

ŞİFA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ *Pseudomonas aeruginosa* SUŞLARINA  
SPESİFİK LİTİK BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE İZOLE  
EDİLEN BAKTERİYOFAJLARIN LİTİK SPEKTRUMLARININ  
BELİRLENMESİ

(Ergün AKTÜRK)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Sinem AKÇALI

2015-İZMİR  
ŞİFA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ *Pseudomonas aeruginosa* SUŞLARINA  
SPESİFİK LİTİK BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE İZOLE  
EDİLEN BAKTERİYOFAJLARIN LİTİK SPEKTRUMLARININ  
BELİRLENMESİ**

(Ergün AKTÜRK)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Sinem AKÇALI

Bu tez Şifa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü  
tarafından 2014-18 Proje numarası ile desteklenmiştir

Tez. No: (2015-501)


2015-İZMİR

## KABUL ve ONAY

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. Kenan DEĞERLİ – Celal Bayar Üniversitesi

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

ONAY: Bu yüksek lisan 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 ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY' a,

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Sayın Prof. Dr. Sinem AKÇALI' ya,

Yoğun çalışma mesaisinden ve akademik ilerleme hayatından fedakârlık yaparak en samimi duygularıyla destekte bulunan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ' a;

Yüksek lisans eğitimi ve tez aşamamızın her safhasında desteklerini bizden ve laboratuvarımızdan esirgemeyen değerli Genel Sekreterimiz Sayın Yrd. Doç. Halil İbrahim HACIBEYOĞLU' na,

Tez çalışmama katkılarını unutamayacağım Sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Arzu DURAN'a, Arş. Gör. Dr. Seniha AKTAKKA' ya ve M. Erkam GÜNDOĞDU' ya,

Tez aşamasında benden çok gayret sarf eden ve ümitsizliğe düştüğüm zamanlarda ümit aşıl原因 ve sabırla mücadele etmeme vesile olan değerli arkadaşım, abim Arş. Gör. İsmail ÖZKAN' a;

Değerli mesai arkadaşlarım Öğr. Gör. Süleyman KUYUMCU' ya ve Öğr. Gör. Hikmet BIÇAKÇI' ya,

Ömrünü çocuklarını yaşatmaya adanmış, dünyayı önlerine serser haklarını ödeyemeyeceğim sevgi ve fedakârlık kahramanları olan kalbimin atış sebebi değerli annem ve babama;

Geride bıraktığımız onca yılda her daim yanımda var olarak hayatımı güzelleştiren, desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen ve yüksek lisans eğitimi boyunca sabırla ve anlayışla yardımcı olan değerli eşim Şeyma AKTÜRK' e, ailemize katılmasıyla hayatımıza anlam katan ve geceleri ağlayarak anne ve babasını uykusuz bırakan dünyalar güzeli kızım Rale Sema AKTÜRK' e

En kalbi duygularıyla teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
RESİMLER LİSTESİ .....	ix
TABLolar LİSTESİ .....	x
<b>1. BÖLÜM: GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Bakteriyofaja Giriş .....	1
1.1.1 Bakteriyofaj Araştırmalarının Tarihçesi.....	1
1.1.2 Bakteriyofajların Günümüzdeki Önemi .....	4
1.1.3 Genel Bakteriyofaj Biyolojisi.....	5
1.1.4 Bakteriyofajların Morfolojisi ve Sınıflandırılması.....	9
1.1.5 Bakteriyofaj Tedavisi .....	11
1.2 Hedef Bakteri .....	12
1.2.1 Konak Hücre: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
1.2.2 Bakteriyel Patojenite ve Antimikrobiyal Direnç .....	13
<b>2. BÖLÜM: GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>15</b>
2.1 Kullanılan Besi Yerleri.....	15
2.2 Bakteri Suşları .....	17
2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının İdentifikasyonu ve Bu İzolatların PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi ile Saptanması .....	17
2.4 Bakterilerin Antimikrobiyal Analizleri .....	19
2.5 Bakterilerin Sayılması .....	20

2.6	Bakteriyofaj İzolasyonu .....	20
2.7	Bakteriyofajların Pürifikasyonu .....	22
2.8	Bakteriyofajların Titresinin arttırılması.....	24
2.9	Bakteriyofaj Titresinin Belirlenmesi .....	24
2.10	Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin (Duyarlılıklarının) Değerlendirilmesi.....	25
2.11	Bakteriyofaj Dinamiklerinin Belirlenmesi .....	26
2.11.1	Adsorbsiyon süresi, Latent Süre ve Çoğalma Oranının (Burst Size) Belirlenmesi.....	26
2.11.2	Adsorbsiyon Oranlarının Belirlenmesi (MOI “Multiplicity of Infection” Value).....	26
2.12	Saklama Koşulları .....	27
<b>3.</b>	<b>BÖLÜM: BULGULAR .....</b>	<b>28</b>
3.1	Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve PZR Analizi .....	28
3.2	Bakteri Suşlarının Antimikrobiyal Analizi.....	29
3.3	Bakteriyofaj İzolasyonu .....	30
3.4	Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	30
3.5	Bakteriyofajın Saflaştırılması ve Titrelerinin Arttırılması .....	33
3.6	Bakteriyofaj Dinamiklerinin Belirlenmesi .....	35
<b>4.</b>	<b>BÖLÜM: TARTIŞMA .....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>44</b>
	<b>ÖZET .....</b>	<b>46</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
<b>6.</b>	<b>REFERANSLAR .....</b>	<b>49</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>58</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
ADF	: Adenozin Difosfat
bp	: Base Pair
BS	: Liziz Büyüklüğü
CFU	: Colony Forming Unit
dak	: Dakika
ddH <sub>2</sub> O	: Saf Su
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	: Double Stranded Deoksiribonükleik Asit
dv	: Devir
FDA	: Food Drug Administration
g	: Gravity
GN	: Gram Negatif
gr	: Gram
KA	: Kanlı Agar
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

NaCl	: Sodyum klorür
ng	: Nanogram
PA/EMEL_001	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EMEL_001 Fajı
PA_5	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5 nolu Bakteri Suşu
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
UVTK	: Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi
WHO	: World Health Organization



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Bakteriyofajların genetik çeşitlilikleri (Ackermann 2007) .....	6
Şekil 1.2 Bakteriyofaj replikasyonunun tek basamaklı büyüme eğrisi.....	7
Şekil 1.3 Bakteriyofajların yaşam döngü tipleri .....	8
Şekil 1.4 Caudovirales takımına ait üç ailenin basit morfolojisi.....	9
Şekil 2.1 Bakteri Sayısının Belirlenmesi .....	20
Şekil 2.2 Sıralı Bakteriyofaj Dilüsyonu.....	23
Şekil 3.1 Tek Basamaklı Büyüme Eğrisi.....	36

## RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. %5 Koyun Kanlı Agar (Solda) ve Luria-Bertani Agar (Sağda) .....	16
Resim 2.2. Luria-Bertani Soft Agar (Solda) ve Luria-Bertani 10X Broth (Sağda) .....	16
Resim 2.3. Luria-Bertani Broth (Solda) ve Luria-Bertani Slant Agar (Sağda)	17
Resim 2.4. Spot Test Sonucu Oluşan Plaklar .....	22
Resim 2.5. Tek Plak Oluşumu .....	23
Resim 2.6. Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	25
Resim 3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bakteri Suşları PCR Sonuçları .....	28
Resim 3.2 Bakteriyofaj İzolasyon Aşamasında Kullanılan Kontrol Grupları ..	31
Resim 3.3 Bakteriyofaj İzolasyon Aşamasından Bazı Örnekler .....	32
Resim 3.4 Bakteriyofaj Titresinin Arttırılmasında Kullanılan LB Agar Örneği .....	35

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. FDA onaylı bakteriyofaj preparatları (Fortuna et al. 2008) .....	3
Tablo 1.2. Ackermann Sınıflandırma Yöntemi * Sınıflandırılmayı bekleyen aileler. (Ackermann 2007) .....	10
Tablo 2.1 <i>P. aeruginosa</i> -spesifik Primerler.....	19
Tablo 2.2 PCR Karışım İçeriği .....	19
Tablo 2.3 PCR Koşulları .....	19
Tablo 3.1 Çalışmada Kullanılan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bakteri Suşları ve Antibiyotik Direnç Profilleri .....	29
Tablo 3.2 Çalışmamızda Elde Edilen PA/EMEL_001 Bakteriyofajının Klinik <i>P. aeruginosa</i> Suşlarına Litik Spektrum Sonuçları .....	33
Tablo 3.3 PA/EMEL_001 Bakteriyofajının Titresinin Belirlenmesi.....	34
Tablo 3.4 Bakterilerin Sayılması .....	36

# 1. BÖLÜM: GİRİŞ

## 1.1 Bakteriyofaja Giriş

1915 yılında ilk defa varlığı fark edilen ve 1940'lı yıllara kadar bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan, zorunlu hücre içi parazitler, bakteri-spesifik virüsler ya da bakteriyofajlar, penisilin bulunması ile uzun süre bilimsel camianın gündeminden düşmüştür. Antibiyotiklerin kolay, ucuz ve hızlı üretilebilir ve geniş etki alanına sahip olmaları bakteriyofaj çalışmalarını bitme noktasına getirmiştir. Fakat son yıllarda yayınlanan raporlarda antibiyotik direncinin önlenemez bir şekilde arttığı bildirilmektedir. Bu durum faj terapisi olarak adlandırılan fajlarla tedavi yönteminin tekrardan önem kazanmasında neden olmuştur.

### 1.1.1 Bakteriyofaj Araştırmalarının Tarihçesi

Bakterilerin antibiyotiklere karşı giderek direnç kazandığı günümüzde, tıp dünyası alternatif tedavi arayışları içerisine girmiştir (Kutateladze & Adamia 2010). Bu soruna karşı, bakteri türlerine spesifik olan ve bakterileri eradike eden bakteriyofajlar, önemli bir çözüm olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriyofajlar mikroorganizmalarla ilgili çalışmaların başlamasından yaklaşık 40 yıl sonra, 19. Yüzyılın ilk çeyreğinde tanımlanmış ve bakteri yiyen virüs olarak literatüre girmiştir (Summers 2001; Brüssow 2005). Bakteriyofajlar, biyosferde her gün üreyen bakterilerin % 4 – 50 'sini enfekte ederek küresel jeokimyasal döngünün önemli bir aktörü olarak görev almaktadır (Suttle 2005).

Tarihte bakteriyofaj alanında ilk çalışmalar Felix d'Herelle (d'Herelle 1917) ve Frederick W. Twort (Twort 1936) tarafından yapılmış olup, bu araştırmalar sonraki yıllarda yapılan faj çalışmalarına öncülük etmiştir (Summers 1999). Bakteriyofaj terimi ilk olarak Felix d'Herelle tarafından kullanılmıştır. Kelime kökenlerine bakıldığında Yunanca 'da 'bacteria' bakteri ve 'phagein' yemek fiilleri manasına gelen kelimelerden oluşmuştur. Ayrıca, d'Herelle bakteriyofajların çift tabaka agar yöntemi

ile bakterileri enfekte etmesi sonucunda oluşan açık zonlara verilen ‘plak’ terimini literatüre kazandıran kişidir. Bakteriyofajların keşfinden çok kısa bir süre sonra fajlar tedavi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Felix d’Herelle faj terapisini ilk kez dizanteri hastası genç bir çocuk üzerinde deneyerek bakteriyofajların potansiyel teropatik etkisini ortaya koymuştur. Bakteriyofajların teropatik kullanımları hakkında ilk bilimsel rapor, akıntılı ve ağrılı cilt yanığı üzerinde stafilokokkal phage kullanılması ile bakteri sayısının azaltılması sonucu olarak 1921 yılında Bruynoghe ve Maisin tarafından Leuven’de yayınlanmıştır (Lavigne & Robben 2012). Bu gelişmenin akabinde L’Oréal şimdiki adıyla Eli Lilly & Co, Parke-Davies, Squibb & Sons ve Swan-Myers ve Abbott Laboratuvarları gibi büyük şirketler birçok farklı formda tedavi amaçlı faj preparatları hazırlamışlardır (Sulakvelidze & Morris 2001; Summers 1999).

İlk bakteriyofaj uygulamalarının başarılı bir şekilde sonuçlanması ve birçok ilaç şirketleri tarafından bakteriyofaj preparatlarının satılmasına rağmen penisilin keşfi ile bakteriyofaj tedavisi batı dünyasında neredeyse unutulmuş, sadece doğu bloğu ülkelerinde lokal olarak uygulanan bir yöntem olarak kalmıştır. Antibiyotiklerin geniş spektrumlu olması gibi birçok avantajının bulunması, faj biyolojisinin tam olarak anlaşılabilmesi ve bakteri tanımlamada kullanılan tekniklerin yeterince gelişmemiş olması bakteriyofaj tedavisinin batıda olumsuzlukla sonuçlanmasının başlıca nedenlerindedir (Ceysens 2009). Yakın zamana kadar bu yöntemi uygulamaya devam eden ve bu alanda enstitü bile kuran Polonya Ludwik Hirszfeld İmmünoloji ve Deneysel Terapi Enstitüsü ve en saygın bilim dergilerinde bile bu alandaki öncülüğü üzerine makaleler yazılan Gürcistan George Eliava Enstitüsü kararlılığın ödülünü almıştır (Abedon 2008; Calendar 2005; Kutter & Sulakvelidze 2004).

İnsanlar üzerinde bakteriyofaj kullanımının yanı sıra veterinerlik ve gıda endüstrisi gibi alanlarda da bakteriyofaj uygulamaları bulunmaktadır. Örneğin 2006 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından bazı etkenler üzerinde *Listeria monocytogenes* suşlarına karşı “Listex-100” bakteriyofaj preparatının kullanılmasına izin verilmiştir (Tablo 1.1). FDA tarafından kullanımına izin verilen başka bakteriyofaj preparatları da bulunmaktadır (Fortuna et al. 2008)

Tablo 1.1. FDA onaylı bakteriyofaj preparatları (Fortuna et al. 2008)

	Firma	Preparat	Hedef bakteri	Kullanım alanı	Onay yılı
1	Intralytix Inc,	LMP-102™	<i>L. monocytogenes</i>	Et, kanatlı	2007
2	EBI Food Safety,	LISTEX™ P100	<i>L. monocytogenes</i>	Tüm gıdalar	2007
3	OmniLytics	BacWash™	<i>Salmonella</i>	Hayvan derileri	2007
4	OmniLytics	AgriPhage™	<i>Xanthomonas capestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>P.syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Domates, biber	2006

Bakteriyofaj çalışmaları biyoloji alanında DNA'nın tanımlanmasından, moleküler rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi gibi birçok önemli keşfin yapılmasında önemli rol oynamıştır. Günümüzde bakteriyofajlardan ele edilen proteinler ve enzimler identifikasyon (Smith et al. 2001), tedavi (Loeffler et al. 2001) ve ilaç teknolojisi (Liu et al. 2007) gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Bakteriyofajlarla tedavi çalışmaları günümüzde hızla yükselen bir araştırma alanı olmaktadır. Bu durumu anlamak için yıllara göre yapılan yayınları incelemek yeterli olacaktır. PubMed veri tabanında “phage therapy” ve “bacteriophage therapy” anahtar kelimeleri ile “title” alanında ham bir tarama yapıldığında ve duplike olanlar elendiğinde, 1970-1979 yılları arasında 3, 1980-1989 yılları arasında 6, 1990-1999 yılları arasında 7, 2000-2009 yılları arasında bu sayı 91 makale görülürken, 2010-2015 yılları arasında 1000'in üzerinde bilimsel makale olduğu ortaya çıkmaktadır. Yayınlanan makalelerin yanı sıra bu alanda yapılan büyük çaplı projeler de bulunmaktadır. “Avrupa Ar-Ge Projeleri” başlığı altında Avrupa Komisyonu tarafından 7. Çerçeve Programı kapsamında, 2013 yılında desteklenen Phagoburn projesi buna örnek gösterilebilir (Phagoburn 2013). Belçika, Fransa ve İsviçre'den 5 partner kuruluşla yürütülen bu proje kapsamında insanlar üzerinde faz I ve faz II çalışmaları yapılmaktadır.

### 1.1.2 Bakteriyofajların Günümüzdeki Önemi

Bakteri spesifik bakteriyofajların Felix d'Herelle (d'Herelle 1917) ve William Twort (Twort 1936) tarafından keşfedilmesinden itibaren bakteriyofajlar kuşkusuz bilimin önemli bir parçası olmuşturlar. Bakteriyofajlarla yapılan çalışmalar sonucunda genetik kodların tanımlanması ve DNA'nın genetik bir materyal olarak kabul edilmesi gibi moleküler biyolojinin ilk basamaklarını oluşturan birçok buluşa imza atılmıştır (Cairns et al. 1966).

Bunun yanı sıra faj ve fajlardan elde edilen vektör, cosmid ve promotör gibi ürünler rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinde önemli rol oynamıştır. Fajlardan elde edilen diğer ürünler, integraz, DNA ligaz ve çeşitli enzimler günümüz moleküler biyolojisinde çok önemli kullanım alanlarına sahiptirler (Summers 2006).

Bu büyük buluşların ardından bakteriyofajlar uzun yıllar boyunca bilimin ilgisinden uzak kalmıştır. Genom araştırmalarının hız kazanması ve önlenemeyen antibiyotik direncinin artması bakteriyofajlara tekrar ilgi duyulmasına neden olmuştur.

Yapılan genom çalışmaları sonucunda birçok bakterinin profaj diye adlandırılan lizojenik bakteriyofaj genomu taşıdığı ve bu genetik materyallerin bakteri genomu üzerinde değişikliklere neden olduğu ortaya konmuştur (Canchaya et al. 2003; Brüssow et al. 2004). Örneğin *Pseudomonas aeruginosa* PAOI genomunda profaj içeren 3 farklı bölge olduğu saptanmıştır (Hertveldt & Lavigne 2008).

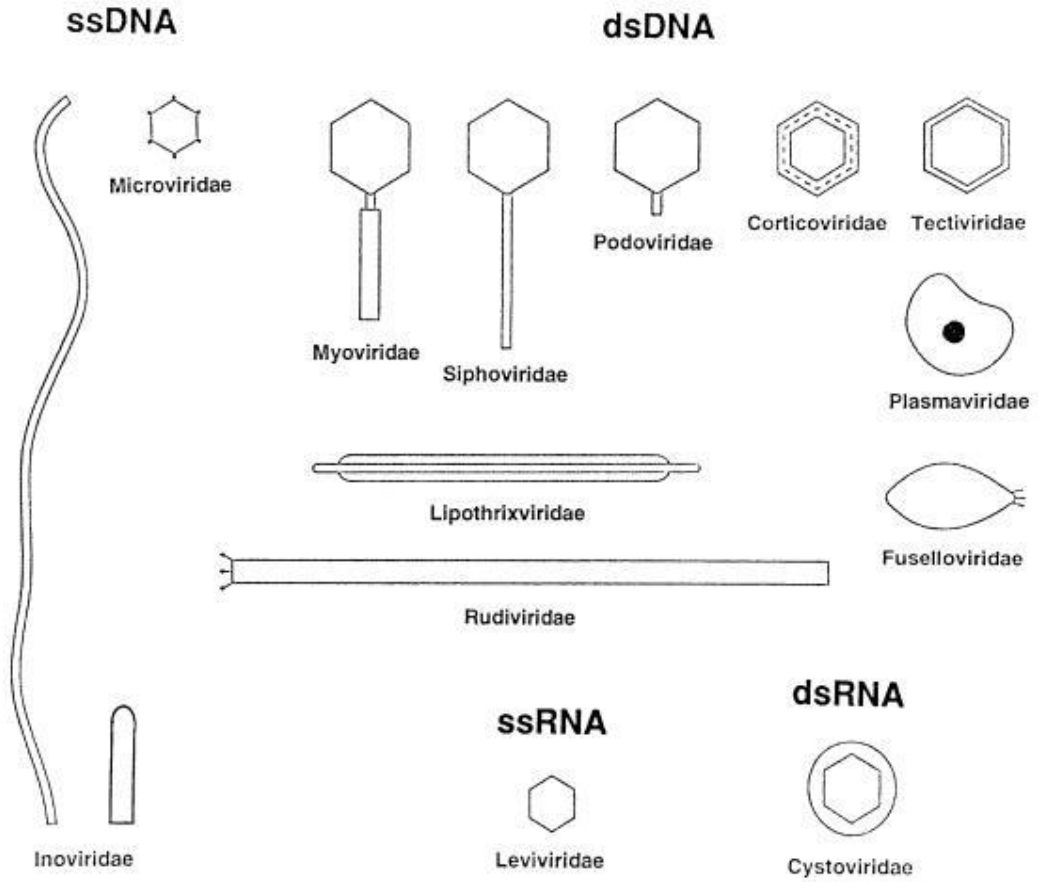
Bakterilerin antibiyotiklere karşı giderek direnç kazandığı günümüzde, tıp dünyası alternatif tedavi arayışları içerisine girmiş (Kutateladze & Adamia 2010) ve antibiyotikler dışında enfeksiyon etkenlerine karşı yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Yeni tedavi stratejileri arasında da en yüksek potansiyeli bakteriyofaj tedavisinin barındırdığı birçok otorite tarafından kabul edilmektedir. Bakteriyofajların yüksek litik etki göstermesi ve kolay ve ucuz yolla üretilebilmesi gibi etkenler faj terapisinin günümüzde kaybettiği popülaritesini tekrardan kazanmasını sağlamıştır. Bakteriyofajlar antibiyotiklerin etki mekanizmasından çok farklı bir etki mekanizmasına sahiptirler. Fajlar, bakterilerin direnç mekanizmalarına karşı değişim geçirerek dirençli bakterileri yok ederler (Debarbieux et al. 2010). Ayrıca, Polonya'da kurulan bir faj tedavi merkezi bakteriyofaj tedavisinin antibiyotik tedavisinden daha az maliyetli olduğu hesaplanmıştır. Metisilin dirençli *S. aureus*

(MRSA) 'dan ileri gelen enfeksiyonlarda antibiyotik tedavi maliyetinin, faj tedavisinden 2-8 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Miedzybrodzki et al. 2007).

### 1.1.3 Genel Bakteriyofaj Biyolojisi

Bakteriyofaj ya da diğer adıyla fajlar kendilerine özgü bakteriyi enfekte eden virüslerdir. Diğer virüs türlerinde olduğu gibi çoğalmak ve yayılmak için zorunlu olarak konak hücreye ihtiyaç duyan zorunlu hücre içi parazitleri olarakta bilinirler. Konak hücre dışında cansız formda olan bakteriyofajlar boyutları 1 µm'nin altındadır. Bakteriyofajlar, virüsler de olduğu gibi tek veya çift iplikçikli DNA ya da RNA genetik materyali taşırlar (Şekil 1.1). Yapısal olarak genetik materyali çevreleyen polihedral kapsidli, kuyruklu veya kuyuksuz, filamentöz veya pleomorfik yapıda olabilirler. Polihedral kapsid genetik materyalin korunmasında ve adsorbsiyonda etkin rol oynamaktadır (Guttman et al. 2005)(Şekil 1.1). Morfolojik analizi yapılmış olan fajların sayısı 5500'ün üzerindedir. Bakteriyofajlar yeryüzündeki en yaygın yaşam formu olarak kabul edilmektedir. Bilimsel verilerden yola çıkılarak yapılan hesaplamalara göre yeryüzünde  $10^{31}$ - $10^{33}$  bakteriyofaj bulunmaktadır. Yeryüzündeki her bir prokaryotik hücre için  $\sim 10^1$  bakteriyofaj olduğu düşünölmektedir (Chibani-Chennoufi et al. 2004). Tipik bir litik faj enfekte ettiği bakteri saatler içinde stoplazmasında  $\sim 100$ - $300$  yeni faj oluşturur. Üretilen bakteriyofajlar da yeni jenerasyon bakterileri enfekte ederek eradike ederler (Mattey & Spencer 2008). Fajların bu replikasyon siklusu, ancak ulaşabilecekleri yeni bakteri kalmayınca sonlanır.

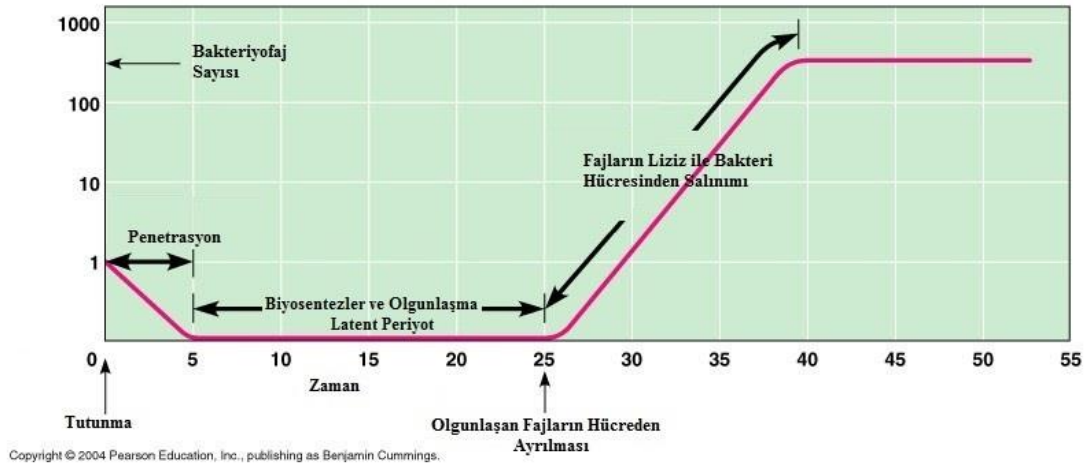




Şekil 1.1 Bakteriyofajların genetik çeşitlilikleri (Ackermann 2007)

Bakteriyofajların adsorbsiyon ile bakteri hücresine spesifik olarak bağlandıktan sonra genetik materyalini konak bakteri hücresine aktarılmasıyla bakteri enfeksiyonu başlar. Bakteriyofajların replikasyonları esnasında ilk olarak faj hedef konak hücre yüzeyinde bulunan spesifik yüzey reseptörlerine 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 enzimler yardımıyla genetik materyali direkt olarak peptidoglikan ve iç membran yapısını penetre ederek bakteri hücresinin sitoplazması içerisine aktarırlar (Molineux 2001; Roos et al. 2007). Genetik materyal konak hücre içerisine aktarıldıktan sonra hücre içi ekzonükleaz ve restriksiyon enzimlerinden korunması gerekmektedir. Bu işlem hedef hücrenin nükleaz enzimini

inhibe ederek, viral genomunu sirküler yapıya dönüştürerek ya da hydroxymethyldeoxyuridine gibi sıra dışı nükleotidlerini kullanarak gerçekleşir (Arber & Dussoix 1962; Wróblewska 2006). Sonrasında bakteriyofaj promoter bölgeleri konak hücre RNA polimeraz enzimleri tarafından tanınarak erken genler transkript edilir. Erken genlerin transkripti sonucu meydana gelen ürünler hücre içi kontrolü ele alarak orta ve geç genler transkript edilmeden önce konak hücre proteaz enzimini, restriksiyon enzimlerini ve konak biyosentezini inhibe ederler. Orta ve geç gen transkriptinde bakteriyofajlar sentezlenerek bakteriyofaj endolizinleri ile hücreyi lize ederler. Bu durum bakteriyofajların litik aktivitesi ile gelişir (Guttman et al. 2005; Abedon 2008; Abedon 2009; Şekil 1.3). Litik bakteriyofajlar enfeksiyon bölgelerinde toksisiteye neden olmadan konsantrasyonlarını hızla arttırmaları (Summers 2001). Bakteriyofajların konak hücre içerisinde geçirdikleri toplam süre “latent periyot” olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.2).



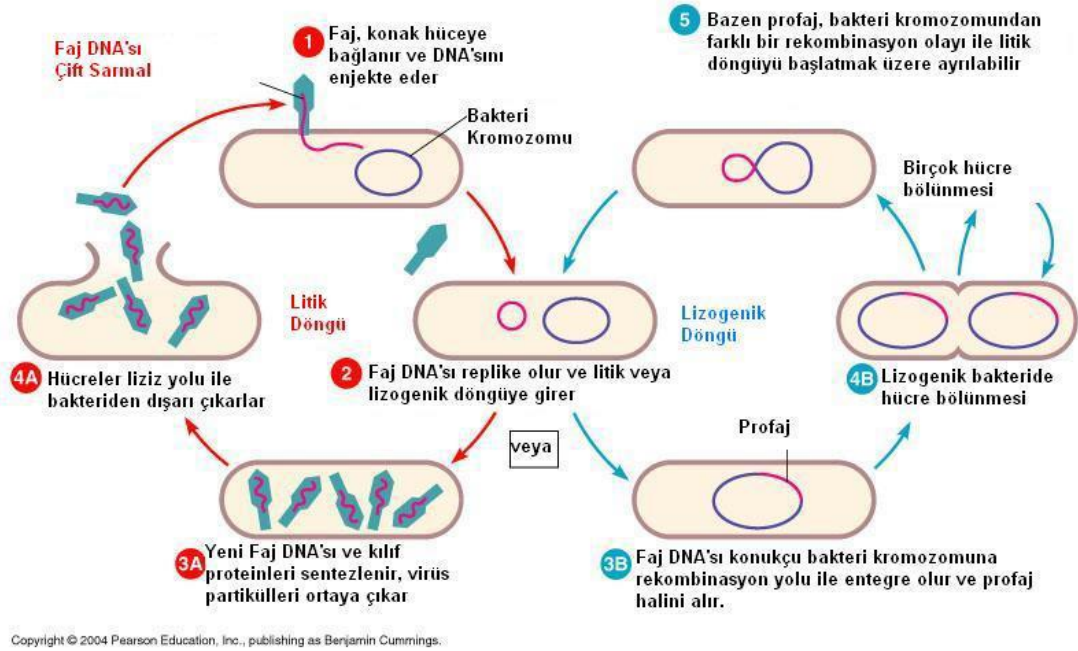
Şekil 1.2 Bakteriyofaj replikasyonunun tek basamaklı büyüme eğrisi

( <http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap13/lecture3.htm> sitesinden modifiye edilmiştir.)

Lizojenik yaşam şeklinde ise faj bakteriyeye genetik materyalini aktardıktan sonra faj genomu bakteri genomuna entegre olur, konakçı bakteri hücresinin bir parçası haline alır ve bakteri üredikçe çoğalan lizojenik siklus gösterir (Campbell 2007; Brüssow 2005; Şekil 1.3). Bu şekilde bakteri genomuna entegre olan faja “profaj”, profajı taşıyan bakteri de “lizojen bakteri” olarak adlandırılır. Ayrıca bu tür fajlara,

bakterilerin yaşam biçimlerini etkilemediği için ılımlı fajlar (temperate phage) da denir. Bazı durumlarda konak hücre içerisindeki optimum şartlar (besin yetersizliği gibi) bozulursa ılımlı fajlar tetiklenerek çoğalma süreci başlar ve sonuç olarak konak hücre parçalanır. Bazen lizojenik formdaki bakteriyofajlar enfekte ettikleri konak hücreye, yeni genler aktarılması yoluyla yeni işlevler kazandırabilir. Buna en iyi örnek *Vibrio cholera* bakterisinin, non-patojen olan suşunun bakteriyofaj ile enfekte edildikten sonra kolera toksin geninin aktarılması ve bakterinin kolera hastalığına neden olan patojen suşu örnek gösterilebilir (Krylov 2001).

Konak hücre içerisinde lizojenik formda bulunan profajlar ultraviyole ışık (UV), mitomisin C, mutajenik maddeler ve inkübasyon sıcaklığındaki değişimlerle indüklenerek litik hale getirilebilir (Adams 1959).



Şekil 1.3 Bakteriyofajların yaşam döngü tipleri

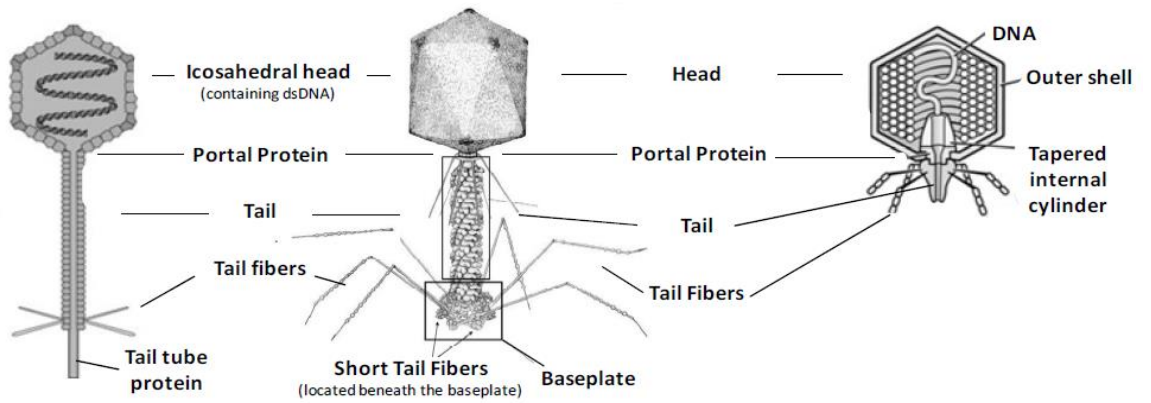
( <http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap13/lecture3.htm> sitesinden modifiye edilmiştir.)

Bir bakteriyofajın biyokontrol ya da tedavi amaçlı kullanılabilmesi için “litik faj” karakteri göstermesi gereklidir. Bakteriyofajlar, doğal mikrofloraya zarar vermeden ve fermente ürünlerdeki kültürleri etkilemeksizin direkt olarak türe özgü olarak uygulanabilmektedir. Bakteriyofajlar biyokontrol dışında bakterilerin direk

olarak örnekler içerisinde saptanması, identifikasyonu ve elde edilen bakteri izolatlarının alt-tiplendirilmesi (faj tiplendirme) amacıyla da kullanılmaktadır (Connerton et al. 2004).

#### 1.1.4 Bakteriyofajların Morfolojisi ve Sınıflandırılması

Bakteriyofajlar bireysel metabolizmaları olmayan zorunlu hücre içi parazitleridir. Yaklaşık yüz yıldır süren bakteriyofaj araştırmaları biyosferde hemen hemen her yerde bulunan bakteriyofajların çok fazla çeşitlilikte türü olduğu hakkında bilgiler ortaya koymuştur. Buna bağlı olarak bakteriyofaj genomları farklılık göstermektedir. Genom uzunlukları açısından birkaç bin baz çiftinden ~ 500 kilobaza kadar bakteriyofaj genomu bulunmaktadır. Son yıllarda sekanslanmış 498 kilobazlık genoma sahip phage G buna örnek verilebilir (Guttman et al. 2005). Phage G'nin genom uzunluğu, yaklaşık bir bakteri genomu ile eş değer uzunlukta olmasına rağmen hayati fonksiyonları gerçekleştiren hücresel kompleks mekanizmayı oluşturacak genlerden yoksundur. Bu durum doğal olarak bakteriyofajların zorunlu hücre içi paraziti olmalarına neden olmaktadır.



Şekil 1.4 Caudovirales takımına ait üç ailenin basit morfolojisi.

Soldan sağa, Siphoviridae (uzun ve esnek kuyruk), Myoviridae (çift katlı kısalabilir kuyruk), Podoviridae (kısa ve kalın kuyruk) (Serwer et al. 2008; Leiman et al. 2004).

Tarihsel olarak bakteriyofajlar morfoloji ve genomik yapısı açısından Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesine göre (UVTK) 13 familyaya ait 30 cins içerisinde yer alırlar (Mattey & Spencer 2008). Literatürde tanımlanmış bakteriyofajların %95'inden fazlası *Caudovirales* takımı üyesi olup kuyruklu ve dsDNA yapısındadır. *Caudovirales* takımı, kuyruk morfolojilerine göre 3 ana aileye ayrılmıştır. Bunlardan ilki; tanımlanmış bakteriyofajların %60'nın oluşturduğu uzun ve esnek kuyruklu *Siphoviridae*, ikincisi; %25'inin oluşturduğu çift katlı kısılabilir kuyruklu *Myoviridae*, üçüncüsü; %15'inin oluşturduğu kısa ve kalın kuyruklu *Podoviridae* ailesidir (Şekil 1.4).

Şekil	Nükleil Asit	Aile	Partiküller	Örnek
Tailed	DNA	<i>Myoviridae</i>	tail contractile	T4
		<i>Siphoviridae</i>	tail long, noncontractile	$\lambda$
		<i>Podoviridae</i>	tail short	T7
Polyhedral	DNA	<i>Microviridae</i>	conspicuous capsomers	$\phi$ X174
		<i>Corticoviridae</i>	complex capsid, lipids	PM2
		<i>Tectiviridae</i>	inner lipid vesicle, pseudotail	PRD1
		SH1	inner lipid vesicle	SH1
		STV1	turret-shaped protrusions	STIV
	RNA	<i>Leviviridae</i>	poliovirus-like	MS2
		<i>Cystoviridae</i>	envelope, lipids	$\phi$ 6
Filamentous	DNA	<i>Inoviridae</i>	a. long filaments	fd
			b. short rods	MLV1
		<i>Lipothrrixviridae</i>	envelope, lipids	TTV1
		<i>Rudiviridae</i>	TMV-like	SIRV-1
Pleomorphic	DNA	<i>Plasmaviridae</i>	envelope, lipids, no capsid	L2
		<i>Fuselloviridae</i>	same, lemon shaped	SSV1
		<i>Salterprovirus</i>	same, lemon shaped	His1
		<i>Guttaviridae</i>	droplet shaped	SNDV
		<i>Ampullaviridae</i> *	bottle shaped	ABV
		<i>Bicaudaviridae</i> *	two tailed, growth cycle	ATV
		<i>Globuloviridae</i> *	paramyxovirus like	PSV

Tablo 1.2. Ackermann Sınıflandırma Yöntemi \* Sınıflandırılmayı bekleyen aileler. (Ackermann 2007)

Ackermann sınıflandırmasına göre ise resmi olarak kabul edilmiş 17 aile, sınıflandırılmayı bekleyen 3 aile bulunmaktadır (Tablo 1.2)(Ackermann 2007). Ackermann sınıflandırması da UVTK'nın sınıflandırmasında olduğu gibi morfolojik ve genetik yapıya dayalı bir sınıflandırma yöntemidir. Sınıflandırma yönteminin detayları Tablo 2'de belirtilmiştir.

### 1.1.5 Bakteriyofaj Tedavisi

Günümüzde antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın tedavi seçeneklerindedir ve enfeksiyon etkeni fırsatçı patojenlere karşı hala potansiyel tedavi yöntemi olduğu günümüzde, bilinçsiz ve sıklıkla kullanım sonucu önlenemez bir hızla antibiyotik direncinin arttığı hakkında raporlar yayınlanmaktadır (Kutateladze & Adamia 2010). Gelişen antibiyotik dirençliliği, özellikle de çoklu dirençlilik, yeni antibiyotiklerin devreye girmesini zorunlu hale getirmiştir. Ancak antibiyotik araştırmaları ve keşif hızı son yıllarda çok yavaşlamış olup, günümüzde araştırma aşamasında birkaç yeni antibiyotik bulunmaktadır. Bu durum Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO; World Health Organization) tarafından da dile getirildiği gibi, antibiyotikler dışında yeni tedavi stratejileri geliştirmeyi ve kullanmayı zorunlu hale getirmiştir (Bush et al. 2004; Livermore 2004; Powers 2004). Bu soruna karşı, bakteri türlerine özgü olan ve bakterileri yok eden bakteriyofajlar, önemli bir cevap olarak karşımıza çıkmaktadır.

Faj tedavisinin, antibiyotik tedavisinden daha az maliyetli olduğu Polonya'da kurulan bir faj tedavi merkezinde hesaplanmıştır (Miedzybrodzki et al. 2007). Metisilin dirençli *S. aureus* enfeksiyonu üzerinden yapılan hesaplamada, antibiyotik tedavi maliyetinin, faj tedavisinden 2-8 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

## 1.2 Hedef Bakteri

### 1.2.1 Konak Hücre: *Pseudomonas aeruginosa*

Günümüz modern medikal mikrobiyoloji gelişmeden önce *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşlarının cerrahi operasyonlarda ve yaralarda enfeksiyonlara neden olduğu bilinmekteydi. Carle Gessard, 1882 yılında enfeksiyon bölgelerinden alınan örnekleri incelediğinde çomak şeklinde gözüken organizmalar olduğunu fark etmiş ve onlara *Bacillus pyocyaneus* adını vermiştir. Fakat 1894 yılında Migula yaptığı detaylı çalışmalarda bakteri türünün *Bacillus* cinsinden farklı olduğunu tespit ederek bu bakteriyi *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlamıştır (Teixeira et al. 2011). Sağlıklı dokulardan çok hasar görmüş dokularda enfeksiyon yapan fırsatçı patojen *Pseudomonas aeruginosa* doğada birçok alanda bulunabilen bir bakteri türü olup rezervuarı toprak, su, hayvanlar ve bitkilerdir. *P. aeruginosa* aerob, sporsuz, düz veya hafif kıvrımlı, 0,5-1,0 µm eninde 1,5- 5,0 µm boyutlarında ikili yada kısa zincirler oluşturabilen Gram- negatif çomaklar olup tek ve çoklu polar flajellaları ile genellikle hareketlidirler. Hastane ortamında ise genellikle nemli bölgelerde, gıda maddelerinde, çiçeklerde, lavabo ve tuvaletlerde, temizlik bezlerinde, solunum cihazlarında, diyaliz ekipmanlarında ve hatta dezenfektan solüsyonlarında bile bulunabilirler. Hastanede yatan veya ayaktan tedavi gören immün sistemi baskılanmış insanların dışında sağlıklı kişilerde normal mikrobiyal floranın bir parçası olarak nadiren bulunurlar. *P. aeruginosa* suşları doğal olarak birçok antibiyotiğe karşı dirençlidir (Livermore 2002) ve üst solunum yolu enfeksiyonlarında yüksek ölüm oranlarına neden olur (Chastre & Fagon 2002). *P. aeruginosa* genellikle vücut direncinin düşmesinde, kronik solunum yolu enfeksiyonlarına, kistik fibrosis kaynaklı yüksek ölümlere, yanık ve yara enfeksiyonlarına ve ameliyat sonrası enfeksiyonlara neden olarak hasta ölümlerini artırmaktadır. (Driscoll et al. 2007; Sécher et al. 2005; Mathur et al. 2008). Salgın durumlarında çocuklar üzerinde oldukça etkilidir (Troop 2012). Bu patojen besin maddelerinde, içme sularında ve birçok yerde kolonizasyon yapabilmektedir (Hardalo & Edberg 1997). *P. aeruginosa*'nın olağanüstü bir direnç mekanizması olduğu tanımlanmıştır (Strateva & Yordanov 2009). Hastane ortamından izole edilen birçok

*Pseudomonas aeruginosa* suşu colistin ve polymyxine karşı duyarlı olmasının yanı sıra son yıllarda antimikrobiyallere karşı hızla direnç kazandığı bildirilmektedir (Bonomo & Szabo 2006; Falagas et al. 2006; Zavascki et al. 2010). Bir çalışmada, *P. aeruginosa* suşları üzerine yapılan testlerde ise 16 farklı antibiyotiğe karşı direnç gösterebildiği belirlenmiştir (Deredjian et al. 2011; Gomes et al. 2011).

*P. aeruginosa* üreme standartları ve gereksinimleri diğer fırsatçı patojenlere göre çok düşüktür. Standart buyyon veya %5 koyun kanlı agar içerisinde 37 °C’de hızlı ve kolay bir şekilde üreyebilirler (Teixeira et al. 2011). *P. aeruginosa* kolonileri katı besi yerinde iki farklı şekilde görülür. Büyük, yüksek ve düz kenarlı ya da küçük, pürüzlü ve dışbükey koloni formunda görünürler. Genellikle klinik örneklerden izole edilen izolatlar büyük formda iken doğadan elde edilen izolatların daha küçük formda oldukları gözlemlenmektedirler. Diğer bir koloni formu ise mukoid yapıda oluşan kolonilerdir. Bu tür koloniler genellikle kistik fibroz hastalarından izole edilen suşlarda görülürler (Murray 2013). Klinik örneklerden izolasyonları genellikle enfeksiyon tipine göre balgam, idrar, deri lezyonu, beyin omurilik sıvısı (BOS), cerahat gibi örneklerden yapılmaktadır.

### 1.2.2 Bakteriyel Patojenite ve Antimikrobiyal Direnç

*Pseudomonas aeruginosa* suşları doğal olarak birçok antibiyotiğe karşı dirençlidir ve tedavi sırasında da mutasyonla direnç gelişimi olabilmektedir (Livermore 2002). Direnç mekanizması yüzeyde bulunan porin proteinleri ile alakalı olarak gelişmektedir. Bakteri içerisine antibiyotik girişi bu porlar üzerinden sağlanmaktadır. Porlarda oluşan bir mutasyon birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. Beta laktamaz antibiyotiklere karşı ise farklı beta laktamlar üreterek direnç göstermektedir.

*P. aeruginosa* toksinler, enzimler ve yapısal proteinler gibi birçok virülans faktörüne sahiptir (Deredjian et al. 2011). *P. aeruginosa* üç farklı aşamada enfeksiyon oluşturabilmektedir. Bunlardan ilki bakterinin bağlanması ve kolonizasyon ikincisi invazyon ve son olarakta sistemik hastalık oluşturmasıdır.



Enfeksiyon oluşumunda hücreye bağlanma çok önemlidir. Bağlanma, *P. aeruginosa* yüzeylelerinde bulunan dört farklı yapısal bileşen ile gerçekteşir. Bunlar flajella, pili, lipopolisakkarit ve aljinatlardır. Flajella ve pili adhezyondan, lipopolisakkaritlerde bulunan Lipid A endodoksin aktivitesinden sorumludur (Murray 2013).

*P. aeruginosa* tarafından üretilen en önemli virölans faktörlerinden bir tanesi ekzotoksin A'dır. Bu toksin ökaryotik hücrelerde peptit zincirinin uzamasını engelleyerek protein üretimini bozmakta ayrıca immün sistemi de baskılamaktadır. *P. aeruginosa* tarafından üretilen diğer bir virölans faktörde mavi renkli pigment olan piyosianindir. Bu pigment oksijeni, hidrojen peroksit ve süperokside katalize eder. Sarı – yeşil bir pigment olan piyoverdin ise demiri bağlayan bir siderofordur. *P. aeruginosa* tarafından salgılanan diğer bir virölans faktörü ise Las A ve Las B enzimleridir. Bu enzimler akciğer gibi elastin içeren dokularda hemorajik lezyonlara neden olurlar. Ekzoenzim S ve T *P. aeruginosa* tarafından üretilen hücre dışı enzimlerdir. İőlevi belli olmayan adenzin difosfat (ADF) ribozil transferaz aktivitesine sahiptir. Tip III salgımda bu enzimleri ökaryotik hücrelere sunduğunda, bakteri yayılımını arttıran nekroz ve doku hasarına neden olmaktadır (Murray 2013).

## 2. BÖLÜM: GEREÇ ve YÖNTEM

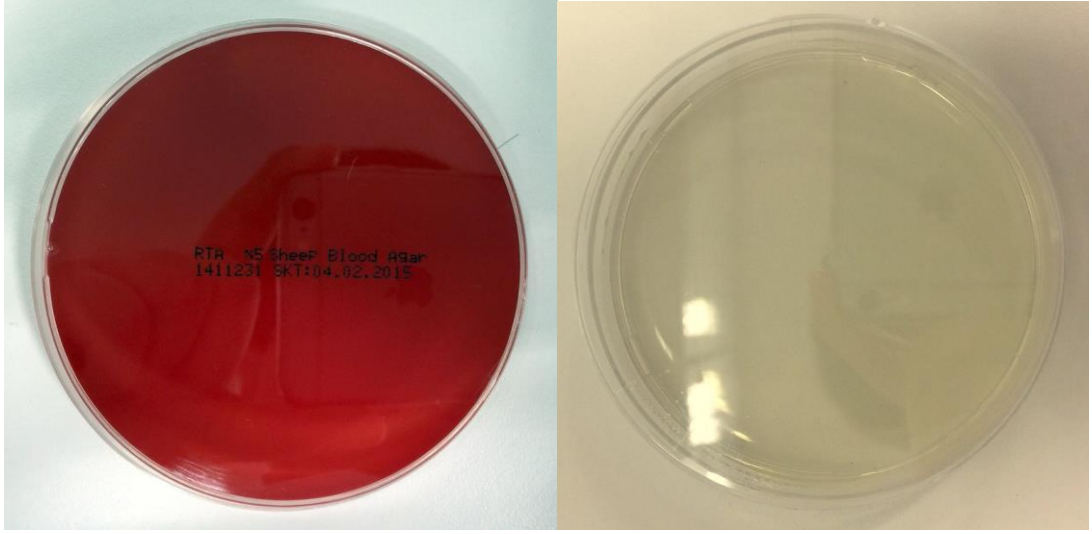
### 2.1 Kullanılan Besi Yerleri

Çalışma boyunca 4 farklı besi yeri kullanılmıştır. Bunlar; % 5 koyun kanlı agar (%5 KA), Luria Bertani Broth (LBB), Luria Bertani soft (yumuşak) agar (LBSA) ve Luria Bertani agar (LBA)'dır (Resim 2.1,Resim 2.2). % 5 koyun kanlı agarın bileşiminde, Nutrient substrate (heart extract and peptones; 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 bulunmaktadır.

LB Broth bileşimi, maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L şeklindedir. 25 g dehidre besiyeri bulunmaktadır. LB Soft Agar bileşimi, maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L şeklindedir.

LB agar bileşimi ise, maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L şeklindedir. 25 g dehidre besiyeri, 15 gr/L agar agar içermektedir.

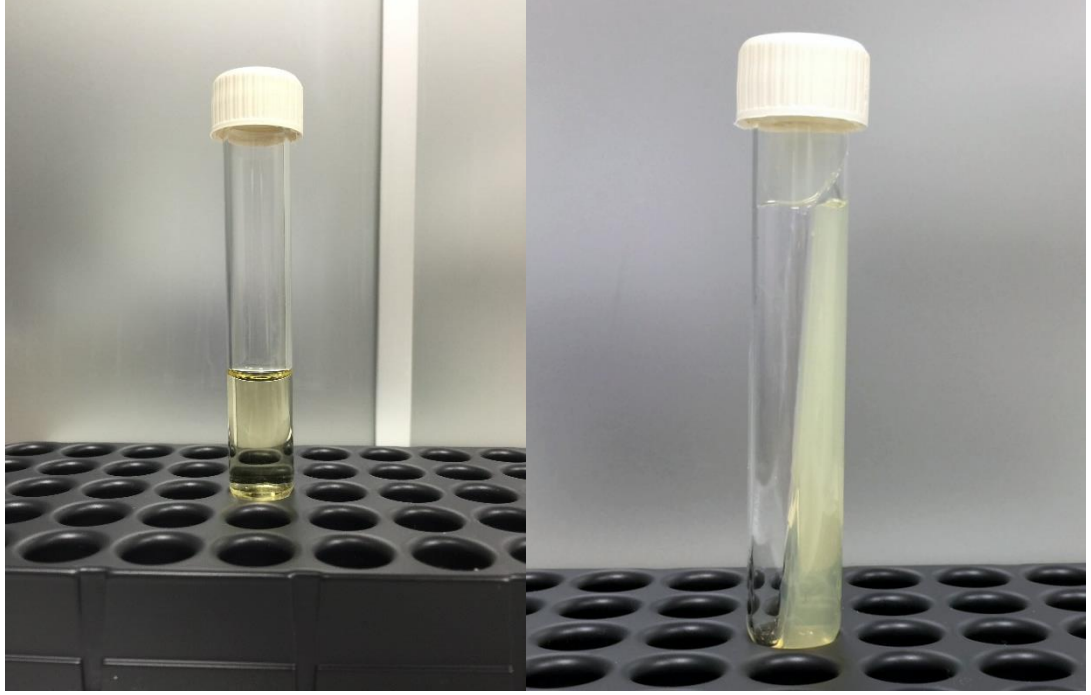
% 5 koyun kanlı agar hazır şekilde temin edilmiş olup diğer tüm besi yerleri amaca uygun miktarlarda distile su içerisinde eritilerek otoklavda 121 °C'de 15 dak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında LB broth 4,5 ml olacak şekilde steril vida kapaklı tüplere aktarılmıştır. LB soft agar, 7,5 ml olacak şekilde vida kapaklı tüplere aktarılıp 30° açı ile yatırılarak yatık besi yeri oluşması sağlanmıştır. LB agar 10 ml olacak şekilde steril petrilere aktarılarak katı besi yeri oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan tüm besi yerleri MERCK (Almanya) firmasından temin edilmiştir.



Resim 2.1. %5 Koyun Kanlı Agar (Solda) ve Luria-Bertani Agar (Sağda)



Resim 2.2. Luria-Bertani Soft Agar (Solda) ve Luria-Bertani 10X Broth (Sağda)



Resim 2.3. Luria-Bertani Broth (Solda) ve Luria-Bertani Slant Agar (Sağda)

## 2.2 Bakteri Suşları

Çalışmada kullanılan tüm bakteriler Şifa Üniversitesi Hastaneleri Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarları stoklarından temin edilmiştir. -80 °C'de cryobanklarda bulunan *Pseudomonas aeruginosa* bakteri izolatları LB broth içerisine ekilerek 24 saat süre ile 37 °C'de inkübe edilmiştir. Akabinde kontaminasyonu önlemek için broth içerisinde üreyen bakteri kültüründen öze ile 10 µl alınarak %5 koyun kanlı agara tek koloni düşecek şekilde ekilerek 37 °C'de inkübe edilmiştir. Çalışmada toplamda 20 adet olmak üzere 19 adet çeşitli antibiyotiklere dirençli *P. aeruginosa* ve 1 adet referans suşu olan *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri suşu kullanılmıştır.

## 2.3 *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle İdentifikasyonu

Proje kapsamında kullanılan tüm *P. aeruginosa* izolatları Şifa Üniversitesi Bornova Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan VİTEK 2

sistemi ile daha önceden birincil tanımlamaları yapılmıştır. Birincil tanımlamaları yapılan bakteri suşları bakteri-spesifik primerler kullanılarak PZR ile teyit edilmiştir. PZR ile tanımlama amacıyla ilk olarak bakteri DNA'ları izole edilmiş daha sonra optimal şartlarda PZR işlemi gerçekleştirilmiştir.

**DNA izolasyonu:** DNA izolasyonları *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşları LB broth içerisinde 24 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra ticari DNA izolasyon kitleri (Invitrogen K1820-02 PureLink Genomic DNA Mini Kit (LOT: 1621175A, CA, ABD)) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol esaslarına göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca; santrifüj edilerek çöktürülen bakteri hücreleri üzerine 180 µl parçalama (digestion) tampon çözeltisi ve 20 µl Proteinase K eklenerek 55 °C'de 30 dak inkübe edilmiştir. Akabinde, 20 µl RNase A eklenerek oda sıcaklığında 2 dak bekletilmiş ve sonrasında 200 µl liziz tampon çözeltisi eklenerek homojen bir karışım için vortekslenmiştir. Sonrasında 200 µl etanol eklenerek DNA filtre tüplerinde yıkama tampon çözeltisi kullanılarak 10000 g 'de 1 dak santrifüj edilmiştir. DNA'nın filtrelere bağlanması sağlandıktan sonra üzerine 20 µl distile su eklenip 10000 g 'de 1 dak santrifüj edilerek DNA'nın distile su içerisinde çözülmesi sağlanmıştır.

**PCR işlemi:** DNA'yı çoğaltmak için da Silva Filho et al. (1999) tarafından tanımlanan *Pseudomonas aeruginosa* spesifik 520 bp (baz çifti) *algD* gen bölgesini kodlayan VIC 1: 5'-TTCCCTCGCAGAGAAAACATC-3' ve VIC 2: 5'-CCTGGTTGATCAGGTCGATCT-3' primerleri kullanılmıştır.

Amplifikasyon, 25 µL PZR tamponunda gerçekleştirilmiştir. PZR tamponu (Tablo 2.2); her bir primerden 0,25 µL (1 µM), 12,5 µL 2X master miks (i-Taq, intron), 11 µL steril distile su ve 1 µL (~ 1µg) hedef DNA içermektedir (Tablo 2.2). Hazırlanan PZR tamponu PZR-termal cyclus cihazında 94 °C'de 5 dak ön denatürasyon, 30 siklus; 94 °C'de 30 sn, 60 °C'de 60 sn, 72 °C'de 90 sn ve 72 °C'de 5 dak son zincir uzaması ile çoğaltılmıştır (Tablo 2.3). 5 µl DNA, 1 µl yükleme solüsyonu ile boyanmıştır ve 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1 agaroz jelle yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Marker olarak 100 bp DNA Ladder (Genaid, İngiltere) kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853, negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 referans suşlarının DNA'ları kullanılmıştır.

Tablo 2.1 *P. aeruginosa*-spesifik Primerler

VIC – 1	5'-TTCCCTCGCAGAGAAAACATC-3'
VIC – 2	5'-CCTGGTTGATCAGGTCGATCT-3'

Tablo 2.2 PZR Karışım İçeriği

Stok Konsantrasyon	Miktar	Final Konsantrasyon
<b>~ 1 µG/ml DNA</b>	0,5 µL	20 ng/ml
<b>100 µM VIC 1</b>	0,25 µL	1 µM
<b>100 µM VIC 2</b>	0,25 µL	1 µM
<b>2x PZR Master mix (i-TAq, intron)</b>	12,5 µL	1 X
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	11,5 µL	-
<b>Toplam</b>	<b>25 µL</b>	

Tablo 2.3 PZR Koşulları

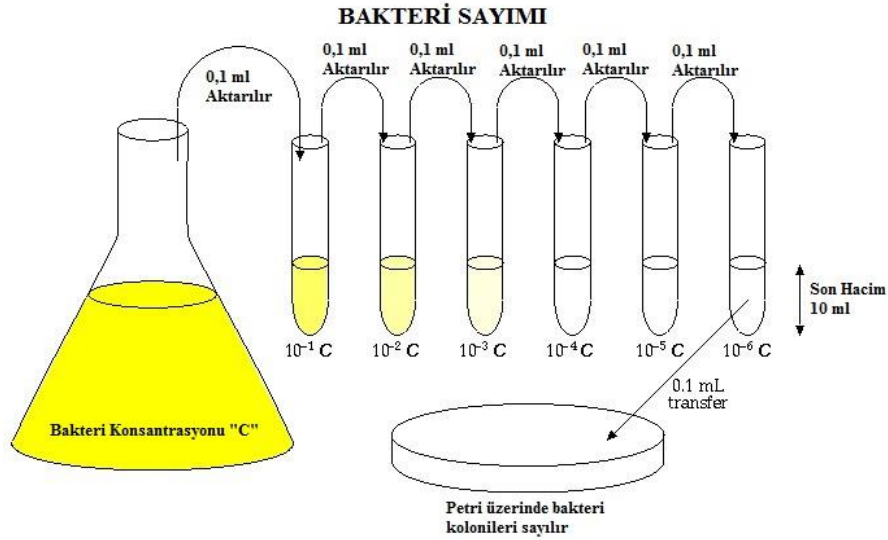
Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü
<b>94</b>	5'	1
<b>94</b>	30"	
<b>60</b>	60"	30
<b>72</b>	90"	
<b>72</b>	5'	1

## 2.4 Bakterilerin Antimikrobiyal Analizleri

Çalışmada kullanılan bakterilerin antimikrobiyal analizleri Şifa Üniversitesi Bornova Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan VITEK 2 (BioMerieux, Fransa) sistemi kullanılarak Gram-negatif bakteriler için kullanılan GN 21341 kartı ile daha önceden gerçekleştirilmiştir.

## 2.5 Bakterilerin Sayılması

LB Broth içerisinde bulunan bakterilerin sayımı seri dilüsyonlar yapılarak cfu/ml olarak belirlenmiştir. Sayımı yapılmak istenen sıvı bakteri kültürü başlangıç stoku olarak kabul edilmiştir. Başlangıç stokundan 1 ml alınarak 9 ml LB Broth içerisinde  $10^{10}$ 'a kadar dilüe edilmiştir. Akabinde her bir dilüsyon tüpünden 100 µl alınarak LB Agar üzerine ekilerek, steril bir yayıcı ile agar üzerinde her yere eşit miktarda ulaşacak şekilde yayılmış ve 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında agar yüzeylerinde oluşan tek koloniler sayılarak başlangıç stokunda bulunan bakteri miktarı belirlenmiştir. Deneyler üç defa tekrarlanarak sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Bakteri Sayısının Belirlenmesi

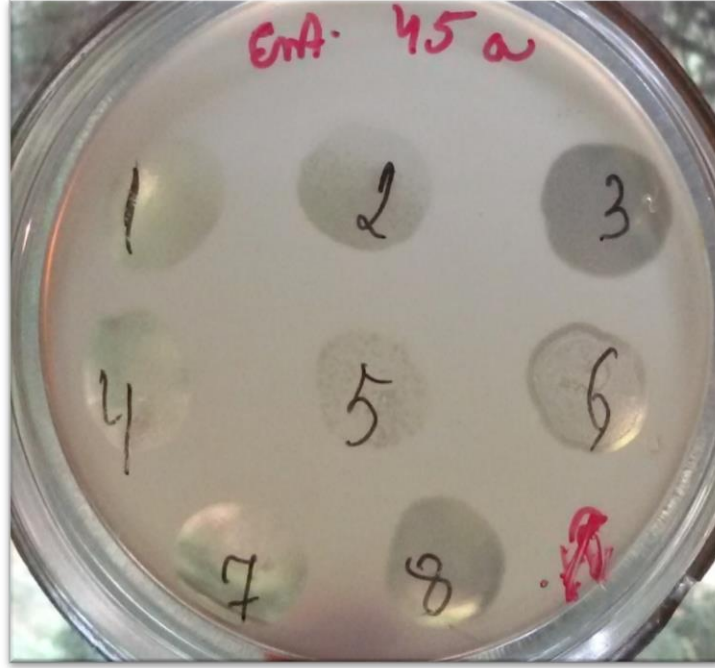
## 2.6 Bakteriyofaj İzolasyonu

Bakteriyofaj izolasyonu için Merabishvili et al. (2014) tarafından hazırlanan protokol modifiye edilerek Şifa Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar standartlarına göre optimize edilmiştir. Bakteriyofaj izolasyonu, farklı kaynaklardan alınan kirli atık suların gerçekleştirilmiştir. Özetle, toplanan atık su örneklerinden

alınan 90 ml örnek ile 10 X LB Broth (250 gr/L) bir erlenmayer balonunda karıştırılarak üzerinde hedef bakteri kültüründen 1 ml ( $\sim 10^8$  cfu/ml) eklenmiş ve 37 °C'de 24 saat süre ile aerobik ortamda inkübe edilmiştir. Akabinde, erlenmayer balonundan alınan bir miktar sıvı kültür içerisindeki partikülleri uzaklaştırmak için 9000 rpm (dv/dak)'de 10 dak süreyle santrifüj (Hettich, Rotina 420 R) edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısımda bulunan süpernatant 0,45 µm gözenek çaplı selüloz asetat filtreden (Milipore) geçirilmiş ve steril bir cam tüp içerisine aktarılmıştır. Filtre edilen kültür içerisine 1/10 oranında kloroform eklenerek oda sıcaklığında 20 dak beklemeye bırakılmıştır.

Bir gün önceden yatık (slant) agar besi yerine inoküle edilen ve 37 °C'de gün aşırı inkübe edilen bakteri kültürüne 4,5 ml LB Broth eklenerek vortekslenmiştir. Ardından oluşan sıvı kültür içerisinden alınan 100 µl bakteri kültürü steril bir tüpe aktarılmış ve üzerine 3 ml yumuşak (soft) LB agar ilave edilerek iyice karışması sağlandıktan sonra önceden dökülmüş LB agar üzerine yayılmıştır. Yumuşak LB agar katılaştıktan sonra mikropipet ile filtre edilen sıvı süspansiyon içerisinden alınan 15 µl örnek yumuşak agar üzerine damlatılarak 37 °C'de 18 saat süre ile inkübe edilmiştir. Yapılan işlem literatürde "spot test" olarak adlandırılmaktadır (Merabishvili et al. 2014). Bir sonraki gün petri üzerinde plak oluşumu olup olmadığı gözlemlenmiştir (Resim 2.4). Bu işlem çalışmada kullanılan tüm atık su örnekleri için gerçekleştirilmiştir. Plak oluşumu gözlemlenen petrilere damlatılan filtre sıvılarında bakteriyofaj varlığı saptanmıştır.



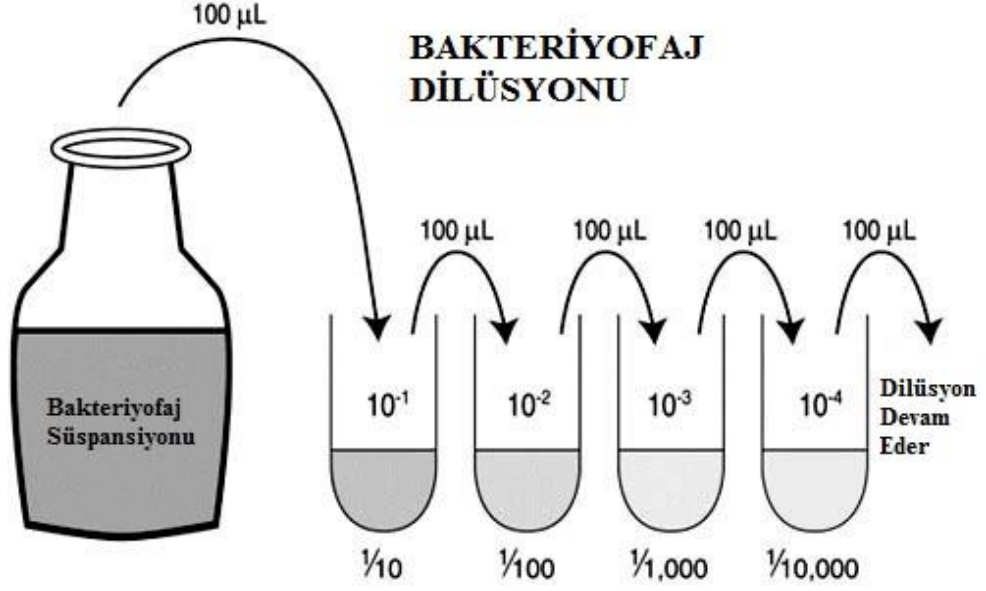


Resim 2.4. Spot Test Sonucu Oluşan Plaklar

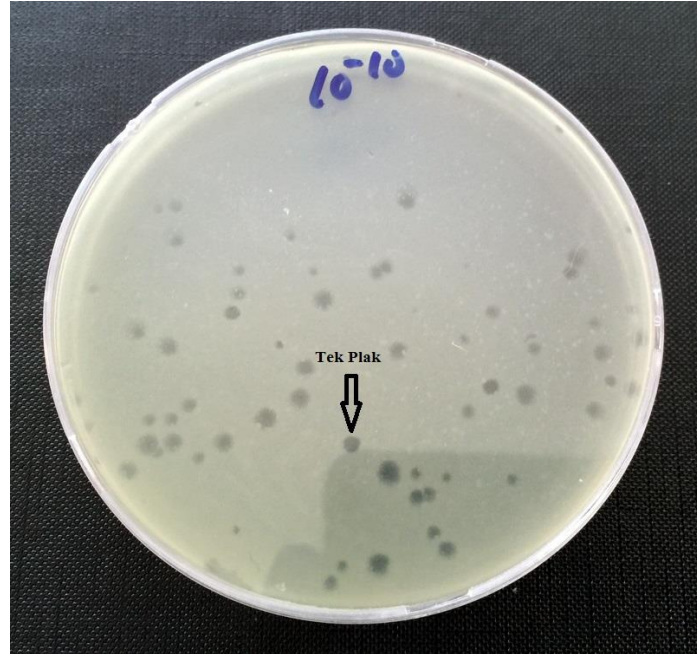
## 2.7 Bakteriyofajların Pürifikasyonu

Spot test sonucunda, içerisinde faj varlığı saptanan filtre sıvıları  $10^{10}$ 'a kadar sıralı dilüsyonlar yapılarak ana stok içerisindeki faj titresinin seyreltilmesi sağlanmıştır (Şekil 2.2). Her bir dilüsyon örneğinden alınan 1 ml bakteriyofaj süspansiyonu, 100  $\mu$ l taze bakteri kültürü ( $\sim 10^8$  cfu/ml) ile karıştırılıp üzerine 3 ml LB soft agar eklenerek önceden hazırlanmış LB agar üzerine yayılarak  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 18 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu yöntem literatürde çift tabaka agar yöntemi olarak geçmektedir (Merabishvili et al. 2009). Bir sonraki gün hazırlanan petriyeriler üzerindeki plak oluşumları gözlemlenmiştir. Bakteriyofajlar tek plak oluşumu gözlemlenen petriyerilerden steril pastör pipeti ile kesilerek LB Broth içerisine aktarılmış, iyice karıştırılarak fajların besiyeri yerine geçmesi sağlanmıştır (Resim 2.5). Hazırlanan yeni faj süspansiyonu dilüe edilerek çift tabaka agar yöntemine tabi tutulmuştur. Bu işlem 6 defa tekrar edilmiştir. Altıncı tekrarın sonunda oluşan tek plaktan kesilen fajlar sıvı besiyeri içerisine aktarılıp iyice karıştırılarak fajların besiyeri yerine difüze olması

sağlanmıştır. Hazırlanan bu son besi yeri faj karışımı, saf (pürifiye) bakteriyofaj stoku olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.2 Sıralı Bakteriyofaj Dilüsyonu



Resim 2.5. Tek Plak Oluşumu

## 2.8 Bakteriyofajların Titresinin Arttırılması

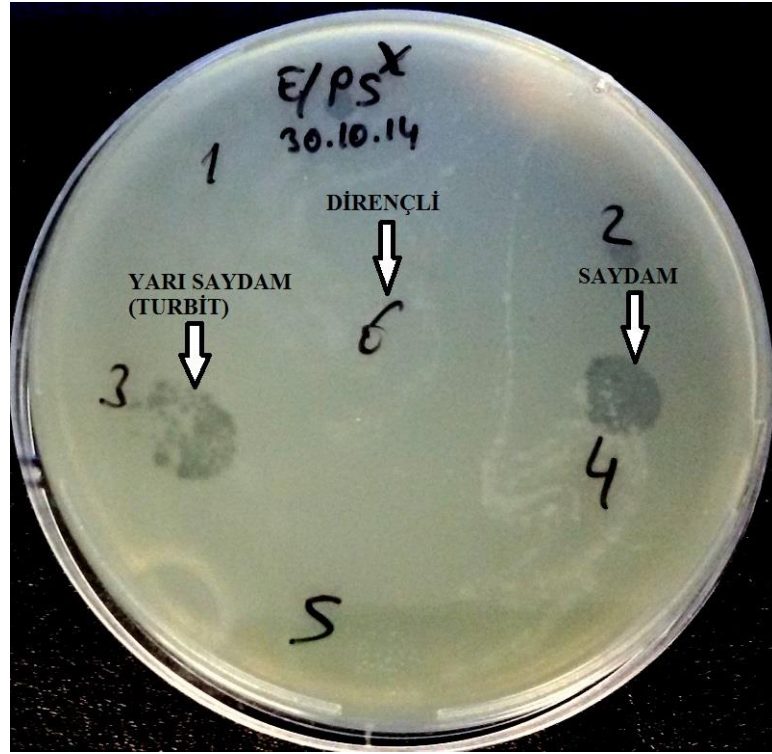
Pürifiye edilen bakteriyofajların çalışmada kullanılabilmesi için titreleri arttırılmıştır. Bu işlem, pürifiye edilmiş stokta bulunan bakteriyofajlar dilüe edilerek çift tabaka agar yöntemi ile çoğaltılmıştır. İlk olarak  $10^{-7}$ 'ye kadar dilüe edilmiş saf faj sıvısı çift tabaka agar yöntemi ile LB agar üzerine yayılarak  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda tam lize olmamış petriyer üzerine 3 ml LB broth eklenerek kazıyıcı yardımı ile yumuşak LB agar tabakası kazınarak LB broth ile karışması sağlanmıştır. Oluşan karışım Falkon tüp içerisine alınarak 9000 rpm (dv/dak)'de 10 dak süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst kısımda bulunan sıvı kısım alınarak  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  gözenek çaplı membran filtre ile filtre edilmiştir. Her filtreleme işleminden sonra elde edilen faj konsantrasyonu başlangıç faj stoku kabul edilerek bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Üçüncü tekrarın sonucunda elde edilen solüsyonda yüksek titre bakteriyofaj olduğu saptanmıştır.

## 2.9 Bakteriyofaj Titresinin Belirlenmesi

Bakteriyofajların titresi her bir mililitre örnek içerisinde bulunan bakteriyofaj sayısının hesaplanması ile belirlenmiş olup ve pfu/ml birimi ile belirtilmiştir. Bakteriyofajların sıvı kültür içerisindeki titresinin belirlenmesi çift tabaka agar metodu ve sıvı kültürün dilüe edilmesiyle hesaplanmıştır. İlk olarak sıvı kültür içerisinde bulunan bakteriyofaj stoku  $10^{-10}$ 'a kadar dilüe edilmiştir. Dilüsyon işleminden sonra yatık besi içerisinde  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat süre ile inkübe edilmiş ve 4,5 ml LB broth ile vortekslenerek elde edilen taze sıvı bakteri kültüründen  $100\text{ }\mu\text{l}$  ( $\sim 10^8$  cfu/ml) eklenmiştir. Akabinde her bir bakteri kültürü üzerine bakteriyofaj dilüsyon tüplerinden 1 ml çekilerek aktarılmış ve üzerlerine 3 ml yumuşak LB agar eklenerek daha önceden hazırlanmış LB agarları üzerine yayılmıştır.  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat süre ile inkübasyonun sonunda her bir agar tabakası üzerindeki plaklar sayılarak bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Örneğin  $10^{-8}$  dilüsyonundan hazırlanan agar üzerinde 20 faj plağı görülmüşse  $20 \times 10^8 = 2 \times 10^9$  pfu/ml olarak belirlenmiştir. Bütün deneyler 3 defa tekrarlanarak bakteriyofaj titreleri belirlenmiştir.

## 2.10 Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin (Duyarlılıklarının) Değerlendirilmesi

Bu aşamada izole edilen bakteriyofajların hedef konak hücresi üzerindeki antimikrobiyal ya da öldürücü etkisi belirlenmiştir. İzole edilen bakteriyofajların litik aktiviteleri 2.6 Bakteriyofaj İzolasyonu başlığı altında basamakları açıkça belirtilen bakteriyofaj damlatma uygulaması “spot test” yöntemi ile değerlendirilmiştir. Faj damlatımı uygulamasından sonra LB agar tabakaları üzerinde oluşan plakların saydamlıklarına göre bakteriyofajların litik aktiviteleri saptanmıştır. Oluşan plaklarda 2 farklı görünüm gözlemlenmiştir. Bunlar sırası ile saydam plaklar ve yarı saydam plaklardır. Plak oluşturmayan bakteriyofajların ise hedef konak hücrelerine duyarlı olmadığı, dirençli olduğu sonucuna varılmıştır (Resim 2.6) (Alves et al. 2014).



Resim 2.6. Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

## **2.11 Bakteriyofaj Dinamiklerinin Belirlenmesi**

### **2.11.1 Adsorbsiyon süresi, Latent Süre ve Çoğalma Oranının (Burst Size) Belirlenmesi**

Adsorbsiyon süresi; bakteriyofajların bakteri yüzeyine bağlanması sırasında geçen süreyi ifade etmektedir. Latent süre; adsorbsiyon (bağlanma) işlemi sona erdikten sonra bakteriyofaj genomunun konak hücreye aktarılmasından konak hücrenin yeni fajlar tarafından lize edilmesine kadar geçen süreyi ifade etmektedir. Çoğalma oranı ise başlangıçta belli bir miktarda bakteriyofaj sayısının enfeksiyon sonrasında oluşan yeni bakteriyofaj sayısının oranını ifade etmektedir. Bu aşamada; ilk olarak steril 15 ml'lik Falcon tüp içerisine titresi  $10^8$  olan bakteriyofaj kültüründen 0,2 ml eklenmiş ve sonrasında, taze konak bakteri kültüründen ( $\sim 10^8$ ) 1,8 ml alınarak eklenerek karıştırılmıştır. Akabinde, sıcaklığı  $37^\circ\text{C}$ 'ye sabitlenmiş sıcak su banyosu içerisine yerleştirilmiştir. Sonrasında beşer dak periyotlar halinde Falcon tüpten 0,1 ml örnek alınarak  $+4^\circ\text{C}$ 'de soğutulmuş 9,9 ml 1/10 kloroformlu sıvı besi yeri içerisine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dak bekletilerek 2.9 Bakteriyofaj Titresinin Belirlenmesindeki protokole uygun bir şekilde her bir tüpün içerisindeki bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Çıkan sonuçlar grafik oluşturularak değerlendirilmiştir. Bütün deneyler üç defa tekrarlanarak sonuçlar elde edilmiştir.

### **2.11.2 Adsorbsiyon Oranlarının Belirlenmesi (MOI “Multiplicity of Infection” Value)**

Adsorbsiyon oranlarının belirlenmesi işlemi, bir bakteriye aynı anda kaç bakteriyofajın bağlanabildiğini belirleme işlemidir. Bu aşamada titresi  $10^8$  olan bakteriyofaj süspansiyonundan 1 ml ve taze konak bakteri kültüründen 1 ml alınarak steril Falcon tüp içerisine eklenmiştir. Ardından  $37^\circ\text{C}$ 'de 2.10.1'de belirlenen latent süre geçilmeyecek şekilde inkübe edilmiştir. Bu işleme paralel olarak 2.5 Bakterilerin

Sayılması başlığında detayları verilmiş olan protokole uygun olarak LB broth içerisindeki bakteri kültüründe bulunan bakterilerin cfu/ml cinsinden sayımı gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun sonunda karışım 9000 rpm (dv/dak)'de 10 dak süreyle santrifüj edilerek adsorbe olmayan bakteriyofajların titresi belirlenmiştir. Bu işlem için süpernatant kısım 0,45 µm gözenek çaplı membran filtreden geçirildikten sonra 2,9'daki protokole uygun bir şekilde titresi belirlenmiştir.

$$\text{MOI Değeri} = \frac{\text{(Başlangıç faj titresi-Adsorbsiyon sonrası faj titresi)}}{\text{Bakteri Sayısı}}$$

Adsorbsiyon oranı yukarıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Bütün deneyler üç defa tekrarlanarak sonuçlar elde edilmiştir.

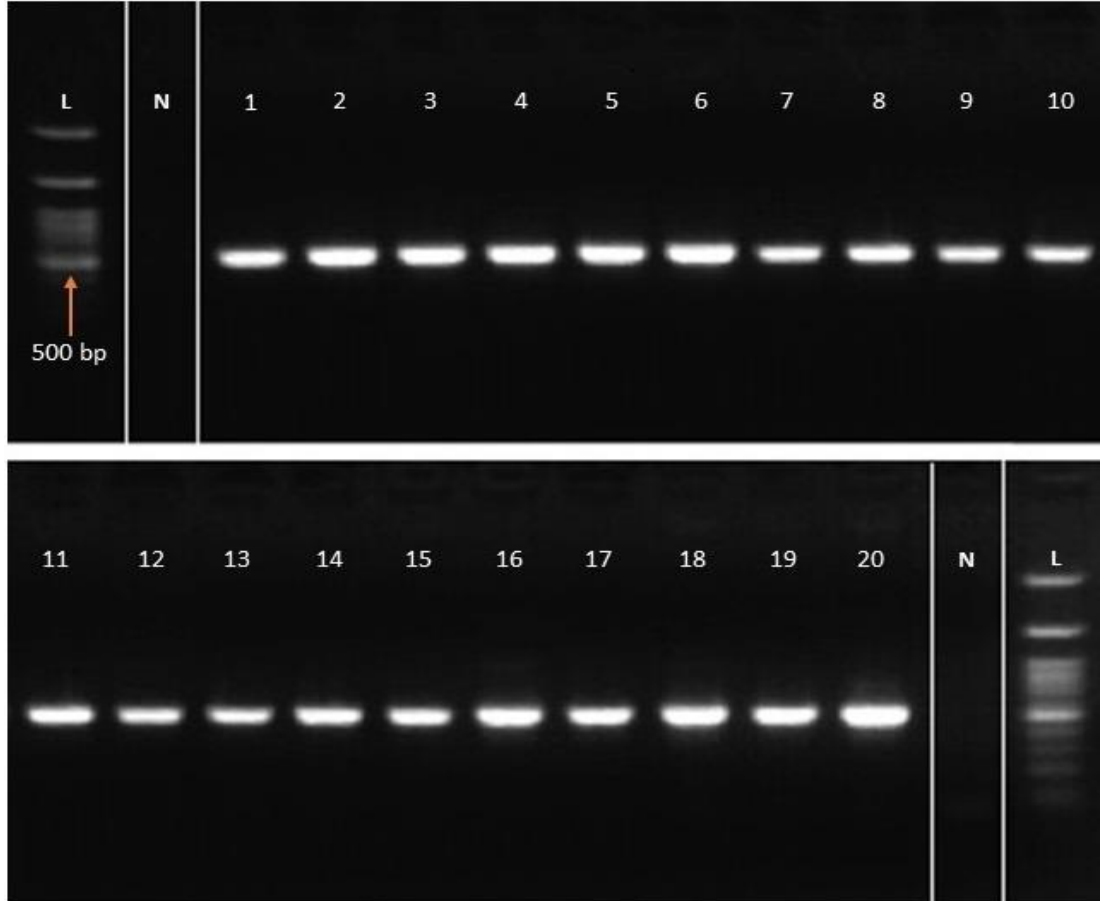
## 2.12 Saklama Koşulları

Saflaştırılmış halde bulunan bakteriyofaj stokları steril bir tüp içerisine aktararak + 4 °C'de saklanmıştır.

### 3. BÖLÜM: BULGULAR

#### 3.1 Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve PZR Analizi

Şifa Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan hastalardan izole edilmiş *P. aeruginosa* bakteri izolatları VİTEK 2 cihazı ile GN 21341 Gram-Negatif kartı kullanılarak daha önceden birincil tanımlama işlemi yapılmıştır. Akabinde, birincil tanımlama işlemleri yapılan *P. aeruginosa* bakteri suşlarının DNA izolasyonları yapılmış ve *P. aeruginosa*-spesifik primerler kullanılarak PZR ile identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. PZR sonuçları Resim 3.1’de gösterilmiştir.



Resim 3.1 *Pseudomonas aeruginosa* Bakteri Suşları PZR Sonuçları

(L: DNA Ladder, N: Negatif Kontrol, 1: Pozitif Kontrol, 2-20: *P. aeruginosa* Suşları Bakınız Tablo 3.1 )

### 3.2 Bakteri Suşlarının Antimikrobiyal Analizi

Tanımlama ve identifikasyon işlemleri gerçekleştirilen *P. aeruginosa* bakteri izolatları daha önceden VİTEK 2 cihazı kullanılarak antibiyogram analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Yapılmış olan testler sonucunda *P. aeruginosa* bakteri suşlarının 18 tanesinin çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu saptanmıştır.

Tablo 3.1 Çalışmada Kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* Bakteri Suşları ve Antibiyotik Direnç Profilleri

Bakteri	Kod	Kaynak	Antibiyotik Direnci
1 <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	PA_00	Kan	-
2 <i>P.aeruginosa</i>	PA_01	Apse	SXT, FOX, CXM, AMP, CXA, AMC
3 <i>P.aeruginosa</i>	PA_02	Kan	CAZ, IPM, CIP, TZP, PRL
4 <i>P.aeruginosa</i>	PA_04	Balgam	SXT, FOX, CXM, AMP, CXA
5 <i>P.aeruginosa</i>	PA_05	Kan	FOX, CXM, AMP
6 <i>P.aeruginosa</i>	PA_06	Balgam	CXM, AMP, CXA
7 <i>P.aeruginosa</i>	PA_07	Trebal	CN, AMP
8 <i>P.aeruginosa</i>	PA_09	Yara	CT, SXT,
9 <i>P.aeruginosa</i>	PA_10	Katater Ucu	CN, AN, SXT, SAM, TGC, NET, TE
10 <i>P.aeruginosa</i>	PA_11	Yara	SXT, FOX, CXM, AMP, CXA, AMC
11 <i>P.aeruginosa</i>	PA_12	Yara	SXT, FOX, TZP
12 <i>P.aeruginosa</i>	PA_13	Katater Ucu	FOX, CXM, AMP, CXA
13 <i>P.aeruginosa</i>	PA_16	Balgam	SXT, FOX, CXM, AMP
14 <i>P.aeruginosa</i>	PA_17	Balgam	FOX, CXM, AMP, CXA, AMC
15 <i>P.aeruginosa</i>	PA_18	Kan	IPM, CIP, TZP
16 <i>P.aeruginosa</i>	PA_19	Yara	FOX, CXM, AMP, CXA
17 <i>P.aeruginosa</i>	PA_20	Kan	CAZ, CN, AMP
18 <i>P.aeruginosa</i>	PA_21	Kan	CIP, CT, SXT,
19 <i>P.aeruginosa</i>	PA_22	Kan	SXT, FOX, TZP
20 <i>P.aeruginosa</i>	PA_23	Kan	FOX, CXA, AMC

• **Antibiyotiklerin İsim Listesi:** İmipenem (IPM), Siprofloksacin (CIP), Gentamisin (CN) 10ug, Amikasin (AN), Klotisin (CT), Co-trimataazol (SXT), Meropenem (MEM), Cefoxitin (FOX), Cefuroxime (CXM), Ampicillin sulbactam (SAM), Ampicillin (AMP), Cefuroxime aksetil (CXA), Piperacillin/Tazobactam (TZP), Piperacilin (PRL), Amoxicillin/clavulanate (AMC), Levofloxacin (LVX), Tigesiklin (TGC), Netilmisin (NET), Tetrasiklin (TE), Cefoperazone sulbactam (SCP)



### 3.3 Bakteriyofaj İzolasyonu

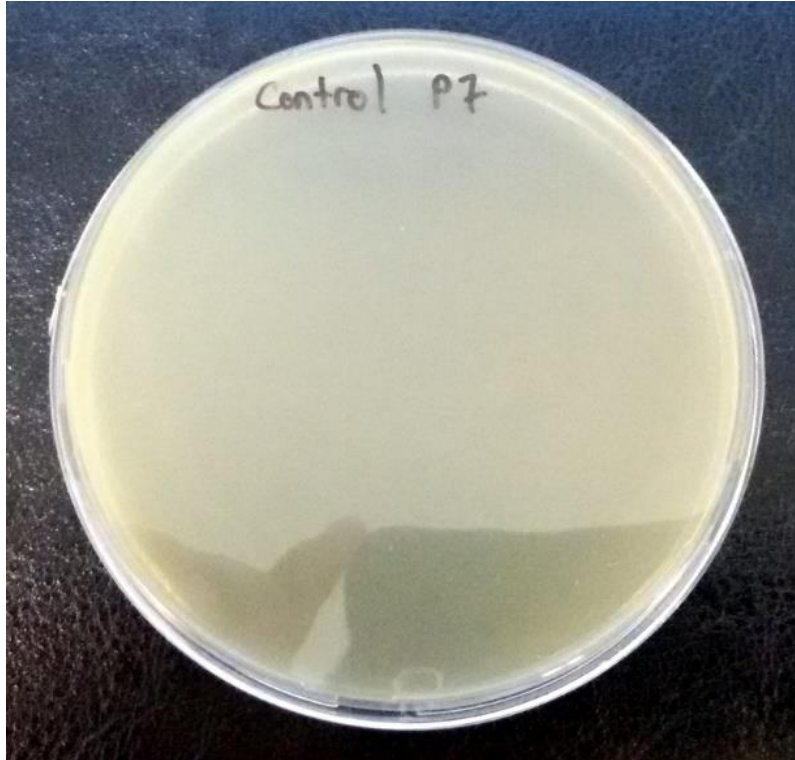
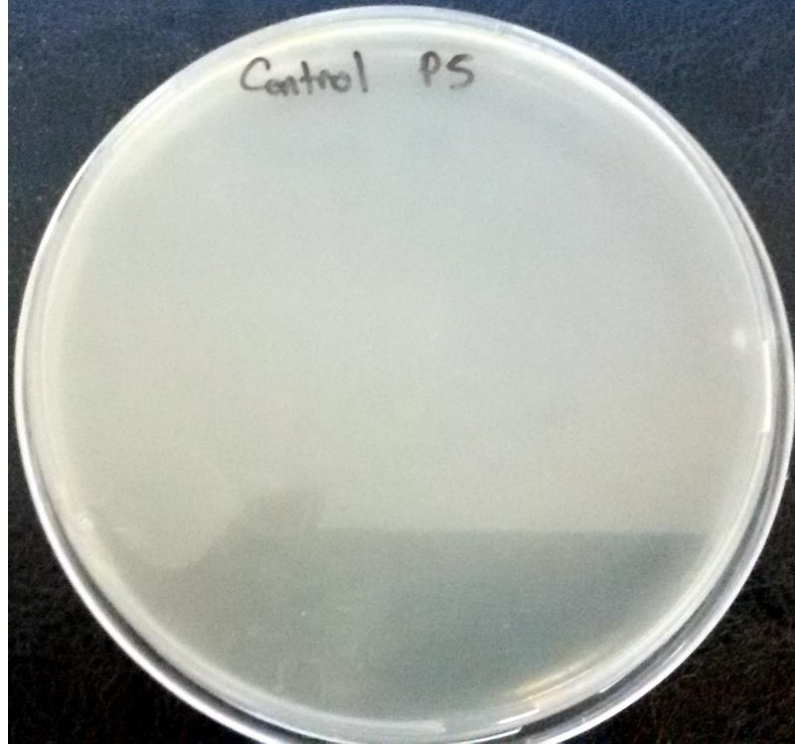
Çalışmamız kapsamında 12 adet atık su örneği incelenmiş ve 6 adet *Pseudomonas aeruginosa* spesifik bakteriyofaj izole edilmiştir. İzole edilen bakteriyofajlar PA/EMEL\_001 – PA/EMEL\_006 olarak adlandırılarak stoklanmıştır.

Çalışma boyunca *P. aeruginosa* spesifik bakteriyofaj izolasyonları amacıyla *P. aeruginosa\_05* (PA\_5) bakterisi konak hücre olarak kullanılmış ve LB slant agar besi yerinde inkübe edilmiştir.

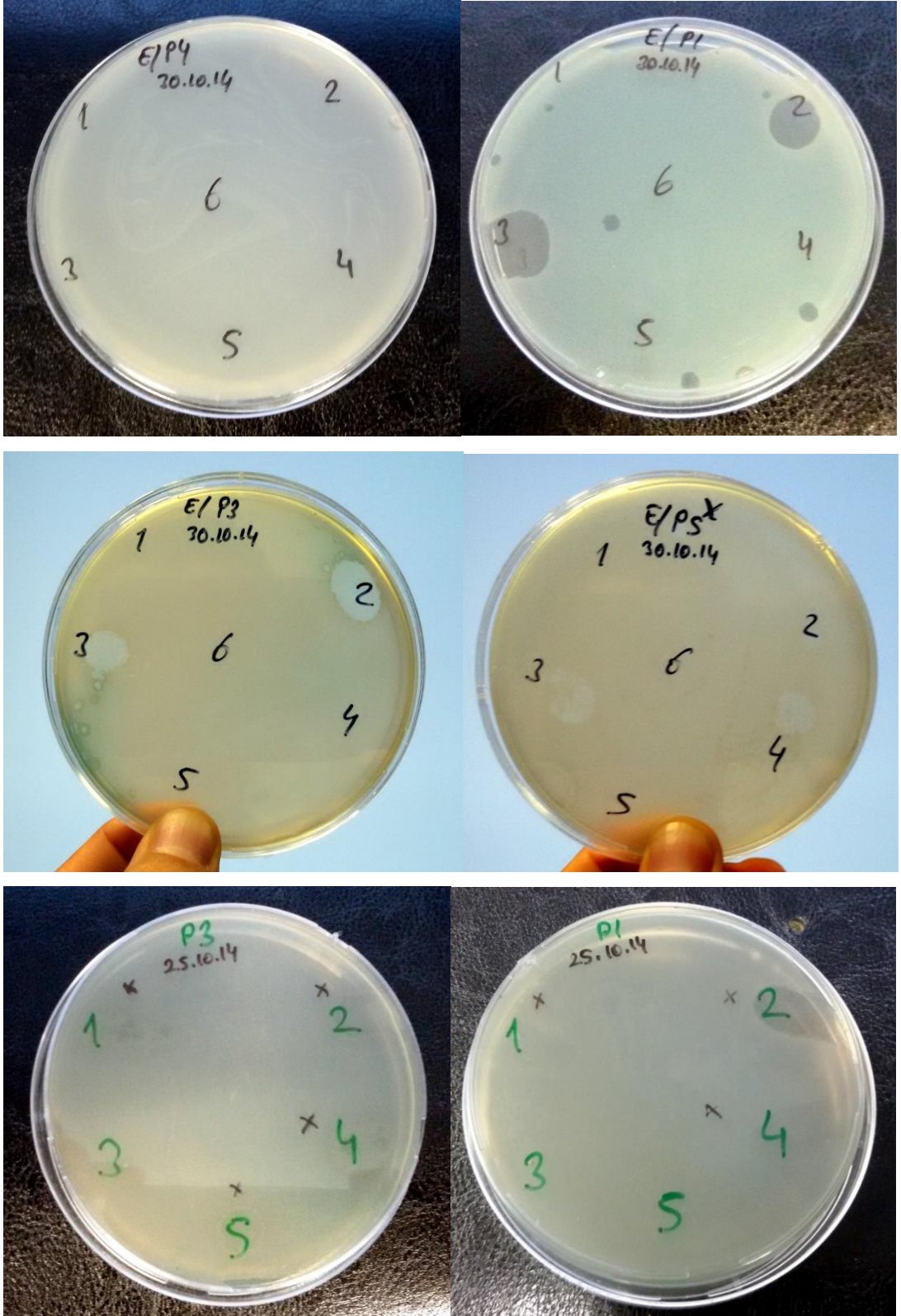
### 3.4 Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda izole edilen her bir bakteriyofajın farklı litik aktivitelere sahip olduğu saptanmıştır. İzole edilen bakteriyofajların litik aktiviteleri, 20 adet farklı çoklu antibiyotik dirençli *P. aeruginosa* suşu üzerinde “spot assay” yöntemi ile değerlendirilmiş ve her birinin farklı litik spektrumlarına sahip olduğu belirlenmiştir ve kontrol grupları ile teyit edilmiştir (Resim 3.2;Resim 3.3).

Yapılan değerlendirme sonucuna *P. aeruginosa* bakterisine karşı litik spektrumu en yüksek olan bakteriyofajın PA/EMEL\_001 fajı olduğu belirlenmiş ve çalışmamızın sonraki aşamalarında kullanılacak bakteriyofaj olarak seçilmiştir. PA/EMEL\_001’in litik aktivitesi, inkübasyon sonucunda fajın etkili olduğu bölgelerde bakterilerin eradike olmalarına bağlı olarak yuvarlak plakların oluşumunun görülmesiyle belirlenmiştir. PA/EMEL\_001 fajının, *P. aeruginosa* bakteri suşları üzerindeki litik aktivite değerleri Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Tabloda bulunan (+) sembolü fajın litik etkisinin pozitif olarak değerlendirilmesini, (-) sembolü ise fajın litik etkisinin negatif olarak değerlendirildiğini göstermektedir. Sonuç olarak biri *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşu olmak üzere toplam 20 adet *P. aeruginosa* bakteri suşundan 14 (%70) tanesinin PA/EMEL\_001’e duyarlı, 6 (%30) tanesinin duyarsız olduğu saptanmıştır.



Resim 3.2 Bakteriyofaj İzolasyon Aşamasında Kullanılan Kontrol Grupları



Resim 3.3 Bakteriyofaj İzolasyon Aşamasından Bazı Örnekler

Tablo 3.2 Çalışmamızda Elde Edilen PA/EMEL\_001 Bakteriyofajının Klinik *P. aeruginosa* Suşlarına Karşı Litik Spektrum Sonuçları

	<b>KOD</b>	<b>KAYNAK</b>	<b>ANTİBİYOTİK DİRENCİ</b>	<b>PA/EMEL_001 LİTİK SPEKTRUM</b>
1	PA_00	Kan	-	+
2	PA_01	Apse	SXT, FOX, CXM, AMP, CXA, AMC	+
3	PA_02	Kan	CAZ, IPM, CIP, TZP, PRL	+
4	PA_04	Balgam	SXT, FOX, CXM, AMP, CXA	-
5	PA_05	Kan	FOX, CXM, AMP	+
6	PA_06	Balgam	CXM, AMP, CXA	-
7	PA_07	Trebal	CN, AMP	-
8	PA_09	Yara	CT, SXT,	+
9	PA_10	Katater Ucu	CN, AN, SXT, SAM, TGC, NET, TE	+
10	PA_11	Yara	SXT, FOX, CXM, AMP, CXA, AMC	-
11	PA_12	Yara	SXT, FOX, TZP	+
12	PA_13	Katater Ucu	FOX, CXM, AMP, CXA	+
13	PA_16	Balgam	SXT, FOX, CXM, AMP	-
14	PA_17	Balgam	FOX, CXM, AMP, CXA, AMC	-
15	PA_18	Kan	IPM, CIP, TZP	+
16	PA_19	Yara	FOX, CXM, AMP, CXA	+
17	PA_20	Kan	CAZ, CN, AMP	+
18	PA_21	Kan	CIP, CT, SXT,	+
19	PA_22	Kan	SXT, FOX, TZP	+
20	PA_23	Kan	FOX, CXA, AMC	+

### 3.5 Bakteriyofajın Saflaştırılması ve Titrelerinin Arttırılması

Çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmaya karar verilen PA/EMEL\_001 fajı bakteriyofaj stokundan seri dilüsyonlar yapılarak çift tabaka agar yöntemi ile plak oluşturulmuştur. Agarlar üzerinde oluşan plaklar incelendiğinde her bir plak yapısının diğerlerinden farklı olduğu belirlenmiştir. Gözlem sonucunda, izolasyon sonucu elde edilen bakteriyofaj stoku içerisinde *P. aeruginosa* suşuna spesifik birden fazla ve farklı karakterlerde bakteriyofajların varlığı belirlenmiştir. Oluşan farklı plaklardan en

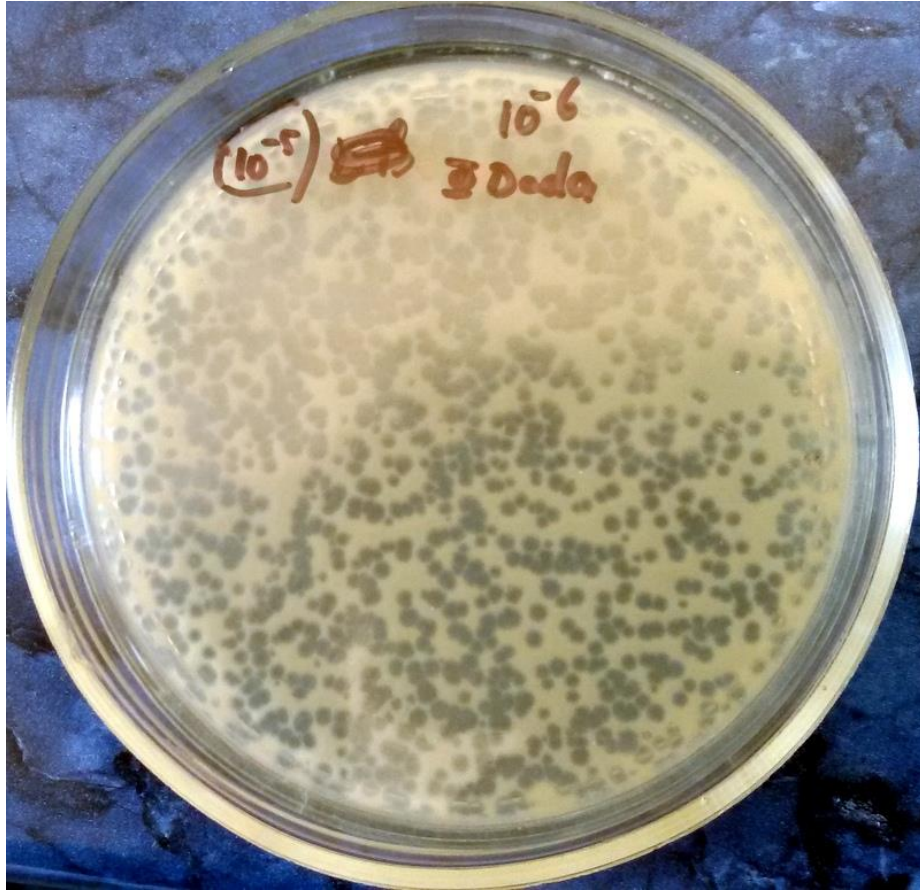
saydam ve büyük çapa sahip olan bakteriyofaj plakı steril pipet ucu ile bulunduğu agar yüzeyinden alınarak steril sıvı besi yeri içerisine aktarılmıştır. Bu şekilde yapılan sıralı işlemler sonucunda ilk izolasyon stokundan pürifiye olmuş (saflaştırılmış) bakteriyofaj elde edilmiştir. Her bir kesme işleminden sonra elde edilen fajlardan oluşan plaklar bir önceki gün elde edilen plaklarla karşılaştırılarak bakteriyofajların saflaştığı gözle görülerek teyit edilmiştir.

Saflaştırma sonrasında elde edilen bakteriyofaj stokunun titresinin  $10^3$  olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın diğer kısımlarında kullanılmak üzere bakteriyofaj titresi artırılmıştır. Bakteriyofaj titresinin artırılması çalışmasında yapılan seri dilüsyonlardan elde edilen bakteriyofaj stokları çift tabaka agar yöntemi ile LB agarlar üzerine yayılmıştır. Akabinde, elde edilen plaklardan sayılabilir ve birbirine geçmemiş durumda olan agarlar seçilmiştir (Resim 3.4). Sonrasında, üzerine 3 ml LB broth eklenerek LB yumuşak agar tabakası hücre kazıyıcı yardımı ile kazınmış ve steril bir tüpe aktarılmıştır. Tüpler santrifüj edilerek süpernatant kısım  $0,45 \mu\text{m}$  gözenek çaplı membran filtreden (Milipore, Almanya) geçirilmiştir. Sonraki günlerde aynı işlem tekrarlanarak bakteriyofaj titresi artırımı sağlanmıştır. Bu çalışma 6 gün sürmüştür. Altıncı günün sonunda elde edilen bakteriyofaj stokunun  $10^{12}$  olduğu seri dilüsyonla belirlenmiştir (Tablo 3.3). Resim 3.4’de bakteriyofajların titre edilmesi (sayımından) neticesinde elde edilen plak örneği verilmiştir.

Tablo 3.3 PA/EMEL\_001 Bakteriyofajının Titresinin Belirlenmesi

Dilüsyon	1. Hesaplama	2. Hesaplama	3 Hesaplama
<b><math>10^{12}</math></b>	$2 \times 10^{12}$ pfu/ml	$1 \times 10^{12}$ pfu/ml	$1 \times 10^{12}$ pfu/ml
<b><math>10^{11}</math></b>	$29 \times 10^{11}$ pfu/ml	$17 \times 10^{11}$ pfu/ml	$13 \times 10^{11}$ pfu/ml
<b><math>10^{10}</math></b>	$288 \times 10^{10}$ pfu/ml	$166 \times 10^{10}$ pfu/ml	$112 \times 10^{10}$ pfu/ml
Ortalama	$2,6 \times 10^{12}$ pfu/ml	$1,5 \times 10^{12}$ pfu/ml	$1,1 \times 10^{12}$ pfu/ml
Genel Ortalama	<b><math>1,7 \times 10^{12}</math> pfu/ml</b>		





Resim 3.4 Bakteriyofaj Titresinin Arttırılmasında Kullanılan LB Agar Örneği

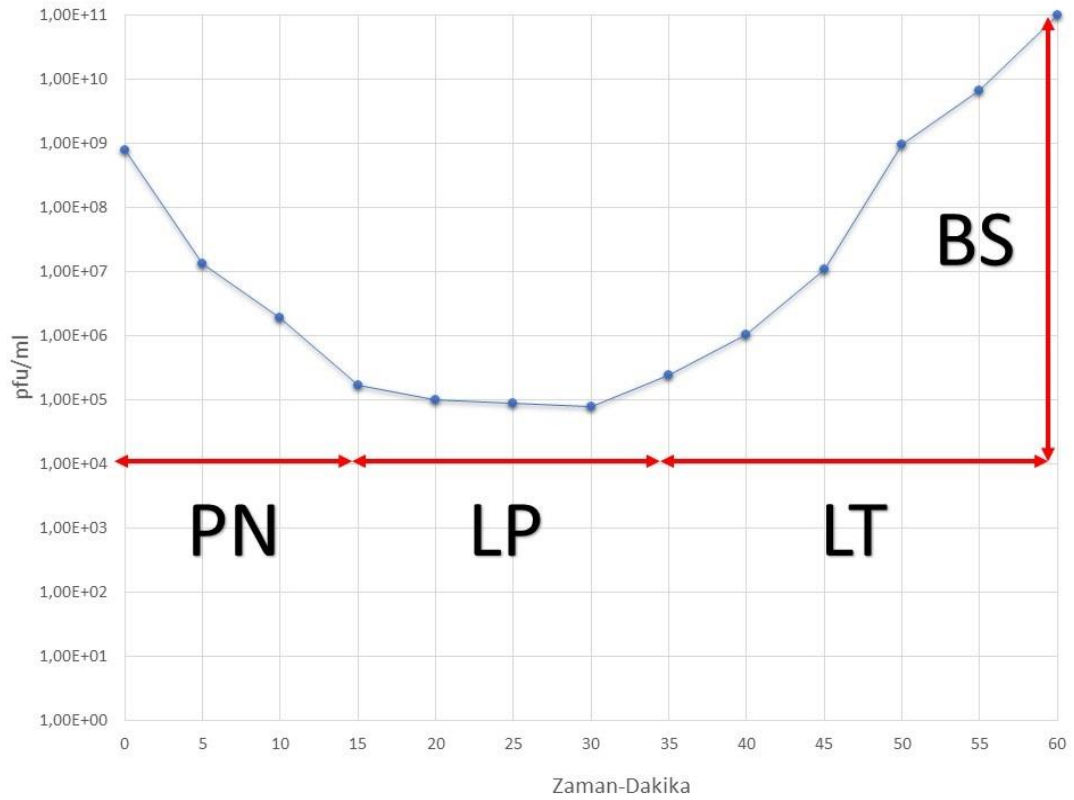
### 3.6 Bakteriyofaj Dinamiklerinin Belirlenmesi

Bakteriyofaj PA/EMEL\_001 saflaştırılıp titreleri arttırıldıktan sonra konak hücre üzerindeki dinamikler hesaplanmıştır. Bu basamakta kullanılan PA\_05 bakteri kültürü içerisinde bulunan bakteri miktarı yapılan hesaplamalar sonucunda kültürde  $\sim 4,7 \times 10^8$  cfu/ml bakteri olduğu saptanmıştır (Tablo 3.4). Akabinde bir önceki basamakta titresi  $10^{12}$  pfu/ml olan bakteriyofaj solüsyonu dört kez seri dilüsyon işlemine tabi tutularak titresi  $10^8$  pfu/ml'e düşürülmüştür. Protokole uygun bir şekilde gerçekleştirilen deneyler sonucunda adsorbsiyon süresinin “adsorbition time” 15 dak, latent sürenin “latent periyot” 20 dak, liziz süresinin “burst time” 25 dak olduğu belirlenmiştir. Aynı deneyler sonucunda PA/EMEL\_001 fajının ilk 10 dak içerisinde  $\sim 99\%$ 'unun hedef konak hücreye adsorbe olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Buna bağlı olarak

adsorbsiyon oranının “adsorbition rate – MOI (Multiplicity of Infection) Value” 1,68 olduğu, liziz büyüklüğünün “burst size” her enfekte olan bakteri hücresi için 124 olduğu belirlenmiştir. Yapılan tüm deneyler 3 kez tekrarlanarak kontrol edilmiştir.

Tablo 3.4 Bakterilerin Sayılması

Dilüsyon	1. Hesaplama	2. Hesaplama	3 Hesaplama
<b>10<sup>8</sup></b>	5 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml	8 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml	3 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml
<b>10<sup>7</sup></b>	45 x 10 <sup>7</sup> cfu/ml	68 x 10 <sup>7</sup> cfu/ml	22 x 10 <sup>7</sup> cfu/ml
<b>10<sup>6</sup></b>	413 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	522 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml	316 x 10 <sup>6</sup> cfu/ml
<b>Ortalama</b>	4,5 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml	6,7 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml	2,8 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml
<b>Genel Ortalama</b>	<b>~4,7 x 10<sup>8</sup> cfu/ml</b>		



Şekil 3.1 Tek Basamaklı Büyüme Eğrisi

(PN: Penetrasyon, LP: Latent Periyot, LT: Liziz Süresi, BS: Liziz Büyüklüğü)

#### 4. BÖLÜM: TARTIŞMA

Antibiyotik dirençli bakteriler her yıl giderek artan bir problem haline gelmekte ve hem ülke ekonomisi açısından maddi bir külfete neden olmakta hem de hastaların tedavi süreci gün geçtikçe uzamaktadır. Antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin sebep olduğu en büyük problemlerin başında hastane enfeksiyonları gelmektedir. Bu enfeksiyonlara sebep olan bakterilerden en önemlilerinden bir tanesi *Pseudomonas aeruginosa* olduğu bildirilmektedir (Driscoll et al. 2007).

Yapılan araştırmalarda *P. aeruginosa*'nın olağanüstü bir direnç mekanizmasına sahip olduğu tanımlanmıştır (Strateva & Yordanov 2009). Hastane ortamından izole edilen birçok *Pseudomonas aeruginosa* suşunun colistin ve polymyxine karşı duyarlı olduğu saptanmıştır ve güncel raporlarda farklı antimikrobiallere de hızla direnç kazandığı hatta tedavi sırasında bile duyarlılık durumunun değişebildiği bildirilmektedir (Bonomo & Szabo 2006; Falagas et al. 2006; Zavascki et al. 2010). Bir araştırmada, *P. aeruginosa* suşları üzerine yapılan testlerde 16 farklı antibiyotiğe karşı direnç gösterebildiği rapor edilmiştir (Deredjian et al. 2011; Gomes et al. 2011).

Dünya geneli *Pseudomonas* spp. antibiyotik direnç oranları Piperacilin/tazobaktam %5-86, Meropenem %10-37, Gentamicin %12-70, İmipenem %5-44, Ceftazidime %9-84, Ciprofloaxine %11-73, Amikacin %5-93, Cefotaxim %50 olarak bildirilmiştir. Bu durum Türkiye'de ise Amikacin %2-34, Ceftazidime %15-62, İmipenem %3-65, Meropenem %3-69, Ciprofloaxine %7-57, Gentamicin %14-65, Piperacilin/ tazobaktam %11-74 olarak rapor edilmiştir (Güney ve ark. 2011). Çalışmamızda kullanılan *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç profilleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

da Silva Filho et al. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada *algD* genini kodlayan VIC 1 ve VIC 2 primerleri kullanılarak 182 adet *P. aeruginosa* suşundan izole edilen DNA örnekleri üzerinde PZR işlemi gerçekleştirilmiş ve tamamında pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu primerlerin %100 *P. aeruginosa* spesifik oldukları ve 520 bp molekül ağırlığında bir DNA fragmenti ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda da kullanılan suşların tamamı bu primerler ve protokol kullanılarak PZR ile teyit edilmiş olup literatüre uygun bulgular elde edilmiştir.



Bakteriyofaj terapisi, antibiyotik tedavisi ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir. Örneğin, antibakteriyel ajanlara karşı direnç gösteren bakterilere karşı etkindirler; hedef bakteriye özgün oldukları için normal mikroflorayı etkilemezler (Kutateladze & Adamia 2010). Bakteriyofajlar hızlı bir şekilde mutasyona (süper faj) uğradıklarından dolayı ortaya çıkan bakteriyofaj-dirençli mutant bakterilere karşı kısa sürede etki gösterirler; yeni antibiyotik geliştirme stratejileri ile karşılaştırıldıklarında daha ucuza mal olmaktadır. Faj ya da faj kokteyllerinin ökaryotik hücreleri enfekte edemiyor olmasından dolayı yan etkilerinin çok az olması en büyük avantajlarından birisidir. Bununla beraber faj terapisinin, uygulanan faj ya da faj kokteyllerinin nötralizan antikorlarla inaktive edilmesi ve bunlara karşı alerjik reaksiyonların gelişmesi, fajlara karşı dirençli mutanların ortaya çıkması ve bakteri toksin genlerinin fajlar tarafından alınması ya da bir başka bakteriye transfer edilmesi gibi dezavantajları da söz konusudur (Matsuzaki et al. 2005). Fakat uygun önlemler alınarak güvenli ve kontrollü bir şekilde uygulandığında fajlara ait bu problemler elimine edilebilmektedir (Matsuzaki et al. 2005; Skurnik & Strauch 2006). Bakteriyofajların yalnız başlarına ya da antibiyotiklerle birlikte terapatik amaçlarla kullanımları, bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavi ve profliaksisinde önemli bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır (Skurnik & Strauch 2006).

Literatürde faj tedavisi ile ilgili yeterli olmasa da çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Faj tedavisi ile ilgili çalışmaların önemli bir kısmı deney hayvanlarında gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanı modellerinde yüzeysel ve sistemik enfeksiyonların faj tedavisi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yüzeysel yara enfeksiyonları ile ilgili çalışmalarda, Soothill (1994) kobaylarda *P. aeruginosa* ile enfekte ettiği deri graflarının hiç birisinin tutmadığını, ancak  $10^6$  pfu/ml faj uyguladığı grafların 7'sinden 6'sının başarıyla yerleştiğini bildirmiştir.

McVay et al. (2007), yanık modelinde letal dozda *P.aeruginosa* verilen farelere periton içi yolla faj kokteyli uyguladıklarında mortalitenin %87 azaldığını bildirmişlerdir. Watanabe et al. (2007) , barsak kökenli fare sepsis modelinde oral faj uygulamasının hayvanların %66,7'sinde *P.aeruginosa*'ya karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir. Marza et al. (2006) antibiyotik dirençli *P. aeruginosa*'dan ileri gelen otitis eksternayı faj tedavisi ile sonlandırdığını bildirmiştir.

*P. aeruginosa* dışında diğer önemli bakteriyel ajanlarla da önemli faj tedavi çalışmaları yapılmıştır. Wills et al. (2005) tavşanlarda, Capparelli et al. (2007) farelerde bakteriyofaj uygulamasının *Staphylococcus aureus* apselerinin boyutunu küçülttüğünü ve bakteri sayısını azalttığını bildirmişlerdir. Capparelli et al. (2007), farelerde letal dozda *S. aureus* enfeksiyonunun  $10^9$  pfu/ml fajla önlendiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, damar içi yolla düşük dozda *S. aureus* ile enfeksiyon oluşturulduğunda, nonspesifik savunmanın bakteriyi gideremediğini, inokulasyondan 10 gün sonra verilen tek doz fajın bakteriyi temizlediğini belirtmişlerdir.

Takemura-Uchiyama et al. (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada hastane ortamından izole edilmiş *S. aureus* suşları ile fareler üzerinde oluşturulan üst solunum yolu enfeksiyonunun bakteriyofaj tedavisi ile enfeksiyonun etkisinin azaltıldığını bildirmiştir. Buna karşın Gill et al. (2006) fajların subklinik mastitli ineklerde *S. aureus* eradikasyonunda önemli bir etkisinin olmadığını bildirmişler ve bunu sütün özel yapısından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Klasik bakteriyofaj tedavileri dışındaki yaklaşımlarda, indüklenerek virulent hale getirilen lizojenik fajın farelerde *S. aureus* tedavisinde kullanılmasının mümkün olduğu gösterilmiştir (Matsuzaki et al. 2003). Yongsheng et al. (2008), sitosan-alginat sistemi ile enkapsüle ettikleri faj partiküllerinin, ömrünün uzadığını, sindirim enzimlerine daha dayanıklı ve oral kullanıma daha uygun hale geldiğini belirlemişlerdir.

Biswas et al. (2002), farelerde periton içi faj uygulamasının, vankomisin dirençli *Enterococcus faecium*'dan ileri gelen ölümleri önlediğini bildirmişler ve dozun önemli olduğunu belirtmişlerdir. Soothill (1992), deneysel fare enfeksiyonlarında, 100 faj partikülünün  $10^8$  pfu/ml dozda *Acinetobacter*'e karşı koruma sağladığını bildirmiştir. Cerveny et al. (2002), fare deneysel sistemik ve lokal *Vibrio vulnificus* enfeksiyonlarında fajların teropatik potansiyeli olduğunu belirlemişlerdir. Golshahi et al. (2008) inhalasyon simulasyonu ile yaptıkları çalışmada aerosol yolla faj uygulamasının kistik fibroz hastalarında *Burkholderia*'ya karşı tedavi potansiyeli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Raya et al. (2006) *Escherichia coli* O157 kolonizasyonuna dirençli bir koyundan izole ettikleri bir fajın bakteri sayısını azalttığını bildirmişlerdir. Ho & Waldor (2007), *E. coli* O157 mutantlarının faja duyarlı olduklarını, bu yüzden ruminantları kolonize

edemediklerini belirlemişlerdir. O'Flynn et al. (2004), *E. coli* O157'ye karşı hazırladıkları faj kokteylinin bakteri sayısını 1 saatte  $5 \cdot 10^{10}$  azalttığını ve kontamine et yüzeylerindeki bakteriyi tamamen sildiğini bildirmişlerdir. Sheng et al. (2006), sığırlarda *E. coli* O157 taşıyıcılığını kontrol altında tutmak için rektal ve oral yolla faj uygulamışlar ve bakteri sayısında önemli azalmalar rapor edilmiştir.

Kudva et al. (1999) sığır dışkılarından sadece *E. coli* O157'ye spesifik fajlar elde etmişler ve bunların enfeksiyonun biyokontrolü için kullanabileceğini bildirmişlerdir. Mukozal uygulamalarda, Smith & Huggins (1983) buzağılarda enteropatojenik bir *E. coli* (EPEC) suşu tarafından oluşturulan şiddetli ishalin tek doz bakteriyofaj ile tedavi edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, faj ile kontamine altlıkta beslenen sığırları da ishalden korunduğu bildirilmiştir.

Smith & Huggins (1982), insan ve hayvanlarda sistemik enfeksiyona neden olan *E. coli* O108 suşunun tedavisinde bakteriyofajın antibiyotikten daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada, intraserebral yolla *E. coli* verilen farelere kas içi yolla her bir gruba ayrı ayrı faj veya antibiyotik (streptomisin, tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol ve bactrim) uygulanmış, antibiyotik grubunda 26/28 ölüm görülürken, faj grubunda bu oranı 13/28 olarak bildirmişlerdir.

İnsanlarda bakteriyofajlarla yapılmış klinik çalışmalar bu yöntemin etkinliği ve biyogüvenliği hakkında bilgi vermektedir. Markoishvili et al. (2002) çözünebilir bir film tabakasına emdirilmiş fajların 96 hastadaki diğer yöntemlerle kapanmayan deri ülserlerinin %70'ini iyileştirdiğini bildirmiştir. Paisano et al. (2004), *E. faecalis* ile enfekte ettikleri insan diş kanallarında fajın bakteri sayısını azalttığını bildirmişlerdir.

İnsanlarda nispeten yakın tarihte en ilginç faj terapi çalışması Gürcistan'da yapılmıştır. Toplam 30769 çocukla yapılan bu çalışmada, caddelerin bir tarafında oturan çocuklara haftada bir kez tablet formunda *Shigella* fajı, diğer tarafında oturanlara plasebo verilmiştir. 109 gün izleme süresi boyunca faj alan çocuklarda 1.8/1000 dizanteri vakası görülürken, plasebo grubunda bu oran 6.7/1000 olmuştur (Brüssow 2005). Polonya'da antibiyotiklere dirençli vakaların da yer aldığı insan *E. coli* enfeksiyonlarında faj tedavisi ile %90 başarı sağlandığı bildirilmiştir (Slopek et al. 1983).

Çocuklarda bakteriyofaj kullanımı ile ilgili bir derlemede Fortuna et al. (2008) tarafından gerçekleştirilmiştir. Polonya ve Almanya'da çocukların ishal ve uriner

sistem enfeksiyonlarında faj tedavisinin başarıyla kullanıldığını, özellikle Polonya’da ayrıca osteomyelit, myosit, irinli yaralar, solunum sistemi enfeksiyonları, furunkuloz ve sepsiside %90 başarılı sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir. Aynı makalede, Amerika Birleşik Devletleri’nde faj tedavisinin sinüzit, stafilokokal dermatit ve üst solunum yolu enfeksiyonunda kullanıldığı bildirilmiştir.

Son yıllarda insanlarda bakteriyofaj tedavisinin oftalmolojide kullanımı üzerinde de durulmaktadır (Górski et al. 2009). Hindistan’da düzenli olarak görülen kolera salgınlarında hastalığın kendiliğinden azalmasında fajların rolü olduğu ileri sürülmüştür (Faruque et al. 2005).

Bakteriyofaj uygulamaları sadece hayvan veya insan materyalleri ile sınırlı kalmamıştır. Abuladze et al. (2008), fajların etkisini cam ve plastik gibi katı yüzeyler ve sebzeler üzerindeki *E. coli* O157’ye karşı denemişlerdir. Üç fajdan oluşan faj kokteyli 5 dakika içinde katı yüzeylerdeki bakteri sayısını %94-99 arasında, domates, ıspanak ve brokoli üzerindeki bakteri sayısını 4-24 saat içinde %94-100 arasında azalttığını bildirmişlerdir. Efrony et al. (2009), akvaryum mercanlarındaki bakteriyel beyaz veba hastalığının yayılışını faj tedavisi ile engellemişlerdir. Curtin & Donlan (2006), fajların kateter üzerinde *Staphylococcus epidermidis* kökenli biofilm oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir.

Fajların dalak tarafından süzülmesi sistemik uygulamada problem olduğu için farklı bir yol geliştirilmiştir (Merril et al. 1996). Bunun için faj periton içine verildikten 7-18 saat sonra kandan izole edilmiş, bu faj in vitro olarak çoğaltılmış ve bu fajlar fareye tekrar verildiğinde kanda bulunma süresinin uzadığı görülmüştür. Hayvan ve insanlarda yapılan çalışmaların çoğunda, bakteriyofaj gibi replike olan bir ajanın tedavideki başarısının başlangıç dozu ve replikasyon oranına bağlı olduğu görüşüne varılmıştır (Payne & Jansen 2000; Levin & Bull 2004). Hastane çalışanlarının faj içeren solüsyon ile ellerini yıkadıklarında, fajsız solüsyona göre ellerindeki stafilokok sayısının 100 kat daha az olduğu ortaya konulmuştur (O’Flaherty et al. 2005).

Bakteriyofajların makrofajlar içinde de etkili olabileceğini ve bunun için Truva atı yaklaşımının kullanılabileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar, *Mycobacterium avium* ve *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte makrofajlara, bu türler için virulent fajı apatojen bir tür olan *Mycobacterium smegmatis* içinde soktuklarında, intraselüler patojen sayılarında azalma belirlemişlerdir. Bakteriyofajlar ilaçları hedefe

yönlendirmek için bir taşıyıcı olarak da kullanılmıştır. Bu yaklaşımın ilginç bir örneği filamentöz faja kloramfenikol aracılığıyla 3 neomisin molekülü bağlanması ve fajın konjuge antikor vasıtasıyla hedef bakteriye yönlendirilmesidir. Bu konjuge faj *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* ve *E. coli* 'ye karşı kullanıldığında, ilacın kendisinden 20.000 kat daha yüksek potansiyele sahip olduğu bulunmuştur (Broxmeyer et al. 2002).

Bakteriyofaj yerine, bunların özellikle litik enzimlerini kullanarak yapılan tedaviler de son zamanlarda yeni bir ilgi alanı olmuştur. Bu tedavilerin bazılarında bakteriyofaj tedavisi kadar başarılı sonuçlar alınmıştır. Entenza et al. (2005), ratların deneysel endokardit modelinde faj litik enziminin *Streptococcus pneumoniae*'yi 30 dak içinde kandan temizlediğini bildirmişlerdir. Obeso et al. (2008), rekombinant stafilkokal faj endolizininin, sütteki *S. aureus*'u 4 saat içinde tamamen ortadan kaldırdığını belirlemişlerdir. Mushtaq et al. (2005), bakteriyofaj ürünü rekombinant kapsül depolimeraz enzimi uygulayarak deneysel *E. coli* enfeksiyonunu tedavi ettiklerini bildirmişlerdir. Grandgirard et al. (2008), faj litik enziminin deneysel pnömokokal menenjitli ratlarda serebrospinal sıvıda bulunan *S. pneumonia* sayısını önemli düzeyde azalttığını belirlemişlerdir.

Bakteriyofajların biyogüvenliği ile ilgili bir derlemede, faj tedavisinin immün sistemi baskılanmış hastalarda güvenli olduğunu bildirmişlerdir. Bruttin et al. (2005), içme suyu ile *E. coli* T4 fajı verdikleri gönüllülerde, klinik bir yan etki görülmediğini, serum fizyolojik değerlerinin değişmediğini ve serumlarda faja ve faja karşı oluşmuş antikorlara rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Sistemik faj tedavisinde, parçalanmış bakteriden salınan endotoksin en önemli yan etki olarak gösterilmektedir. Hagens et al. (2004), bu sorunu çözmek için eksport protein geni yerine restriksiyon endonükleaz yerleştirerek rekombinant faj elde etmişlerdir. Rekombinant faj *P. aeruginosa*'da çoğalamamasına ve parçalayamamasına karşın, bakteri DNA'sını sindirerek öldürmüştür.

Merabishvili et al. (2014) tarafından yapılan çalışmada *Acinetobacter baumani* suşuna spesifik izole edilmiş olan Acibel004 ve Acibel007 bakteriyofajlarının tedavi amaçlı kullanılabilirliklerini bildirmiştir. İzole edilen fajlardan Acibel004'ün ilk 10 dakikada %85'inin adsorbe olduğu, ikinci izole edilen Acibel007 fajının ise ilk 10 dakikada %95'inin adsorbe olduğu belirlenmiştir. Acibel004 fajı için latent periyodun

27 dak, liziz süresinin 35 dak ve liziz oranının her enfekte bakteri için 125 olduğu, Acibel007 fajı için ise latent periyotun 19 dak, liziz süresinin 31 dak ve liziz oranının her enfekte bakteri için 145 olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda yapılan deneyler sonucunda *P. aeruginosa* spesifik PA/EMEL\_001 bakteriyofajının ilk 10 dakikada %99'unun adsorbe olduğu ve bu faj için latent periyotun 20 dak, liziz süresinin 25 dak ve liziz oranının her enfekte bakteri için 124 olduğu saptanmıştır. PA/EMEL\_001 fajı bu bakteriyofajla karşılaştırıldığında söz konusu bakteriyofaj kadar etkin olduğu ve teropatik amaçlarla kullanma potansiyelinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Akturk et al. (2014), Gürcistan George Eliava Enstitüsü tarafından ticari olarak üretilen ve *P. aeruginosa*'ya karşı spesifik faj içeren PYO ve INTESTI faj kokteyllerinin, çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* suşları üzerinde litik aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Toplam 15 adet *P. aeruginosa* bakteri suşunun kullanıldığı çalışmada PYO faj kokteylinin 12 (%80), INTESTI faj kokteylinin 13 (%86) bakteri suşu üzerinde litik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmamızda izole edilen PA/EMEL\_001 bakteriyofajının ise 20 *P. aeruginosa* bakteri suşundan 14'üne (%70) karşı litik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, PA/EMEL\_001 fajının tek başına ticari olarak mevcut faj kokteylleri kadar etkin olduğu görülmektedir. Görüldüğü üzere PA/EMEL\_001 fajının adsorbsiyon süresi ve oranının literatürde bulunan teropatik amaçla izole edilmiş ve preparatları hazırlanmış diğer bakteriyofajlara göre daha hızlı ve yüksek olması, tedavi amacıyla kullanılacak fajlarda aranan hızlılık ve yüksek adsorbsiyon oranı kriterlerini taşımaktadır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına spesifik litik bakteriyofaj izolasyonu, izole edilen faj izolatlarının saflaştırılması, çoklu antibiyotik dirençli klinik *P. aeruginosa* suşları üzerindeki litik aktiviteleri ve dinamikleri belirlenmiştir.

Araştırma bulgularımız litik aktivitesi yüksek olan *Pseudomonas aeruginosa* EMEL\_001 (PA/EMEL\_001) fajının *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlarda tedavi amaçlı kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu sonucunu doğrulamaktadır. Ancak bu bakteriyofajın kullanım aşamasına gelebilmesi için tüm genom dizi analizinin yapılması, olası toksisite ile ilişkili gen bölgelerinin var olup olmadığının tespit edilmesi ve bu bakteriyofajın teropatik etkinliklerinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Akabinde hayvan deneyleri ve insan deneylerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca yüksek litik aktiviteye sahip yeni bakteriyofajlar izole ederek oluşturulabilecek kokteyller ile daha fazla bakteri suşunu enfekte etmek mümkün olacaktır. Bu çalışma kapsamında yapılan analizler sonucunda izole edilen PA/EMEL\_001 fajının tedavi amaçlı kullanılabilme potansiyeli için temel çalışma mahiyetinde olup gelecekte yapılacak kapsamlı çalışmalara yol gösterici mahiyettedir.

Bakteriyofajlar, teropatik amaçla kullanımın dışında dekontaminasyon ve biyogüvenlik gibi çok farklı alanlarda kullanılabilmektedir. Özellikle gıdalarda ciddi problemlere neden olan önemli patojen bakterilere karşı izole edilebilecek yeni bakteriyofajlar ülke ekonomisi ve teknolojisine ciddi katkılar sağlayacaktır.

Bu çalışmadan elde edilen bilimsel veriler ile ülkemizde özellikle çoklu antibiyotik dirençli patojenik bakterilere karşı bakteriyofaj-temelli tedavi uygulamalarını başlatılması ve ülkemizin uluslararası düzeyde rekabet edebilirliğini arttırmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar topluca aşağıda verilmiştir.

- Toplamda 19 adet klinik *P. aeruginosa* suşunun antibiyotik direnç profilleri Tablo 3.1’de detaylarıyla gösterilmiştir.
- Birincil tanımlamaları yapılan *P. aeruginosa* bakteri suşları PZR yöntemi ile teyit edilmiştir.

- Bu çalışmada, çoklu antibiyotik dirençli klinik *P. aeruginosa* suşlarına spesifik 12 farklı atık su rneği incelenerek toplamda 6 adet bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan testler sonucunda aktivitesi en yüksek olan bakteriyofaj belirlenmiş ve PA/EMEL\_001 olarak adlandırılmıştır.
- İzole edilen bakteriyofaj çeşitli işlemlere tabi tutularak saflaştırılmış ve bakteriyofaj dinamikleri belirlenmiştir. PA/EMEL\_001 faj ilk 10 dak içerisinde %99'unun adsorbe olduğu, 20 dakikalık bir latent periyot sonunda lizisin başladığı ve liziz büyüklüğünün her enfekte bakteri için ~124 olduğu belirlenmiştir.
- PA/EMEL\_001 fajının *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tek başına ya da faj kokteylleri içerisinde kullanılma potansiyeli olduğu belirlenmiştir.



## ÖZET

Antibiyotiklerin, enfeksiyon etkeni fırsatçı patojenlere karşı hala potansiyel tedavi yöntemi olduğu günümüzde, bilinçsiz ve sıklıkla antibiyotik kullanımı sonucunda önlenemez bir hızla antibiyotik direncinin arttığı hakkında raporlar her geçen gün artmaktadır. Gelişen antibiyotik dirençliliği, özellikle de çoklu dirençlilik, yeni antibiyotiklerin devreye girmesini zorunlu hale getirmiştir. Ancak antibiyotik araştırmaları ve keşif hızı son yıllarda çok yavaşlamış ve günümüzde de araştırma aşamasında birkaç yeni antibiyotik bulunmaktadır. Bu durum Dünya Sağlık Teşkilatı tarafından da dile getirildiği gibi, antibiyotikler dışında yeni tedavi stratejileri geliştirmeyi ve kullanmayı zorunlu hale getirmiştir.

Bu çalışma kapsamında; kistik fibrosis kaynaklı yüksek ölümlere, kronik solunum yolu, yanık ve yara gibi enfeksiyonlara neden olan çoklu antibiyotik dirençli *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşlarına spesifik, antibiyotiklere alternatif bir antibakteriyel ajan olan, bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Şifa Üniversitesi Hastaneleri Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları koleksiyonunda bulunan ve geçmişte hastalardan izole edilmiş çoklu antibiyotik dirençli 19 adet *Pseudomonas aeruginosa* izolatu çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen izolatlar PZR yöntemi ile identifiye edilmiştir. Toplamda 12 adet atık su örneği incelenerek 6 adet *P. aeruginosa* spesifik bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *P. aeruginosa* PA\_05 bakteri izolatu çalışmada konak hücre olarak kullanılmıştır. İzole edilen bakteriyofajların, plak assay yöntemi ile litik aktiviteleri belirlenmiş ve faj dinamikleri tanımlanmıştır.

Bulgulara göre, litik aktiviteleri incelenen bakteriyofajlar içinden PA/EMEL\_001 olarak adlandırılan bakteriyofajın en yüksek litik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. PA/EMEL\_001 bakteriyofajının adsorbsiyon süresinin 15 dak, latent süresinin 20 dak, lizis süresinin 25 dak olduğu ve ilk 10 dak içerisinde ~%99'unun hedef konak hücreye adsorbe olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, litik aktivitesi yüksek olan *Pseudomonas aeruginosa* EMEL\_001 (PA/EMEL\_001) fajının *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlarda tedavi amaçlı kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu ve gelecekte yapılacak kapsamlı çalışmalara yol gösterici mahiyette olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyofaj, *Pseudomonas aeruginosa*, litik aktivite, spot test, çift tabaka agar

## ABSTRACT

The number of reports have been in increase in an irrepressible speed due to the unconscious and frequent antibiotic usage while antibiotic constitutes still potential treatment method against the bacterial infections. The developed antibiotic resistance, especially the multidrug resistance, has caused the new antibiotics to enter into force. However, antibiotic researches and exploration speed has decelerated too much recently and there is a number of new antibiotics in the stage of research at the moment. This situation is also put into words by World Health Organization, it necessitates developing and using new treatment strategies out of antibiotics.

In the scope of this study, it was aimed to effectuate bacteriophage isolation, which is specific and alternative antibacterial agent against bacteria strains of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, causing infections such as chronical respiratory tract, burning and wound and death arising from cystic fibrosis.

Nineteen of multidrug resistant *P. aeruginosa* isolates, which were available in the collection Clinical Microbiology Laboratories of Sifa University Hospitals and had been isolated from the patients before, were selected in order to utilize in the study. The identify of selected isolates were confirmed by PCR. Totally, 12 waste water sample were examined and 6 bacteriophages isolation specific to *P. aeruginosa* were isolated. The lytic activities of the isolated bacteriophages were determined by plaque-assay method and their dynamics were defined.

According to the results, it was determined that the bacteriophage, called as PA/EMEL\_001, had the highest level of lytic activity among the bacteriophages isolated. It was determined that adsorption period of PA/EMEL\_001 bacteriophage was 15 minutes, latent period was 20 minutes, lysis period was 25 minutes and 99% of it was adsorbed into the target host within the first 10 minutes.

Consequently, based on the result of this study, *Pseudomonas aeruginosa* EMEL\_001 (PA/EMEL\_001) phage was found to have capability to be utilized for therapeutic purposes of the *P. aeruginosa* infections.

**Keywords:** Bacteriophage, *Pseudomonas aeruginosa*, lytic activity, spot test, plaque assay

## 6. REFERANSLAR

Abedon, S.T., 2008. *Bacteriophage Ecology* First Edit. S. T. Abedon, ed., Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Abedon, S.T., 2009. Phage evolution and ecology. *Advances in applied microbiology*, 67, pp.1–45.

Abuladze, T. et al., 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), pp.6230–6238.

Ackermann, H.W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), pp.227–243.

Adams, M.H., 1959. Bacteriophages. In *Bacteriophages*. p. 592.

Akturk, E. et al., 2014. Evaluation of lytic activity of PYO and INTESTI phage cocktails against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Turkey. *Bacteriophage 2015 Conference*.

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.

Anon, <http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap13/lecture3.htm>.

Arber, W. & Dussoix, D., 1962. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host-controlled modification of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.*, 5, pp.18–36.

Biswas, B. et al., 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*, 70(1), pp.204–210.

Bonomo, R.A. & Szabo, D., 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43 Suppl 2, pp.S49–S56.

Broxmeyer, L. et al., 2002. Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *The Journal of infectious diseases*, 186(8), pp.1155–60.

- 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.
- Brüssow, H., Canchaya, C. & Hardt, W., 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68(3), pp.560–602.
- Bush, K., MacIelag, M. & Weidner-Wells, M., 2004. Taking inventory: Antibacterial agents currently at or beyond Phase 1. *Current Opinion in Microbiology*, 7(5), pp.466–476.
- 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.
- Calendar, R.L., 2005. *The Bacteriophages* Second Edi. R. L. Calendar, ed., Oxford, USA: Oxford University Press.
- Campbell, A., 2007. Phage integration and chromosome structure. A personal history. *Annual review of genetics*, 41, pp.1–11.
- Canchaya, C. et al., 2003. Phage as agents of lateral gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 6, pp.417–424.
- Capparelli, R. et al., 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), pp.2765–2773.
- Cervený, K.E. et al., 2002. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infection and Immunity*, 70(11), pp.6251–6262.
- Ceysens, P., 2009. *Isolation And Characterization Of Lytic Bacteriophages Infecting Pseudomonas*. Katholieke Universiteit Leuven.
- Chastre, J. & Fagon, J.-Y., 2002. Ventilator-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165, pp.867–903.
- 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.

- Curtin, J.J. & Donlan, R.M., 2006. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(4), pp.1268–75.
- d’Herelle, F., 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Les Comptes rendus de l’Académie des sciences*, 165, pp.373–5.
- Debarbieux, L. et al., 2010. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *The Journal of infectious diseases*, 201(7), pp.1096–104.
- Deredjian, A. et al., 2011. Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 162, pp.689–700.
- 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.
- Efrony, R., Atad, I. & Rosenberg, E., 2009. Phage therapy of coral white plague disease: Properties of phage BA3. *Current Microbiology*, 58(2), pp.139–145.
- 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.
- Falagas, M.E., Koletsi, P.K. & Bliziotis, I.A., 2006. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 55, pp.1619–1629.
- Faruque, S.M. et al., 2005. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: Role of host-mediated amplification of phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), pp.6119–24.
- 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.
- Gill, J.J. et al., 2006. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), pp.2912–2918.
- Golshahi, L. et al., 2008. Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, 21(4), pp.351–360.
- Gomes, M.Z.R. et al., 2011. Outbreaks, persistence, and high mortality rates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in a hospital with AIDS-predominant admissions. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15, pp.312–322.

- Górski, A. et al., 2009. The potential of phage therapy in bacterial infections of the eye. *Ophthalmologica*, 223(3), pp.162–165.
- Grandgirard, D. et al., 2008. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *The Journal of infectious diseases*, 197(11), pp.1519–1522.
- Guttman, B. et al., 2005. *Basic Phage Biology. Bacteriophages: Biology and Applications* E. Kutter & A. Sulakvelidze, eds., F: CRC PRESS.
- Hagens, S. et al., 2004. Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), pp.3817–3822.
- Hardalo, C. & Edberg, S.C., 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Critical reviews in microbiology*, 23, pp.47–75.
- Hertveldt, K. & Lavigne, R., 2008. Bacteriophages of *Pseudomonas*. In *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. pp. 255–291.
- Ho, T.D. & Waldor, M.K., 2007. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 gal mutants are sensitive to bacteriophage P1 and defective in intestinal colonization. *Infection and Immunity*, 75(4), pp.1661–1666.
- Krylov, V.N., 2001. Phage Therapy in Terms of Bacteriophage Genetics: Hopes, Prospects, Safety, Limitations. *Russian Journal of Genetics*, 37(7), pp.715–730.
- Kudva, I.T. et al., 1999. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), pp.3767–3773.
- Kutateladze, M. & Adamia, R., 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in biotechnology*, 28(12), pp.591–5.
- Kutter, E. & Sulakvelidze, A., 2004. *Bacteriophages: Biology and Applications* First Edit. E. Kutter & A. Sulakvelidze, eds., Florida, USA: CRC Press.
- 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.
- Leiman, P.G. et al., 2004. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell*, 118(4), pp.419–429.
- Levin, B.R. & Bull, J.J., 2004. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), pp.166–173.

- Liu, X. et al., 2007. Cyanophage Pf-WMP4, a T7-like phage infecting the freshwater cyanobacterium *Phormidium foveolarum*: Complete genome sequence and DNA translocation. *Virology*, 366, pp.28–39.
- Livermore, D.M., 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34, pp.634–640.
- Livermore, D.M., 2004. The need for new antibiotics. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10 Suppl 4, pp.1–9.
- Loeffler, J.M., Nelson, D. & Fischetti, V.A., 2001. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science (New York, N.Y.)*, 294, pp.2170–2172.
- 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.
- Marza, J.A.S. et al., 2006. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns*, 32(5), pp.644–646.
- Mathur, P. et al., 2008. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 26, p.233.
- 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.
- 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, pp.608–612.
- McVay, C.S., Velásquez, M. & Fralick, J. a., 2007. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), pp.1934–8.
- Merabishvili, M. et al., 2014. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, 9(8), p.e104853.



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.

Merril, C.R. et al., 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(8), pp.3188–3192.

Miedzybrodzki, R. et al., 2007. Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 61, pp.461–465.

Molineux, I.J., 2001. No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Molecular Microbiology*, 40, pp.1–8.

Murray, P.R., 2013. *Medical Microbiology, Seventh Editione* 7th Editio. M. R. Patrick, ed., Philadelphia, PA 19103-2899: Elsiwer Saunders.

Mushtaq, N. et al., 2005. Treatment of experimental *Escherichia coli* infection with recombinant bacteriophage-derived capsule depolymerase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), pp.160–165.

Mustafa Güney, O.B.A.K.A.C.B., 2011. The antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from blood cultures specimens in the Medical Microbiology Laboratory of Gulhane Military Medical Academy. *Gulhane Medical Journal*, 53(2), pp.119–122.

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’Flynn, G. et al., 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), pp.3417–24.

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.

Paisano, A.F. et al., 2004. In vitro antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(5), pp.327–330.

Payne, R.J.H. & Jansen, V.A.A., 2000. Phage therapy: The peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 68(3), pp.225–230.

Phagoburn, 2013. Phagoburn. Available at: <http://www.phagoburn.eu/> [Accessed March 15, 2015].

- Powers, J.H., 2004. Antimicrobial drug development--the past, the present, and the future. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10 Suppl 4, pp.23–31.
- 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.
- Roos, W.H. et al., 2007. Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, pp.1484–1497.
- Sécher, I. et al., 2005. Surgical wound infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in orthopedic surgery. *Medecine et maladies infectieuses*, 35, pp.149–154.
- Serwer, P. et al., 2008. Evidence for bacteriophage T7 tail extension during DNA injection. *BMC research notes*, 1, p.36.
- 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.
- Da Silva Filho, L. V et al., 1999. PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *Journal of medical microbiology*, 48(4), pp.357–61.
- Skurnik, M. & Strauch, E., 2006. Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(1), pp.5–14.
- Slopek, S. et al., 1983. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. II. Detailed evaluation of the results. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 31(3), pp.293–327.
- Smith, D.E. et al., 2001. The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, 413, pp.748–752.
- 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.
- Smith, H.W. & Huggins, M.B., 1982. Successful Treatment of Experimental *Escherichia coli* Infections in Mice Using Phage: its General Superiority over Antibiotics. *Microbiology*, 128(2), pp.307–318.
- Soothill, J.S., 1994. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 20(3), pp.209–211.

- Soothill, J.S., 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal of Medical Microbiology*, 37(4), pp.258–261.
- Strateva, T. & Yordanov, D., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58, pp.1133–1148.
- Sulakvelidze, A. & Morris, J.G., 2001. Bacteriophages as therapeutic agents. *Annals of medicine*, 33, pp.507–509.
- Summers, W.C., 2001. Bacteriophage therapy. *Annual review of microbiology*, 55, pp.437–51.
- Summers, W.C., 1999. *Felix d'Herelle and the origins of molecular biology*, New Haven, Connecticut: Yale University Press.
- 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.
- Teixeira, L.M. et al., 2011. Manual of Clinical Microbiology, 10th edition. In *Manual of Clinical Microbiology, 10th edition*. ASM Press, pp. 677–691.
- Troop, P., 2012. *The Regulation and Quality Improvement Authority Independent Review of Incidents of Pseudomonas aeruginosa Infection in Neonatal Units in Northern Ireland Final Report*, Northern Ireland.
- Twort, F.W., 1936. Further Investigations on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses and their Cultivation. *The Journal of hygiene*, 36, pp.204–235.
- Watanabe, R. et al., 2007. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(2), pp.446–452.
- 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.
- Wróblewska, M., 2006. Novel therapies of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. infections: the state of the art. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 54(2), pp.113–20.

Yongsheng, M. et al., 2008. Microencapsulation of bacteriophage felix o1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), pp.4799–4805.

Zavascki, A.P. et al., 2010. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert review of anti-infective therapy*, 8, pp.71–93.

## ÖZGEÇMİŞ

Ergün AKTÜRK 1988 yılında Konya’da doğmuştur. İlk ve ortaokulu İstanbul’da tamamladıktan sonra 2006 yılında kazandığı Fatih Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji (İng.) Bölümünden 2011 yılında mezun olarak profesyonel yaşantısına başlamıştır. 2014 yılında Şifa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Şifa Üniversitesi’nde iş hayatına devam etmektedir.