



**ÇOĞUL DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞUNA  
ÖZGÜ LİTİK BAKTERİYOFAJ ARAŞTIRILMASI**

**Betül ÇELİK**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Barış OTLU**

**Yüksek Lisans Tezi - 2017**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇOĞUL DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞUNA ÖZGÜ LİTİK  
BAKTERİYOFAJ ARAŞTIRILMASI**

**Betül ÇELİK**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Barış OTLU**


Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından  
2015/81 Proje numarası ile desteklenmiştir.


**MALATYA  
2017**

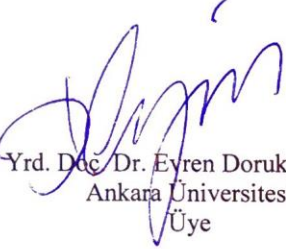
## KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Betül ÇELİK**'in "**Çoğul Dirençli Acinetobacter baumannii Suşuna Özgü Litik Bakteriyofaj Araştırılması**" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/07/2017

  
Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL  
İnönü Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Barış OTLU  
İnönü Üniversitesi  
Üye

  
Yrd. Döç. Dr. Eyren Doruk ENGİN  
Ankara Üniversitesi  
Üye

### ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../2017 tarih ve 2017/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Enstitü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>XII</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	3
2.2. Tarihçe ve Taksonomi .....	3
2.3. Kültür Özellikleri ve Biyokimyasal Karakteristikleri.....	4
2.4. Patogenez .....	5
2.5. Antibiyotiklere Direnç ve Direnç Mekanizmaları .....	8
2.6. Epidemiyoloji ve Ekoloji .....	10
2.7. Bakteriyofajlar .....	12
2.7.1. Bakteriyofajlar ve Faj Terapisinin Tarihçesi .....	12
2.7.2. Bakteriyofajların Yapısal Özellikleri.....	13
2.7.3. Bakteriyofajların Sınıflandırılması .....	14
2.7.4. Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü.....	14
2.7.5.1. Litik Faj.....	15
2.7.5.2. Lizojenik Faj .....	17
2.7.6. Bakteriyofajların Kullanım Alanları .....	17
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>19</b>
3.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'ye Özgü Litik Bakteriyofajın Eldesi .....	19
3.1.1. Bakteriyofaj İzolasyon Kaynakları .....	19
3.1.2. Bakteriyofaj İzolasyonu .....	19
3.1.3. <i>A. baumannii</i> Konakçı Kültürünün Hazırlanması.....	20
3.1.4. Çift Agar Yöntemiyle Bakteriyofaj Tespiti .....	20
3.1.5. Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofajın Saflaştırılması .....	20
3.1.6. Bakteriyofajın Titresinin Yükseltilmesi ve Belirlenmesi .....	21
3.2. Bakteriyofajın Protein Profillerinin Analizi .....	22

3.3. Bakteriyofajın Transmisyon Elektron Mikroskobu İle Karakterizasyonu.....	24
3.3.1. Bakteriyofajın Morfolojik Karakterizasyonun Yapılması .....	24
3.3.2. Faj-Bakteri Adsorbsiyonunun Tespit Edilmesi.....	24
3.4. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu .....	26
3.4.1. Bakteriyofaj Genomunun Eldesi.....	26
3.4.2. Bakteriyofaj Genomunun Restriksiyon Endonükleazlar İle Kesilmesi .....	26
3.4.3. Sindirme Ürünlerinin Plazmid Vektörlere Klonlanması .....	26
3.4.4. Ligasyon Ürünlerinin Transformasyonu.....	27
3.4.5. Transformantlardan Plazmid İzolasyonu .....	27
3.4.6. Plazmid Üzerinden Sekans Analizi.....	28
3.4.7. Bakteriyofaj DNA'sının Dizi Analizi Sonuçları.....	28
3.5. Bakteriyofajın Çoğul dirençli <i>A. baumannii</i> İzolatları Üzerine Etkisi .....	28
3.5.1. Çoğul Dirençli <i>A. baumannii</i> İzolatlarının belirlenmesi.....	28
3.5.2. <i>A. baumannii</i> İzolatlarında Karbapenemaz Aktivitesinin Karbapenem İnaktivasyon Metodu (CIM) ile Belirlenmesi .....	29
3.5.3. <i>A. baumannii</i> İzolatlarında Kolistin Direncinin MIC testi ile Belirlenmesi .....	29
3.5.4. Bakteriyofajın Farklı Genotipteki <i>A. baumannii</i> İzolatlarına Etkisinin incelenmesi.....	30
3.5.5. Elde Edilen Bakteriyofajın Farklı Mikroorganizmalara .....	31
Olan Etkisinin Araştırılması .....	31
3.6. Kullanılan Tampon Çözeltiler ve Kimyasallar .....	31
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>32</b>
4.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'ye Özgü Litik Bakteriyofaj .....	32
4.1.1. Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofajın Saflaştırılması .....	32
4.1.2. Bakteriyofajın Titresinin Yükseltilmesi ve Belirlenmesi .....	33
4.2. Bakteriyofajın Protein Profillerinin Analizi .....	35
4.3. Bakteriyofajın Transmisyon Elektron Mikroskobu İle Karakterizasyonu.....	35
4.3.1. Bakteriyofajın Morfolojik Karakterizasyonu.....	35
4.3.2. Faj-Bakteri Adsorbsiyonu .....	36
4.4. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu .....	38

4.4.1. Bakteriyofaj Genomu.....	38
4.4.2. Bakteriyofaj Genomunun Restriksiyon Endonükleazlar İle Kesilmesi .....	39
4.4.3. Bakteriyofaj DNA'sının Dizi Analizi Sonuçları.....	39
4.5. Bakteriyofajın Çoğul Dirençli <i>A. baumannii</i> İzolatları Üzerine Etkisi .....	40
4.6. Bakteriyofajın Diğer Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi .....	41
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>43</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>50</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>61</b>
<b>EK.1.ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>61</b>
<b>EK.2. ETİK KURUL .....</b>	<b>62</b>

## TEŐEKKÜR

Çalıőmam boyunca benden desteklerini esirgemeyen danıőman hocam, Sayın Prof. Dr. Barış OTLU'ya; Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL'a ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĐLU'na, Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĐULLARI'na, Prof. Dr. ÇiĐdem KUZUCU'ya, Prof. Dr. Selma AY'a, Yrd. Doç. Dr. Yücel DUMAN'a Yüksek Lisans eğitimim boyunca vermiő oldukları desteklerden dolayı teőekkür ederim. İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (BAP) ve maddi manevi destekleriyle her zaman yanımda olan rahmetli amcam Mustafa DÜZLEME'ye ve aileme katkılarından dolayı teőekkür ederim.

**Betül ÇELİK**  
**Malatya-2017**

## ÖZET

### Çoğul Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşuna Özgü Litik Bakteriyofaj Araştırılması

**Amaç:** *Acinetobacter baumannii* özellikle yoğun bakım ünitelerinde çok sık saptanan önemli bir hastane patojenidir. Artan antimikrobiyal direnç, bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmış ve son zamanlarda tüm antibiyotiklere dirençli suşların yaygınlaşması sonucu önemli hasta kayıpları yaşanmıştır. Bu sorun, antibiyotik çağı öncesinde popüler olan bakteriyofaj terapisini yeniden gündeme getirmiştir. Bu çalışmada, çoğul ilaç dirençli *A. baumannii* suşuna özgü litik bir DNA fajının izole edilmesi, karakterizasyonu ve tedavide kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** İnönü Üniversitesi atık su tesisleri ve kampüs çevresel su kaynaklarında belirlenen toplam 22 farklı bölgeden 250 su örneği alınmıştır. Bu örneklerde litik bakteriyofaj aranması çift agar yöntemi ile yapılmıştır. Potansiyel litik bakteriyofajların morfolojik ve genomik karakterizasyonları için SDS-PAGE, DNA dizi analizi ve elektron mikroskopu kullanılmıştır. Bununla birlikte, potansiyel litik faj adaylarının konak özgüllüğü 130 klinik *A. baumannii* izolatu ve diğer gram negatif ile türler üzerinde test edildi.

**Bulgular:** Toplanan 250 su örneğinin 12'sinde *A. baumannii*'ye karşı potansiyel litik etki gösteren faj bulunmuştur. Bunlardan *A. baumannii*'ye özgü en güçlü litik etki göstereni seçilerek ABO-Faj adı verilmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Transmisyon elektron mikroskopik incelemede bu fajın ikozahedral kapsid simetrisine sahip ve kuyuksuz bir yapıda olduğu görülmüştür. Fajın protein profili belirlenmiş ve nükleik asit dizisi veri tabanları ile karşılaştırıldığında "Acinotabacter phage WCHABP1" ile %95 homoloji gösterdiği belirlenmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışmada saptadığımız ABO-Fajının dirençli *A. baumannii*'ye karşı yüksek düzeyde etkili olduğu görülmüştür. Bakteriyofajların, böylesi enfeksiyonların tedavisi için bir tedavi alternatifi olabileceğine dair güçlü veriler elde edilmiş olup, yeni litik faj tiplerinin belirlenmesi için farklı habitatlarda kapsamlı çalışmalar yapılmasına gereksinim vardır.

**Anahtar Kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, bakteriyofaj, litik faj, faj tedavisi



## ABSTRACT

### **Investigation of Lytic Bacteriophage Specific for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain**

**Aim:** *Acinetobacter baumannii* is an important nosocomial pathogen that is frequently detected in the intensive care units. Increasing antimicrobial resistance has complicated the treatment of the infections caused by this bacterium, and particularly in the recent years, significant patients lost have occurred as the distribution of pandrug-resistant strains. This problem has revived the bacteriophage treatment that was popular before the antibiotic era. In this study, isolation and characterization of a lytic DNA phage specific for resistant *A. baumannii*, and to study the therapeutic potency of this phage were aimed to be investigated.

**Material and Methods:** A total 250 water samples were collected from the previously determined 22 points in the Inonu University wastewater treatment facility and the environmental water resources around the campus. Lytic bacteriophages were investigated in these samples with double agar method. Morphological and genomical characterization of the potential lytic bacteriophages was assessed with SDS-PAGE, DNA sequencing, and electron microscopy. Additionally, the specificity of the detected phages was analyzed on 130 clinical isolates of *A. baumannii*, and other gram negative bacterial species.

**Results:** *Acinetobacter baumannii*-specific potential lytic phages were found in 12 of total 250 samples. The phage which showed the most potent lytic effect to *A. baumannii* was selected among them, named as “ABO-Phage”, and further characterized. In transmission electron microscopy, it was observed that the phage was in icosahedral capsid symmetry without tail. The protein profile of the phage was determined, and when its nucleic acid sequence was compared with the database, it was shown that the phage was exhibiting 95% homology with “*Acinetobacter* phage WCHABP1”.

**Conclusion** It was observed that the phage found in this study, ABO-phage, was highly effective to resistant *A. baumannii* strains. Strong evidence indicating bacteriophages can be a treatment alternative for such infections is determined, and

there is need for comprehensive studies in different habitats to detect novel lytic phages types.

**Key Words:** *Acinetobacter baumannii*, bacteriophage, lytic phage, phage treatment



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>AbOMPA</b>	: <i>Acinetobacter baumannii</i> dış membran proteinleri
<b>AFLP</b>	: Amplifiye edilmiş fragment polimorfizmi
<b>ApaI</b>	: Restriksiyon endonükleaz enzimi
<b>APS</b>	: Amonyumpersülfat
<b>ARDRA</b>	: Amplifiye edilmiş ribozomal deoksiribonükleik asit restriksiyon analizi
<b>ATP</b>	: Adenozintrifosfat
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum klorür
<b>Cfu</b>	: Koloni oluşturma birimi
<b>CIM</b>	: Karbapenem inaktivasyon metodu
<b>Cl</b>	: Lizojenik döngünün başlaması için gerekli protein
<b>Cro</b>	: Litik döngünün başlaması için gerekli protein
<b>Csms</b>	: Şaperon salgı membran sistemi
<b>Csu</b>	: chaperon-usher patway
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DNaz</b>	: Deoksiribonükleaz
<b>dsDNA</b>	: Çift zincirli deoksiribonükleik asit
<b>EcoRI</b>	: Restriksiyon endonükleaz enzimi
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>EMB</b>	: Eozin metilen blue
<b>F pilı</b>	: Fertilitate faktörü
<b>g</b>	: Relatif santrifüj kuvveti (dakikadaki dönüş sayısı)
<b>G+C</b>	: Guanin+Sitozin
<b>gr</b>	: Gram
<b>HA</b>	: Herellea agar
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>HeLa</b>	: Henrietta lacks hücreleri
<b>HST</b>	: Hücre süspansiyon tamponu

<b>ICTV</b>	: Virüs taksonomisi uluslar arası topluluğu
<b>IDSA</b>	: Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Birliği
<b>kDA</b>	: KiloDalton
<b>LAM</b>	: Leeds <i>Acinetobacter</i> medium
<b>LB broth</b>	: Lurian Bertani broth
<b>LMA</b>	: Düşük erime ısılı agaroz
<b>M</b>	: Molarite
<b>mA</b>	: Miliamper
<b>MALDI TOF MS</b>	: Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi
<b>MATE</b>	: Multidrug and toxic compound extrusion system
<b>MDR</b>	: Çoklu ilaç direnci
<b>MFS</b>	: Major facilitator superfamilies
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	: Magnezyum sülfat
<b>MIC</b>	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>MLST</b>	: Multi lokus sekans tiplemesi
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>MRSA</b>	: Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>N</b>	: Normalite
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorid
<b>OD<sub>600</sub></b>	: 600 nanometre dalgaboyundaki optik yoğunluk
<b>OMPs</b>	: Dış membran proteinleri
<b>PEG6000</b>	: Polietilen glikol 6000
<b>PFGE</b>	: Darbeli alan jel elektroforezi
<b>Pfu</b>	: Plak oluşturma birimi
<b>RAPD</b>	: Rastgele arttırılmış polimorfik deoksiribonükleik asit
<b>REP-PCR</b>	: Tekrarlayan ekstrasjenik palindromik polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RFLP</b>	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RND</b>	: Resistance-nodulation division
<b>rpm</b>	: Revolution per minute (santrifüjün dakikadaki dönüş sayısı)

<b>Sapr</b>	: Yüzey yapışma protein bölgesini
<b>SDS</b>	: Sodyumdodesilsülfat
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
<b>SF</b>	: Serum fizyolojik
<b>SOC</b>	: Süper optimize edilmiş et suyu
<b>TBE</b>	: Tris borik asit edta tamponu
<b>TE</b>	: Tris edta tampon
<b>TEM</b>	: Transmisyon elektron mikroskobu
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
<b>Tris-HCl</b>	: Tris hidroklorid
<b>V</b>	: Volt
<b>VRE</b>	: Vankomisin dirençli Enterokok
<b>Vtx 1, 2</b>	: Verotoksin1, 2
<b>w/v</b>	: Ağırlıkça yüzde
<b>XbaI</b>	: Restriksiyon endonükleaz enzimi
<b>XDR</b>	: Extrem ilaç direnci

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Temel bakteriyofaj ailelerinin morfolojik ve genom karakteristikleri .....	15
Şekil 3.1. Faj ve "mock" inoküle kültürlerin dört saatlik inkübasyon sonundaki görünüşleri. ....	22
Şekil 4.1.. Çift tabaka agar yöntemiyle faj varlığının tespiti .....	32
Şekil 4.2. Fajın bakteriyi enfekte etmesiyle oluşan iki liziz zonu. ....	33
Şekil 4.3. Fajın saflaştırılması için, faj plaklarının çift agardan bistürü ile kesilerek çıkarılması. ....	33
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda faj solüsyonlarının <i>A. baumannii</i> suşunun sayısı üzerindeki etkisi. ....	34
Şekil 4.5. SDS-PAGE analizi. ....	35
Şekil 4.6. Bakteriyofajın TEM’de görüntüleri.....	36
Şekil 4.7. Bakteriyofajların <i>A. baumannii</i> ’ye adsorbsiyonu. ....	37
Şekil 4.8. İnkübasyonun 20. dakikasında bakteriyofajın <i>A. baumannii</i> konakçısına adsorbsiyonu. ....	37
Şekil 4.9. İnkübasyonun 20. dakikasında bakteriyofajın <i>A. baumannii</i> konakçısına adsorbsiyonu. ....	37
Şekil 4.10. İnkübasyonun 20. dakikasında bakteriyofajın <i>A. baumannii</i> konakçısına adsorbsiyonu. ....	38
Şekil 4.11. Faj DNA’sının %1’lik agaroz jelde elektroforez görüntüsü. ....	38
Şekil 4.12. <i>A. baumannii</i> fajının <i>EcoRI</i> ile kesiminin %1’lik agaroz jelde görünümü. .	39
Şekil 4.13. Çalışmamızda elde ettiğimiz <i>A. baumannii</i> ’ye özgü litik bakteriyofaj genomunun 978 bazlık DNA dizisi .....	40
Şekil 4.14 Çalışmamızda elde ettiğimiz <i>A. baumannii</i> ’ye özgü litik bakteriyofaj genomunun ait 978 bazlık DNA fragmentine ait baz dizisinin BLAST sorgulaması.....	40
Şekil 4.15. Çalışmada kullanılan çoğul dirençli <i>A. baumannii</i> izolatu CIM sonucu.....	41
Şekil 4.16. Farklı bakteri türlerinde <i>A. baumannii</i> faj özgüllüğü denemeleri .....	42

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 3.1.</b> SDS-PAGE ayırım jelinin içeriği.....	23
<b>Tablo 3.2.</b> SDS-PAGE yığılma jeli .....	23



# 1. GİRİŞ

Bin dokuz yüz yetmişli yıllara kadar patojen olarak kabul edilmeyen *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), bugün için hastalık yapıcı önemli bir bakteri türüdür (1). Başta hastane enfeksiyonları olmak üzere, bakteriyemi, üriner sistem enfeksiyonları, kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları, diyabetik ayak sendromu, ventilatör ilişkili pnömoni gibi birçok hastalığın etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (2, 3). Özellikle derin yara ve yanık enfeksiyonlarında *A. baumannii* fırsatçı bir patojendir (4, 5).

Günümüzde giderek artan antibiyotik direnci önemli bir sorundur (6). Son yıllarda yapılan çalışmalar, karbapenem grubu antibiyotikler, polimiksin B ve kolistin antibiyotiğine karşı gelişen direncin yanı sıra, *A. baumannii* türlerinde çoğul ilaç direnci de giderek artmaktadır (2, 6–8).

Mevcut antibiyotiklere karşı gelişen direnci kontrol altına almak amacıyla yeni antibakteriyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi bir zorunluluk haline gelmiştir (2, 9). Araştırılan yeni yöntemler arasında en önemli potansiyeli bakteriyofaj terapisi oluşturmaktadır (10, 11). Bakteriyofaj terapisi, fajların kullanılmasıyla bakteriyel enfeksiyonların kısa sürede kontrol altına alınması esasına dayanmaktadır (12). Kısa sürede etki gösterebilen ve herhangi bir yan etkisi bildirilmeyen, tamamen doğal yollarla tedavi yeteneğine sahip ilaç dışı bu antibakteriyel ajanların kullanımıyla tıpta yeni bir yol açılabilir (4, 11). Bu nedenle faj terapisi üzerine yapılan araştırmalar her geçen gün artmaktadır.

Çalışmamız kapsamında, hedef mikroorganizma olarak seçtiğimiz *A. baumannii* izolatlarına özgü stabil litik özellik gösteren faj izolatları araştırılacaktır. İzole edilen fajların karakterizasyonu için faj partikülleri üretilerek zenginleştirilecek, genomik nükleik asit tipleri ve protein profilleri belirlenecektir. DNA fajı olduğu saptananların gerek faj partiküllerinden gerekse bakteriyel hücrelerden elde edilecek replikatif formlarının restriksiyon haritalaması yapılacak, sindirme ürünlerinden elde edilen fragmentlerin plazmid vektörlere klonlanması ile elde edilecek kalıplardan DNA dizileme çalışmaları gerçekleştirilecektir. Sekans bilgisinin nükleik asit dizi veri tabanları ile karşılaştırılması yapılacaktır. Ayrıca saflaştırılmış faj partikülleri, transmisyon elektron mikroskopi tekniği ile görüntülenerek yapılan tiplendirme



desteklenecektir. Böylelikle *Acinetobacter baumannii* tarafından oluşturulan özellikle yara enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir, rekombinant DNA teknolojisi ile modifiye edilmeye elverişli potansiyel faj terapi ajanlarının araştırılması için bir n çalışma yapılmış olunacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Acinetobacter baumannii*

Fırsatçı bir patojen olan *A. baumannii*, Moraxcellacea ailesinden olup gram negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketsiz, kokobasil görünümünde ve non-fermentatif bir bakteridir. Kuru ve cansız yüzeylerde uzun süre canlı kalabilme özelliğinin yanı sıra farklı ortam koşullarına oldukça dayanıklı olması da virülansını arttıran en önemli faktörlerden biridir. *Acinetobacter* cinsi bakteriler, sepsisten osteomyelite kadar değişen birçok önemli enfeksiyona neden olurlar. Bununla birlikte, sık görülen sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyon etkenlerinden biridir. Özellikle yoğun bakımlarda, hızlı gelişen çoklu ilaç direnci (MDR) ve ekstrem ilaç direnci (XDR) nedeniyle önemi giderek artmıştır. Bunun yanında *Acinetobacter* türleri, atık sulardan biyolojik fosfor fazlasının uzaklaştırılması gibi biyolojik dönüşüm süreçlerinde giderek artan bir kullanıma sahiptir (2).

### 2.2. Tarihçe ve Taksonomi

İlk olarak Beijerinck tarafından 1911 yılında topraktan izole edilen bu bakteriler, *Micrococcus calcoacticus* olarak isimlendirilmiştir (2). Ancak 1939 yılında DeBord'un üretral örnekler üzerinde yaptığı araştırmalarda gram negatif kokobasilleri izole etmesiyle *Micrococcus* yerine Yunanca "akinetos" yani hareket yeteneği olmayan anlamına gelen *Acinetobacter* adı verilmiştir (13). Bindokuzyüzdört yılında Brisou ve Prevot, *Achromobactereae* ailesinin hareketli üyelerinden hareket yeteneği olmayanları ayırmış ve hem oksidaz pozitif hem de oksidaz negatif türleri içeren pigmentsiz gram negatif saprofitik bakterileri yeniden düzenlemiştir. Baumann ve arkadaşları, bu mikroorganizmaları oksidaz negatif olarak karakterize ettikten sonra bakterinin üreme ihtiyaçlarındaki farklılıklara bakarak onları *Acinetobacter* cinsi altında sınıflandırmaya çalışmışlardır. Bindokuzyüzyetmişbir yılında Moraxella için yapılan kurul toplantısında, Baumann ve arkadaşlarının çalışması desteklenerek cinsler oksidaz negatif suşlar olarak sınırlandırılmıştır. Takip eden yıllarda Bouvet ve Grimont'un yaptığı çalışmada, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii* ve *A.*

*radioresistent* türlerini içeren 15'den fazla genomik tür tespit etmiştir. Moleküler biyolojideki gelişmelerle türlerin belirlenmesinde moleküler metotlar kullanılmaya başlanmasıyla, Moraxella cinsinde yer alan türler hücre şekli, flagella yapısı, DNA'da bulunan G+C içeriği ve üreme özelliklerine bakılarak *Acinetobacter* cinsi olarak ayrılmıştır. Bu sayede *Pseudomonales* takımı ve *Moraxellaceae* ailesinde sınıflandırılan *Gammaproteobacteria* grubundaki heterojenliğin farkına varılarak taksonomik sınıflandırma aşağıdaki şekilde yapılmıştır;

Alem: Bacteria

Şube: Proteobacteria

Sınıf: Gammaproteobacteria

Takım: Pseudomonales

Aile: Moraxellaceae

Cins: *Acinetobacter*

*Acinetobacter* türleri arasında klinik açıdan *A. baumannii* ilk sırada olmak üzere *A. ursingii* ve *A. schindleri* türleri de günümüzde oldukça önemli türler olarak karşımıza çıkmaktadır (2, 14).

### 2.3. Kültür Özellikleri ve Biyokimyasal Karakteristikleri

*Acinetobacter* spp. non-fermentatif, hareketsiz, katalaz pozitif, DNaz negatif, indol negatif, oksidaz negatif, çoğu izolatu nitratı redükte edemeyen, gram negatif kapsüllü kokobasillerdir. *Acinetobacter* türleri 20-42°C aralığında üreyebilirler. Ancak klinik önemi olan türler için optimum üreme ısısı ve süresi 33-35°C'de 18-24 saattir. Logaritmik üreme fazında eni 0.9-1.6 µm ve boyu 1.5-2.5 µm'dir. Kanlı agarda üreyen kolonileri tipik olarak pigmentsiz; beyaz veya krem renkte, düz veya mukoid, opak, 37°C'de 18-24 saatlik üreme sonucu 1-2 mm eninde gözlenmektedir (2, 13). *Eozin metilen blue* (EMB) agarda mavimsi veya mavi gri renkli koloni morfolojisi göstermektedir. Bu besiyerinin yanı sıra *Herellea agar* (HA)'da uçuk eflatun renkte; *Leeds Acinetobacter medium* (LAM)'da ise mor zeminde pembe renkte görülürler (15). Çevresel kaynaklardan izole edilen bazı suşların yayılabilen kahverengi pigmente sahip olduğu da araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (16). Rutin laboratuvarlarda kanlı

agar, triptik soy agar ve MacConkey agar gibi pek çok besiyerinde üretilebilirler. Bazı klinik izolatların koyun kanlı agarda hemoliz yapabilme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. *Acinetobacter* spp., tipik gram negatif hücre duvarına sahiptir. Ancak gram boyama yapıldığında, hücre duvarının kristal viyoleyi tutma eğiliminden dolayı boyanın hücre duvarından uzaklaştırılması zordur. Bu nedenle gram pozitif koklar ile karıştırılması olasıdır (2). *Acinetobacter* türleri içerisinde 44°C'de üreme yeteneğine sahip tek tür *A. baumannii*'dir. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden anaerobik şartlarda üreme yeteneği olmaması ve nitratı indirgeyememesi ile *Moraxella* ve *Neisseria* türlerinden ise oksidaz negatif olmalarıyla ayırt edilirler (13, 15).

*Acinetobacter* türlerinin identifikasyonunda kültür ve biyokimyasal temelli geleneksel yöntemlerin yanında, MALDI TOF-MS gibi kütle spektrometrik protein temelli yöntemler de kullanılmaktadır. İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılması için PFGE, REP-PCR, RAPD, PCR-RFLP ve AFLP genotipleme metotları kullanılmaktadır. Bunlardan; PFGE, ARDRA ve AFLP, ayırım yeteneğinin çok iyi olması nedeniyle günümüzde en sık kullanılan metotlardır. Bununla birlikte, global karşılaştırmaların yapılabilmesi ve dirençli suşların takip edilebilmesi için multilokus sekans tiplemesi (MLST) yöntemi kullanılmaktadır (17–19).

#### **2.4. Patogenez**

Geçmişte enfeksiyon etkeni olarak çok fazla önemsenmeyen *Acinetobacter* türleri, şimdilerde antibiyotikleri inaktive eden enzimler, porin kanalları, effluks pompaları gibi kazandıkları direnç mekanizmaları ile en güçlü antimikrobialeri dahi etkisiz kılabilen ve mortaliteyi arttıran ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *Acinetobacter* türlerinin bu düzeyde direnç kazanması; her geçen gün tarım ve hayvancılık alanlarında artan antibiyotik tüketimi, gelişen tıbbi uygulamalarla birlikte bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların artması ve gereksiz antibiyotik kullanımı gibi birçok nedene bağlanabilir (1, 20).

*A. baumannii*, tüm dünyada sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonlara ve salgınlara neden olabilen oldukça önemli bir patojendir. *Acinetobacter* spp.'in neden olabildiği enfeksiyonlar arasında sepsis, ventilatör ilişkili pnömoni, bakteriyemi, menenjit, üriner sistem enfeksiyonları, safra enfeksiyonları, peritonit, cilt ve yara enfeksiyonları, ventrikülit ve endokardit sayılabilir. Bununla birlikte bu bakteriler cilt veya solunum yolunda herhangi bir enfeksiyona neden olmadan da kolonize olabilirler. Özellikle

hastanede yatış süresinin uzaması bu kolonizasyonun artmasına neden olmaktadır (2, 7, 13).

*Acinetobacter* spp., insan cildinin doğal florasında bulunan ve çevreden de izole edilebilen potansiyel bir patojendir. Gram negatiflerin diğer cinsleri ile karşılaştırıldığında *Acinetobacter* türleri kuruluğa ve sıcaklığa karşı oldukça geniş toleransa (50-75°C) sahiptirler. Nemli ve kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilirler ve hatta bazı suşların sabuna toleransı tespit edilmiştir. Bu özelliklerinin oldukça fazla elektron yoğunluğuna sahip olan hücre duvarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çevre şartlarındaki kuruluğa *P. aeruginosa* ve *E. coli* sadece 24 saat dayanabilirken *A. baumannii* bu şartlarda 25 günden fazla canlı kalabilir. Yapılan bazı çalışmalarda *A. radioresistens*'in 157; *A. baumannii*'nin 30 günden fazla; *A. lwoffi*'nin ise 21 gün kuruluğa dayanabildiği rapor edilmiştir (2, 21, 22). Bunun yanında *A. baumannii*, normal insan serumunun kompleman sisteminin öldürücü etkisine karşı direnç gösterebilmektedir (23, 24).

Yapılan meta analizlerde, *A. baumannii*'nin sağlık bakımı ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olarak *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Enterococcus* spp., *Serratia* spp. ve *Enterobacter* spp. gibi etkenlerden sonra geldiğini bildirmektedir (2). Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalar, yoğun bakım ünitelerinde en sık izole edilen türün *A. baumannii* olduğunu, *P. aeruginosa* ve *S. maltophilia* daha az izole edildiği göstermiştir (25). Antibiyotik duyarlılıklarına bakıldığında kolistinin, *P. aeruginosa* (%100) ve *Acinetobacter* spp. (%99.39) için en etkili antibiyotik olduğu bildirilmiştir. *A.baumannii*'de karbapenem grubundan imipenem direnci gelişiminin ise %93.05 olduğu tespit edilmiştir. *Acinetobacter* enfeksiyonları, mortalitenin %34'ünü oluştururken hastane ilişkili enfeksiyonların ise %43'ünü oluşturmaktadır (2, 25, 26).

İnsanda *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarının enfektif dozu henüz belirlenememiştir. Tanımlanmış olan birkaç virulans faktörünün dışında, toksinlerini ya da sitolizinlerini nasıl aktardığına dair mevcut çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bununla birlikte, *A. baumannii* ile çevresel örneklerden izole edilen *A. baylyi* genomları karşılaştırıldığında farklı olarak, pilus biyogenezi, demir alımı ve metabolizması, *quorum sensing* mekanizmaları, tip 4 sekresyon sistemi ile ilişkili genler tespit edilmiştir. İlginç olarak, *A. baumannii* çengel benzeri *csu* tip I pili (*chaperon-usher*

*patway*) ile cansız yüzeylere tutunurken, kısa, fibril benzeri ince pili ile de konak hücre yüzeyinde adezyonunu sağlar (2).

Başarılı bir enfeksiyon meydana getirmede ilk koşul bakterinin konak hücreye adezyonudur. *Acinetobacter* türleri, bakteriyel adezyonda önemli bir faktör olan hücre yüzey hidrofobisitesi meydana getirirler (2). Bakteri, hücre yüzey hidrofobisitesini polisakkarit kapsülün L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asit yapılarıyla sağlar. Bu yapılar bir araya geldiğinde hücre yüzeyinin hidrofobisitesini sağlayarak bakteriyi fagositoz gibi dış etkenlerden korur ve bakterinin derin yüzeylere penetre olmasını sağlar (14). Hidrofobisite bakteriye aynı zamanda katater ve protez gibi plastik yüzeylere tutunma yeteneğini de kazandırır. *Acinetobacter* spp. genellikle, logaritmik üreme fazı boyunca bu polisakkaritleri üretir ve glukozu kullanarak D-glukronik asit, D-mannoz, L-ramnoz ve D-glukoz bloklarını inşa eder (2, 7, 13). Yüzey hidrofobisitesine kolonizasyon faktörleri, komplementer hücre yüzey reseptörleri, fimbrialar ve diğer hücre duvar bileşenleri, bakterinin konağa adhezyonunu sağlayan hücre yüzey enzimleri de katkı sağlar (2).

Virülans faktörleri içerisinde bir diğer önemli nokta ise verotoksin üretimidir. Verotoksinler ilk olarak *A. haemolyticus*'ta rapor edilmiştir (27). *Escherichia coli* ile *Shigella dysenteriae* gibi enterik bakterilerin çoğu tarafından üretilen verotoksin, kanlı diyare ile karakterizedir (2). Doğrudan hücre ribozomlarına giderek protein sentezini inhibe ederler. Verotoksinler, Vtx-1 ve Vtx-2 olmak üzere iki antijenik gruptan oluşmaktadır (2, 28). *Acinetobacter* spp.'lerin ürettiği bu enzimlerin lipit yıkımına neden olduğu ve nötrofiller üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir (14).

*A. baumannii* için patogeneizde önemli diğer bir virülans faktörü ise siderofor üretimidir. Siderofor, bakterilerde demir alımından sorumlu demir bağlayan proteinlerdir. Ortamdaki demir bakterilerin üremesinde oldukça önemli bir faktördür (14). *A. baumannii*, farklı demir kaynaklarını kullanabilme yeteneği ile konağa kolonize olmayı sağlayan bağımsız demir kazanım sistemine sahiptir. Bakteriyel sideroforlar genel olarak aerobaktin olarak adlandırılırken *Acinetobacter* türlerine ait sideroforlar ise acinetobaktin olarak adlandırılır. Acinetobactin, düşük moleküler ağırlıklı, yüksek affiniteye sahip demir şelatlayıcı siderofordur ve histidin dekarboksilasyonu sonucu oluşan amin histamin yapımından sorumludur (29, 30). Serbest demirin vücuttaki normal konsantrasyonu  $10^{-8}$  M'dir ve insan vücudundaki bakterinin canlılığı için gerekli

olan konsantrasyon  $10^{-6}$ 'dır. Bakteri, sideroforları kullanarak ekzojen demiri bağlamasıyla demir ihtiyacını karşılamış olur. (2, 31, 32).

Son zamanlarda yoğun ilgi toplayan başka bir virülans faktörü ise dış membran proteinleridir (outer membrane proteins, OMPs). Gram negatif bakterilerin dış membran proteinleri, antibiyotik direncinde olduğu gibi konak hücreye adaptasyon ve patogeneizde temel rollere sahip olduğu bilinmektedir. *Acinetobacter* hücreleri, konak hücrenin yaşamsal aktivitesini sonlandıran bir OmpA (outer membrane protein A) ile çevrelenmiştir. Bir enfeksiyon boyunca, OmpA ökaryotik hücreye bağlanır ve nükleus içine giderek hücre ölümüne neden olur. OmpA ailesinden olan dış membran proteinleri *Acinetobacter* suşlarında farklı karakterizasyona sahiptir (2, 14, 33). Dış membran proteininin kodlayan her *Acinetobacter* suşunda yalnızca bir genin bu işten sorumlu olduğu rapor edilmiştir (2). Örneğin *A. baylyi* OmpA proteinleri sadece emülsiyon aktivitesine sahipken, *A. baumannii* hücre duvarında yer alan 38 kDa molekül ağırlığına sahip OmpA (AbOmpA) da bakterinin epitelial yüzeylere yapışmasını sağlar. AbOmpA, proapoptotik molekülleriyle epitelial hücrelerin apoptozisini indükler, gastrin ve interlökin B gen ekspresyonunu uyarıcıdır (2, 14). Ayrıca OmpA proteinin biyofilm oluşumunda da etkili olduğu düşünülmektedir (34).

Virülans faktörleri, sıcaklıktaki değişim, oksijen konsantrasyonu, osmotik basınç ve çevresel uyarıcılar gibi değişkenlere göre düzenlenmektedir. Enfeksiyon süresince, çeşitli virülans faktörlerin ekspresyonu, patojenin gereksinimine bağlı olarak düzenlenmektedir. Kapsül ve hücre duvarı gibi faktörler patojeniteyi arttıran önemli virülans faktörlerdir. Bu düzenlemeler sayesinde patojen konağa uyum sağlama yeteneği kazanmaktadır (35).

Konak hücre tiplerinin *A. baumannii*'ye karşı duyarlılıklarının farklı olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda özellikle epitel hücrelerin *A. baumannii* virülans faktörlerine duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte makrofajların da çoğunun duyarlı olduğu halde HeLa hücrelerinin ise *A. baumannii* enfeksiyonlarına dirençli olduğu kaydedilmiştir (36, 37).

## 2.5. Antibiyotiklere Direnç ve Direnç Mekanizmaları

Günümüzde *Acinetobacter* cinsi bakterilerin antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu direnç oldukça büyük bir problemdir (6, 14, 8). Araştırmalar *Acinetobacter*

spp.'in ampisilin, sefalotin, karbenisilin, gentamisin, amikasin, kloramfenikol, tetrasiklin, kotrimaksazol, siprofloksasin ve sefoperazon'a dirençli olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra, *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde 1. kuşak ampisilin ve 2. kuşak sefalosporinler, kinolonlar, minosiklinler, kolistin, aminoglikozid, imipenem, sulbaktam ve gentamisin antibiyotikleri kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklere karşı gelişen direnç, tedavi sürecini etkileyerek dünya çapında büyük bir kaygıya neden olmaktadır. Çoğu *A. baumannii* suşu, aminoglikozidler, tetrasiklinler, sefalosporinler, ampisilin, sefotaksimler, kloramfenikol, gentamisin ve tobramisine karşı dirençlidir. Bazı araştırmalar, genotipte karbapenem direnci taşıyan izolatların etken olduğu enfeksiyonlarda kolistin kullanımının tedavi sürecinde başarı sağlayacağını bildirmiştir (8). Aynı şekilde, sulbaktam-ampisilin veya polimiksin B-imipenem-rifampisin gibi antibiyotik kombinasyonlarının ve tigesiklinin *Acinetobacter* türleri üzerinde oldukça yıkıcı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak son zamanlarda *A. baumannii* suşlarında kolistin ve polimiksin B direnci de bildirilmeye başlamıştır (8).

*Acinetobacter*'lerde karbapenemlerin kullanımı, bakterinin bu antibiyotiği yıkacak enzimlere sahip olması ve antibiyotiğin hücre içine girişini sağlayan dış membrandaki porin kayıplarına bağlı olarak riskli hale gelmektedir. *Acinetobacter*'lerin sahip olduğu antimikrobiyal direnç hem intrinsik hem de gen aktarım mekanizmaları yoluyla sonradan kazanılmıştır. Penisilin bağlayan proteinler, dış membran proteinlerinde yüksek veya düşük permeabilite, aktif efluks pompa sistemi (AdeABC ve AdeDE benzeri efluks sistemi), hedef bölgenin mutasyonu, modifiye enzimlerin inaktivasyonu gibi çeşitli direnç mekanizmaları tespit edilmiştir (2, 17, 38). PER-1, PER-2, VEB-1, AmpC sefalosporinaz benzeri geniş spektrumlu betalaktamazlar; serin oksasilinaz benzeri karbapenemazlar, OXA tipi karbapenemazlar, metallobetalaktamazlar, aminoglikozid modifiye enzimler gibi antibiyotikleri yıkan enzimler birçok çalışmayla rapor edilmiştir (6, 39). *Acinetobacter* gruplarında antibiyotiklere karşı etkin olan aktif pompa sistemleri üç grup altında toplanmıştır.

- MFS'ler (major facilitator superfamilies); tetrasiklinler için Tet (A)-eflüks sistemi, tetrasiklinler ve monoksilinler için Tet (B)-eflüks sistemi, kloramfenikol için CamI A-eflüks sistemi
- RND'ler (resistance-nodulation division); aminoglikozidler,  $\beta$ -laktamlar, kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin, etidyum bromid ve florokinolonlara duyarlılıkta azalmaya karşı Ade ABC (ATP bağlayan kasetler) eflüks sistemi



- MATE'ler (multidrug and toxic compound extrusion system); norfloksasin, ofloksasin, siprofloksasin, gentamisin, 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), triklosan, akriflavin, doksokrubisin, rodamin 6G ve etidyum bromide karşı Abe M efluks sistemi (40).

## 2.6. Epidemiyoloji ve Ekoloji

*A. baumannii*, tropikal bölgeler de dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinden sıklıkla izole edilmektedir (1, 2, 7). Hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı pnömonilerin en sık rastlanan etkenidir (14, 16, 41).

*A. baumannii* enfeksiyonlarında konağa ait risk faktörleri arasında kronik akciğer hastalıkları, sigara kullanımı, diabetes mellitus, alkolizm, uzamış hastane yatışı, cerrahi müdahaleler, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, yoğun bakım ünitesi ya da yanık ünitesinde yatış, mekanik ventilasyon, parenteral beslenme, katater varlığı sayılabilir (14, 42, 43). Ancak, *A. baumannii* ile ilgili birçok epidemiyolojik rapor olduğu halde diğer türlerle oluşan enfeksiyonlarla ilgili veriler oldukça azdır (2, 14, 24).

*Acinetobacter* cinsi bakteriler çeşitli metabolitleri ve karbon kaynaklarını kullanabilmeleri, farklı sıcaklık ve pH değişimlerinde canlı kalabilmeleri nedeniyle doğanın her yerinde serbest halde saprofit olarak yaşarlar (44). Ayrıca bu bakteriler fostatı, polifosfat olarak muhafaza edebildiklerinden, fosfatın biyolojik degradasyonunda potansiyel kullanıma sahiptir (45). Bununla birlikte farklı *Acinetobacter* türleri farklı habitatlarda yaşamlarını sürdürmektedir. Örneğin; *Acinetobacter* genomspace-3 grubu suda, çamurda, sebzeler üzerinde ve insan cildinde; genomspace-11 grubu ise su ve çamurda, sebzeler üzerinde ve insan bağırsak florasında yaşamını sürdürmektedir (2, 46).

*Acinetobacter* türleri kuş, balık ve gökkuşağı alabalıkları gibi hayvansal kaynaklardan da izole edilmiştir. Tavuk, hindi ve danalarda septisemi, ineklerde mastitit ve metritit, sığır, domuz ve atlarda düşük, sığırlarda keratokonjüktivit, danalarda omfalitis, kedilerde kulak enfeksiyonları, atlarda solunum yolu enfeksiyonları ve balanopostit rapor edilmiştir. *Acinetobacter baumannii* ve *A. beijerinckii*, hayvanlarda hastalık etkeni olan en önemli *Acinetobacter* türleridir (2, 47)

*Acinetobacter* türleri genellikle mukoz membranlarda ya da farinkste, insan solunum yolu salgı sistemi, idrar, bağırsak ve diğer klinik örneklerde kolonize

olabilmektedir. Yapılan bir araştırmada alın, burun, kulak, boğaz, trake, konjunktiva aksilla, el, kasık, vajina, perine ve ayak parmakları arasından alınan numunelerde *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir. Flora elemanı olarak *A. baumannii*'de sıklıkla izole edilen türler arasındadır (48).

Biyofilm, polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitlerden yapılmış olan polimerik bir matriks ve matriks yüzeyine tutunan mikroorganizmaların bileşiminden oluşur. Patojen bakteriler tarafından oluşturulan bu biyofilm formasyonu bakterinin abiyotik ortamda canlılığını korumasını sağlar (2, 49). Biyofilmler fonksiyon bakımından dokulara benzerdir ve matriks polimerinin periyodik kasılmasıyla extraselüler ortamda iyonik değişim oluşarak matrikste kanalların içine besin akışı meydana gelir. Pilus aracılı biyofilmler (PMB) özellikle *Acinetobacter* spp.'den *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. lwoffii* ve *A. calcoaceticus*'da görülmektedir. Bu sayede cam, medikal araç ve gereçler, metal, seramik ve diğer cansız nesnelere üzerinde mikroorganizma tabakası oluşmaktadır. Bakteri hücre yüzeyindeki pili ve hidrofobik yüzey proteinleri insan epitel hücrelerin yüzeyine tutunmayı sağlayarak enfeksiyon sürecini başlatır. *A. baumannii* hücreye başarılı bir şekilde adezyonu sağladıktan sonra ekzopolisakkarit salgısı başlatılır (50–52).

Biyofilm oluşumu bakterileri, fagositozdan, antibiyotiklerden ve her türlü çevresel değişkene karşı korur. Aynı zamanda biyofilm sayesinde, konak immün yanıtına direnç gelişebilir. Biyofilm konusunda *A. baumannii* biyofilmleri üzerinde birçok çalışma mevcuttur. Biyofilm formasyonundaki diğer bakterilerden farklı olarak, *Acinetobacter* spp.'de tip IV pili, kamçı ve fimbria gibi intrinsik faktörler ile kolaylaşmış olup tahmin edilen şaperon salgı membran sistemi (csms) ve yüzey yapışma protein bölgesinin (sapr) sorumlu olduğu rapor edilmiştir. İşlem genellikle, reversible tutunma, irreversible tutunma, olgunlaşma ve dağılmadan meydana gelir. *A. baumannii* enfeksiyonları sıklıkla, foley katater, venöz katater ve serebrospinal şant üzerinde biyofilm yoluyla gerçekleşmektedir (2, 50). Çoğul dirençli suşların biyofilm süreçleri oldukça gelişmiş olduğundan, biyofilm formasyonun aynı zamanda antibiyotik direnci ile de doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ek olarak bu biyofilm formasyonundan oluşan *A. baumannii* biyofilm birliği proteinleri farelerde humoral immün yanıtın uyarılması için yeterlidir (53).

Biyofilm formasyonunun düzenlenmesinde *quorum sensing* önemli bir etkiye sahiptir. Sinyal moleküllerinin algılanması, bakterinin bulunduğu ortamda düşük

veya yüksek miktardaki popülasyon yoğunluğunu ayırt edebilmesini sağlamak ve böylece ortamda bakteri sayısındaki değişikliğe cevap olarak gen ekspresyonunun popülasyon düzeyindeki kontrolünü sağlamaktadır (54). Bu mekanizma ile biyofilmdeki bakteriler arasında iletişim sağlanmaktadır. *A. baumannii*, primer sinyal molekülü olarak rapor edilen N-(3-hydroxydodecanoyl)-L-HSL ile farklı zincir uzunluklarının N-acylhomoserine lactones olarak adlandırılan *quorum sensing* moleküllerini üretme yeteneğine sahiptir. *A. baumannii* biyofilm formasyonunda bilinen üç büyük otoindükleyici sentaz geni tanımlanmıştır. Bunlar, *AbaI* otoindükleyici, *Bap* proteini ve *csu-coded chaperone-usher pilus* sistemidir (55).

Hastanelerde gelişen enfeksiyonların tarihine bakıldığında Gram negatif basillerden özellikle *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae*; sonraki süreçte Gram pozitif metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) ve vankomisin dirençli *Enterococci* (VRE) yoluyla meydana gelen enfeksiyonlar ciddi sorunlara neden olmuştur. Ancak, hastanelerde antibiyotik kullanımının yaygınlaşmasıyla *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* türlerini içeren Gram negatif sağlık bakımı ile ilişkili bakteriyel patojenlerde çoğul direnç hızla yayılmıştır. Hastanede tekrar tekrar kullanılabilen birçok araç gereçler, sağlık personelinin cildinde, yataklarda, yastıklarda ve ventilatör ve musluk suyunda bulunduğu tüm ortamlardan izole edilebilir.

## **2.7. Bakteriyofajlar**

Protein kapsid ile sarılı nükleik asitleri olan, küçük, viral yapılı ve bakterileri enfekte eden mikroorganizmalara bakteriyofaj denir (4). Bakteriyofajlara toprak, atık sular, dışkı, canlı vücudu ve gıdalar gibi bakteriyel floranın bulunduğu her ortamda rastlamak mümkündür (56–58). Fajların, genetik çeşitliliği ve transdüksiyon potansiyeli oldukça yüksek olduğundan biyolojik etkinliği oldukça fazladır (57, 59).

### **2.7.1. Bakteriyofajlar ve Faj Terapisinin Tarihçesi**

İngiliz bakteriyolog Ernest Hankin (1896)'in Ganj ve Jumna nehirlerinde gözlemlediği bulgular ışığında başlayan bakteriyofaj araştırmaları, yine İngiliz bir bakteriyolog olan Frederick Twort (1915) ve Kanadalı mikrobiyolog Felix d'Herelle (1917) tarafından sürdürülmüştür. Bu iki bilim adamı, bakterileri öldürme yeteneğine

sahip, birbirinden bağımsız küçük varlıkların olduğunu keşfetmiştir (60, 61). d'Herelle, bakteriyofajların aydınlatılmasında önemli bir adım atarak, onların keşfine ışık tutmuştur. d'Herelle, 1915 yılında ortaya çıkan hemorajik bir dizanteri salgınında, dizanterili hastaların dışkılarından bir filtrat hazırlamış ve bu filtratı diğer hastalardan izole edilen *Shigella* izolatları ile karıştırmıştır. Bu karışımı besiyeri üzerine yaydığına, üreme ortamında inkübasyon sonrası birtakım şeffaf plak oluşumları gözlemlemiştir. D'Herelle, gözle görülmeyen bu küçük varlıklara “bakteriyofaj” adını vermiştir. Böylelikle 1917 yılında ilk bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmiştir (62). Süregelen yıllarda, d'Herelle fajları bazı hastalıkların tedavisinde kullanarak semptomlarda ciddi anlamda gerileme olduğunu rapor etmiştir (60). Hastalıkların tedavisinde ilk kez bir terapi ajanı olarak kullanımının ardından birçok araştırmacı enfeksiyonların tedavisinde bakteriyofajlara yönelmiştir. Fajlara adeta bir mucize gözüyle bakılmaya başlanılmıştır. Fajlar yapıları itibariyle oldukça basit canlılardır, tedavi sırasında toksik bir yan etkileri yoktur. Ancak bazı kaynaklar fajların, vücuda alındıklarında immün sistemin devreye girdiğini ve fajlara antijen gibi davranabildiğini rapor etmiştir. Tüm tartışmalar devam ederken penisilin keşfi ile antibiyotik çağı başlamış ve fajların terapötik etkisi bir süreliğine önemini yitirmiştir (63, 64).

### **2.7.2. Bakteriyofajların Yapısal Özellikleri**

Fajlar, yapısal olarak tek tip nükleik asit ve nükleik asidi çevreleyen bir kapsidden oluşmuştur. Kapsid, protein yapıdaki kapsomerlerin bir araya gelmesiyle oluşur. Sahip oldukları nükleik asit, morfolojik ve genomik açıdan yüksek çeşitlilik göstermektedir. Bunun yanı sıra tipik olarak baş, boyun, kuyruk ve kuyruk fibrillerinden oluşabilen fajların, morfolojik karakterizasyonu incelendiğinde büyük ölçüde farklılıklar ortaya çıkmıştır. Fajlarda baş bölgesi, birbirinden farklı büyüklükte yapılar göstermekle beraber simetrik bir yapıya sahiptir. Fajlar baş bölgelerinde çembersel veya lineer, çift ya da tek zincirli DNA veya RNA'dan oluşan nükleik asit içermektedir. Kuyruk bölgesi ve taban fibrilleri de farklılıklar gösterebilmektedir. Kuyruk tabanı, bir tabla ve bu tablaya bağlı olan taban fibrillerinden oluşurken, bazıları yumru veya topuz şeklinde görülen farklı taban yapılarına sahiptir. Kuyruk fibrilleri yardımıyla bakteri hücre duvarındaki özgül reseptörlere adsorbe olan faj, nükleik asidini kuyruk yardımıyla bakteriye enjekte etmektedir. Kuyruk faj tipleri de kasılabilme özelliklerine göre farklılıklar göstermektedir. Kasılabilen kuyruklu fajlarda nükleik asit enjeksiyonu

kuyrukta oluşan bir kasılma sonucu gerçekleşirken, kasılmayan kuyruklu fajlarda bu olay daha kompleks bir yapıda gerçekleşmektedir (65–70).

### **2.7.3. Bakteriyofajların Sınıflandırılması**

Binsekizyüzlerin sonlarında başlayan bakteriyofaj araştırmaları uzun yıllar tahminler doğrultusunda ilerlerken, elektron mikroskopunun keşfi sonrası 1940 yılında bakteriyofajların viral doğası yakından incelenebilmiştir. Sonraki yıllarda, fajların morfolojik karakterizasyonu ve nükleik asit tipinden yola çıkılarak sınıflandırılmaları yapılmıştır. Daha sonra tek iplikli DNA veya RNA'ya sahip kuyruklu, filamentöz ve ikozahedral fajlar tanımlanarak bugünkü faj sınıflandırmasının temeli oluşturulmuştur (69).

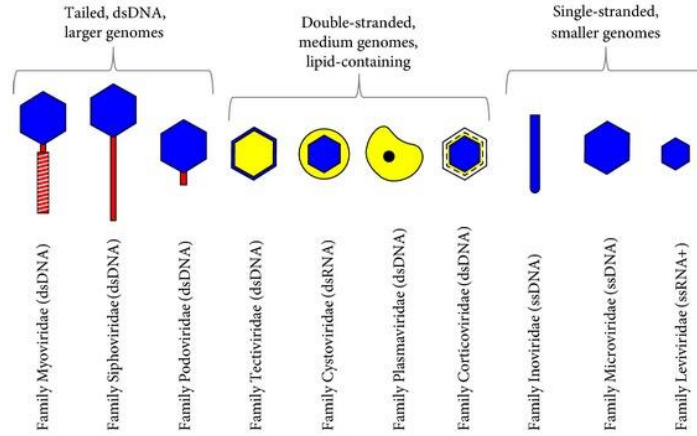
Bindokuyüzyetmişbir yılında Bradley, nükleik asit, konakçı özgüllükleri ve morfolojik karakterizasyonlarına göre altı faj morfotipinin varlığını bildirmiş, sonraki yıllarda fajların sınıflandırılması Ackermann tarafından morfolojik karakterizasyonu ve nükleik asit içeriklerine bakılarak yeniden düzenlenmiştir (71, 72).

Virüslerin cins ve tür temelinde ayrımı için belirgin bir kriter bulunmamaktadır. Bu nedenle Virüs Taksonomisi Uluslararası Topluluğu (ICTV), sınıflama için uygun özellikleri belirlemekte ve standart protokoller hazırlamaktadır (59). Günümüzde ICTV; 1 takım, 13 aile ve 31 faj cinsi tanımlamıştır (69). Araştırmacılar fajlarını tanımlarken, konakçı özgüllükleri, restriksiyon endonükleaz aktivitesi, sekans analizleri, yapısal protein profilleri ve serolojik test sonuçlarını kullanmaktadır. Böylelikle her çalışma, farklı çalışmalar ile kıyaslanarak elde edilen sonuçlar doğrultusunda fajların tanımlanması ve sınıflandırılması yapılmaktadır. Bu anlamda fajların evrimsel gelişimlerinin belirlenmesi, filogenetik çalışmaların doğru yönde ilerlemesi için oldukça önemlidir (64, 72–74).

### **2.7.4. Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü**

Bakteriyofajların doğasına bağlı olarak, nükleik asidini bakteriye enjekte ettikten sonra profaj halini alır ve bu evrede eğer konak hücrede stabil olarak ona hiçbir zarar vermeden kalırsa lizojenik; yeni viral partiküllerin oluşumu için konağı lizize uğratma eğilimi gösterirse litik faj olarak adlandırılırlar (4). Litik ya da lizojenik yaşam döngüsü

*cro* ve *Cl* proteinlerinin kontrolü altında gerçekleşmektedir (75, 76). Her protein kendi yolağını temsil etmektedir. Operatör bölgeye *cro* proteini bağlanırsa litik döngü, *Cl* proteini bağlanırsa lizojenik döngü devreye girer. Ancak bu iki protein birbiriyle yarış halinde olduğundan operatöre ilk bağlanan protein diğerinin sentezini inhibe eder. Litik fajlara T4 fajı, lizojenik fajlara ise  $\lambda$  fajı en iyi örnektir (72, 75, 76).



**Şekil 2.1.** Temel bakteriyofaj ailelerinin morfolojik ve genom karakteristikleri (77)

### 2.7.5.1. Litik Faj

Mikroorganizmalar canlılıklarının devamı olarak üreme ve beslenme gibi birtakım faaliyetleri yerine getirmek zorundadır. Tıpkı diğer canlılar gibi bakteriyofajlar da nükleik asidini ve yapısal elemanlarını sentezleterek çoğalma eğilimi gösterirler. Çoğalan progeniler, konak hücreyi lizise uğratarak dışarı salınır ve böylece litik döngü tamamlanır (69). Ancak litik bir enfeksiyon bazı aşamalar içerir;

Adsorbsiyon; konak hücre duvarı ile fajın taban fibrilleri arasında meydana gelen yüksek uyum sonucu gerçekleşir. Bu aşama fajın bakteriye olan özgüllüğünde oldukça önemli oynar. Bakteriye özgü kapsül yapısı, lipopolisakkarit tabakası, F pili, fimbriya, gibi birçok yüzey proteini adsorbsiyonun gerçekleşmesi için gereklidir. Ancak bu reseptörler, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde hücre duvar yapısından dolayı farklılık göstermektedir (70). Fajın konağa olan ilgisi reseptör proteinlerine bağlıdır. Bu proteinlerde meydana gelen en ufak değişim fajın konağa ilgisini azaltmaktadır (78). Adsorbsiyonun gerçekleşmesinde dış faktörlerin etkisi de küçümsenmeyecek kadar önemlidir. Örneğin ortam pH'sı, ortamda bulunan  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  gibi birtakım iyonlar, elektrostatik etkileşim gibi faktörlerin varlığı adsorbsiyon dengesini değiştirebilmektedir (78). Aynı zamanda bakteri kültürlerinin tazeliği de adsorbsiyonu

etkileyen önemli bir etkidir. Yaşlı kültürlerin hücre duvarında gerçekleşebilecek değişiklikler nedeniyle konağa karşı faj direnci gelişebilirken, taze kültürlerde hücre duvarı yeni sentezlendiğinden faj duyarlılığı da özgül reseptörler varlığında oldukça kuvvetli olmaktadır (70). Faj morfolojisine göre adsorbsiyon olayı da farklılıklar göstermektedir. Kuyruklu fajlar adsorbsiyonu taban fibrilleri ile gerçekleştirirken kuyruksuz fajlar kapsomerleri aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (70).

Penetrasyon; faj nükleik asidinin, birçok enzimatik olay vasıtasıyla konak hücreye enjekte edilmesidir. Örneğin; T4 fajı, bakteri hücre duvarına adsorbe olduktan sonra, yapısında bulundurduğu bir enzim ile duvarı parçalamaktadır (70). İkozahedral kapsidinin altında bir zara sahip olan, *Pseudomonas* ve *Enterobacteriaceae* üyelerini enfekte eden *Tectiviridae* familyasından PRD1 fajı istisnai bir durum göstermektedir. Bu faj kapsidi ile yüzey reseptörüne bağlanmakta ve kapsit proteinleri üzerinde konformasyonel bir değişiklik meydana gelmektedir. Daha sonra bakteri hücre duvarına doğru tübüler bir sistem oluşmakta ve adsorbsiyonun ardından bir takım enzimatik reaksiyonlar ile faj DNA'sı bakteri hücre duvarından içeri aktarılmaktadır (78) .

Biyosentez; faj nükleik asidi hücre içine enjekte edildiği anda, yani penetrasyondan hemen sonra başlamaktadır. Bu safhaya giren faj DNA'sı, bakteri makromolekül sentezinin durdurulmasına neden olarak bakteri kromozomunun nükleazlar tarafından parçalanması ile sonuçlanmaktadır. Böylelikle oluşan faj nükleik asidi öncüllerinden, nükleik asitlerin replikasyonu gerçekleştirilir (70). Çoğu litik fajın dsDNA'sı lineerdir ve replikasyonun ilk aşamasında sirküler forma dönüşmektedir (79).

DNA replikasyonundan sonra üretilen geç mRNA'lar doğrudan 3 çeşit proteini sentezlemektedir. Bunlar; faj yapısal proteinleri, virion yapısı oluşmadan hemen önce faj yapıtaşlarını bir araya toplayan proteinler ve hücre lizizi ve faj oluşmasını sağlayan proteinlerdir (78) .

Biyosentez sonucu oluşan faj yapısal elemanları tam bir faj partikülünü oluşturmak üzere bir araya toplanmakta ve oluşan yeni bakteriyofajlar, sentezledikleri enzimler yardımıyla bakteri hücrelerini parçalayarak dışarı çıkmaktadırlar. Bu aşamalar yaklaşık 30 dakika içerisinde tamamlanmaktadır (70). Bakteriyofajın tür sayısı ve şartlara bağlı olarak her ata birey yaklaşık olarak litik faj döngüsünün %200'ü kadar yavru birey meydana getirebilir. Eğer her birey bir konak bakteriyi enfekte eder ve öldürürse ikinci döngünün sonunda 40 bin; üçüncü döngünün sonunda 8 milyon;

dördüncü döngünün sonunda 1,6 milyar progeni oluşacaktır (80). Çoğu faj intraselüler fazın sonunda konak hücrelerini lizize uğratar. Örneğin, T4 fajının *E. coli*'yi lizize uğratması, 37°C'de yaklaşık 22 dakika sürer ve ortalama 300 T4 fajı meydana gelir (78).

### **2.7.5.2. Lizojenik Faj**

Lizojenik enfeksiyon; 3 viral proteinin varlığında meydana gelmektedir. Bakteri hücresine faj DNA'sının girmesiyle, bu viral proteinlerin sentezi başlamakta ve bu sentez, yeni oluşacak litik fajın yapısal elemanlarının üretilmesi için gerekli olan bilginin genomdan alınması engellemektedir. Buna bağlı olarak faj, bakteri hücresini lizize uğratmamaktadır. Hücre sitoplazmasında hapsolan faj DNA'sı bu durumdan kurtulmak için konakçı genomuna entegre olmaktadır. Böylece faj DNA'sı, konakçı DNA'sı ile aynı anda replike olmaya başlamaktadır (81). Bakteri DNA'sına entegre olarak enfeksiyon oluşturan fajlar, lizojenik faj; bakteri kromozomuna entegre olan profajın bakteride oluşturduğu enfeksiyon ise lizojenik enfeksiyon olarak adlandırılır. Kromozomunda profaj taşıyan bakteri ise "lizojenik bakteri" olarak adlandırılır (70).  $\lambda$  fajı gibi bazı fajlar *E. coli* kromozomunun *gal* ve *bio* genleri arasına entegre olurken, bazı fajlar bakteri kromozomuna katılmadan bağımsız olarak sitoplazmada bulunur ve bakteri DNA'sına bağlanarak bakteri çoğalması ile birlikte kendi DNA'sının replikasyonunu sağlayabilir (70, 79). Bununla birlikte, ultraviyole, sıcaklık, pH, mitomisin C uygulanması gibi fizyolojik bir sinyal litik evreye geçişe neden olabilmektedir (74, 79). Lizojenik döngü, konak hücre yapısında bir takım değişikliklere neden olabilmekte ve bu da bakteriyel virulansı arttırabilmektedir (70).

### **2.7.6. Bakteriyofajların Kullanım Alanları**

Faj terapisi üzerine 1980 yıllara kadar az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak sonraki yıllarda hayvan modellemeleri üzerinde faj terapisinin faydalarını gösteren raporlar yayınlanmaya başlamış ve bu alana olan ilgi artmıştır. Örneğin; yapılan çalışmalarda bakteriyemili fareler, fatal enfeksiyonlu dana, koyun, tavuklar ve *P. aeruginosa*'nın neden olduğu cilt enfeksiyonlarında tavşanlar üzerinde kullanılan tek dozluk faj enjeksiyonunun, son derece olumlu bir tedavi yanıtı sağladığı bildirilmiştir (80). Bir çalışmada, fajların logaritmik üreme modellerinden yola çıkarak; *E. coli* O18:K1:H7 suşuyla farklı dozlarda enfekte edilen farelerde, faj solusyonundan tek enjeksiyonluk



tedavinin son derece etkili olduğunu göstermişlerdir (82). Bu şekilde tek dozunda oldukça verimli sonuçlar alınan fajlar, logaritmik üreme özelliği gösterdiğinden çoğu antibiyotik ve antibiyotik kompleksine oranla önemli derecede üstünlük sağlamaktadır (80).

Çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilen Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnç yayılımı günümüzde oldukça önemli bir sorundur. Gram negatif bakterilerden özellikle Enterobacteriaceae ailesi üyeleri üzerinde bakteriyofaj terapisinin etkili bir yöntem olduğu yapılan çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir Ancak başarılı bir bakteriyofaj terapisi için; fajın uygulanma şekli, faj konsantrasyonu, tedavinin dozu, faj direnci, elde edilen fajın nötralizasyonu, hedef bakteriye ulaşılabilirlik gibi birçok durum göz önünde tutulmalıdır (83). Bunun yanında fajlar, atıksuların kalitesinin artırılmasında da önemli bir rol oynamaktadır. Hastane atık suları, kanalizasyon suları ve bazı bölgelerde yoğun kirletici etkisi altında olan akarsuların temizlenmesinde fajların kullanılabileceği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (65, 84).

Şimdiye kadar anlatıldığı üzere fajların bakteriler üzerindeki litik aktiviteleri nedeniyle enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklere alternatif bir yöntem olarak kullanımı, antibiyotiklere direncin artışı ile birlikte yeniden popüler hale gelmiştir (63, 65, 83, 85, 86). Bunların yanında, fermentasyon teknolojisinin kullanıldığı birçok alanda, istenilmeyen etkileri de gözlenebilmektedir. Örneğin, sütün mayalanması aşamasında oluşabilecek en ufak faj kontaminasyonunun ürünün tadını, kokusunu ve yapısal özelliklerini etkilediği gösterilmiştir (81). Yine şarap üretim teknolojisinde de faj kontaminasyonu istenmeyen bazı değişikliklere ve zararlara neden olabilmektedir (74).

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde; antibiyotik kullanımı ile kıyaslandığında faj terapisi bazı avantajlara sahiptir. Antibiyotikler vücudun normal flora üyesini oluşturan bakteriler üzerinde de etkili olduğundan, gereksiz ve yanlış antibiyotik kullanımı floranın bozulmasına ve yeni direnç mekanizmalarının gelişmesine neden olabilmektedir. Bu durum enfeksiyon hastalıklarının tedavisini güçleştirmekte ve enfeksiyon oranlarında artışa neden olmaktadır. Halbuki konak özgüllükleri dikkate alındığında; faj terapisi sırasında sadece etken mikroorganizma hedef alındığı için, normal flora üyeleri tedaviden etkilenmeyecektir. Bakteriler fajlara karşı da direnç geliştirmektedir ancak antibiyotik direnci kadar yaygın ve hızlı bir direnç gelişiminin fajlarda gözlenmeyeceği umut edilmektedir (87).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. *Acinetobacter baumannii*'ye Özgü Litik Bakteriyofajın Eldesi

##### 3.1.1. Bakteriyofaj İzolasyon Kaynakları

Bu çalışmada, bakteriyofaj izole edilebilecek potansiyel kaynaklar olarak; İnönü Üniversitesi atık su tesisleri ve kampüs alanı içerisinde bulunan çevresel su kaynakları seçildi. Bu amaçla, 22 farklı bölgeden, toplam 250 su örneği alındı. Her bir kaynaktan 200 ml su, steril taşıma kaplarında alınarak bekletilmeden faj izolasyon çalışmalarına başlandı.

##### 3.1.2. Bakteriyofaj İzolasyonu

Alınan su örneklerinden bakteriyofaj izolasyonu için Khairnar ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem küçük değişiklikler ile kullanıldı (88). Buna göre, atık sulardan bakteriyofaj izolasyonu için protokol aşağıdaki basamaklarda uygulandı.

- 1- Laboratuvara getirilen 200 ml su örneği ilk olarak 3600 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
- 2- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek bakteri, mantar gibi diğer mikroorganizmalar uzaklaştırıldı.
- 3- Elde edildiği düşünülen faj lizatu üzerine; 8 ml %50 PEG6000 (50 g PEG6000, 100 ml Distile su), 3.2 ml 5M NaCl (58.46 gr NaCl, 200 ml Distile su), 0.8 ml distile su eklendi.
- 4- Karışım 1 dakika vortekslenerek +4°C 'de 1 gece bekletildi.
- 5- Ertesi gün 5000 x g'de 90 dakika santrifüj edilerek çöktürme işlemi yapıldı. Üst sıvı atılarak elde edilen pelletler, 1 ml TE Buffer ile sulandırıldı. Bu haliyle faj taşıma potansiyeli olan örnekler ekim işlemine kadar +4°C'de saklandı.

### 3.1.3. *A. baumannii* Konakçı Kültürünün Hazırlanması

Konakçı kültürü hazırlamak için 20 ml Lurian-Bertani (LB) broth (200 ml; 2 g NaCl, 2 g Pepton, 1 g Maya özütü) besiyerine *A. baumannii* bakteri stoğundan 100 µl eklenerek, 37°C 'de 150 rpm'de 1 gece inkübasyona bırakıldı ve konak bakteri çoğaltıldı. Ertesi gün üreme olan sıvı besiyerinden 200 µl alınarak yeni bir LB broth besiyerine ekim yapılarak ve 37°C 'de 4 saat 150 rpm'de çalkalamalı inkübasyondan sonra konakçı bakteri stoğu katı besiyerine ekilmek üzere hazır hale getirilmiş oldu.

### 3.1.4. Çift Agar Yöntemiyle Bakteriyofaj Tespiti

Bakteriyofajların ekimi ve faj plaklarının görüntülenmesi için "overlay agar" tekniği kullanıldı (12, 89). Bu amaçla; 200 ml yumuşak agar (2 g NaCl, 2 g Pepton, 2 g Maya özütü, 0.8 g Agar, 150 µl CaCl<sub>2</sub>) hazırlanarak cam tüplere 3'er ml halinde dağıtıldı. Hazırlanan yumuşak agarın ekim yapılmadan katılaşmaması için 40°C'lik benmari içerisinde tutuldu. Yumuşak agar içerisine 100 µl faj solüsyonu ve 100 µl bakteri süspansiyonu ilave edildi ve faj-bakteri adsorbsiyonunun sağlanması için cam tüpler 10 dakika süreyle 40°C bekletildi. Süre sonunda, faj ve bakteri süspansiyonunu içeren yumuşak agar, LB katı agar besiyeri (500 ml; 5 g NaCl, 5 g Pepton, 2.5 g Maya özütü, 6 g Agar, 750 µl CaCl<sub>2</sub>) üzerine yayılarak, yaklaşık 30 dakika süreyle donması için beklendi. Besiyerleri katılaştıktan sonra bir gece 37°C 'deki etüvde inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün faj plakları kontrol edildi.

### 3.1.5. Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofajın Saflaştırılması

Bakteriyofajları saf olarak elde etmek amacıyla tek plak izolasyonu yöntemi kullanıldı (89). Bu amaçla, çift agar yöntemiyle elde edilen faj plakları, tek düştükleri bölgelerden steril bir bistüri ile kesilerek, kapaklı steril bir tüp içerisine alındı. Üzerine 3 ml LB sıvı besiyerinden eklenip hafifçe karıştırılarak fajların besiyerine geçmesi sağlandı. Önceden ekimi yapılan dört saatlik *A. baumannii* kültüründen 100 µl alınarak bu tüp içerisine eklendi. Faj-bakteri adsorbsiyonunun gerçekleşmesi için 15 dakika beklendi ve bu süre sonunda tüp içerisine 5 ml daha LB sıvı besiyeri ilave edildi. Hazırlanan deney tüpü, 37°C sıcaklıkta 18 saat süreyle inkübe edildi. Ertesi gün, hücre

ve besiyeri atıklarını uzaklaştırmak amacıyla 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek saf faj filtratı steril bir tüpte toplandı.

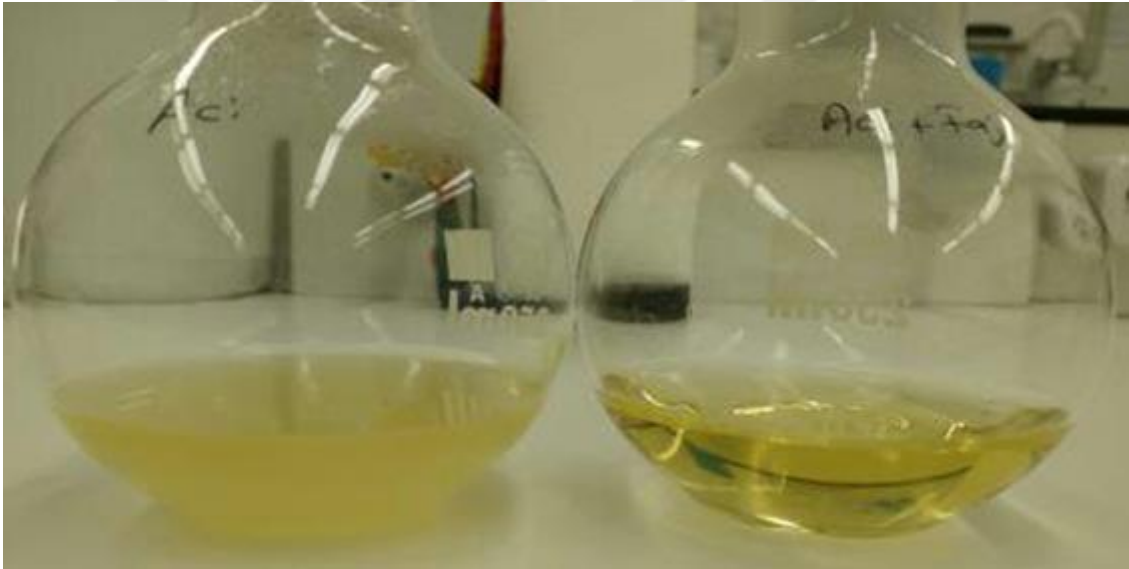
### 3.1.6. Bakteriyofajın Titresinin Yükseltilmesi ve Belirlenmesi

Tek plak izolasyonu yapılarak saflaştırılan bakteriyofajların titresini arttırmak için, aşağıdaki deney basamakları takip edildi.

- 1- Steril bir ependorf tüp içerisine 1 ml faj lizatu ve 0.1 ml 4 saatlik konakçı bakteriden eklenerek oda ısısında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası faj-bakteri süspansiyonu, taze hazırlanmış LB sıvı besiyeri içerisine eklenerek 37°C 'de 18 saat daha inkübe edildi.
- 2- Ertesi gün LB sıvı besiyeri kapaklı steril bir tüp içerisine alınarak, 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. İçerisinde faj bulunan üst sıvı 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek hücre artıkları ortamdan uzaklaştırıldı. Bu işleme istenilen titreye ulaşıncaya kadar devam edildi
- 3- Filtre edilen bakteriyofaj süspansiyonu üzerine 8 ml PEG6000, 3.2 ml NaCl, 0.8 ml distile su ilave edildi. Bu şekilde hazırlana bakteriyofaj süspansiyonu 1 dakika vortekslenerek +4°C 'de bir gece bekletildi. Ertesi gün 5000 x g'de 90 dakika santrifüj edilerek, saf faj filtratının çöktürülerek yoğunlaştırılması sağlandı.
- 4- Elde edilen pellet, 500 µl TE buffer ile süspanse edildi. Olası bir bakteri kontaminasyonunu engellemek için süspansiyona 100 µl kloroform ilave edildi. Hazırlanan solüsyon +4°C 'de muhafaza edildi. (Fajın protein profilini belirlerken bu pelletten yararlanılmıştır)
- 5- Bu aşamada, son karşılaştırmaya ait faj süspansiyonundan 10<sup>-6</sup>'ya kadar fizyolojik tuzlu su içerisinde dilüsyonlar hazırlandı ve bu dilüsyonların her birine çift agar yöntemi uygulandı. Agarın katılaşmasından sonra faj dilüsyonları petri plaklarının çizilen bölgelerine mikropipet ile 100'er µl damlatılarak yayılmış ve 37°C 'de 24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, faj liziz plaklarının sayılabileceği seyreltiden hareketle faj süspansiyonunun titresini plak oluşturma birimi/ml (pfu/ml) olarak belirlendi.

### 3.2. Bakteriyofajın Protein Profillerinin Analizi

Fajların protein profillerinin çıkarılması amacıyla, SDS-PAGE kesikli sistem kullanıldı. Bu amaçla *A. baumannii* suşu, bir gece boyunca LB buyyonda 200 rpm hızda çalkalanarak 37°C sıcaklıkta üretildi. Faj partiküllerinin protein band profil analizinin yapılabilmesi için iki adet 50 ml hacminde LB besiyerine, durağan faza gelmiş bir gecelik kültürden 100 µl eklendi. Kùltürler, 500 ml'lik yuvarlak tabanlı balonlarda 200 rpm hızı ile çalkalanarak 37°C sıcaklıkta 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon, 600 nm dalga boyunda 10 mm ışık yolu için 0.2 – 0.3 absorbans yoğunluğuna ulaşılan kadar sürdürüldü. Erken logaritmik faza gelen kùltürlerden birine 500 µl faj stoğu, diğerine ise aynı hacimde LB (“mock” inokülasyon) eklenerek inkübasyona aynı koşullarda dört saat daha devam edildi (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Faj ve "mock" inoküle kùltürlerin dört saatlik inkübasyon sonundaki görünümleri.

Sürenin sonunda, faj ve “mock” inoküle kùltürler, 5000 x g ivmesi ile 4°C sıcaklıkta 20 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı toplandı. Kùltür süpernatantlarında faj partiküllerine ait proteinlerin analizi için noniyonik protein presipitatlarından yararlandı. Bu amaçla, her 3 hacim kùltür süpernatantı, 1 hacim %50 PEG6000 ve 2 M NaCl çözeltisi ile karıştırıldı. Kısaca çalkalanan karışım, 1 saat boyunca 5000 x g ivme ile 4°C sıcaklıkta santrifüj edilerek üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı. SDS – poliakrilamid jele (SDS-PAGE) yüklenecek faj ve “mock” inoküle

kültürlere ait pelletler, 4 ml %10 SDS, 0.5 ml %1 bromofenol mavisi, 2 ml %20 gliserol, 1 ml 2-mercaptoetanol, 8 ml distile su ve 50 mM tris hidroklorür pH 6.8'den oluşan Laemmli tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı (Laemmli, 1970). Daha sonra süspansiyonlar, 100°C'de 5 dak süreyle kaynatıldı. Biorad miniprotean elektroforez sistemi için ayırım ve yığılma jelleri Tablo 3.1 ve 3.2'de belirtildiği gibi hazırlandı.

**Tablo 3.1.** SDS-PAGE ayırım jelinin içeriği

	Stok		Çalışan		7,000 ml
TrisCl pH 8.8	1,000	M	0,375	M	2,625 ml
Acrylamide stock (30:0.8)	30,000	%	12,000	%	2,800 ml
SDS	20,000	%	0,100	%	0,035 ml
APS	10,000	%	0,050	%	0,035 ml
TEMED	100,000	%	0,050	%	0,004 ml
H <sub>2</sub> O					1,502 ml

**Tablo 3.2.** SDS-PAGE yığılma jeli

	Stok		Çalışan		2,000 ml
TrisCl pH 6.8	1,000	M	0,125	M	0,250 ml
Acrylamide stock (30:0.8)	30,000	%	3,750	%	0,250 ml
SDS	20,000	%	0,100	%	0,010 ml
APS	10,000	%	0,050	%	0,010 ml
TEMED	100,000	%	0,050	%	0,001 ml
H <sub>2</sub> O					1,479 ml

Elektroforez işlemi, 25 mM tris-base, 192 mM glisin ve %0.1 SDS'den oluşan tampon içinde (devamlı sistem ile), proteinlerin yığılma jeline 50 V (15 mA/jel) ile girmesinin ardından 100 V sabit voltaj ile gerçekleştirildi. Yükleme tamponu boyasının jelin alt ucuna ulaşana kadar yaklaşık 45 dakika sürdürülen elektroforez işleminin sonunda, jel sandviçi açılarak %25 (hacim/hacim) 2-propanol ve %10 (hacim/hacim) asetik asit çözeltisi ile fiksasyon gerçekleştirildi. Fiksasyon işlemi sonrasında jeller, %10 (hacim/hacim) asetik asit içindeki %0.006 (ağırlık/hacim) *Coomassie* mavisi çözeltisi içinde çalkalanarak boyandı. Boyama işleminin sonlandırılmasının ardından %10 (hacim/hacim) asetik çözeltisi içinde çalkalanarak yeterli boya giderimi yapılan jeller beyaz ışık translüminasyonu ile görüntülendi.

Protein profil analizleri, sadece *A. baumannii* içeren süspansiyondan ve *A. baumannii* faj ile enfekte edildikten sonra elde edilecek faj içeren süspansiyonlardan ayrı ayrı

yapıldı. Bunun amacı, faj protein profilleri belirlenirken, konak bakteriye ait ortamda bulunabilecek protein kalıntılarının tespit edebilmektir.

### **3.3. Bakteriyofajın Transmisyon Elektron Mikroskobu İle Karakterizasyonu**

*A. baumannii*'ye karşı etkili olduğu tespit edilen litik bakteriyofajların morfolojik karakterizasyonu ve konakçı hücreye adsorbsiyonunu göstermek için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanıldı.

#### **3.3.1. Bakteriyofajın Morfolojik Karakterizasyonun Yapılması**

- 1- Faj stoğundan ve glutaraldehit fiksatifinden 50'şer µl alınarak homojenize edildi.
- 2- Bakır gridler dikkatlice çıkarılarak her bir grid üzerine yaklaşık 10 µl fiksatif-faj karışımı eklendi ve gridler 37°C'de etüvde kurutuldu.
- 3- %2 fosfotungustik asit kullanılarak kontrastlama yapıldı. Bu amaçla, 0.1 mg fosfotungustik asit ve 5 ml ultrapure saf su homojen olana kadar vortekslendi ve 0.22 µl'lik filtreden geçirildi. Hazırlanan %2 fosfotungustik asitten bakır gridler üzerine 10 µl damlatılıp 37°C'deki etüvde kuruması için beklenildi.
- 4- Kurutulan örneklerin üzerine, enjeksiyonluk sudan 2-3 damla eklenerek yıkama işlemi yapıldı ve yıkanan gridler üzerinden bakteriyofajların TEM'de görüntülenmesi gerçekleştirildi.

#### **3.3.2. Faj-Bakteri Adsorbsiyonunun Tespit Edilmesi**

Faj-bakteri adsorbsiyonunu TEM'de görüntülemek amacıyla 3 seri düzenek hazırlandı. Faj ve bakteri solüsyonları deney tüpü içerisine eklendiği sırada süre tutulup 15., 20. ve 30. dakikalarda her bir süspansiyondan numune alınması suretiyle adsorbsiyon aşaması görüntülenmeye çalışıldı. İşlem protokolü aşağıdaki gibidir.

- 1- 10 ml %3 Fosfat tamponlu glutaraldehit fiksatif (5 ml 0.1M fosfat tamponu (pH: 7.4), 0.6 ml %50 glutaraldehit, 3.8 ml distile su) hazırlandı.
- 2- 500 µl faj solüsyonu ve 500 µl 4 saatlik konakçı *A. baumannii* 2 ml'lik tüpe eklendi.

- 3- Faj-bakteri solüsyonunu içeren 3 seri tüp hazırlandı. Bunlardan 1.'sine 15. dakika'da, 2.'sine 20. dakika'da ve 3.'süne 30. dakika'da faj-bakteri süspansiyonundan eklendi. Hazırlanan tüpler, 5000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pellet üzerine 500 µl glutaraldehit fikstratı ilave edildi.
- 4- 2 saat süre tutularak +4°C'de bekletildi.
- 5- Süre sonunda 3 seri yeniden santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pelet 500 µl fosfat tamponuyla sulandırıldı ve direkt olarak kullanıldı.
- 6- Elde edilen tüpler 100 rpm'de 1 gece karıştırıcı üzerinde bırakıldı.
- 7- Ertesi gün jel olandan sıvı atıldı ve jel olmayan ise 5000 x g'de 10 dakika santrifüj ederek süpernatant atıldı. Tüplere fosfat tamponu eklenerek 30 dakika yıkama yapıldı.
- 8- Süre sonunda fosfat tamponu dökülerek yerine dikkatli şekilde Osmium eklendi. Jel olan tüpe 250 µl, jel olmayana ise 200 µl ilave edilerek 100 rpm'de karanlık ortamda 2 saat karıştırılarak bekletildi.
- 9- Süre sonunda osmium atılarak 4 kez 15 dakika sürede 500 µl fosfat tamponuyla yıkama yapıldı. Daha sonra 20'şer dakika sırasıyla %30, %50 ve %70'lik etanol ile 1'er kez; sırasıyla %90, %100 lük etanol ve son olarak 1,2-Propylenoxid ile 2 kez yıkama yapıldı.
- 10- Her bir jel birer ependorfa alınırken, jel olmayanlar ise 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek ependorflar üzerine 0.5 ml araldit eklendi ve hibridizasyon fırınında 25°C'de 1 gece alt üst edildi.
- 11- Ertesi gün spin yapılarak jellerin dibe çökmesi sağlanırken, jel olmayanlar ise santrifüj edilerek dibe çöktürüldü.
- 12- Ependorflar yaklaşık 6 saat boyunca 45°C'ye ayarlanmış olan hibridizasyon fırınında tutuldu, daha sonra fırının ısı 60°C'ye çıkarıldı ve yaklaşık 18 saat bekletildi ve süre sonunda fırın kapatılarak kendi kendine soğuması beklenildi.
- 13- Donduktan sonra ependorflar kesilerek içlerindeki araldit çıkarıldı ve elektron mikroskopik takip için kullanıldı.



### **3.4. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu**

#### **3.4.1. Bakteriyofaj Genomunun Eldesi**

Bakteriyofaj DNA izolasyonu için hem faj DNA izolasyon kitleri (Lambda DNA Mini Isolation Kit, Qiagen) hem de alternatif olarak standart protokol uygulandı (89). Standart protokole göre faj genomik DNA'sı fenol kloroform izoamilalkol kullanılarak izole edildi. Santrifüj sonrası üstte su fazındaki nükleik asitler, eşit hacimde izopropanol ile çöktürüldü ve etanol yıkamaları sonrası alkolü uzaklaştırılan pellet grade1 su ile çözüldü. Elde edilen faj DNA'sının miktarı spektrometrik olarak ölçülerek, %1'lik agaroz jel elektroforezi ile kalitesi değerlendirildi ve büyüklüğü tespit edildi.

#### **3.4.2. Bakteriyofaj Genomunun Restriksiyon Endonükleazlar İle Kesilmesi**

Tek plak izolasyonu ile elde edilen saf fajlardan genomik DNA izolasyonu yapılarak elde edilen DNA, vektör plazmide uygun olarak *Apal*, *XbaI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesildi. Her bir enzim ile sindirme, optimal aktivite gösterilen tampon içinde optimal inkübasyon sıcaklığında gerçekleştirildi. Bu süre sonunda elde edilen sindirme ürünleri, %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Jel etidyum bromür ile boyanarak Gel Logic 2200 jel dokümantasyon sisteminde görüntülendi.

#### **3.4.3. Sindirme Ürünlerinin Plazmid Vektörlere Klonlanması**

Restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmiş faj genomundan elde edilen fragmentlerden uygun büyüklükte olanları, aynı enzim kullanılarak kesilmiş plazmid vektöre klonlandı. Vektör olarak puc18 plazmidini kullanıldı. Ligasyon işleminden önce kesilmiş faj genomik fragmentleri ve plazmid vektör DNA'sı silika matriksli kolonlar kullanılarak saflaştırıldı. Bu amaçla, saflaştırılacak DNA örnekleri son konsantrasyonu 5M olacak şekilde guanidin ile karıştırıldı. Silika kolonlardan geçirilen karışım, propanol ile iki kez yıkandı ve alkol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra su ile elüsyon gerçekleştirildi.

Saflaştırılmış vektör ve "insert" spektrometrik olarak kantite edilerek, ligasyon tepkimesine çalışılabilecek oranda girmeleri sağlandı. ATP içeren tampon içinde T4 DNA ligaz kullanılarak 22°C sıcaklıkta bir saat süreyle ligasyon işlemi gerçekleştirildi.

### 3.4.4. Ligasyon Ürünlerinin Transformasyonu

Ligasyon ürünleri, *Escherichia coli* K12 JM109 hücrelerine kimyasal yöntemler kullanılarak aktarıldı. Bu amaçla, bir gecelik bakteri kültürü LB buyyon içinde 100 kat dilüe edildi. Kültür, 33°C sıcaklıkta OD<sub>600</sub> 0.5 bulanıklığa ulaşana kadar çalkalayıcı etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 600 x g ivme ile santrifüj edilerek elde edildi. Bakteri pelleti %5 DMSO, %10 PEG6000, 10 mM MgCl<sub>2</sub> ve 10 mM MgSO<sub>4</sub> içeren LB buyyon ile süspanse edildi. Süspansiyon buz üzerinde inkübe edildikten sonra eklenen her bir ligasyon ürünü için 100µl'lik alikotlara ayrılarak plazmidler ile karıştırıldı. Buz üzerinde bir saatlik inkübasyon sonunda hücrelere 42°C sıcaklıkta 90 saniye ısı şoku uygulandı. Isı şokunun ardından hücreler antibiyotik direnç geninin ekspresyonu için bir saat boyunca SOC buyyonda 37°C sıcaklıkta çalkalanarak üretildi. Her bir kültürden 200 µl uygun antibiyotik içeren SOC plaklara ekildi. Bir gecelik inkübasyon sonrasında elde edilen transformant koloniler incelendi.

### 3.4.5. Transformantlardan Plazmid İzolasyonu

Elde edilen transformantlardan plazmid izolasyonu için alkalin lizis yöntemi ve “mini prep” yöntemleri kullanıldı.

*Mini prep yöntemi:* Mini-Prep Kiti (Lamda Biotech, USA) ile plazmit izolasyonu üreticinin önerilerine göre aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi.

- 1- LB besiyeri içerisinde 1 gece inkübe edilmiş bakteri süspansiyonu 1.5ml'lik ependorf tüplere alınarak santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.
- 2- Pellet üzerine 100 µl solüsyon eklenerek, vorteksleme ile bakteri pelleti süspanse edildi.
- 3- Bakteri süspansiyonu üzerine 200 µl lizis solüsyonu ilave edilerek, hemen 4-6 kez tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
- 4- Daha sonra 350 µl nötralizasyon: solüsyonu eklenerek, tüp nazikçe 4-6 kez alt üst edilmiş ve >10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 5- Santrifüj sonrası süpernatant spin kolonuna aktararak >10,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve böylece DNA'nın spin kolona bağlanması sağlandı.

- 6- Santrifüj sonrası spin kolon alınarak yeni bir tüp içerisine yerleştirildi ve üzerine 700 µl yıkama solüsyonu eklendi ve >10,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 7- Gerekli görüldüğü takdirde yıkama basamağı tekrarlandı.
- 8- Son olarak spin kolon tekrar boş bir ependorf tüp içerisine alınıp santrifüj işlemi tekrarlandı.

#### **3.4.6. Plazmid Üzerinden Sekans Analizi**

Sekans primerleri, klonlama için seçilen restriksiyon enziminin kesim bölgesinin yukarisından ve aşağından seçildi. Primer ve kalıp konsantrasyon oranları, sekans kitinde önerilen şekilde uygulandı. Sekans karışımı hazırlandıktan sonra 60 döngü boyunca 95°C sıcaklıkta 5 saniye denatürasyon, 50°C sıcaklıkta 20 saniye bağlanma ve 60°C sıcaklıkta 4 dakika uzama gerçekleştirildi. Sonrasında elde edilen floresan işaretli ürünler etanol asetik asit yöntemi ile çöktürüldü. Çöktürme sonrası etanolü uzaklaştırılan pelletler deiyonize formamid ile çözülerek kapiller jel elektroforezine hazır hale getirildi. Yüklemenin hemen öncesinde örnekler 95°C sıcaklıkta 5 dakika bekletilerek denatürasyon sağlandı.

#### **3.4.7. Bakteriyofaj DNA'sının Dizi Analizi Sonuçları**

Yapılan kapiller elektroforez sonucunda elde edilen kromatogram dosyaları, FinchTV v1.3.1 yazılımı (GeoSpiza Inc., ABD) yardımıyla görsel olarak düzeltildi ve FASTA formatına kaydedildi. Güvenilirlik skorları uygun aralıkta bulunan kromatogramlardan elde edilecek DNA dizileri veri tabanlarında sorgulanarak benzer dizilerin varlığı araştırıldı. Bu amaçla *National Center for Biotechnology* (NCBI) hizalama arama motoru olan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) kullanıldı ve GenBank eşleştirmeleri yapıldı.

### **3.5. Bakteriyofajın Çoğul dirençli *A. baumannii* İzolatları Üzerine Etkisi**

#### **3.5.1. Çoğul Dirençli *A. baumannii* İzolatlarının belirlenmesi**

*A. baumannii* ya karşı izole edilen litik bakteriyofajın etkinliği klinik izolatlar üzerinde denendi. Bu amaçla, 20.10.2015-05.05.2016 tarihleri arasında

laboratuvarımıza gönderilen ve *A. baumannii* olarak izole edilen 130 klinik izolat çalışmaya dahil edildi. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları için Microscan Walkaway Otomatize Sistemi, kolistin direnci için MIC testi ve karbapenemaz aktivitesi için CIM testi kullanıldı. En az üç antibiyotik sınıfının antibiyotiklerinden birine dirençli olan *A.baumannii* izolatları çoğul dirençli olarak tanımlandı.

### **3.5.2. *A. baumannii* İzolatlarında Karbapenemaz Aktivitesinin Karbapenem İnaktivasyon Metodu (CIM) ile Belirlenmesi**

İzolatların karbapenemaz aktivitelerini belirlemek için Zwaluw ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem kullanıldı (90). Karbapenem aktivitesi belirlenecek olan *A. baumannii* izolatları için kanlı agar besiyerindeki gecelik kültürden 1 öze dolusu alınarak 400 µl serum fizyolojik (SF) içerisinde süspanse edildi. 10 µg meropenem (Oxoid Ltd, Hampshire, United Kingdom) içeren antibiyotik diski, hazırlanan süspanسیون içerisinde bırakılarak 35°C’de 2 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda duyarlı *E. coli* (ATCC 29522) suşu Mülller-Hinton agar üzerine ekildi ve meropenem antibiyotik diski süspanسیون içerisinde çıkarılarak besiyerine eklenmiştir. 35°C’de 1 gecelik inkübasyon sonrası oluşan zonlara göre karbapeneme duyarlılık veya dirençlilik durumu değerlendirildi.

### **3.5.3. *A. baumannii* İzolatlarında Kolistin Direncinin MIC testi ile Belirlenmesi**

Kolistin direnci belirlenecek olan *A. baumannii* izolatları 5 ml SF içerisinde 0.5 McFarland bakteri süspanسیونunda ( $1.5 \times 10^8$ ) hazırlandı. MIC testindeki tüm kuyucuklara 50 µl Mülller-Hinton broth eklendi. İlk kuyucuğa kolistin antibiyotiğinden 50 µl koyularak son kuyucuktan bir önceki kuyucuğa kadar dilüsyon yapıldı. Son kuyucuktan bir önceki kuyucukta son dilüsyon çekilip atılmıştır. Son kuyucuk kontrol kuyucuğu olduğu için kolistin eklenmedi. İnokülüm hazırlamak için, 0.5 McFarland olarak hazırlanan bakteri süspanسیونundan 0.1 ml alındı ve 9.9 ml Mülller-Hinton brotha eklendi. Bir dilüsyondaki inokülüm miktarı  $1 \times 10^6$  cfu/ml oldu. Tüm kuyucuklara hazırlanan inokülümden 50 µl eklenerek inokülüm son konsantrasyonu plate’e eklendikten sonra yarıya indi ( $5 \times 10^5$  cfu/ml). İşlemler sonrası plate 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

### 3.5.4. Bakteriyofajın Farklı Genotipteki *A. baumannii* İzolatlarına Etkisinin incelenmesi

Bakteriyofajın konak özgüllüğünü test edebilmek için çalışmaya dahil edilen *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkiler PFGE yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla Durmaz ve arkadaşlarının geliştirdiği PFGE yöntemi kullanılmıştır (91). Kanlı besiyerinde üretilen saf *A. baumannii* kolonileri, 1 ml hücre süspansiyon tamponunda (100mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA) resüspanse edildi. Hücre konsantrasyonu spektrometre aracılığıyla 590 nm’de 1.0 adsorbans (yaklaşık 4 McFarland) olarak ölçüldü.

Hücre süspansiyon tamponunda %2 (w/v) *low melting agarose* (10ml HST, 0.5 gr LMA) hazırlandı. Hazırlanan agaroz jeli 45-50°C soğutulmuş, 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine 200 µl dağıtılarak çalışma sırasında donmaması için 50°C’deki ısı bloğunda bekletildi. Hazırlanan LMA, final konsantrasyonu %1 olacak şekilde bakteri süspansiyonları ile 2-3 kez pipetlenerek karıştırıldı. Bu karışımdan yaklaşık 100 µl hemen pulsed field gel electrophoresis kalıplarına aktarıldı. Kalıpların donması için +4°C’de 10-15 dk bekletildi.

Bakteri hücrelerinin lizizi için, hücre liziz-1 solüsyonu (50mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, lizozim (2.5 mg/ml), proteinaz K (1.5 mg/ml), pH 8.0) hazırlandı ve steril tüplere 500 µl dağıtıldı. Agaroz kalıpları, PFGE kalıbından çıkarıldı ve her kalıp hücre liziz-1 solüsyonlarının bulunduğu tüplere transfer edildi. 37°C’de 1 saat çalkalayıcı su banyosunda hücre lizizi gerçekleştirildi. Süre sonunda kalıplar, hücre liziz-2 solüsyonuna (0.5 M EDTA (pH 8.0), %1 sarkozil ve proteinaz K (1 mg/ml)) transfer edilmek üzere yeni tüplere alındı ve 55°C’de 2 saat çalkalayıcı su banyosunda bekletildi.

Agaroz kalıplarının yıkanması için, hücre liziz-2 solüsyonu dökülerek kalıplar 3 kez ultra saf sudan ve sonra 3 kez de TE tamponundan (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 7.6)) 4 ml kullanılarak 50°C’de 15 dk süreyle gerçekleştirildi. Yıkama bitince kalıplar üzerine 4 ml TE tampon ilave edilerek +4°C’de muhafaza edildi.

Agaroz jel kalıbındaki DNA’lar uygun restriksiyon endonükleaz enzimi (*Apa I*) ile kesildi. Restriksiyon sonrası kalıp DNA’lar, 100 ml 0.5X TBE tamponunda (44.5 mM Tris baz, 44.5 mM borik asit ve 1 mM EDTA (pH 8.0)) hazırlanan %1’lik (w/v) agaroz jele gömüldü. Jel donduktan sonra, 1900 ml 0.5X TBE (pH 8.0) bulunan elektroforez

tankına yerleştirildi. 14°C’de, 20 saat süreyle 6 V/cm<sup>2</sup> elektrik akımında, başlangıç vuruşu 5 ve bitiş vuruşu 30 sn olarak elektroforez gerçekleştirildi. Jel, etidyum bromid (5 µg/ml) ile 20 dakika boyanarak Gel Logic 2200 imaging system aracılığıyla görüntülendi. DNA bant profili, GelCompar programı (version 3.0) kullanılarak analiz edildi.

### **3.5.5. Elde Edilen Bakteriyofajın Farklı Mikroorganizmalara Olan Etkisinin Araştırılması**

Çalışmalar sonucunda elde edilen bakteriyofajın yalnızca *A. baumannii* suşuna özgül olup olmadığını tespit etmek amacıyla 42 farklı *E. coli*, 5 farklı *Klebsiella* spp., 7 farklı *Pseudomonas* spp. suşu kullanıldı. Saf faj solüsyonu, çift agar yöntemiyle bu izolatlar üzerinde tek tek denendi.

### **3.6. Kullanılan Tampon Çözeltiler ve Kimyasallar**

#### %10’luk SDS - 20 ml

20 ml Distile su

2 g SDS

#### %10’luk Amonyumpersülfat (APS) - 20 ml

20 ml Distile su

2 g APS

#### 0.5M TrisHCl (pH: 6.8) - 100 ml

6 g Trizma base

60 ml Distile su

6 N HCl ile pH’ı 6.8’e getirilmiştir. Sonra solüsyon, distile su ile 100 ml’ye tamamlandı ve +4°C’de karanlık bir ortamda muhafaza edildi.

#### 1.5M TrisHCl (pH: 8.8) - 100 ml

18.15 g Trizma base

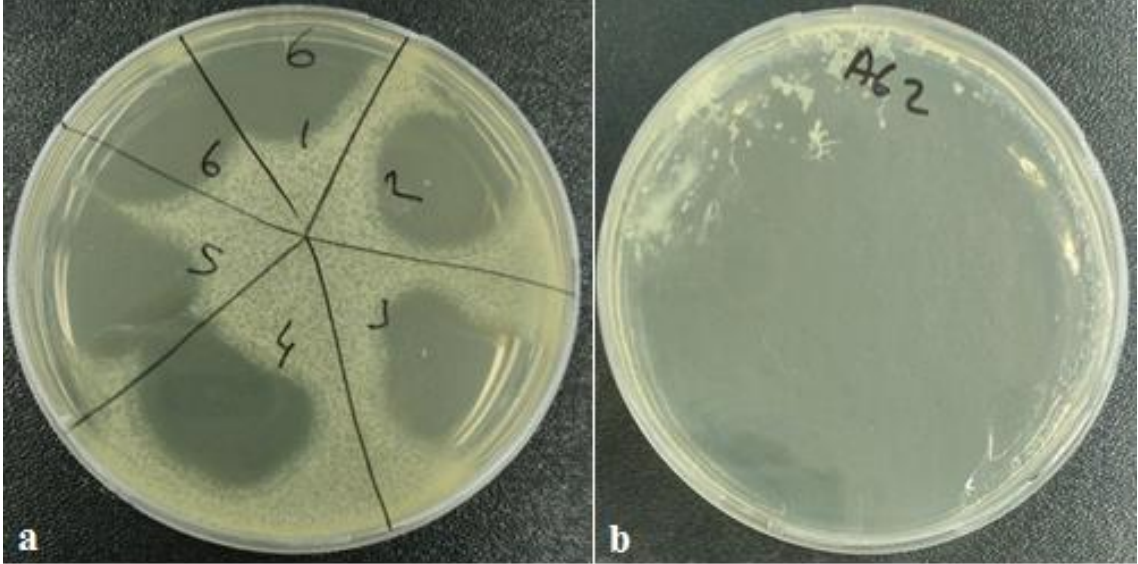
60 ml Distile su

6N HCl ile pH’ı 8.8’e getirilerek, distile su ile hacim 100 ml’ye tamamlandı, karanlık bir ortamda +4°C’de muhafaza edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Acinetobacter baumannii*'ye Özgü Litik Bakteriyofaj

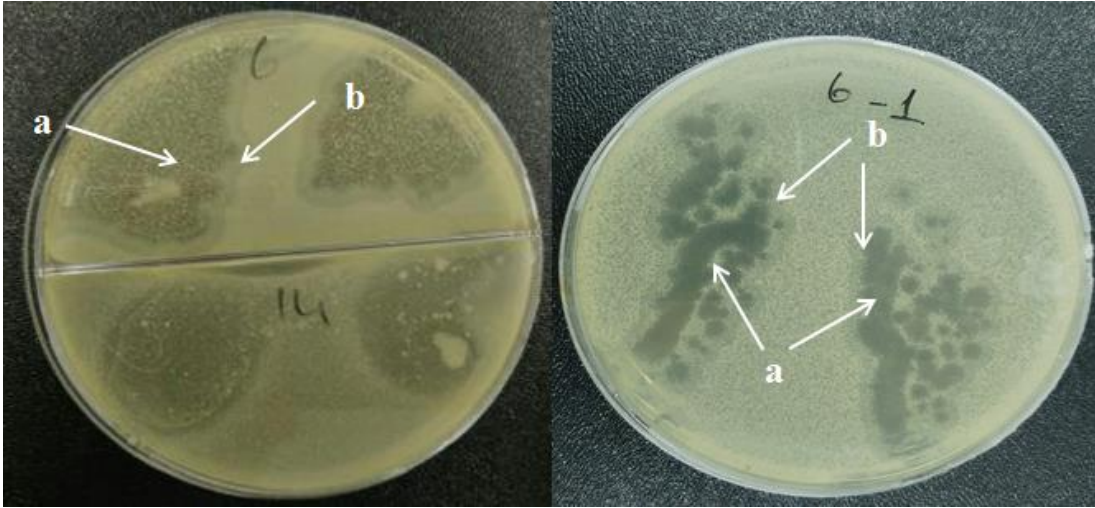
İnönü Üniversitesi atık su arıtma tesislerinden ve kampüs çevresel su kaynaklarından alınan 250 su örneğinin 7'sinde çift agar yöntemiyle *A. baumannii* izolatına karşı potansiyel faj varlığı tespit edilmiştir. İzole edilen bu potansiyel fajlardan sadece biri *A. baumannii*'ye karşı çift agarda, güçlü litik faj plakları oluşturmuştur (Şekil 4.1). *A. baumannii* konakçısını lizise uğrattığı tespit edilen bu faja, ABO Faj adı verilmiş ve çalışmanın bundan sonraki faj karakterizasyonu aşamaları bu faj ile gerçekleştirilmiştir.



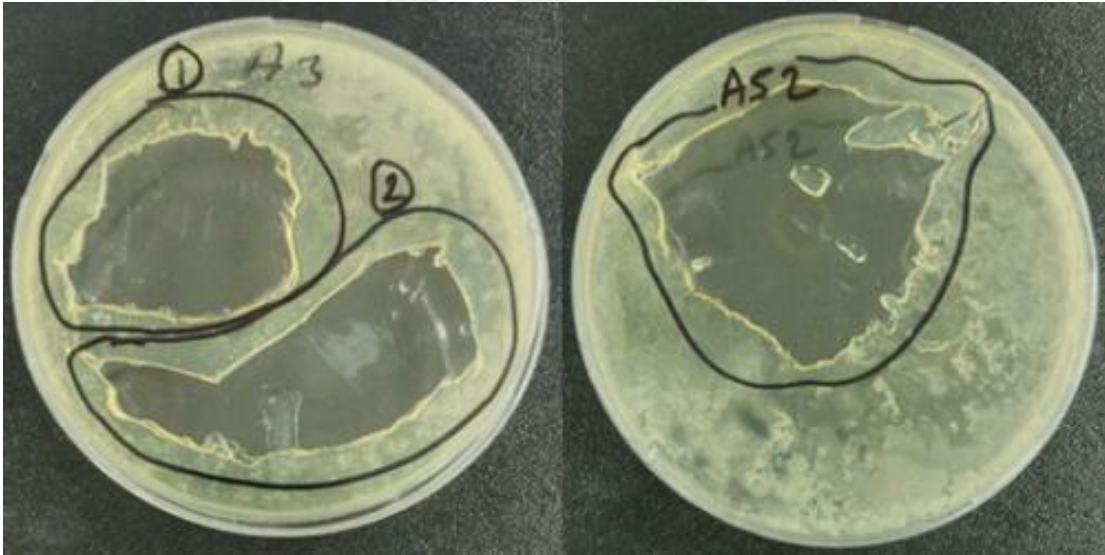
Şekil 4.1. Çift tabaka agar yöntemiyle faj varlığının tespiti a) Damlatma yöntemi b) Yumuşak agarda faj-bakteri adsorbsiyonu sağlandıktan sonra.

#### 4.1.1. Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofajın Saflaştırılması

İçerisinde faj olduğu belirlenen faj süspansiyonlarından yapılan ekimler sonucunda, bakteriyofajların, *A. baumannii* konakçısını lizise uğrattığı bölgelerde oluşan plaklar ortamdan izole edilerek her tüp için yaklaşık 8 ml steril saf faj solüyonu elde edilmiştir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.2.** Fajın bakteriyi enfekte etmesiyle oluşan iki liziz zonu. a) Temel liziz zonu b) İkinci liziz zonu.



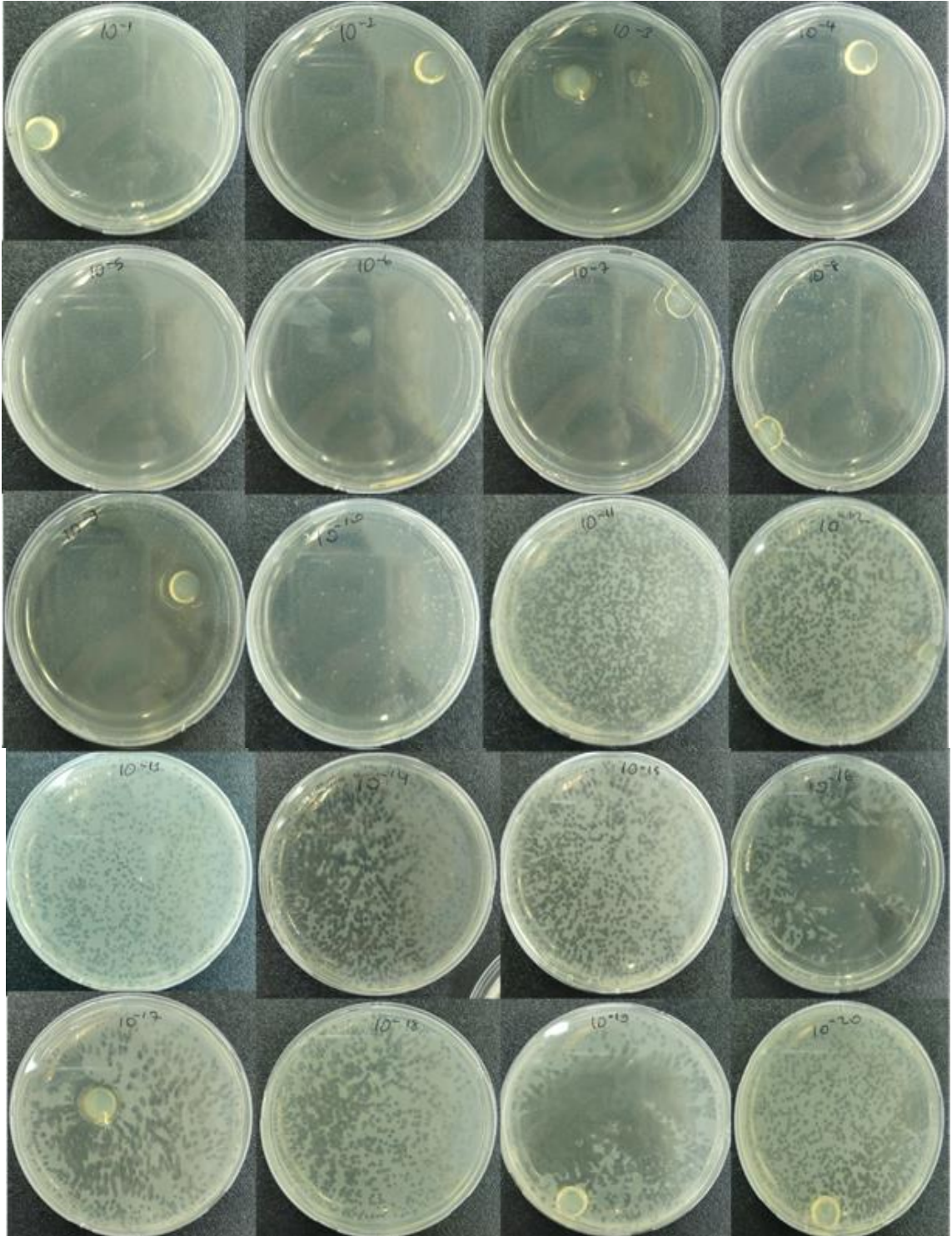
**Şekil 4.3.** Fajın saflaştırılması için, faj plaklarının çift agardan bistürü ile kesilerek çıkarılması.

#### 4.1.2. Bakteriyofajın Titresinin Yükseltilmesi ve Belirlenmesi

Tek plak izolasyonu sonucu elde edilen saf faj filtratlarından yapılan çalışmada, faj titresinin  $10^{-20}$  dilüsyonda  $12 \times 10^{19}$  pfu/ml olduğu tespit edilmiştir.  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  ve  $10^{-10}$  dilüsyonlarda faj yoğunluğu nedeniyle oluşan liziz alanında plak sayılamadığından;  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-16}$ ,  $10^{-17}$ ,  $10^{-18}$  ve  $10^{-19}$  dilüsyonlarda ise faj plakları oldukça yoğun olduğundan değerlendirmeye



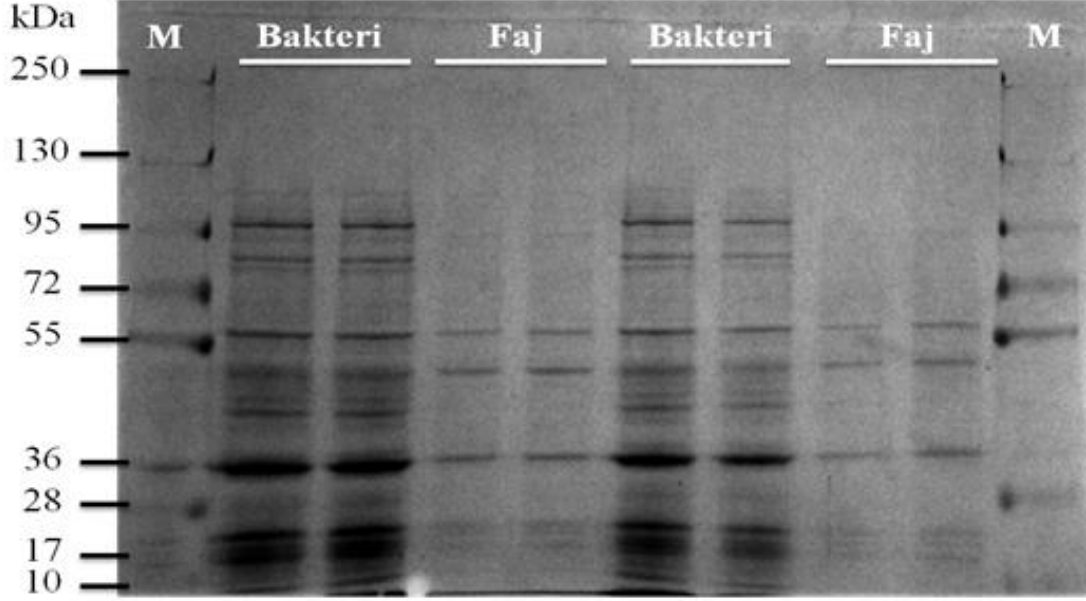
alınmamıştır. Aynı zamanda farklı konsantrasyonlarda faj ile enfekte edilen *A. baumannii* suşunun sayısı faj yoğunluğuna bağlı olarak değişim göstermiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Farklı konsantrasyonlarda faj solüsyonlarının *A. baumannii* suşunun sayısı üzerindeki etkisi.  $10^{-1}$ 'den  $10^{-20}$ 'ye kadar hazırlanan faj dilüsyonlarının 100  $\mu$ l'sinde oluşan faj plakları.

## 4.2. Bakteriyofajın Protein Profillerinin Analizi

SDS-PAGE analizi sonucunda ABO bakteriyofajının protein profilleri tespit edilmiştir. Çalışmada karşılaştırabilmek için; mock inoküle kültürden elde edilen proteinler, faj ile enfekte kültürden elde edilen proteinler ve moleküler ağırlık standardı birlikte yürütülmüştür (Şekil 4.5).

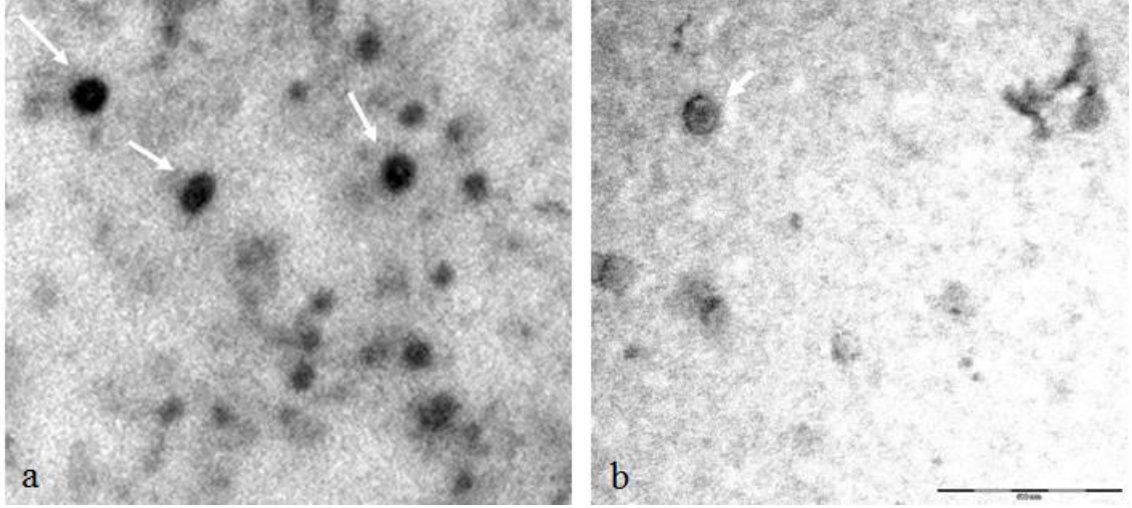


Şekil 4.5. SDS-PAGE analizi. M: Protein ağırlık standardı.

## 4.3. Bakteriyofajın Transmisyon Elektron Mikroskobu İle Karakterizasyonu

### 4.3.1. Bakteriyofajın Morfolojik Karakterizasyonu

*A. baumannii* konakçı bakterisinden izole edilen bakteriyofajın, büyüklük ve morfolojik karakterizasyonu Zeiss Libra 120 marka transmisyon elektron mikroskobunda incelenmiş ve morfolojisi tespit edilmiştir. Fajların,  $8 \times 10^3$  ve  $1.6 \times 10^4$  kez büyütülerek aşağıdaki görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.6).



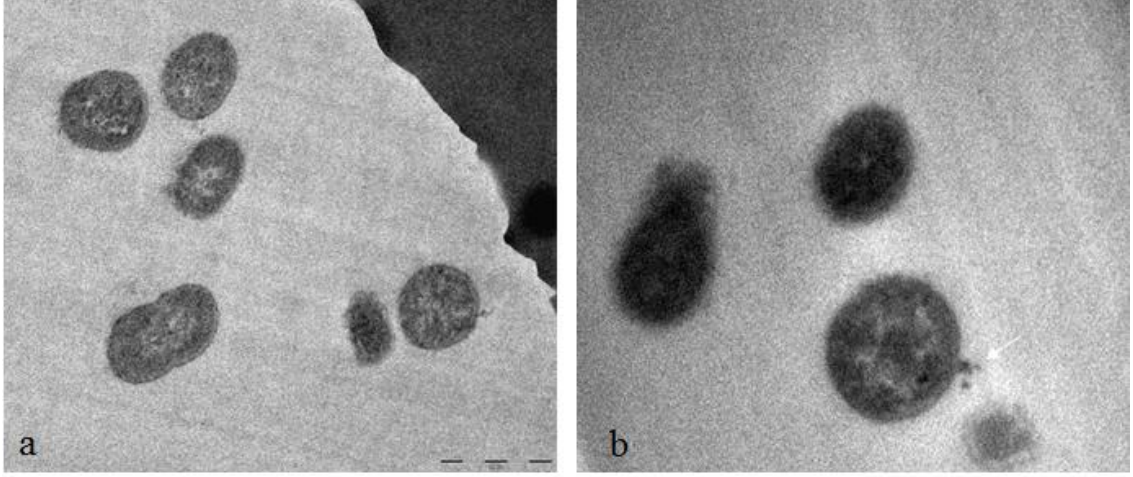
**Şekil 4.6.** Bakteriyofajın TEM’de a)  $8 \times 10^3$  ve b)  $1.6 \times 10^4$  büyütmedeki görüntüleri.

TEM’de incelenen *A. baumannii* litik fajının fajının, D tipi fajlara benzer şekilde kuyruk fibriline sahip olmadığı ve yaklaşık 80-90 nm büyüklüğünde olduğu görülmüştür.

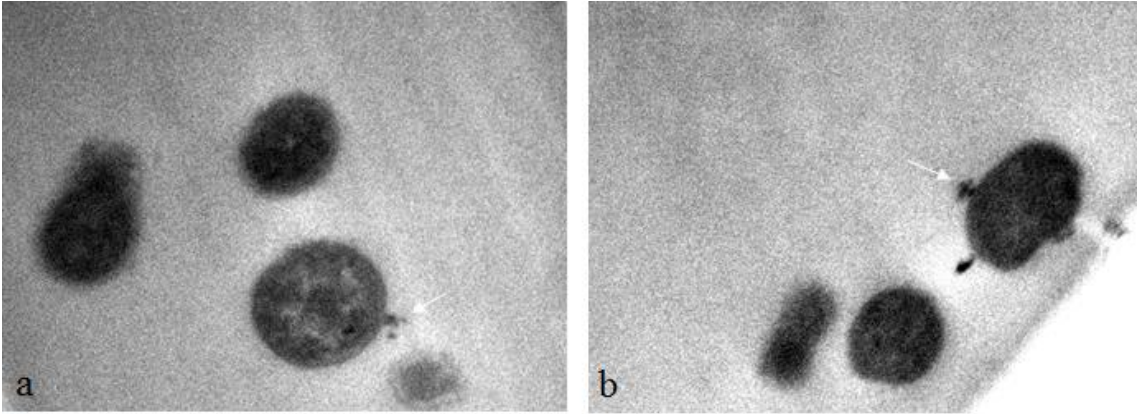
#### **4.3.2. Faj-Bakteri Adsorbsiyonu**

Bakteriyofajın *A. baumannii* konakçısına adsorbsiyonu 15. dakikadan itibaren gözlenmektedir. Bakteri, faj ile enfekte edildikten sonra fiksasyon amaçlı %2.5 gluteraldehit ve ardından fosfat buffer ile yıkama aşamaları uygulandığı için kesitlerde bakteri dışındaki alanlarda faj görülmemekte, sadece bakteri üzerine tutunmamış faj yapıları izlenebilmektedir (Şekil 4.7)

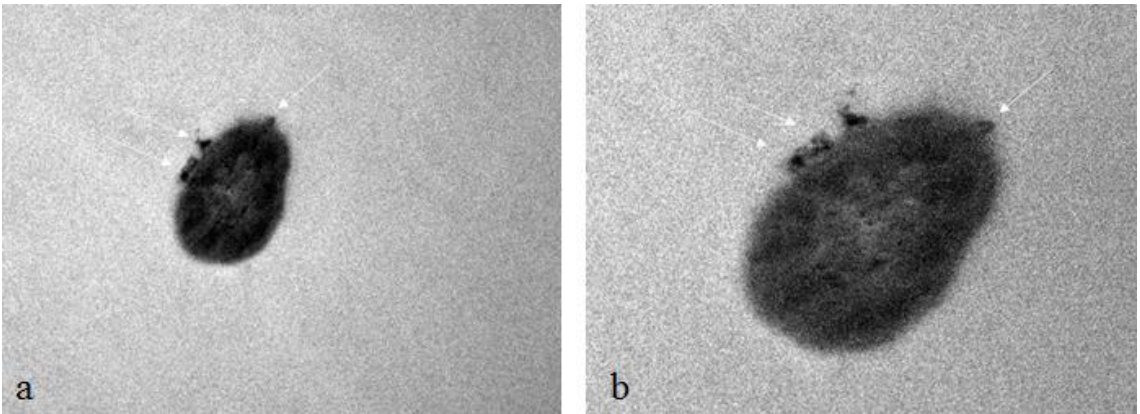




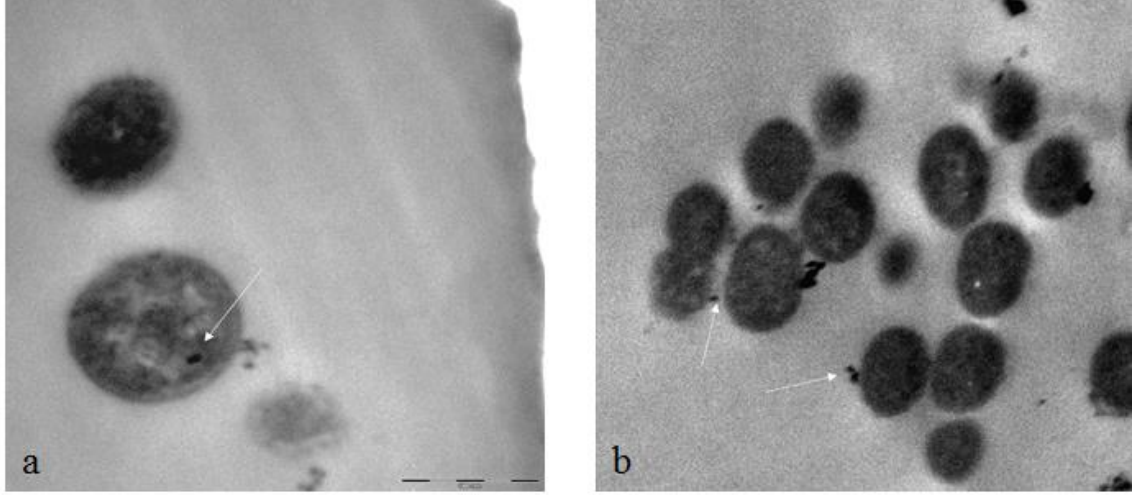
**Şekil 4.7.** Bakteriyofajların *A. baumannii*'ye adsorbsiyonu. a) 16.000X, scale bar: 1µm) b) İnkübasyonun 15. dakikasında bakteriyofajın adsorbsiyonu



**Şekil 4.8.** İnkübasyonun 20. dakikasında bakteriyofajın *A. baumannii* konakçısına adsorbsiyonu. a) büyütme; 16.000X b) büyütme; 25.000X



**Şekil 4.9.** İnkübasyonun 20. dakikasında bakteriyofajın *A. baumannii* konakçısına adsorbsiyonu. a) büyütme; 16.000X b) büyütme31.500X

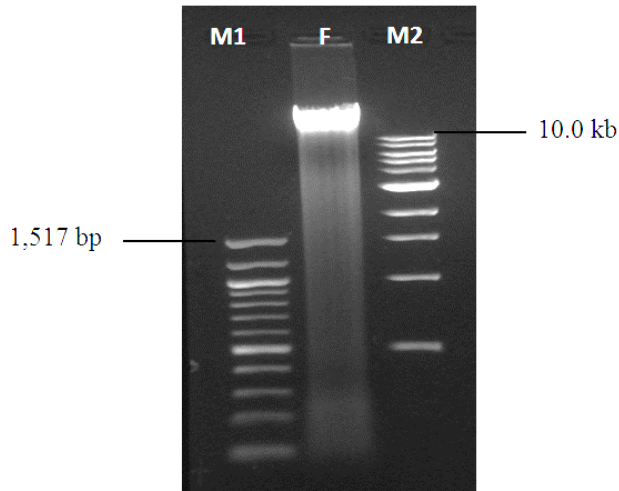


**Şekil 4.10.** İnkübasyonun 20. dakikasında bakteriyofajın *A. baumannii* konakçısına adsorbsiyonu. a) büyütme; 31.500X b) büyütme; 16.000X

#### 4.4. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu

##### 4.4.1. Bakteriyofaj Genomu

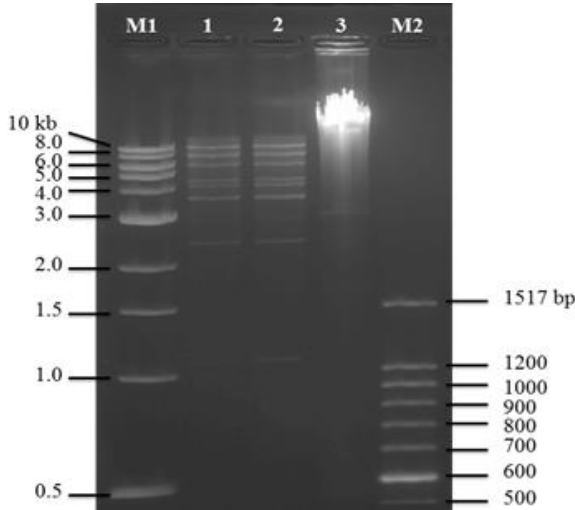
Hazırlanan faj solüsyonlarından izole edilmiş olan ABO-Fajına ait genomik DNA hem in-house yöntemle hem de hazır nükleik asit izolasyon sistemleriyle elde edilmiştir. Bakteriyofajın genom büyüklüğü 10 kb'dan büyük olmakla birlikte, çalışmamızda kullandığımız DNA ladder'ın sınırları dışında olduğu için tam büyüklüğü belirlenememekle birlikte tahmini büyüklüğü 30-35kb'dır (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** Faj DNA'sının %1'lik agaroz jelde (1X TBE tamponu, 100V, 60 dakika olmak üzere) elektroforez görüntüsü. M1; 100 bp DNA Ladder (NEB, USA), M2; 1 kb DNA Ladder (NEB, USA), F; Faj DNA'sı.

#### 4.4.2. Bakteriyofaj Genomunun Restriksiyon Endonükleazlar İle Kesilmesi

Faj DNA'sı saflaştırıldıktan sonra, plazmide klonlanma ve dizi analizi için *EcoRI* enzimi ile kesilmiştir. Bu enzim faj DNA'sını 1-10 kb arasında değişen sekiz fragmente ayırmıştır. Bu amaçla denenilen *XbaI* ve *ApaI* restriksiyon endonüklez enzimleri ile faj DNA'sı kesime uğramamıştır.



**Şekil 4.12.** *A. baumannii* fajının *EcoRI* ile kesiminin %1'lik agaroz jelde (1X TBE tamponu, başlangıç için 100V, 30 dakika; sonradan 80V, 3 saat olmak üzere), M1; 1 kb DNA Ladder (NEB, USA), M2; 100 bp DNA Ladder (NEB, USA), 1-2; *EcoRI* ile kesilmiş faj DNA'sı, 3; Faj DNA'sı.

#### 4.4.3. Bakteriyofaj DNA'sının Dizi Analizi Sonuçları

Çalışmamızda elde ettiğimiz ABO-Fajının genom bilgisi için “de-nova” yaklaşımla plazmid üzerine klonladığımız ≈1kb'lık fajDNA fragmentinden elde edilen DNA dizileri, NCBI hizalama arama motoru olan BLAST kullanılarak araştırılmıştır. Bu analiz sonucunda, ABO-Fajına ait 978 bazlık DNA fragmenti, *Acinetobacter* phage WCHABP1, complete genome (GenBank: KY829116.1) ile %98 benzerlik (Query cover: %100, E-value: %98) göstermiştir (Şekil 4.13, Şekil 4.14 ).

```

1   CCGTAATCGAATTAGTTGCTCATAATGTGCGAAAGTTTCAGATTAAGCTGCCACCTAAACTT   60
61  GTACCTGTCTTTTCTGCTCAGGATGTGCGATACCGTCAAAGTTGGGGAGGAAGGGGCTCA   120
121 GGTAAAGACGCGCTCGTTTGCAAAGATGACAGCCGTTAAAGGCTATATGTTTGCCGAAATG   180
181 GGTGTAAGTGGAACTTTGCTTTGTGGTCTGAGTTTATGAATACGCTTGCCGATTCTTCT   240
241 ATGGAGGAGATTAAGCAAGCTATTCGCGAAGAGCCATTTCTAAATAATTATTATGAGATG   300
301 GGCGAAAACCTACATAAGAACCAAGAATAGGCGTGTGACTTACTCATTTTGTGGTTTGCCT   360
361 CATAACTTGGATAGCATCAAATCTAAAGCACGTATTTTGTCTTAGTTGGGTGGATGAGGCT   420
421 GAAACGGTTAGTCAAATGGCTTGGCGTAAAGTTATTGCCAACTGTGCGTGAAGAAATTTGTA   480
481 CTGCCCCAACGGCAAGATTGTTTATTCTGAGGTATGGGTAACATGGAACCCTGAAAGACGA   540
541 GATAGCCCCAACGTCAACGCGGTTTAGACATGAAGAAATACTAGATGACGAAGGTGTTCTA   600
601 ATCGGCATTGGTGTCTGAGATGAACCTATTCTGATAAATCCGTGGTTCCCTCATGTTCTCGAC   660
661 TTGGAGCGCAGACGAGATCAAGCCAATCTTGATGATGTAACCTATCGTTGGATATGGGAA   720
721 GGCGCTTATCTTCAAATGTCGGAAGCGCAAATCTTTAAAGGTAAATACGAAAAGAAAGAT   780
781 TTTACACCAGATCCTCAAAAATGGCATGGTCCCTATATTGGATTGGACTTTGGTTTTGCT   840
841 CAGGATCCAACGGCATGTGTCAAAGTCTGGATTTCATGATGATTGTTTGTGGATTGAACAC   900
901 GAAGGTGGCAAGGTTGGTCTTGAGCTAGATGATACTGTTGAATTTTGTAGAAAAGAAAATA   960
961 CCAGACATTAAGAAGTAT   978

```

**Şekil 4.13.** Çalışmamızda elde ettiğimiz *A. baumannii*'ye özgü litik bakteriyofaj genomunun 978 bazlık DNA dizisi

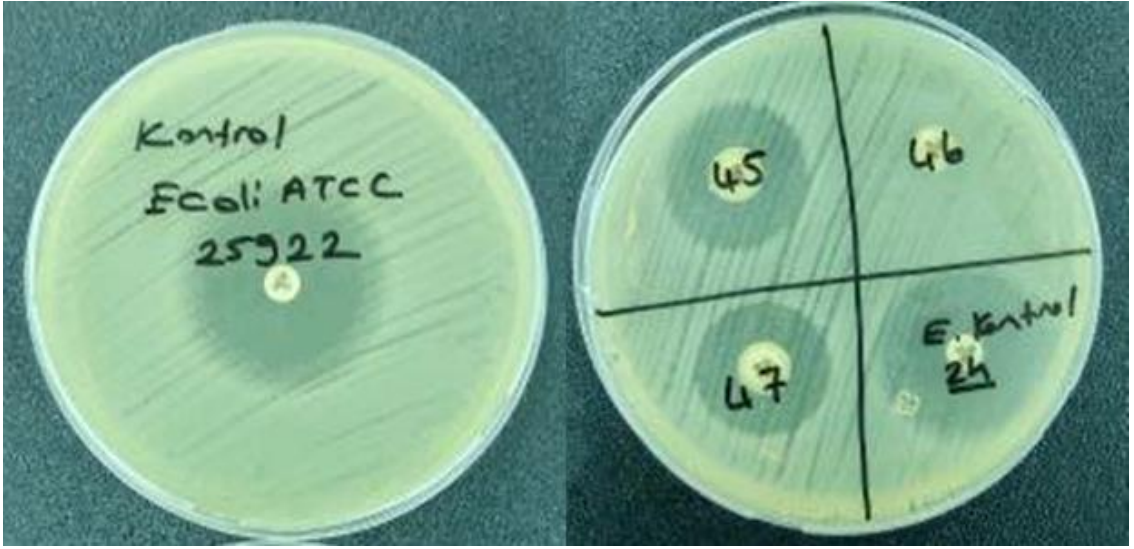


**Şekil 4.14.** Çalışmamızda elde ettiğimiz *A. baumannii*'ye özgü litik bakteriyofaj genomunun ait 978 bazlık DNA fragmentine ait baz dizisinin BLAST sorgulaması.

#### 4.5. Bakteriyofajın Çoğul Dirençli *A. baumannii* İzolatları Üzerine Etkisi

Çalışmaya dahil edilen 115 *A. baumannii* izolatının 91'i çoğul ilaç direncine sahipken bunların 11'i tüm ilaçlara dirençli bulundu. Tüm izolatların 107'si (%93) karbapenemlere, 12'si (%10) kolistine dirençliydi. Karbapeneme dirençli izolatların 96'sında (%89) CIM yöntemi ile karbapenemaz aktivitesi tespiti edildi (Şekil 4.15).

İzolatların PFGE ile tiplendirilmesinde 115 izolat, 85 farklı genotip içerisinde kümelenmiştir. Klonal yönden ilişkili suşlar 18 farklı küme içerisinde yer almaktadırlar. Toplam 115 izolatın 48'i herhangi bir küme içerisinde yer almaktadır. Suşların kümeleşme oranı %41 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda özgüllüğü ve etkisini test ettiğimiz ABO-Fajı, 115 *A. baumannii* izolatının 108'inin üremesini inhibe etmiştir. Fajın litik etki göstermediği yedi izolatının herbiri PFGE ile farklı genotipte bulunmuştur. Bu izolatların tamamı çoğul ilaç dirençliyken, ikisi kolistine de dirençlidir.

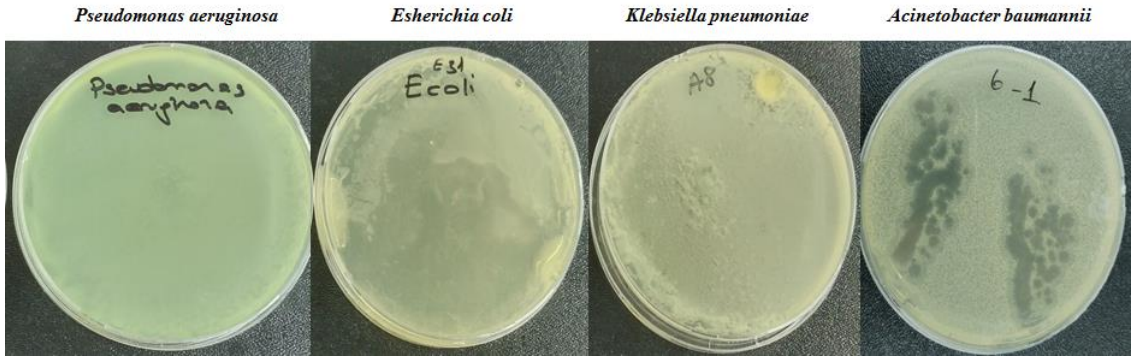


Şekil 4.15. Çalışmada kullanılan çoğul dirençli *A. baumannii* izolatı CIM sonucu.

#### 4.6. Bakteriyofajın Diğer Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi

Elde edilen saf faj filtratının *A. baumannii* dışında farklı izolatlara ilgisi araştırıldığında ABO-fajının, araştırmada kullanılan toplam 77 farklı cinste mikroorganizmaya (18 *Klebsiella* spp., 7 *Pseudomonas* spp. ve 52 *E. coli* suşlarında) karşı konak özgüllüğünün olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Bu nedenle elde edilen fajın, sadece *A. baumannii* suşunu enfekte eden litik aktiviteye sahip bir litik faj olduğu belirlenmiştir.





**Şekil 4.16.** Farklı bakteri türlerinde *A. baumannii* faj özgüllüğü denemeleri



## 5. TARTIŞMA

Sülfanomidlerin 1930'lu yıllarda keşfi ile başlayan antibiyotik çağı 2000'li yılların başlarına kadar oldukça hızlı bir gelişim süreci göstermiş ve 18 farklı grupta olmak üzere yaklaşık 200 farklı antibiyotik üretilmiştir (92). Bu durum, daha önce en sık insan ölüm nedeni olan enfeksiyon hastalıklarının yıkıcı etkisini dikkate değer düzeyde düşürmüş ve bir çok ölümcül hastalık kolaylıkla tedavi edilebilir bir duruma gelmiştir. Antibiyotiklerin geliştirilmesindeki bu hızlı süreç genel olarak tüm tıbbi branşlarda oldukça olumlu sonuçlar doğurmuş ve cerrahi, doğum, travma ve yanık hastalarının enfeksiyon nedenli kayıpları önemli düzeyde azalmıştır. Diğer taraftan tüm dünyada antimikrobiyallerin aşırı tüketimi ve antibiyotiklerin seçici baskısı, bu ilaçlara karşı direnç gelişimini tetiklemiş ve özellikle son yıllarda daha sık karşılaşılan tedavi edilemez enfeksiyonların orataya çıkışını tetiklemiştir. Antibiyotiklerin tarım ve hayvancılıkta kullanılması diğer taraftan direnç sorununu besleyen oldukça ciddi bir etki göstermiştir (93). İnsanlık, gelişen her yeni dirence karşı daha güçlü başka bir antibiyotik üreterek cevap vermeye çalışsa da özellikle son 10 yılda artık böylesi bir yolla bu mücadelenin devam ettirilemeyeceği görülmüştür. Son yıllarda yeni antibiyotik sınıflarının keşfi neredeyse durma noktasına gelmiştir. Bununla birlikte yeni keşfedilen antibiyotiklere karşı hızla direnç gelişmesi, ilaç sanayisinin de bu alana olan ilgisini kaybetmesine neden olmuştur. Çok hızlı bir şekilde gelişen antimikrobiyal direncinin önüne geçebilmek için ilaç dışı alternatif çözüm önerileri aramanın kaçınılmaz olduğu bir gerçektir. Alternatif çözüm önerileri arasında en önemli potansiyelin bakteriyofajların terapötik etkisi olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (83, 94–97).

*A. baumannii*, Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Birliği (IDSA) tarafından en yüksek önceliğe sahip organizmalardan biri olarak listelenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) Şubat 2017 basın bildirisinde ise karbapenem dirençli *A. baumannii* suşları antimikrobiyal geliştirilmesi gereken kritik patojenler listesinde birinci etken olarak bildirilmiştir (98). Böylelikle; daha önce MRSA suşları nedeniyle antibiyotik çağının sonuna yaklaştığımız düşüncesi değişmiş ve bu sonun *Acinetobacter* ile yaşanacağı kanısı oluşmuştur (9). Yıllar içerisinde her ne kadar yeni antimikrobiyaller geliştirilse de antibiyotiklerin temelde benzer mekanizmalara sahip olduğu unutulmamalıdır. Dolayısı ile yeni antibiyotik geliştirme çalışmaları çoğunlukla yeni bir

mekanizma keşfedilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Diğer taraftan, son yıllarda geliştirilen (veya kullanıma sokulan) antibiyotiklerden sadece kolistin, sulbaktam, ertapenem ve tigesiklin gram negatif bakterileri inhibe etmektedir. Ancak son veriler kolistin *A. baumannii* izolatları üzerindeki etkisinin hızla erozyona uğradığı ve *A. baumannii* izolatları arasında kolistin dirençli fenotiplerin oranının giderek arttığını göstermektedir. *A. baumannii*'nin ertapeneme doğal dirençli olduğu göz önüne alındığında kolistin, sulbaktam ve tigesiklin alternatif gibi görünmektedir. Ancak ne yazık ki bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimi de birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (6, 7, 99, 100).

Enfeksiyonlarda kullanılmak üzere antibiyotiklere alternatif olabilecek uygulamalar uzun yıllardır çalışılan konulardan biri olmuştur. Bu yaklaşımlar özellikle antibiyotik çağı öncesi oldukça popüler iken, etkin antibiyotiklerin üretilmeye başlanması sonrası çalışmalarda duraksama yaşanmıştır. Ancak günümüzde ulaşılmış olan yüksek ve yaygın antimikrobiyal direnç nedeniyle araştırmacıların ilgisi tekrar bu alanlara yoğunlaşmaktadır. Moleküler yöntemlerdeki gelişmeyle birlikte faj tedavisi bakteriyel etkenlere karşı kullanım potansiyeli hızla yükselen bir alan konumuna gelmiş ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde gelecek vadeden bir konu haline almıştır (101).

Terapötik amaçlar için etkin bakteriyofaj hazırlığı bakteriyofaj karakterizasyonu, kokteyli ve dozunun çok yönlü araştırılması gibi *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları içeren bir süreç gerektirir (3). Başlangıçta potansiyel bakteriyofaj kaynakları tespit edilerek bu kaynaklardan izolasyon çalışmaları yapılır. Bu çalışmada 11 dışkı örneği üzerinde yapılan taramadan *A. baumannii* bakteriyofaj tespit edilememiş olup 22 farklı bölgeden toplanan 250 su örneği üzerinde yapılan taramadan *A. baumannii* fajının izolasyonu sağlanmıştır. Birçok çalışmada bakteriyofaj izolasyon için dışkı, atık su örneği, besinler, toprak, vs. gibi çevresel kaynaklar kullanılmıştır (102, 103). Bu süreçte faj terapisi için elde edilen bakteriyofajın karakterizasyonu mümkün olduğu kadar detaylı ve tamamlayıcı bir şekilde ortaya konulmalıdır. Böylelikle farklı şartlar altında ve farklı çevrelerde hedef bakterinin kısa sürede ortadan kaldırılmasında olanak sağlanır (3). Tek plak izolasyon yöntemiyle elde ettiğimiz saf *A. baumannii* fajının *in vitro* çalışmalar süresince çift agar yöntemiyle titresi artırılarak plak ve faj morfolojisi, fajın plak büyüklüğü, elektron mikrofajisi, genomik yapısı, protein analizi, konak özgüllüğü, farklı sıcaklık koşullarına olan tepkisi, restriksiyon endonükleaz ile kesim bölgeleri ve DNA dizi analizine detaylı olarak çalışılmış olup bakteriyofajın karakterizasyonu ve genel olarak biyolojik özellikleri ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra bazı çalışmalarda

bakteriyofaj identifikasyonu yapılırken faj ve konağın protein-protein ilişkisine, ortamdaki kalsiyum ve magnezyum iyon konsantrasyonuna, dezenfektanlara duyarlılığına ve ortam pH'sına bakılarak fajın ekolojik özellikleri tanımlanmıştır (65, 104, 105). Ancak bazı çalışmalarda ise fajı, yalnızca besiyerinde oluşturduğu plak yapısı ve elektron mikrofrafisine bakarak tanımlamışlardır (65).

Çalışmamızda faj bakteri adsorbsiyonun en iyi şekilde sağlanabilmesi için dört saatlik konakçı bakteri kullanılmıştır. Bu sürede bakteri üreme fazında olduğundan hücre duvarının yeni sentezlenmiş olması ve bakteriyofajın bu fazda hücre duvarına kolay adsorbe olması açısından önemlidir (69, 106). Bakteriyofajın faj terapisine seçilebilmesi için en temel özellik konak özgüllüğüdür. Bakteriyofajlar özellikle de klinik anlamda kritik önem taşıyan türler mümkün olduğu kadar geniş bir konak özgüllüğüne sahip olmalıdır. Bir bakteriyofaj için geniş konak özgüllüğü, bir bakteri cinsinin çok sayıda türünü ya da çok sayıda bakteri cinsini enfekte ederek ortadan kaldırdığının göstergesidir (107). Bu çalışmadan izole edilen *Acinetobacter* fajının, PFGE aracılığıyla tespit edilen 85 farklı genotipten 115 *A. baumannii* izolatu üzerinde konak özgüllüğü belirlenmiştir. *Acinetobacter* fajının, 7 izolat hariç diğer 108 *A. baumannii* izolatu üzerinde litik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda fajın, çalışmada kullanılan *Acinetobacter* dışı toplam 77 izolattan 8 *E. coli* ve 1 *P. aeruginosa* türlerine karşı konak özgüllüğü saptanmıştır. Geniş konak özgüllüğü; yani polivalan olarak tanımlanan bu durum için, literatürde bir cinsin aynı veya farklı türleri mi yoksa farklı cinsteki bakteriler için mi kullanılması gerektiğine dair kesin bir kriter bulunmamaktadır (107). Dahası, yapılan çalışmalar bir bakteriyofajın, bir bakteri ailesinin birbirinden farklı birçok cinsi üzerinde enfeksiyon oluşturduğunu göstermiştir. Örneğin; Mu fajının, *Enterobacteriaceae* üyelerinden *Shigella sonnei*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Citrobacter freundii* ve *E. coli*'de enfeksiyon oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (69). Bir çalışmada, litik aktivitenin kısıtlı konak özgüllüğünün özellikle de pseudomonal bakteriyofajlarda *Podoviridae* familyasında gözlerken, en geniş spektrumunu *Myoviridae* familyası üyelerinde olduğu belirtilmiştir (3).

*A. baumannii* fajının sıcaklığa toleransını tespit etmek amacıyla yapılan deneyler sonucunda geniş sıcaklık aralığına fajın uyum göstermesi dikkat çekici olmuştur. Bu sonuçların literatürdeki birçok araştırma ile de uyumlu olduğu görülmüştür (69, 108). Sıcaklığa dirençli fajlar genellikle aşırı sıcaklıklarda izole edilmekle birlikte, aynı zamanda normal çevresel sıcaklıklarda da bulunabilmektedir. Bu çalışmada *A. baumannii* fajının, 20 dk'lık sürelerde 85°C'ye kadar olan sıcaklıklara son derece

dirençli olduğu; daha yüksek sıcaklıklarda ise dayanıklılığının azaldığı görülmüştür. Bakteriyi hedef alan faj virüsünün değişen sıcaklık koşullarına bu kadar dirençli olması, çok daha düşük sıcaklıklarda kolaylıkla yıkılan antibiyotiklere nazaran ciddi avantaj sağlayacağı öngörülmüştür (108–110).

Plak morfolojisi fajın biyolojik özelliklerini tanımlamada önemli olduğundan çalışmamızda çift agar yüzeyindeki faj plakları ivedilikle incelenmiştir. *A. baumannii* fajının oluşturduğu temel liziz zonunun çevresinde ikinci bir liziz zonu oluşumunun olası nedenleri literatür taraması ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Yapılan bir araştırmada *Podoviridae* familyasına ait *Abp1* fajının çift agar yüzeyinde özel bir plak morfolojisi gösterdiği bildirilmiştir. Fajın oluşturduğu temel liziz zonu etrafında ikinci bir liziz zonu olduğunu ve temel liziz zonunun çapı değişmezken bu ikinci zonun inkübasyon süresinin artışı ile daha da büyüdüğünü göstermişlerdir. Bu durum çalışma verilerimizle uyum içinde olup *Abp1* fajının ortama salındığında, konağının hücre duvarını lizize uğratabilen etkili bir endolizin veya depolimeraz kodlamasından kaynaklı olabileceği öngörülmüştür (111). Bu enzimler ekzopolisakarit tabakasının depolimerize olmasına neden olmaktadır. Bakteriyofajın depolimeraz aktivitesine sahip olması bu özelliği gösteremeyen fajlara kıyasla biyofilm formasyonunun yok edilmesinde faja avantaj sağlamaktadır (112). Literatüre bakıldığında, özellikle biyofilm üreten bakterilerin hücre duvarını yıkmak için bir takım enzimlerin görev aldığı görülmektedir. Eğer faj enzimleri bakteri hücre duvarını etkilerse, biyofilm üretiminin hızlıca ortadan kalktığı; ayrıca bu biyofilm formasyonu içerisinde faj ve bakteri arasında birlikte yaşama eğilimi olabildiği çalışmalarda bildirilmiştir (113).

Klinik uygulamalarda enfeksiyon etkenini ortadan kaldırmak için gerekli olan minimal faj titresi henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak referans kaynaklarda gram doku başına  $10^5$  bakteri yoğunluğu bir septisemi riski olarak kabul edilmektedir (12). Bu nedenle yaptığımız *in vitro* çalışmada, bir dizi dilüsyon hazırlanarak değişen bakteriyofaj titresinin besiyerindeki bakteri yüküne etkisi araştırılmıştır. Agar üzerinde başlangıç dilüsyondan  $10^{-19}$  dilüsyona kadar giderek seyrelen ancak sayılamayacak kadar yoğun bir plak oluşumu ile karşılaşılmıştır.  $10^{-20}$  dilüsyonda nihayet faj plakları sayılarak dilüsyon konsantrasyonun  $12 \times 10^{19}$  pfu/ml olduğu tespit edilmiştir. Ancak bazı çalışmalarda  $10^9$  pfu/ml gibi düşük faj konsantrasyonlarında dahi olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Aynı zamanda faj titresinin belirlenmesinde faj plaklarının sayımının daha güvenilir olduğu araştırmalarca gösterilmiştir (12, 108, 114). Diyabetik ayak sendromunda sıklıkla karşılaşılan *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarına

karşı potansiyel faj duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmada, önceden karakterize edilmiş 5 farklı bakteriyofajdan oluşan bir kokteyl kullanılmıştır. Planktonik hücre ve oluşturulan biyofilm üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmayla geniş spektrumlu faj aktivitesinin fajın konağı üzerindeki yıkıcı etkisi gösterilmiştir. Ancak kullanılan dozun ne kadar süreyle verilmesi gerektiği veya miktarında nasıl bir değişiklik olması gerektiğine dair kesin bir bilgiye ulaşılamamıştır (3).

Proteinler hücredeki tüm süreçlerde işlevsel olduğundan bir mikroorganizmanın protein profilinin belirlenmesi, yapısal proteinlerini ve işlevlerini tespit etmeye katkı sağlayacaktır. Bu amaçla SDS-PAGE, MALDI TOF MS/MS, ESI MS/MS, ELISA, kromatografi, vs. gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (9, 115–117). Bu çalışmada *A. baumannii* fajının protein profilini belirlemek amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemiyle faja özgül 9 proteine ait bant belirlenmiştir. Çalışmamız, fajların protein profilinin SDS-PAGE ile belirlenmesine yönelik araştırmalar ile uyum göstermektedir (111, 117, 118). Ancak bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler sadece fajın temel yapısını aydınlatmaya yönelik olduğundan, bu protein bantlarının fajın kapsid, kuyruk veya kuyruk fibrilleri gibi yapısal elemanlarından hangisine ait olduğuna dair literatürdeki bazı çalışmalarda olduğu gibi ayrıntılı bir yol izlenmemiştir (116, 119).

*S. aureus*, *Oenococcus oeni*, *E. coli*, *Lactococcus lactis* gibi etkenler süt, şarap, vs. gibi besinlerin fermentasyon sürecini etkileyerek veya diğer besinleri enfekte ederek hem üreticilere hem de bu besinlerle beslenen insanlarda ciddi problemlere yol açmaktadır. Bu nedenle, bu gibi mikroorganizmalar üzerinde litik aktivite gösteren fajlar kullanılarak yapılan çalışmalarda etkenlerin ciddi düzeylerde inhibe olduğu bildirilmiştir (67, 120, 121).

*E. coli* O157:H7 ile enfekte koyun, dana ve fareler üzerinde yapılan araştırmalar neticesinde, oral yoldan uygulanan farklı dozlardaki faj solüsyonları ile etken bakteri sayısında ciddi bir düşüş tespit edilmiştir (122). Aynı şekilde başka araştırmalarda ise, diyareli dana ve domuz yavrularının, septisemili ve menenjitli tavuklara uygulanan faj tedavilerinden alınan olumlu sonuçlar faj tedavisinin geleceği açısından önemli bulgulardır (123, 124).

İnsan klinik örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* ile enfekte bir yanık yarasına uygulanan faj solüsyonunun etken izolatlarına karşı litik etkisi ile pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Aynı çalışmada, bu uygulamanın 8 hasta üzerinde uygulandığını ve bir klinik yan etki gözlenmediğini bildirmiştir (12).

Faj terapisinde karşılaşılan çeşitli problem sıklıkla metodolojiye yetersiz hazırlık

sonucunda ortaya çıkmaktadır. Safılaştırma, endotoksin ve pirojenik maddelerin ortadan kaldırılması, süspansiyonun pH kontrolü ve stabilitesi geçmişte oldukça ciddi problemler oluşturmaktaydı. Ancak günümüzde bilimin ilerlemesi ve ticari kitlerin yaygınlaşması ile bu sorunlar ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır (125, 126).

Bu araştırmada, günümüzde hastane ve yoğun bakımlarda yatarak tedavi görmekte olan hastalar için önemli bir enfeksiyon etkeni olan ve geliştirdiği yüksek antimikrobiyal direnç nedeniyle tedavisinde oldukça sorunlarla karşılaşılan *Acinetobacter* suşlarına karşı litik faj araştırması yapılmış olup, gelecek için ümit vadeden sonuçlar elde edilmiştir. Bakteriyel enfeksiyonlarda trapötik amaçlı kullanılmak üzere faj uygulamalarının oldukça yüksek potansiyeli olduğu saptanmıştır. Faj özgülüğünün artırılması, doz ve tedavi süresinin belirlenmesi üzerinde durulması gereken ve daha fazla çalışma yapılmasına gereksinim olan konular olarak görülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Bu tez çalışması kapsamında, İnönü Üniveristesi atık su kaynaklarından *A. baumannii*'ye özgü litik bakteriyofaj elde edilmiştir.
- 2- *A. baumannii*'ye özgü bu bakteriyofaja ABO-Fajı adı verilmiştir.
- 3- ABO-Fajının protein profil analizi yapılmış ve 10 ile 97 kDa arasında değişen dokuz proteine sahip olduğu tespit edilmiştir.
- 4- Yapılan elektron mikroskopik çalışmalarda bakteriyofajın kuyuksuz ve ikozahedral kapsit simetrisine sahip olduğu görülmüştür.
- 5- Elektron mikroskopu ile yapılan faj-bakteri adsorbsiyonu görüntüleme çalışmalarında, ABO-Fajın inkübasyonun 15. dakikasından itibaren etkin bir şekilde konakçısına tutunduğu tespit edilmiştir.
- 6- ABO-Fajının genomu ilgili yapılan çalışmalarda genom büyüklüğünün yaklaşık 30 kb olduğu ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile sekiz parçaya ayrıldığı görülmüştür.
- 7- *EcoRI* kesimi ile elde edilen yaklaşık 1000 bazlık bir fragment vektör plazmite aktarılmış ve dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen baz dizisinin NCBI Blast sorgulamasında, "Acinotabacter phage WCHABP1" genomu ile %99 (E-value: 0.0) benzer bulunmuştur.
- 8- İzole ettiğimiz ve saflaştırdığımız ABO-Fajı çalışmamıza dahil ettiğimiz *A. baumannii* izolatlarının %95'na etkili olmuştur.
- 9- ABO-Fajının konak özgüllüğü ile ilgili çalışmalarda, bakteriyofaj 85 farklı genotipte *A. baumannii* izolatına etkili olmuştur.
- 10- ABO-Fajının çalışmaya dahil edilen 102'si çoğul dirençli, 6'sı ise tüm ilaçlara duyarlı olan toplam 108 *A. baumannii* izolatına etkili olduğu görülmüştür.
- 11- Günümüz özellikle yoğun bakımlarda salgınlara yol açan ve çoğul ilaç direnci nedeniyle tedavi güçlükleri yaşanan *A. baumannii* için farklı tedavi seçeneklerinin araştırılması zorunluluk haline gelmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bakteriyofaj *A. baumannii* üzerine yüksek düzeyde etkilidir.
- 12- Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının alternatif tedavisinde bakteriyofajların yüksek potansiyel taşıdığını göstermiştir.



## KAYNAKLAR

1. Towner KJ. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* 2009 73(4) 355–63.
2. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of Acinetobacter spp.: an overview. *Microbes Environ* 2011 26(2) 101–12.
3. Mendes JJ, Leandro C, Mottola C, Barbosa R, Silva FA, Oliveira M, et al. In vitro design of a novel lytic bacteriophage cocktail with therapeutic potential against organisms causing diabetic foot infections. *J Med Microbiol* 2014 63 (Pt 8) 1055–65.
4. Mendes JJ, Leandro C, Corte-Real S, Barbosa R, Cavaco-Silva P, Melo-Cristino J, et al. Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds. *Int J Tissue Repair Regen* 2013 21(4) 595–603.
5. Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ. Multidrug-resistant Acinetobacter extremity infections in soldiers. *Emerg Infect Dis* 2005 11(8) 1218–24.
6. Ciftci IH, Asik G. Antibiotic resistance mechanisms of Acinetobacter baumannii. *ANKEM Derg* 2011 25(3) 196–207.
7. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. Acinetobacter baumannii: a universal threat to public health? *Int J Antimicrob Agents* 2008 32(2) 106–19.
8. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung S-I, Park K-H, Kang CI, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of Acinetobacter baumannii isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother* 2007 60(5) 1163–7.
9. Merabishvili M, Vandenheuvel D, Kropinski AM, Mast J, De Vos D, Verbeken G, et al. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against Acinetobacter baumannii. *PLoS One* 2014 9(8):e104853.
10. Peng F, Mi Z, Huang Y, Yuan X, Niu W, Wang Y, et al. Characterization, sequencing and comparative genomic analysis of vB\_AbaM-IME-AB2, a novel lytic bacteriophage that infects multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates. *BMC Microbiol* 2014 14 181.
11. Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, Gilmore BF. Recent advances in

- bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J Pharm Pharmacol* 2011 63(10) 1253–64.
12. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One* 2009 4(3):e4944.
  13. Mauro Bendinelli, Herman Friedman EB-B. Acinetobacter biology and pathogenesis. 1st ed. Mauro Bendinelli, Herman Friedman EB-B, editor. *Springer* 2008 1-217.
  14. Aksaray N, Özlem Ö. Acinetobacter infections and treatment. *J Pediatr Inf* 2013 7 28–32.
  15. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996 9(2) 148–65.
  16. Başustaoğlu A, Özyurt M. Nozokomiyal patojen olarak Acinetobacter'lerin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. *Hastan infeksiyonları Derg* 1998 2 88–93.
  17. Özbey N, Tatman-Otkun M. Molecular typing and investigation of carbapenemases in carbapenem resistant Acinetobacter baumannii isolates. *Türk Hij ve Deney Biyol Derg* 2016 73(4) 345–54.
  18. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Gaultier MP, et al. Molecular analysis of Acinetobacter baumannii strains isolated in Lebanon using four different typing methods. *PLoS One* 2014 9(12) 1–15.
  19. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 2013 41(1) 11–9.
  20. Singh H, Thangaraj P, Chakrabarti A. Acinetobacter baumannii: A brief account of mechanisms of multidrug resistance and current and future therapeutic management. *J Clin Diagn Res* 2013 Nov 7(11) 2602–5.
  21. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Ruden H. Survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997 35(6) 1394–7.
  22. Espinal P, Martí S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces. *J Hosp Infect* 2012 80(1) 56–60.

23. García a, Solar H, González C, Zemelman R. Effect of EDTA on the resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to the bactericidal activity of normal human serum. *J Med Microbiol* 2000 49(11) 1047–50.
24. Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. Koneman. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. *J Clin Microbiol* 2009 47(2) 469–71.
25. Tanrıverdi Çaycı Y, Bıyık İ, Birinci A. Investigation of antimicrobial susceptibility of nonfermentative gram negative bacteria isolated from intensive care units. *Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg* 2016 45(4) 170–4.
26. Uzun B, Gungor S, Yurtsever SG, Afsar İ, Demirci M. Evaluation of resistance to various antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from blood cultures of intensive care patients. *ANKEM Derg* 2012 26(2) 55–60.
27. Grotiuz G, Sirok A, Gadea P, Varela G, Schelotto F. Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J Clin Microbiol* 2006 44(10) 3838–41.
28. Doughari JH, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. Multi-drug resistance, verotoxin production and efficacy of crude stem bark extracts of *Curtisia dentata* among *Escherichia coli* (non-O157) and *Acinetobacter* species isolates obtained from water and wastewater samples. *African J Pharm Pharmacol* 2012 6(23) 1653–67.
29. Hasan T, Choi CH, Oh MH. Genes involved in the biosynthesis and transport of acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics Inform* 2015 13(1) 2–6.
30. Erdem B. Mikrobiyal sideroforlar ve biyoteknolojideki uygulama alanları. *Karadeniz Fen Bilim Derg* 2013 3(8) 77–88.
31. Ghosh M, Miller PA, Möllmann U, Claypool WD, Schroeder VA, Wolter WR, et al. Targeted antibiotic delivery: selective siderophore conjugation with daptomycin confers potent activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* both in vitro and in vivo. *J Med Chem* 2017 acs.jmedchem 7b00102.
32. Penwell WF, Degrace N, Tentarelli S, Gauthier L, Gilbert CM, Arivett BA, et al. Discovery and characterization of new hydroxamate siderophores, baumannoferrin A and B, produced by *Acinetobacter baumannii*. *Chem Bio Chem* 2015 16(13) 1896–904.
33. Islam AHMS, Singh KKB, Ismail A. Demonstration of an outer membrane

- protein that is antigenically specific for *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011 69(1) 38–44.
34. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* 2009 77(8) 3150–60.
  35. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010 35(3) 219–26.
  36. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells *BMC Microbiol* 2008 8 216.
  37. Jin JS, Kwon S-O, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim S II, et al. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One* 2011 6(2):e17027.
  38. Dal T, Dal MS, Ağır İ. *Acinetobacter baumannii* ' de antibiyotik direnci ve AdeABC aktif pompa sistemleri : literatürün gözden geçirilmesi. *Van Tıp Derg* 2012 19(3) 137–48.
  39. Chong PM, McCorrister SJ, Unger MS, Boyd DA, Mulvey MR, Westmacott GR. MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of Enterobacteriaceae spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *J Microbiol Methods* 2015 111 21–3.
  40. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. Vol. 59, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007 1210–5.
  41. Çağatay AA, Özsüt H. Yoğun bakım ünitesi infeksiyonları ve antimikrobik tedavi. *Turkish Journal of Intensive Care Unit* 2001 1(1) 21–32.
  42. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* 2010 51(1) 79–84.
  43. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection - an emerging threat to human health Vol 63 *IUBMB Life* 2011 1048–54.
  44. Jung J, Park W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015 99(6) 2533–48.
  45. Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, Labarre L, et al.

- Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res* 2004 32(19) 5766–79.
46. Lee YC, Huang YT, Tan CK, Kuo YW, Liao CH, Lee PI, et al. *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13tu and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. *J Antimicrob Chemother* 2011 66(8) 1839–46.
  47. Francey T, Gaschen F, Nicolet J, Burnens a P. The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *J Vet Intern Med* 2000 14(2) 177–83.
  48. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol* 1997 35(11) 2819–25.
  49. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, Fernández-Cuenca F, Cisneros JM, Pachón J, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 2008 14(3) 276–8.
  50. Gaddy J a, Actis L a. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 2009 4(3) 273–8.
  51. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 2014 37(2) 119–27.
  52. Sauer K, Rickard AH, Davies DG. Biofilms and biocomplexity. *Microbe* 2007 2(7) 347–53.
  53. Dallo SF, Weitao T. Insights into acinetobacter war-wound infections, biofilms, and control. *Adv Skin Wound Care* 2010 23(4) 169–74.
  54. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001 55(1) 165–99.
  55. Maurer CK, Lu C, Empting M, Hartmann RW, Kalia VC, Kumar P. Quorum sensing vs quorum quenching: a battle with no end in sight. Kalia VC, editor. *Springer-Verlag New York* 2015 385-391.
  56. Ashelford KE, Day MJ, Fry JC. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol* 2003 69(1) 285–9.
  57. Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M-L, Brussow H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol* 2004 186(12) 3677–86.
  58. Dabrowska K, Switala-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A.

- Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* 2005 98(1) 7–13.
59. Rohwer F, Edwards R. The Phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol* 2002 184(16) 4529–35.
60. Roy S, Yusuf MA. Bacteriophage therapy: issues and controversies. Bangladesh *J Med Microbiol* 2013 7(1) 25–8.
61. Keen EC. A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays* 2015 37(1) 6–9.
62. Ahmed K, Kaderbhai NN, Kaderbhai MA. Bacteriophage therapy revisited. *African J Microbiol Res* 2012 6(14) 3366–79.
63. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 45(3) 649–59.
64. Cece E, Melo L, Kutsal T, Cerca N. Staphylococcus epidermidis biyofilmlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren bakteriyofajların izolasyon ve karakterizasyonu. Fen Bilim Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Hacettepe Üniversitesi. 2011;
65. Beheshti Maal K, Soleimani Delfan A, Salmanizadeh S. Isolation and identification of t novel Escherichia coli bacteriophages and their application in wastewater treatment and coliform's phage therapy. Jundishapur *J Microbiol* 2015 8(3):e14945.
66. Zago M, Scaltriti E, Rossetti L, Guffanti A, Armiento A, Fornasari ME, et al. Characterization of the genome of the dairy Lactobacillus helveticus bacteriophage AQ113. *Appl Environ Microbiol* 2013 79(15) 4712–8.
67. Obeso JM, García P, Martínez B, Arroyo-López FN, Garrido-Fernández A, Rodriguez A. Use of logistic regression for prediction of the fate of Staphylococcus aureus in pasteurized milk in the presence of two lytic phages. *Appl Environ Microbiol* 2010 76(18) 6038–46.
68. Ergüllü E. Bakteriyofaj ve süt teknolojisinde yarattığı sorunlar. *Gıda/The J Food* 1982 7(5) 239–45.
69. Calendar R. The Bacteriophages. Vol 54 *Oxford University Press* 2006 746.
70. Us AD. Şemsettin Usta Çelebi'nin Genel Viroloji. 3rd ed Ankara: *Pelikan* 2013 149-156.
71. Gökçe Ö. Lactobacillus delbrueckii bakteriyofajı LL-H'nin konakçı spektrumu. Fen Bilim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale. 2010;

72. Soykut EA, Tunail N. Termofilik faj taksonomisi. *Gida* 2009 34(4) 251–8.
73. Şanlıbaba P, Akçelik M. Classification of virulent Lactococcal bacteriophages based on protein composition and restriction endonuclease analysis. *Turk J Vet Anim Sci* 2005 29 865–71.
74. Doria F, Napoli C, Costantini A, Berta G, Saiz J-C, Garcia-Moruno E. Development of a new method for detection and identification of *Oenococcus oeni* bacteriophages based on endolysin gene sequence and randomly amplified polymorphic DNA. *Appl Environ Microbiol* 2013 79(16) 4799–805.
75. Thomason LC, Court DL. Evidence that bacteriophage  $\lambda$  lysogens may induce in response to the proton motive force uncoupler CCCP. *FEMS Microbiol Lett* 2016 363(3).
76. Yao J, Wang J. Neither two-state nor three-state: Dimerization of lambda cro repressor. *J Phys Chem Lett* 2015 6(11) 2022–6.
77. Hyman P, Abedon ST. Smaller fleas: viruses of microorganisms. *Scientifica (Cairo)* 2012 2012 734023.
78. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott, Harley and Klein's Microbiology. *McGraw-Hill Companies Inc* 2008 1–1088.
79. Brooks GF, Carroll KC, Butel J, Morse SA, Mietzner T. Medical Microbiology. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology 2013 1.
80. Carlton RM. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999 47(5) 267–74.
81. Soykut EA, Tunail N. Süt endüstrisinde sorun yaratan termofilik fajlar. *Gida* 2009 34(2) 107–13.
82. Bull JJ, Otto G, Molineux IJ. In vivo growth rates are poorly correlated with phage therapy success in a mouse infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 56(2) 949–54.
83. Xu Y, Liu Y, Liu Y, Pei J, Yao S, Cheng C. Bacteriophage therapy against Enterobacteriaceae. Vol 30 *Virologica Sinica* 2015 11–8.
84. Tanji Y, Mizoguchi K, Yoichi M, Morita M, Kijima N, Kator H, et al. Seasonal change and fate of coliphages infected to *Escherichia coli* O157:H7 in a wastewater treatment plant. *Water Res* 2003 37(5) 1136–42.
85. Brüßow H. Phage therapy: The *Escherichia coli* experience. *Microbiology* 2005 151(7) 2133–40.
86. Summers WC. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol* 2001 (55) 437–51.

87. del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 2007 82(2) 204–9.
88. Khairnar K, Pal P, Chandekar RH, Paunikar WN. Isolation and Characterization of Bacteriophages Infecting Nocardioforms in Wastewater Treatment Plant. *Biotechnol Res Int* 2014 2014 1–5.
89. Acar-Soykut E. Identification and classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* based on their replication parameters, capsid protein profiles and restriction endonuclease analysis. Fen Bilim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi. 2007;
90. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One* 2015 10(3) 1–13.
91. Durmaz R, Otlu B, Koksal F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis* 2009 62(5) 372–7.
92. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2013 12(5) 371–87.
93. Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep* 2012 127(1) 4–22.
94. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Görski A. Bacteriophage therapy for infections in cancer patients. Vol. 1 *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2001 131–4.
95. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 2013 5(1) 226–35.
96. Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J bone Jt Surg Am* Vol 2013 95(2) 117–25.
97. Nakai T, Park SC. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. Vol. 153 *Research in Microbiology* 2002 13–8.
98. World Health Organization Geneva; 2017.



<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> Erişim Tarihi 20 Haziran 2017

99. Navon-Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007 59(4) 772–4.
100. Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol* 2017 7.
101. Bassetti M, Garnacho-Montero J, Calandra T, Kullberg B, Dimopoulos G, Azoulay E, et al. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2017 1–14.
102. Lin NT, Chiou PY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ. Isolation and characterization of AB2: A novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* 2010 161(4) 308–14.
103. Pelzek AJ, Schuch R, Schmitz JE, Fischetti VA. Isolation of bacteriophages from environmental sources, and creation and functional screening of phage DNA libraries. Vol. 2013 *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques* 2013.
104. Li E, Yin Z, Ma Y, Li H, Lin W, Wei X, et al. Identification and molecular characterization of bacteriophage phiAxp-2 of *Achromobacter xylosoxidans*. *Sci Rep* 2016 6 34300.
105. Roucourt B, Lecoutere E, Chibeu A, Hertveldt K, Volckaert G, Lavigne R. A procedure for systematic identification of bacteriophage-host interactions of *P. aeruginosa* phages. *Virology* 2009 387(1) 50–8.
106. Smith HL, Trevino RT. Bacteriophage infection dynamics: multiple host binding sites. *Math Model Nat Phenom* 2009 4(6) 109–34.
107. Ross A, Ward S, Hyman P. More is better: Selecting for broad host range bacteriophages. *Front Microbiol* 2016 7 1–6.
108. Yang H, Liang L, Lin S, Jia S. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 2010 10 131.
109. Svahn O, Björklund E. Thermal stability assessment of antibiotics in moderate temperature and subcritical water using a pressurized dynamic flow-through system. *Int J Innov Appl Stud* 2015 11(4) 872–80.
110. Hsieh MK, Shyu CL, Liao JW, Franje CA, Huang YJ, Chang SK, et al. Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural

- degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity. *Vet Med (Praha)* 2011 56(6) 274–85.
111. Huang G, Le S, Peng Y, Zhao Y, Yin S, Zhang L, et al. Characterization and genome sequencing of phage Abp1, a new phiKMV-like virus infecting multidrug-resistant acinetobacter baumannii. *Curr Microbiol* 2013 66(6) 535–43.
  112. Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 2004 232(1) 1–6.
  113. Dubrovin E V., Popova A V., Kraevskiy S V., Ignatov SG, Ignatyuk TE, Yaminsky I V., et al. Atomic force microscopy analysis of the Acinetobacter baumannii bacteriophage AP22 lytic cycle. *PLoS One* 2012 7(10) 1–9.
  114. Anderson B, Rashid MH, Carter C, Pasternack G, Rajanna C, Revazishvili T, et al. Enumeration of bacteriophage particles. *Bacteriophage* 2011 1(2) 86–93.
  115. Cilia M, Fish T, Yang X, Mclaughlin M, Thannhauser TW, Gray S. A comparison of protein extraction methods suitable for gel-based proteomic. *J Biomol Tech* 2009 20 201–15.
  116. Lee JH, Bai J, Shin H, Kim Y, Park B, Heu S, et al. A novel bacteriophage targeting Cronobacter sakazakii is a potential biocontrol agent in foods. *Appl Environ Microbiol* 2016 82(1) 192–201.
  117. Walker JM. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>. Vol. 531, Humana Press 2009 58.
  118. Niu YD, McAllister TA, Nash JHE, Kropinski AM, Stanford K. Four Escherichia coli O157:H7 phages: A new bacteriophage genus and taxonomic classification of T1-like phages. *PLoS One* 2014 9(6).
  119. Czajkowski R, Ozymko Z, De Jager V, Siwinska J, Smolarska A, Ossowicki A, et al. Genomic, proteomic and morphological characterization of two novel broad host lytic bacteriophages PdbIPD10.3 and PdbIPD23.1 infecting pectinolytic Pectobacterium spp. and Dickeya spp. *PLoS One* 2015 10(3).
  120. Costantini A, Doria F, Saiz J-C, Garcia-Moruno E. Phage-host interactions analysis of newly characterized Oenococcus oeni bacteriophages: Implications for malolactic fermentation in wine. *Int J Food Microbiol* 2017 246 12–9.
  121. Hudson JA, Billington C, Cornelius AJ, Wilson T, On SLW, Premaratne A, et al. Use of a bacteriophage to inactivate Escherichia coli O157:H7 on beef. *Food Microbiol* 2013 36(1) 14–21.
  122. Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ. Application of bacteriophages to control intestinal Escherichia coli O157:H7 levels in ruminants. *Appl Environ*

- Microbiol* 2006 72(8) 5359–66.
123. Smith HW, Huggins MB. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol* 1983 129(8) 2659–75.
  124. Barrow P, Lovell M, Berchieri A. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998 5(3) 294–8.
  125. Anna Kuchment. *The Forgotten Cure*. 1st ed. Kuchment A, editor New York Springer-Verlag New York 2012.
  126. Kutter EM, Kuhl SJ, Abedon ST. Re-establishing a place for phage therapy in western medicine *Futur* 2015 10(5) 685–8.



## **EKLER**

### **EK.1.ÖZGEÇMİŞ**

1989 yılında Malatya’da doğdum. İlköğretimimi Malatya’da Ali Fevzi Ağan İlköğretim Okulunda, Lise eğitimimi Malatya Bahçebaşı Lisesi’nde tamamladım. 2007 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne kayıt oldum. Biyoloji son sınıfta Pedagojik Formasyon eğitimine kayıt yaptırđım. 2011 yılı yaz döneminde Biyoloji bölümünden ve aynı yılın sonbahar döneminde 1.5 yıl süren Pedagojik Formasyon eğitiminden mezun oldum. 2012 yılı Ocak ayında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı’nda Tezli Yüksek Lisans’ı kazandım. 2014 yılı Temmuz ayında ise Tezli Yüksek Lisans eğitimimi tamamlayarak mezun oldum. 2014 yılı Ağustos ayında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda 2. Tezli Yüksek Lisans eğitimime başladım.

## EK.2. ETİK KURUL

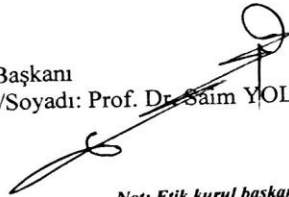
### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Çoğul Dirençli Acinetobacter Baumanni Suşuna Özgü Litik Bakteriyofaj Araştırılması.
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2016/207

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İnönü Üniversitesi Merkez Kampüsü, 44280, Malatya, Türkiye
	TELEFON	+90 422 341 06 60 / 1219
	FAKS	+90 422 341 00 36
	E-POSTA	inu.dhek@inonu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Barış OTLU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MALATYA			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>				
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İmza:



Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Çoğul Dirençli Acinetobacter Baumanni Suşuna Özgü Litik Bakteriyofaj Araştırılması.
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2016/207

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
Diğer:	<input type="checkbox"/>						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/207	Tarih:05.07.2017					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						
<b>KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Saim YOLOĞLU						

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Saim YOLOĞLU	Biyoistatistik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin GENÇ	Halk Sağlığı	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İbrahim ŞAHİN	İç Hastalıklar	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sedat YILDIZ	Fizyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Barış OTLU	Mikrobiyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet GÜL	Histoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Cemalettin AYDIN	Genel Cerrahi	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

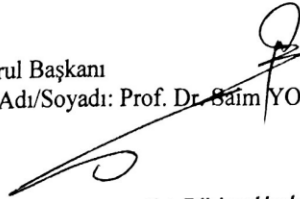
Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Çoğul Dirençli Acinetobacter Baumanni Suşuna Özgü Litik Bakteriyofaj Araştırılması.							
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		2016/207							
Prof. Dr. Hakan HARPUTLUOĞLU	Onkoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR	Tıbbi Farmakoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARATAŞ	Tıp Tarihi ve Etik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. Sedat AKBAŞ	Anesteziyoloji ve Rea.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Katılmadı
Necla DENİZ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Katılmadı
Abdullah DEMİREL	Hukuk	Serbest Avukat	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Katılmadı
Hasan KONAN	Sivil Üye	MSD Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Katılmadı

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İmza:



Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.