.
- Castilho, S.A, Godoy, C.S. M., Guilarde, A.O, Cardoso, JL, André, MCP, Junqueira-Kipnis, AP, Kipnis, A. (2017). *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. *PLoS One*, 12(5), e0176790.
- Chaleckis, R., Meister, I., Zhang, P., Wheelock, CE (2019). Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC–MS-based metabolomics. *Curr opin biotech*, 55, 44-50.
- Cheng, Q., Park, JT. (2002). Substrate specificity of the AmpG permease required for recycling of cell wall anhydro-muropeptides. *J bacterio*, 184(23), 6434-6436.
- Cho, S., Wang, Q., Swaminathan, C.P, Heseck, D., Lee, M., Boons, G.J., Mariuzza, RA (2007). Structural insights into the bactericidal mechanism of human peptidoglycan recognition proteins. *Pro. Natl Acad Sci*, 104(21), 8761-8766.
- Davies, O., Mendes, P., Smallbone, K., Malys, N. (2012). Characterisation of multiple substrate-specific (d) ITP/(d) XTPase and modelling of deaminated purine nucleotide metabolism. *BMB reports*, 45(4), 259-264.
- Depke, T., Thöming, JG, Kordes, A., Häussler, S., Brönstrup, M. (2020). Untargeted LC-MS metabolomics differentiates between virulent and avirulent clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomol*, 10(7), 1041.
- Dexter, C., Murray, G.L., Paulsen, I.T., & Peleg, A.Y. (2015). Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Exp rev anti-infec ther*, 13(5), 567-573.

- Di Venanzio, G., Flores-Mireles, A.L., Calix, J.J., Haurat, MF, Scott, NE, Palmer, LD, Wang, B. (2019). Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes. *Nat comm*, 10(1), 1-13.
- Djordjevic, Z.M., Folic, M.M., Folic, N.D., Gajovic, N., Gajovic, O., Jankovic, S.M. (2016). Risk factors for hospital infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J inf dev countr*, 10(10), 1073-1080.
- Durante-Mangoni, E., Signoriello, G., Andini, R., Mattei, A., De Cristoforo, M., Murino, P., Galdieri, N. (2013). Colistin and rifampicin compared with colistin alone for the treatment of serious infections due to extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a multicenter, randomized clinical trial. *Clin Inf Dis*, 57(3), 349-358.
- Dutta, A., DuBois, D.L., Roberts, J.A., Shaw, W.J. (2014). Amino acid modified Ni catalyst exhibits reversible H₂ oxidation/production over a broad pH range at elevated temperatures. *Proce NatAca of Sci*, 111(46), 16286-16291.
- Elnahriry, S.S., Khalifa, H.O., Soliman, A.M., Ahmed, A.M., Hussein, A.M., Shimamoto, T., Shimamoto, T. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in a clinical *Escherichia coli* isolate from Egypt. *Antimicrob agents chemothe*, 60(5), 3249-3250.
- Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. [Internet]. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).
media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, HA, Glass, CK, Merrill, AH, Murphy, RC, Shaw, W. (2005). A comprehensive classification system for lipids1. *J lipid res*, 46(5), 839-861.
- Falagas, M., Karveli, E. (2007). The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. *Elsevier*, 13:117-119.
- Falagas, M.E., Kasiakou, S.K. (2006). Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical care*, 10(1), 1-13.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Fun gens*, 155-171.
- Fishbain, J., Peleg, A.Y. (2010). Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Inf Dis*, 51(1), 79-84.
- Foschi, C., Salvo, M., Laghi, L., Zhu, C., Ambretti, S., Marangoni, A. (2018). Impact of meropenem on *Klebsiella pneumoniae* metabolism. *PLoS One*, 13(11), e0207478.
- Fraser, PD, Miura, Y., Misawa, N. (1997). In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J Bio Chem*, 272(10): 6128-6135.
- Freire, AT, Melnyk, V., Kim, MJ, Datsenko, O., Dzyublik, O., Glumcher, F., Cooper, CA (2010). Comparison of tigecycline with imipenem/cilastatin for the treatment of hospital-acquired pneumonia. *Diag micro inf dis*, 68(2): 140-151.

- Freire, M., de Oliveira Garcia, D., Garcia, C., Bueno, M.C., Camargo, C., Magri, A.K., Ibrahim, K. (2016). Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clin Micro Inf*, 22(4): 352-358.
- Gaddy, J. A., Actis, L. A. (2009). Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future micro*, 4(3): 273-278.
- J., Ortiz-Leyba, C., Jimenez-Jimenez, F., Barrero-Almodovar, A., Garcia-Garmendia, J., Bernabeu-Wittell, M., . . . Madrazo-Osuna, J. (2003). Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clinical Infectious Diseases*, 36(9): 1111-1118.
- Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., Götz, F. (1998). Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. *J Biological Chemistry*, 273(29): 18586-18593.
- Gevers, D., Knight, R., Petrosino, JF, Huang, K., McGuire, AL, Birren, BW, Huttenhower, C. (2012). The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome.
- Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Nelson, KE (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*, 312(5778): 1355-1359.
- Ginawi, I., Saleem, M., Sigh, M., Vaish, A., Ahmad, I., Srivastava, V., Abdullah, AFM (2014). Hospital acquired infections among patients admitted in the medical and surgical wards of a non-teaching secondary care hospital in northern India. *J clin diag res*, 8(2): 81.
- Gómez-Romero, M., Zurek, G., Schneider, B., Baessmann, C., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach. *Food chem*, 124(1): 379-386.
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *Tren Ana Chem*, 82: 425-442.
- Green, E.R., Mecsas, J. (2016). Bacterial secretion systems: an overview. *Micro spec*, 4(1): 4: 13.
- Greene, C., Wu, J., Rickard, AH, Xi, C. (2016). Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Let app micro*, 63(4): 233-239.
- Greulich, P., Scott, M., Evans, MR, & Allen, RJ (2015). Growth-dependent bacterial susceptibility to ribosome-targeting antibiotics. *Molecular systems biology*, 11(3), 796.
- Hameed, F., Khan, M.A., Muhammad, H., Sarwar, T., Bilal, H., Rehman., T.U. (2019). Plasmid-mediated mcr-1 gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52.

- Han, M.L., Liu, X., Velkov, T., Lin, Y.-W., Zhu, Y., Creek, DJ, Zhang, J. (2019). Comparative metabolomics reveals key pathways associated with the synergistic killing of colistin and sulbactam combination against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front phar*, 754.
- Haseley, S.R., Pantophlet, R., Brade, L., Holst, O., Brade, H. (1997). Structural and serological characterisation of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter junii* strain 65. *Euro J biochem*, 245(2): 477-481.
- Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., Steinbeck, C. (2016). ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic acids research*, 44(D1): D1214-D1219.
- Hendriks, M.M., van Eeuwijk, F.A., Jellema, R.H., Westerhuis, J.A., Reijmers, T.H., Hoefsloot, H.C., Smilde, AK (2011). Data-processing strategies for metabolomics studies. *Tren Ana Chem*, 30(10), 1685-1698.
- Henkel, T., Rohr, J., Beale, Jm, Schwenen, L. (1990). Landomycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces* sp. I. Structural studies on landomycins AD. *J antibio*, 43(5): 492-503.
- Henry, R., Vithanage, N., Harrison, P., Seemann, T., Coutts, S., Moffatt, JH, Adler, B. (2012). Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly- β -1, 6-N-acetylglucosamine. *Antimicro age chemo*, 56(1): 59-69.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit rev food sci nut*, 46(2): 185-196.
- Höltje, J.V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Micro mol bio revs*, 62(1): 181-203.
- Hood, M.I., Becker, K.W., Roux, C.M., Dunman, P.M., Skaar, E.P. (2013). Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in *Acinetobacter baumannii*. *Inf imm*, 81(2): 542-551.
- Hrenovic, J., Durn, G., Goic-Barisic, I., Kovacic, A. (2014). Occurrence of an environmental *Acinetobacter baumannii* strain similar to a clinical isolate in paleosol from Croatia. *App enviro micro*, 80(9), 2860-2866.
- Ide, T., Hoya, M., Tanaka, T., & Harayama, S. (2012). Enhanced production of astaxanthin in *Paracoccus* sp. strain N-81106 by using random mutagenesis and genetic engineering. *Bio Eng J*, 65: 37-43.
- Jaruratanasirikul, S., Nitchot, W., Wongpoowarak, W., Samaeng, M., Nawakitranngsan, M. (2019). Population pharmacokinetics and Monte Carlo simulations of sulbactam to optimize dosage regimens in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. *Euro J PharSci*, 136: 104940.

- Jayakumar, J. (2009). Bio-efficacy of *Streptomyces avermitilis* culture filtrates against root knot nematode, *Meloidogyne incognita* and reniform nematodes, *Rotylenchulus reniformis*. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 22(3): 567-571.
- Jiao, N., Herndl, G.J., Hansell, D.A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, SW, Chen, F. (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat Rev Micro*, 8(8): 593-599.
- Juttukonda, L.J., Chazin, W.J., Skaar, E.P. (2016). *Acinetobacter baumannii* coordinates urea metabolism with metal import to resist host-mediated metal limitation. *MBio*, 7(5): e01475-01416.
- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Tokimatsu, T. (2007). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nuc aci res*, 36:D480-D484.
- Karakonstantis, S. (2020). A systematic review of implications, mechanisms, and stability of in vivo emergent resistance to colistin and tigecycline in *Acinetobacter baumannii*. *J Chemo*, 33(1): 1-11.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Yu, B. (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nuc aci res*, 47(D1): D1102-D1109.
- Knobloch, JK-M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.-H., Mack, D. (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J bac*, 183(8): 2624-2633.
- Koal, T., Daigner, H.P. (2010). Challenges in mass spectrometry based targeted metabolomics. *Current molecular medicine*, 10(2): 216-226.
- Krone, N., Hughes, B.A., Lavery, G.G., Stewart, P.M., Arlt, W., Shackleton, C.H. (2010). Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J ster bio mole bio*, 121(3-5): 496-504.
- Lambert, J.B, Mazzola, E.P., Ridge, C.D. (2019). *Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods*: John Wiley & Sons.
- Lee, Y.T., Tsao, S.-M., Hsueh, P.-R. (2013). Clinical outcomes of tigecycline alone or in combination with other antimicrobial agents for the treatment of patients with healthcare-associated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Euro J cli micro infec dis*, 32(9):1211-1220.
- Lima, W.G., Alves, M.C., Cruz, W.S., Paiva, M.C. (2018). Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 37(6):1009-1019.
- Lin, J., Huang, S., Zhang, Q. (2002). Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Micr inf*, 4(3): 325-331.

- Lingwood, D., Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *science*, 327(5961): 46-50.
- Mack, D., Siemssen, N., Laufs, R. (1992). Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Inf imm*, 60(5): 2048-2057.
- Maifiah, H.M, Creek, D.J., Nation, R.L., Forrest, A., Tsuji, B.T., Velkov, T., Li, J. (2017). Untargeted metabolomics analysis reveals key pathways responsible for the synergistic killing of colistin and doripenem combination against *Acinetobacter baumannii*. *Scientific reports*, 7(1); 1-12.
- Makino, T., Harada, H., Ikenaga, H., Matsuda, S., Takaichi, S., Shindo, K., Misawa, N. (2008). Characterization of cyanobacterial carotenoid ketolase CrtW and hydroxylase CrtR by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Plant cell phy*, 49(12): 1867-1878.
- Malta, RCR, Ramos, GL d. PA, dos Santos Nascimento, J. (2020). From food to hospital: we need to talk about *Acinetobacter* spp. *Germs*, 10(3): 210.
- Manor, BC, Rauchfuss, T.B. (2013). Hydrogen activation by biomimetic [NiFe]-hydrogenase model containing protected cyanide cofactors. *J Amer Chem Soci*, 135(32): 11895-11900.
- Mapelli, V., Olsson, L., Nielsen, J. (2008). Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. *Trends in biotechnology*, 26(9), 490-497.
- Margolin, W. (2009). Sculpting the bacterial cell. *Cur Bio*, 19(17): R812-R822.
- Marin, SJ, Sawyer, JC, He, X., Johnson-Davis, KL (2015). Comparison of drug detection by three quadrupole time-of-flight mass spectrometry platforms. *J Analy Toxicoy*, 39(2): 89-95.
- Mielko, KA, Jabłoński, SJ, Pruss, Ł., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2021). Metabolomics Comparison of Drug-Resistant and Drug-Susceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strain (Intra-and Extracellular Analysis). *Int J mol scie*, 22(19): 10820.
- Miller, MB, & Bassler, BL (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu rev micro*, 55(1): 165-199.
- Miller, MJ, Kennedy, AD, Eckhart, AD, Burrage, LC, Wulff, JE, Miller, LA, Sun, Q. (2015). Untargeted metabolomic analysis for the clinical screening of inborn errors of metabolism. *J inh met dis*, 38(6): 1029-1039.
- Moffatt, J.H, Harper, M., Boyce, J.D. (2019). Mechanisms of polymyxin resistance. *Poly Antibios*, 55-71.
- Moffatt, J.H., Harper, M., Harrison, P., Hale, JD, Vinogradov, E., Seemann, T., Cox, A.D. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antil age chemo*, 54(12): 4971-4977.
- Moore, J.L., Becker, K.W., Nicklay, J.J., Boyd, K.L., Skaar, E.P., Caprioli, R.M. (2014). Imaging mass spectrometry for assessing temporal proteomics: analysis of calprotectin in *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection. *Proteomics*, 14(7-8); 820-828.

- Moraga, J., Dalmais, B., Izquierdo-Bueno, I., Aleu, J., Hanson, J.R., Hernández-Galán, R., Collado, I.G. (2016). Genetic and molecular basis of botrydial biosynthesis: Connecting cytochrome P450-encoding genes to biosynthetic intermediates. *Chem Bio*, 11(10): 2838-2846.
- Morris, F.C., Dexter, C., Kostoulas, X., Uddin, MI, & Peleg, A.Y. (2019). The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Fron Micro*, 10: 1601.
- Morrow, K.J. (2010). Mass spec central to metabolomics. *Gen Eng Biotech News*, 30(7): 1.
- Mortensen, BL, Skaar, E.P. (2012). Host–microbe interactions that shape the pathogenesis of *A cinetobacter baumannii* infection. *Cel micro*, 14(9): 1336-1344.
- Nairn, B.L., Lonergan, Z.R., Wang, J., Braymer, JJ, Zhang, Y., Calcutt, MW, . de Crécy-Lagard, V. (2016). The response of *Acinetobacter baumannii* to zinc starvation. *Cell micr*, 19(6): 826-836.
- Nho, JS, Jun, SH, Oh, MH, Park, TI, Choi, CW, Kim, SI, Lee, JC (2015). *Acinetobacter nosocomialis* secretes outer membrane vesicles that induce epithelial cell death and host inflammatory responses. *Micr path*, 81: 39-45.
- Ni, X., Li, D., Yang, L., Huang, T., Li, H., & Xia, H. (2011). Construction of kanamycin B overproducing strain by genetic engineering of *Streptomyces tenebrarius*. *Ap mic biotec*, 89(3): 723-731.
- Nicholson, JK, Lindon, JC, & Holmes, E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11): 1181-1189.
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, DA, Chang, L., Barrette, M., Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nuc acids res*, 49(W1): W388-W396.
- Patti, G.J. (2011). Separation strategies for untargeted metabolomics. *J sep sci*, 34(24): 3460-3469.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clil micr rev*, 21(3): 538-582.
- Penwell, W.F., Shapiro, A.B., Giacobbe, R.A., Gu, R.F., Gao, N., Thresher, J. Ehmann, DE (2015). Molecular mechanisms of sulbactam antibacterial activity and resistance determinants in *Acinetobacter baumannii*. *Antimic chemo*, 59(3): 1680-1689.
- Perez, F., Ponce-Terashima, R., Adams, M.D., Bonomo, R.A. (2011). Are we closing in on an "elusive enemy"? The current status of our battle with *Acinetobacter baumannii*. *Taylor & Francis*, 2: 86-90.
- Peter, J., Mark, S., Riddle, K. (2008). *Acinetobacter baumannii* Skin and Soft-Tissue Infection Associated with War Trauma, *Clinical Infectious Diseases*, 47:444–449
- Pinu, F.R., Villas-Boas, S.G., Aggio, R. (2017). Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: quenching and extraction protocols. *Metabolites*, 7(4): 53.

- Pitterna, T., Cassayre, J., Hüter, OF, Jung, PM, Maienfisch, P., Kessabi, FM, Tobler, H. (2009). New ventures in the chemistry of avermectins. *Bioorg med chem*, 17(12): 4085-4095.
- Prescott, R.D., Decho, A.W. (2020). Flexibility and adaptability of quorum sensing in nature. *Trends in microbiology*, 28(6): 436-444.
- Raes, J., Bork, P. (2008). Molecular eco-systems biology: towards an understanding of community function. *Nature Reviews Microbiology*, 6(9): 693-699.
- Rees, CA, Nordick, KV, Franchina, FA, Lewis, AE, Hirsch, EB, Hill, JE (2017). Volatile metabolic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in nutrient-replete conditions. *Meta*, 13(2): 1-11.
- Rigatto, M.H, Vieira, F.J., Antoechevis, L.C., Behle, T.F., Lopes, N.T., Zavascki, A.P. (2015). Polymyxin B in combination with antimicrobials lacking in vitro activity versus polymyxin B in monotherapy in critically ill patients with *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Antimic agents chemo*, 59(10): 6575-6580.
- Rochat, B. (2016). From targeted quantification to untargeted metabolomics: Why LC-high-resolution-MS will become a key instrument in clinical labs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 84, 151-164.
- Rochfort, S. (2005). Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J nat products*, 68(12): 1813-1820.
- Rodríguez-Medina, I., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Use of high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray-Qq-time-of-flight mass spectrometry for the direct characterization of the phenolic fraction in organic commercial juices. *J Chroma*, 1216(23): 4736-4744.
- Rumbo, C., Tomás, M., Fernandez Moreira, E., Soares, NC, Carvajal, M., Santillana, E., . . . Bou, G. (2014). The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infec imm*, 82(11): 4666-4680.
- Sassano M.F., Davis E.S., Keating J.E., Zorn B.T., Kochar T.K., Wolfgang M.C. (2018). Evaluation of e-liquid toxicity using an open-source high-throughput screening assay. *PLoS Bio*, 16(3): e2003904
- Sato, Y., Unno, Y., Kawakami, S., Ubagai, T., Ono, Y. (2017). Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. *J medl micro*, 66(2): 203-212.
- Sertcelik, A., Baran, I., Akinci, E., Mumcuoglu, I., Bodur, H. (2020). Synergistic activities of colistin combinations with meropenem, sulbactam, minocycline, disodium fosfomycin, or vancomycin against different clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Micro Drug Resis*, 26(5): 429-433.
- Shi, H., Lee, J.S, Park, S.Y., Ko, Y., Eom, JS (2019). Colistin Plus Carbapenem versus Colistin Monotherapy in the Treatment of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Pneumonia. *Inf and drug resis*, 12: 3925.

- Siegman-Igra, Y., Bar-Yosef, S., Gorea, A., & Avram, J. (1993). Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clinl Inf Dis*, 17(5): 843-849.
- Sievert, D.M., Ricks, P., Edwards, J.R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Inf Con Hos Epi*, 34(1): 1-14.
- Singh, JK, Adams, FG, Brown, MH (2019). Diversity and function of capsular polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Fron in Micr*, 3301.
- Smani, Y., Dominguez-Herrera, J., Pachón, J. (2013). Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J of inf diss*, 208(10): 1561-1570.
- Smith, V.H. (2002). Effects of resource supplies on the structure and function of microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1): 99-106.
- Spellberg, B., Bonomo, R.A. (2015). Combination therapy for extreme drug resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii*: ready for Prime-Time? *Crit.l care med.*, 43(6): 1332.
- Sun, J., Hopkins, R.C., Jenney Jr, F.E., McTernan, P.M., Adams, M.W. (2010). Heterologous expression and maturation of an NADP-dependent [NiFe]-hydrogenase: a key enzyme in biofuel production. *PLoS One*, 5(5): e10526.
- Tang, J. (2011). Microbial metabolomics. *Current genomics*, 12(6): 391-403.
- Ten-Doménech, I., Martínez-Sena, T., Moreno-Torres, M., Sanjuan-Herráez, JD, Castell, JV, Parra-Llorca, A., Kuligowski, J. (2020). Comparing targeted vs. untargeted MS2 data-dependent acquisition for peak annotation in LC–MS metabolomics. *Metabolites*, 10(4): 126.
- Tipton, K.A., Rather, P.N. (2017). An ompR-envZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J bacterio*, 199(3): e00705-00716.
- Torsvik, V., Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5(3): 240-245.
- Trebosc, V., Gartenmann, S., Tötzl, M., Lucchini, V., Schellhorn, B., Pieren, M., . . . Bumann, D. (2019). Dissecting colistin resistance mechanisms in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *MBio*, 10(4): e01083-01019.
- Tredwell, G.D., Edwards-Jones, B., Leak, D.J., & Bundy, J.G. (2011). The development of metabolomic sampling procedures for *Pichia pastoris*, and baseline metabolome data. *PLoS One*, 6(1), e16286.
- Tsitsopoulos, PP, Iosifidis, E., Antachopoulos, C., Anestis, DM, Karantani, E., Karyoti, A., Tsonidis, C. (2016). Nosocomial bloodstream infections in neurosurgery: a 10-year analysis in a center with high antimicrobial drug-resistance prevalence. *Acta neurochirurgica*, 158(9): 1647-1654.

- Uehara, T., Suefuji, K., Valbuena, N., Meehan, B., Donegan, M., Park, J.T. (2005). Recycling of the anhydro-N-acetylmuramic acid derived from cell wall murein involves a two-step conversion to N-acetylglucosamine-phosphate. *J bac*, 187(11): 3643-3649.
- Velkov, T., Roberts, KD, Nation, RL, Thompson, PE, & Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future micro*, 8(6): 711-724.
- Ventura, M., O'flaherty, S., Claesson, MJ, Turrone, F., Klaenhammer, TR, Van Sinderen, D., O'toole, PW (2009). Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nature Rev Micro*, 7(1): 61-71.
- Vernocchi, P., Del Chierico, F., Putignani, L. (2016). Gut microbiota profiling: metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Fron Micr*, 7: 1144.
- Vignatti, P., Gonzalez, ME, Jofré, EC, Bolívar-Anillo, HJ, Moraga, J., Viaud, M., . . . Pieckenstein, FL (2020). Botrydial confers Botrytis cinerea the ability to antagonize soil and phyllospheric bacteria. *Fun Bio*, 124(1): 54-64.
- Villas-Bôas, SG, Noel, S., Lane, GA, Attwood, G., & Cookson, A. (2006). Extracellular metabolomics: a metabolic footprinting approach to assess fiber degradation in complex media. *Analytical biochemistry*, 349(2), 297-305.
- Wang, J., Wang, C., & Han, X. (2019). Tutorial on lipidomics. *Analytica chimica acta*, 1061, 28-41.
- Weber, BS, Kinsella, RL, Harding, CM, Feldman, MF (2017). The secrets of Acinetobacter secretion. *Tren microbio*, 25(7): 532-545.
- Winn, W. C., & Koneman, E. W. (2006). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology (6th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Whitfield, C., & Trent, MS (2014). Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annual rev biochem*, 83: 99-128.
- Wiedemann, B., Pfeifle, D., Wiegand, I., Janas, E. (1998). β -Lactamase induction and cell wall recycling in gram-negative bacteria. *Drug res upd*, 1(4): 223-226.
- Wisplinghoff, H., Paulus, T., Lugenheim, M., Stefanik, D., Higgins, PG, Edmond, MB, Seifert, H. (2012). Nosocomial bloodstream infections due to Acinetobacter baumannii, Acinetobacter pittii and Acinetobacter nosocomialis in the United States. *J Inf*, 64(3): 282-290.
- Wittmann, C. (2007). Fluxome analysis using GC-MS. *Microbial cell factories*, 6(1): 1-17.
- Wong, D., Nielsen, TB, Bonomo, RA, Pantapalangkoor, P., Luna, B., & Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections: a century of challenges. *Cli micro rev*, 30(1): 409-447.

- Yang, Q., Zhang, A.-h., Miao, J.-h., Sun, H., Han, Y., Yan, G.-l., Wang, X.-j. (2019). Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review. *RSC Advances*, 9(64): 37245-37257.
- Zhang, B., Powers, R. (2012). Analysis of bacterial biofilms using NMR-based metabolomics. *Future med chem*, 4(10): 1273-1306.
- Zhang, C., Chen, X., & Too, H.-P. (2020). Microbial astaxanthin biosynthesis: recent achievements, challenges, and commercialization outlook. *App micro biotech*, 104(13): 5725-5737.
- Zhang, W.-J., Lu, Z., Schwarz, S., Zhang, R.-M., Wang, X.-M., Si, W., Liu, S. (2013). Complete sequence of the bla NDM-1-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *J Anti Chemo*, 68(7): 1681-1682.
- Zhang, Y., & Shou, S. (2021). Pathogens and drug-resistance of hospital-acquired pneumonia in an EICU in Tianjin, China. *Int J bio*, 12(2): 49.
- Zhou, J., Yin, Y. (2016). Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, 141(23): 6362-6373.
- Zhu, Z.-J., Schultz, AW, Wang, J., Johnson, CH, Yannone, SM, Patti, GJ, & Siuzdak, G. (2013). Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nature protocols*, 8(3): 451-460.