

T.C
ŞİFA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus*
SUŞLARINA SPESİFİK LİTİK BAKTERİYOFAJ
İZOLASYONU ve İZOLE EDİLEN FAJLARIN LİTİK
SPEKTRUMLARININ BELİRLENMESİ**

İsmail ÖZKAN
Araştırma Görevlisi

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Kenan DEĞERLİ

2015-İZMİR

T.C
ŞİFA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus*
SUŞLARINA SPESİFİK LİTİK BAKTERİYOFAJ
İZOLASYONU ve İZOLE EDİLEN FAJLARIN LİTİK
SPEKTRUMLARININ BELİRLENMESİ**

İsmail ÖZKAN
Araştırma Görevlisi

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Kenan DEĞERLİ

**Bu tez Şifa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 2014-19 Proje numarası ile desteklenmiştir**

Tez. No: 2015-500

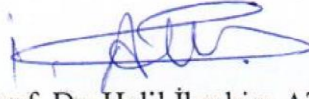
2015-İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Şifa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/ 06 /2015

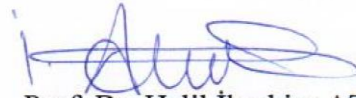


Tez Danışmanı : Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY – Şifa Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Selçuk KAYA – Katip Çelebi Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Arzu DURAN – Şifa Üniversitesi

ONAY : Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimi boyunca büyük desteğini gördüğüm, tez çalışmasının her aşamasında önerileriyle bana yol gösteren değerli fikirleriyle önemli katkılarda bulunan değerli hocam tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY'a,

Tez çalışmasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Kenan DEĞERLİ 'ye,

Çalışma boyunca her zaman yanımda bulunan değerli hocamız Sayın Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ ve Yrd. Doç. Dr. İbrahim HACIBEYOĞLU'na,

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışma boyunca her zaman yanımda bulunan çok değer verdiğim arkadaşım Ergün AKTÜRK'e

Katkılarını unutmayacağım çalışma arkadaşlarım Öğretim Gör. Hikmet BIÇAKÇI ve Öğretim Gör. Süleyman KUYUMCU'ya,

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu DURAN, Erkam GÜNDOĞDU, Arş. Gör. Seniha AKTAKKA ve Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Her türlü desteği ile her zaman yanımda olan desteğini esirgemeyen çok değerli eşim Şeyma ÖZKAN'a varlığı ile bizleri mutlu eden oğlum İhsan ÖZKAN'a ve bugüne kadar hayatımın her aşamasında yanımda olan değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
RESİMLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Genel Bilgiler	1
1.2 Bakteriyofajlar ve Faj Tedavisinin Tarihçesi.....	2
1.3 Bakteriyofajların Önemi.....	3
1.4 Bakteriyofajların Morfolojisi ve Sınıflandırılmaları	4
1.5 Bakteriyofajlar ve Enfeksiyon Tipleri.....	8
1.6 Bakteriyofajların Uygulama Alanları.....	11
1.7 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2 GEREÇ ve YÖNTEM	15
2.1 Kullanılan Besi Yerleri	15
2.2 Bakteri Suşları.....	18
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının İdentifikasyonu ve Bu İzolatların PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İle Teyit Edilmesi	19
2.3.1 DNA İzolasyonları	19
2.3.2 PZR İşlemi	19
2.4 Bakterilerin Antimikrobiyal Analizleri	21
2.5 Bakterilerin Sayılması.....	21
2.6 Bakteriyofaj İzolasyonu	23

2.7	Bakteriyofajların Pürifikasyonu	25
2.8	Bakteriyofajların Titresinin Artırılması	26
2.9	Bakteriyofaj Titresinin Belirlenmesi.....	27
2.10	Bakteriyofajların Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi.....	28
2.10.1	Adsorbsiyon süresi, Latent Süre ve Çoğalma Oranının (Burst Size) Belirlenmesi	29
2.11	Adsorbsiyon Oranlarının Belirlenmesi (Multiplicity of Infection Value; MOI).....	29
2.12	Saklama Koşulları	30
3	BÖLÜM: BULGULAR	31
3.1	Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve PZR İle Teyit Edilmesi.....	31
3.2	Bakteri Suşlarının Antimikrobiyal Analizi	31
3.3	Bakteriyofajların İzolasyonu ve Litik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	33
3.4	Bakteriyofajların Saflaştırılması ve Titrelerinin Arttırılması.....	35
3.5	Bakteriyofaj Dinamiklerinin Belirlenmesi.....	36
4	TARTIŞMA.....	38
5	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
	ÖZET	45
	ABSTRACT	46
6	KAYNAKLAR	47
7	ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
bp	: Base Pair
BS	: Liziz Büyüklüğü
CFU	: Colony Forming Unit
CDC	:Centers for Disease Control
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	: Double Stranded Deoksiribonükleik Asit
dv	: Devir
FDA	: Food Drug Administration
g	: Gravity
gr	: Gram
L	: Litre
LBA	: Luria Bertani Agar
LBB	: Luria Bertani Broth
LBSA	: Luria-Bertani Soft Agar
LP	: Latent Periyot
LT	: Liziz Süresi
M	: Molar
ml	: Mililitre
MOI	: Multiplicity of Infection
MRSA	: Metisilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	: Sodyum klorür

ng	: Nanogram
SA/EMEL_001	: <i>Staphylococcus aureus</i> EMEL_001 Fajı
ICTV	: International Committee of Taxonomy of Viruses
PFU	: Plaque Forming Unit
PN	: Penetrasyon
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Revolutions per Minute
sn	: Saniye
ssDNA	: Single Stranded Deoksiribonükleik asit
UV	: Ultraviyole
WHO	: World Health Organization

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Caudovirales Cinsine Ait Üç Ailenin Basit Morfolojisi	5
Şekil 1.2 Bakteriyofajların Morfolojik Olarak Bradley Sınıflandırması (Ackermann 2007)	6
Şekil 1.3 Bakteriyofajların Morfolojik Olarak Ackermann Sınıflandırması (Ackermann 2007)	7
Şekil 1.4 Bakterilerde Litik ve Lizojenik Enfeksiyon.....	10
Şekil 2.1 Bakteri Sayımında Seri Dilüsyonlarının Hazırlanması ve Bakteri Kolonilerinin Agar Yüzeyindeki Sayımları (10^{-3} e kadar yapılan dilüsyon alınmamıştır)	22
Şekil 2.2 Bakteriyofaj Dilüsyonlarının Hazırlanması (10^{-7} ‘den sonraki dilüsyon alınmamıştır)	25
Şekil 2.3 Adsorbsiyon Oranının Belirlenmesi İçin Kullanılan Formül.....	30
Şekil 3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> Bakteri Suşları PCR Bulguları (M: Marker, 1, 2 : Negatif Kontrol (<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853), 3: Pozitif Kontrol (<i>S. aureus</i> ATCC 29213 suşu), 4-28: Çalışmada Kullanılan <i>S. aureus</i> İzolatları)	31
Şekil 3.2 Tek Basamaklı Büyüme Eğrisi (PN: Penetrasyon, LP: Latent Periyot, LT: Lizis Süresi, BS: Lizis Büyüklüğü)	37

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2-1 Luria-Bertani 10X Broth (Üstte), Luria-Bertani Soft Agar (Altta). 16	16
Resim 2-2 Luria-Bertani Broth..... 17	17
Resim 2-3 Luria-Bertani Agar 17	17
Resim 2-4 %5 Koyun kanlı Agar..... 18	18
Resim 2-5 Spot Test Sonucu Oluşan Plaklar 24	24
Resim 2-6 Spot Test Kontrol Plağı..... 24	24
Resim 2-7 Tek Plak Oluşumu..... 26	26
Resim 2-8 Agar Besiyerinde Yüksek Titrede Bakteriyofaj Görünümü..... 27	27
Resim 2-9 Bakteriyofajların Duyarlılıklarının Belirlenmesi 28	28
Resim 3-1 SA/EMEL_001 Bakteriyofajının Oluşturduğu Plaklar 35	35

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1-1 Fajların ICTV (International Committee of Taxonomy of Viruses) Sınıflandırılması (Sillankorva et al. 2008).....	8
Tablo 2-1 PZR Karışım İçerikleri	21
Tablo 2-2 PZR Koşulları.....	21
Tablo 3-1 Bakteri Suşlarının Antimikrobiyal Direnç Profilleri	32
Tablo 3-2 Antibiyotiklere Dirençli <i>S. aureus</i> Suşlarına karşı SA/EMEL_001 Fajının Litik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	34
Tablo 3-3 SA/EMEL_001 Bakteriyofajının Titresinin Belirlenmesi.....	36
Tablo 3-4 Klinik İzolatlardan Elde Edilen <i>S. aureus</i> Bakteri Suşunun Sayılması.....	37

1 GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

Antibiyotik dirençli bakterilerden kaynaklanan enfeksiyon hastalıkları günümüzde ciddi problemlere neden olmaktadır. (Moellering 2012). Son zamanlarda antibiyotik dirençli bakteri suşlarındaki artış enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ciddi bir tehdit oluşturmuştur. *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı ilaç direnci, özellikle gelişmiş ülkelerin hastanelerinde büyük bir sorun oluşturmaktadır. ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC)'nin tahminlerine göre her yıl nozokomiyal kaynaklı 80.000 hastanın metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) ile enfekte olduğu belirtilmektedir. Bu durum antibiyotiklere alternatif tedavi yöntemleri veya stratejileri geliştirmenin önemini göstermektedir. Litik bakteriyofajlar, antibiyotik dirençli *S. aureus*'un oluşturduğu enfeksiyon hastalıkları için potansiyel bir tedavi seçeneği olup, doğal olarak *S. aureus* suşlarını enfekte ederek yok etmektedir (Kvachadze et al. 2011).

Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat bakteriler her geçen gün antibiyotiklere karşı direnç kazanmaktadır. Tedavide son çare olarak uygulanan antibiyotiklerin sonuç vermediği günümüzde, tıp dünyası farklı tedavi arayışları içerisine girmiştir. Bu arayışa, bakteri türlerine özgü olan ve bakterileri yok eden bakteriyofajlar, tedavide önemli bir cevap olarak karşımıza çıkmaktadır (Kutateladze & Adamia 2010).

Enfeksiyon hastalıklarına karşı yeni antibiyotiklerin bulunmasında, süre ve maliyet açısından ortaya çıkan güçlükler nedeniyle, bakteriyofaj terapi çalışmaları günümüzde tekrar gündeme gelmiştir. Enfeksiyon etkenlerinin bakteriyofajlar ile ortadan kaldırılması işlemi ("faj terapi") günümüzde yeniden önem kazanmıştır (Weber-Dabrowska et al. 2006).

Bakteriyofajlar 19. yüzyılın ilk çeyreğinde tanımlanmış ve bakteriyel çalışmaların başlamasından sonra bakteri yiyen virüs olarak literatüre girmiştir (Summers et al. 2001; Brüssow 2005).

Bakteriyofajlar, bakterilerin yaşadığı ortamlarda, toprakta, çevresel atık sularında, insan ve hayvan vücutlarında, yiyeceklerde ve her yerde bulunabilirler (Dabrowska et al. 2005; Ashelford et al. 2003). Bakteriyofajlar, bakterilerin % 4 – 50 'sini enfekte ederek biyosferdeki jeokimyasal döngünün önemli bir faktörü olarak görev almaktadır (Suttle 2005). Bakteriyofajlar yaklaşık pH 1.3 değerinde ve 95 °C'ye kadar yüksek sıcaklıklara dayanabilmektedir. Ayrıca bakteriyofajların yüksek oranda bakteri spesifik özellikleri, toksik olmamaları ve biyofilm oluşumunda bir çok mikroorganizmayı kontrol ettikleri bildirilmiştir (Kudva et al. 1999).

İn vitro yapılan araştırmalarda fajların; bakteri popülasyonlarını azalttığını, bakteriyel biyofilmleri çözdüğü görülmüştür (Alves et al. 2014). Ayrıca böcek ve farelerde in vivo yapılan çalışmalar fajların enfeksiyon tedavisinde enfeksiyon oranının azalmasına neden olduğunu göstermiştir (Khawaldeh et al. 2011; Morello et al. 2011).

Enfeksiyon hastalıklarında önemli bir patojen olan *Staphylococcus aureus*, basit apsenden, pnömoni, mastit, menenjit, endokardit ve sepsise kadar değişen spektrumda çok farklı hastalıklara neden olmaktadır. Enfeksiyon etkeninin metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olması durumunda, tedavi ile eradike olmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle bakteriyofaj tedavisi, MRSA olmak üzere *S. aureus* enfeksiyonları için tekrar alternatif olarak gündeme gelmiştir (Mann 2008). *Myoviridae* ailesine ait bakteriyofajlar, stafilokok tedavisinde oldukça önemlidir. (Kwiattek et al. 2012). Faj tedavisinde bakteriyofajın sadece enfekte ettiği bakteriye olan spesifikliğı, tedavide çok önemli bir avantaj olarak görülmektedir (Miedzybrodzki et al. 2007)

1.2 Bakteriyofajlar ve Faj Tedavisinin Tarihçesi

Pasteur Enstitüsünde çalışan Felix d'Herelle, 1916 yılında dizanteri hastalarının gaitasından anti-Shiga etkenini ayırarak hastalığa neden olan bakterinin içerisine yerleştirmiştir. Dizanteri basilini yok eden bu virüsü keşfettiğini açıklamış ve onu "bakteriyofaj" şeklinde tanımlamıştır (d'Herelle 1917). Bakteriyofaj terapisi, ilk kez 1919 yılında ağır bir dizanteri hastasında Felix d'Herelle tarafından denenmiştir

(O'Flaherty et al. 2009). 19. yüzyılın ilk çeyreğinde tanımlanan bakteriyofajlar, bakteri yiyen virüs olarak literatüre girmiştir. 1940'lı yıllarda antibiyotiğin keşfi ile popülerliğini yitiren bakteriyofajlar geniş etki göstermesi, kolay ve ucuz yolla üretilebilmesi, faj terapisi alanında uygulanabilir olması gibi avantajlarını fark eden batı dünyasında popülerlik kazanmaya başlamıştır (Summers 2001).

Bakteriyofajlar 1923 yılında kurulan Gürcistan'ın Tiflis şehrinde George Elieva Enstitüsünde birçok hastalığın tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. Günümüzde özellikle de antibiyotik dirençli mikroorganizmalara karşı bakteriyofaj araştırmalarına yeniden bir yönelim olmuştur (Kutateladze ve Adamia 2010).

Akıntılı ve ağrılı cilt yanığı üzerinde stafilokokkal faj kullanılması ile bakteri sayısının azaltılması bakteriyofajların terapatik kullanımları ile ilgili ilk bilimsel rapordur. Bu rapor 1921 yılında Bruynoghe ve Maisin (Lavigne & Robben 2012) tarafından Leuven'de yayınlanmıştır. Bu gelişmenin sonrasında Eli Lilly & Co, Squibb & Sons, Parke-Davies, Swan-Myers ve Abbott laboratuvarları birçok farklı formlarda insanlarda terapi amaçlı faj preparatları hazırlamışlardır (Sulakvelidze ve Morris 2001; Summers 2001).Günümüzde bakteriyofaj alanında büyük çaplı projeler yapılmaktadır. Avrupa'nın Belçika, Fransa ve İsviçre şehirlerinde yapılan Phagoburn projesi insanlar üzerinde faz I ve faz II çalışmaları ile devam etmektedir (Phagoburn 2013).

1.3 Bakteriyofajların Önemi

Dünya Sağlık Örgütü tarafından antibiyotiklerin, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları başta olmak üzere, bir çok ilaca dirençli enfeksiyon etkenleri üzerindeki etkisinin azaldığını ve raporlarda bakterinin hızla direnç kazandığı bildirilmektedir. Son yıllarda, yeni antibiyotik geliştirme çalışmalarının yetersizliği nedeniyle, patojen bakterilere spesifik bakteriyofajların kullanılabileceği tedavi yöntemleri gündeme gelmiş, faj tedavisi *S. aureus* enfeksiyonları açısından oldukça önem kazanmıştır (WHO 2011) . Faj tedavisinde, fajın sadece enfekte ettiği bakteriye olan özgüllüğünün, yan etkisinin olmaması açısından çok önemli bir avantaj olarak görülmesine karşın, fajın tür düzeyinde konak litik spektrumunun sınırlı olması

dezavantajdır (Miedzybrodzki et al. 2007). Dolayısıyla konak spektrumu geniş olan fajların bulunması faj terapisinin etkinliği bakımından önem taşımaktadır. Bakteriyofajların antibiyotiklere karşı birçok avantajı vardır (Loc-Carrillo ve Abedon 2011). Örneğin bakteriyofaj normal mikroflorayı etkilemeden sadece hedef bakteri hücrelerine karşı etki gösterir (Kutateladze ve Adamia 2010).

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) kaynaklı enfeksiyonlarda antibiyotik kullanılarak yapılan tedavi maliyetinin, bakteriyofaj tedavisinden çok daha fazla olduğu bildirilmiştir. Polonya'daki bir bakteriyofaj tedavi merkezinin yaptığı hesaba göre bakteriyofaj tedavisinin antibiyotik tedavisinden daha az maliyetli olduğu belirlenmiştir (Miedzybrodzki et al. 2007).

Moleküler biyolojinin ilk basamaklarını oluşturan genetik kodların tanımlanması ve DNA'nın genetik bir materyal olarak kabul edilmesi gibi birçok buluş bakteriyofajlarla yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiştir (Cairns et al. 1966) .

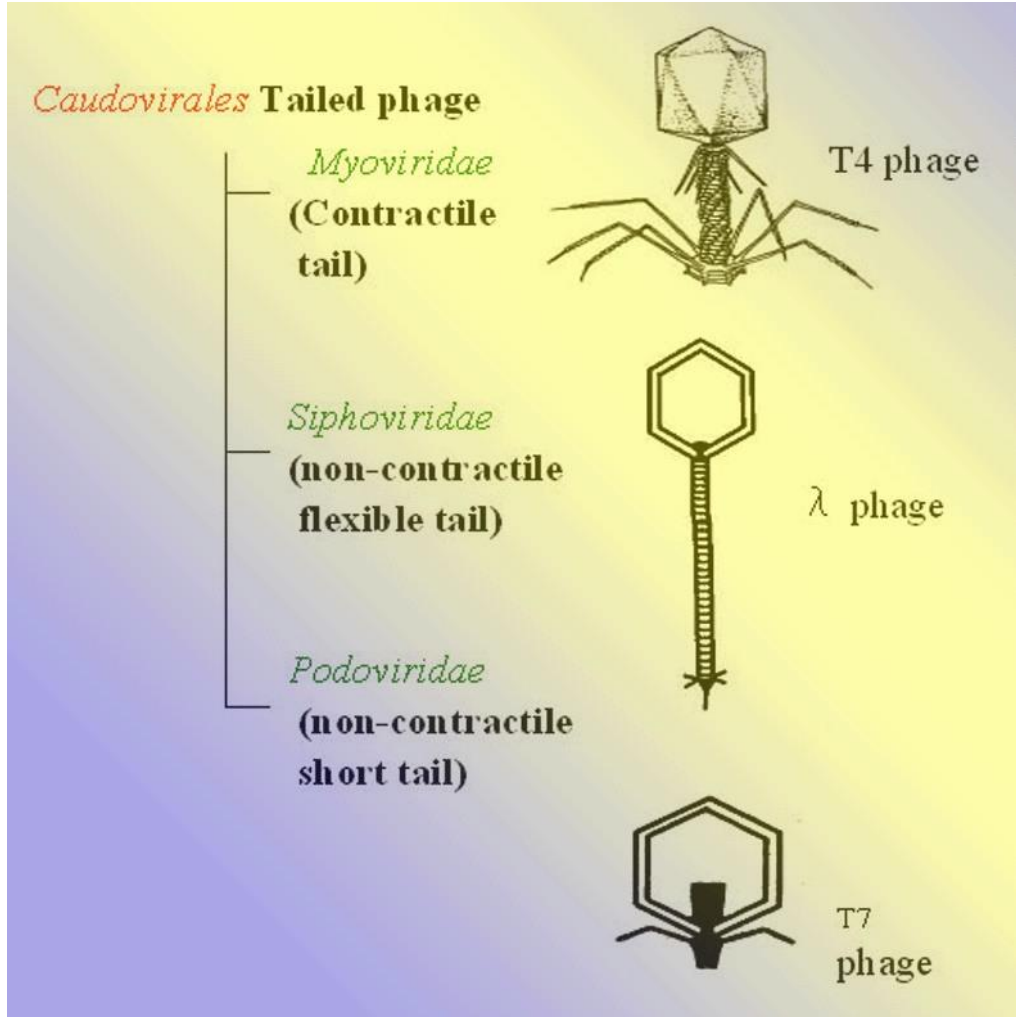
1.4 Bakteriyofajların Morfolojisi ve Sınıflandırılmaları

Bakteriyofajların biyosferde çok farklı türleri bulunmaktadır. Bu nedenle genom farklılıkları bulunmaktadır. Yaklaşık 500 kilobaz büyüklüğe kadar bakteriyofaj genomu bulunmaktadır. Bu genom büyüklüğü bir bakteri genom uzunluğuna yakındır. Bakteriyofajların hayati fonksiyonlarını gerçekleştirebilecek kendilerine ait hücresel mekanizmaları olmadığından zorunlu hücre içi parazitleridir (Guttman et al. 2005).

Bakteriyofajların %95' den fazlası *Caudovirales* takımı olup kuyruklu ve dsDNA yapısındadır. *Caudovirales* cinsi, *Siphoviridae*, *Myoviridae* ve *Podoviridae* olmak üzere 3 aileye ayrılmıştır. Bakteriyofajların %60'ının oluşturduğu uzun ve esnek kuyruklu *Siphoviridae*, %25'nin oluşturduğu çift katlı kısılabilir kuyruklu *Myoviridae*, %15' ise kalın ve kısa kuyruklu *Podoviridae* ailesidir (Şekil 1.1) (Ackermann 2007).

Günümüze kadar ise yaklaşık 5100 bakteriyofaj dört yapısal gruba ayrılarak 1 takım, 17 aile ve 31 cins olarak karakterize edilmiştir. Bradley ve Ackermann

sınıflamalarında kübik, filamentöz ve pleomorfik grupta yer alan bakteriyofaj sayısı yaklaşık 180 olup 10 küçük aile içinde yer almıştır. (Ackermann 2001; Ackermann 2007; Ackermann 2009).



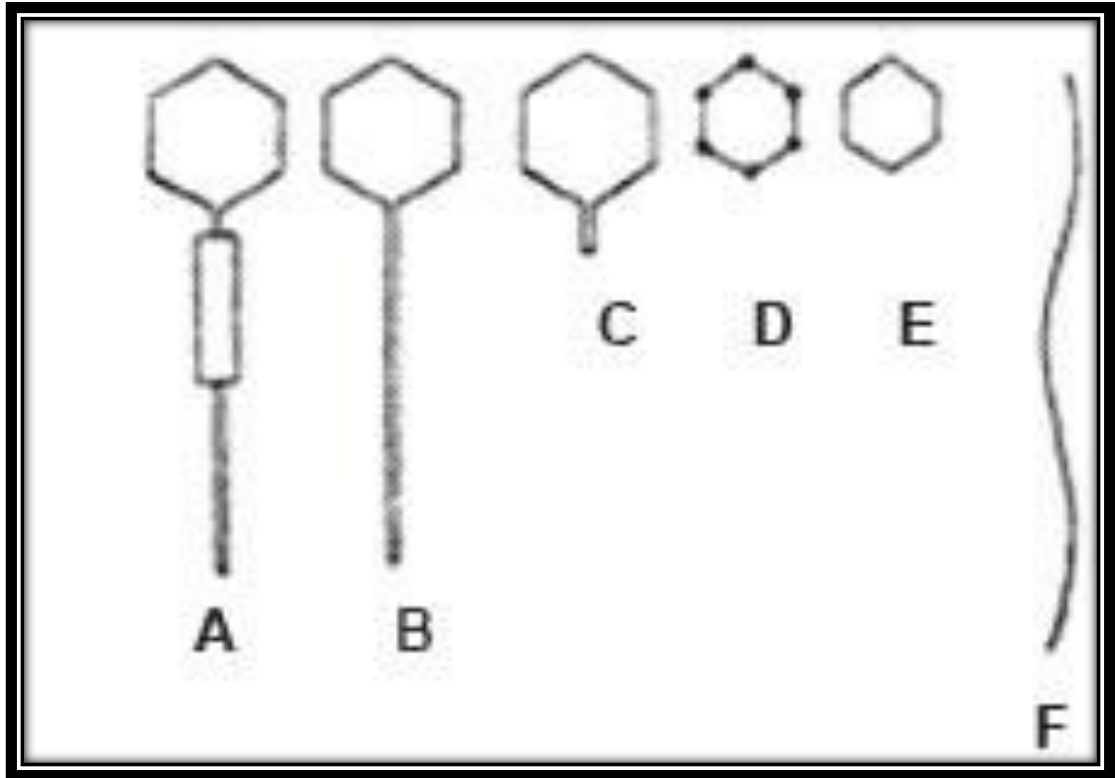
Şekil 1.1 Caudovirales Takımına Ait Üç Ailenin Basit Morfolojisi

(<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/vsrf/virus.img/phage.gif> sitesinden modifiye edilmiştir.)

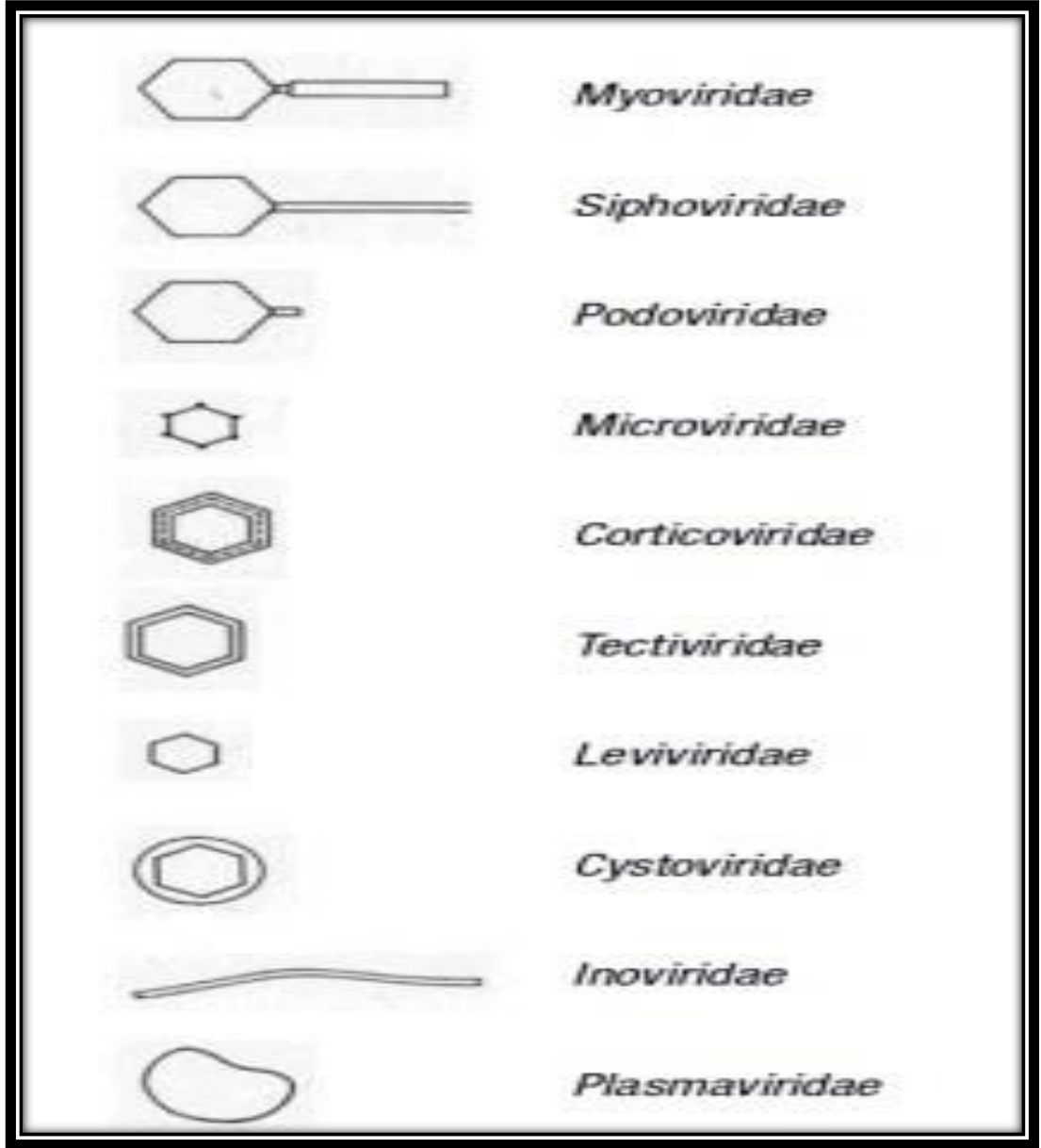
Bakteriyofajlar taşıdıkları nükleik asit tipine ve morfolojik yapılarına göre Bradley tarafından 6 tipe (A – F) ayrılmıştır. Bradley sınıflamasındaki gruplar, kübik, filamentöz ve pleomorfik fajların bulunması ile genişlemiştir. (Şekil 1.2)'de sunulan Bradley sınıflamasına göre Φ X174, T4, λ , PM2, fd ve MS2 fajları 6 faj cinsi olarak kabul edilmiştir (Ackermann 2005).

Sonraki yıllarda bakteriyofajların morfolojik özellikleri ve nükleik asit yapıları da dikkate alınarak 'Ackermann Sınıflaması' olarak adlandırılan (Şekil 1.3) yeni bir sınıflama modeli geliştirilmiştir (Ackermann 2007).

Bakteriyofajların cins ve tür ayırımı için morfolojik olarak belirgin bir kriter yoktur. Bu nedenle sınıflandırma ve kriterleri belirleme açısından ICTV (International Committee of Taxonomy of Viruses) ile klasifikasyonu yapılmaktadır (Tablo 1-1) (Sillankorva et al. 2008).

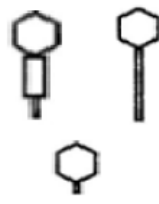












Şekil 1.2 Bakteriyofajların Morfolojik Olarak Bradley Sınıflandırması (Ackermann 2007)



Şekil 1.3 Bakteriyofajların Morfolojik Olarak Ackermann Sınıflandırması (Ackermann 2007)

Tablo 1-1 Fajların ICTV (International Committee of Taxonomy of Viruses) Sınıflandırılması (Sillankorva et al. 2008)

Familya	Nükleik Asit	Özellikleri	Morfoloji
<i>Myoviridae</i>	Lineer dsDNA	Zarfsız, Kontraktıl Kuyruk	
<i>Siphoviridae</i>	Lineer dsDNA	Uzun Kuyruk	
<i>Podoviridae</i>	Lineer dsDNA	Kısa kuyruk	
<i>Corticoviridae</i>	Dairesel dsDNA	İzometrik Kapsit	
<i>Tectiviridae</i>	Lineer dsDNA	Lipoprotein Kaplı	
<i>Lipothrixviridae</i>	Lineer dsDNA	Çubuksu, filament	
<i>Plasmaviridae</i>	Dairesel dsDNA	Kapsit yok, lipit zarf	
<i>Rudiviridae</i>	Lineer dsDNA	Lipit Zarf, Çubuksu	
<i>Fuselloviridae</i>	Dairesel dsDNA	Kapsit yok, Limon formlu	
<i>Inoviridae</i>	Dairesel ssDNA	Uzun veya kısa filament	
<i>Microviridae</i>	Dairesel ssDNA	Kapsit yok, lipit içeren kompleks	
<i>Leviviridae</i>	Lineer ssDNA	Kapsit	
<i>Cystoviridae</i>	Halkalı dsRNA	Lipit Zarf	

1.5 Bakteriyofajlar ve Enfeksiyon Tipleri

Konak hücre dışında cansız formda ve boyutları 1 µm'nin altında olan fajlar kapsid denen protein bir kılıf içinde olup, genomları DNA veya RNA'dan oluşmaktadır. Ayrıca bakteriyofajlar genomunu konak hücreye aktaran bir kuyruğa sahiptir (Ackermann 2007).

5500'ün üzerinde morfolojik analizi yapılmış bakteriyofaj bulunmaktadır. Bakteriyofajlar yeryüzündeki en yaygın yaşam formu olarak bilinmektedir. Bilimsel olarak yapılan hesaplamalara göre yeryüzünde 10^{31} - 10^{33} arasında bakteriyofaj bulunduğu düşünülmektedir. Biyosferde her bir prokaryotik hücre için yaklaşık 10^1 bakteriyofaj olduğu bildirilmiştir (Chibani-Chennoufi et al. 2004).

Bakteriyofajlar kendilerine spesifik bakterileri enfekte eden, hayati fonksiyonlarını devam ettirmek için konak hücreye gereksinim duyan zorunlu hücre içi parazitleridir. Bakteriyofajlar, genetik materyal olarak DNA ve RNA'dan yalnız birini taşırlar. (Guttman et al. 2005).

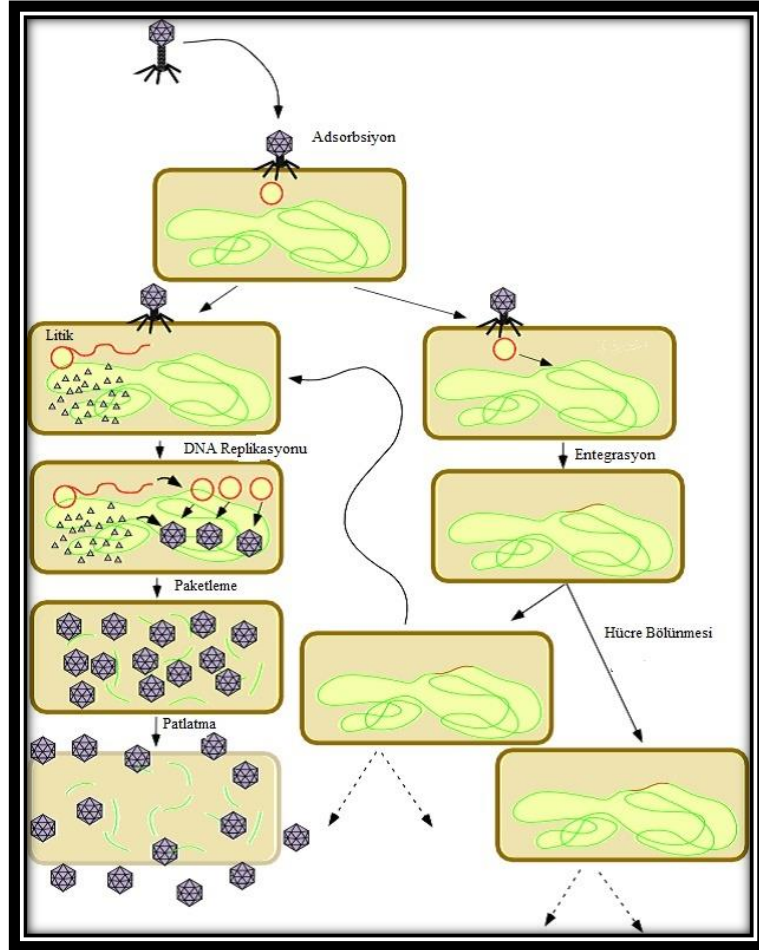
Bakteriyofajın adsorbsiyon ile genetik materyalini konak bakteri hücrelerine aktarılmasıyla enfeksiyon, başlar. İlk olarak faj hedef konak hücre yüzeyinde bulunan spesifik yüzey yapılarına bağlanır. Gram negatif bakterilerin bağlanma reseptörleri genellikle lipopolisakkaritler, pili, flagella ve diğer yüzey proteinleridir. Gram pozitif bakterilerde ise peptidoglikan, teikoik asit, lipoteikoik asitler ve diğer yüzey proteinleridir (Guttman et al. 2005).

Fajlar hedef bakterinin yüzey reseptörlerine bağlandıktan sonra genetik materyalleri direkt olarak bakteri hücrelerinin içerisine endolizin yardımıyla peptidoglikan ve iç membran yapısını penetre ederek aktarır (Molineux 2001; Roos et al. 2007).

Bakteriyofajlar konak bakteri hücreleri içerisinde çoğalma durumlarına göre ikiye ayrılmıştır. Litik ya da virüent olarak tanımlanan fajlar bakteriye genetik materyalini aktardıktan sonra bakteri içerisinde çoğalarak yaklaşık 1 saat içerisinde bakteriyi lize eden fajlardır. Bakteriyi lize etme süresi fajlar arasında değişiklik göstermektedir (Abedon 2008). Litik bakteriyofaj, enfekte ettiği bakteri stoplazmasında saatler içinde yaklaşık 100-300 yeni faj oluşturur. Üreyen bakteriyofajlar da yeni jenerasyon bakterileri enfekte ederek öldürürler (Mattey ve Spencer 2008).

Litik bakteriyofajlar enfeksiyon bölgelerinde toksisiteye neden olmadan konsantrasyonları hızla arttırırlar (Summers 2001). Bunun yanı sıra lizojenik yaşam şeklinde faj bakteriye genetik materyalini aktardıktan sonra bakteri genomuna entegre

olup konakçı bakterinin bir parçası halini alan ve bakteri üredikçe çoğalan lizojenik siklus gösteren faj tipi lizojenik fajdır (Şekil 1.4) (Campbell 2007) . Bu şekilde bakteri genomuna entegre olan faja “profaj”, profajı taşıyan bakteriye de “lizojen bakteri” denir. Profaj, UV, mitomisin C, mutajenik maddeler ve inkübasyon sıcaklığındaki değişimlerle indüklenerek litik hale getirilebilir (Soykut et al. 2008).



Şekil 1.4 Bakterilerde Litik ve Lizojenik Enfeksiyon

(/https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSKmaxbkKc5823N7xcakuQH8rP_R3YEsYbociB2Id7-zpZ_xdK2 modifiye edilmiştir).

1.6 Bakteriyofajların Uygulama Alanları

Bakteriyofajlar terapötik amaçla, Rusya, Polonya ve Rusya gibi çok az sayıda ülkede insanlara uygulanmaktadır. Üst solunum yolu enfeksiyonları, apse, yanık, iltihaplı yaralar gibi birçok hastalığın tedavisinde bakteriyofajlar kullanılmaktadır (Bruttin ve Bru 2005). Rusya'da 1990'ların başında iç savaş devam ederken askerler, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. pyogenes* bakterilerine karşı bakteriyofaj kullanımına devam etmişlerdir (Dabrowska et al. 2005).

George Eliava, 1923 yılında Tiflis'de enstitü kurarak bakteriyofajlar ile insanlarda terapi çalışmalarına başlamıştır. Bakteriyofajların ucuz olması nedeniyle Sovyet ordusu tarafından üretilen faj preparatları kullanılmıştır. Ayrıca Eliava Enstitüsü 1945'li yıllarda anaerobik enfeksiyonlar için bakteriyofajlar izole etmişlerdir (Weber-Dabrowska et al. 1987). Günümüzde bakteriyofajların antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı ve yararlı etkilerinin ortaya konduğu çalışmalar da mevcuttur. ABD Gıda ve İlaç Dairesi FDA tarafından onaylanmış Listex P100 olarak isimlendirilen tüketime hazır kırmızı et ve kanatlı ürünlerde antibakteriyel gıda katkısı olarak kullanılan ticari ürün *Listeria monocytogenes*-spesifik bakteriyofaj preparatı 2006 yılında onaylanmıştır ve bu preparat genel olarak güvenli kabul edilenler listesine eklenmiştir (O'Flaherty et al. 2009).

Bakteriyofajlardan elde edilen integraz, DNA ligaz enzimleri moleküler biyolojide çok önemli kullanım alanlarına sahiptirler. Ayrıca bakteriyofajlardan elde edilen vektör, cosmid ve promoter gibi ürünler rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinde önemli rol oynamıştır (Summers 2006). Bakteriyofaj tedavisi için ABD'de Gürcistan ile ortaklaşa kurulan firmalar bulunmaktadır. Açık yaraların tedavisinde kullanılmak üzere, bakteriyofajlar ile aşılanan yapay deriler elde edilmektedir. Deriler çevreye zarar vermeyen kolayca toprakta çözünebilen polimer yapıdadır. Intralytix firması, ABD'de ürünün denemelerini yapmaktadır. GangaGen firması daha sonraki faj tedavilerinde antikörlerin oluşumuna daha az neden olan fajlar geliştirmeye çalışmaktadır. (Kutateladze & Adamia 2010).

Son yıllarda ABD ve İngiltere’de dirençli bakterilere karşı insanlar için bakteriyofaj tedavi çalışmaları sürmektedir. ABD’nin Texas eyaletindeki yara bakım merkezi, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*’ye karşı faz I çalışmaları yürütmektedir. Londra’da Great Ormond Street hastanesinde *P. aeruginosa*’ kaynaklı otitis enfeksiyonlarına karşı faz II çalışmaları devam etmektedir (Sillankorva et al. 2008; Pires et al. 2014).

Bakteriyofajların diğer kullanım alanlarından bir tanesi ise dezenfektan olarak kullanılmalarıdır. Bakterilerin üremesini engelleyerek hastanelerde hastaların enfeksiyon kapmasını önleyerek potansiyel antibiyotik kullanımını azaltır (Kumari et al. 2010). Bakteriyofajların biyokontrol ve terapi amaçlı kullanılabilmesi için “litik faj” karakteri göstermesi gereklidir. Bakteriyofajlar, bakterilerin identifikasyonu ve bakteri suşlarının alt tiplendirilmesi için de kullanılmaktadır (Connerton et al. 2004).

Bakteriyofajlar, antibiyotiklere alternatif olarak tıbbi cihazlardaki patojenlerin temizlenmesi ve insanlarda bakteriyel hastalıkların tedavisinde önerilmektedir. Minho Üniversitesi’nde (Braga, Portekiz) yapılan çalışmalarda, *S. epidermidis* suşlarının oluşturduğu biyofilmlerinin bakteriyofajlarla kontrol edilebileceği bildirilmiştir (Cerca et al. 2007).

Bakteriyofajların kullanım alanlarından bir diğeri de ürünlerin gıda kaynaklı patojenlerden korunmasıdır. Balık ve çiftlik hayvanlarında meydana gelen hayvan hastalıklarını en aza indirmek için patojen bakterileri bakteriyofaj ile enfekte etme çalışmaları yapılmaktadır. Bu alandaki çalışmalar *E. coli*, *Campylobacter* ve *Salmonella* bakterileri üzerinde yapılmıştır. Çalışmada kullanılan değişik bakteriyofajlarla bu patojenlerde başarılı bir azalma olduğu bildirilmiştir (Atterbury et al. 2007).

1.7 Staphylococcus aureus

Micrococcaceae ailesinin üyesi olan stafilokoklar ismini, Gram pozitif kokların üremeleri esnasında üzüm salkımı şeklinde üremelerinden almıştır. Stafilokokların çoğu 0,5-1,5 µm çapında, Gram pozitif, fakültatif anaerob ve hareketsiz olup yüksek

tuzlu ortamlarda 30-37°C’de 18-24 saat içerisinde üreyebilmektedir. *Staphylococcus aureus*, çeşitli doku ve organlarda ağır enfeksiyonlara sebep olan en önemli türüdür. *S. aureus* insanda saptanan koagülaz enzimi oluşturan tek türdür (Lowy 1998; Brown et al. 2009).

Stafilokoklar dünyada en yaygın hastane enfeksiyon etkenlerindedir. Sağlıklı insanların %20’sinde burunda kolonize olduğu tespit edilmiştir (Moran et al. 2006). *S. aureus* nemli deri bölgelerinde, yeni doğanların göbek kordonunda, deri ve perianal bölgelerinde, orofarinks, gastrointestinal ve ürogenital sistemde normal flora etkeni olarak bulunabilir (Seenivasan ve Yu 2003).

Alexander Fleming’in 1928’de penisilini bulması ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. *S. aureus* suşlarında penisilin direnci 1944’de Kirby tarafından bildirilmiştir (Gordon et al. 2013). Bilinçsiz antibiyotik kullanımı nedeniyle birçok bakteri, tedavilere karşı direnç mekanizması geliştirmiştir. *Staphylococcus aureus* suşları da antibiyotiklere karşı kazandığı direnç mekanizmaları yüzünden hastane enfeksiyonlarında büyük sorunlar oluşturmaktadır. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları hastanede yatan hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadır. Ayrıca sağlıklı çocuk ve yetişkinlerde son yıllarda hastane dışında da enfeksiyonlara neden olan önemli enfeksiyon etkenlerindedir (Naimi et al. 2003; Moran et al. 2006). *S. aureus* suşları bakteriyeminin de yaygın etkenlerindedir. Genelde enfeksiyon zararsız görülen cilt enfeksiyonlarından kan dolaşımına geçmektedir. *S. aureus*’un oluşturduğu akut endokardit mortalitesi %50’lere ulaşan ciddi bir hastalıktır. Stafilokoklara bağlı yara enfeksiyonları ise travma sonrası, cerrahi girişim sonrası, ciltte kolonize olmuş bakterinin yaraya ulaşmasıyla oluşmaktadır (Seenivasan ve Yu 2003).

Stafilokokların çoğunda en dışta polisakkarit yapıda bir kapsül bulunur. *S. aureus* suşlarında 11 kapsül serotipi bulunmuştur. Kapsül bakteriyi fagositozdan korumaktadır. Peptidoglukan tabaka ise hücre duvarının yarısını oluşturmaktadır. Teikoik asit hücre duvarının diğer büyük komponentidir. *S. aureus* suşlarının çoğunun yüzeyi protein A ile sarılmıştır. Protein A varlığının görülmesi *S. aureus* için spesifik bir tanımlama testi olarak kullanılmaktadır. Diğer spesifik tanımlama testi kümelenme faktörüdür (‘clumping faktör’). Bu protein, *S. aureus* ’un önemli bir virülens faktörüdür

(Dinges et al. 2000)(Gordon et al. 2013). Fibrinojene bağlanarak çözünür hale getirip fibrinojoni fibrine dönüştürerek stafilokokların kümelenmesine yol açmaktadır (Gordon et al. 2013).

Stafilokoklar, antibiyotiklerin çoğuna direnç geliştirme özelliğine sahiptir. Son zamanlarda *S. aureus* suşlarında vankomisin ve metisiline karşı iki formda direnç bulunmaktadır. Bu dirençli bakteriler geniş bir alana yayılacak olursa virülansı yüksek bu bakteri enfeksiyonlarının antibiyotik tedavisi çok zor olacaktır(Stanley & Amagai 2006).

Bu tez kapsamında fırsatçı bir Gram-pozitif patojen olan çoklu antibiyotik dirençli *S. aureus* bakterisine özgü litik aktivitesi yüksek bakteriyofaj izole edilerek, faj terapisi ve faj uygulamalarının ilk basamakları oluşturulması hedeflenmiştir.

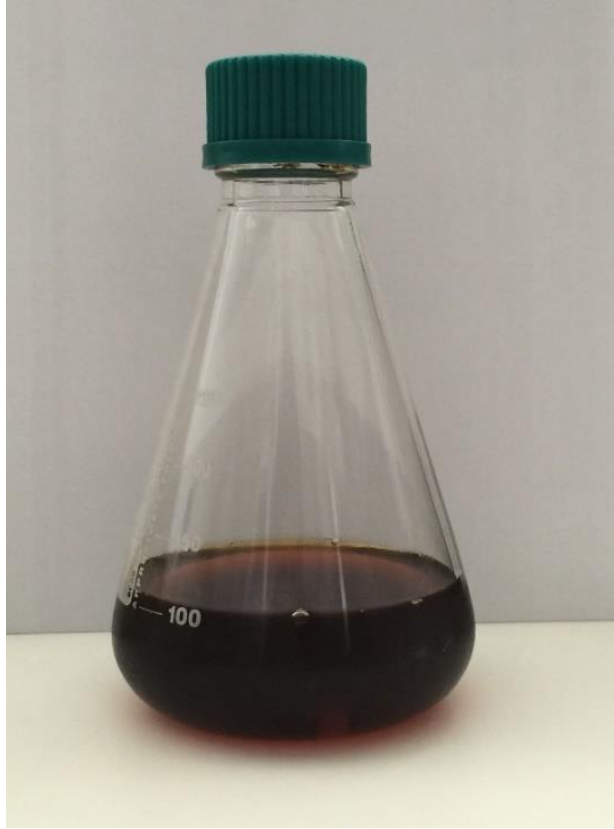
2 GEREÇ ve YÖNTEM

2.1 Kullanılan Besi Yerleri

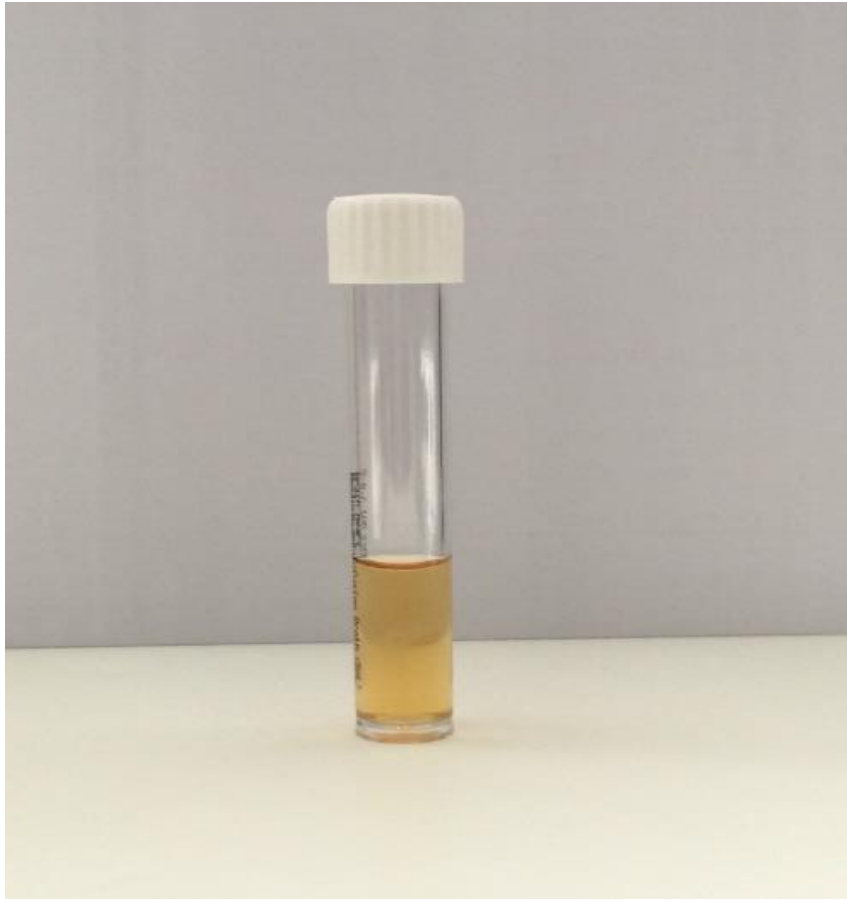
Tez çalışmada kullanılan besiyerleri şunlardır;

- Luria Bertani Broth (25 g dehidre besiyeri; maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L) MERCK, Almanya (Resim 2-1) (Resim 2-2).
- Luria Bertani Soft (yumuşak) Agar (maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L, 5 gr/L agar agar) MERCK, Almanya (Resim 2-1).
- Luria Bertani Agar (maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L, 15 gr/L agar agar) MERCK, Almanya (Resim 2-3).
- % 5 koyun kanlı agar (Nutrient substrate kalp ekstraktı ve peptonlar, 20,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; agar-agar 15,0 g/L ve 5 ml/L defibrine koyun kanı) MERCK, Almanya (Resim 2-4).

Çalışmamızda kullanılan Luria Bertani Agar, Luria Bertani Broth ve Luria Bertani Soft (yumuşak) Agar yeterli miktarda distile su içerisinde ısıtılarak çözülüp 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Akabinde Luria Bertani Agar steril petri kutularına 13 ml, Luria Bertani Broth steril tüplere 4,5 ml ve Luria Bertani Soft Agar steril tüpler yatık olacak şekilde 6 ml alınarak dökülmüştür. % 5 koyun kanlı agar ise steril petrilere hazır dökülmüş şekilde satın alınarak çalışmamızda kullanılmıştır.



Resim 2-1 Luria-Bertani 10X Broth (Üstte), Luria-Bertani Soft Agar (Altta)



Resim 2-2 Luria-Bertani Broth



Resim 2-3 Luria-Bertani Agar



Resim 2-4 %5 Koyun kanlı Agar

2.2 Bakteri Suşları

Tez çalışmasında kullanılan antibiyotik dirençli bakteriler Şifa Üniversitesi Hastaneleri Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonu stoklarından alınmıştır.

Çalışmamızda antibiyotik dirençli 25 adet *S. aureus* bakteri izolatu, bir tane referans *S. aureus* ATCC 29213 bakteri suşu ve negatif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri suşu kullanılmıştır. Antibiyotik dirençli *S. aureus* izolatları LB broth içerisinde 24 saat süre ile 37 °C'de aerobik şartlarda inkübe edilerek canlandırılmıştır. Daha sonra kontaminasyon kontrolü için sıvı besiyerinden alınan bakteri kültürü %5 koyun kanlı agara tek koloni düşecek şekilde öze ile ekilerek 37 °C'de aerobik şartlarda 24 saat süre ile inkübe edilmiştir.

2.3 *Staphylococcus aureus* İzolatlarının İdentifikasyonu ve Bu İzolatların PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İle Teyit Edilmesi

Şifa Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan VİTEK 2 cihazı kullanılarak Gram pozitif bakteriler için VK2C9252 kartı ile ilk tanımlamaları önceden yapılan antibiyotik dirençli 25 adet *S. aureus* izolatu bakteri-spesifik *S. aureus*-spesifik SA-1 5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3' ve SA-2 5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3' primerleri kullanılarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizleri yapılmış ve suşların identifikasyonları teyit edilmiştir.

2.3.1 DNA İzolasyonları

S. aureus suşları bir gün öncesinden LB Broth içerisinde 24 saat 37 °C'de aerobik şartlarda inkübe edildikten sonra ticari bir DNA izolasyon kitiyle (Invitrogen, ABD) ilgili firmanın vermiş olduğu protokole göre DNA izolasyonu yapılmıştır.

Bir gün öncesinden inkübe edilen *S. aureus* suşları santrifüj edilip çöktürülerek üzerine 180 µl lizozim digestion tampon çözeltisi (20 mg Lizozim/ml) ve 20 µl Proteinaz K eklenerek 55°C'de 30 dk inkübe edildi. Üzerine 20 µl RNase A eklenerek 2 dk bekletilmiştir. Sonrasında üzerine 200 µl liziz tampon çözeltisi eklenerek homojen bir karışım olana kadar vorteksledikten sonra 200 µl etanol eklenip DNA filtre tüplerinde yıkama tampon çözeltisi ile 14000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj ile DNA'lar filtrelere bağlandıktan sonra 20 µl distile su eklenip 14000 g'de 1 dk santrifüj edilerek DNA izole edilmiştir.

2.3.2 PZR İşlemi

DNA'yı çoğaltmak için Pereira ve ark. (2009) tarafından tanımlanan *S. aureus* –spesifik 108 bp (baz çifti) *mecA* gen bölgesini kodlayan SA-1 5'-AAT CTT TGT

CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3' ve SA-2 5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3' primerleri kullanılmıştır (Pereira et al. 2010).

DNA çoğaltılması, 25 µL PZR tampon çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. PZR tampon çözeltisi; primer örneklerinden 0,50 µL (1 µM), 12,5 µL 2X master miks (i-TAq, intron), 11,50 µL steril distile su ve 0,5 µL (~ 1µg) hedef DNA'dan oluşmaktadır. Hazırlanan PZR tampon çözeltisi PZR-termal cyclor cihazında;

1. 94 °C'de 5 dk 1 siklus (ön denatürasyon),
2. 94 °C'de 30 sn 55°C'de 60 sn, 72°C'de 90 sn, 30 siklus,
3. 72 °C'de 5 dk 1 siklus (son zincir uzaması)

şeklinde çoğaltılmıştır (Tablo 3). 5 µl DNA örneği, 1 µl loading dye ile boyanmıştır. Akabinde, 5 µg/ml etidyum bromid içeren agaroz jelde (%1) elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Marker olarak 100 bp DNA ladder (Genaid, İngiltere) kullanılmıştır. PZR işleminde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu, negatif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır.

İzole edilen DNA örnekleri PZR karışımı (Tablo 2-1) hazırlanarak laboratuvarımızda optimize edilen PZR koşullarında (Tablo 2-2) DNA çoğaltım işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek sonuçlar gözlemlenmiştir.

Tablo 2-1 PZR Karışım İçerikleri

STOK İÇERİK	MİKTAR	SON KONSANTRASYON
1 µg/ml DNA	0,5 µl	20 ng/ml
100 mM Primer SA-1	0,25 µl	1 µM
100 mM Primer SA-2	0,25 µl	1 µM
2X PZR Master Mix Solusyonu (i-Taq)	12,5 µl	1X
Distile Su	11,5 µl	-
Toplam	25 µl	

Tablo 2-2 PZR Koşulları

Sıcaklık(°C)	Süre(Dk)	Döngü Sayısı
94	5'	1
94	30"	30
55	60"	
72	90"	
72	5'	1

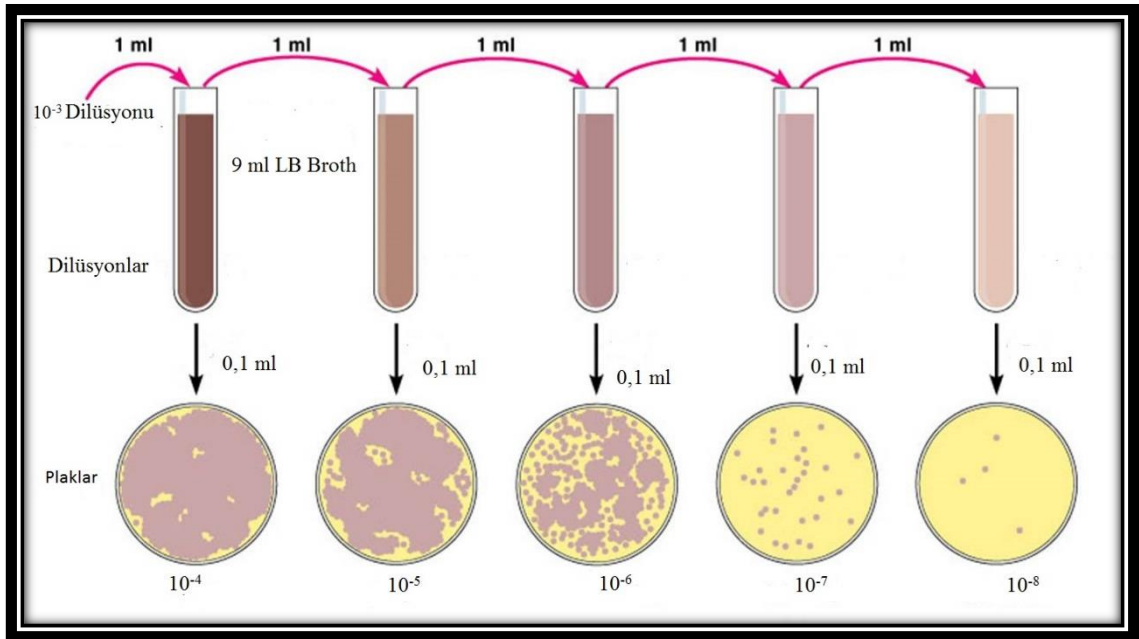
2.4 Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Antimikrobiyal Analizleri

Kullanılan bakteri suşlarının antimikrobiyal analizleri Şifa Üniversitesi Bornova Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan Vitec 2 (BioMerieux,

Fransa) cihazı ile Gram pozitif bakteriler için kullanılan VK2C9252 kartı ile yapılmıştır. Kullanılan bakteri suşlarının antibiyotik direnç bulguları (Tablo 3-1)'de verilmiştir.

2.5 Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Sayılması

Sayımı yapılacak bakteri kültürü başlangıç stoku olarak belirlenmiştir. Bakteri sayımı sonucunda elde edilen veriler cfu/ml birimi cinsinden belirlenmiştir. Başlangıç stoku olarak belirlenen bakteri stokundan 1 ml alınarak 1/10 oranında LB broth içerisinde dilüe edilmiştir. Dilüsyon işlemi 10^{-8} 'e kadar gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1). Dilüsyon tüplerinden alınan 100 μ l'lik örnekler LB agarlar üzerine ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında LB agarlar üzerinde oluşan bakteri kolonileri sayılarak ilk stoktaki bakteri miktarı tayin edilmiştir. Bu işlemler 3 repetasyonla teyit edilmiştir.



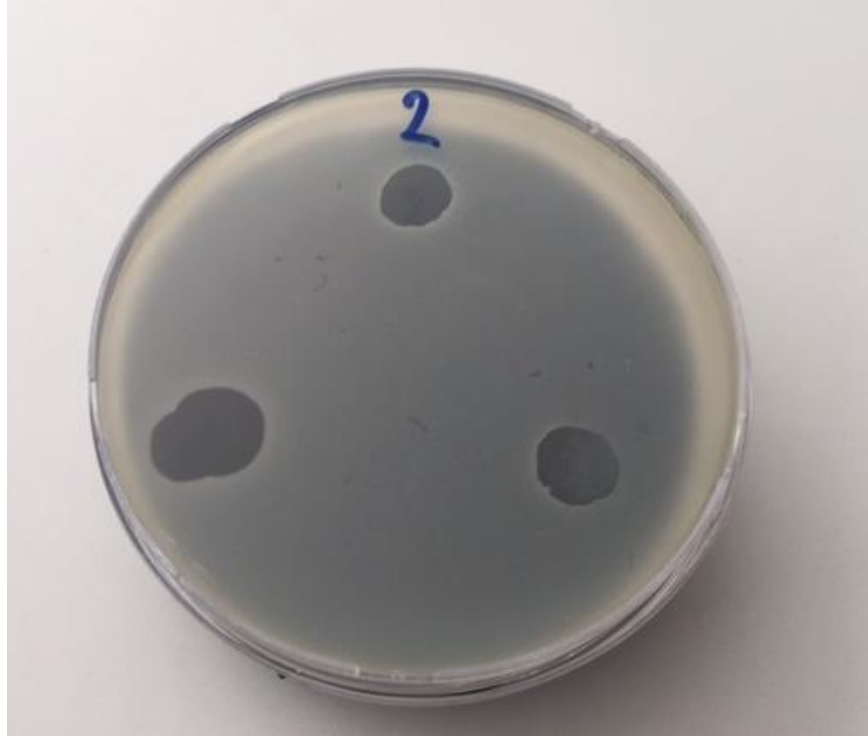
Şekil 2.1 Bakteri Sayımında Seri Dilüsyonlarının Hazırlanması ve Bakteri Kolonilerinin Agar Yüzeyindeki Sayımları (10^{-3} e kadar yapılan dilüsyon alınmamıştır)

(http://o.quizlet.com/i3VcoeMphCKITuuePyFv4g_m.jpg adresinden modifiye edilmiştir)

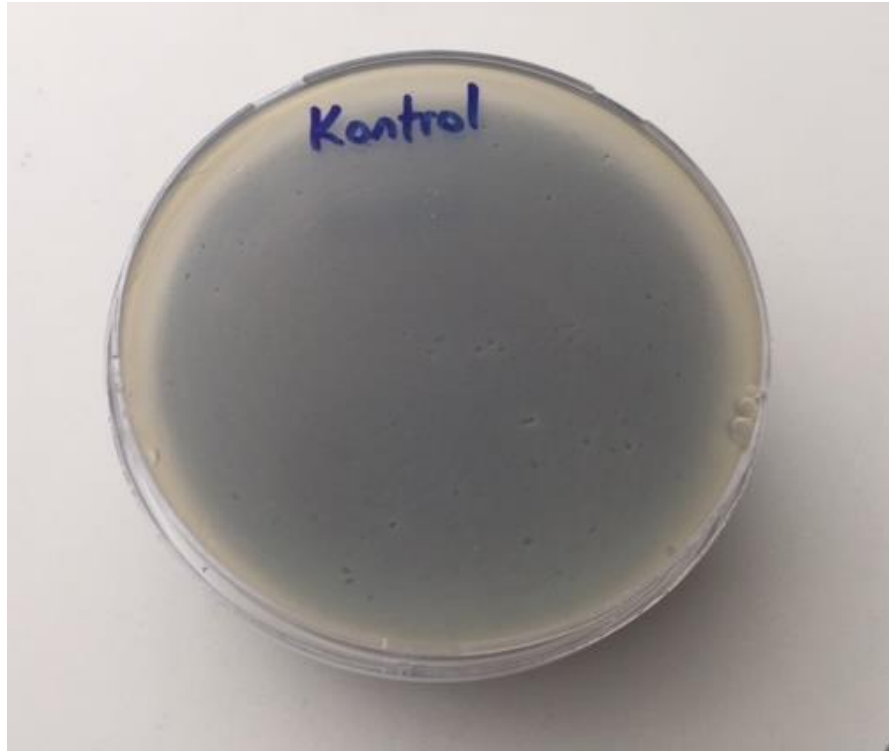
2.6 Bakteriyofaj İzolasyonu

Bakteriyofaj izolasyonu (Merabishvili et al. 2014) tarafından hazırlanan protokole göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca; atık su örneklerinden toplanan örneklerden alınan 90 ml sıvı örneği 10 ml 10 X LB Broth (250gr/L) besi yeri ile karıştırılarak üzerine hedef bakteri kültüründen 1 ml eklenmiştir. Hazırlanan karışım 37 °C’de 24 saat süre ile aerobik ortamda inkübe edilmiştir. Akabinde, karışımdan alınan 5 ml örnek içerisinde bulunan partikülleri uzaklaştırmak amacıyla 9000 rpm (dv/dk)’de 10 dk süreyle santrifüj (Hettich, Rotina 420 R) işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısım 0,45 mikrometrelik selüloz asetat filtreden (Milipore) geçirilerek steril bir tüpe aktarılmış ve üzerine 1/10 oranında kloroform eklenmiştir. Elde edilen süspansiyon oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir.

Yatık besiyerinde inkübe edilen taze bakteri kültürü üzerine 4,5 ml LB broth eklenerek vortekslenmiş ve elde edilen kültürden 100 µl alınarak steril bir tüpe aktarılmıştır. Daha sonra bakteri kültürü üzerine 4 ml soft agar eklenerek LB agar üzerine yayılmıştır. Hazırlanan agar preparatları üzerine 10 µl bakteriyofaj süspansiyonu damlatılarak 37 °C’de 18 saat süre ile aerobik ortamda inkübe edilmiştir. Ertesi gün agar üzerlerinde oluşan plaklar gözlemlenmiştir (Resim 2-5). Plak oluşumu görülen petriler üzerine damlatılan filtre edilmiş sıvılarda bakteriyofaj varlığı saptanmıştır.



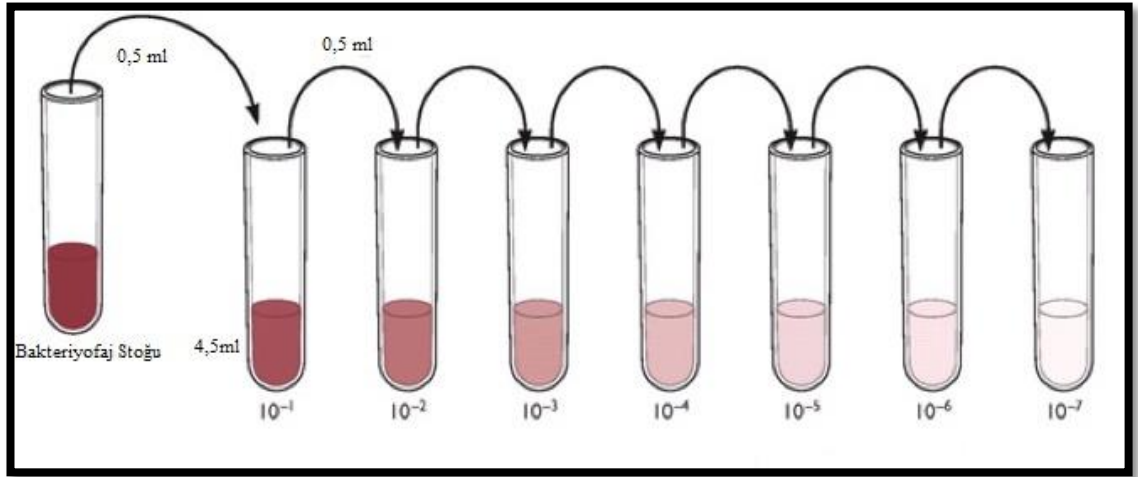
Resim 2-5 Spot Test Sonucu Oluşan Plaklar



Resim 2-6 Spot Test Kontrol Plağı

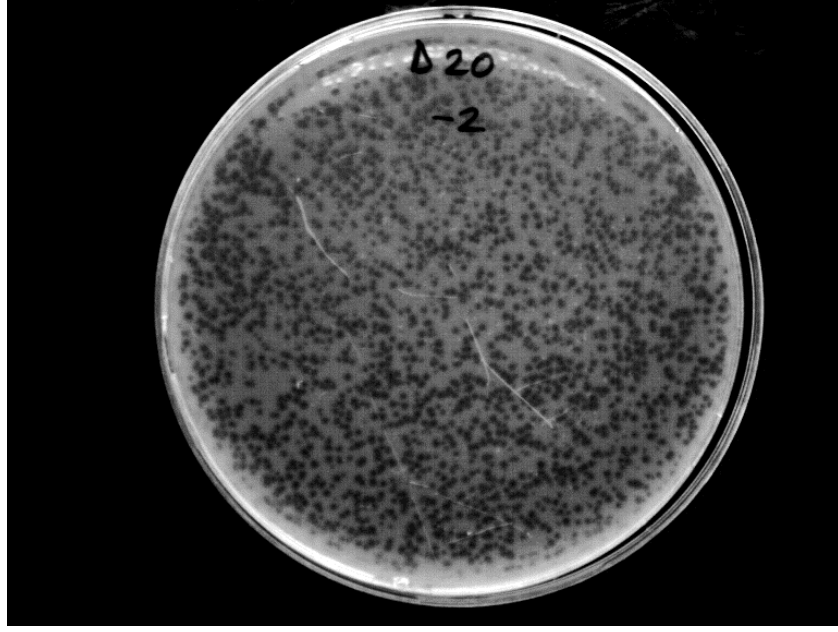
2.7 İzole Edilen Bakteriyofajların Pürifikasyonu

İçerisinde faj varlığı belirlenen sıvı örnekleri, faj titresinin seyreltilebilmesi amacıyla 10^{-10} 'a kadar sıralı dilüsyona tabi tutulmuştur (Şekil 2.2). Dilüsyon tüplerinden alınan 1 ml bakteriyofaj örneği, 100 µl taze hedef bakteri kültürü ile karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında 10 dakika beklenmiştir. Daha sonra, çift tabaka agar yöntemi kullanılarak üzerine 4 ml yumuşak LB Agar eklenerek karıştırılmış ve LB agar üzerine yayılarak 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. 18 saatlik inkübasyondan sonra petriler üzerindeki plak oluşumları gözlemlenmiştir. Tek plak oluşumu görülen petrilerden bakteriyofaj plakları steril pastör pipeti ile kesilerek LB Broth içerisine aktarılmıştır (Resim 2-7). Kesilen bakteriyofaj plakları sıvı besiyerinde karıştırılarak bakteriyofajların besiyerine geçmesi sağlanmıştır. Bu bakteriyofaj süspansiyonu tekrar sulandırılarak çift tabaka agar yöntemi uygulanarak 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir (Merabishvili et al. 2009). Bu işlem üç gün boyunca tekrar edilmiştir. Üçüncü günün sonunda oluşan tek plak düşen petriden kesilen fajlar sıvı besiyeri içerisine aktarılıp iyice karıştırılarak fajların besiyerine geçmesi sağlanmıştır. En son elde edilen besiyeri faj karışımı, pürifiye olmuş saf bakteriyofaj stoku olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.2 Bakteriyofaj Dilüsyonlarının Hazırlanması (10^{-7} 'den sonraki dilüsyon alınmamıştır)

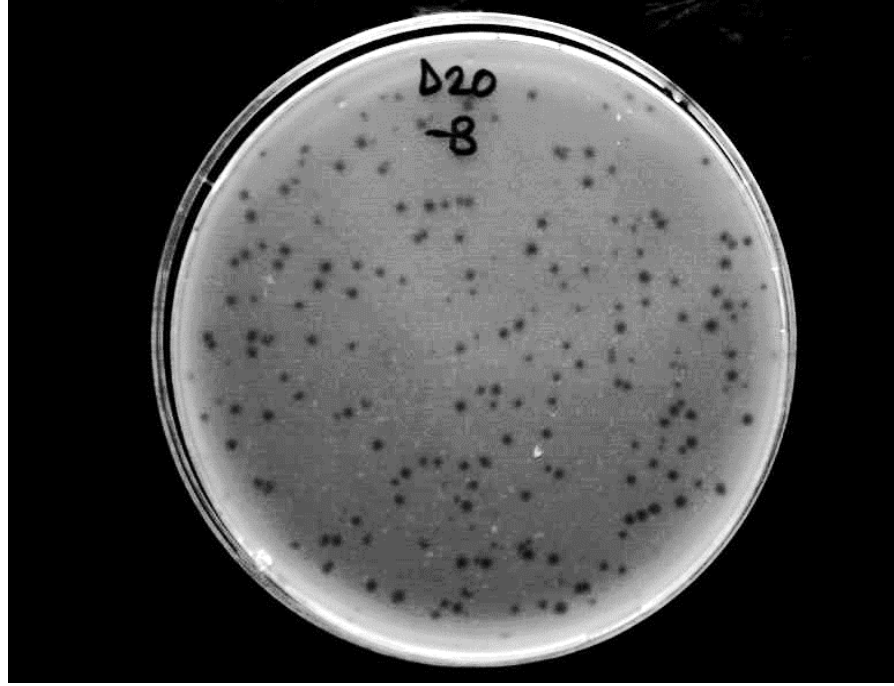
(<http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e0q.jpg> den modifiye edilmiştir).



Resim 2-7 Tek Plak Oluşumu

2.8 Bakteriyofajların Titresinin Artırılması

Pürifikasyon işlemi gerçekleştirilen bakteriyofajlar deneylerde kullanılmak amacıyla dilüe edilerek çift tabaka agar yöntemi ile titreleri artırılmıştır. 10^{-7} 'ye kadar dilüe edilmiş pürifiye faj sıvısı çift tabaka agar yöntemi ile LB Agar üzerine yayılarak 37°C 'de 18 saat süre ile aerobik ortamda inkübe edilmiştir. Akabinde gerçekleştirilen gözlemler sonucunda liziz olmamış agar örnekleri üzerine 3 ml LB broth eklenerek yüzey kısımları scraper yardımıyla kazınarak LB Broth içerisinde süspansiyon edilmiştir. Oluşan karışım steril tüp içerisine alınarak 9000 rpm (dv/dk)'de 10 dk süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım alınarak 0,45 mikrometre gözenek çaplı membran filtre ile filtre edilmiştir. Filtreleme işlemi sonrasında elde edilen faj konsantrasyonu başlangıç stoku kabul edilmiştir. Bu işlem yüksek bakteriyofaj titresi elde edilene kadar devam etmiştir. Son bakteriyofaj stoğu yüksek titre bakteriyofaj olarak çalışmalarda kullanılmıştır (Resim 2-8).



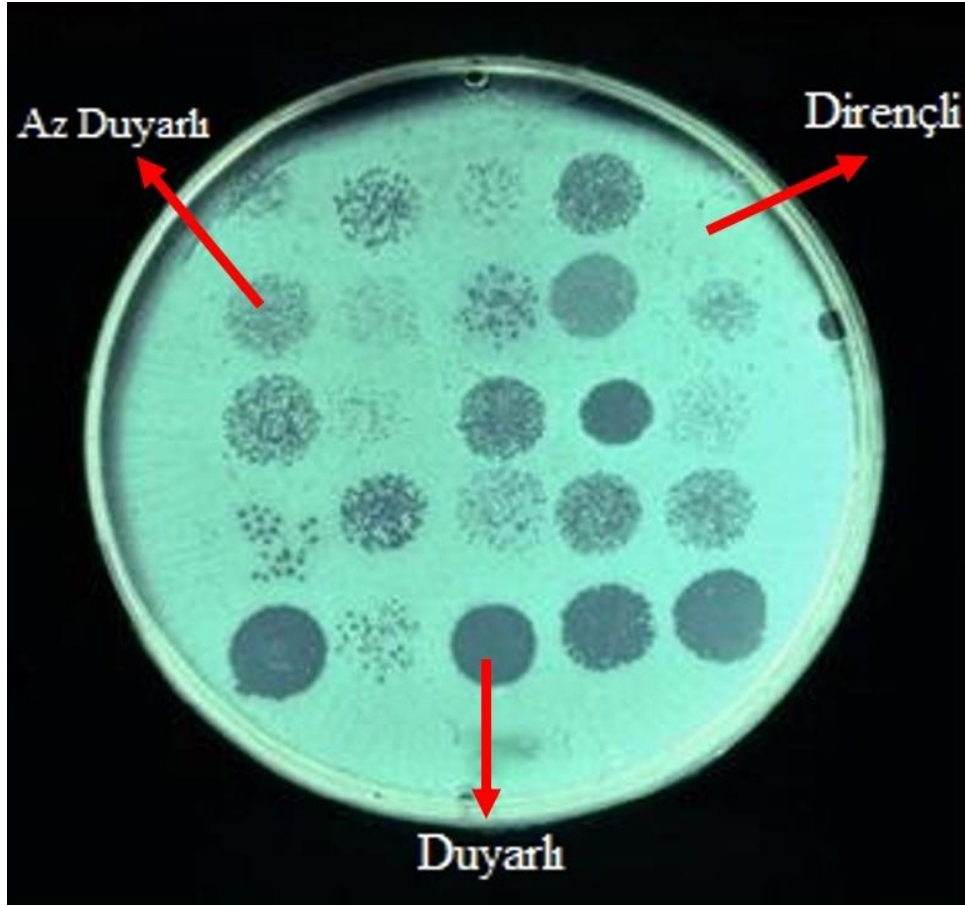
Resim 2-8 Agar Besiyerinde Yüksek Titrede Bakteriyofaj Görünümü

2.9 Pürifiye Edilen Bakteriyofaj Titresinin Belirlenmesi

Bakteriyofajların sıvı kültür içerisindeki titresinin belirlenmesi çift tabaka agar metodu ve sıvı kültürün dilüe edilmesiyle hesaplanmıştır. Bakteriyofajların titresi bir mililitre örnek içerisinde bulunan bakteriyofaj sayısının hesaplanması ile belirlenmiştir. Titre belirlenmesinde pfu/ml birimi kullanılmıştır. Öncelikle kültür içerisindeki bakteriyofaj stoku 10^{-8} 'e kadar dilüe edilmiştir. Steril tüpler içerisinde bulunan yatık besiyerindeki bakteri suşları 37°C 'de 24 saat süre ile aerobik ortamda inkübe edilmiş. İnkübasyondan sonra 4,5 ml LB Broth ile vortekslenerek içerisinde 100 μl alınarak başka bir steril tüpe aktarılmıştır. Daha sonra her bir bakteri kültürü üzerine bakteriyofaj dilüsyonlarından 1 ml alınarak ve üzerlerine 3 ml yumuşak LB agar içeren petrilere yayılmıştır. Bakteriyofaj titresi inkübasyon sonunda her bir agar tabakası üzerindeki plaklar sayılarak belirlenmiştir. Örneğin 10^{-7} bakteriyofaj dilüsyonundan hazırlanan petrilere 30 faj plağı sayılmışsa bakteriyofaj titresi 3×10^8 pfu/ml olarak belirlenmiştir.

2.10 Bakteriyofajların Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi

İzole edilen bakteriyofajların hedef bakteri suşları üzerindeki antimikrobiyal ya da öldürücü etkisi belirlenmiştir. İzole edilen bakteriyofajların litik aktiviteleri spot test uygulaması ile değerlendirilmiştir. Spot test uygulamasından sonra LB agar tabakaları üzerinde oluşan plakların saydamlıklarına göre bakteriyofajların litik aktiviteleri görülmüştür. Oluşan plaklar 3 farklı şekilde değerlendirilmiştir. (Alves et al. 2014). Bunlar sırası ile saydam plaklar (duyarlı) , yarı saydam (az duyarlı) plaklar, plak oluşturmayan bakteriyofajların ise hedef bakterilere karşı dirençli olduğu, duyarlı olmadığı görülmüştür (Resim 2-9).



Resim 2-9 Bakteriyofajların Duyarlılıklarının Belirlenmesi

(http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes_stud/en/med/lik/ptn/Microbiology,%20virology%20and%20immunology/2/14_Laboratory%20diagnosis%20of%20escherichiosis.files/image024.jpg sitesinden modifiye edilmiştir).

2.10.1 Adsorbsiyon süresi, Latent Süre ve Çoğalma Oranının (Burst Size) Belirlenmesi

Bakteriyofajların bakteri yüzeyine bağlanması sırasında geçen süreye adsorbsiyon süresi denilmektedir. Adsorbsiyon işleminden sonra sonra bakteriyofaj genomunun konak hücreye aktarılmasından konak hücrenin yeni fajlar tarafından lize edilmesine kadar geçen süreye ise latent süre denilmektedir. Başlangıçta belli bir miktarda bakteriyi enfekte eden bakteriyofaj sayısının enfeksiyon sonrasında oluşan yeni bakteriyofaj sayısına oranına çoğalma oranı denilmektedir.

Steril 15 ml'lik falkon tüp içerisine titresi 10^8 olan bakteriyofaj kültüründen 0,2 ml, bir gün öncesinden LB Broth içerisine inoküle edilen ve 37°C 'de 24 saat inkübe edilen bakteri kültüründen 1,8 ml alınarak steril bir tüp içerisine eklenmiştir. Daha sonra sıcaklığı 37°C 'de sıcak su banyosu içerisine yerleştirilmiştir. Sonrasında beşer dakikalık periyotlar halinde falkon tüpten 100 μl örnek alınarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulmuş 9,9 ml 1/10 kloroformlu LB sıvı besiyeri içerisine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk bekletilerek 2.9'daki protokole uygun bir şekilde her bir tüpün içerisindeki bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Çıkan sonuçlar grafik oluşturarak değerlendirilmiştir. Bütün deneyler üç defa tekrarlanarak sonuçlar elde edilmiştir.

2.11 Adsorbsiyon Oranlarının Belirlenmesi (Multiplicity of Infection Value; MOI)

Bir bakteriye aynı anda kaç bakteriyofajın bağlanabildiğinin belirlenmesine adsorbsiyon oranı denilmektedir. Adsorbsiyon oranlarının belirlenmesi için titresi 10^8 olan bakteriyofaj kültüründen 100 μl ve bir gün öncesinden LB broth içerisine inoküle edilen ve 37°C 'de 24 saat inkübe edilen konak bakteri kültüründen 900 μl alınarak steril bir tüp içerisine aktarılmıştır. Daha sonra 37°C 'de belirlenen latent süre geçilmeyecek şekilde inkübe edilmiştir. Akabinde LB Broth içerisindeki bakteri kültüründe bulunan bakterilerin cfu/ml cinsinden sayımı gerçekleştirilmiştir. İnkübe edilen karışım 9000 rpm (dv/dk)'de 10 dk süreyle santrifüj edilerek bakteriye

bağlanmayan bakteriyofajların titresi belirlenmiştir. Süpernatant kısım 0,22 mikrometre gözenek çaplı membran filtreden geçirildikten sonra titresi belirlenmiştir.

Adsorbsiyon oranı aşağıdaki tablo kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 2.3).

$$\% \text{ Adsorbsiyon} = \frac{(\text{Başlangıç faj titresi} - \text{Adsorbsiyon sonrası faj titresi})}{\text{Başlangıç faj titresi}} \times 100$$

Şekil 2.3 Adsorbsiyon Oranının Belirlenmesi İçin Kullanılan Formül

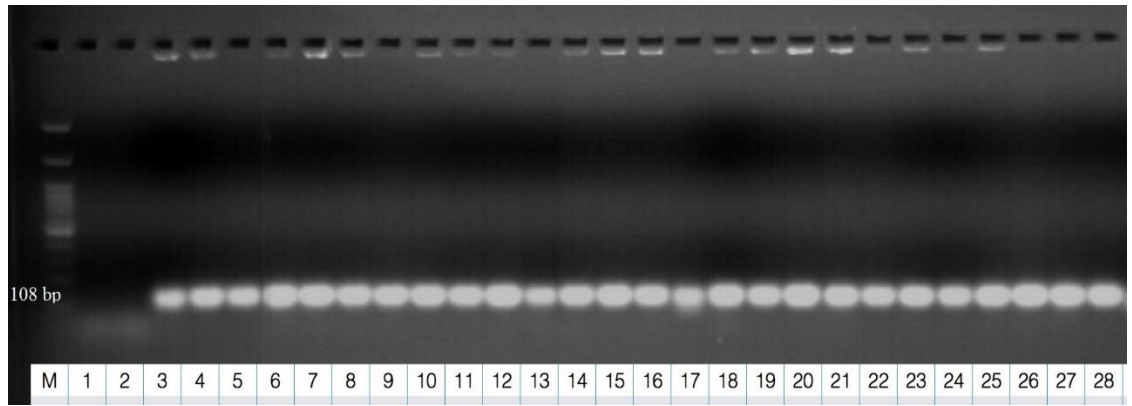
2.12 Saklama Koşulları

Bakteriyofajlar, izole edilip saflaştırıldıktan sonra uygun bir şekilde titreleri arttırılmıştır. Titreleri 10^8 pfu/ml olduğu belirlenen bakteriyofaj stokları vida kapaklı steril tüplerin içerisine aktarılarak + 4 °C’de saklanmıştır.

3 BÖLÜM: BULGULAR

3.1 Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve PZR İle Teyit Edilmesi

Şifa Üniversitesi Hastaneleri Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan hastalardan izole edilmiş -80°C’de saklanan *Staphylococcus aureus* bakteri izolatları VİTEK 2 cihazı ile Gram pozitif bakteriler için VK2C9252 kartı kullanılarak ilk tanımlama işlemi önceden yapılan *S. aureus* bakteri suşlarının DNA izolasyonları yapılarak ve *S. aureus* -spesifik primerler kullanılarak PZR ile identifikasyonları teyit edilmiştir. PZR bulguları (Şekil 3.1) gösterilmiştir.



Şekil 3.1 *Staphylococcus aureus* Bakteri Suşları PCR Bulguları (M: Marker, 1, 2 : Negatif Kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853), 3: Pozitif Kontrol (*S. aureus* ATCC 29213 suşu), 4-28: Çalışmada Kullanılan *S. aureus* İzolatları)

3.2 Bakteri Suşlarının Antimikrobiyal Analizi

Staphylococcus aureus bakteri izolatlarının VİTEK 2 cihazı ile Gram pozitif bakteriler için VK2C9252 kartı kullanılarak antibiyogram analizleri yapılan *S. aureus* bakteri suşlarının antimikrobiyal direnç profilleri (Tablo 3-1)’de verilmiştir. Antibiyogram analiz sonuçlarına göre *S. aureus* bakteri suşlarının 16 tanesinin çoklu antibiyotik dirençli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3-1 Bakteri Suşlarının Antimikrobiyal Direnç Profilleri

	İZOLAT	KAYNAK	KOD	ANTİBİYOTİK DİRENCİ
1	<i>S. aureus</i>	Apse	SUSA_01	OX, P
2	<i>S. aureus</i>	Mukus	SUSA_02	OX, P
3	<i>S. aureus</i>	Yara	SUSA_03	RIF, P
4	<i>S. aureus</i>	İdrar	SUSA_04	CİP
5	<i>S. aureus</i>	İdrar	SUSA_05	RIF
6	<i>S. aureus</i>	Apse	SUSA_06	P
7	<i>S. aureus</i>	Kan	SUSA_07	P, RIF
8	<i>S. aureus</i>	Yara	SUSA_08	RIF, P
9	<i>S. aureus</i>	YARA	SUSA_09	CN, P, FOX, OX, TE, CIP, SXT, CM
10	<i>S. aureus</i>	APSE	SUSA_10	RIF, P
11	<i>S. aureus</i>	YARA	SUSA_11	P, OX, E, TE
12	<i>S. aureus</i>	ASPIRAT	SUSA_12	E, CM
13	<i>S. aureus</i>	APSE	SUSA_13	P
14	<i>S. aureus</i>	YARA	SUSA_14	IPM, OX, FOS, RIF, P, CN, TE, CM, CİP, E
15	<i>S. aureus</i>	MUKOZA	SUSA_15	P
16	<i>S. aureus</i>	YARA	SUSA_16	OX
17	<i>S. aureus</i>	İDRAR	SUSA_17	P
18	<i>S. aureus</i>	YARA	SUSA_18	P
19	<i>S. aureus</i>	APSE	SUSA_19	RIF, P
20	<i>S. aureus</i>	GÖZ	SUSA_20	RIF, P
21	<i>S. aureus</i>	İDRAR	SUSA_21	RIF, P
22	<i>S. aureus</i>	YARA	SUSA_22	RIF, P
23	<i>S. aureus</i>	APSE	SUSA_23	CİP, P
24	<i>S. aureus</i>	YARA	SUSA_24	P
25	<i>S. aureus</i>	APSE	SUSA_25	TE, P
Antibiyotikler; Oksasilin (OX), Penisilin (P), Rifampicin (RIF), Siproflaxacin (CİP), Tetrasiklin (TE), Cefoxitin (FOX), Gentamisin(CN), Cefoxitin (FOX), Co-trimatazcol (SXT), Clindamisin (CM), Eritromisin (E), Imipenem (IPM), Fosfamycin (FOS)				

3.3 Bakteriyofajların İzolasyonu ve Litik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Bakteriyofaj izolasyonları İzmir ilinde bulunan atık su kanallarından ve hastane atık sularından izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Yirmi farklı yerden alınan atık su örneği üzerinde çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda hastane atık sularından litik aktivitesi olan faj izole edilememiştir. Diğer yerlerden alınan atık sulardan 3 adet *S. aureus* bakteri türüne spesifik bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakteriyofajlar SA/EMEL_001–SA/EMEL_003 olarak isimlendirilerek stoklanmıştır.

İzole edilen her bir bakteriyofajın farklı litik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. İzole edilen bakteriyofajların litik aktiviteleri, 25 farklı antibiyotik dirençli *S. aureus* suşu üzerinde spot test yöntemi ile değerlendirilerek litik kapasitesi en yüksek olan SA/EMEL_001 bakteriyofajı çalışma içerisinde kullanılacak bakteriyofaj olarak seçilmiştir. SA/EMEL_001 bakteriyofajının litik kapasitesi plak üzerinde etkili olduğu bölgelerde bakterileri tamamıyla eradike etmelerine bağlı olarak belirlenmiştir (Resim 3-1).

SA/EMEL_001 fajının, *S. aureus* bakteri suşları üzerindeki litik aktivitelerinin değerlendirilmesi (Tablo 3-2)'de gösterilmiştir. Sonuç olarak toplam 25 adet *S. aureus* bakteri suşundan 17 (%68) tanesinin SA/EMEL_001'e duyarlı, 7 (%28) tanesinin az duyarlı 1 (%4) tanesinin dirençli olduğu saptanmıştır.

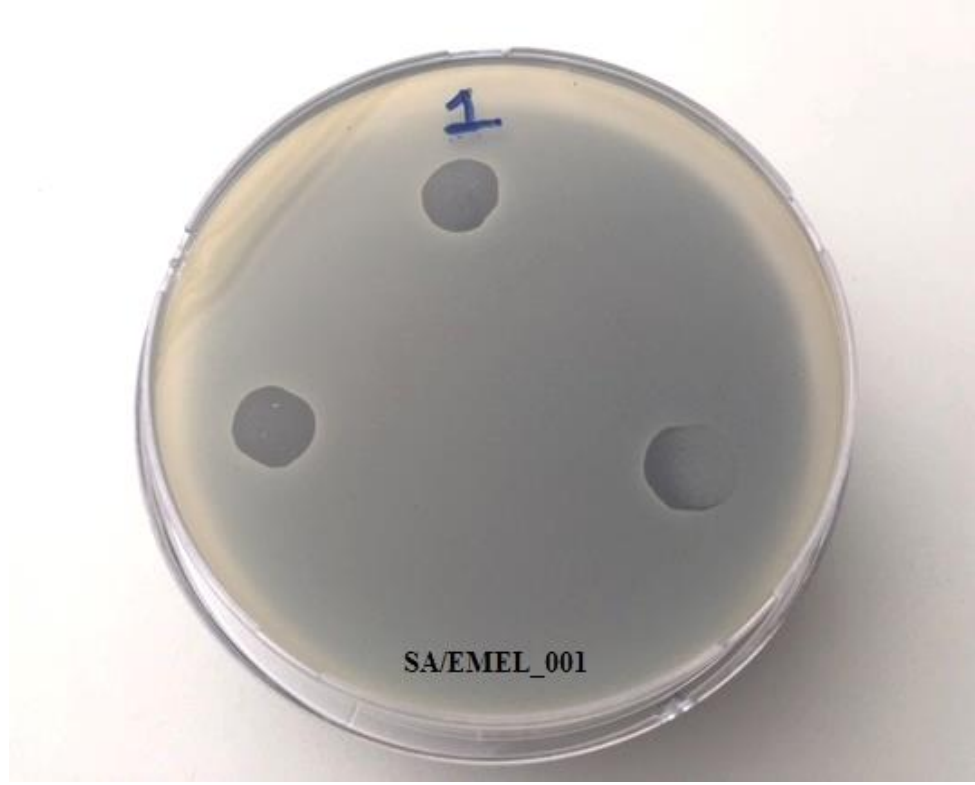
Tablo 3-2 Antibiyotiklere Dirençli *S. aureus* Suşlarına karşı SA/EMEL_001 Fajının Litik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

	<i>S. aureus</i> İzolatları	Antibiyotik Direnci	SA/EMEL_001
1	SUSA_01	OX, P	S
2	SUSA_02	OX, P	S
3	SUSA_03	RIF, P	I
4	SUSA_04	CİP	S
5	SUSA_05	RIF	S
6	SUSA_06	P	I
7	SUSA_07	P, RIF	S
8	SUSA_08	RIF, P	S
9	SUSA_09	CN, P, FOX, OX, TE, CIP, SXT, CM	S
10	SUSA_10	RIF, P	S
11	SUSA_11	P, OX, E, TE	S
12	SUSA_12	E, CM	S
13	SUSA_13	P	S
14	SUSA_14	IPM, OX, FOS, RIF, P, CN, TE, CM, CİP,	I
15	SUSA_15	P	I
16	SUSA_16	OX	S
17	SUSA_17	P	S
18	SUSA_18	P	I
19	SUSA_19	RIF, P	S
20	SUSA_20	RIF, P	S
21	SUSA_21	RIF, P	I
22	SUSA_22	RIF, P	R
23	SUSA_23	CİP, P	S
24	SUSA_24	P	I
25	SUSA_25	TE, P	S

S: Duyarlı **I:** Az Duyarlı **R:** Dirençli

Antibiyotikler;

Oksasilin (OX), Penisilin (P), Rifampicin (RIF), Siproflaxacin (CİP), Tetrasiklin (TE), Cefoxitin (FOX), Gentamisin(CN), Cefoxitin (FOX), Co-trimataazol (SXT), Clindamisin (CM), Eritromisin (E), Imipenem (IPM), Fosfamycin (FOS)



Resim 3-1 SA/EMEL_001 Bakteriyofajının Oluşturduğu Plaklar

3.4 Bakteriyofajların Saflaştırılması ve Titrelelerinin Arttırılması

Litik aktivitesi en yüksek olarak belirlenen SA/EMEL_001 bakteriyofajından dilüsyonlar yapılarak çift tabak agar yöntemi ile petriler üzerinde bakteriyofaj plakları oluşturulmuştur. Petrilerde oluşan plaklar incelendiğinde bakteriyofaj plak yapılarının farklı olduğu görülmüş, bakteriyofaj stoklarının saf olmadığı farklı karakterlerde bakteriyofaj olduğu anlaşılmıştır. Petriler üzerindeki faj plaklarından en saydam ve büyük çapa sahip faj plakı steril pipet ucu ile kesilerek LB besiyeri içerisine konulmuştur. Kesme işleminden elde edilen fajlardan oluşan plaklar bir önceki gün elde edilen plaklarla kıyaslanarak bakteriyofajların saflaştığı görülmüştür.

Saflaştırılan faj stokunun titresinin 10^3 pfu/ml olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılmak üzere 10^3 pfu/ml olan bakteriyofaj titresi arttırılmıştır. Bakteriyofaj stoklarının çift tabaka agar yöntemi ile LB agar üzerine yayılması ile elde edilen faj plaklarından saf olan petriler belirlenip, üzerine 3 ml LB Broth eklenerek

steril kazıyıcı ile kazınarak steril bir tüpe aktarılmıştır. Tüplere aktarılan LB Broth içindeki faj plakları endorf tüplere konularak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım 0,22 mikrometre gözenek çaplı membran filtreden geçirilmiştir. Bu çalışma 5 gün aynı şekilde devam ettirilmiş, beşinci günün sonunda elde edilen bakteriyofaj stokunun 10^8 pfu/ml olduğu belirlenmiştir (Tablo 3-3).

Tablo 3-3 SA/EMEL_001 Bakteriyofajının Titresinin Belirlenmesi

Dilüsyon	1. Hesaplama	2. Hesaplama	3 Hesaplama
10^8	4×10^8 pfu/ml	2×10^8 pfu/ml	3×10^8 pfu/ml
10^7	49×10^7 pfu/ml	27×10^7 pfu/ml	33×10^7 pfu/ml
10^6	488×10^6 pfu/ml	266×10^6 pfu/ml	312×10^6 pfu/ml
Ortalama	$4,6 \times 10^8$ pfu/ml	$2,5 \times 10^8$ pfu/ml	$3,1 \times 10^8$ pfu/ml
Genel Ortalama	$3,4 \times 10^8$ pfu/ml		

3.5 Bakteriyofaj Dinamiklerinin Belirlenmesi

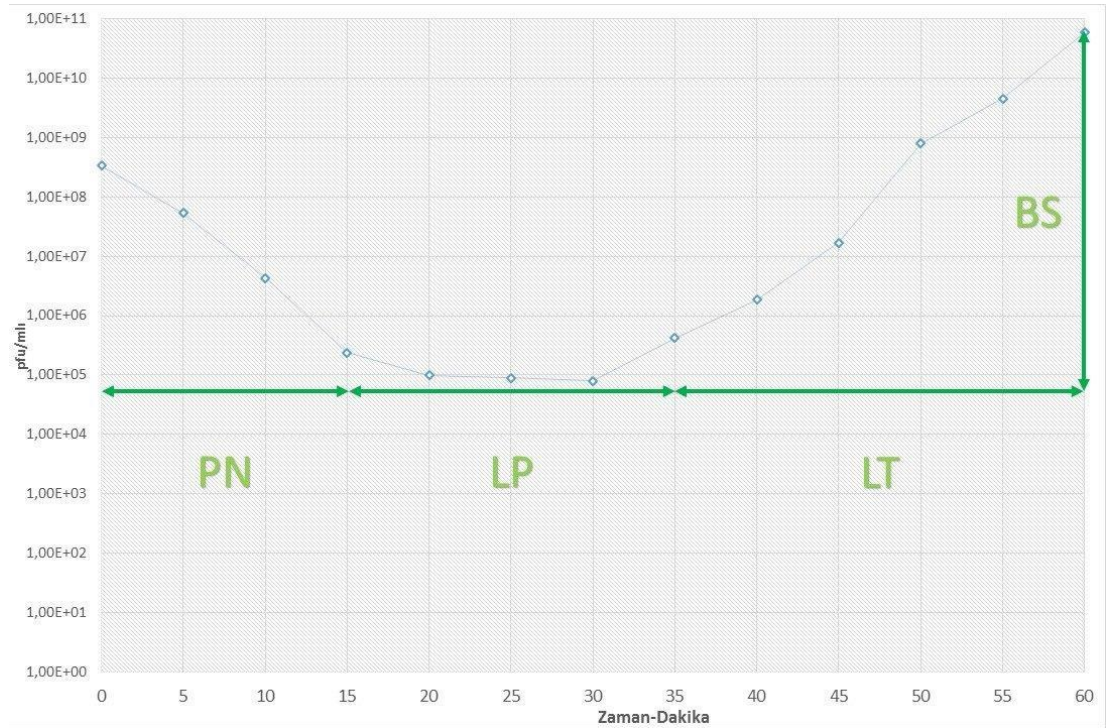
Çalışmada kullanılan SUSA_19 kodu verilen bakteri izolatına spesifik SA/EMEL_001 fajı saflaştırılıp faj titresi arttırıldıktan sonra konak hücre üzerindeki dinamikleri belirlenmiştir. SUSA_19 bakteri izolatı içerisinde bulunan bakteri miktarı kültürde $\sim 2,6 \times 10^8$ cfu/ml bakteri olduğu saptanmıştır (Tablo 3-4).

Titresi 10^8 pfu/ml olan SA/EMEL_001 bakteriyofaj solüsyonuna dört defa seri dilüsyon yapılarak bakteriyofaj titresi 10^4 'e düşürülmüştür. Protokole uygun yapılan deneyler neticesinde adsorbsiyon süresinin “adsorbition time” 15 dakika, latent süresinin “latent period” 20 dakika, lizis süresinin “burst time” 25 dakika olduğu belirlenmiştir. EMEL_001 fajının ilk 10 dakika içerisinde yaklaşık %98'inin hedef konak hücreye adsorbe olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Yapılan hesaplama sonucunda adsorbsiyon oranının “adsorbition rate – MOI (multiplicity of infection) Value” 1,29 olduğu, lizis

büyüküğünün “burst size” her enfekte olan bakteri hücresi için 173 olduğı belirlenmiştir. Yapılan tüm deneyler 3 kez tekrarlanarak teyit edilmiştir.

Tablo 3-4 Klinik İzolatlardan Elde Edilen *S. aureus* Bakteri Suşunun Sayılması

Dilüsyon	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	Ortalama	Genel Ortalama
1. Hesaplama	2 x 10 ⁸ cfu/ml	30 x 10 ⁷ cfu/ml	160 x 10 ⁶ cfu/ml	2,2 x 10 ⁸ cfu/ml	~2,6 x 10 ⁸ cfu/ml
2. Hesaplama	5 x 10 ⁸ cfu/ml	66 x 10 ⁷ cfu/ml	100 x 10 ⁶ cfu/ml	3,2 x 10 ⁸ cfu/ml	
3. Hesaplama	3 x 10 ⁸ cfu/ml	19 x 10 ⁷ cfu/ml	260 x 10 ⁶ cfu/ml	2,4 x 10 ⁸ cfu/ml	



Şekil 3.2 Tek Basamaklı Büyüme Eğrisi (PN: Penetrasyon, LP: Latent Periyot, LT: Lizis Süresi, BS: Lizis Büyüklüğü)

4 TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biri de *Staphylococcus aureus* 'dur. *S. aureus* virülans bir bakteri olup, son yıllarda artan oranlarda antibiyotik direnci gösterdiği bildirilmektedir (Lowy et al. 1998; Lowy 2010). Bakterilerdeki artan antibiyotik direnci nedeniyle hastaların tedavileri oldukça zorlaşmaktadır. Bunların başında tedavi süresinin ve maliyetin artması gelmektedir. Antibiyotik dirençli bakterilerin neden olduğu hastane enfeksiyonları en önemli problemlerin başında gelmektedir. (Driscoll et al. 2007).

Bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavinde bakteriyofaj terapisi günümüzde oldukça önemlidir. Ayrıca bakteriyofajların antibiyotikler ile birlikte kullanıldıkları da bildirmektedir (Skurnik & Strauch 2006).

Antibiyotik kullanımının birçok dezavantajı bulunmaktadır. Enfeksiyolara neden olan bakteriye spesifik olmamaları, mikroflorada bulunan diğer bakteri hücrelerine zarar vermeleri en bilinen dezavantajları arasındadır. Fakat bakteriyofajların, terapide hedef bakteriye spesifik olmaları normal mikroflorayı etkilememeleri, daha ucuza mal olması nedeniyle antibiyotik dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde günümüzde ön plana çıkmaktadır. Bakteriyofaj terapisi ile yeni antibiyotik geliştirme çalışmaları karşılaştırıldığında, yeni antibiyotik geliştirmenin oldukça maliyetli ve uzun süreli olduğu bildirilmektedir (Matsuzaki et al. 2005).

Bu tez çalışmasında Şifa Üniversitesi Hastanelerinden izole edilmiş enfeksiyon hastalıklarına neden olan antibiyotik dirençli *Staphylococcus aureus* bakterisine spesifik bakteriyofajlar izole edilmiştir. İzole edilen bu bakteriyofajların litik aktiviteleri değerlendirilerek bakteriyofaj dinamikleri belirlenmiştir.

Bakteriyofajların izolasyonu aşamasında önce hastane ve çevresindeki kanalizasyon suları kullanılmıştır. Hastane ve çevresinden yeterli litik aktiviteye sahip bakteriyofajlar izole edilemediğinden, hastane kaynaklı olmayan 20 farklı yerden çevresel atık suları alınarak tekrar bakteriyofaj izolasyonu yapılmıştır. Tez

kapsamında 3 adet bakteriyofaj izole edilmiş, *Staphylococcus aureus* suşlarına özgü litik aktivitesi en yüksek bakteriyofaj seçilerek tez çalışmasında kullanılmıştır.

Merabishvili et al. (2014) tarafından Ghent Üniversitesi Hastanesinde yapılan çalışmada bakteriyofaj izolasyonu çevresel atık sularından yapılmıştır. Merabishvili ve ark. (2014) çevresel atık sularını hedef bakteri suşları ile karıştırarak konsantre LB Broth içerisinde 32° C’de bir gece inkübe ederek bakteriyofajları izole etmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında ise çevresel atık sularını hedef bakteri suşları konsantre LB Broth içerisinde 37° C’de aerobik şartlarda bir gece inkübe ederek bakteriyofajlar başarılı bir şekilde izole edilmiştir.

Kropinski et al. (2009) tarafından yapılan bakteriyofaj izolasyonunda çevresel atık su süspansiyonu içerisindeki istenmeyen partikülleri uzaklaştırmak için 10000 rpm (dv/dk) ‘de santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısım 0,22 mikrometre büyüklüğündeki membran filtre ile filtre edilmiştir. Yapılan tez çalışmasında ise bakteriyofaj izolasyonunda çevresel atık su süspansiyonu içerisindeki istenmeyen partikülleri uzaklaştırmak için 9000 rpm (dv/dk) ‘de santrifüj edilerek süpernatant kısım 0,22 mikrometre büyüklüğündeki membran filtre ile filtre edilmiştir.

Pereira et al. (2010) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus*–spesifik 108 bp (baz çifti) molekül ağırlığında *mecA* gen bölgesini kodlayan SA-1 ve SA-2 primerleri kullanılarak, 18 adet *S. aureus* suşundan izole edilmiş DNA’lar üzerinde PZR yapılmıştır. Primerlerin %100 *S. aureus* spesifik oldukları ve 108 bp molekül ağırlığında bir DNA fragmenti ortaya çıkardığı belirlenmiştir.

Martineau et al. (1996) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus*–spesifik kodlayan SA-1 ve SA-2 primerleri kullanılarak 82 *S. aureus* suşunda izole edilmiş DNA’lar üzerinde PZR yapılmıştır. Aynı şekilde primerlerin %100 *S. aureus* spesifik oldukları ve 108 bp molekül ağırlığında bir DNA fragmenti ortaya çıkardığı belirlenmiştir. Yapılan tez çalışmasında ise öncelikle *S. aureus* bakteri izolatları daha önceden VİTEK 2 cihazı ile Gram pozitif bakteriler için VK2C9252 kartı kullanılarak ilk tanımlama işlemi yapılmıştır. Daha sonra ön tanımlama işlemleri yapılan *S. aureus* bakteri suşlarının DNA izolasyonları yapılarak ve 108 bp (baz çifti) molekül ağırlığında *mecA* gen bölgesini kodlayan SA-1 ve SA-2 primerleri kullanılarak PZR

ile identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan 25 adet *S. aureus* bakteri suşu literatüre uygun bir şekilde tanımlanmışlardır.

Bakteriyofaj tedavisi ile ilgili deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda; Takemura-Uchiyama et al. (2014) farelerde, hastanelerden izole edilmiş *S. aureus* suşları ile enfekte edilmişlerdir. Fareler üzerinde oluşturulan üst solunum yolu enfeksiyonunun bakteriyofaj tedavisi ile azaltıldığını bildirilmişlerdir. Wills et al. (2005) ve Capparelli et al. (2007) tarafından yapılan çalışmada tavşanlarda ve farelerde bakteriyofaj terapisinin *S. aureus* suşlarının oluşturduğu enfeksiyon bölgelerini azalttığını bildirmişlerdir. Entenza et al. (2005) ratlarda yaptığı çalışmada bakteriyofaj litik enziminin *S. pneumoniae*'yı kandan tamamen temizlediğini göstermişlerdir. Bakteriyofajların litik enzimlerini kullanarak yapılan bu tedavi yöntemi günümüzde önemli yer tutarak bakteriyofaj tedavisi kadar önemli sonuçlar vermiştir. Matsuzaki et al. (2003) tarafından yapılan çalışmada, bakteriyofaj tedavilerinde litik bakteriyofaj kullanımının dışında, çeşitli yöntemlerle indüklenerek virülent hale getirilen lizojenik bakteriyofajların farelerde *S. aureus* tedavisinde kullanıldığında etkili olduğu belirlenmiştir.

Hayvanlar üzerinde yapılan bakteriyofaj çalışmalarında Smith & Huggins (1983) enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC) bakterisinin buzağularda neden olduğu şiddetli ishalin bakteriyofaj kullanılarak tedavi edildiği bildirilmiştir. Kudva et al. (1999) tarafından yapılan çalışmada sığır dışkılarından *E. coli* O157'ye spesifik bakteriyofajlar izole etmişler ve bu fajların *E. coli* O157 tedavisinde kullanabileceğini belirlemişlerdir. Raya et al. (2006) tarafından yapılan çalışmada *E. coli* O157'ye dirençli bir koyundan izole edilen bakteriyofajın *E. coli* O157 suşunun kolonizasyonunu büyük ölçüde azalttığı görülmüştür. Sheng et al. (2006) tarafından yapılan çalışmada *E. coli* O157 taşıyıcılığını azaltmak için sığırlara bakteriyofaj terapisi uygulandığında bakteri sayısında azalma olduğu bildirilmiştir.

Bakteriyofajların gıdalar üzerinde uygulanması ile ilgili bir çalışmada Obeso et al. (2008) süt içerisindeki *S. aureus*'un rekombinant stafilokokal faj endolizleri kullanılarak 4 saat gibi kısa bir zamanda tamamını eradike ettiğini bildirmiştir.

Bakteriyofaj tedavisinin insanlar üzerinde uygulanması ile ilgili yapılan bir çalışmada ise; Fortuna et al. (2008) Polonya’da gerçekleştirdiği bir çalışmada çocuklar üzerinde bakteriyofaj terapisinin solunum sistemi enfeksiyonlarını, osteomyeliti, irinli yaraları ve septisemiye %90 oranında tedavi ettiğini, Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri’nde de çocuklar üzerinde uygulanan faj terapisinin başarılı sonuçlar ortaya koyduğunu bildirilmişlerdir. Bruttin et al. (2005) yaptığı derlemede bakteriyofajların yan etkileri ile ilgili çalışmaları değerlendirmiştir. Özetle, immün sistemi yetersiz yada baskılanmış hastalarda bakteriyofaj uygulamasının güvenli olduğu bildirilmiştir. O’Flaherty et al. (2005) hastane personeli üzerinde yaptığı araştırmada bakteriyofajlı su ile ellerini yıkadıklarında, bakteriyofaj bulunmayan solüsyona göre stafilokok oranının az olduğunu bildirmiştir. Markoishvili et al. (2002) tarafından 96 hastada ile yapılan çalışmada film tabakalarına emdirilmiş fajların, deri ülserlerini normal tedavi yöntemlerine göre %70 oranla daha başarılı olduğunu bildirilmiştir.

Kvachadze et al. (2011) tarafından yapılan çalışmada Gürcistan’ın Tiflis şehrinde bulunan hastane ve tanı merkezlerinden 2004 ve 2009 yılları arasında hastalardan izole edilen çeşitli antibiyotiklere dirençli 352 farklı *S. aureus* suşuna karşı Sb-1 bakteriyofajının litik aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda bakteri suşlarının % 98’inin Sb-1 monofajına karşı duyarlı % 2’sinin dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise çeşitli antibiyotiklere karşı dirençli 25 farklı *S. aureus* suşuna spesifik SA/EMEL_001 bakteriyofajının litik aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda bakteri suşlarının % 96’sının SA/EMEL_001 fajına karşı duyarlı % 4’ünün dirençli olduğu belirlenmiştir.

Alves et al. (2014) tarafından yapılan çalışmada in vitro yapılan araştırmalarda fajların; bakteri popülasyonlarını azalttığını, biyofilm oluşumunu çözdüğü görülmüştür. Çalışma için dünyanın farklı yerlerinden temin edilen 5000 izolattan genetik farklılıkları MLST (Multilocus Sequence Typing) ile tespit edilen özellikle metisilin dirençli ve duyarlı suşlar seçilmeye çalışılmıştır. Önceden izole edilmiş olan Faj K ve yeni izole edilen DRA88 fajı ile *Staphylococcus aureus* tarafından oluşturulan biyofilm formlarının parçalanması hedeflenmiş, seçilen 95 izolattan DRA88 fajı 95 izolatın 57’sine karşı, K fajı 95 izolatın 61’ine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Alves et al. (2014) tarafından yapılan çalışmada bakteriyofaj terapisi amacıyla kullanılabilir *S. aureus* suşlarına spesifik DRA88 ve K fajı olmak üzere 2 farklı bakteriyofaj izole edildiğini bildirmiştir. İzole edilen fajlardan DRA88 fajının ilk 10 dakikada %80,3 'nün adsorbe olduğu, Diğer K fajının ise ilk 10 dakikada %71,6'sının adsorbe olduğu görülmüştür. DRA88 fajı için latent periyotun 25 dakika, liziz süresinin 35 dakika ve liziz oranının her enfekte bakteri için 76 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca K fajı için latent periyotun 20 dakika, liziz süresinin 40 dakika ve liziz oranının her enfekte bakteri için 125 olduğu bulunmuştur. Bu tez çalışmasında ise *S. aureus* spesifik SA/EMEL_001 bakteriyofajının ilk 10 dakikada %98'inin adsorbe olduğu ve bu faj için latent periyotun 20 dakika, liziz süresinin 25 dakika ve liziz oranının her enfekte bakteri için 173 olduğu saptanmıştır.

Ozkan et al. (2015) tarafından yapılan çalışmada Gürcistan'ın Tiflis şehrinde bulunan George Eliava Enstitüsü tarafından üretilip satılan Staphylococcal, PYO, INTESTI, ENKO, FERSISI ve SES faj kokteyllerinin, *S. aureus* suşları üzerinde litik aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Toplam 10 *S. aureus* suşunun kullanıldığı çalışmada Staphylococcal, FERSISI ve SES faj kokteylinin 10, PYO faj kokteylinin 8, ENKO faj kokteylinin 5, INTESTI faj kokteylinin 9 bakteri suşu üzerinde litik aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen SA/EMEL_001 bakteriyofajının ise antibiyotik dirençli 25 *S. aureus* suşu üzerinde 24 tanesine karşı litik aktiviteye sahip olduğu, bir tanesi üzerinde litik aktivitesi olmadığı görülmüştür.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında fırsatçı bir Gram-pozitif patojen olan çoklu antibiyotik dirençli *S. aureus* bakterisine özgü litik aktivitesi yüksek 3 adet bakteriyofaj izole edilmiştir. İzole edilen bakteriyofajlardan litik aktivitesi en yüksek olan bakteriyofaj seçilerek, bu bakteriyofajın litik aktiviteleri ve faj dinamikleri (liziz süresi, adsorbsiyon oranı) belirlenmiştir. Bu çalışma ile ileride yapılacak olan faj terapisi ve faj uygulamalarının ilk basamaklarının oluşturulması hedeflenmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar topluca aşağıda verilmiştir.

- Ön tanımlama işlemleri önceden yapılan *S. aureus* suşlarının *S. aureus*-spesifik primerler kullanılarak PZR ile identifikasyonları teyit edilmiştir.
- *S. aureus* suşlarına spesifik bakteriyofaj izolasyonları yapılarak litik aktivitesi en yüksek olan bakteriyofaj belirlenmiştir.
- Litik aktivitesi en yüksek olan bakteriyofaj saflaştırıldıktan sonra faj dinamikleri (liziz süresi, adsorbsiyon oranı) belirlenmiş ve SA/EMEL_001 olarak adlandırılmıştır.
- Çalışmada izole edilen litik aktivitesi en yüksek olan SA/EMEL_001 fajı saflaştırma sonunda titresi 10^8 pfu/ml'ye çıkarılmıştır.
- Toplam 25 adet *S. aureus* bakteri suşundan 17 (%68) tanesinin litik aktivitesi en yüksek olan SA/EMEL_001'e duyarlı, 7 (%28) tanesinin az duyarlı, 1 (%4) tanesinin dirençli olduğu saptanmıştır.

Staphylococcus aureus suşlarının neden olduğu enfeksiyon hastalıklarında, izole edilen litik aktivitesi en yüksek olan SA/EMEL_001 bakteriyofajının, tedavi amaçlı kullanılabilmesi için;

- İzole edilen bakteriyofajın morfolojik sınıflandırılmaları ile tüm genom dizi analizinin yapılarak olası toksisite ile ilişkili gen bölgelerinin olup olmadığını belirlenmelidir.

- Tüm genom dizi analizleri değerlendirildikten sonra bakteriyofajların hayvan ve insan deneylerinin yapılması gerekmektedir.
- Bağışıklık sisteminin bakteriyofajlara verdiği tepkiler immünolojik çalışmalar ile ortaya konulmalıdır.

Bakteriyofaj çalışmalarında daha iyi sonuçlar elde etmek için;

- Bakteriyofajlar kendisine spesifik bakteri suşlarına litik aktivite gösterirler. Bakteriyofaj terapisi ve diğer bakteriyofaj uygulamalarında daha iyi sonuçlar için bakterileri öldürme potansiyeli yüksek fajlar izole edilerek, en az 4-5 fajın bir araya getirilerek faj kokteylinin hazırlanması önerilmektedir.
- Moleküler biyoloji ve genetik alanındaki çalışmalar ile bakteriyofaj varlığı olmadan bakteriyofaj enzimleri ile faj terapisi ve diğer faj uygulamaları için gerekli çalışmalar yapılmalıdır.
- Ayrıca enzimatik aktiviteleri geliştirilmiş yeni bakteriyofajlar ile ilgili in-vivo çalışmalar ve hayvan deneyleri yapılmalıdır.

ÖZET

Son yıllarda antibiyotik dirençli bakteri suşlarındaki artış enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ciddi bir tehdit haline gelmiştir. *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı ilaç direnci, özellikle gelişmiş ülkelerde hastane enfeksiyon etkeni olarak büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bu durum antibiyotiklere alternatif tedavi yöntemleri veya stratejileri geliştirmenin önemini göstermektedir. Bu tez kapsamında fırsatçı bir Gram-pozitif patojen olan çoklu antibiyotik dirençli *S. aureus* bakterisine özgü litik aktivitesi yüksek bakteriyofajlar izole edilerek, faj dinamiklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmada Şifa Üniversitesi Hastaneleri Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan VİTEK 2 cihazı ile tanımlanan ve antimikrobiyal direnç profilleri belirlenen 25 adet *Staphylococcus aureus* izolatının identifikasyonları *S. aureus*-spesifik primerler kullanılarak PZR ile teyit edilmiştir.

Araştırmamızda *S. aureus*-spesifik faj izolasyonu amacıyla 20 adet farklı lokasyonlardan alınan atık su örneği incelenmiş olup; bunlardan 3 adet *S. aureus*-spesifik faj izole edilmiştir. Daha sonra izole edilen bu fajların litik spektrumu en geniş olan bir adet faj belirlenerek SA/EMEL_001 olarak adlandırılmıştır. Akabinde SA/EMEL_001 fajı saflaştırıldıktan sonra faj dinamikleri (liziz süresi, adsorbsiyon oranı vb.) belirlenmiştir. Toplam 25 adet *S. aureus* bakteri suşundan 17 (%68) tanesinin SA/EMEL_001'e duyarlı, 7 (%28) tanesinin az duyarlı, 1 (%4) tanesinin ise dirençli olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada izole edilip saflaştırılan *S. aureus*-spesifik SA/EMEL_001 fajının litik etkinliğinin oldukça yüksek olması (%96) bu fajın gerek tek başına gerekse faj kokteylleri içerisinde terapötik amaçla kullanma potansiyelinin olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, bu fajın terapötik amaçla kullanımından önce tam genom analizleri ve toksisite deneylerinin yapılması gerekmektedir.

ABSTRACT

In the recent years, the increase in the antibiotic-resistant bacterial strains has become a significant threat for the treatment of the infectious diseases. Antibiotic resistance against *Staphylococcus aureus* strains is a considerable problem as a hospital-acquired (nosocomial) infections especially in developed countries. The necessity of developing alternative treatment methods or strategies for the treatment of antibiotic resistant bacterial infections are therefore very imperative.

The aim of this thesis were to isolate and purify *Staphylococcus aureus*-specific bacteriophages and to determine dynamics of the isolated bacteriophages.

In this study, 25 multidrug resistant *S. aureus* isolates which were available in the culture collection of Medical Microbiology Laboratories of Sifa University Hospitals and had been isolated from the patients, were employed. The identification of the *S. aureus* isolates were verified using *S. aureus*-specific primers by PCR.

Twenty waste water samples obtained from various locations in Izmir were examined and 3 *S. aureus*-specific bacteriophages were isolated/purified and characterized. Afterwards, one of the isolated phages was named as SA/EMEL_001 and then phage dynamics of this phage (adsorption rate, latent period and lysis time,) were determined. It was found out that 17 (68%) strains of the 25 *S. aureus* tested were sensitive to SA/EMEL_001, 7 (28%) were low-sensitive and 1 (4%) was resistant.

It is concluded that *S. aureus*-specific SA/EMEL_001 phage was isolated and purified in this study. The SA/EMEL_001 phage had high level of lytic efficiency (96%) suggesting its potential to be utilized for the treatment of multidrug resistant *S. aureus* infections. However, it is necessary to carry out full-genome analysis and toxicity examinations before utilizing this phage for therapeutic purposes in humans.

6 KAYNAKLAR

- Abedon, S.T., 2008. *Bacteriophage Ecology* First Edit. S. T. Abedon, ed., Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Ackermann, H.W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), pp.227–243.
- Ackermann, H.W., 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146(5), pp.843–857.
- Ackermann, H.-W., 2009. Phage classification and characterization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 501, pp.127–140.
- Alves, D.R. et al., 2014. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 80(21), pp.6694–703. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25149517> [Accessed January 12, 2015].
- Ashelford, K.E., Day, M.J. & Fry, J.C., 2003. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), pp.285–289.
- Atterbury, R.J. et al., 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), pp.4543–4549.
- Brown, E.L. et al., 2009. The Panton-Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(2), pp.156–164.
- Bruttin, A., Bru, H. & Brüssow, H., 2005. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: A safety test of phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), pp.2874–2878.
- Brüssow, H., 2005. Phage therapy: the Escherichia coli experience. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 7), pp.2133–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000704> [Accessed January 20, 2015].
- Cairns, J. et al., 1966. *Phage and the origins of molecular biology* The Centen. J. Cairns, G. S. Stent, & J. D. Watson, eds., New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Campbell, A., 2007. Phage integration and chromosome structure. A personal history. *Annual review of genetics*, 41, pp.1–11.

- Capparelli, R. et al., 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), pp.2765–2773. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932491&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed November 25, 2014].
- Cerca, N. et al., 2007. Protection against *Escherichia coli* infection by antibody to the *Staphylococcus aureus* poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), pp.7528–7533.
- Chibani-Chennoufi, S. et al., 2004. Phage-host interaction: An ecological perspective. *Journal of Bacteriology*, 186(12), pp.3677–3686.
- Connerton, P.L. et al., 2004. Longitudinal study of *Campylobacter jejuni* bacteriophages and their hosts from broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), pp.3877–3883.
- d’Herelle, F., 1917. Sur un microbe invisible antagonistes des bacilles dysentériques. *Les Comptes rendus de l’Académie des sciences*, 165, pp.373–5.
- Dabrowska, K. et al., 2005. A review: Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), pp.7–13.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M. & Schlievert, P.M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), pp.16–34.
- Driscoll, J.A., Brody, S.L. & Kollef, M.H., 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), pp.351–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17335295> [Accessed January 7, 2015].
- Entenza, J.M. et al., 2005. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), pp.4789–4792.
- Fortuna, W. et al., 2008. Bacteriophage therapy in children: facts and prospects. *Medical science monitor : International medical journal of experimental and clinical research*, 14(8), pp.RA126–A132. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668009> [Accessed May 28, 2015].
- Gordon, C.P., Williams, P. & Chan, W.C., 2013. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: A medicinal chemistry perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(4), pp.1389–1404.
- Guttman, B. et al., 2005. *Basic Phage Biology. Bacteriophages: Biology and Applications* E. Kutter & A. Sulakvelidze, eds., F: CRC PRESS. Available at: www.crcpress.com.

- Khawaldeh, a. et al., 2011. Bacteriophage therapy for refractory *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection. *Journal of Medical Microbiology*, 60(11), pp.1697–1700. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737541> [Accessed January 6, 2015].
- Kropinski, A.M. et al., 2009. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 501, pp.69–76.
- Kudva, I.T. et al., 1999. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), pp.3767–3773.
- Kumari, S., Harjai, K. & Chhibber, S., 2010. Evidence to support the therapeutic potential of bacteriophage Kpn5 in burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* in BALB/c mice. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(5), pp.935–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20519918> [Accessed January 12, 2015].
- Kutateladze, M. & Adamia, R., 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in biotechnology*, 28(12), pp.591–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810181> [Accessed January 9, 2015].
- Kvachadze, L. et al., 2011. Evaluation of lytic activity of staphylococcal bacteriophage Sb-1 against freshly isolated clinical pathogens. *Microbial biotechnology*, 4(5), pp.643–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3819013&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 12, 2015].
- Kwiatek, M. et al., 2012. Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. *Archives of Virology*, 157(2), pp.225–234.
- Lavigne, R. & Robben, J., 2012. Professor Dr. Richard Bruynoghe: A 1951 overview of his bacteriophage research spanning three decades. *Bacteriophage*, 2(March), pp.1–4.
- Loc-Carrillo, C. & Abedon, S.T., 2011. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), pp.111–114. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3278648&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract> [Accessed December 23, 2014].
- Lowy, F.D., 2010. Mapping the distribution of invasive *Staphylococcus aureus* across Europe. *PLoS Medicine*, 7(1).
- Lowy, F.D., 1998. Medical progress - *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 339, pp.520–532.

- Lowy, F.D. et al., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine*, 339(8), pp.520–532. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9709046> [Accessed January 19, 2015].
- Mann, N.H., 2008. The potential of phages to prevent MRSA infections. *Research in microbiology*, 159(5), pp.400–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541414> [Accessed January 20, 2015].
- Markoishvili, K. et al., 2002. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *International journal of dermatology*, 41(7), pp.453–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121566> [Accessed May 28, 2015].
- Martineau, F. et al., 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), pp.2888–2893.
- Matsuzaki, S. et al., 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 11(5), pp.211–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258815> [Accessed January 20, 2015].
- Matsuzaki, S. et al., 2003. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *The Journal of infectious diseases*, 187(4), pp.613–624.
- Mattey, M. & Spencer, J., 2008. Bacteriophage therapy--cooked goose or phoenix rising? *Current opinion in biotechnology*, 19(6), pp.608–612.
- Merabishvili, M. et al., 2014. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, 9(8), p.e104853. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4128745&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed January 12, 2015].
- Merabishvili, M. et al., 2009. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PloS one*, 4(3), p.e4944. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2654153&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed December 18, 2014].
- Miedzybrodzki, R. et al., 2007. Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 61, pp.461–465.

- Moellering, R.C., 2012. MRSA: the first half century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, pp.4–11.
- Molineux, I.J., 2001. No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Molecular Microbiology*, 40, pp.1–8.
- Moran, G.J. et al., 2006. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *The New England journal of medicine*, 355(7), pp.666–674.
- Morello, E. et al., 2011. Pulmonary bacteriophage therapy on pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis strains: First steps towards treatment and prevention. *PLoS ONE*, 6(2), p.e16963. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3039662&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed November 30, 2014].
- Naimi, T.S. et al., 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 290(22), pp.2976–2984.
- O’Flaherty, S. et al., 2005. Potential of the Polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), pp.1836–1842.
- O’Flaherty, S., Ross, R.P. & Coffey, A., 2009. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria: Review article. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), pp.801–819.
- Obeso, J.M. et al., 2008. Lytic activity of the recombinant *staphylococcal* bacteriophage PhiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International journal of food microbiology*, 128(2), pp.212–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809219> [Accessed May 20, 2015].
- Ozkan, I. et al., 2015. Evaluation of lytic activity of commercial phage cocktails against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Turkey. *Bacteriophage 2015 Conference*.
- Pereira, E.M. et al., 2010. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR. *Microbiological Research*, 165(3), pp.243–249.
- Phagoburn, 2013. Phagoburn. Available at: <http://www.phagoburn.eu/> [Accessed March 15, 2015].
- Pires, D.P. et al., 2014. Complete Genome Sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage phiIBB-PAA2. , 2(1), pp.7–8.

- Raya, R.R. et al., 2006. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), pp.6405–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1563603&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed May 28, 2015].
- Roos, W.H. et al., 2007. Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, pp.1484–1497.
- Seenivasan, M.H. & Yu, V.L., 2003. *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis - The hidden peril of coagulase-negative staphylococcus in blood cultures. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(8), pp.489–491.
- Sheng, H. et al., 2006. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), pp.5359–5366.
- Sillankorva, S., Neubauer, P. & Azeredo, J., 2008. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC biotechnology*, 8, p.79.
- Skurnik, M. & Strauch, E., 2006. Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(1), pp.5–14.
- Smith, H.W. & Huggins, M.B., 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Journal of general microbiology*, 129(8), pp.2659–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6355391> [Accessed January 20, 2015].
- Soykut, E.A., Dudak, F.C. & Boyaci, I.H., 2008. Selection of staphylococcal enterotoxin B (SEB)-binding peptide using phage display technology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370(1), pp.104–108.
- Stanley, J.R. & Amagai, M., 2006. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *The New England journal of medicine*, 355(17), pp.1800–1810.
- Sulakvelidze, A. & Morris, J.G., 2001. Bacteriophages as therapeutic agents. *Annals of medicine*, 33, pp.507–509.
- Summers, W.C. et al., 2001. Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology*, 55(3), pp.437–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544363> [Accessed January 12, 2015].
- Summers, W.C., 2001. Bacteriophage therapy. *Annual review of microbiology*, 55, pp.437–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544363> [Accessed January 12, 2015].

- Summers, W.C., 2006. Phage and the early development of molecular biology. The Bacteriophages. In R. L. Calendar, ed.
- Suttle, C.A., 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437, pp.356–361.
- Takemura-Uchiyama, I. et al., 2014. Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice. *Microbes and Infection*, 16(6), pp.512–517. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631574> [Accessed January 6, 2015].
- Weber-Dabrowska, B. et al., 2006. *Alternative therapies in antibiotic-resistant infection*.
- Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M. & Slopek, S., 1987. Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 35(5), pp.563–568.
- WHO, 2011. *World Health Statistics 2011*.
- Wills, Q.F., Kerrigan, C. & Soothill, J.S., 2005. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), pp.1220–1221.
- (<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/vsrf/virus.img/phage.gif> sitesinden modifiye edilmiştir.)
- (https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSKmaxbkKc5823N7xcakuQH8rP_R3YEsYbociB2Id7-zpZ_xdK2 modifiye edilmiştir).
- (http://o.quizlet.com/i3VcoeMphCKITuuePyFv4g_m.jpg adresinden modifiye edilmiştir).
- (<http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e0q.jpg> den modifiye edilmiştir).
- (http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes_stud/en/med/lik/ptn/Microbiology,%20virology%20and%20immunology/2/14_Laboratory%20diagnosis%20of%20escherichiosis.files/image024.jpg sitesinden modifiye edilmiştir).

7 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İsmail ÖZKAN

Doğum Yeri ve Yılı : Ankara, 1986

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Eskipazar Y. Dil Ağırlıklı Lisesi

Lisans : Dumlupınar Üniversitesi (Biyoloji Bölümü 2005-2010)

Yüksek Lisans: Şifa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji
Yüksek Lisans 2013-...

Çalıştığı Kurum ve Yıl:

İzmir Valiliği, Kınık Kaymakamlığı 2011 - 2012

İzmir Valiliği, Çiğli Kaymakamlığı 2012 - 2013

Şifa Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Araştırma Görevlisi 2013 - ...