



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ ACİNETOBACTER
BAUMANNİİ SUŞLARINA ÖZGÜ LİTİK
BAKTERİYOFAJLARIN ELDE EDİLMESİ VE
TEDAVİDE KULLANIM POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hilal Başak EROL

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ALTANLAR

ANKARA

2021

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ ACİNETOBACTER
BAUMANNİİ SUŞLARINA ÖZGÜ LİTİK
BAKTERİYOFAJLARIN ELDE EDİLMESİ VE
TEDAVİDE KULLANIM POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hilal Başak EROL

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

**Prof. Dr. Nurten ALTANLAR
Prof.Dr. Sulhiye YILDIZ (İkinci Danışman)
Doç.Dr. Banu KAŞKATEPE (İkinci Danışman)**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
18L0237009 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2021**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Acinetobacter baumannii* Suşlarına Özgü Litik Bakteriyofajların Elde Edilmesi ve Tedavide Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Hilal Başak EROL

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında

Hilal Başak EROL tarafından hazırlanan

“Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Acinetobacter baumannii* Suşlarına Özgü Litik Bakteriyofajların Elde Edilmesi ve Tedavide Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/04/2021

Prof.Dr. Nurten ALTANLAR

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Berrin ÖZÇELİK

Gazi Üniversitesi

Prof.Dr. Nilgün ÜNAL

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Doç.Dr. Müjde ERYILMAZ

Ankara Üniversitesi

Dr.Öğr. Üyesi Evren Doruk ENGİN

Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii

1. GİRİŞ	1
1.1. Acinetobacter Türlerinin Tarihçe ve Taksonomisi	2
1.1.1. Mikrobiyolojik Özellikler	3
1.1.2. Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	4
1.1.3. Patojenez ve Virülans Faktörleri	6
1.1.3.1. Porinler	6
1.1.3.2. Kapsüler Polisakkarit ve Lipopolisakkaritler	7
1.1.3.3. Fosfolipazlar	8
1.1.3.4. Sekresyon Sistemleri	8
1.1.3.5. Metal Alım Sistemi	10
1.1.3.6. Biyofilm Oluşturma ve Çoğunluğu Algılama (Quorum Sensing)	11
1.1.3.7. Penisilin Bağlayan Proteinler	13
1.1.4. <i>A. baumannii</i> 'nin Oluşturduğu Enfeksiyonlar	13
1.1.4.1. Solunum Yolu Enfeksiyonları	14
1.1.4.2. Kan Dolaşımı Enfeksiyonları	14
1.1.4.3. Deri, Yumuşak Doku ve Kemik Enfeksiyonları	15
1.1.4.4. İdrar Yolu Enfeksiyonları	16
1.1.4.5. Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonları	16
1.1.5. Tedavi ve Direnç	17
1.2. Bakteriyofajlar	20
1.2.1. Bakteriyofajların Keşfi	20
1.2.2. Bakteriyofaj Biyolojisi	21
1.2.3. Bakteriyofajların Yapısal Özellikleri	22
1.2.4. Bakteriyofajların Sınıflandırılması	23
	iv

1.2.5. Bakteriyofajların Çoğalma ve Replikasyonu	24
1.2.6. Bakteriyofajların Kullanım Alanları	25
1.2.7. Bakteriyofaj Terapisi	28
1.3. Bakteriyofajların Biyofilm Üzerine Etkisi	31
2. GEREÇ VE YÖNTEM	34
2.1. Gereç	35
2.1.1. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Temini	35
2.1.2. Bakteriyofaj İzolasyon Kaynakları	35
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri	36
2.1.4. Kullanılan Boya, Çözelti ve Ayıraçlar	39
2.1.4.1. Boyalar	40
2.1.4.2. Çözeltiler	40
2.1.4.3. Ayıraçlar	43
2.1.5. Kullanılan Araç ve Gereçler	43
2.2. Yöntem	44
2.2.1. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Doğrulanması	44
2.2.1.1. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	44
2.2.2. Konak Bakterinin Zamana Bağlı Üreme Eğrisinin Oluşturulması	45
2.2.3. Bakteriyofaj İzolasyonu	45
2.2.3.1. Bakteriyofaj Varlığının Belirlenmesi	46
2.2.3.2. Tek Plak İzolasyonu	46
2.2.3.4. Bakteriyofaj Konsantrasyonunun Arttırılması	47
2.2.3.5. Bakteriyofajların Konak Aralıklarının Belirlenmesi	47
2.2.3.6. Bakteriyofajların Morfolojik Karakterizasyonu	47
2.2.3.7. Bakteriyofajların Saflaştırılması	48
2.2.3.8. Etkin MOI (İnfeksiyon Çokluğu) Tespiti	48
2.2.3.9. Bakteriyofajların Adsorbsiyon Oranlarının Belirlenmesi	49
2.2.3.10. Bakteriyofajların Üreme Karakterlerinin Ortaya Konması	49
2.2.3.11. Bakteriyofajların Ortam Şartlarına Dayanıklılıkları	50
2.2.3.12. Bakteriyofajların Protein Profilleri	50
2.2.3.13. Bakteriyofajların Tüm Genom Analizi	52
2.2.4. ERIC-PCR Yöntemi ile <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Klonal İlişkilerinin Tespiti	53
2.2.5. Kolistin Stok Solüsyonunun Hazırlanması	54

2.2.5.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	55
2.2.6. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Değerlendirilmesi	56
2.2.7. Bakteriyofajların <i>A. baumannii</i> Biyofilmleri Üzerine Etkisi	56
2.2.8. Bakteriyofaj ile Antibiyotiğin <i>A. baumannii</i> Biyofilmleri Üzerine Etkisi	57
3. BULGULAR	59
3.1. Çalışmada Kullanılan <i>A. baumannii</i> İzolatları	59
3.1.1. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Temini	59
3.1.2. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları	62
3.2. Bakteriyofaj Varlığının Belirlenmesi	63
3.2.1. Konak Bakterinin Zamana Bağlı Üreme Eğrisinin Oluşturulması	68
3.2.2. Tek Plak İzolasyonu	69
3.2.3. Bakteriyofaj Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	72
3.2.4. Bakteriyofajların Konak Aralıklarının Belirlenmesi	74
3.2.5. Seçilen Bakteriyofajların TEM Görüntüleri	76
3.2.6. Seçilen Bakteriyofajların Optimal MOI Değerleri	78
3.2.7. Bakteriyofajların Adsorbsiyon Oranlarının Belirlenmesi	79
3.2.8. Bakteriyofajların Üreme Karakterleri	80
3.2.9. Bakteriyofajların Ortam Şartlarına Dayanıklılıkları	82
3.2.10. Bakteriyofajların Saklama Koşullarının Değerlendirilmesi	85
3.2.11. Bakteriyofajların Protein Profilleri	85
3.2.12. Bakteriyofajların Tüm Genom Analizi	87
3.3. ERIC-PCR Yöntemi ile <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Klonal İlişkilerinin Tespiti	90
3.4. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Kolistin MİK Değerleri	92
3.5. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Biyofilm Kapasiteleri	93
3.6. Bakteriyofajların Olgun Biyofilm Üzerine Etkinlikleri	95
3.7. Bakteriyofaj ile Antibiyotiğin Olgun Biyofilm Üzerine Etkinliği	105
4. TARTIŞMA	115
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	134
ÖZET	135
SUMMARY	136
KAYNAKLAR	137
EKLER	152
	vi

EK-1. Etik Kurul Raporu

152

ÖZGEÇMİŞ

154



ÖNSÖZ

Son yıllarda çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* suşları dünya çapında yayılmaktadır. Bu suşlar, uzun hastanede kalış süresi, artan maliyetler ve yüksek ölüm oranlarına neden olmaktadır. Bakteriyofajlar, özellikle konakçı bakterilere saldırıp onları öldürebilen virüslerdir. Antibiyotiğe dirençli bakteriyel enfeksiyonların yaygınlığı nedeniyle faj tedavi çalışmalarında yükseliş yaşanmaktadır. Geleneksel antibiyotik tedavisine alternatif olarak fajlar, konakçı spesifikliğı, lokal mikrobiyota üzerindeki minimal etkileri, konakçı bakterilerde kendi kendine replikasyon ve kritik yan etkilerinin olmaması gibi avantajlara sahiptirler. Çalışmamızda önemi her geçen gün artan dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı, tedavide alternatif olabileceğı düşünölen faj terapisine katkıda bulunmak amacıyla hastane enfeksiyonu etkeni *A. baumannii* suşlarına özgü litik bakteriyofajların elde edilmesi ve tedavide kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18L0237009 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana yardımcı olup desteklerini daima hissettiren değerli danışmanlarım Prof. Dr. Nurten ALTANLAR, Prof. Dr. Sulhiye YILDIZ ve Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında bilgileriyle yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk ENGİN'e, çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Merve Eylül KIYMACI ve Araş. Gör. Duygu ŞİMŞEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte sözleriyle beni cesaretlendiren sevgili eşime, sevgilerini hep üzerimde hissettiğim canım annem, babam ve oğluma sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AHL	N-açıl homoserin lakton
ATCC	American type culture collection
β	Beta
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CAMHB	Kasyon eklenmiş müeller hinton sıvı besiyeri
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EM	Elektron mikroskobu
EOP	Faj plak etkinliği
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
ICTV	Uluslararası virüs taksonomi komitesi
İYE	İdrar yolları enfeksiyonu
kDa	Kilo dalton
kob	Koloni oluşturan birim
KVS	Kardiyovasküler sistem
L	Litre
LB	Luria bertani
Log	Logaritma
LPS	Lipopolisakkarit
LOS	Lipooligosakkarit
M	Molar
MDR	Çoklu ilaç dirençli
mg	Miligram
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MİK	Minimal inhibisyon konsantrasyonu

µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MOI	İnfeksiyon çokluğu
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
OD	Optik densite
PBP	Penisilin bağlayan protein
PBS	Fosfat tamponlu salin
PEG	Polietilen glikol
pH	Power of hydrogen
pob	Plak oluşturan birim
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	Revolutions per minute
SBÜ	Sağlık Bilimleri Üniversitesi
SF	Serum fizyolojik
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
%	Yüzde
VIP	Ventilatör ilişkili pnömoni
YBÜ	Yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Bakteriyofaj yapısı	23
Şekil 1.2. Temel bakteriyofaj ailelerinin morfolojik ve genom karakteristikleri	24
Şekil 1.3. Bakteriyofaj yaşam döngüleri	25
Şekil 3.1. <i>A. baumannii</i> izolatının agarlı besiyerinde tek koloni ekimi sonrası görüntüsü	62
Şekil 3.2. <i>A. baumannii</i> izolatının mikroskop görüntüsü ve katalaz testi örneği	62
Şekil 3.3. <i>A. baumannii</i> izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik direnç oranları	63
Şekil 3.4. Çevresel su örnekleri (Bentderesi-ANKARA)	64
Şekil 3.5. Farklı konak bakteriler (M1, A1, SU1) ile yapılan faj izolasyon denemeleri sonucu elde edilen plak görüntüleri	67
Şekil 3.6. Konak bakterinin zamana bağlı üreme eğrisi	68
Şekil 3.7. Faj yokluğunda (a) ve faj varlığında (b) taze bakteri süspansiyonu ile inkübasyon sonrası besiyeri görüntüsü	70
Şekil 3.8. <i>A. baumannii</i> 'ye özgü izole edilen farklı plak morfolojilerine sahip litik faj plakları	70
Şekil 3.9. Faj stok çözeltisi	73
Şekil 3.10. <i>A. baumannii</i> fajlarının konak aralıklarının belirlenmesinde kullanılan spot test sonuçları	74
Şekil 3.11. C2 fajının mikroskop görüntüleri	77
Şekil 3.12. K3 fajının mikroskop görüntüsü	77
Şekil 3.13. Seçilen bakteriyofajların optimal MOI değerleri	79

Şekil 3.14. C2 ve K3 fajlarının konak hücreye adsorbsiyon oranlarının grafiği	80
Şekil 3.15. C2 fajının tek aşamalı gelişim eğrisi	81
Şekil 3.16. K3 fajının tek aşamalı gelişim eğrisi	82
Şekil 3.17. C2 ve K3 fajlarının pH stabiliteleri	83
Şekil 3.18. C2 ve K3 fajlarının termal stabiliteleri	84
Şekil 3.19. (a) C2 fajının SDS-PAGE jel görüntüsü, M: Marker. (b) K3 fajının SDS-PAGE jel görüntüsü, M: Marker	86
Şekil 3.20. C2 fajına ait elde edilen yeni nesil sekans diyagramı	87
Şekil 3.21. K3 fajına ait elde edilen yeni nesil sekans diyagramı	89
Şekil 3.22. <i>A. baumannii</i> izolatlarının ERIC-PCR jel görüntüleri	90
Şekil 3.23. <i>A. baumannii</i> izolatlarının ERIC-PCR dendogram şeması	92
Şekil 3.24. <i>A. baumannii</i> izolatlarının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerleri	93
Şekil 3.25. <i>A. baumannii</i> izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri, hata çubukları birden çok kültürden (n=4) standart sapmaları temsil etmektedir	95

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. CAMHB besiyeri içeriği (g/L)	36
Çizelge 2.2. LB agar besiyeri içeriği (g/L)	37
Çizelge 2.3. LB broth besiyeri içeriği (g/L)	37
Çizelge 2.4. MHA besiyeri içeriği (g/L)	38
Çizelge 2.5. Yatık agar besiyeri içeriği (g/L)	38
Çizelge 2.6. Yumuşak agar besiyeri içeriği (g/L)	39
Çizelge 2.7. 2x YT besiyeri içeriği (g/L)	39
Çizelge 2.8. Gram boyama	40
Çizelge 2.9. Kristal viyole çözeltisi (g/L)	40
Çizelge 2.10. PBS (g/L)	41
Çizelge 2.11. SM tampon (g/L)	41
Çizelge 2.12. Serum fizyolojik (g/L)	42
Çizelge 2.13. Tris-EDTA (g/L)	42
Çizelge 2.14. Oksidaz ayırıcı (g/L)	43
Çizelge 2.15. SDS-PAGE ayırım jeli içeriği	51
Çizelge 2.16. SDS-PAGE yığılma jeli içeriği	51
Çizelge 2.17. Örnek yükleme tampon içeriği	51
Çizelge 2.18. Lizis I ve Lizis II tampon içeriği	53
Çizelge 2.19. ERIC-PCR reaksiyonundan kullanılan primer dizileri, PCR karışımı ve sıcaklık döngüsü	54
Çizelge 3.1. Hastanelerden temin edilen izolatlara ait bilgiler	59
Çizelge 3.2. Faj izolasyon kaynağı olarak kullanılan su örnekleri	

ve alınma tarihleri	64
Çizelge 3.3. Faj kaynağı olarak kullanılan su örnekleri ve izolasyonda kullanılan potansiyel konakçı bakteriler	65
Çizelge 3.4. İzole edilen bazı fajların plak görünümleri ve stok konsantrasyon değerleri	73
Çizelge 3.5. Seçilen fajların konak aralık değerleri	75
Çizelge 3.6. C2 ve K3 fajlarının TEM ile belirlenen morfolojik özellikleri	78
Çizelge 3.7. Bakterilerin biyofilm oluşturma özellikleri	93
Çizelge 3.8. <i>A. baumannii</i> izolatlarının optik dansite değerleri ve biyofilm oluşturma özellikleri	94
Çizelge 3.9. Fajların (F1, F2, F3) ve antibiyotiğin olgun biyofilm üzerine ilavesi sonrası 6. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları (%)	98
Çizelge 3.10. Fajların (F1, F2, F3) ve antibiyotiğin olgun biyofilm üzerine ilavesi sonrası 24. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları (%)	100
Çizelge 3.11. Fajların (F1, F2, F3) ve antibiyotiğin olgun biyofilm üzerine ilavesi sonrası 48. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları (%)	102
Çizelge 3.12. Faj 1, Faj 2 ve Faj 3'ün kütle azalması yönünden en etkin konsantrasyonları (pob/mL)	104
Çizelge 3.13. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiğin birlikte ve ardışık uygulamasının 24. saatte ölçülen OD değerleri	107
Çizelge 3.14. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiğin birlikte ve ardışık uygulamasının 24. saatte biyofilme etki oranları (%)	109
Çizelge 3.15. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiğin birlikte ve ardışık uygulamasının 48. saatte ölçülen OD değerleri	111
Çizelge 3.16. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiğin	



1. GİRİŞ

Acinetobacter türleri arasında *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) dünya çapında en önemli hastane enfeksiyonu etkenleri arasında yer almaktadır. Başlarda bu Gram negatif kokobasilin, düşük dereceli patojen olduğu düşünülmüş olsa da 2004 yılında Irak ve Afganistan'da görev yapan askerlerde aniden yüksek oranda bildiriminin yapılması ile dikkat çekmiş ve 'ıragibacter' olarak da adlandırılmıştır (Lee ve ark., 2017).

Birçok raporda, *A. baumannii*'nin antimikrobiyallere karşı hızla direnç geliştirdiği ve idrar yolu, kan dolaşımı, cilt ve yumuşak dokuda önemli fırsatçı enfeksiyonlardan sorumlu bir patojen olduğu bildirilmiştir (McConnell ve ark., 2013). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde antibiyotiklerin yoğun kullanımı ve yatış sürelerinin uzaması nedeniyle antibiyotik direnç oranları artmaktadır. Çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında karbapenemler tedavi de kullanılırken, son yıllarda artan karbapenem direnci *A. baumannii* tedavisinde sorun oluşturmaktadır (Morris ve ark., 2019).

Tüm dünyada artan antibiyotik direncine paralel olarak ortaya çıkan tedavi başarısızlıkları ile yeni tedavi seçeneklerine yönelim giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalarda bakteriyofaj terapisi öne çıkan alternatif tedavi yöntemleri arasındadır (Lyon, 2017). Bakteriyofaj terapisi, yalnızca bakteriyel hücrelere saldıran bakteriyofajların, bu benzersiz özelliklerini kullanarak bakteriyel enfeksiyonları tedavi etme yöntemidir (Sulakvelidze ve ark., 2001). Litik bakteriyofajlar belirgin antibakteriyel etkileri bakımından antibiyotiklere benzemektedirler. Tedavi amacıyla oluşturulmuş bakteriyofaj preparatlarının antibiyotiklere göre bir takım avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Bakteriyofajların doğal mikrobiyotayı koruması, toksik olmaması, ucuz ve kolay elde edilebilir olması, uygulanma biçiminden bağımsız etkene özgü olarak nerede ihtiyaç olursa oraya göç etmesi ve orada çoğalması,

biyofilm üzerinde etkin olması, antibiyotik direncinden bağımsız aktivite göstermesi gibi avantajlarının yanında dezavantajları da mevcuttur. Etki spektrumunun dar olması ve bakteriyofaj tedavisi öncesi bakteriyofaj/etken ilişkisinin tanımlanmamış olması, lizojenik bakteriyofajların bakteri DNA'sında değişikliklere neden olarak dirençli bakteriler ortaya çıkarma potansiyeli ve klinik çalışmaların yetersizliği gibi dezavantajları nedeniyle hastane uygulamaları hala çok sınırlıdır (Wittebole ve ark., 2014). Ancak kişiye özgü antibiyotik tedavi uygulaması gerekliliğinin vurgulandığı günümüzde kişiye özgü bakteriyofaj terapisi, özellikle etkenin belirlendiği vakalarda ve çoklu direnç geliştiren mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlarda en umut vaat eden yollardan biri olarak görülmektedir.

Çalışmamızda önemi her geçen gün artan dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı, tedavide alternatif olabileceği düşünülen faj terapisine katkıda bulunmak amacıyla hastane enfeksiyonu etkeni *A. baumannii* suşlarına özgü litik bakteriyofajların elde edilmesi ve tedavide kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı çevresel su örneklerinden litik bakteriyofajlar izole edilmiş, elde edilen bakteriyofajlardan geniş spektrumlu ve litik aktivitesi yüksek olanlar seçilerek karakterize edilmiş ve tüm genom dizileri elde edilerek *A. baumannii* biyofilmlerine karşı etkinliği değerlendirilmiştir.

1.1. Acinetobacter Türlerinin Tarihçe ve Taksonomisi

Günümüzde *Acinetobacter* cinsinin üyesi olarak tanımlanan gram negatif, nonfermantatif bakteriler en az 50 farklı jenerik ad altında uzun bir taksonomik değişim sürecine maruz kalmışlardır. Bunlardan en iyi bilinenleri; *Micrococcus calcoaceticus*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Bacterium anitratum*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii*'dir (Bergogne-Bérézin ve Towner, 1996; Harding ve ark., 2018).

Acinetobacter türlerinin günümüze kadar 33 genotipi tespit edilmiştir. Bu türlerin çoğu doğal çevrede bulunmaktadır ve insanda hastalık oluşturmazlar. Bu bakteri türlerini fenotipik yöntemlerle ayırt etmek zor olduğu için tanımlamada bazen *Acinetobacter calcoaceticus*– *A. baumannii* kompleks terimi kullanılmaktadır (Gordon ve Wareham, 2010). Genotip 1 (*A. calcoaceticus*), genotip 2 (*A. baumannii*), genotip 3 ve genotip 13 den oluşan ve *A. calcoaceticus*– *A. baumannii* kompleksi olarak adlandırılan gruplar klinik öneme sahiptir (Garnacho-Montero ve Amaya-Villar, 2010). *A. baumannii*, *A. nosocomialis* ve *A. pittii* en sık izole edilen hastane türleridir. *A. baumannii* bu türler arasında en sık ve önemli klinik tablolara yol açan türdür (Wallace ve ark., 2016).

1.1.1. Mikrobiyolojik Özellikler

Moraxellaceae ailesi içerisinde yer alan *Acinetobacter* cinsi bakteriler, mutlak aerobik, 1-1,5 µm x 1,5-2,5 µm boyutunda pleomorfik kokobasillerdir. İlk izolasyon ve doku kültürlerinde kokobasil, takip eden pasajlarda ve penisilinli ortamda çomak şeklinde görülmektedirler. Hareketsiz, oksidaz-negatif, katalaz-pozitif ve glukozu fermente etmeyen bakterilerdir. Zor boyanırlar, bu nedenle bazen Gram pozitif olarak tanımlanırlar. Çoğu *Acinetobacter* türü, amonyum veya nitrat tuzları ve tek bir karbon içeren basit bir mineral ortamında büyüebilmektedir. *Acinetobacter*'ler kanlı agar ve triptik soya agar gibi besiyerlerinde 37 °C'de soluk sarı ile grimsi beyaz, pürüzsüz, mukoid koloniler oluşturmakta, *Eozin metilen blue* (EMB) agarda mavi gri renkli koloni morfolojisi göstermektedirler. Bu besiyerinin yanı sıra *Herellea agar* (HA)'da uçuk eflatun renkte; *Leeds Acinetobacter medium* (LAM)'da pembe renkte koloniler oluşturmaktadır. Bazı çevresel türlerde kahverengi pigment oluşumu gözlenmiştir (Bergogne-Bérézin ve Towner, 1996; Bonomo ve Szabo, 2006; Moubareck ve Hammoudi, 2020; Peleg ve ark., 2008).

1.1.2. Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Acinetobacter'ler farklı ısı ve pH koşullarında uzun süre canlılığını sürdürebilen, kuruluğa dayanıklı; toprak ve suda serbestçe yaşayabilen mikroorganizma türleridir. Çok sayıda çalışma; telefon kolları, kapı itme plakaları, hasta çizelgeleri, yatak çarşafaları, masa tablaları, hastane zemini dâhil cansız yüzeylerde uzun süre hayatta kaldığını göstermiştir (Tewari ve ark., 2018). Bazı sağlıklı bireylerde normal mikrobiyota üyesi olarak görülebilmekte olup, insan vücudunda genelde deri, koltuk altı ve kasık gibi bölgelerde ayrıca farinkste, insan solunum yolu salgılarında, idrar ve bağırsakta da rastlanmaktadır (Seifert ve ark., 1997; Villar ve ark., 2014).

Acinetobacter türleri arasında *A. baumannii* dünya çapında en önemli hastane enfeksiyonu etmenleri arasında yer almakta ve neden olduğu enfeksiyonlardaki artış ve çoklu ilaç direnci nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (McConnell ve ark., 2013). *A. baumannii* özellikle yoğun bakım ünitelerinde üriner sistem, bakteriyemi, menenjit, ventilatörle ilişkili pnömoni ve yara enfeksiyonları gibi önemli hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı bir patojendir. Ayrıca, toplum kökenli *A. baumannii* enfeksiyonlarının sıklığı da giderek artmaktadır (Lin ve Lan, 2014; Richards ve ark., 2015).

A. baumannii kolonizasyonu veya enfeksiyonu için hastanede uzun yatış süresi, yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) kalış, yakın zamanda cerrahi girişim geçirme, parenteral beslenme, invaziv girişimler, mekanik ventilasyon, cihaz kullanımı (kalıcı kateter, endotrakeal tüp veya nazogastrik tüp), huzurevinde kalma ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı bilinen risk faktörleri arasında yer almaktadır (Fishbain ve Peleg, 2010). *A. baumannii* enfeksiyonlarının yayılmasında en önemli nedenler sıklıkla ventilasyon ekipmanları, klimalar, hasta yatakları, hastane personelinin elleri veya çevresel kontaminasyona bağlı enfeksiyon kontrol uygulamalarındaki hatalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Moubareck ve Hammoudi, 2020; Özsoy ve ark., 2019).

Uzun süre canlı ve cansız yüzeylerde hayatta kalma yeteneği ve karbapenemler de dâhil olmak üzere birden fazla antibiyotiğe direncin tedaviyi zorlaştırması, *A. baumannii*'nin önemli insan patojenleri arasında yer almasını sağlamıştır (Martín-Aspas ve ark., 2018).

Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonları kontrol etmek için etkin stratejiler tasarlanmakta, fenotipik ve genotipik teknikler kullanılmaktadır. Fenotipik teknikler arasında biyokimyasal testler, faj tiplemesi, immüno blotlama, protein analizi, bakteriyosin tiplemesi ve antimikrobiyal direnç paternlerinin tanımlanması yer almaktadır. Bu teknikler, *Acinetobacter* suşlarını tanımlama ve ayırt etmek için yeterli değildir. Kaynak ve dağıtım yollarını belirleyemezler ve yaygın izolatların yayılmasını kontrol etmede etkili önlemler sağlamazlar.

Günümüzde, spesifik moleküler belirteçler kullanılarak yapılan genotipik teknikler *Acinetobacter* türlerinin tiplendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında ribotipleme, plazmid analizi, kromozomal Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Rastgele amplifiye polimorfik DNA analizi (RAPD), Arbitrarily PCR (APPCR), Repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) ve Pulse-field jel elektroforezi (PFGE) bulunmaktadır (Maleki ve ark., 2017). Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, polimeraz zincir tepkimesi (PCR) tabanlı parmak izi yöntemlerinin uygulanması daha kolay ve uygun maliyetlidir (Aljindan ve ark., 2018).

A. baumannii'de, simetrik elementler olarak adlandırılan tekrar dizileri mevcuttur ve genellikle DNA'nın kodlamayan parçasında görülmektedir. Bu tekrar dizilerinin değişken sayısı ve uzunluğu ile ilgili olarak bazı primerler tasarlanmıştır. Her izolat için elde edilen bantların uzunluğu ve sayısı değişkendir ve suşlar bantların çeşitliliğine göre gruplandırılabilir (Falah ve ark., 2019).

1.1.3. Patojenez ve Virölans Faktörleri

A. baumannii'nin patojenitesinden sorumlu çeşitli virölans faktörleri fenotipik ve genotipik yöntemlerle gösterilmiş olmakla birlikte, diğer Gram-negatif patojenlere kıyasla nispeten daha az sayıda virölans faktörü tanımlanmıştır. Dış membran porinleri, proteazlar, lipopolisakkaritler, kapsüler polisakkaritler, protein sekresyon sistemleri ve demir-şelatlama sistemleri olmak üzere çeşitli virölans faktörleri bulunmaktadır (Lee ve ark., 2017; McConnell ve ark., 2013).

1.1.3.1. Porinler

Porinler, hücresel geçirgenliğin düzenlenmesinden sorumlu dış zar proteinleridir. OmpA, bir β -barrel porindir ve dış zarda en fazla bulunan porinlerden biridir. OmpA'nın biyolojik özellikleri in vitro sistemlerde iyi karakterize edilmiştir. Saflaştırılmış OmpA, konak epitel hücrelerini bağlamakta, mitokondriyi hedeflemekte ve sitokrom c ve apoptozis indükleyici faktör gibi proapoptotik molekülleri serbest bırakarak apoptozu indüklemektedir (Choi ve ark., 2005; Lee ve ark., 2017).

OmpA ayrıca fibronektin ile etkileşime girerek epitelyal hücrelere tutunmada, invazyonunda önemli bir rol oynar ve insan serumundaki faktör H'ye bağlanır, bu da *A. baumannii*'nin kompleman aracılı öldürmeden kaçmasına izin verebilmektedir (Gaddy ve ark., 2009; Smani ve ark., 2012). OmpA, yüzey hareketliliğini ve biyofilm oluşumunu kolaylaştırarak *A. baumannii*'nin hayatta kalımını ve kalıcılığını artırmaktadır (McConnell ve ark., 2013).

Bir su geçiş kanalı görevi gören 33-36-kDa Omp proteini (Omp34), *A. baumannii* sitotoksitesitesiyle ilişkili bir başka dış zar porinidir. Yapılan bir çalışmada, Omp34 delesyonunun, suşun insan akciğer epitel hücrelerine yapışmasını,

invazyonunu ve dolayısıyla bu hücrelerde sitotoksitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Smani ve ark., 2013).

Omp22'nin *A. baumannii* patojenitesine katkısı henüz belirlenmemiş olsa da aşı geliştirme çalışmalarında kullanmak için yeni, korunmuş ve güvenli bir antijen olarak tanımlanmıştır (Huang ve ark., 2016).

1.1.3.2. Kapsüler Polisakkarit ve Lipopolisakkaritler

Diğer tüm dış membran bileşenlerine benzer şekilde, Lipopolisakkarit (LPS), Lipooligosakkarit (LOS) ve kapsülün tamamı sitoplazmada sentezlenir ve özel proteinöz sistem ile hücre zarfının dış kısmına yerleştirilmiştir. *A. baumannii* LPS'i, bir lipit A parçası, karbonhidrat çekirdek ve tekrarlayan O-antijenlerini içermektedir. Buna karşılık, LOS O-antijen içermez ve bunun yerine genişletilmiş çekirdek oligosakkaritlere sahiptir (McConnell ve ark., 2013; Morris ve ark., 2019).

Lipid A, LPS ve LOS'un immün sistemi uyarıcı bileşenidir ve daha önce tüm Gram negatif bakteriler için gerekli olduğu düşünülmüştür. Ancak son on yılda, daha önce sadece *Neisseria meningitidis* ve *Moraxella catarrhalis*'de olduğu düşünülen, lipid A yokluğunda hayatta kalabilme özelliğine sahip üçüncü Gram negatif patojenin *A. baumannii* olduğu belirlenmiştir (Morris ve ark., 2019).

Kapsül, hücre dış yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturmaktadır. Katyonik antimikrobiyal peptitlere ve seruma karşı direnç aracılık eder ve in vivo ortamda hayatta kalmayı artırır. Kapsül üretimi, belirli antibiyotikler (kloramfenikol ve eritromisin) de dâhil olmak üzere çevresel uyaranlara yanıt olarak, BfmRS iki bileşenli düzenleyici sistem (TCS) tarafından negatif olarak düzenlenir ve bu da artan ekspresyon ve antimikrobiyal dirençle sonuçlanmaktadır (Geisinger ve Isberg, 2015).

Ayrıca, kapsülün varlığı veya yokluğu, *Acinetobacter* fenotipik değişimiyle de ilişkilendirilmiştir. Bu sayede opak virülan form gelişmiş kapsül üretimi ile karakterize edilirken iki kat daha az kapsül üretimi yapan yarı saydam form avirülan olarak nitelendirilmiştir (Chin ve ark., 2018).

1.1.3.3. Fosfolipazlar

Fosfolipazlar iyi bilinen virülans faktörleridir ve *Acinetobacter*'ler hem fosfolipaz C hem de D enzimlerini kodlar. *A. baumannii*, tümü ökaryotik membran bileşeni olan fosfatidilkoline yönelik substrat spesifikliğine sahip iki fosfolipaz C ve üç fosfolipaz D enzimini kodlamaktadır (Morris ve ark., 2019). İlginç bir şekilde, her iki enzim de ferrik alım düzenleyici (Fur) tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenmekte ve insan eritrositlerine karşı hemolitik aktivite göstermekte, bu da demir alımına yardımcı olmaktadır. Bu önemli role uygun olarak fosfolipaz C, ATCC 19606, ATCC 17978, ACICU, AYE ve AB0057 de dâhil olmak üzere çok sayıda suşta korunmaktadır (Fiester ve ark., 2016). Benzer şekilde, üç fosfolipaz D geni serum direnci, epitel hücre istilas ve in vivo patogeneze ile ilişkilidir. Benzerliklerine rağmen, Stahl ve ark. (2015), *Galleria mellonella* larva modelinde yaptıkları bir çalışmada fosfolipaz D2'nin diğer ikisine göre, invazyon için daha önemli olduğu gösterilmiştir. Sadece üç enzimin de silinmesi durumunda virülansta sıra dışı kusurlar oluşmuştur (Stahl ve ark., 2015).

1.1.3.4. Sekresyon Sistemleri

A. baumannii'de sekresyon sistemleri, proteinlerin hücre yüzey yapılarından salgılanması ve çevre ve konakçılarla etkileşimine izin vermektedir. Bu nedenle tedavi hedefleri olarak kullanılırlar. Çok çeşitli salgı sistemleri bulunmaktadır (Moubareck ve Hammoudi, 2020).

Tip I salgılama sistemi (T1SS), proteinleri sitozolden hücre dışı ortama taşıyan üçlü bir sistemdir (Morris ve ark., 2019). *A. baumannii* ayrıca birden fazla efektör proteini dışa aktarmak için bir tip II salgılama sistemi (T2SS) kullanmaktadır. Bu iki aşamalı salgılama sürecinde, genel salgılama yolu (Sec) veya Twin-arginin (Tat) sistemi, patojenin iç zarı boyunca bir N terminali salgılama sinyali olan proteinleri iletir. Daha sonra, salgı sinyali kaldırılır ve T2SS makinesi, katlanmış proteinleri hücrenin dışına salgılar (Sandkvist, 2001). T2SS efektörleri arasında; CpaA, LipA ve LipH bulunur; burada LipA ve LipH, ekzojen lipidlerin kullanımı için gerekli olan lipazlardır ve CpaA, fibrinojeni ve faktör V'yi çinkoya bağlı bir mekanizmada bozan ve kan pıhtılaşma yollarını olumsuz etkileyen bir metallo-endopeptidazdır (Tilley ve ark., 2014).

Tip IV salgılama sistemi (T4SS), DNA'nın, plazmitlerin ve diğer mobil genetik öğelerin konjugatif transferinden sorumludur (Liu ve ark., 2014).

Birçok Gram-negatif bakteri gibi, *A. baumannii*'de protein toksinlerini temasa bağlı bir şekilde diğer bakterilere enjekte edebilen ve böylece polimikrobiyal enfeksiyonlarda önemli olan, çok bileşenli bir salgı modeline sahip tip VI salgılama sistemini (T6SS) kodlamaktadır (Hood ve ark., 2010). Birleştirilmiş T6SS sistemi, tipik olarak kendi kendine zehirlenme olmaksızın diğer bakterileri hedef alan efektör proteinin salınmasına izin vermektedir. *A. baumannii*'de T6SS, nükleazlar, peptidoglikan hidrolazlar veya hücre zarı aktif toksinler gibi toksinler üreterek diğer bakterilere saldırabilmektedir (Elhosseiny ve Attia, 2018; Fitzsimons ve ark., 2018).

Tip V sekresyon sistemi (T5SS) (ototransporterler), Gram negatif bakterilerde en basit ve en yaygın sekresyon sistemidir. Trimerik ototransporter (Ata), *A. baumannii*'de tanımlanan ilk salgı sistemidir. Ata, insan matriks bileşenlerine, özellikle kollajene bağlanmaya aracılık eder ve ayrıca biyofilm oluşumu/bakımı ve virülans ile ilişkilendirilmektedir. Bu proteinin silinmesi, ATCC 17978'in biyofilm

oluşturma yeteneğini önemli ölçüde azaltmış ve in vivo virülansı tamamen zayıflatmıştır (Bentancor ve ark., 2012).

T6SS'ler hem ökaryotik hem de prokaryotik hücreleri hedefleyebilir, ancak *Acinetobacter*'de T6SS yalnızca diğer bakterileri hedef almaktadır. İlginç bir şekilde, bakteriyel rekabetteki rolüne rağmen, aktif T6SS'li klinik izolatlar, yüksek oranda bağışıklığı baskılanmış hastalardan izole edilebilmektedir. Bunun, rekabet eden diğer patojenlere karşı bakterisidal aktivitelerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir (Fitzsimons ve ark., 2018).

1.1.3.5. Metal Alım Sistemi

A. baumannii'nin patojen olarak kalıcılığına katkıda bulunan önemli bir faktör de, demir, manganez ve çinko dâhil olmak üzere konakçı besinleri yakalayabilme ve böylece konakçı tarafından oluşturulan sınırlı metal ortamına uyum sağlama yeteneğidir (Tipton ve Rather, 2017). *A. baumannii*'de demir yakalamak için sideroforlar olarak bilinen yüksek afiniteli demir şelatlama molekül kümesi bulunmaktadır (Morris ve ark., 2019).

A. baumannii suşları beş farklı sideroforu (demir şelatör proteini) kodlamaktadır. Küme 1, sekiz genden ve bir MFS ailesi dışarı akış pompasından oluşmaktadır. Küme 2 (yalnızca ATCC 17978'de mevcuttur) ayrı bir MFS ve MATE dışarı akış pompasına sahip 15 geni içerir, küme 3, iyi karakterize edilmiş *asinetobaktin* ve ABC dışarı akış pompasıdır, küme 4 yalnızca 8399 suşunda bulunur ve küme 5, ATCC 17978 haricinde çoğu suşta mevcuttur (Eijkelkamp ve ark., 2011).

Benzer şekilde, Fur, demir-sülfür kümesi birleştirme sisteminin (Isc) veya diğer varsayılan demir taşıyıcıların (FeoA) bozulması, azalmış bakteriyel biyofilm

oluşumuna, oksidatif stres direncine ve in vivo patogeneze yol açmaktadır (Álvarez-Fraga ve ark., 2018).

Demire benzer şekilde, çinko biyolojik olarak önemlidir ve çeşitli proteinler için hem doğal bir katalizör hem de kofaktör olarak hareket etmektedir (Hood ve Skaar, 2012). *A. baumannii*, ZnuABC taşıyıcısı ve ZigA GTPaz'dan oluşan yüksek kapasiteli bir çinko temizleme sistemine sahiptir. ZnuABC hücre içi çinko alımını sağlarken, ZigA çinko metabolizmasından sorumludur. *A. baumannii*, ZnuABC taşıyıcısının ve Zur tarafından transkripsiyonel olarak kontrol edilen ZigA GTPaz'ın aktivitesiyle hücre içi çinko konsantrasyonlarını düzenlemektedir (Nairn ve ark., 2016).

A. baumannii tarafından manganez sınırlamasının üstesinden gelmek için kullanılan mekanizmalar daha az anlaşılmış olsa da, dirençle ilişkili makrofaj proteini (NRAMP) ailesine ait bir taşıyıcının, kalprotektin varlığında manganez birikimini ve büyümesini kolaylaştırdığı varsayılmaktadır (Moubareck ve Hammoudi, 2020).

1.1.3.6. Biyofilm Oluşturma ve Çoğunluğu Algılama (Quorum Sensing)

Tüm virülans faktörleri arasında, biyofilm oluşumu, organizmayı çoklu ilaca dirençli hale getirerek *A. baumannii* patogenezinde önemli hale gelmiştir. Biyofilmler, su kanalları ile dağılmış heterojen bir protein matrisi, nükleik asitler, polisakkaritler ve bakteriyel mikrokolonilerden oluşan dinamik bir topluluktur (Hall-Stoodley ve ark., 2004). Biyofilmler, hücre dışı bir madde içine alınmış mikroorganizmaların, kendilerini kuruma, bağışıklık sistemi ve antibiyotikler dâhil olmak üzere streslere karşı dirençli hale getirmek için oluşturdukları mikro topluluklarıdır. Biyofilmler ayrıca *A. baumannii*'deki patojen-konak etkileşimlerine aracılık etmektedir (Doi ve ark., 2015; Moubareck ve Hammoudi, 2020).

A. baumannii, hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde biyofilmler oluşturarak kalıcı tıbbi cihazlarda, hastane yüzeylerinde veya başka şekilde elverişsiz koşullarda hayatta kalmayı teşvik etmektedir. Biyofilm oluşumu, ilk bağlanma ile başlayan, hücrelerin mikrokolonilere güçlü bir şekilde yapışması ve toplanması ile devam eden, ardından biyofilm büyümesi ve olgunlaşmasının gerçekleştiği, çevreye hücre yayılımı ile sonlanan çok aşamalı bir süreçtir (Hall-Stoodley ve ark., 2004). Titanyum ve polistiren gibi tıbbi yüzeylere yapışma kabiliyetleri ile abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturabilmeleri, hastane ortamlarında bu patojenin başarısına katkıda bulunmuştur (Brossard ve Campagnari, 2012).

Çoğu *A. baumannii*, gen ekspresyonunu etkileyen ve antibiyotiklere yanıt olarak koruyucu bir kapsül oluşturmayı sağlayan bir molekül ağı olan BfmRS, iki bileşenli düzenleyici sistem (TCS) tarafından düzenlenen, Csu pili olarak bilinen bir şaperon/usher pilus sistemine sahiptir. Sistem ayrıca hücre bağlanmasını kolaylaştırmak için pili oluşumuna aracılık etmektedir (Greene ve ark., 2016). Başka bir TCS olan GacSA, Csu gen ekspresyonunu etkileyebilmekte ve bu nedenle patojenin biyofilm oluşturma kabiliyeti üzerinde dolaylı bir etkiye sahip olabilmektedir. *A. baumannii*'nin biyofilm oluşumuna yardımcı olan bir diğer önemli faktör, birçok Gram-negatif bakteri türü tarafından üretilen ve yapışma ve agregasyon için gerekli olan ekzopolisakkarit poli- β -1,6-N-asetilglukozaminin (PNAG) üretimidir (Choi ve ark., 2009; Tomaras ve ark., 2008).

Pek çok rapor, çoğunluğu algılama sisteminin biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığını öne sürmektedir. Çoğunluk algılama sistemi, genellikle otoindükleyiciler olarak bilinen sinyal moleküllerinin üretimi yoluyla populasyon yoğunluğunu korumak için bakteriler arasında bir iletişim şeklidir. Bunlar, motiliteyi, biyofilm oluşumunu ve diğer özellikleri düzenlemekten sorumlu olan N-açıl homoserin laktonları (AHL) içeren hormon benzeri bileşiklerdir. *A. baumannii*'deki çekirdek algılama döngüsü, AbaI indükleyicisinin yanı sıra aynı kökenli AbaR reseptörünü içermektedir. AbaI geni tarafından kodlanan AbaI, sinyal AHL molekülleri üreten bir otoindüktör sentaz olarak işlev gören bir sensör proteindir.

AbaR, AHL'lere bağlanma üzerine bir dizi reaksiyonu indükleyen bir reseptör proteini olarak işlev görür. Bu bağlanma, pozitif geri besleme döngüsü tarzında daha fazla AHL üretimini tetikler ve bu da biyofilm oluşumunun düzenlenmesiyle sonuçlanmaktadır (Saipriya ve ark., 2020; Whiteley ve ark., 2017).

1.1.3.7. Penisilin Bağlayan Proteinler

Penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) en yaygın olarak β -laktam antibiyotiklere bağlanma ve etkisizleştirme ile ilişkilidirler. Bununla birlikte, PBP'ler aynı zamanda peptidoglikan tabakasının biyosentezinin son aşamalarına da katılır ve böylece bakteriyel hücre stabilitesine katkıda bulunmaktadır (Sauvage ve ark., 2008). Varsayılan düşük molekül ağırlıklı penisilin bağlayıcı protein PBP7/8'i kodlayan, *pbpG* genine, bir transpozon eklenerek oluşturulmuş bir *A. baumannii* mutantında azalmış büyüme gözlemlendiği ve hem yumuşak doku enfeksiyonu hem de pnömoninin fare modelinde azalmış büyüme ve hayatta kalma oranı gösterdiği gözlemlenmiştir (Russo ve ark., 2008).

1.1.4. *A. baumannii*'nin Oluşturduğu Enfeksiyonlar

Yukarıda bahsedildiği üzere, *A. baumannii* stresli ortamları ve çok sayıda antibiyotik sınıfını tolere etme eğilimindedir, bu da özellikle kritik hastalarda nozokomiyal bir patojen olarak hayatta kalmasını ve yayılmasını sağlayarak morbidite ve mortalitenin artmasına katkı sağlamaktadır (Antunes ve ark., 2014).

A. baumannii hastane kökenli enfeksiyonların önemli etkenlerindendir ve özellikle çoklu ilaç dirençli hastane enfeksiyonu etkenleri arasında giderek artan oranlarda bildirilmektedir. Son yıllarda solunum yolu, kan dolaşımı, deri ve yumuşak

doku, idrar yolu ve merkezi sinir sistemini içeren sorunlu *A. baumannii* enfeksiyonları ortaya çıkmıştır (Moubareck ve Hammoudi, 2020).

1.1.4.1. Solunum Yolu Enfeksiyonları

Hastane kaynaklı pnömoni, *A. baumannii* enfeksiyonunun en yaygın klinik belirtisidir. Lübnan'daki üçüncü basamak bir bakım merkezinde yapılan yedi yıllık bir çalışmada MDR *A. baumannii* izolatları arasında en yaygın enfeksiyon bölgesi solunum yolu (% 53,1), ardından cerrahi yara (% 18,8), kan (15,6 %) ve idrar (% 10,2) olduğu bulunmuştur (Kanafani ve ark., 2018). Bu enfeksiyonlar en tipik olarak, yoğun bakım ortamında mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda ortaya çıkmaktadır. *A. baumannii*'nin neden olduğu ventilatör ilişkili pnömoninin (VİP), hava yolunun çevresel etkenlere maruziyetinden kaynaklandığı ve bunu takiben pnömoni geliştiği düşünülmektedir (Dijkshoorn ve ark., 2007). *A. baumannii*'nin neden olduğu ventilatörle ilişkili pnömoninin ölüm oranının yaklaşık % 52-% 66 arasında olduğu bildirilmiştir. *A. baumannii*'nin neden olduğu toplum kökenli pnömoni, nozokomiyal enfeksiyondan daha az görülmekte ve sıklıkla alkol veya kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi altta yatan konakçı faktörlerle ilişkilendirilmektedir (Huang ve ark., 2019).

1.1.4.2. Kan Dolaşımı Enfeksiyonları

A. baumannii yoğun bakım ortamında kan dolaşımı enfeksiyonlarının yaygın bir nedenidir ve ilişkili risk faktörleri arasında immünosupresyon, ventilatör kullanımı, antibiyotik hikâyesi, *A. baumannii* kolonizasyonu ve invazif prosedürler bulunmaktadır. Uygunsuz ampirik antibiyotik tedavisi, komorbiditeler, nötropeni ve yaygın intravasküler pıhtılaşmanın varlığı, *A. baumannii* kan dolaşımı enfeksiyonlarının daha kötü klinik sonuçları ile ilişkilendirilmiştir (Jang ve ark., 2009;

Jung ve ark., 2010). Ek olarak yara enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları da kan dolaşım enfeksiyonu odağı olarak rapor edilmiştir (Wisplinghoff ve ark., 2012).

A. baumannii'nin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarına bağlı ölüm oranı % 40'a yaklaşmaktadır (Wisplinghoff ve ark., 2012). Brezilya'da kanser hastalarında yapılan bir çalışmada, bu organizmanın bakteriyemi vakalarının yaklaşık % 68'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Nörocerrahi grubu hastalarda 10 yıllık bir süre boyunca kan dolaşımı enfeksiyonlarının yaklaşık % 13'ü *A. baumannii* ile ilişkilendirilmiş ve bunların % 90'ı karbapenem dirençli olarak bulunmuştur. Ayrıca, Yunanistan'da bir üniversite hastanesinde YBÜ hastalarında kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan *A. baumannii*'nin % 42'si kolistine dirençli ve doğrudan fulminan septik şok ve yüksek mortalite ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Moubareck ve Hammoudi, 2020).

1.1.4.3. Deri, Yumuşak Doku ve Kemik Enfeksiyonları

Yanık bölgelerinde *A. baumannii* enfeksiyonu ile flora kolonizasyonu arasında ayırım yapmak zor olsa da, yanık enfeksiyonlarının önemli bir nedenidir. *A. baumannii*'nin neden olduğu yumuşak doku enfeksiyonları, Irak ve Afganistan'da savaşa bağlı travma sonrası askeri personelde önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Yüksek çoklu ilaç direnci oranları ve bazı antibiyotiklerin yanık bölgelerine zayıf penetrasyonu nedeniyle, bu enfeksiyonlar klinisyenler için son derece zor olabilmektedir (McConnell ve ark., 2013).

A. baumannii yanık bölgesi enfeksiyonunun prevalansı kurulum ve coğrafi konuma bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterse de, yanık ünitelerinde yüksek *A. baumannii* enfeksiyonu vakaları bildirilmektedir. Yanık enfeksiyonu yara iyileşmesini geciktirebilmekte, deri greftlerinin başarısızlığına yol açabilmekte, yara yeri kolonizasyonu, altta yatan dokunun enfeksiyonu ve ardından bakterilerin sistemik

yayılmasına kadar ilerleyebilen sorunlara yol açabilmektedirler (Moubareck ve Hammoudi, 2020).

Yanık hastalarında yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında, kan dolaşımında *A. baumannii* ile enfekte hastaların % 31'lik bir genel mortaliteye sahip olduğu, enfekte olmayan kontrollerin ise % 14'lük bir mortaliteye sahip olduğu bildirilmiştir (Wisplinghoff ve ark., 1999).

Yanık yoğun bakım ünitesinde ciddi yanık hastaları ile yapılan başka bir çalışmada, *A. baumannii*, art arda dört yıl boyunca kandan en çok izole edilen patojen olarak izole edilmiş ve izolatlar polimiksin B ve minosikline karşı düşük direnç profili gösterirken diğer antibiyotiklere % 100 oranında dirençli bulunmuştur (Zhang ve ark., 2020).

1.1.4.4. İdrar Yolu Enfeksiyonları

A. baumannii enfeksiyonları üzerine yapılan araştırmalar öncelikle pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına odaklanmış olsa da, son çalışmalar beş *A. baumannii* suşundan birinin üriner bölgelerden izole edildiğini göstermiştir. *A. baumannii*, özellikle kalıcı üriner kateterlerde bazen idrar yolu enfeksiyonlarına (İYE) neden olmaktadır (Moubareck ve Hammoudi, 2020).

1.1.4.5. Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonları

Toplum kaynaklı nadir *A. baumannii* menenjit vakaları bildirilmesine rağmen, vakaların çoğu cerrahi girişim sonrası iyileşen hastalarda meydana gelmektedir. *A. baumannii*'ye bağlı nozokomiyal menenjit, özellikle kalıcı ventrikülostomi tüpleri

veya serebrospinal fistül kullanan ve ameliyat sonrası antimikrobiyal tedavi gören hastalarda % 70'e yaklaşan mortalite ile yoğun bakım beyin cerrahisi ünitelerinde artan bir tehdit olmaktadır (Siegman-Igra ve ark., 1993). Ayrıca, 40 yaş üstü, dış ventriküler dren varlığı, artmış beyin omurilik sıvısı beyaz kan hücresi sayısı ve komorbiditelerin varlığı (diyabet ve hipertansiyon), beyin cerrahisi YBÜ'de *A. baumannii*'ye bağlı mortalite için risk faktörlerindendir (Sharma ve ark., 2019).

A. baumannii menenjitleri diğer organizmaların etken olduğu bakteriyel menenjit ile benzerdir ve ateş, baş ağrısı, bilinç bulanıklığı ve nöbet görülmektedir. *A. baumannii* menenjitleri ile ilişkili ölüm oranlarının tahmin edilmesi, yeterli büyüklükteki çalışma popülasyonları ile yapılmış sınırlı çalışma nedeniyle zordur. 2008 yılında retrospektif bir çalışmada 1990 ve 2004 yılları arasında ikinci basamak bir hastanede cerrahi operasyon sonrası 51 *A. baumannii* menenjit vakası tespit edilmiştir. Bu vakalar, bu kurumdaki tüm menenjit vakalarının % 10,9'unu temsil etmekte ve kaba ölüm oranı % 33 olarak saptanmaktadır (McConnell ve ark., 2013; Rodríguez Guardado ve ark., 2008).

1.1.5. Tedavi ve Direnç

A. baumannii tedavisi zor bir patojen olması nedeni ile önemlidir. Patojenin ilaca dirençli doğası ve öngörülemeyen duyarlılık profilleri ampirik ve terapötik tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır (Fishbain ve Peleg, 2010). Tedavide kullanılabilecek antibiyotik sınıflarından en az 3'ünde yer alan bir veya birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gösteren kökenler, çoklu ilaç dirençli (ÇİD); bir ya da iki antibiyotik dışında tüm antibiyotiklere direnç gösteren kökenler, yaygın ilaç dirençli (XDR-Extensively drug resistant) olarak kabul edilmektedir (Basak ve ark., 2016). Birçok rapor, *A. baumannii*'nin antimikrobiyallere hızla direnç gösterdiğini bildirmiş ve ÇİD suşları izole edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü *A. baumannii*'nin, en ciddi mikroorganizmalardan biri olduğunu (ESKAPE => *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas*

aeruginosa ve *Enterobacter* türleri) açıklamış ve yeni terapötiklere acilen ihtiyaç duyulan bir numaralı kritik öncelikli patojenler arasında olduğunu bildirmiştir (Shlaes ve Bradford, 2018).

A. baumannii'de artan antimikrobiyal direnç ve hemen hemen tüm mevcut antibiyotiklere dirençli suşların gelişmesi oldukça endişe vericidir (Dijkshoorn ve ark., 2007). Mikroorganizmanın bilinen ilaç direnç mekanizmaları; ilaçların enzimatik degradasyonu, hedef modifikasyonları, çoklu effluks pompaları ve ilaç geçirgenliğinin değişmesidir (Lee ve ark., 2017). Aminopenisilinler, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler gibi yaygın olarak kullanılan bir dizi antibiyotiğe doğal dirençli olan *A. baumannii*, çok sayıda ajana karşı direnç kazanma ve dolayısıyla çevresel değişikliklere hızla yanıt verme konusunda oldukça yeteneklidir. Ertapenem doğal olarak *A. baumannii*'ye karşı aktif değildir (Peleg ve ark., 2008). *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisine yönelik mevcut kılavuzlar, bu tür direnç eğiliminden ciddi şekilde etkilenmekte ve tedavi seçeneklerini oldukça sınırlı hale getirmektedir (Wong ve ark., 2017).

Belirgin impermeabilite ve çoklu efluks sistemlerinin ekspresyonu çoklu ilaç direncine yol açarak, çeşitli direnç mekanizmalarını kazanmasına olanak sağlamaktadır. AmpC tipi sefalosporinazların aşırı üretimi çoğu zaman, karboksipenisilinler, üreidopenisilinler ve 3. kuşak sefalosporinlere karşı kazanılmış dirençle sonuçlanmaktadır (Kumburu ve ark., 2019). Bununla birlikte, plazmid kaynaklı dar spektrumlu β -laktamazlara ek olarak, çeşitli GSBL (Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamaz)'ler de aynı zamanda *A. baumannii* tarafından kazanılmaktadır. Bunlar arasından PER, CTX-M, GES en sık karşılaşılan tipler olup özellikle pandemik klonlarda yer almaktadır (Lee ve ark., 2017). Her iki durumda imipenem, meropenem veya doripenem tedavide ilk seçenek olarak düşünülmekteydi. Ancak 1980'lerin sonundan karbapenem dirençli klonlar görülmüş ve hızla yayılmıştır. Karbapenem direnci kromozomal kaynaklı OXA-51 benzeri enzimin aşırı ekspresyonunun sonucunda da oluşmakla birlikte, büyük ölçüde plazmid kaynaklı

OXA-23 benzeri, IMP, VIM, SIM ve daha yakın zamanlarda NDM tipi karbapenemazların kazanılmasına bağlıdır (Fishbain ve Peleg, 2010).

Antibiyotikle mücadelede kısıtlılık klinisyenlerin alternatif uygulamalara yönelimine neden olmuştur (Wong ve ark., 2017). Bunlardan kolistin (polimiksin E) ve polimiksin B, *A. baumannii* ilişkili VAP, bakteremi ve menenjit tedavisinde kullanılmaktadır (Garnacho-Montero ve Amaya-Villar, 2010). Kolistinin nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi yan etkileri ve akciğer dokusuna zayıf penetrasyonu nedeniyle kullanımı kısıtlıdır (Falagas ve Kasiakou, 2006). *A. baumannii* ilişkili VAP hastalarında ve deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında diğer bir alternatif ajan minosiklidir (Ritchie ve Garavaglia-Wilson, 2014). *A. baumannii*'nin ÇİD ve XDR suşları için alternatif de tigesiklidir. Bu ajanın *A. baumannii*'ye karşı anlamlı in vitro aktivitesi olmasına rağmen, klinik veriler sınırlıdır. Spesifik olarak, *A. baumannii* VAP ve bakteriyemi ile yapılan klinik çalışmalarda, tigesiklin ile tedavi edilen hastalarda etkinliği diğer ajanlara görece daha düşük bulunmuştur (Lee ve ark., 2013). Tetrasiklinler, minosiklin ve tigesikline alternatif, β -laktamaz inhibitörü sulbaktam olabilir (Wong ve ark., 2017). Sulbaktamın önemli bir dezavantajı, direncin yanı sıra klinik kullanımına ilişkin daha fazla araştırmaya gereksinim duyulmasıdır. Dirençli *A. baumannii* enfeksiyonları için en uygun kombinasyon tedavisine ilişkin net bir fikir birliği bulunmamakla birlikte, kapsamlı klinik çalışmalar devam etmektedir (Moubareck ve Hammoudi, 2020).

Bununla birlikte, kolistin dirençli izolatların, özellikle daha önceden bu ilacı almış olan hastalar başta olmak üzere tüm dünyada artış göstermekte olduğu bildirilmiştir (Lima ve ark., 2018). Bu fenotip temelde, lipid A biyosentezini kodlayan genlere ISAbA 11 sekansının girmesinin yanı sıra sekonder olarak lipopolisakkarit üretimindeki kayba bağlıdır. PmrAB, iki bileşenli düzenleyici sistemin (TCS), artmış ekspresyonu, LPS değişiminde diğer bir mekanizma olup kolistin direnciyle sonuçlanmaktadır. İlginçtir ki lipid A'nın negatif yükündeki azalma, kolistine (pozitif yük) olan afiniteyi azaltmaktadır (Moffatt ve ark., 2010).

1.2. Bakteriyofajlar

1.2.1. Bakteriyofajların Keşfi

Bakteriyofajlar, kendilerine özgü bakteriyi hedef alan ve öldürebilen bakteri virüsleri olarak tanımlanmaktadırlar. Faj terimi, Yunanca 'yemek' anlamına gelen fajinden kaynaklanır (Orlova, 2009). Bakteriyofajların varlığı ilk kez M. Ernest Hankin'in 1896 yılında Hindistan, Ganj nehir suları ile yıkanan insanların koleraya yakalanmadıklarını gözlemlemesiyle ortaya çıkmıştır. Frederick Twort 1915 yılında, 'bakterileri enfekte ederek öldüren filtrelenebilir bir etmen' olduğunu düşünmüş ve bakteri yokluğunda büyüemediği tespit edilen bu şeffaf malzeme, Twort tarafından o zamanlar net olmayan bir amaç için mikroorganizma tarafından salgılanan bir ferment olarak tanımlanmıştır. Felix d'Herelle, 1917'de 'dizanteri basilinin görünmez bir mikrobunu' bakteriyofaj olarak adlandırmış ve bakteriyofajların antimikrobiyal etkisini dünyaya duyuran ilk kişi olmuştur (Golkar ve ark., 2014; Wittebole ve ark., 2014). O yıllarda, fajın kesin doğası henüz belirlenmemiştir ve aktif veya canlı oluşuyla ilgili tartışmalar devam etmekteydi. DNA ve RNA'nın temel doğası hakkında bilgi eksikliği nedeniyle, 20. yüzyılın başlarında faj biyolojisi hakkında kapsamlı bir bilgi yoktu. 1938'de John Northrop, bakteriyofajların canlı konakçı tarafından bir oto-katalitik reaksiyonla aktif faja dönüştürülen inert bir protein olduğu sonucuna varmıştır. Elektron mikroskopunun (EM) icadı ile Alman doktor Helmut Ruska'nın, bakteri zarına yapışan bir faj süspansiyonundan 'sperm şeklindeki' parçacıkları tanımlaması ile yapısı hakkında bilgi sahibi olunmuştur (Wittebole ve ark., 2014).

Klinik olarak ilk kez 1919 yılında Felix D'Herelle tarafından Fransa'da kullanılmıştır. Pastör Enstitüsünde Felix D'Herelle ile birlikte çalışan George Eliava, Gürcistan'da bir faj enstitüsü ve terapi merkezi kurmayı planlamış ve 1923 yılında Bakteriyofaj, Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü'nü kurmuş ve bir süre burada Felix

D'Herelle ile birlikte çalışmışlardır. 1928 yılında antibiyotiklerin keşfi ile Batı dünyası için önemini yitirmiş ve patojen bakterilere karşı antibiyotik çağı başlamış olsa da antibiyotik erişimi olmayan doğu ülkeleri (özellikle SSCB ülkeleri) Salmonella, Shigella gibi enfeksiyonlarda faj kullanımını sürdürmüşlerdir. Finlandiya Soğuk Savaş yıllarında (1938-1940), Krestnikova adlı araştırmacı profilaktik olarak faj preparatları hazırlamış ve ampütasyonu 3 kat azaltmıştır. Yine İkinci Dünya Savaşı sırasında, Eliava Enstitüsü'nün uzmanları, özellikle yaraları, kangreni ve kolera gibi hastalıkları tedavi etmek için askerlere farklı faj kombinasyonları (kokteylleri) sağlamıştır (Chanishvili, 2012).

Antibakteriyel materyal olarak kullanılması düşünülmüş olan bakteriyofajlar, Gürcistan, eski Rusya, ABD ve Polonya gibi az sayıda ülkede üst solunum yolları enfeksiyonu, apse, yanık, iltihaplı yaralar gibi birçok hastalığın tedavisinde 1940'lı yıllara kadar kullanılmıştır. Antibiyotiklerin kullanılmaya başlanması ile birlikte bakteriyofaj tedavisi geri planda kalmış ancak Sovyet hattı Ülkelerinde 1990'ların başında iç savaş devam ederken *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. pyogenes* bakterilerine karşı askerlerin tedavisinde kullanılmaya devam edilmiştir (Bruttin ve Brüssow, 2005).

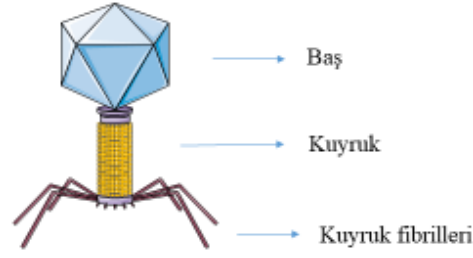
1.2.2. Bakteriyofaj Biyolojisi

Bakteriyofajlar, biyosferin her yerinde; volkanik alanlar gibi kısıtlayıcı ortam şartlarında dahi bulunabilmektedirler (Breitbart ve Rohwer, 2005). Bakteriler deniz suyu, tatlı su ve toprak gibi hemen hemen her ortamda bulunabilmekte, bu yüzden bakteriyofajların da konağının bulunduğu herhangi bir yerde bulunması beklenmektedir. Doğada yaklaşık sayılarının 10^{32} olduğu tahmin edilmekle birlikte dışkı, lağım suları, dereler, göller, gübreli topraklarda sık rastlandığı bildirilmektedir. Bakterilerde olduğu gibi, bakteriyofajlar da çoğunlukla sindirim kanalı, vajina, solunum ve ağız yolu, deride ve mukozal epitelde bulunmaktadır (Domingo-Calap ve Delgado-Martinez, 2018; Sabouri Ghannad ve Mohammadi, 2012).

Fajlar, doğal ortamlar dışında hastaneler gibi insanların yaşadığı yapay yerlerde veya altyapılarda da bulunabilir, bu da doğal yerlerin tek faj kaynağı olmadığını göstermektedir. Hastane kanalizasyonu özellikle iyi bir faj rezervuarıdır. Dirençli bakteriler hakkında çok sayıda makalede açıklandığı gibi, tıp merkezlerinin atık sularından izole edilen fajlar, hastalıklara neden olan dirençli bakterilere karşı kullanılmaktadır. Ek olarak, klinik materyaller veya tıbbi cihazlar da faj kaynağı olabilmektedir (Lood ve ark., 2017; Peng ve ark., 2014).

1.2.3. Bakteriyofajların Yapısal Özellikleri

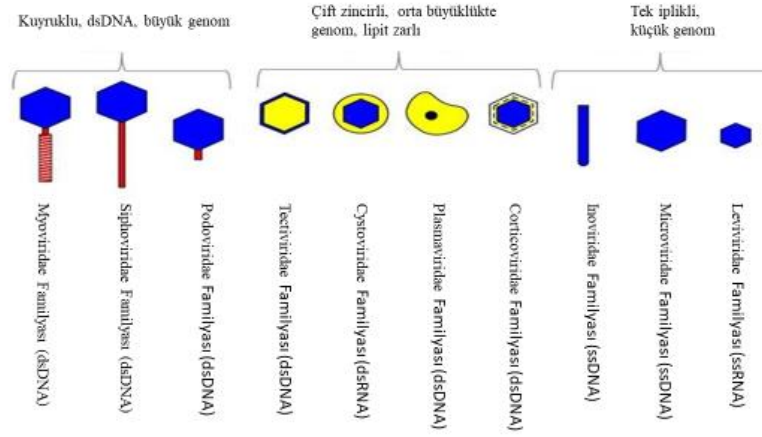
Bakteriyofajlar baş, boyun, kuyruk ve kuyruk fibrillerinden meydana gelmektedir (Şekil 1.1). Baş kısmı kapsit adı verilen protein kılıf ile çevrili nükleik asitleri içeren ikozahedron forma sahiptir. Nükleik asitler, çift veya tek iplikli DNA ya da RNA'dan oluşabilmektedir. Baş kısmı, kasılabilen veya kasılmayan kuyruk ile uzak ucu bakteri hücre yüzeyindeki bağlantı reseptörlerini tanıyan kuyruk fibrillerine bir yaka vasıtasıyla bağlanır. Kuyruk fibrilleriyle bakteri hücre duvarındaki özgül reseptörlere adsorbe olan bakteriyofajlar, nükleik asidini kuyruk yardımıyla bakteriye enjekte ederek yaşam döngülerini tamamlarlar. Kuyruklu, polihedral, filamentöz veya pleomorfik şekilde olabilmektedirler. Tüm kuyruklu bakteriyofajlar çift sarmallı DNA yapısına sahiptir (Ackermann, 2009b; Guttman ve ark., 2005; Orlova, 2012; Sulakvelidze ve ark., 2001).



Şekil 1.1. Bakteriyofaj yapısı.

1.2.4. Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Bakteriyofajlar önceleri konak spektrumları, serolojik özellikleri ve morfolojik yapılarına göre karakterize edilmiş, ancak günümüzde bunlar tanımlama için yeterli kriterleri oluşturamadıklarından moleküler düzeyde çalışmalara ağırlık verilmiştir (Ackermann, 2009b). 1943 yılında H. Ruska, virüslerin elektron mikroskobu ile sınıflandırılmasını önermiştir. Holmes, 1948'de virüsleri üç aileye ayırmış ve Phagineae familyasını fajlar oluşturmuştur. 1965 yılında Geçici Virüs İsimlendirme Komitesi (PCNV) kurulmuş ve daha sonra Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) haline gelmiştir. ICTV' nin 1971 yılında yayınlanan raporunda 6 bakteriyofaj cinsini, türlerin tip ve özelliklerine göre "T-çift fajlar, lipid fajı PM2, f X grubu, lifli faj ve ribofaj" olarak listelemiştir (Ackermann, 2012). Bu bakteriyofaj sınıflandırmasının başlangıç noktası olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde ise, ICTV 1 takım, 14 aile, 204 cins ve 873 bakteriyofaj türü tanımlamıştır (Adriaenssens ve Brister, 2017). Temel bakteriyofaj ailelerinin morfolojik ve genom karakteristikleri Şekil 1.2'de verilmiştir.



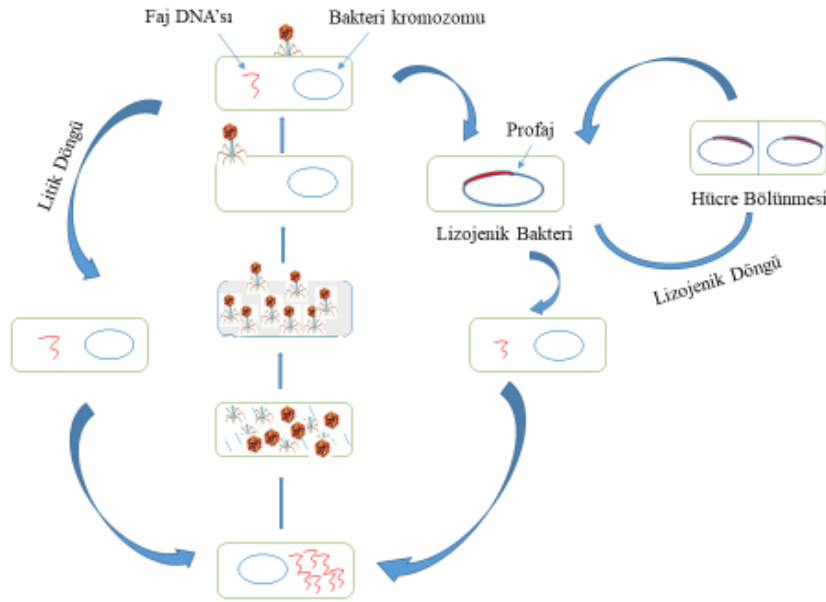
Şekil 1.2. Temel bakteriyofaj ailelerinin morfolojik ve genom karakteristikleri (Hyman ve Abedon, 2012).

1.2.5. Bakteriyofajların Çoğalma ve Replikasyonu

Bir bakteri hücresinin zorunlu hücre içi paraziti olan fajlar bakteriyel konakta litik, lizojenik, yalancı lizojenik ve kronik enfeksiyon gibi farklı yaşam döngüleri göstermektedirler. Litik yaşam döngüsündeki bakteriyofajlar virülan (litik) bakteriyofajlar, lizojenik yaşam döngüsündeki bakteriyofajlar ılımlı (lizojenik) bakteriyofajlar olarak tanımlanmaktadır (Sulakvelidze ve ark., 2001).

Litik yaşam döngüsü adsorpsiyon, penetrasyon, biyosentez ve lizis evrelerinden oluşmaktadır. Lizojenik döngüde ise viral DNA genellikle konak hücre DNA'sıyla birleşmekte, bakteriyel DNA replikasyona uğrarken aynı anda bakteriyofaj DNA'sı da çoğalmakta ve böylece yeni hücre 'profaj' viral DNA içermektedir. Lizojenik yaşam döngüsündeki bakteriyofajlar (profaj) bakterinin, bazı fiziksel ya da kimyasal indükleyiciler ile muamele edilmesi sonucu dışarı çıkarılarak virülan bakteriyofaj formuna dönüşebilmektedir (Guttman ve ark., 2005).

Litik bakteriyofajlar tercihen iki ana nedenden ötürü bakteriyofaj terapisinde seçilmektedirler. Öncelikle, litik bakteriyofajlar konakçı bakterilerini tahrip ederken, ılımanlar edemezler. İkincisi, ılıman bakteriyofajlar, bakteriyofaj genomunun bakteri genetik materyali ile birleştiği ve çoğaldığı yaşam döngüsünden dolayı virülans ve direnç genlerini aktarabilirler. Bununla birlikte kısa replikasyon süreleri ve sadece kendi spesifik konaklarında çok sayıda viral progeni elde etme kabiliyetleri, patojenik olmayan bakterilerde hasar oluşturmamaları (ekolojik olarak güvenlidir ve bilinen hiçbir yan etkisi yoktur), hızlı ve düşük maliyetli üretimleri bakteriyofaj kullanımının avantajları arasında sayılabilmektedir (Domingo-Calap ve Delgado-Martinez, 2018).



Şekil 1.3. Bakteriyofaj yaşam döngüleri.

1.2.6. Bakteriyofajların Kullanım Alanları

Hızla yeni antibiyotiklerin keşfi ve elde edilen başarılı sonuçlara rağmen aynı oranda ortaya çıkan direnç ve günümüzde bazı bakteri suşlarının neredeyse tüm antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesi bakteriyofajlara olan ilgiyi yeniden

arttırmıştır. Bakteriyofajların en yaygın kullanım alanı faj terapisi olmakla birlikte; çevre ve gıda kontrolü gibi tıp dışı birçok alanda da kullanımına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (Regeimbal ve ark., 2016).

Bakteriyofaj uygulamalarının çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda listelenmiştir (Sulakvelidze ve ark., 2001):

- Bakteriyofajlar spesifik etki gösterirler (genellikle sadece hedeflenen bakteri türlerini etkiler); bu nedenle, disbiyoz ve ikincil enfeksiyon geliştirme şansı önlenmektedir.
- Enfeksiyon bölgesinde çoğaltma ve bu nedenle en çok ihtiyaç duyulan yerde hazır bulunma avantajlarına sahiptirler.
- Ciddi yan etkilere neden olmazlar.
- Faj dirençli bakteriler, benzer hedef aralığa sahip diğer fajlara duyarlı olabilmektedir.
- Yeni fajların seçilmesi (örneğin, faja dirençli bakterilere karşı) nispeten hızlı bir işlemdir ve sıklıkla günler veya haftalar içinde gerçekleştirilebilmektedir.

Bakteriyofaj tedavisi sadece beşeri tıpta değil aynı zamanda diş hekimliği, veteriner hekimliği, gıda sektörü ve tarımda potansiyel uygulama alanına sahiptir (Abhilash ve ark., 2008). Özellikle tıbbi alanlarda veya klinik cihazlarda dezenfeksiyon, bakteri identifikasyonu, bakteri suşlarının alt tiplerinin belirlenmesi, gıda ve hayvancılık gibi pek çok alanda koruma ve ıslah çalışmalarında kullanılabilmektedirler (Kazi ve Annapure, 2016). Faj bazlı aşılama bakteriyofaj partiküllerinin kullanılması ile birlikte bitki ve hayvan gen transfer yöntemleri, gen aktarımı, bakteri biyosensing cihazları, gıda koruma ve güvenliği, bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü, biyofilm kontrolü, yüzey dezenfeksiyonu ve korozyon kontrolü en

umut vaat eden önleyici stratejiler olarak ortaya çıkmaktadır (El-Shibiny ve El-Sahhar, 2017; Harada ve ark., 2018).

Her ne kadar fajlar konak spesifik olsalar da, bazıları geniş bir konakçı aralığı sergilemektedir. Buna ek olarak, faj-bakteri etkileşimleri nedeniyle fajlar, biyotik ve abiyotik ortamların biyojeokimyasal döngülerine katılabilmektedir. Bakteriyel parçalanma gerçekleştiğinde, bakteri artıkları ortamda kalır, bir besin kaynağıdır ve karbon, azot ve fosfor döngüleri zenginleşir. Bu nedenle fajlar ekosistemde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, deniz ekosistemlerinde besin alımına katılırlar ve faj parçalanması yoluyla karbon transferini geliştirirler (Domingo-Calap ve Delgado-Martinez, 2018). Bunun yanında bakteriyofajlar, atıksuların kalitesinin arttırılmasında da önemli bir rol oynamaktadır. Hastane atık suları, kanalizasyon suları ve bazı bölgelerde yoğun kirletici etkisi altında olan akarsuların temizlenmesinde bakteriyofajların kullanılabileceği, yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Beheshti Maal ve ark., 2015; Tanji ve ark., 2003).

Gıda güvenliği, biyopestisit olarak kullanımı, probiyotik ürün hazırlama, kozmetik ve diş bakımında, hayvan gıdaları ve gıda takviyelerinde, bitki enfeksiyonlarında, hayvan sağlığı ürünlerinde, hastalıkların hızlı tanısında da kullanılabilmektedirler (Rohde ve ark., 2018).

Bakteriyofajların bakteriyel popülasyonları kontrol etme yeteneği, tıptan gıda endüstrisine, tarımdan su ürünleri yetiştiriciliğine kadar çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Atık su kalitesini artırmak için atık su arıtımında bakteriyofaj tabanlı tekniklerin kullanılması ve çamurun çevreye salınması, Ar-Ge uygulaması için potansiyel bir alandır. Doğal kaynaklardan bakteriyofajların izolasyon, sayım ve karakterizasyonu için kullanılan yöntemler standart mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanması kolay yöntemlerdir. Ancak, büyük ölçekli bakteriyofaj süspansiyonları üretimi için gerekli saflaştırma yöntemlerini literatürde bulmak zordur (Sharma ve ark., 2016).

1.2.7. Bakteriyofaj Terapisi

Bakteriyofaj tedavisi, yalın ifade ile enfeksiyondan sorumlu bakterilere karşı tedavi amaçlı fajın uygulanmasıdır. Belli oranda saflaştırılmış fajın hastaya verilmesi sonrasında, fajın enfeksiyon etkeni ile antagonistik yarışa girmesi ve patojeni kısa sürede yok etmesi, bu tedavinin temelini oluşturmaktadır. Fajlar bakteriyi üzerindeki reseptörlerden tanıyarak spesifik olarak bağlanır, bu bağlanma genellikle sadece bir bakteri türünü, hatta suşu hedefler. Ardından faj, genomunu bakteri içine enjekte eder ve kendi genlerini eksprese ettirir. Tedavide kullanılan litik fajlarda hedef bakteri parçalanarak yüzlerce faj progenisinin salınımı gerçekleşmektedir. Bu süre faj türüne göre değişmekle birlikte, genelde 15 dakikadır. Salınan faj progenisinin ortamdaki diğer bakteri hücrelerini enfekte etmesiyle litik döngü sürüp gitmektedir (Harper ve ark., 2014).

Bakteriyofajlar, antibiyotiklere dirençli ve hayatı tehdit edici enfeksiyonlara neden olanlar da dâhil olmak üzere farklı bakterileri yok edebilmektedir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde fajların potansiyelini belirleyen bu istisnai özelliktir (Sulakvelidze ve ark., 2001). Ayrıca fajlar etki spektrumu dışında kalan bakterilere etkisiz olduğu için antibiyotiklerin normal floraya olan olumsuz etkilerini göstermezler (Kochetkova ve ark., 1989). Bakteriyofaj tedavisinde en önemli iki etkenden biri fajın güçlü litik etkisinin olması, diğeri ise fajın konak hücreye özgüllüğünün yüksek olmasıdır (Lyon, 2017).

Bakteriyofajlar, cilt enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, bakteriyel dizanteri, septisemi, yenidoğan menenjit, yenidoğan sepsisi, abse, osteomyelitis, nazal mukoza enfeksiyonları, pleural enfeksiyonlar, solunum yollarının supuratif enfeksiyonları, stafılakokal akciğer enfeksiyonları, kistik fibrozis, peritonit, frunkulozis, kanser

olgularında postoperatif enfeksiyonlar, üriner enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilmektedirler (Lin ve ark., 2017).

Faj terapisinin ana uygulaması, hastalıkta veya enfeksiyonda rol oynayan patojenik bakterileri öldürmenin yanı sıra biyofilm oluşturanları ortadan kaldırmak için terapötik bir madde olarak kullanılmasıdır. Özellikle faj kokteyllerinin biyofilmin giderilmesinde etkin olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Pires ve ark., 2017).

Faj terapisi ile ilgili son yıllarda yapılmış en kapsamlı çalışma 2013 yılında Avrupa Birliği'nin desteklediği *E. coli* ve *P. aeruginosa* ile enfekte yanık yaralarında faj terapisinin değerlendirilmesini içeren Phagoburn projesi, 2017 yılında sona ermiş ve sonuç raporu yayınlanmıştır. Çalışma 7 farklı yanık merkezinde randomize, çift kör seçilmiş *P. aeruginosa* ile enfekte yanık yaralarına sahip 27 hasta üzerinde, Faz 1/2 çalışmasıdır. Tedavide 12 faj ile hazırlanan faj kokteyllinin, yanık yaralarında kullanılan gümüş sülfadiazine karşı 7 günlük tedavi etkinliği karşılaştırılmış ve hastalar 14 gün takip edilmiştir. Çalışma sonunda faj bazlı ürünlerin GMP (good manufacturing practices) standardına göre üretilebileceği, GMP faj ürünlerinin istenmeyen yan etkilerden yoksun olduğu ve yanık yaralarındaki patojen yükünü önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Jault ve ark., 2019).

Antimikrobiyallere alternatif, umut vaat edici bir ajan olarak faj terapisine yönelik talepler yıllar içinde önemli ölçüde artmıştır. Günümüzde sınırlı sayıda merkezde faj terapi uygulamaları yapılmaktadır. Bakteriyofajlar tedavide, 'Helsinki Bildirgesi İnsan Deneklerde Tıbbi Araştırmalar Etik İlke Kuralları' gereği, ruhsatlandırılmış ve ulaşılabilir tıbbi ürünlerle standart bir terapisi olmayan acil hastalarda, sadece diğer ülkelerde ruhsatı olan/olmayan ilaçların kullanımına izin veren, insani amaçlı ilaca erken erişim 'Compassionate Use' adlı bir tedavi seçeneği altında uygulanabilmektedir. Ancak, Avrupa İlaç Ajansı (EMA), Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) ve Ülkemiz yönetmelikleri, insani amaçlı ilaca erken erişim programı kapsamındaki ilaçların, ruhsat başvurusunun yapılmış ya da klinik

araştırmalarının devam ediyor olmasını zorunlu kılar. Bakteriyofajların bu gereksinimleri karşılamaması nedeniyle, insani amaçlı ilaca erken erişim sadece Belçika, Fransa ve ABD gibi belirli bir düzenlemeye sahip ülkelerde ve 1930'lerden günümüze bakteriyofaj terapisinin sağlandığı Polonya, Gürcistan ve Rusya gibi ülkelerde mevcuttur. Dünyanın geri kalanında bakteriyofaj terapisine erişim, klinik çalışmalardan elde edilen sonuçların olmaması nedeniyle engellenmektedir. Bununla birlikte, sonuçları hala açıklanmamış olmasına rağmen, halen devam etmekte olan çok sayıda klinik araştırma mevcuttur (Álvarez ve ark., 2019; Aydın, 2018; Patey ve ark., 2018).

Bakteriyofajlarla yapılan dekontaminasyon ve tedavilerde, bakteriyofajların özgül etkileri nedeniyle lokal bakteriyofajlar önem taşımaktadır. Bu nedenle bir bakteriye karşı farklı coğrafi alanlardan ve farklı örneklerden faj izolasyonu yapılması oldukça önem taşımaktadır. Fajlarla yapılan dekontaminasyon ve tedavilerde lokal fajlar önemli olduğu gibi faj çeşitliliğinin arttırılması açısından da çok sayıda farklı alandan örnek alınması önemlidir (Boyd ve Brüssow, 2002). Bu nedenle her ülkenin kendi enfeksiyon etkenlerine karşı elde ettiği bakteriyofajlarla oluşturduğu bakteriyofaj koleksiyonunun önemi giderek artmaktadır. Bu koleksiyonun oluşturulmasında çok sayıda farklı alandan örnek alınarak çeşitliliğin arttırılması ve spektrumu geniş bakteriyofajlar elde edilmesi uygulamanın başarısı açısından önemlidir (Rohde ve ark., 2018).

Dünyada farklı ülkelerde bakteriyofaj koleksiyon bankaları bulunmaktadır ve bu bankalar tedavi için bakteriyofajları sunmanın dışında araştırmaları desteklemek için de standardize bakteriyofaj temini sağlamaktadırlar. Dünya genelinde bakteriyofaj terapisi ve farklı alanlarda (Endüstri, Gıda vs.) bakteriyofajların kullanımının araştırılmasına yönelik çalışmaların artmasıyla, bakteriyofaj bankalarının sayısında da artış meydana gelmiş ve artan antibiyotik direncinin de bir sonucu olarak bakteriyofaj terapi merkezleri açılmaya başlanmıştır.

Ludwik Hirszfeld İmmünoloji ve Deneysel Tedavi Enstitüsü ve Eliava Bakteriyofaj Terapi Merkezi en eski ve yerleşik tedavi merkezi iken Belçika'da Queen Astrid Askeri Hastanesi, Amerika California San Diego Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde de terapi merkezleri kurulmaya başlanmıştır. Özellikle Eliava Enstitüsü'nde dünyanın her yerinden hastalarla klinik denemeler gerçekleştirmekte ve genellikle bu tedaviler yüksek başarı oranları ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca Enstitü'de terapi, hastalıkları önleme, veterinerlik, çevre ve gıda kontrol alanlarında da bakteriyofaj çalışmaları yürütülmektedir. Enstitü bünyesinde 4000'den fazla bakteriyofaj tanımlanmış ve uluslararası çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu nedenle, Eliava Enstitüsü günümüzde bakteriyofajlar için önemli bir referans merkezidir. Enstitüde ticari bakteriyofaj preparatları (SES phage, Pyo-Phage, Intesti phage, Enkophage, Staphylococcal monophage, Fersis), otobakteriyofajlar (sıvı, krem, suppozituar formda) ve 32.000'den fazla medikal ürün bulunmaktadır (Patey ve ark., 2018).

Benzer şekilde Belçika'da da uzun süren tartışmalar sonrasında 2018 yılında fajların, hekim tarafından öngörülen tedaviyi kolaylaştırmak için, bireysel hastalara majistral preparat olarak verilmesi kabul edilmiştir. Fajların aktif farmasötik içerik olduğu düşünüldüğünden eczacının gözetiminde monograflara göre hazırlanması gerekmektedir. Queen Astrid Askeri hastanesinde bir birim, faj hazırlaması ve uygulaması yapmaktadır (Patey ve ark., 2018).

1.3. Bakteriyofajların Biyofilm Üzerine Etkisi

Biyofilmler, değişik mikrobiyal türlerin kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları mikro ekosistemler olarak tanımlanabilmektedirler. Biyofilm içinde yer alan mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara, planktonik şekillerine göre 100-500 kat daha dirençli olduğu bildirilmektedir (Gilbert ve ark., 1997). Biyofilmlerin antimikrobiyal ajanlara direnç göstermeleri sonucu yeni biyofilm kontrol stratejileri

geliştirme gereği doğmuştur (Simoes ve ark., 2010). İlaçlar ve bakteriyofajlar arasında öldürme mekanizmaları çok farklıdır. Bu nedenle, antibiyotik ve bakteriyofaj uygulamasının birleştirilmesinin tedaviye etkisi, yakın zamanda yapılan çalışmalarla araştırılmaya başlanmıştır (Rohde ve ark., 2018).

Bakteriyofajların biyofilm içerisindeki bakteriler üzerine antibiyotikler veya biyositlerden daha farklı davranarak biyofilmin ortadan kaldırılması aşamasında dört farklı şekilde etki edebileceği düşünülmektedir (Harper ve ark., 2014).

1. Bakteriyofajlar, konakçı hücrelerinde çoğalır ve bakteriyofaj sayısında lokalize artışlara neden olurlar. Biyofilmin yayılmasıyla, EPS (ekzopolisakkarit) malzemesini üreten bakterileri yok eden bakteriyofajlar, biyofilmi aşamalı olarak ortadan kaldırabilir ve rejenerasyon potansiyelini azaltabilir.
2. Bakteriyofajlar EPS'yi bozan depolimerleştirici enzimleri taşıyabilir veya eksprese edebilir.
3. Bakteriyofajlar, konakçı genomda EPS'yi bozan depolimerleştirici enzimleri indükleyebilir.
4. Persister hücreler bakteriyofajlarla enfekte olabilir; Bakteriyofaj, inaktif hücrelerin içinde çoğalmaz ve yok edemese de, bu bakteriler yeniden aktifleşinceye ve daha sonra hücrelere zarar veren üretken bir enfeksiyonu başlatana kadar kalabilirler.

Faj terapisinde antibiyotiklerin ve bakteriyofajların kombine veya ardışık kullanımının, terapötik uygulamalar için potansiyele sahip olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır. Sharp ve ark. (2006) bakteriyofajların yanında polisakkarit liyaz ve DNAaz enzimlerinin kullanımını biyofilm matrisini bozmak için önermişlerdir (Sharp ve ark., 2006). Yılmaz ve ark. (2013), *S. aureus* 'a bakteriyofaj ve antibiyotiğin birlikte kullanımının etkiyi arttırdığını göstermişlerdir (Yılmaz ve ark., 2013). Benzer şekilde

endüstriyel biyofilmler için Sillankorva ve ark. (2011), her ne kadar fajlar biyofilmlerde bulunan bakteriyel popülasyonları azaltabilirse de, bu biyolojik ajanlar tek başına endüstriyel biyofilmleri kontrol etmek için yeterince etkili olmadığını ancak günümüzde kullanılan biyositler ve dezenfektanlarda olduğu gibi büyük temizleme işlemlerinden sonra geri kalan biyofilmler üzerinde spesifik bakteriyi öldürmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Sillankorva, 2011).

Kendi ulusal etkenlerimize karşı geliştirilecek tedavilerde ve dekontaminasyon çalışmalarında lokal fajlar önemli olduğu gibi faj çeşitliliğinin artırılması açısından da çok sayıda farklı alandan örnek alınabilmesi önemlidir. Bu açığın kapatılması için izole edilmiş yerel fajların morfolojik ve genomik karakterizasyonlarının iyi yapılması ve tüm özellikleri bilinen bir koleksiyon oluşturulması büyük önem taşımaktadır. Artan antibiyotik direncinin bir sonucu olarak faj terapisi ve farklı alanlarda (Endüstri, Gıda vs.) fajların kullanımının araştırılmasına yönelik çalışmalar da artmıştır. Bu nedenle Ülkemizde de kendi enfeksiyon etkenlerimize karşı tedavi ve dekontaminasyon çalışmalarında kullanılmak üzere faj elde edilmesi, karakterize edilmesi ve klinik potansiyellerinin araştırılması son derece önemlidir.

Çevresel fajların muazzam çeşitliliği nedeniyle, bir faj kokteyli tasarlamak, kombine antibiyotik tedavisi için bir rejim tasarlamaktan önemli ölçüde daha karmaşıktır. Faj kokteyli bileşimi, faj tedavisinin başarısı için kritiktir. Faj kokteyllerini her enfeksiyon için özelleştirmek, zaman alıcı ve maliyetlidir. Kokteyl tasarımında faj yaşam döngüsü de hesaba katılmalıdır. Lizojenik fajlar, bağırsak viromunun çoğunluğunu oluşturan profajlarla, bağırsak mikrobiyotasında çok yaygın görülmektedir. Terapötik açıdan ümit vaat eden bazı lizojenik fajların, patojenik bakterilerdeki virülans genlerini susturmada etkili olduğu bildirilmiştir (Lin ve ark., 2017).

Yapılan literatür taramaları sonucu *A. baumannii*'ye litik etkili bakteriyofaj bildirimi çok sınırlıdır. Bu çalışma kapsamında farklı çevresel örneklerden izole

edilecek bakteriyofajların karakterizasyonunun yapılarak literatüre katkı sağlanması ve *A. baumannii* biyofilmi üzerine antibiyotik ve bakteriyofaj uygulamasının farklı kombinasyonlarının etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. *A. baumannii* İzolatlarının Temini

Çalışma kapsamında farklı klonlara ait *A. baumannii* izolatlarının hastanelerden alınabilmesi için T.C. SBÜ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, SBÜ Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına dilekçe ile başvuruda bulunulmuş ve alınan izin yazıları da eklenerek Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuru yapılmıştır. 25 Haziran 2018 tarihli ve 11-748-18 Karar no ile Etik Kurul onayı alınmıştır. Alınan etik kurul onayı sonrasında Temmuz 2018- Haziran 2019 tarihleri arasında çalışmada kullanılan 78 *A. baumannii* izolatı hastanelerden temin edilmiştir.

2.1.2. Bakteriyofaj İzolasyon Kaynakları

A. baumannii'ye özgü litik bakteriyofaj izole etmek için, Temmuz 2018- Haziran 2019 tarihleri arasında Ankara'da dere suyu, göl suyu, lağım suyu ve kirli atık su olmak üzere farklı çevresel su kaynaklarından örnekler alınmıştır. Her bir kaynaktan taşıma kaplarına alınan su, bekletilmeden faj izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Çalışmamızda örnek aldığımız çevresel su kaynaklarının 2018 örneklerinde, bakteriyofaj izolasyon şansının düşük olması; atık ve lağım sularından bakteriyofaj

izolasyon başarısının yüksek olması nedeniyle T.C. Ankara Büyükşehir Belediyesi ASKİ Genel Müdürlüğü'ne dilekçe ile atıksu tesisleri girişinden, atıksu örneklerinin alınabilmesi için başvuruda bulunulmuştur. 20/12/2018 tarihli ve 32283655-314.04-E.52522 sayı ile izin yazısı alınmıştır. Alınan izin yazısı sonrası 4 farklı atıksu arıtma tesisinden su alınarak; toplamda 31 su örneği bakteriyofaj izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Kasyon Eklenmiş Müeller Hinton Sıvı Besiyeri (CAMHB) - Millipore, Sigma-Aldrich

Çizelge 2.1. CAMHB besiyeri içeriği (g/L).

Besiyeri içeriği	(g/L)
Sığır Eti İnfüzyonu	3 g
Kazein Hidrolizati	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	17 g

Besiyeri karışımı tartılmış, hacmi 1000 mL distile su içerisinde ısıtılarak homojenize edilmiştir. pH $7,3 \pm 0,2$ 'a ayarlanarak otoklavda 121°C'de, 15 dakika steril edilmiştir.

Luria Bertani Agar (LB Agar) - Merck

Çizelge 2.2. LB agar besiyeri içeriği (g/L).

Besiyeri içeriği	(g/L)
Trypton	10 g
Maya Ekstraktı	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g

Besiyeri karışımından 35 g tartılıp 1000 mL distile su içerisinde ısıtılarak homojenize edilmiş, pH $7,0 \pm 0,2$ 'a ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de, 15 dakika steril edilen besiyeri, 45-50°C'ye soğuduktan sonra yaklaşık 25 mL olacak şekilde petri plaklarına paylaştırılmıştır.

Luria Bertani Broth (LB Broth) – Merck

Çizelge 2.3. LB broth besiyeri içeriği (g/L).

Besiyeri içeriği	(g/L)
Trypton	10 g
Maya Ekstraktı	5 g
NaCl	10 g

Besiyeri karışımından 25 g tartılıp 1000 mL distile suda çözülerek ve pH $7,0 \pm 0,2$ 'a ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de, 15 dakika steril edilmiştir.

Müeller-Hinton Agar (MHA) – Merck

Çizelge 2.4. MHA besiyeri içeriği (g/L).

Besiyeri içeriği	(g/L)
Sığır Eti İnfüzyonu	2 g
Kazein Hidrolizatı	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	17 g
	pH 7,3 ± 0,2

Otoklavda 121°C’de, 15 dakika steril edilen besiyeri, 45-50°C’ye soğuduktan sonra petri plaklarına dökülmüştür.

Yatık Agar

Çizelge 2.5. Yatık agar besiyeri içeriği (g/L).

Besiyeri içeriği	(g/L)
Tripton	10 g
Maya Ekstraktı	5 g
NaCl	10 g
Agar	% 2

Besiyeri karışımı tartılmış, hacmi 1000 mL distile su içerisinde ısıtılarak homojenize edilmiştir. pH 7,0 ± 0,2’a ayarlanarak otoklavda 121°C’de, 15 dakika steril edilen besiyeri buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Yumuşak Agar

Çizelge 2.6. Yumuşak agar besiyeri içeriği (g/L).

Besiyeri içeriği	(g/L)
Trypton	10 g
Maya Ekstraktı	5 g
NaCl	10 g
Agar	% 0,6-0,8

Besiyeri karışımı tartılmış, hacmi 1000 mL distile su içerisinde ısıtılarak homojenize edilmiştir. pH $7,0 \pm 0,2$ 'a ayarlanarak otoklavda 121°C'de, 15 dakika steril edilen besiyeri buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2x YT

Çizelge 2.7. 2x YT besiyeri içeriği (g/L).

Besiyeri içeriği	(g/L)
Trypton	16 g
Maya Özütü	10 g
NaCl (5 M Stok)	8,6 mM

Besiyeri karışımı tartılmış, hacmi 1000 mL distile su içerisinde ısıtılarak homojenize edilmiştir. pH 7,0'a ayarlanarak otoklavda 121°C'de, 15 dakika steril edilen besiyeri buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2.1.4. Kullanılan Boya, Çözelti ve Ayıraçlar

2.1.4.1. Boyalar

Gram Boyama

Çizelge 2.8. Gram boyama.

Boya İçeriği	Boyama Süresi
Kristal Viyole	3 dk
Lugol	2 dk
Alkol	1 dk
Sulu Fuksin	1 dk

Kristal Viyole Çözeltisi

Çizelge 2.9. Kristal viyole çözeltisi (g/L).

Boya İçeriği	(g/L)
Kristal Viyole	1 g
Asit Fenik Kristal	2 g
% 96'lık Etil Alkol	10 mL
Distile Su	100 mL

2.1.4.2. Çözeltiler

Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)

Çizelge 2.10. PBS (g/L).

Tampon içeriği	(g/L)
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na₂HPO₄	1,44 g
KH₂PO₄	0,24 g

Belirtilen tüm maddeler 800 mL distile su içerisinde çözülmüştür. pH değeri HCl yardımıyla 7,4'e ayarlanmış ve hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de, 15 dakika steril edilmiştir.

SM Tamponu

Çizelge 2.11. SM tampon (g/L).

Tampon içeriği	(g/L)
NaCl	5,8 g
MgSO₄.7H₂O	2,0 g
1M Tris-HCl (pH 7.5)	50 mL
% 2 Jelatin Çözeltisi	5 mL
Distile Su	1000 mL

Tampon çözelti 121°C' de, 15 dakika sterilize edildikten sonra buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Fizyolojik Tuzlu Su (Serum fizyolojik)

Çizelge 2.12. Serum fizyolojik (g/L).

Tampon içeriği	(g/L)
NaCl	8,5 g
Distile Su	1000 mL

8,50 g NaCl, 1000 mL distile suda çözülerek hazırlanmış ve otoklavda 121°C’de, 15 dakika sterilize edildikten sonra buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Tris base (1M)

121g Tris Base 800 mL distile suda eritilmiş, yaklaşık olarak 60 mL HCl asit ilave edilerek pH 7,6’ya ayarlanarak karışımın hacmi 1000 mL’ye tamamlanmıştır. 121°C’de 15 dk steril edilmiştir.

Tris-EDTA

Çizelge 2.13. Tris-EDTA (g/L).

Tampon içeriği	(g/L)
Tris-HCl (1 M)	10 mM
EDTA (0,5 M)	1 mM
Distile Su	pH 7,6

%2’lik Uranil Asetat (Sigma-Aldrich)

Ticari olarak temin edilen toz uranil asetat 2 g tartılıp distile su ile hacmi 10 mL’ye tamamlanmıştır. pH 3,5 ± 0.02’a ayarlanmıştır. 0.22 µm por büyüklüğünde

filtreden geçirilip kullanmak için hazır hale gelmiştir. Filtrat karanlık ortamda oda sıcaklığında uzun süre saklanabilmektedir.

2.1.4.3. Ayırıcılar

Oksidaz Ayırıcı

Çizelge 2.14. Oksidaz ayırıcı (g/L).

Tampon içeriği	(g/L)
Tetrametil p-fenilendiamin	0,1 g
Hidroklorür	
Distile Su	10 mL

2.1.5. Kullanılan Araç ve Gereçler

- ESCO Lexicon® II ULT Freezer -80°C Derin Dondurucu
- HETTICH Zentrifugen Universal 320-Santrifüj (50 mL falkon tüpe uyumlu rotora sahip)
- SIGMA 1-15PK Mikrosantrifüj
- FINEPCR Fine Vorteks
- HERAUS İnkübatör
- STIK® Incubator Shaker Series PSE-T150 Çalkalamalı İnkübatör
- GFL Su Banyosu
- HIRAYAMA-Hiclave-HV- 85 L Otoklav
- LEICA ICC50W Mikroskop

- SARTORIUS Hassas Terazı
- BİOSAN Den-1 Mc Farland Okuyucu
- SHIMADZU UV-Visible Spektrofotometre UV-1601
- Thermo Owl Easycast B2 Yatay Elektroforez Sistemi
- Thermo Termal Döngü Cihazı
- FEI marka G2 S Twin 200 kV RTEM Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)
- Thermo Multiscan Fc Mikroplak Okuyucu

2.2. Yöntem

2.2.1. *A. baumannii* İzolatlarının Doğrulanması

Hastanelerin farklı kliniklerinden alınan izolatları doğrulamak amacıyla; Gram boyama ve biyokimyasal testler (Katalaz, Oksidaz) uygulanmıştır. Boyama sonrası mikroskopta, çift veya zincir yapmış kokobasil görünümünde, sporsuz, Gram negatif bakteriler seçilerek; oksidaz negatif ve katalaz pozitif olanlar çalışmaya dâhil edilmiştir. İzolatların taze kültürlerinden stokları yapılarak, -80°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.1.1. *A. baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Hastane izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının doğrulanması EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır (Testing, 2016).

Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri: Ampisilin-sulbaktam (AMP) 10 µg, Piperasilin-Tazobaktam (TPC) 100/10 µg, Ceftazidim (CEF) 30 µg, Cefepim (FEP) 30 µg, Cefaperazon-Sulbaktam (CES) 25 µg, İmipenem (IPM) 10 µg, Meropenem (MEM) 10 µg, Amikasin (AMI) 30 µg, Gentamisin (GN) 10 µg, Ciprofloksasin (CIP) 5 µg, Levofloksasin (LEV) 5 µg, Trimetoprim-Sulfametoksazol (TMP) 25 µg, Tigesiklin (TGC) 15 µg. Kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır. Sonuçlar EUCAST Klinik Sınır Değer Tablosu 2020-01-01 verilerine göre duyarlı (S) ve dirençli (R) olarak yorumlanmıştır.

2.2.2. Konak Bakterinin Zamana Bağlı Üreme Eğrisinin Oluşturulması

Konak bakterinin zamana bağlı üreme grafiği çıkartılmıştır. Bunun için x2 YT besiyerine konak bakterinin taze kültürü eklenerek, 120 rpm, 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Belirli saat aralıklarında, 600 nm dalga boyunda besiyerinin absorbans değerleri ölçülmüş, bakterinin ikiye katlanma zaman değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanarak üreme eğrisi oluşturulmuştur.

$$\text{Doubling Time (İkiye Katlanma Zamanı)} = \text{Süre} \cdot \log(2) / \log(\text{Son Konsantrasyonu}) - \log(\text{Başlangıç Konsantrasyonu})$$

2.2.3. Bakteriyofaj İzolasyonu

Bakteriyofaj izolasyonu için önce faj zenginleştirme yapılmıştır. Alınan çevresel su örnekleri 10.000 rpm’de santrifüj edilerek içeriğindeki partiküller uzaklaştırılarak süpernatant, 0,22 µm membran filtreden geçirilmiştir. Taze bakteri kültürleri CaCl₂ ve MgSO₄ ile zenginleştirilmiş x2 LB sıvı besiyerine ekilerek 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İkinci gün süspansiyon 10.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilip, % 10 kloroform ilavesi ile süpernatantta kalan bakterilerin ölmesi sağlanmıştır (Kropinski ve ark., 2009; Oliveira ve ark., 2016).

2.2.3.1. Bakteriyofaj Varlığının Belirlenmesi

Olası faj varlığının belirlenmesi için spot test yöntemi uygulanmıştır. Taze bakteri kültüründen şerit ekim yapılarak, faj süspansiyonundan ekim yapılan bölgelere 10'ar µL damlatılmış, bir gecelik 37°C'de inkübasyon sonrası ekim yerlerinde zon varlığı değerlendirilmiştir (Adams, 1959).

Spot test sonucu zon görülen örneklerde faj varlığının belirlenmesi amacıyla, çift tabaka agar yöntemi uygulanmıştır. Bunun için logaritmik fazdaki taze bakteri kültüründen 0,1 mL, 0,2 mL süpernatant ve 3 mL yumuşak agar (% 0,6 agar) karıştırılmıştır. Faj-bakteri adsorbsiyonun için 10 dakika beklenmiş ve daha önceden dökülüp donması beklenen agar plak (% 1,5 agar) üzerine yayılması sağlanarak, 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün petriler faj plaklarının varlığı yönünden değerlendirilmiştir (Merabishvili ve ark., 2009; Oliveira ve ark., 2016).

2.2.3.2. Tek Plak İzolasyonu

Bakteriyofaj plağı tespit edilen petrilerde saflaştırma için tek plak izolasyonu yapılmıştır. Oluşan plaklar steril pastör pipeti veya öze ucu ile bulundukları bölgelerden kesilerek 3 mL LB sıvı besiyeri içine atılmıştır. Üzerine taze bakteri kültüründen eklenerek 10 dakika faj-bakteri adsorbsiyonu için beklenir ve 3 mL daha LB sıvı besiyeri eklenerek 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün faj süspansiyonu, 5000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek 0,22 µm'lik membran filtreden geçirilmiştir. İleri dilüsyonları yapılarak her bir dilüsyona çift tabaka agar yöntemi uygulanmıştır. Petride tek tip faj plağı görülmesi hedeflendiğinden, tek tip faj plağı görülmeyen örnekler için bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır (Russell ve Sambrook, 2001; Sasikala ve Srinivasan, 2016).

2.2.3.4. Bakteriyofaj Konsantrasyonunun Arttırılması

Saf olduğu düşünölen faj plakları için, konsantre faj süspansiyonu hazırlanmıştır. Bunun için faj ile konakçısının birlikte en uygun üremeyi gerçekleştirdikleri faj dilüsyonuna çift tabaka agar yöntemi uygulanmıştır. Ertesi gün yumuşak agar kısmı alınarak vortekslenip üzerine kloroform ilavesi ile bakterilerin ölmesi sağlanmıştır. Her bir örnek için titrenin, çift tabaka agar yöntemi ile ‘plak oluşturan birim’ (pob) olarak belirlenmesi hedeflenmiştir (Merabishvili ve ark., 2009).

2.2.3.5. Bakteriyofajların Konak Aralıklarının Belirlenmesi

Eş zamanlı olarak tek tip olarak konsantre edilen fajların konak aralıklarını belirlemek için spot test (damlatma) yöntemi uygulanmıştır. Hastane izolatlarının taze kültürlerinden 10^8 kob/mL konsantrasyonda şerit ekim yapılarak, saf fajların 10^8 pob/mL dilüsyonlarından bu bölgelere 10’ar µL damlatılmıştır. Bir gece inkübasyon sonunda ekim yerlerinde üremenin olmadığı bölgeler etki yönünden +++: Tam lizis, ++: Lizis bölgesinde tek tük bakteri, +: Lizis bölgesinde çok sayıda bakteri, -:Lizis yok olarak değerlendirilmiştir (Garbe ve ark., 2010).

2.2.3.6. Bakteriyofajların Morfolojik Karakterizasyonu

Seçilen bakteriyofajların morfolojik karakterlerini ortaya çıkarmak için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak görüntöleme yapılmıştır. Seçilen 3 bakteriyofaj, % 2’lik uranil asetat ile negatif boyanarak formvar kaplı karbon grid üzerinde 120 kV’da incelenmiştir. Burada 2 farklı teknik ile görüntü aranması denenerek en iyi görüntü alınan yöntem ile çalışmaya devam edilmiştir. Çalışmanın

bu kısmı A.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü'nün TEM cihazı kullanılarak yapılmıştır (Ackermann, 2009a).

2.2.3.7. Bakteriyofajların Saflaştırılması

Bakteriyofajların genomlarının yeterli miktarda ve saf olarak elde edilebilmesi için en uygun koşullar denenerek çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda kloroform, NaCl ve PEG 8000'in farklı oranlarında denemeler yapılarak seçilen her bir bakteriyofaj için saflaştırma optimizasyonu yapılmıştır. Elde edilen pürifikasyon ürünleri SDS-PAGE gradient jel elektroforezinde ve bakteriyofaj genom eldesinde kullanılmıştır (Peng ve ark., 2014).

2.2.3.8. Etkin MOI (İnfeksiyon Çokluğu) Tespiti

Bakteriyofaj genom eldesinde kullanılmak ve yüksek oranda bakteriyofaj ürünü elde etmek amacıyla bakteriyofaj ile konak bakterisinin en verimli birleşmeyi gösterdiği oran, İnfeksiyon Çokluğu (MOI) değeri saptanmıştır. Bunun için bakteriyofaj stoğunun LB sıvı besiyeri içinde 10 kat dilüsyonları hazırlanmıştır. Her birine konak bakteriden 10^8 kob/mL konsantrasyonda eklenerek 37°C'de çalkalamalı inkübasyona bırakılmış, iki zaman noktasında bakteriyofaj titresi belirlenmiştir (Peng ve ark., 2014). Bakteriyofaj titresi çift tabaka agar yöntemi ile belirlenmiş ve ürünler daha önce tespit ettiğimiz pürifikasyon prosesi uygulanarak SDS-PAGE gradient jel elektroforezde yürütülmüştür.

2.2.3.9. Bakteriyofajların Adsorbsiyon Oranlarının Belirlenmesi

1,8 mL 1×10^8 kob/mL taze bakteri kültürü ile 0,2 mL 10^7 pob/mL bakteriyofaj karıştırılmıştır. Kontrol tüpü olarak 0,9 mL LB sıvı besiyeri ile 0,1 mL 10^7 pob/mL faj eklenmiş her iki tüp 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. 0, 3, 5, 10 ve 15. dakikalarda 0,1 mL örnek alınarak, içinde 0,4 mL kloroform bulunan soğuk 9,9 mL sıvı besiyerine aktarılıp vortekslenmiştir. Bu tüplerden 0,1 mL alınarak 0,9 mL sıvı besiyerinde dilüe edilmiş; son olarak her tüpten 0,2 mL alınarak içinde 0,1 mL bakteri kültürü bulunan tüplere eklenerek çift tabaka agar yöntemi uygulanmıştır. Ertesi gün adsorblanmamış faj plakları sayılarak;

$$(P_n / P_o \times 100)$$

P_n : Adsorlanmamış faj sayısı, P_o : Kontrol petrisindeki plak sayısı

formülü ile adsorblanmamış faj yüzdeleri hesaplanmıştır (Sophio ve ark., 2013).

2.2.3.10. Bakteriyofajların Üreme Karakterlerinin Ortaya Konması

Fajların üreme karakterlerini (latent periyot, yükselme periyodu ve patlama boyutu) belirlemek için tek aşamalı gelişim eğrisi çıkarılmıştır. Bunun için; 0,1'lik bir MOI'ye ulaşılacak şekilde bakteriyofaj ve konak bakteri kültürü karıştırılmıştır. Karışım, tam adsorpsiyona izin vermek için 37°C 'de 15 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra 15,000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar atılmış, absorbe edilmemiş bakteriyofajların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Peletler LB sıvı besiyeri içinde yeniden süspanse edilerek 37°C 'de inkübe edilmiştir. Her 10 dakikada 100 μL örnek alınarak 90. dakikaya kadar örnek alımına devam edilmiştir. Alınan örneklerden bakteriyel hücreleri uzaklaştırmak için 1 dakika 15,000 g'de santrifüj edildikten sonra serbest bakteriyofajlar titre edilmiştir. Başlangıçta (0. dakika) ek bir 100 μL örnek alınmış bunun yarısı (50 μL) santrifüjlenmiş ve kalan yarısı santrifüj edilmeden her iki

örnekteki bakteriyofaj titresi hesaplanmıştır. Enfekte hücreler, santrifüj edilmemiş kısmın bakteriyofaj sayısından, santrifüjlenen kısmın bakteriyofaj sayısının çıkarılmasıyla hesaplanmış, ardından maksimal progen sayısının enfekte olmuş hücre sayısına bölünmesiyle patlama boyutu hesaplanmıştır (Peng ve ark., 2014).

2.2.3.11. Bakteriyofajların Ortam Şartlarına Dayanıklılıkları

Fajların (10^6 pob/mL) pH ve termal stabilitelerini değerlendirmek için; pH 4 altı ve pH 9 üstü değerleri 30 gün boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de test edilmiştir. Faj titreleri çift tabaka agar yöntemi ile 1, 2 ve 30. günlerde ölçülmüştür. Kontrol olarak pH 7,5'a ayarlı, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen örnek kullanılmıştır. Termostabilitenin değerlendirilmesi için faj süspansiyonunun (10^6 pob/mL) 25, 40, 50, 60 ve 70°C 'ye 3 saat maruziyeti değerlendirilmiştir. Sonuçlar, her zaman noktasında pH 7,5 olan, $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki örnek titresi ile kıyaslanmıştır (Jeon ve ark., 2016).

2.2.3.12. Bakteriyofajların Protein Profilleri

Bakteriyofajların saflaştırma prosesi uygulanan ürünleri SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez) gradient jel elektroforezinde protein yapıları görüntülenerek yorumlanmıştır. Bu amaçla, gradient jel Çizelge 2.15 ve Çizelge 2.16'ya uygun olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteriyofajlar, örnek yükleme tamponu (Çizelge 2.17) ile karıştırılarak jelle yüklenmiştir. Yürüme sonrası jeller fiksasyon işlemine tabi tutulmuş; Coomassie mavisi ile boyanma sonrası asetik asit ile boya giderilerek görüntü alınmıştır.

Çizelge 2.15. SDS-PAGE ayırım jeli içeriği.

	Stok		Çalışan	
TrisCl pH 8.8	1,000	M	0,375	M
Acrylamide stock	50,000	%	12,000	%
Bis-acrylamide	10,000	%	0,400	%
SDS	20,000	%	0,100	%
APS	10,000	%	0,050	%
TEMED	100,000	%	0,050	%
H2O				

Çizelge 2.16. SDS-PAGE yığılma jeli içeriği.

	Stok		Çalışan	
TrisCl pH 6.8	1,000	M	0,125	M
Acrylamide stock	50,000	%	3,750	%
Bis-acrylamide	10,000	%	0,125	%
SDS	20,000	%	0,100	%
APS	10,000	%	0,050	%
TEMED	100,000	%	0,050	%
H2O				

Çizelge 2.17. Örnek yükleme tampon içeriği.

	Stok		Çalışan		10,000	ml
TrisCl pH 6.8	1,000	M	0,313	M	3,125	ml
Gliserol	100,000	%	30,000	%	3,000	ml
SDS	20,000	%	5,000	%	2,500	ml
2-Merkaptoetanol	100,000	%	0,500	%	0,050	ml
Bromfenol Mavisi	1,000	%	0,003	%	0,025	ml
H2O					1,300	ml

2.2.3.13. Bakteriyofajların Tüm Genom Analizi

Bakteriyofaj DNA izolasyonu, bakteri genom eldesinde kullanılan prosese göre yapılmıştır. Saflaştırılmış PCR ürünleri Tris HCl (pH 8) ile 1:20 oranında dilüe edilmiştir. Dilüe edilen her bir PCR ürününün kalite kontrol işlemlerinde spektrofotometrik ve florometrik yöntemler kullanılarak, miktar ve saflık tayini yapılmıştır. Ölçümlerde NanoDrop 2000 (Thermo Fisher) ve Qubit (Thermo Fisher) kullanılmıştır. Numune başlangıç şartı olarak >50 ng/ μ l (10 μ l); $\sim 1,8^{260/280}$ ve $>1,8^{260/230}$ belirlenmiştir.

Kütüphane hazırlık basamağında Nextera DNA Flex Library Prep Kit (illumina) kullanılmıştır. Kütüphane hazırlık sürecinde sırasıyla, fragmentasyon, index/barkod dizilerinin eklenmesi, amplifikasyon ve pürifikasyon işlemleri üretici firmanın kit yönergeleri takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Dizileme çalışmasında illumina NextSeq 550 (illumina) yeni nesil dizileme platformu ve uygun reaktifleri kullanılmıştır. Bu basamakta örnek başı ~ 2 milyon çift yönlü (paired-end) 2 x 150 bp'lık okuma elde edilmesi planlanmıştır. Bu deney tasarımına göre örnek başı $\sim 1,2$ Gb veri çıktısı ile genom boyu ortalama $\sim 150x$ okuma derinliği elde edilmesi planlanmıştır.

Okuma işlemi sonrasında, elde edilmiş verilerin kalite kontrolü yapılmıştır. Çalışmada bu amaçla FASTQC programı kullanılmıştır. Dizileme sürecinde, Fastq okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları, sonraki analiz basamaklarında sapmalara neden olmaması için, okumalardan kırpılmıştır. Kalite filtreleri ve kırpma işlemleri için Trimmomatic kullanılmıştır. Elde edilen verilerin, Kraken2 algoritması kullanılarak Extended Kraken2 (Mart 2020) veritabanı dikkate alınarak taksonomik sınıflandırması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Krona aracı kullanılarak görselleştirilmiştir (Wood ve Salzberg, 2014).

2.2.4. ERIC-PCR Yöntemi ile *A. baumannii* İzolatlarının Klonal İlişkilerinin Tespiti

Spot test sonucunda fajların etki ettiği *A. baumannii* suşlarının ERIC-PCR yöntemi ile epidemiyolojik tiplendirimleri yapılarak suşların klonal ilişkilerinin ortaya konması sağlanmıştır (Jeong ve ark., 2011). Genel üretim besiyerinde üretilen suşların taze kültürlerinde üreyen koloniler, öze ile toplanarak sıvı besiyerinde süspanse edilmiş ve bir gece 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan taze bakteri süspanسیونlarının konsantrasyonları spektrofotometrede benzer olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından, bakteri süspanسیونları ependorflarda 10.000 rpm’de santrifüj edilerek üst sıvı atılmış, üzerlerine Lizis I ve Lizis II tamponu (Çizelge 2.18) ilavesi sonrası santrifüj edilerek fenol-kloroform-alkol ile muamele edilmiştir.

Çizelge 2.18. Lizis I ve lizis II tampon içeriği.

Lizis I	Stok	Birim	Çalışan	500	µL
Guanidium HCl	8	M	4	M	250
					µL
Lizis II	Stok	Birim	Çalışan	500	µL
Sodium citrate pH 7	1000	M	25	mM	12.50
Triton X-100	10,00	%	1	%	50
B-Mercaptoethanol	1470	M	100	mM	3.40
H ₂ O					184.10

Çizelge 2.19’da belirtilen reaksiyon sonrası ampikonlar, % 1,6’lık agaroz jelde 65 voltta yaklaşık 2 saat yürütülmüştür. Etidyum bromür çözeltisi ile boyanarak UV translüminatörde (VersaDoc, Bio-Rad) görüntüleri alınmıştır.

Çizelge 2.19. ERIC-PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri, PCR karışımı ve sıcaklık döngüsü.

Primer Dizileri	
ERIC 1	5' ATGT AAG CTC CTG GGG ATT CAC 3'
ERIC 2	5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3'

PCR Karışımı	Stok		Çalışan		25	µL
H ₂ O					9,4	µL
dNTP (dA+dT+dG+dC)	10	mM	0,2	mM	0,5	µL
Primer 1: ERIC1	10	µM	0,8	µM	2	µL
Primer 2: ERIC2	10	µM	0,8	µM	2	µL
MgCl ₂	25	mM	4,5	mM	4,5	µL
Tampon (DreamTaq Buf 20mM Mg)	10	x	1	x	2,5	µL
Taq DNA polimeraz (DreamTaq)	5	u/µl	0,5	u	0,1	µL
Kalıp DNA	25	ng/µl	100	ng	4	µL

Reaksiyon Döngüsü					
80	°C	bekle			
94	°C	120	sn		
94	°C	15	sn		
52	°C	30	sn	40	x
72	°C	120	sn		
72	°C	300	sn		
20	°C	bekle			

2.2.5. Kolistin Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışılacak dilüsyon aralıkları 0,125- 128 mg/L olarak belirlenmiştir. İlk kuyucuktaki konsantrasyonun 128 mg/L olması için sulandırım oranları dikkate alınarak 512 mg/L kolistin solüsyonu hazırlanmıştır. Ardından kolistin stok solüsyonları hazırlanmıştır. Bunun için 51.2 mg kolistin tartılarak 10 mL steril distile

suda çözülmüştür; 1'er mL alikodlanarak -80°C'de muhafaza edilmiştir. Stok solüsyonunun üzerine 9 mL distile su eklenerek istenilen konsantrasyon değerine (512 mg/L) ulaşılmıştır.

2.2.5.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Biyofilm oluşturan suşların kolistin MİK (Minimal inhibisyon konsantrasyon) değerleri EUCAST'ın önerileri doğrultusunda sıvı dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bunun için ticari firmanın önerileri doğrultusunda CAMHB (katyon eklenmiş Müeller Hinton sıvı besiyeri) besiyeri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalkanın her kuyucuğuna 100'er µL CAMHB ilavesi sonrası mikropalkanın ilk sütunundaki kuyucuklara hazırlanan antibiyotik solüsyonundan 100 µL ilave ilave edilmiştir. İlk kuyucuktan 100 µL alınarak ikinci kuyucuğa aktarılıp pipetaj yapılmış böylece antibiyotiğin çift katlı sulandırımına ulaşılmıştır. On birinci kuyucuktan alınan 100 µL dışarı atılarak, on ikinci kuyucuk bakteri kontrol kuyucuğu olarak tayin edilmiştir.

Bakterilerin 1 gecelik taze kültürlerinden 0,5 MacFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazırlanarak CAMHB içerisinde 1:100 oranında sulandırılmış ve her kuyucukta son bakteri süspansiyonu 5×10^5 kob/mL olacak şekilde tüm kuyucuklara 100 µL bakteri süspansiyonundan ilave edilmiştir. Mikropalaklar $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 16-20 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak kolistine duyarlı *E.coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda bakterinin üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir (EUCAST 2020-01-01).

2.2.6. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Değerlendirilmesi

A. baumannii izolatlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri Pires ve ark. (2011)'lerinin spektrofotometrik mikropalak yöntemi kısmen modifiye edilerek araştırılmıştır (Pires ve ark., 2011). Bu amaçla, hastane suşlarının 1×10^8 kob/mL yoğunluğundaki taze kültürleri, her birinde 200 μ L % 1 glikoz içeren LB sıvı besiyerinde 1:100 oranından dilüe edilerek 96 kuyucuklu mikropalaklara eklenmiştir. Biyofilm oluşması için 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir kuyucukdaki besiyeri mikropipet yardımıyla boşaltılmış, steril % 0,9 fizyolojik tuzlu su ile dikkatlice yıkanarak biyofilm üzerinde bulunan serbest bakteriler uzaklaştırılmıştır. Ters çevrilerek oda ısısında kurumaya bırakılan biyofilm tabakasını boyamak için % 0,1 kristal viyole çözeltisinden 200 μ L eklenerek 15 dakika beklenmiştir. Boyama sonrası kuyucuklar saf su ile yıkanarak, biyofilme bağlı boya 200 μ L % 33 glasiyel asetik asit ile ekstrakte edilip, mikropalak okuyucuda 540 nm'de absorbansı okunmuştur. Tüm deneyler ve ölçümler 2 tekrar ve 4 paralel olarak çalışmıştır. Negatif kontrol olarak, bakteri eklenmeyen % 1 glikoz içeren LB sıvı besiyeri, pozitif kontrol olarak da güçlü biyofilm üreticisi *A. baumannii* ATCC 19606 suşu kullanılmıştır. Okunan optik dansite (OD) değerleri ile negatif kontrole ait OD değeri karşılaştırılarak, biyofilm oluşum kapasiteleri belirlenmiştir.

2.2.7. Bakteriyofajların *A. baumannii* Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Bakteriyofajların litik faaliyetlerinin *A. baumannii* biyofilmlerine karşı etkisini belirlemek amacıyla; öncelikle fajın etki spektrumu içinde olan ve biyofilm oluşturan *A. baumannii* suşları seçilmiştir. Biyofilmler üzerine fajların kendi başına, kokteyl hazırlanarak ve kolistin ile kombinasyonlarının etkisi Chaudhry ve ark. (2017) ile Kwiatak ve ark. (2017) yöntemi modifiye edilerek test edilmiştir (Chaudhry ve ark., 2017; Kwiatak ve ark., 2017).

Çalışmada seçimi yapılan iki fajın, Faj 1 (C2) ve Faj 2 (K3), farklı konsantrasyonlarındaki (10^9 - 10^7 pob/mL) etkinlikleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla; kuyucuklarda 200 µL başlangıç kültürünün oluşturduğu 48 saatlik biyofilmler, % 0,9 fizyolojik tuzlu su ile yıkanarak biyofilmlerin serbest kalan planktonik hücrelerden temizlenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, kuyucuklara 200 µL LB sıvı besiyerinde süspanse edilmiş faj süspansiyonları eklenmiştir. Plaklar, 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Fajların *A. baumannii* suşlarının biyofilm kütlelerini üzerine etkileri 3 zaman periyotunda; fajların biyofilm ile teması sonrası 6., 24. ve 48. saatlerdeki değişimler ölçülerek saptanmıştır. Seçilen iki fajın etkin konsantrasyonlarından bir kokteyl oluşturularak, biyofilm kütlesi üzerine kokteyl etkinliği de değerlendirilmiştir.

2.2.8. Bakteriyofaj ile Antibiyotiğin *A. baumannii* Biyofilmleri Üzerine Etkisi

Çalışmamızın devamında *A. baumannii* biyofilmine karşı antibiyotik ile fajın birlikte uygulanmasının tedavi potansiyeli üzerine etkisi incelenmiştir. Titrasyonla saptanan faj etkinliğine göre yüksek aktivite gösteren konsantrasyon değeri kullanılmıştır. Hastane izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri incelendiğinde ortak duyarlılık gösterdikleri tek antibiyotiğin kolistin olduğu görülmüştür. Aynı zamanda kolistin dirençli izolatlar da çalışmaya dâhil edilmiştir. Kolistin, çalışılan her hastane örneği için belirlenen MİK değeri uygulamada kullanılmıştır.

Antibiyotiğin ve fajların her birinin etkinlikleri belirlendikten sonra birlikte kullanım modelleri test edilmeye başlanmıştır. Bunun için, belirlenen etkin faj konsantrasyonları ve MİK değerinde antibiyotiğin eş zamanlı ve ardışık kullanımlarının tedavi etkinliği saptanmıştır. Eş zamanlı uygulamada; 48 saatlik biyofilm kütlesi üzerine Faj 1 (C2) + antibiyotik, Faj 2 (K3) + antibiyotik, Faj kokteyl (C2+K3) + antibiyotik (kolistin MİK) uygulanarak, 24 ve 48 saat temas sonrası sonuçlar kütle azalması yönünden incelenmiştir. Ardışık uygulama yönteminde ise; kuyucuklara

öncelikli olarak faj 1, faj 2, faj kokteyl ilavesi yapıp, 6. saatin ardından antibiyotik eklenerek 24 saatlik ve 48 saatlik tedavi protokolü test edilmiştir.

Süre sonunda her bir kuyucuk mikropipet yardımıyla boşaltılmış ve steril % 0,9 fizyolojik tuzlu su ile yıkanarak biyofilm üzerinde bulunan serbest bakteriler uzaklaştırılmıştır. Oda ısısında kurutulan plaklar % 0,1 kristal viyole çözeltisi ile boyanmıştır. Boyama sonrası kuyucuklar saf su ile yıkanarak, biyofilme bağlı boya 200 µL % 33 glasiyel asetik asit ile ekstrakte edilerek spektrofotometre cihazında 540 nm’de absorbansı okunmuştur. Tüm deneyler 2 paralel ve 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Tedavi edilmeyen kontrol ile tedavi edilen grupların biyofilm kütlesi istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. SPSS versiyon 20,0 paket programı kullanılarak t-test ile analiz edilmiş ve $p \leq 0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Çalışmada Kullanılan *A. baumannii* İzolatları

3.1.1. *A. baumannii* İzolatlarının Temini

Bu çalışmada 4 farklı hastanenin farklı kliniklerinden toplamda 78 *A. baumannii* izolatu temin edilmiştir. Bu kapsamda; Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarından 35, Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarından 28, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarından 10 ve SBÜ Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından 5 *A. baumannii* izolatu alınmıştır. Hastane izolatlarına ait bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hastanelerden temin edilen izolatlara ait bilgiler.

No	Suş ID	Hastane	Klinik	Örnek Orjini	Cinsiyet	Yaş
C 1	C 69490	Cebeci	Göğüs Hastalıkları	Trakeal	K	78
C 2	C 69785	Cebeci	Kardiyoloji	İdrar	E	89
C 3	C 64200	Cebeci	Kardiyoloji	Balgam	K	76
C 4	C 64737	Cebeci	Hematoloji	Kan	K	52
C 5	C 38519	Cebeci	KVS	Yara	K	75
C 6	C 39722	Cebeci	Kardiyoloji	İdrar	K	76
C 7	C 43816	Cebeci	Plastik Cerrahi	İdrar	E	78
C 8	C 43714	Cebeci	Psikiyatri	İdrar	K	55
C 9	C 67936	Cebeci	Çocuk	Trakeal	E	1
C 10	C 67787	Cebeci	Genel Cerrahi	Yara	E	58
C 11	C 68594	Cebeci	Çocuk	Trakeal	E	1
C 12	C 69489	Cebeci	Göğüs Hastalıkları	Yara	K	78
C 13	C 64705	Cebeci	Plastik Cerrahi	Doku	E	83
C 14	C 64774	Cebeci	Plastik Cerrahi	Doku	K	68

Çizelge 3.1. Devam. Hastanelerden temin edilen izolatlara ait bilgiler.

C 15	C 66658	Cebeci	Genel Cerrahi	Apse	E	58
C 16	C 66194	Cebeci	Göğüs Hastalıkları	İdrar	E	70
C 17	C 38312	Cebeci	Hematoloji	Balgam	K	63
C 18	C 42421	Cebeci	Plastik Cerrahi	Yara	K	58
C 19	C 23732	Cebeci	Hematoloji	Kan	K	52
C 20	C23781	Cebeci	KVS	Yara	K	75
C 21	C 23947	Cebeci	Genel Cerrahi	Yara	E	58
C 22	C 25687	Cebeci	Genel Cerrahi	Doku	E	71
C 23	C 25921	Cebeci	Göğüs Hastalıkları	Balgam	E	75
C 24	C 25979	Cebeci	Göğüs Hastalıkları	Trakeal	E	74
C 25	C 23311	Cebeci	Genel Cerrahi	Yara	E	58
C 26	C 33890	Cebeci	Kardiyoloji	Balgam	K	76
C27	C 33951	Cebeci	Hematoloji	Kan	K	52
C 28	C 34261	Cebeci	KVS	Yara	K	75
M 1	M 39494	İbni Sina	Nöroloji	Kan	K	88
M 2	M 39230	İbni Sina	Beyin Cerrahi	Trakeal	K	49
M 3	M 39435	İbni Sina	Dâhiliye	Trakeal	K	67
M 4	M 39600	İbni Sina	Nefroloji	Balgam	E	77
M 5	M 39799	İbni Sina	Dâhiliye	Kan	K	22
M 6	M 42044	İbni Sina	Genel Cerrahi	Yara	K	88
M 7	M 39235	İbni Sina	Hematoloji	Kan	K	52
M 8	M 41869	İbni Sina	Acil	Trakeal	E	62
M 9	M 52135	İbni Sina	Nöroloji	Yara	E	73
M 10	M 51136	İbni Sina	Reanimasyon	Trakeal	K	47
M 11	M 51391	İbni Sina	Beyin Cerrahi	BOS	E	32
M 12	M 51538	İbni Sina	Beyin Cerrahi	Yara	E	70
M13	M 57487	İbni Sina	Kulak-Burun-Boğaz	Trakeal	K	37
M14	M 53957	İbni Sina	Genel Cerrahi	Trakeal	K	89
M15	M 57213	İbni Sina	Beyin Cerrahi	Trakeal	K	55
M16	M 57947	İbni Sina	Beyin Cerrahi	Trakeal	E	86
M17	M 55324	İbni Sina	Beyin Cerrahi	Trakeal	K	64
M18	M 55450	İbni Sina	KVS	Trakeal	K	55
M19	M 53988	İbni Sina	Reanimasyon	Trakeal	E	40
M20	M 55793	İbni Sina	KVS	Trakeal	K	50
M21	M 54599	İbni Sina	Acil	Trakeal	E	88
M22	M 55453	İbni Sina	Acil	Trakeal	K	93
M23	M 54900	İbni Sina	Acil	Trakeal	E	89

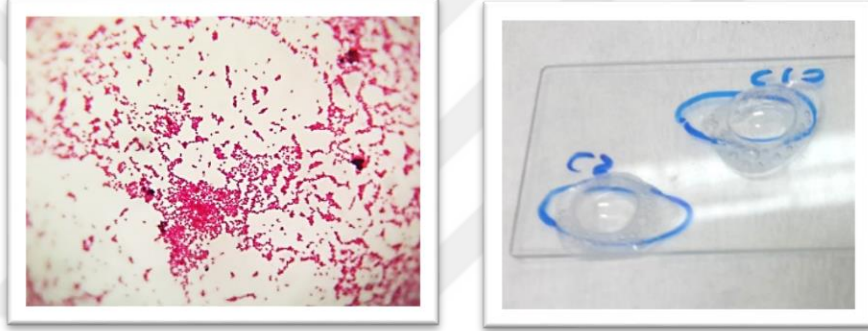
Çizelge 3.1. Devam. Hastanelerden temin edilen izolatlara ait bilgiler.

M24	M 57631	İbni Sina	Post operatif örnek	Trakeal	K	76
M25	M 51858	İbni Sina	Beyin Cerrahi	Kan	E	50
M26	M 57960	İbni Sina	Acil	Trakeal	E	84
M27	M 57621	İbni Sina	Reanimasyon	Trakeal	E	69
M28	M 56250	İbni Sina	Beyin Cerrahi	Trakeal	E	50
M29	M 55461	İbni Sina	Dâhiliye	Trakeal	K	88
M30	M 54475	İbni Sina	KVS	Trakeal	K	75
M31	M 53739	İbni Sina	Kulak-Burun-Boğaz	Trakeal	K	37
M32	M 57206	İbni Sina	Acil	Apse	E	77
M33	M 57262	İbni Sina	Acil	Trakeal	E	77
M34	M 55860	İbni Sina	Acil	Trakeal	E	84
M35	M 55071	İbni Sina	KVS	Trakeal	K	50
A 1	A 920577	Numune	Yoğun Bakım	Trakeal	K	84
A 2	A 907630	Numune	Yoğun Bakım	Trakeal	E	19
A 3	A 853073	Numune	Yoğun Bakım	Trakeal	E	62
A 4	A 872495	Numune	Yoğun Bakım	Trakeal	K	45
A 5	A 615800	Numune	Yoğun Bakım	Yara	E	81
A 6	A 993472	Numune	Yoğun Bakım	Trakeal	K	62
A 7	A1001389	Numune	Kronik Yara prep.	Yara	E	52
A 8	A1001558	Numune	Üroloji	İdrar	K	47
A 9	A 853570	Numune	Yoğun Bakım	Trakeal	E	61
A 10	A1026699	Numune	Beyin Cerrahi Yoğun	Trakeal	K	52
SU 1	-	Sami Ulus	Çocuk	Trakeal	K	8
SU 2	-	Sami Ulus	Genel Cerrahi	Yara	E	12
SU 3	-	Sami Ulus	Çocuk	Trakeal	E	9
SU 4	-	Sami Ulus	Göğüs Hastalıkları	Yara	K	10
SU 5	-	Sami Ulus	Plastik Cerrahi	Doku	K	6

Hastane izolatlarının doğrulanması amacıyla tek koloni ekim yapılmıştır (Şekil 3.1). Ertesi gün alınan kolonilere, Gram boyama ve biyokimyasal testler (Katalaz, Oksidaz) uygulanmıştır. Boyama sonrası mikroskopta, çift veya zincir yapmış kok veya kokobasil görünümünde, sporsuz, Gram negatif bakteriler seçilerek; oksidaz negatif ve katalaz pozitif olanlar çalışmaya dâhil edilmiştir (Şekil 3.2). Seçilen suşların taze kültürlerinden % 20 gliserol çözeltisinde stokları yapılarak, -80 °C’de muhafaza edilmişlerdir. Toplamda 78 *A. baumannii* hastane izolatı teyit edilerek stoklanmıştır.



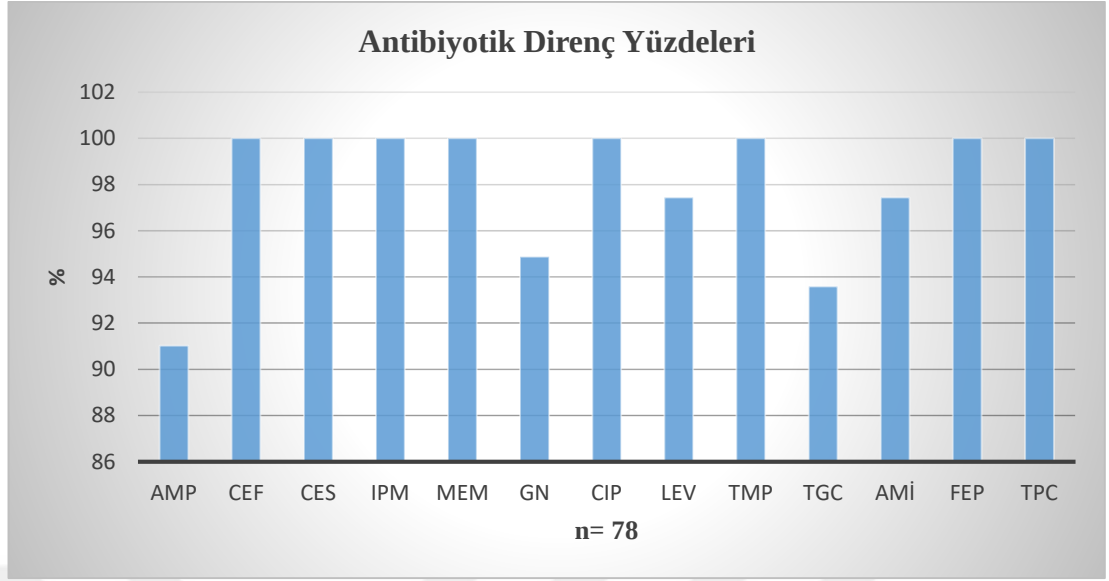
Şekil 3.1. *A. baumannii* izolatının agarlı besiyerinde tek koloni ekimi sonrası görüntüsü.



Şekil 3.2. *A. baumannii* izolatının mikroskop görüntüsü ve katalaz testi örneği.

3.1.2. *A. baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Hastane izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları EUCAST önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Sonuçlar EUCAST Klinik Sınır Değer Tablosu 2020-01-01 verilerine göre duyarlı (S) ve dirençli (R) olarak yorumlanmış ve Şekil 3.3’de direnç oranları gösterilmiştir.



Şekil 3.3. *A. baumannii* izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik direnç oranları.

3.2. Bakteriyofaj Varlığının Belirlenmesi

Bakteriyofaj izolasyon kaynakları olarak, Temmuz 2018- Haziran 2019 tarihleri arasında Ankara’da dere suyu, göl suyu, kirli atık su, lağım suyu ve atık su arıtma tesisi olmak üzere farklı su kaynaklarından (Şekil 3.4) örnek alınmıştır. Toplamda 31 su örneği (27 çevresel su + 4 atık su arıtma tesisi suyu), konak bakterileri ile faj varlığı açısından incelenmiştir. Farklı zamanlarda ve lokasyonlardan alınan su örneklerinin alınma tarihleri ve lokasyonları Çizelge 3.2’de listelenmiştir. Hastane izolatlarından rastgele seçilen 10 tanesi (İbni Sina Lab. 3, Cebeci Lab. 3, Sami ulus Lab. 2, Numune Lab. 2 örnek) konak bakteri olarak kullanılmıştır. Su örnekleri ve denenen konak bakteriler Çizelge 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.4. Çevresel su örnekleri (Bentderesi-ANKARA).

Çizelge 3.2. Faj izolasyon kaynağı olarak kullanılan su örnekleri ve alınma tarihleri.

Örnek No	Alındığı Lokasyon	Alındığı Tarih
1	Çubuk-Güzelyurt Çayı	Temmuz 2018
2	Yenimahalle Merkez-Kanalizasyon suyu	Temmuz 2018
3	Göksu-Göl suyu	Ağustos 2018
4	Göksu-Köprü kenarı	Ağustos 2018
5	Kızılcahamam-Soğuksu	Eylül 2018
6	Yenimahalle Merkez-Çeşme	Kasım 2018
7	Yenimahalle Merkez-Havuz	Kasım 2018
8	Altınpark	Kasım 2018
9	Gümüşdere	Kasım 2018
10	Gümüşdere	Kasım 2018
11	Bentderesi	Kasım 2018
12	Çubuk Çayı	Kasım 2018
13	Akyurt-Altınova	Kasım 2018
14	Akköprü	Ocak 2019
15	Çamlıdere Barajı	Ocak 2019
16	Kurt boğazı	Ocak 2019
17	Kesikköprü Barajı	Ocak 2019

Çizelge 3.2. Devam. Faj izolasyon kaynağı olarak kullanılan su örnekleri ve alınma tarihleri.

18	Turkuaz Atıksu Arıtma	Mart 2019
19	Yapracık Kuzey Doğu Atıksu Arıtma	Mart 2019
20	Yapracık Güney Batı Atıksu Arıtma	Mart 2019
21	Temelli-Çeşme	Mart 2019
22	Tatlar Merkezi Atıksu Arıtma	Mart 2019
23	Yenikent-Zir Vadisi	Mart 2019
24	Gümüşdere	Nisan 2019
25	İvedik ASKİ	Nisan 2019
26	Mavigöl	Mayıs 2019
27	Ostim	Mayıs 2019
28	Ostim	Mayıs 2019
29	İvedik Organize	Mayıs 2019
30	Karşıyaka	Haziran 2019
31	Ihlara vadisi	Haziran 2019

Çizelge 3.3. Faj kaynağı olarak kullanılan su örnekleri ve izolasyonda kullanılan potansiyel konakçı bakteriler.

Su Örnekleri	Konak Bakteriler													
	C1	C2	C5	C6	C7	C8	C13	C16	C18	M1	M5	M12	A1	SU1
1			X	X	X	X			X	X				
2		X	X	X	X	X			X	X			X	
3		X								X			X	
4		X								X			X	
5		X								X			X	
6	X	X	X		X		X	X		X	X		X	X
7	X	X	X		X		X			X			X	X
8	X				X					X		X	X	X
9	X		X		X					X		X	X	X
10	X												X	

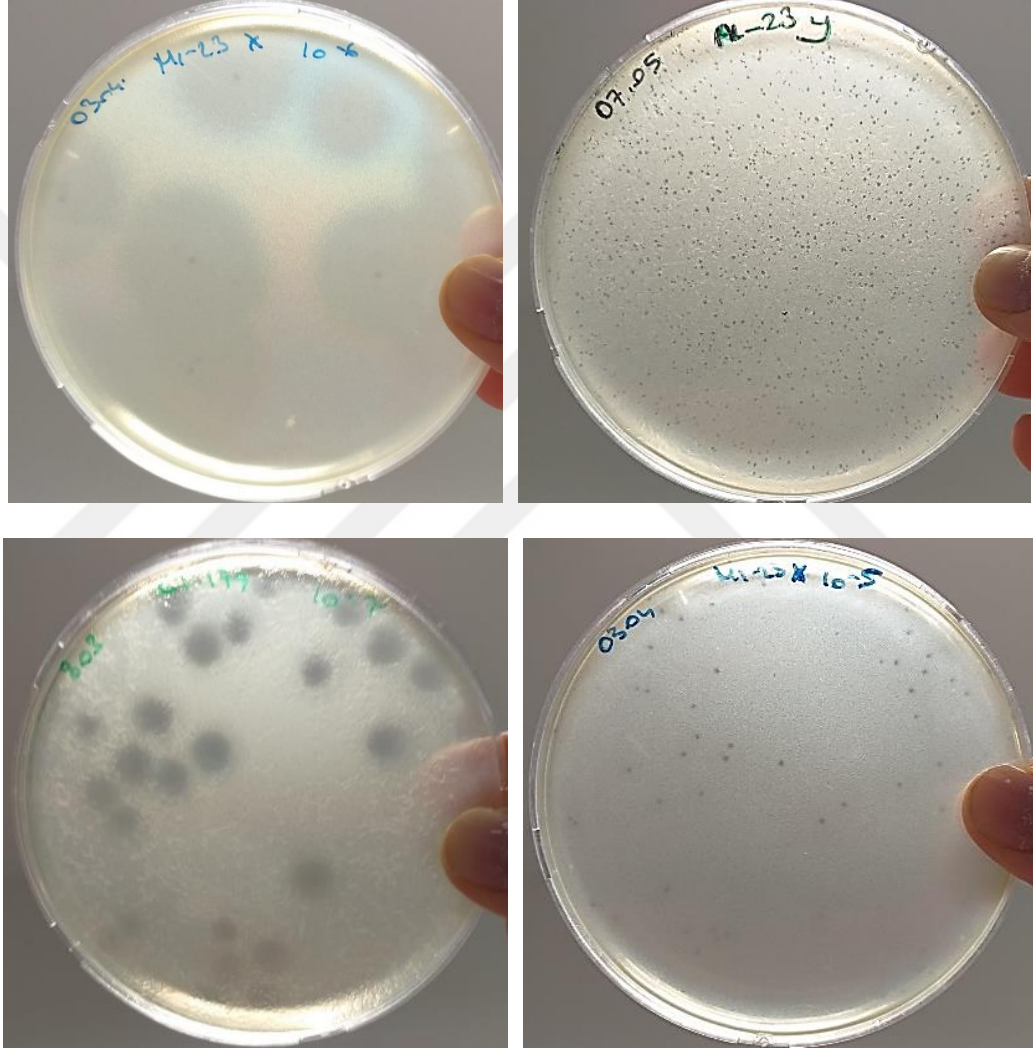
Çizelge 3.3. Devam. Faj kaynağı olarak kullanılan su örnekleri ve izolasyonda kullanılan potansiyel konakçı bakteriler.

11	X												X	
12	X												X	
13	X												X	
14	X													
15	X													
16	X													
17	X													
18	X								X			X	X	
19	X								X			X	X	
20	X								X			X	X	
21	X								X			X	X	
22	X								X			X	X	
23	X								X			X	X	
24	X								X			X	X	
25	X								X			X	X	
26	X								X			X	X	
27	X								X			X	X	
28	X								X			X	X	
29	X								X			X	X	
30	X								X			X	X	
31	X								X			X	X	

X işareti su örneğinde faj kaynağı olarak denenen konak bakterileri belirtmektedir.

Çizelge 3.3’de görüldüğü üzere çalışmanın ilk aşamasında farklı hastane izolatları konak bakteri olarak kullanılmıştır. Yapılan faj izolasyon denemeleri sonucu

Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarından alınan C1 numaralı bakteri örneğinin faj konağı olarak daha elverişli olması ve ilk denemelerde plak oluşturulduğunun görülmesi üzerine C1 suşu genel konak olarak kullanılmıştır. Şekil 3.5’de farklı konak bakteriler kullanılarak elde edilen faj plak görüntüleri verilmiştir.



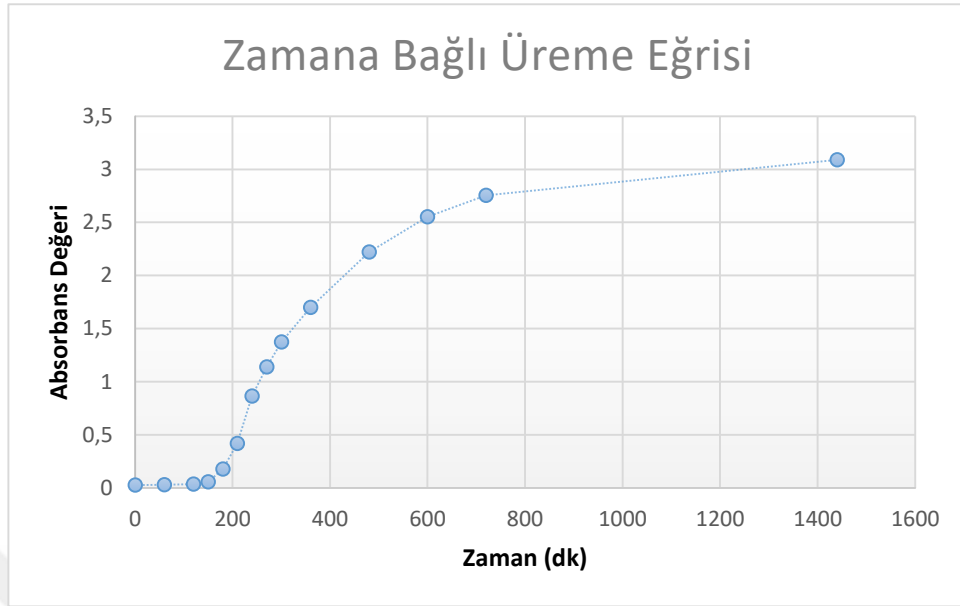
Şekil 3.5. Farklı konak bakteriler (M1, A1, SU1) ile yapılan faj izolasyon denemeleri sonucu elde edilen plak görüntüleri.

3.2.1. Konak Bakterinin Zamana Bağlı Üreme Eğrisinin Oluşturulması

Yapılan ön denemeler sonucunda plak oluşumuna en elverişli konak olarak seçilen bakterinin x2YT besiyerinde zamana bağlı üreme eğrisi çıkartılmıştır. 3 tekrarlı, 3 paralel çalışılan deneyde sıvı besiyerinden belirli zaman aralıklarında örnek alınarak 600 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Şekil 3.5’de zamana bağlı ölçüm değerleri ve eğrisi verilmiştir. Absorbans ölçüm aralığı 0,1-0,6 olarak kabul edilerek, ileri konsantrasyonlarda dilüsyonları ile ölçüm alınmıştır. Yapılan ölçüm sonucunda konak bakterinin ikiye bölünme zamanının üçüncü saatte en kısa (17,78 dk) olduğu bulunmuştur. Bu nedenle faj çalışmaların logaritmik üreme döneminin üçüncü saatindeki bakteri süspansiyonu kullanılmıştır.

t (dk)	K3	İkiye Katlanma Zamanı
0	0,025	
60	0,0289	286,8872477
120	0,0342	246,9879486
150	0,0548	44,10599996
180	0,1764	17,78723518
210	0,4167	24,19045554
240	0,8654	28,45333313
270	1,1391	75,67055864
300	1,3732	111,2564212
360	1,6980	195,8897777
480	2,2214	309,5713753
600	2,5530	597,8348209
720	2,7530	1102,828945
1440	3,089	4330,166355

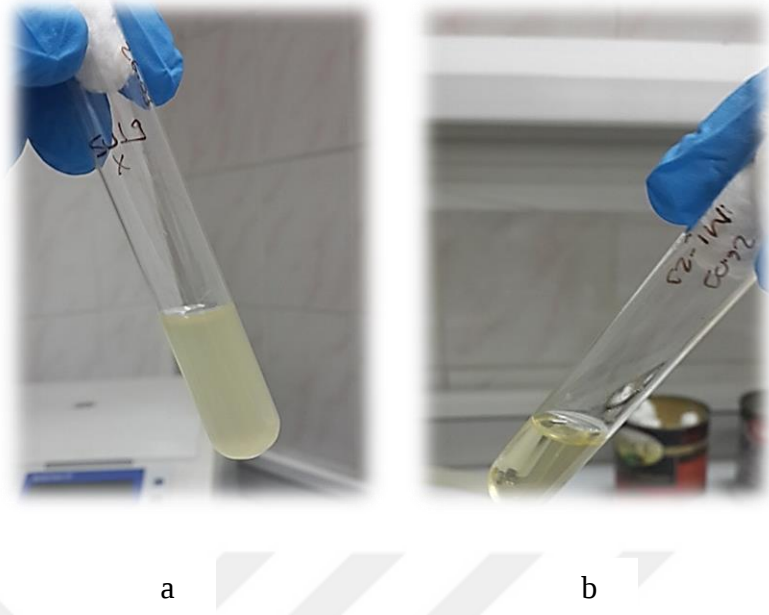
Şekil 3.6. Konak bakterinin zamana bağlı üreme eğrisi.



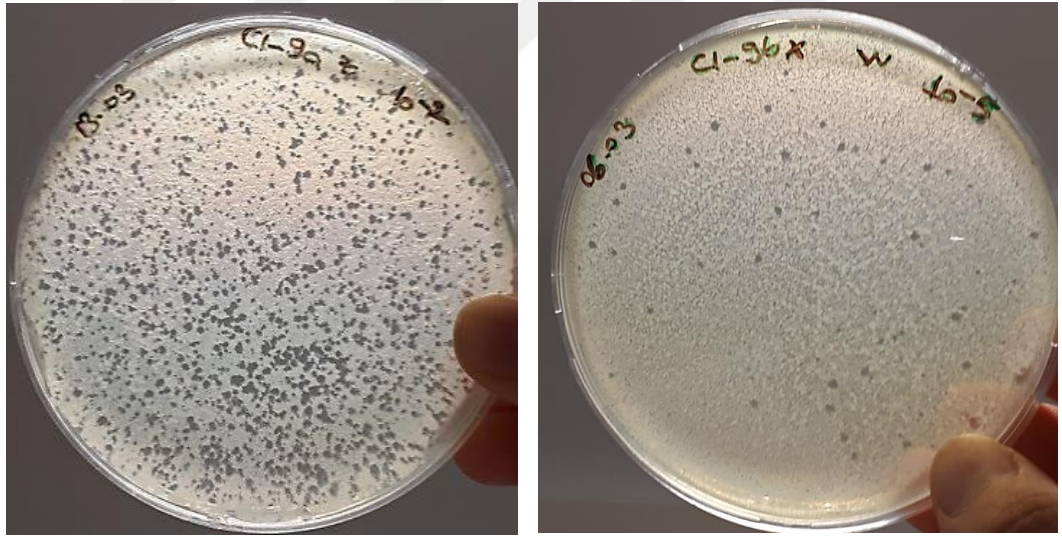
Şekil 3.6. Devam. Konak bakterinin zamana bağlı üreme eğrisi.

3.2.2. Tek Plak İzolasyonu

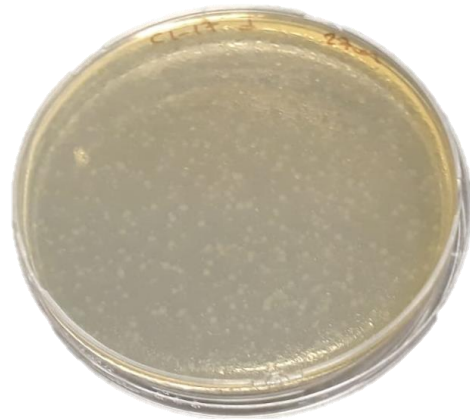
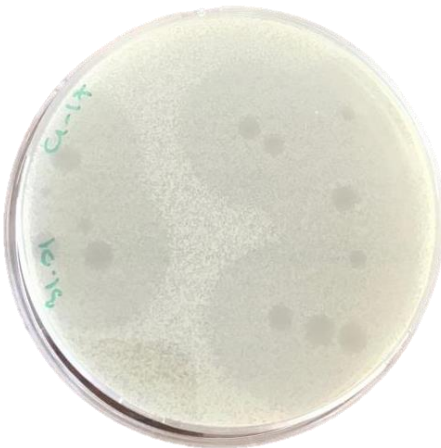
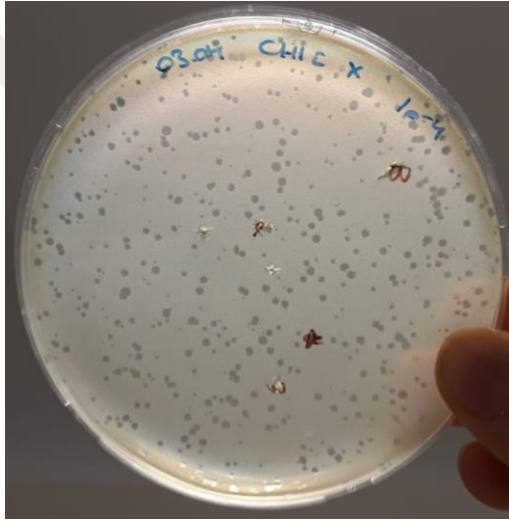
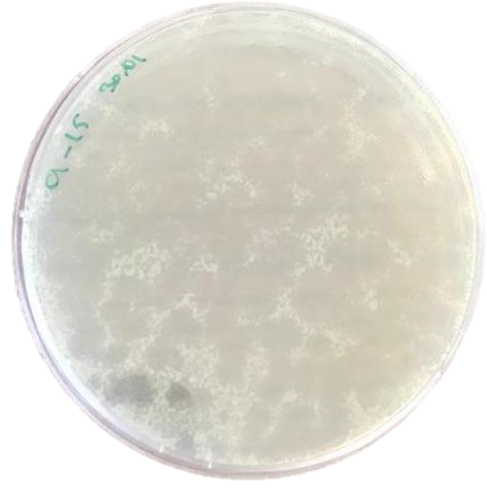
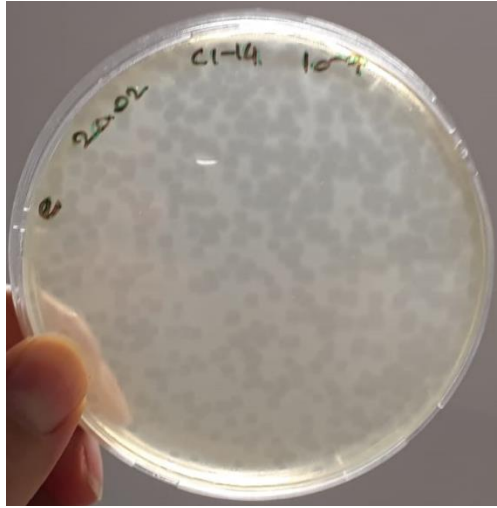
Alınan su örnekleri zenginleştirme sonrası olası faj varlığı açısından değerlendirilmiş ve lizis oluşturan örneklerle çift tabaka agar uygulanmıştır. Su örneklerinden 13'ünde (1, 2, 9, 11, 14, 15, 17, 19, 23, 24, 25, 29, 31 numaralı su numunelerinde) lizis görülmüştür. Çift tabaka agar sonucu plak yapıları görülen her bir su örneğinden, en fazla 3 farklı görünüşte plaklar seçilmiş ve tek plak izolasyonu yapılmıştır. Alınan plakların ileri dilüsyonları yapılarak her bir dilüsyona çift tabaka agar yöntemi uygulanmıştır. Tüm örnekler için bu işlem en fazla 5 kez tekrarlanmış petride tek tip faj plağı görülmesi hedeflenmiştir. Yapılan işlemler sonucunda 31 su örneğinden 13 örnekte *A. baumannii*'ye özgü faj varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3.7). Bu örneklerden farklı plak morfolojisine sahip 80 litik karakterde bakteriyofaj seçilmiş ve izole edilmiştir. İzole edilen fajlardan farklı plak morfolojilerine sahip plak görüntüleri Şekil 3.8'de verilmiştir.



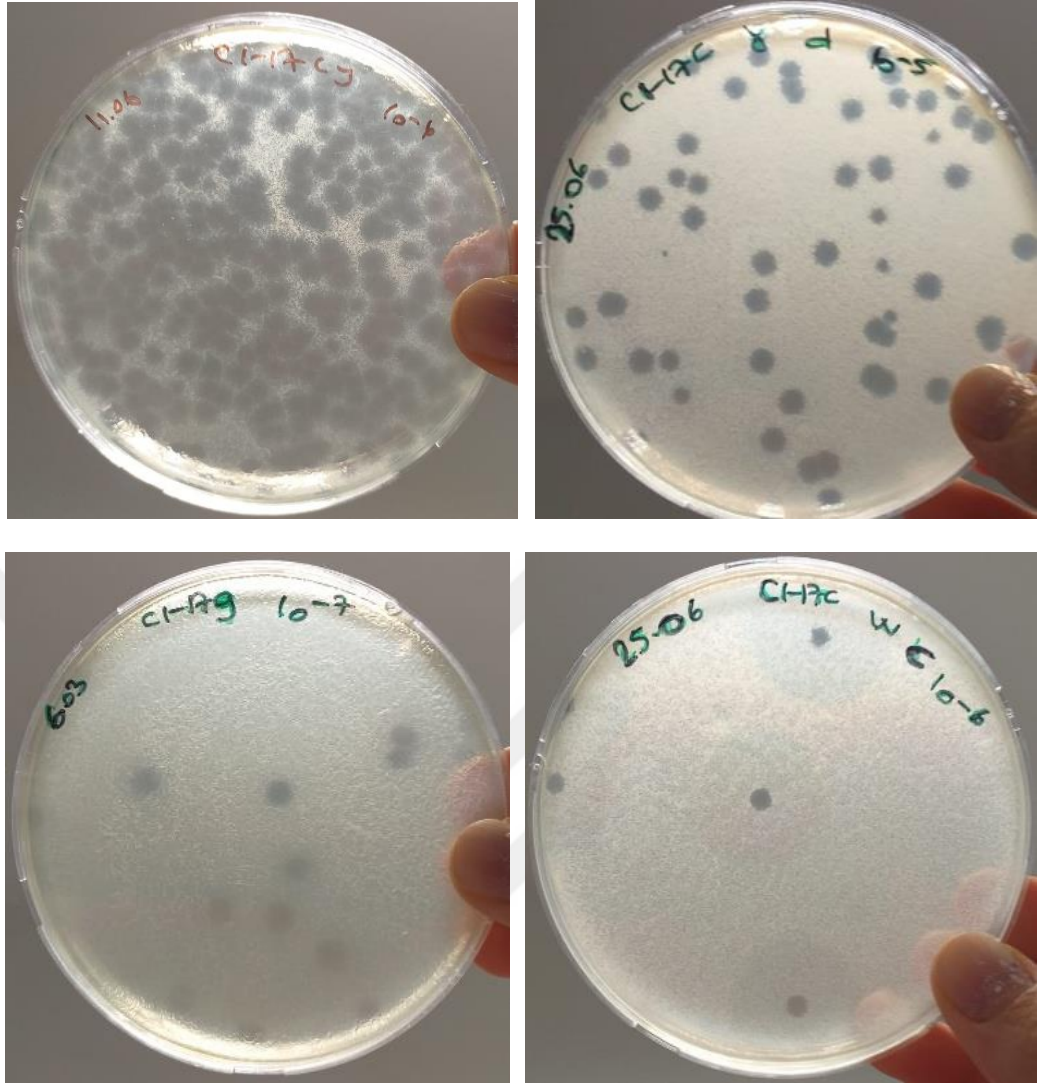
Şekil 3.7. Faj yokluğunda (a) ve faj varlığında (b) taze bakteri süspansiyonu ile inkübasyon sonrası besiyeri görüntüsü.



Şekil 3.8. *A. baumannii*'ye özgü izole edilen farklı plak morfolojilerine sahip litik faj plakları.



Şekil 3.8. Devam. *A. baumannii*'ye özgü izole edilen farklı plak morfolojilerine sahip litik faj plakları.



Şekil 3.8. Devam. *A. baumannii*'ye özgü izole edilen farklı plak morfolojilerine sahip litik faj plakları.

3.2.3. Bakteriyofaj Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilmiş ve petride tek tip plak oluşturmuş *A. baumannii* fajlarının kendi konakçısı olan bakteriyi lize edebilme yeteneği yani faj titresini hesaplamak için çift tabaka agar metodu uygulanmıştır. Bunun için öncelikle tek tip plaklar seçilerek, konak bakterisi ile en uygun dilüsyonunda birleştirilmiş ve konsantrasyonlarının arttırılması sağlanmıştır. Stok faj süspansiyonlarının daha sonra dilüsyonları yapılarak çift tabaka agar yöntemi ile konsantrasyonları pob/mL olarak hesaplanmıştır. Stok

konsantrasyon tespiti belirli aralıklarla 3 tekrarlı olarak yapılmıştır (Şekil 3.9). Stok konsantrasyonları belirlenen bakteriyofaj izolatlarının adı; konak suşu ve su örneği numarası ile kodlanmıştır. Faj stoklarından bazılarının plak görünümü ve tahmini hesaplanan stok konsantrasyonları Çizelge 3.4’de verilmiştir.



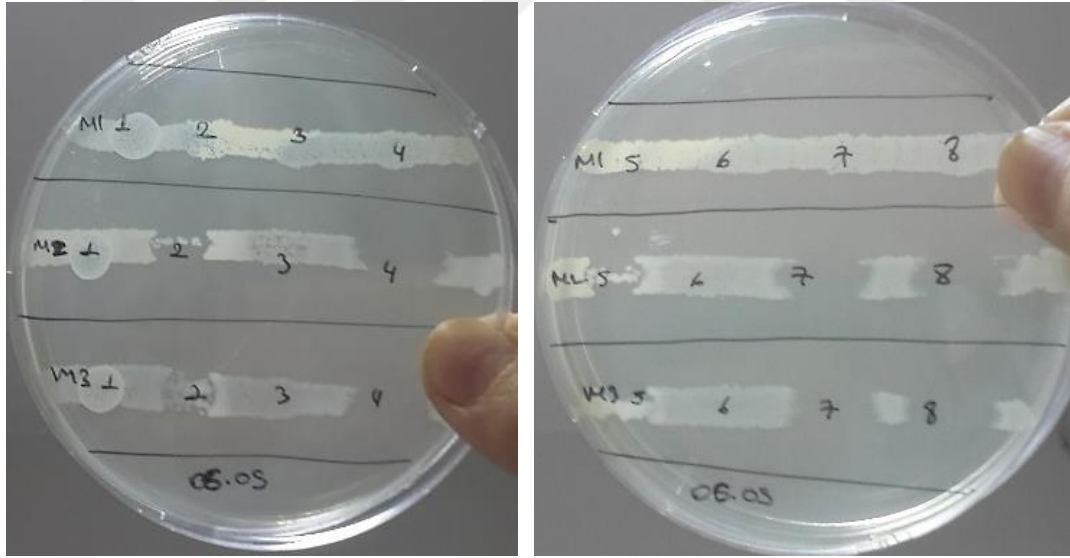
Şekil 3.9. Faj stok çözeltisi.

Çizelge 3.4. İzole edilen bazı fajların plak görünümü ve stok konsantrasyon değerleri.

Bakteriyofaj ID	Plak görünümü	Stok konsantrasyonu
A6	Geniş hale ve saydam göbekli zon	4×10^{12}
B7	Minik plak	3×10^{11}
C2	Geniş hale ve saydam göbekli zon, 4 mm	4×10^{12}
D4	Büyük plak, 1 mm	3×10^{11}
E2	Minik plak	2×10^{11}
F2	Orta büyüklükte plak, 0,5 mm	1×10^{10}
G1	Büyük plak, 1 mm	5×10^{11}
H1	Orta büyüklükte plak, 0,5 mm	2×10^{10}
I2	Orta büyüklükte plak, 0,5 mm	4×10^{11}
K3	Büyük plak, 1 mm	9×10^{14}

3.2.4. Bakteriyofajların Konak Aralıklarının Belirlenmesi

İzole edilen ve konsantrasyonları belirlenen fajların konak aralıklarını belirlemek için spot test (damlatma) yöntemi uygulanmıştır (Şekil 3.10). Çalışmanın bu kısmında antibiyogram sonuçlarına göre farklı duyarlılık profilleri gösteren *A. baumannii* izolatları kullanılmıştır. Hastanelerden temin edilen 49 *A. baumannii* izolatı ve ATCC 19606 olmak üzere toplamda 50 bakteri üzerine, 80 bakteriyofajın litik etkisi incelenmiştir. Ertesi gün bakteri ekim bölgeleri bakteri üremesi yönünden incelenmiştir. Çalışmanın devamında kullanılacak olan bakteriyofajların seçiminde litik etkinlik yüzdeleri dikkate alınmıştır. Fajların en etkin litik etkinlik yüzdeleri Çizelge 3.5’de verilmiştir. Litik etkinliği % 78 olan K3 fajı ile hem plak morfolojisinin farklı (geniş hale ve saydam göbekli zon) olması hem de litik aralığının farklı olması nedeniyle % 32 etkinlik gösteren C2 fajı karakterizasyon ve biyofilm çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.



Şekil 3.10. *A. baumannii* fajlarının konak aralıklarının belirlenmesinde kullanılan spot test sonuçları.

Çizelge 3.5. Seçilen fajların konak aralık değerleri.

Bakteri No	Bakteriyofaj İzolatları										
	A6	B7	C2	C4	D4	E2	F2	G1	H1	I2	K3
C3	+++	++	+++	+++	+++	+	++	++	++	++	++
C4	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
C5	-	+++	-	-	+++	+	+	++	+++	++	+++
C6	+	+	+	+	+	-	-	+	+++	-	-
C7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
C8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
C10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C12	-	+++	-	-	++	++	+	+++	+++	+++	++
C13	-	++	-	-	++	-	+	-	+	-	-
C15	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C16	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
C17	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
C18	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+
C19	+	+++	-	+	++	++	++	++	+	+	++
C22	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
C24	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
C27	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C28	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
A1	-	-	-	-	++	+	+	+	+++	++	+++
A2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
A4	+++	+++	+++	-	++	+	++	+++	+++	+++	+++
A5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A7	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	++	+++
A8	-	-	-	-	++	-	+	+++	+++	+++	+++
A9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
M1	+	++	+	-	+	-	+	+	++	+	++
M2	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M3	+++	+++	+++	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
M6	+++	+++	+++	-	++	-	+	-	+++	+++	+++
M7	+++	+++	+++	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
M10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
M11	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
M12	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

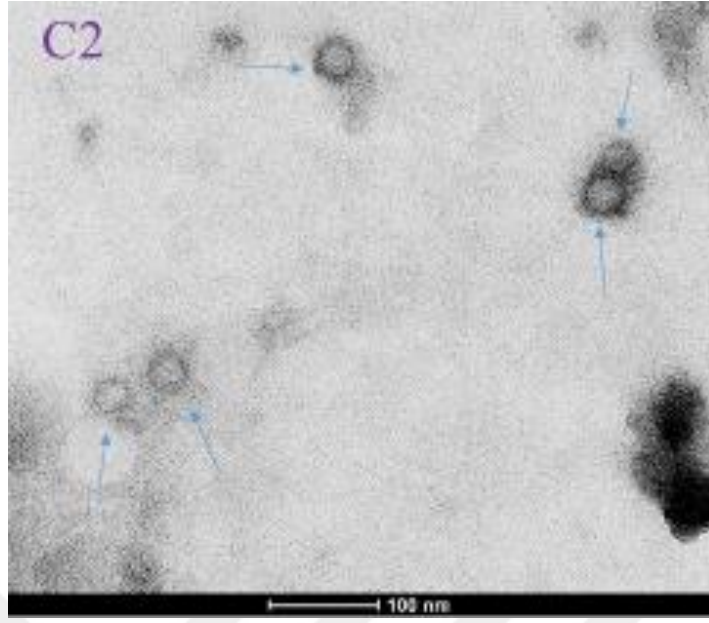
Çizelge 3.5. Devam. Seçilen fajların konak aralık değerleri.

M15	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
M16	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
M19	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	++
M20	-	-	++	++	-	-	-	+	-	-	-
M21	-	-	-	-	-	+++	++	++	-	-	-
M24	-	+++	+	+	+++	+	++	++	+	++	++
M27	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
M29	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
M33	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
M34	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
M35	-	+	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
SU1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
SU2	-	+	++	-	-	-	-	-	+	-	+
SU3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
ATCC19606	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Litik Etkinlik	22	25	16	12	22	23	25	30	33	33	39
Litik Etkinlik	44	50	32	24	44	46	50	60	66	66	78

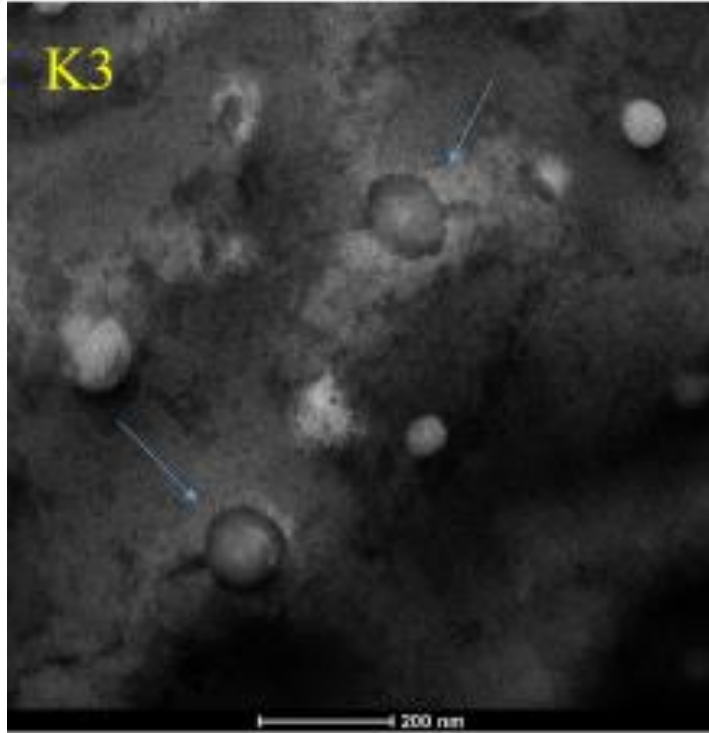
+++; Tam lizis ++; Lizis bölgesinde tek tük bakteri +; Lizis bölgesinde çok sayıda bakteri -:Lizis yok.

3.2.5. Seçilen Bakteriyofajların TEM Görüntüleri

Seçimi yapılan üç *A. baumannii* bakteriyofajının (C2, K3, G1) Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile görüntülenmesi için örnekler önce formvar kaplı karbon grid üzerinde uranil asetat ile negatif boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar A.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsünde TEM mikroskobunda incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Mikroskop görüntüleri C2 ve K3 fajı için alınabilmiş ancak G1 örneğinde gridde bazı alanlarda kopmalar nedeniyle görüntü alınamamıştır. C2 ve K3 fajının TEM görüntüleri sırası ile Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.11. C2 fajının mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.12. K3 fajının mikroskop görüntüsü.

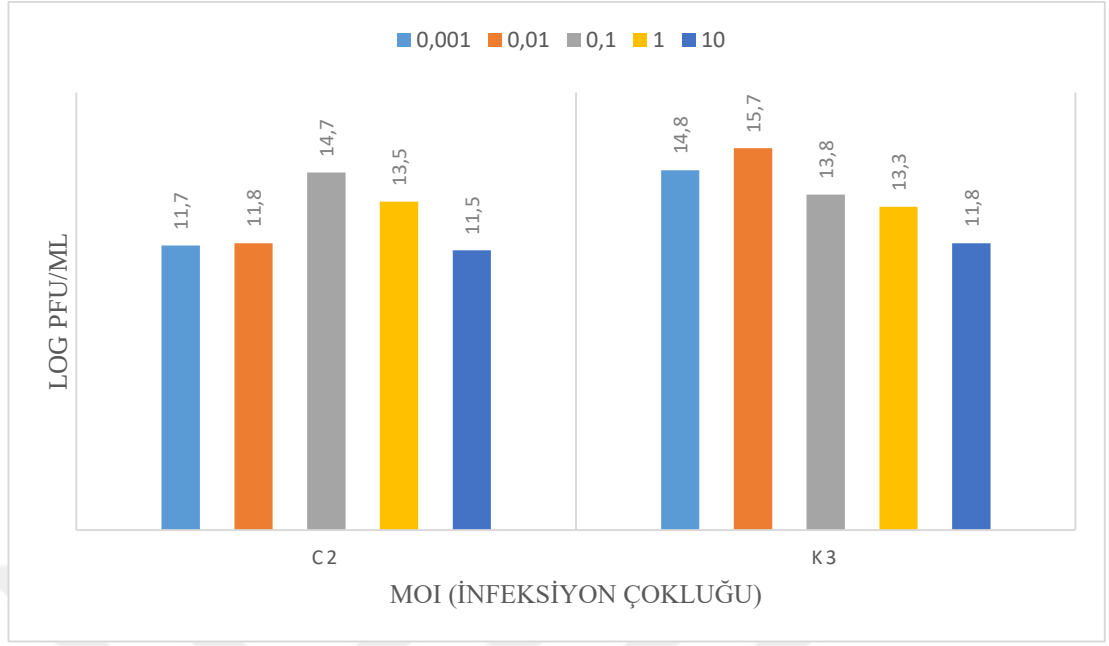
TEM mikroskobu ile morfolojik olarak tanımlanan C2 ve K3 fajları sınıflandırmak için uluslararası virüs taksonomisi (ICTV) kılavuzları kullanılmıştır. C2 fajı kısa kuyruk ve ikozahedral baş yapısı nedeniyle *Podoviridae* ailesinin, K3 fajı uzun kuyruk ve ikozahedral baş yapısı nedeniyle *Myoviridae* ailesinin morfolojik özelliklerini taşıdığı gözlemlenmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. C2 ve K3 fajlarının TEM ile belirlenen morfolojik özellikleri.

Bakteriyofaj	Morfoloji		Takım	Aile
	Baş (nm)	Kuyruk (nm)		
C2	50 x 41,6	12,5 x 6,25	<i>Caudovirales</i>	<i>Podoviridae</i>
K3	127,59 x 124,14	117,24 x 13,79	<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>

3.2.6. Seçilen Bakteriyofajların Optimal MOI Değerleri

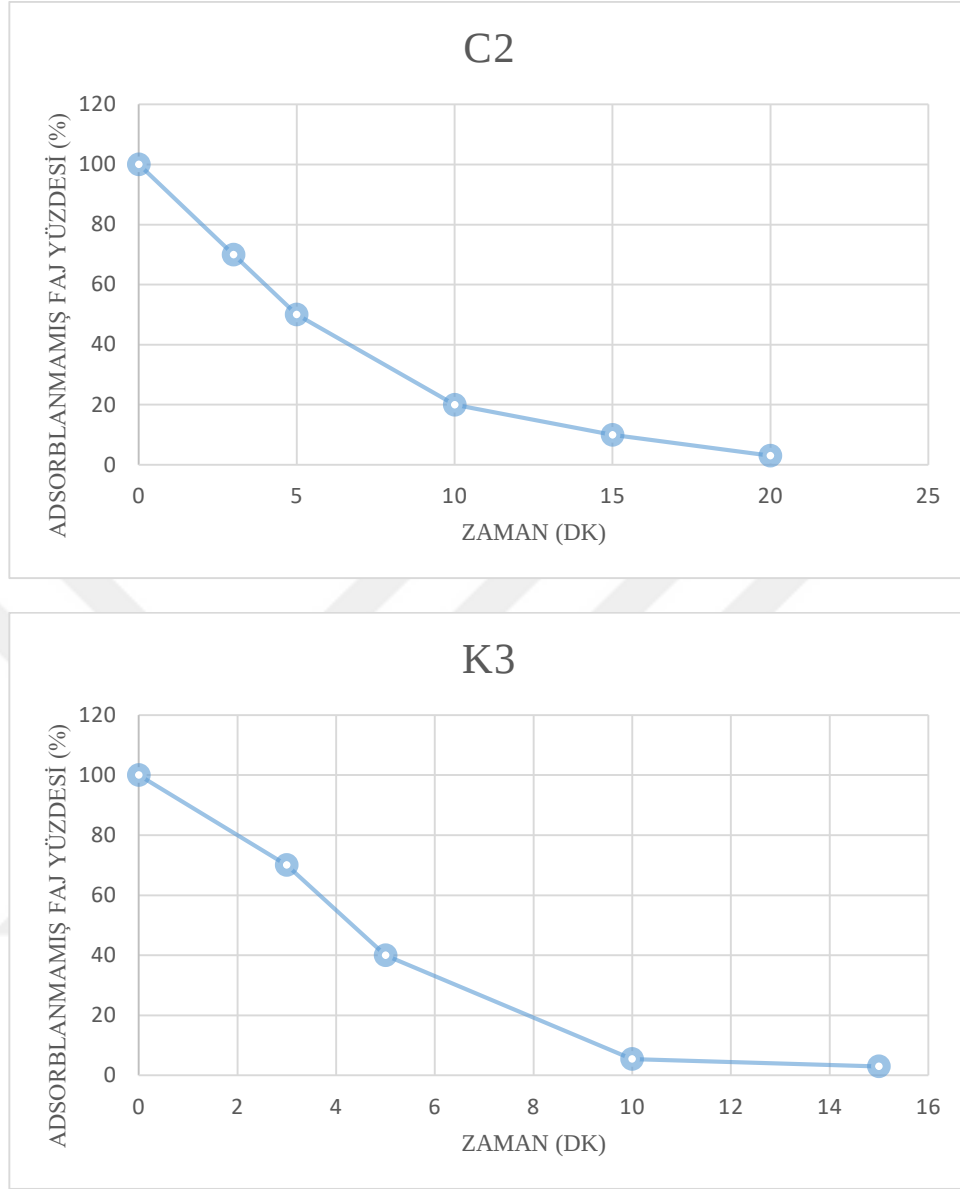
C2, K3 fajları için 0,001-10 aralığında MOI değerleri test edilmiş ve titreleri hesaplanmıştır. Seçilen her faj için farklı optimal MOI konsantrasyonu saptanmıştır. C2 fajı için optimal MOI: 0,1, K3 fajı için optimal MOI: 0,01 olarak bulunmuştur (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Seçilen bakteriyofajların optimal MOI değerleri.

3.2.7. Bakteriyofajların Adsorbsiyon Oranlarının Belirlenmesi

Bakteriyofajların, bakteri yüzeyine bağlanması sırasında geçen süreye adsorbsiyon süresi denilmektedir. C2 ve K3 fajları için zamana göre adsorblanmamış faj yüzdeleri hesaplanmıştır (Şekil 3.14). Buna göre C2 fajının ilk 15 dakikada % 90'ının adsorblandığı belirlenmiştir. K3 fajının ise ilk 10 dakika içerisinde ~% 94,6'sının konak hücreye adsorbe olduğu belirlenmiştir.



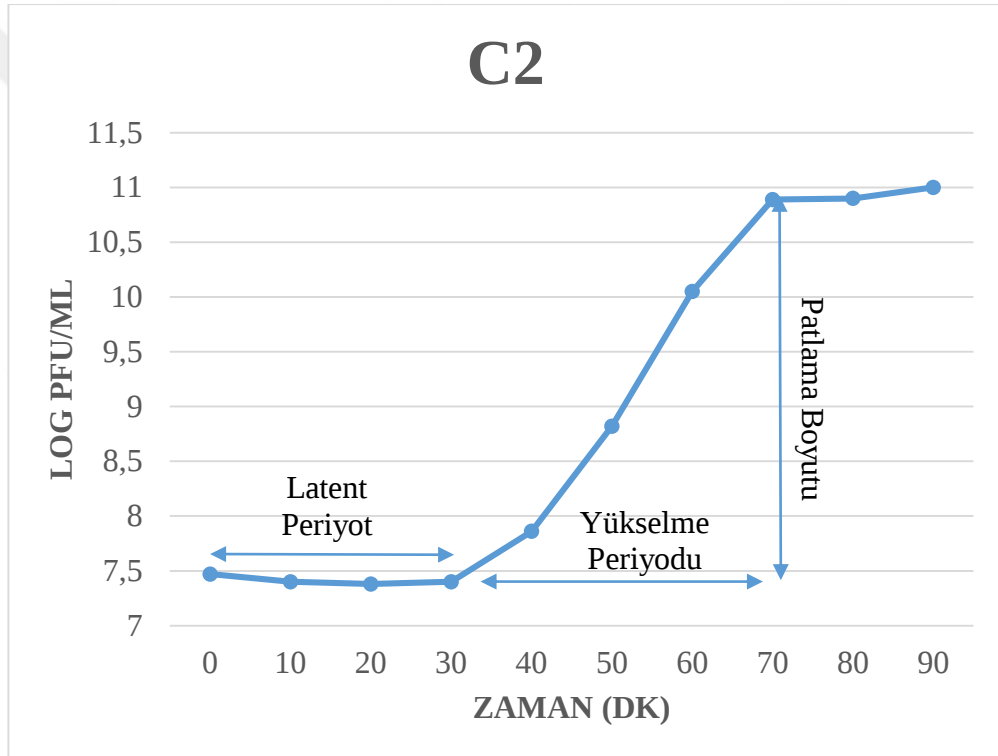
Şekil 3.14. C2 ve K3 fajlarının konak hücreye adsorbsiyon oranlarının grafiği.

3.2.8. Bakteriyofajların Üreme Karakterleri

Bir fajın tek aşamalı gelişim eğrisinin oluşturulması latent periyot, yükselme periyodu ve patlama boyutu gibi büyüme kinetiği parametrelerinin hesaplanmasına yardımcı olduğundan çok önemlidir. Latent periyot, fajın konak hücreye bağlanması sonrası konak hücreyi enfekte etmesinden ilk bakteri hücrelerinin parçalandığı ana

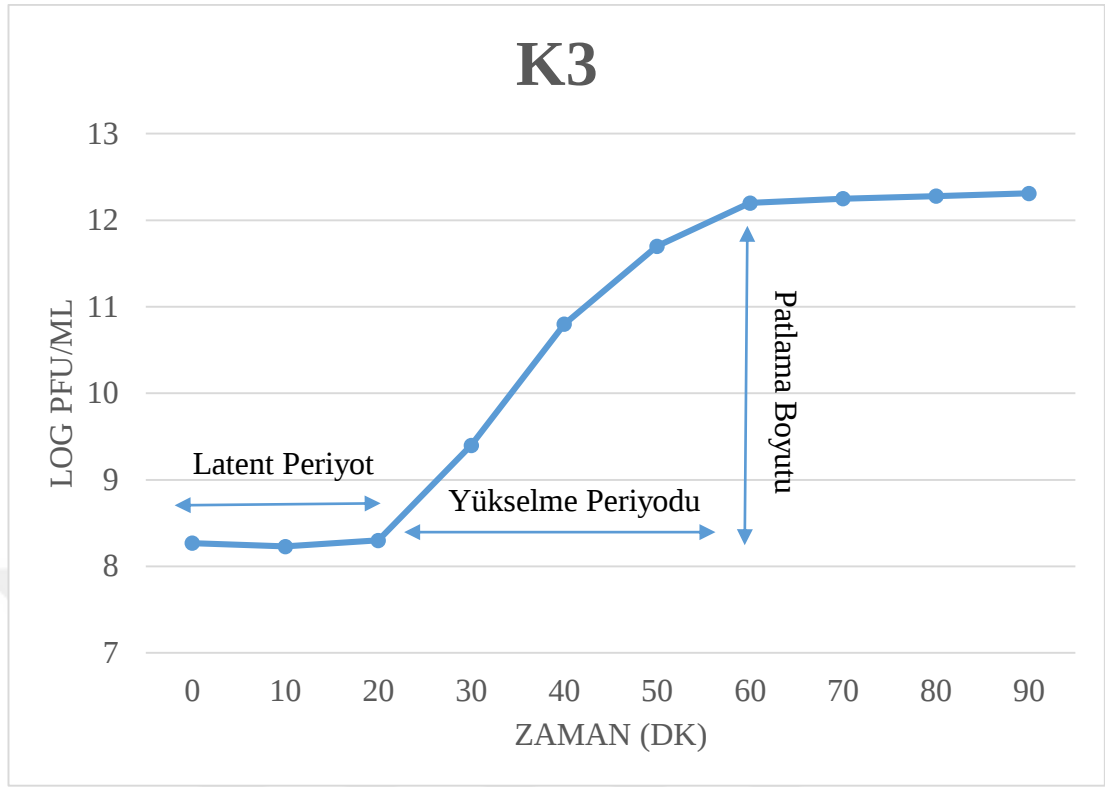
kadar geçen süredir. Yükselme periyodu, latent periyot sonundan başlayarak tüm fajlar hücre dışına çıkana kadar geçen süredir. Patlama boyutu ise, başlangıçta belli bir miktarda bakteriyi enfekte eden bakteriyofaj sayısının enfeksiyon sonrasında oluşan yeni bakteriyofaj sayısına oranını ifade etmektedir.

C2 fajının litik enfeksiyon siklusunda faj için latent sürenin 30 dk (latent periyot), yükselme süresinin 40 dk ve hücre başına üretilen faj partikül sayısının (patlama boyutu) 126 pob/mL olduğu hesaplanmıştır.



Şekil 3.15. C2 fajının tek aşamalı gelişim eğrisi.

K3 fajının litik enfeksiyon siklusunda faj için latent sürenin 20 dk (latent periyot), yükselme süresinin 40 dk ve hücre başına üretilen faj partikül sayısının (patlama boyutu) 198 pob/mL olduğu hesaplanmıştır.

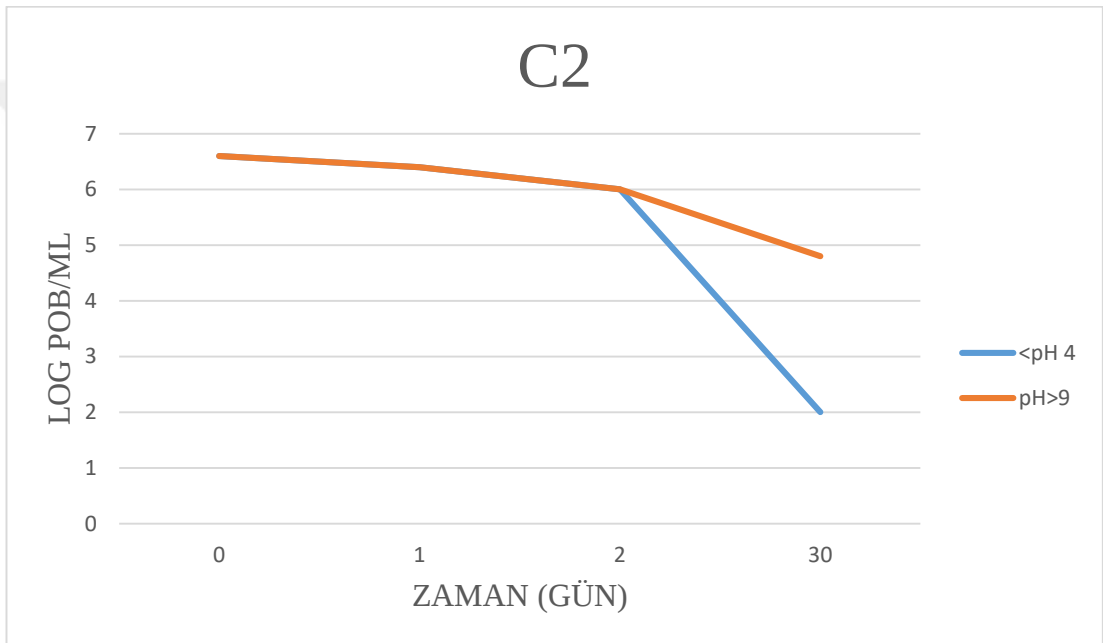


Şekil 3.16. K3 fajının tek aşamalı gelişim eğrisi.

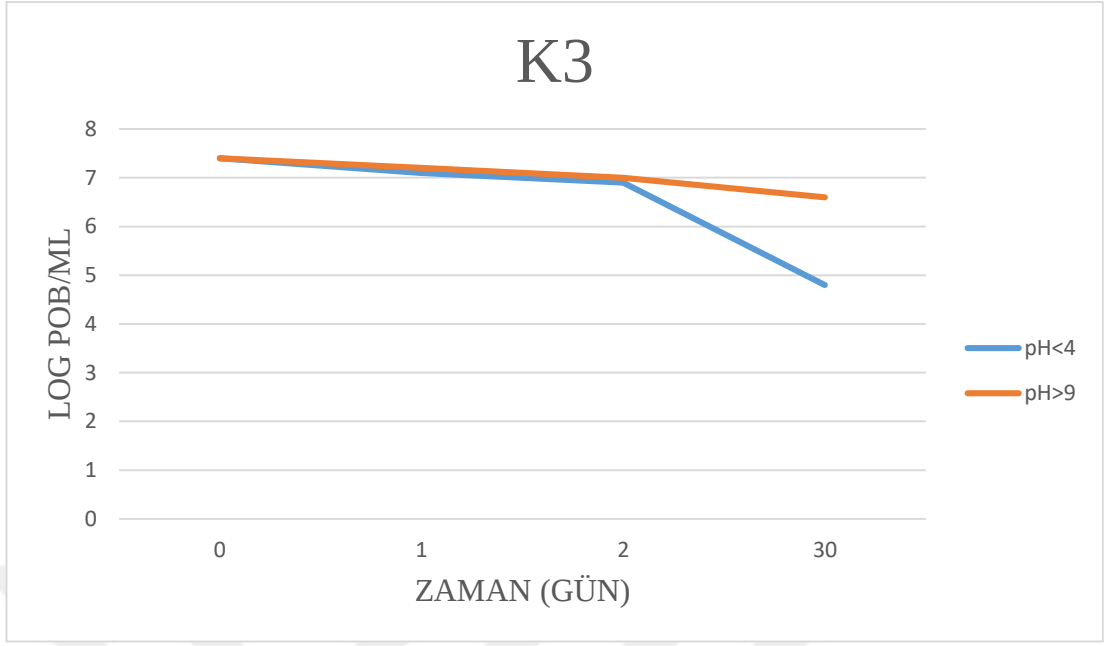
3.2.9. Bakteriyofajların Ortam Şartlarına Dayanıklılıkları

C2 ve K3 fajının geniş pH ve sıcaklık aralıklarında stabiliteleri değerlendirilmiştir. pH değişimlerinin C2 ve K3 fajına etkisi incelenmiş ve K3 fajının pH değişimlerine daha dirençli olduğu; C2 fajının düşük pH değerlerinde aktivitesini önemli ölçüde kaybettiği tespit edilmiştir. C2 fajının pH 4'ün altında ve pH 9'un üstünde 1. ve 2. günün sonunda konsantrasyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmezken; 30. günün sonunda yapılan titre belirlemesi sonrasında pH 9'un üstündeki konsantrasyonunda 2 log azalma, pH 4'ün altında etkinliğinin tamamına yakını kaybettiği görülmüştür. K3 fajı 1. ve 2. günün sonunda etkinliğini korurken; 30. günün sonunda pH 9'un üzerinde etkinliğini koruduğu ve pH 4'ün altında konsantrasyonunun 1 log azaldığı görülmüştür. C2 ve K3 fajlarına ait pH zaman değişimleri Şekil 3.17'de verilmiştir.

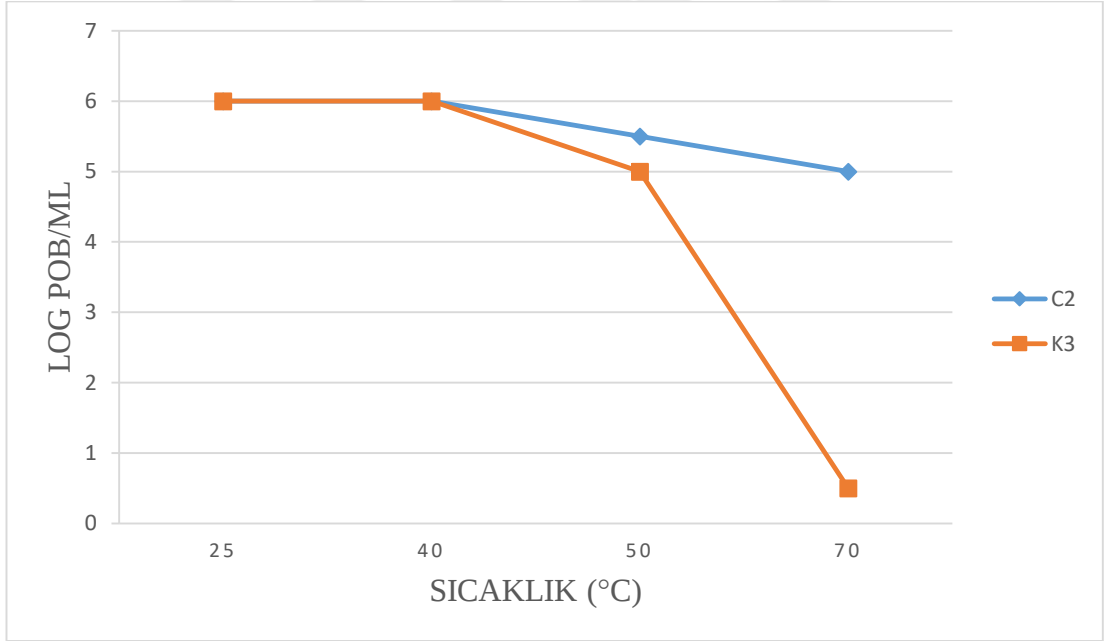
Sıcaklık değişimlerinin C2 ve K3 fajlarına etkisi de değerlendirilmiştir. C2 fajının sıcaklık değişimlerine daha dirençli olduğu K3'ün duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. C2 fajının 3. saatin sonunda tüm sıcaklık değerlerinde stabil olduğu görölmüştür. Bununla birlikte, K3 fajının 70 °C'de 3 saatin sonunda tamamına yakınının inaktive olduğu görölmüştür. C2 ve K3 fajlarına ait sıcaklık zaman değişimleri şekil 3.18'de verilmiştir.



şekil 3.17. C2 ve K3 fajlarının pH stabiliteleri.



Şekil 3.17. Devam. C2 ve K3 fajlarının pH stabiliteleeri.



Şekil 3.18. C2 ve K3 fajlarının termal stabiliteleeri.

3.2.10. Bakteriyofajların Saklama Koşullarının Değerlendirilmesi

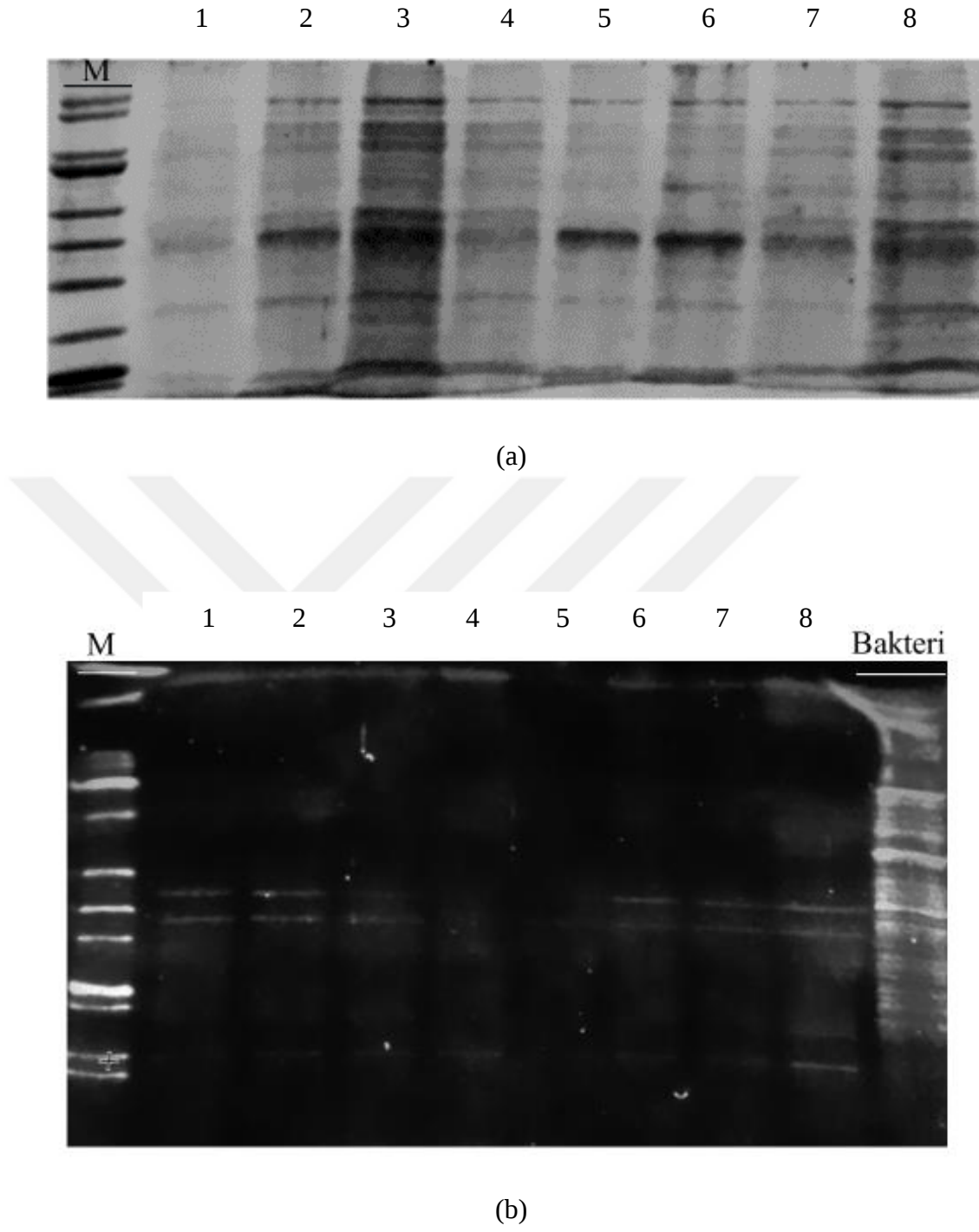
Fajların izolasyonu ve saflaştırılmasının ardından belirlenen stok konsantrasyon değerlerini korumak amacıyla farklı ortamlarda muhafaza koşulları değerlendirilmiştir. Bu amaçla seçilen iki fajın;

1. Sıvı besiyeri (0,5 mL) + Faj 1/2 (0,5 mL)
2. SM tamponu (0,5 mL) + Faj 1/2 (0,5 mL)
3. Faj süspansiyonu (0,5 mL)
4. Gliserol %30 (0,5 mL) + Faj 1/2 (0,5 mL)

Yukarıda belirtilen ortamlar oluşturularak +4 °C ve -20 °C’de saklama koşulları değerlendirildi. Altı ay bekletme sonrasında yapılan konsantrasyon tespiti sonucu, -20 °C’de saklama koşullarında en uygun muhafaza ortamının % 30 gliserol ile +4 °C’de saklama koşullarında en iyi muhafazanın sıvı besiyeri ile sağlandığı tespit edilmiştir.

3.2.11. Bakteriyofajların Protein Profilleri

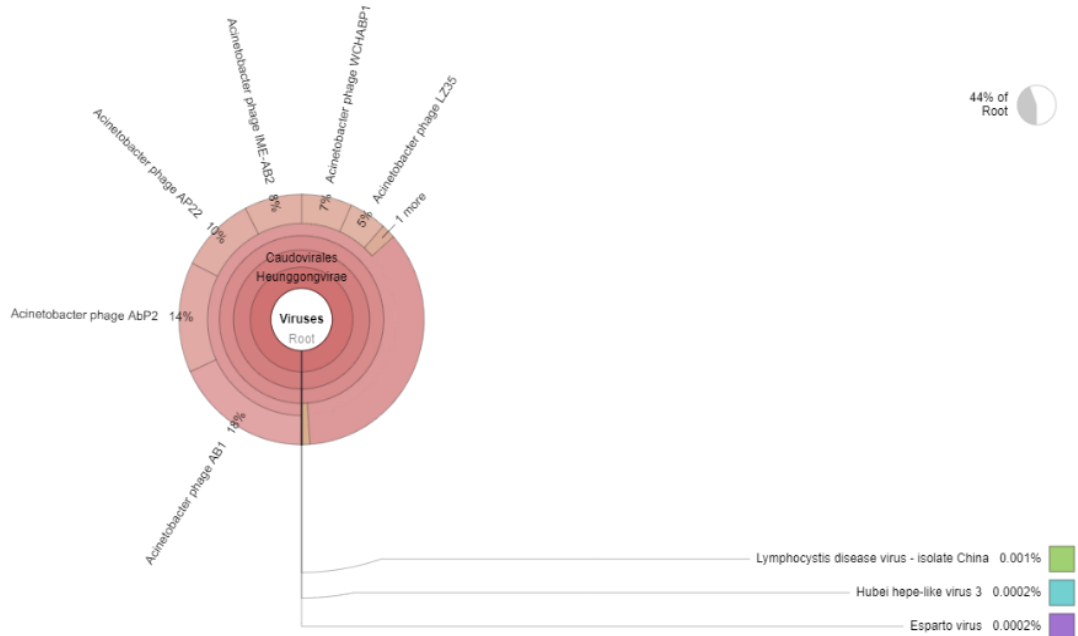
Çalışmada kullanılan C2 ve K3 fajlarının en uygun saflaştırma ürünlerinin tespiti için SDS-PAGE gradient jel elektroforezi yapılmıştır. Seçilen bakteriyofajların protein profillerinin de görüldüğü jelde saflaştırma optimizasyon denemelerinden; C2 için daha az protein bandının görüldüğü 5 numaralı proses, K3 için 2 numaralı proses uygulanmıştır (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. (a) C2 fajının SDS-PAGE jel görüntüsü, M: Marker. (b) K3 fajının SDS-PAGE jel görüntüsü, M: Marker.

3.2.12. Bakteriyofajların Tüm Genom Analizi

Seçimi yapılan C2 ve K3 fajlarının yeni nesil sekans analizi ticari firma tarafından yapılmış daha sonra okumaların veritabanı kullanılarak taksonomik sınıflandırması yapılmıştır. Sekans sonucuna göre C2 fajında elde edilen okumanın % 44'ünün viral DNA'ya ait olduğu tespit edilmiştir. ICTV taksonomisine göre sınıflandırıldığında % 100'ü *Heunggongvirae* kingdomı; % 100 *Caudovirales* takımı; % 0,07 sınıflandırılmamış *Myoviridae*, % 99,03 *Myoviridae* ailesi üyesidir. Bu aile içinde % 36'sı diğer *Obolenskivirus* cinsi ile benzerlik göstermiştir. % 64 *Obolenskivirus* cinsi içerisinde daha önce tanımlanan 7 farklı türle benzerlik göstermiştir. Bunlardan; *Acinetobacter phage WCHABP12* ile % 2, *Acinetobacter phage LZ35* % 5; *Acinetobacter phage WCHABP1* % 7; *Acinetobacter phage IME-AB2* % 8; *Acinetobacter phage AP22* % 10; *Acinetobacter phage AbP2* % 14; *Acinetobacter phage AB1* %18 benzerlik yüzdesine sahip olduğu bulunmuştur. C2 fajına ait elde edilen yeni nesil sekans diyagramı Şekil 3.20'de verilmiştir.

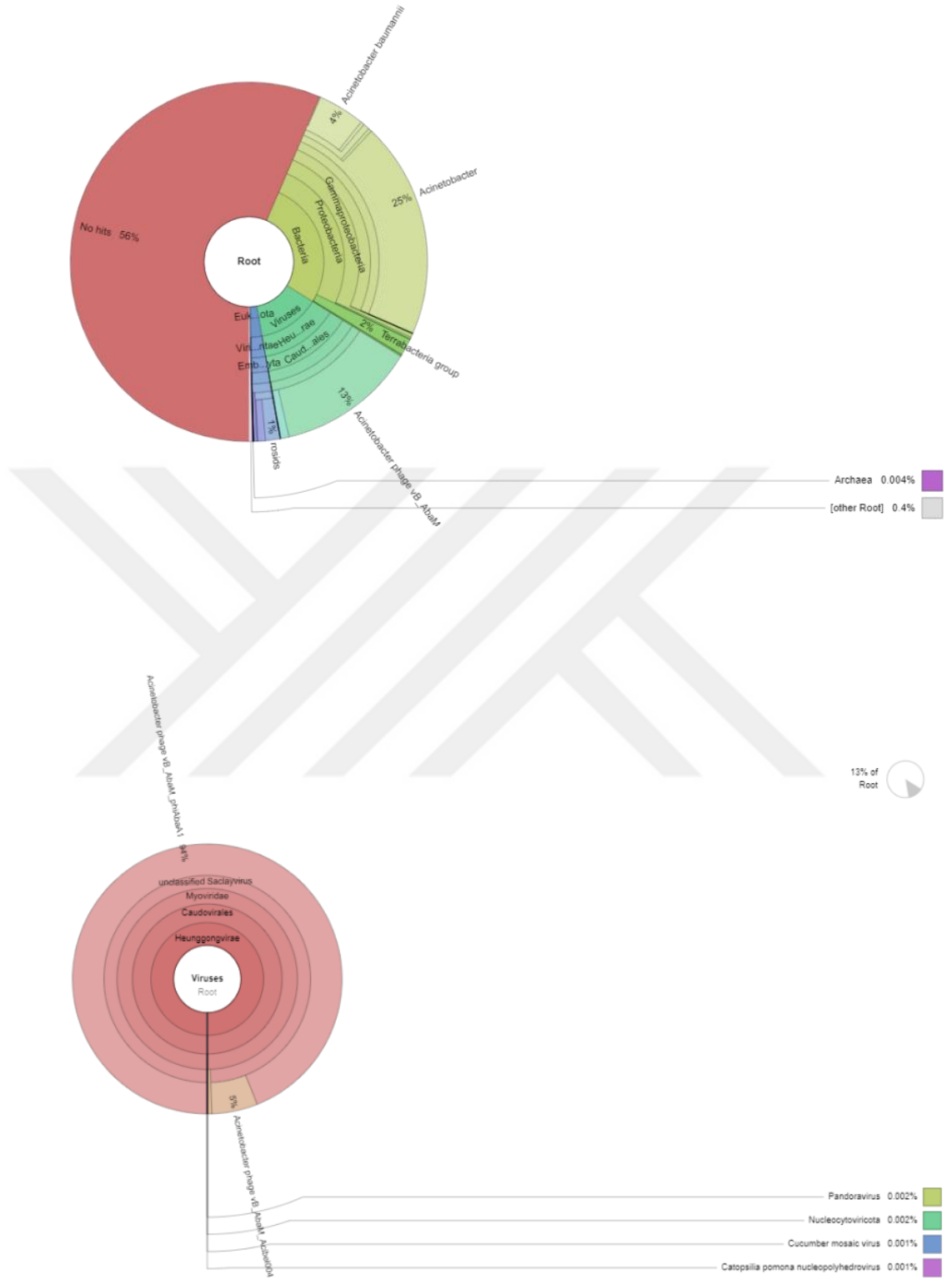


Şekil 3.20. C2 fajına ait elde edilen yeni nesil sekans diyagramı.



Şekil 3.20. Devam. C2 fajına ait elde edilen yeni nesil sekans diyagramı.

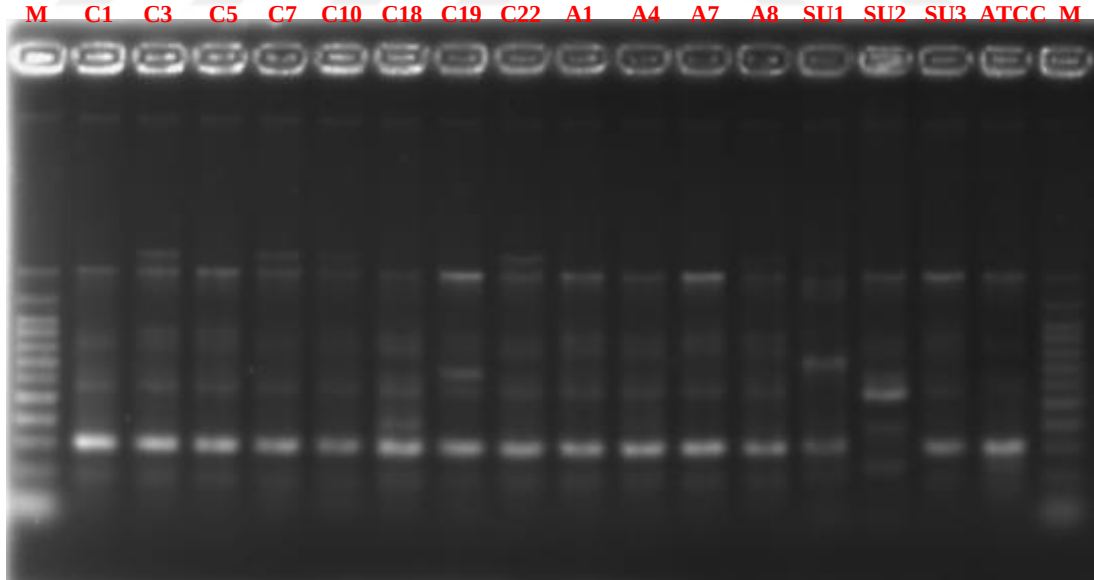
Sekans sonucuna göre K3 fajında elde edilen okumanın % 13'ünün viral DNA'ya ait olduğu tespit edilmiştir. ICTV taksonomisine göre sınıflandırıldığında % 100'ü *Heunggongvirae* kingdomı; % 100 *Caudovirales* takımı; % 1 sınıflandırılmamış *Myoviridae*, % 99 *Myoviridae* ailesi üyesidir. Bu aile içinde % 94'ü sınıflandırılmamış *Saclayvirus* cinsi ile benzerlik göstermiştir. Bu cins içinde % 94 *Acinetobacter phage vB_AbaM_phiAbaA1* ve % 6 *Acinetobacter phage vB_AbaM_Acibel004* benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur. K3 fajına ait elde edilen yeni nesil sekans diyagramı Şekil 3.21'de verilmiştir.



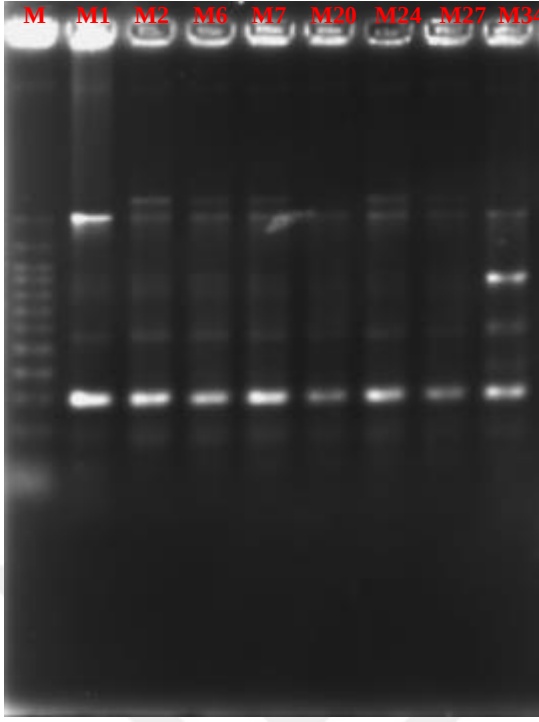
Şekil 3.21. K3 fajına ait elde edilen yeni nesil sekans diyagramı.

3.3. ERIC-PCR Yöntemi ile *A. baumannii* İzolatlarının Klonal İlişkilerinin Tespiti

Biyofilm çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen 24 *A. baumannii* izolatının ERIC-PCR yöntemi ile klonal ilişkilerine bakılmıştır. Bunun için öncelikli olarak tüm bakterilerin DNA'ları elde edilmiş ve spektrofotometrik olarak kantite edilmiştir. Polimeraz zincir tepkimesinde (PZT) uygun bant profilleri elde edebilmek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle farklı primer bağlanma (annealing) sıcaklıkları test edilmiştir. Daha sonra primer konsantrasyonları artırılarak, Mg^{++} konsantrasyonu 1-7 mM değiştirilerek bant sayısı artırılmaya smear görüntüsünden uzaklaşmaya çalışılmıştır. PZT optimizasyonu sonrası tüm suşlar aynı anda çalışılmıştır. Reaksiyon sonrası ampliconlar % 1,6'lık agaroz jelde 65 voltta yaklaşık 2 saat yürütülmüştür. Ardından jel etidyum bromür çözeltisi ile boyanmış ve VersaDoc (Bio-Rad) görüntüleme sisteminde UV ışık altında, bantlarının fotoğrafı çekilerek kaydedilmiştir (Şekil 3.22).

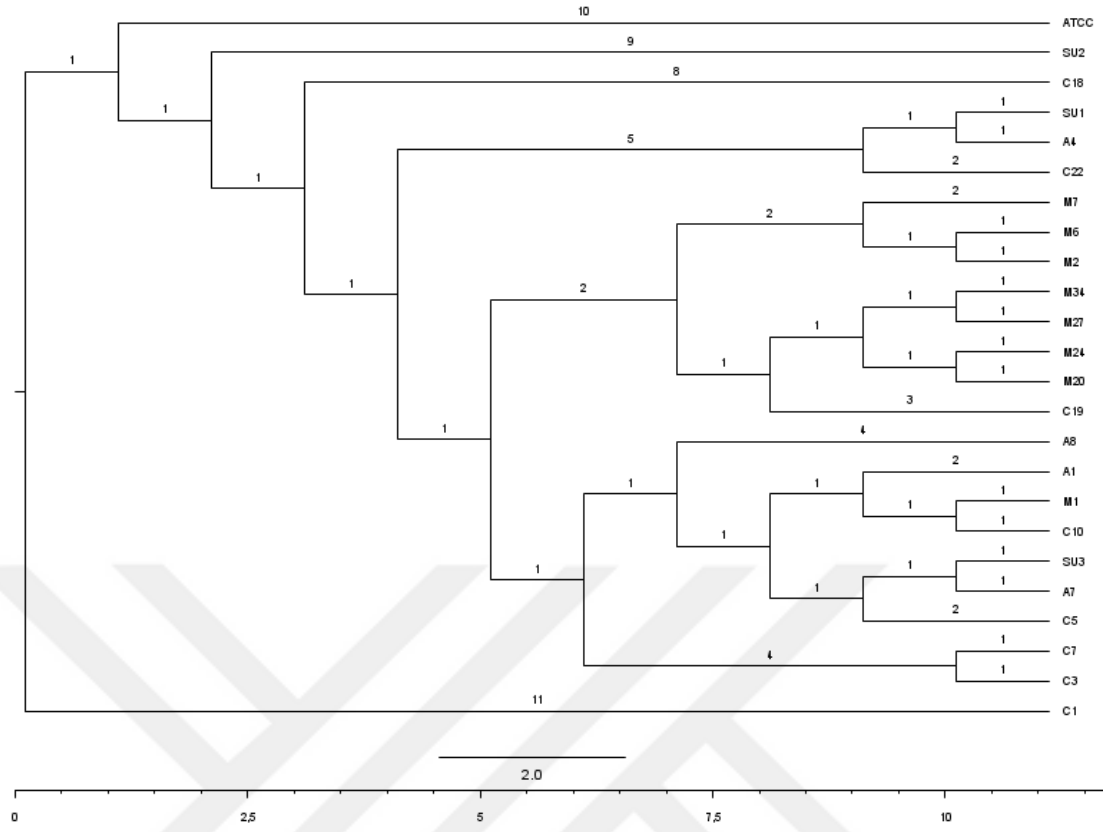


Şekil 3.22. *A. baumannii* izolatlarının ERIC-PCR jel görüntüleri.



Şekil 3.22. Devam. *A. baumannii* izolatlarının ERIC-PCR jel görüntüleri.

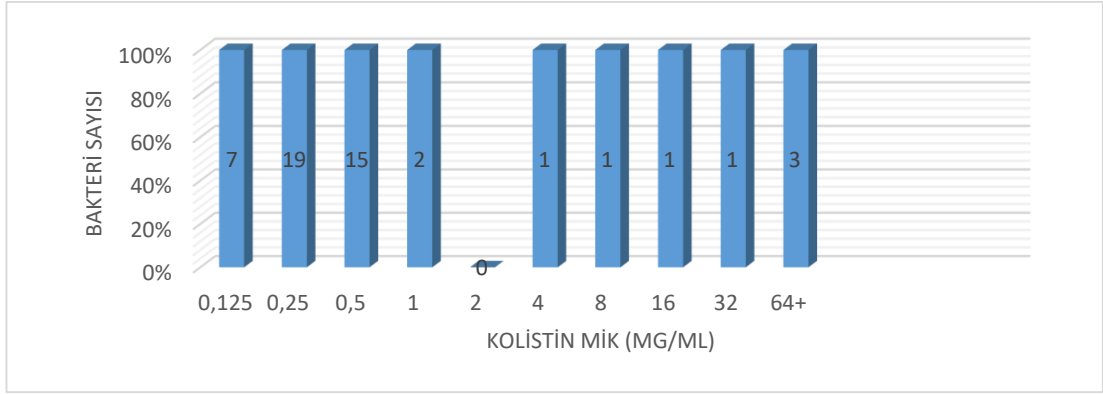
Bant profilleri GelAnalyzer2010a programı kullanılarak analiz edilmiştir. UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) metodu ve Dice benzerlik katsayısı kullanılarak bant profillerinin dendrogramı oluşturulmuş ve kümelenme analizi yapılmıştır. Kofenetik Korelasyon Katsayısı (CP) = 0,84 olarak bulunmuştur. FigTree v1.4.4. programı ile filogenetik ağaç oluşturulmuş ve Şekil 3.23’de verilmiştir. Suşların 7 kümede toplandığı ve bu kümelerden 4’ünün tek suşla temsil edildiği görülmektedir.



Şekil 3.23. *A. baumannii* izolatlarının ERIC-PCR dendrogram şeması.

3.4. *A. baumannii* İzolatlarının Kolistin MİK Değerleri

A. baumannii izolatları üzerine sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen kolistin MİK değerlerinin 0,125-64+ mg/mL arasında değiştiği saptanmıştır. İzolatların MİK değerlerinin dağılımı Şekil 3.24’de verilmiştir.



Şekil 3.24. *A. baumannii* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerleri.

3.5. *A. baumannii* İzolatlarının Biyofilm Kapasiteleri

A. baumannii izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri, mikropalak okuyucuda okunan OD değerlerinin, negatif kontrol OD değerine göre, Çizelge 3.7’de belirtilen aralıklar baz alınarak yorumlanmıştır. Buna göre *A.baumannii* izolatlarının % 7,5’i zayıf, % 25’i orta düzey ve % 67,5’i güçlü biyofilm üretim kapasitesine sahip olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.7. Bakterilerin biyofilm oluşturma özellikleri.

OD ≤ Negatif kontrol (NK)	Biyofilm üretimi negatif
NK < OD ≤ 2×NK	Zayıf Biyofilm Üretimi
2×NK < OD ≤ 4×NK	Orta Düzey Biyofilm Üretimi
4×NK ≤ OD	Güçlü Biyofilm Üretimi

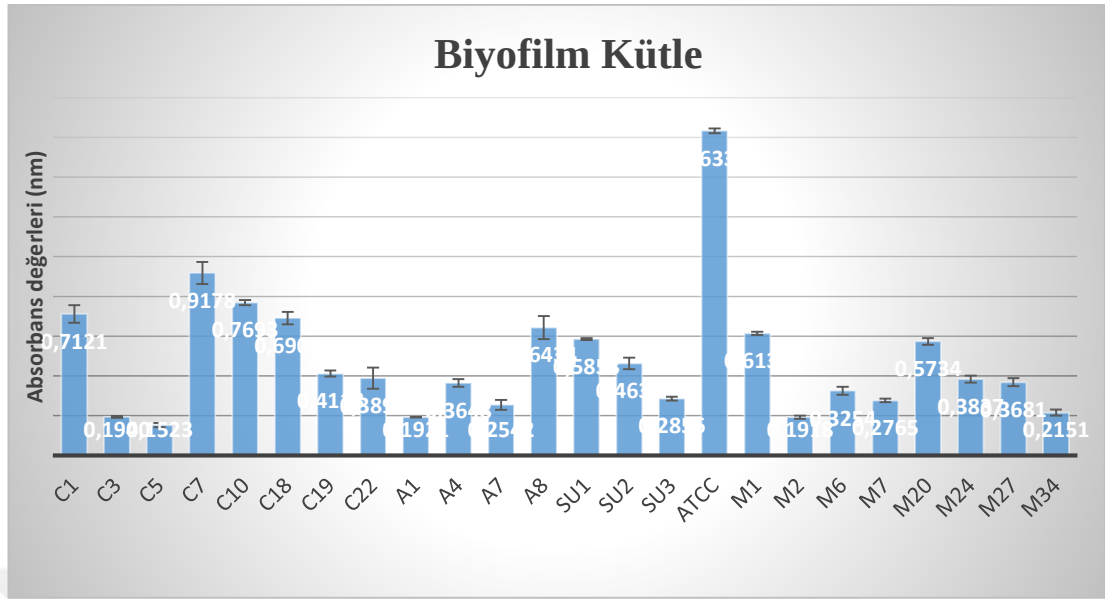
Bakteriyofajların biyofilm üzerine etkisi ve buna bağlı olarak istenen biyofilm kütle azalmasını görebilmek için izole edilip saflaştırılmış +4 °C’de saklanan C2 ve K3 bakteriyofajları için hem biyofilm oluşturabilen hem de kullanılan fajlara pozitif litik cevap veren *A. baumannii* suşlarının seçilmesi amaçlanmıştır. Bunun için, her iki

özellikte pozitiflik gösteren farklı hastanelerden temin edilen 24 *A. baumannii* suşu seçilmiştir. Biyofilm çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen bakterilerin kristal viyole ile belirlenen biyofilm oluşturma özellikleri ve optik dansite değerleri Çizelge 3.8 ve Şekil 3.25’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. *A. baumannii* izolatlarının optik dansite değerleri ve biyofilm oluşturma özellikleri.

Bakteri No	Optik Dansite (540 nm)	Biyofilm Oluşturma Özelliği
C1	0,2201	O
C3	0,1940	O
C5	0,9178	K
C7	0,9544	K
C10	0,7693	K
C18	0,6908	K
C19	0,4118	K
C22	0,3890	K
A1	0,1921	O
A4	0,3648	K
A7	0,2542	K
A8	0,6434	K
SU1	0,5853	K
SU2	0,4632	K
SU3	0,2856	K
ATCC 19606	1,6330	K
M1	0,6134	K
M2	0,1918	O
M6	0,3254	K
M7	0,2765	K
M20	0,5734	K
M24	0,3837	K
M27	0,3681	K
M34	0,2151	O

K: Kuvvetli biyofilm üretimi, O: Orta düzey biyofilm üretimi.



Şekil 3.25. *A. baumannii* izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri, hata çubukları birden çok kültürden (n=4) standart sapmaları temsil etmektedir.

3.6. Bakteriyofajların Olgun Biyofilm Üzerine Etkinlikleri

Biyofilm çalışmalarına dâhil edilen orta ve güçlü biyofilm üreticisi 24 *A. baumannii* suşu üzerine C2 (F1) ve K3 (F2) fajlarının 10^9 - 10^7 pob/mL konsantrasyonlarında etkinlikleri değerlendirilmiştir. Fajların *A. baumannii* suşlarının biyofilm kütlesini azaltma yetenekleri 3 zaman periyodunda; fajların biyofilm ile teması sonrası 6, 24 ve 48. saatlerde ölçülmüştür. Seçilen iki fajın etkin konsantrasyonlarından bir kokteyl (F3) oluşturularak, biyofilm kütlesi üzerine kokteyl etkinliği de değerlendirilmiştir. *A. baumannii* suşlarının duyarlılık gösterdiği kolistin antibiyotiğinin belirlenen MİK değerlerinde olgun biyofilme etkisi kristal viyole ile boyanarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak besiyeri içeren kuyucuklar kullanılmış ve OD değerleri negatif kontrolle karşılaştırılarak sonuçlar kütle azalması yönünden incelenmiştir. Aşağıda verilen formüle göre fajların ve antibiyotiğin olgun biyofilme etki yüzdeleri hesaplanmıştır:

Biyofilme Etki Oranı (B.E.O) (%) = $(A-B) / A \times 100$

(A: Bakterinin biyofilm kütle optik dansite değeri)

(B: Faj / Antibiyotik varlığında ölçülen optik dansite değeri)

Suşların olgun biyofilm kütlesi üzerine F1 (C2), F2 (K3), hazırlanan faj kokteyli (F3) ve antibiyotiğin (kolistin MİK) 6, 24 ve 48. saatin sonunda biyofilm kütlesi üzerine etkisi incelenmiştir. Yapılan ölçüm sonrası kütle azalmasının en fazla 6 saatlik tedavide sağlandığı görülmüştür. Buna göre, F1 fajı % 40-86; F2 fajı % 35-85; Faj 3 fajının % 42-87 ve antibiyotik % 54-89 arasında kütle azalması sağlamıştır ($p<0,001$). F2 fajı suşların % 62,5'inde F1 fajına kıyasla daha etkin kütle azalması sağladığı ve düşük konsantrasyonda (10^7 pob/mL) daha etkin olduğu görülmüştür (Çizelge 3.9). Fajların kokteyl olarak kullanımı (10^9 - 10^7 pob/mL konsantrasyonlarda) Faj 1 ve Faj 2'nin tek başına kullanımlarına göre, suşların % 79,2'unda anlamlı biyofilm kütle azalmasına neden olmazken fajların daha düşük konsantrasyonları ile benzer etki gösterebildikleri görülmüştür. Fajların etkisi antibiyotikle kıyaslandığında suşların % 41,6'sında faj ile daha güçlü kütle azalması sağlandığı, fajların daha etkin biyofilm eradikasyonu sağladığı bulunmuştur.

Suşların olgun biyofilmi üzerine faj ve antibiyotiğin 24 saat muamelesi sonrası biyofilm kütle azalması incelendiğinde faj eklenen kuyularda azalmanın 6 saatlik uygulama kadar etkin olmadığı görülmüştür. Yapılan ölçüm sonrası F1 fajı % 18-84; F2 fajı % 26-85; F3 fajı % 28-85 ve antibiyotik % 54-85 arasında kütle azalması sağlamıştır ($p<0,001$) (Çizelge 3.10). Biyofilm kütlesi üzerine faj uygulamasının etkisinin zamanla azaldığı görülmüştür.

Suşların olgun biyofilmi üzerine faj ve antibiyotiğin 48 saat muamelesi sonrası biyofilm kütle azalması yüzdeleri F1 fajında % 1-81; F2 fajı % 1-80; faj kokteyli % 0-81 ve antibiyotik % 36-82 arasında değişmektedir ($p<0,001$) (Çizelge 3.11). Sonuçlar değerlendirildiğinde biyofilm kütle azalmasına antibiyotik ve fajın etkisinin zamanla azaldığı ve 6 saat terapide fajın etki olarak antibiyotik ile etki yönünden benzer olduğu

görülmüştür. Faj 1 ve Faj 2'den hazırlanan kokteylin suşların % 41,7'sinde etkiyi artırdığı diğer suşlarda fajlar ile benzer etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Faj 1, Faj 2 ve Faj 3'ün kütle azalması yönünden en etkin konsantrasyonları Çizelge 3.12'de verilmiştir.



Çizelge 3.9. Fajların (F1, F2, F3) ve antibiyotiklerin olgun biyofilmler üzerine ilavesi sonrası 6. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları (%).

Bakteri No	Biyofilm Kütle	F1			F2			F3			Kolistin	
		10 ⁹ pob/mL	10 ⁸ pob/mL	10 ⁷ pob/mL	10 ⁹ pob/mL	10 ⁸ pob/mL	10 ⁷ pob/mL	10 ⁹ pob/mL	10 ⁸ pob/mL	10 ⁷ pob/mL	10 ⁹ pob/mL	MİK
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
C1	0,7121	0,12 / % 83	0,15 / % 79	0,14 / % 79	0,11 / % 84	0,17 / % 76	0,19 / % 73	0,15 / % 78	0,16 / % 77	0,15 / % 79	0,11 / % 85	
C3	0,1940	0,07 / % 62	0,08 / % 59	0,09 / % 54	0,08 / % 59	0,09 / % 51	0,08 / % 59	0,11 / % 41	0,09 / % 54	0,07 / % 64	0,06 / % 67	
C5	0,1523	0,06 / % 61	0,06 / % 61	0,06 / % 59	0,07 / % 54	0,08 / % 43	0,09 / % 37	0,06 / % 57	0,07 / % 51	0,11 / % 28	0,06 / % 57	
C7	0,9178	0,21 / % 77	0,26 / % 72	0,24 / % 73	0,25 / % 73	0,24 / % 74	0,25 / % 73	0,25 / % 72	0,23 / % 74	0,22 / % 75	0,19 / % 79	
C10	0,7693	0,18 / % 76	0,15 / % 80	0,19 / % 75	0,17 / % 77	0,18 / % 76	0,19 / % 75	0,19 / % 75	0,19 / % 75	0,17 / % 77	0,16 / % 79	
C18	0,6908	0,09 / % 86	0,10 / % 85	0,14 / % 80	0,11 / % 85	0,16 / % 77	0,11 / % 84	0,16 / % 77	0,17 / % 75	0,12 / % 81	0,09 / % 86	
C19	0,4118	0,19 / % 52	0,14 / % 65	0,12 / % 72	0,07 / % 82	0,09 / % 77	0,10 / % 75	0,10 / % 75	0,09 / % 77	0,12 / % 70	0,09 / % 78	
C22	0,3890	0,09 / % 75	0,09 / % 77	0,13 / % 67	0,15 / % 60	0,17 / % 56	0,13 / % 65	0,16 / % 59	0,08 / % 80	0,17 / % 56	0,08 / % 79	
A1	0,1921	0,06 / % 69	0,05 / % 71	0,08 / % 54	0,05 / % 74	0,05 / % 72	0,05 / % 71	0,07 / % 65	0,05 / % 72	0,07 / % 63	0,05 / % 73	
A4	0,3648	0,09 / % 75	0,15 / % 59	0,12 / % 67	0,11 / % 70	0,09 / % 73	0,07 / % 81	0,13 / % 64	0,11 / % 68	0,2 / % 45	0,05 / % 85	
A7	0,2542	0,06 / % 75	0,08 / % 67	0,11 / % 58	0,1 / % 60	0,09 / % 65	0,07 / % 72	0,14 / % 50	0,13 / % 49	0,07 / % 72	0,05 / % 77	
A8	0,6434	0,13 / % 80	0,15 / % 76	0,16 / % 75	0,15 / % 76	0,22 / % 66	0,19 / % 70	0,28 / % 56	0,26 / % 59	0,12 / % 81	0,12 / % 81	
SU1	0,5853	0,14 / % 75	0,11 / % 81	0,11 / % 81	0,11 / % 80	0,08 / % 84	0,08 / % 84	0,14 / % 73	0,19 / % 67	0,09 / % 85	0,09 / % 84	

Çizelge 3.9. Devam. Fajların (F1, F2, F3) ve antibiyotiklerin olgun biyofilm üzerine ilavesi sonrası 6. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları (%).

SU2	0,4632	0,14 / % 70	0,09 / % 80	0,22 / % 51	0,33 / % 29	0,07 / % 85	0,13 / % 72	0,12 / % 38	0,12 / % 74	0,09 / % 80	0,06 / % 86
SU3	0,2856	0,15 / % 46	0,13 / % 53	0,08 / % 70	0,18 / % 36	0,13 / % 52	0,10 / % 63	0,11 / % 62	0,15 / % 46	0,18 / % 78	0,06 / % 78
ATCC	1,6330	0,63 / % 61	0,54 / % 66	0,73 / % 55	0,26 / % 84	0,47 / % 71	0,50 / % 69	0,35 / % 78	0,42 / % 74	0,29 / % 82	0,24 / % 85
M1	0,6130	0,22 / % 65	0,3 / % 52	0,36 / % 40	0,11 / % 83	0,11 / % 83	0,12 / % 80	0,09 / % 85	0,08 / % 87	0,11 / % 83	0,09 / % 86
M2	0,1918	0,11 / % 43	0,07 / % 63	0,06 / % 66	0,10 / % 47	0,05 / % 74	0,08 / % 57	0,10 / % 47	0,11 / % 42	0,08 / % 57	0,09 / % 54
M6	0,3254	0,09 / % 71	0,09 / % 72	0,09 / % 72	0,06 / % 80	0,07 / % 76	0,11 / % 64	0,07 / % 77	0,06 / % 82	0,09 / % 72	0,09 / % 72
M7	0,2765	0,07 / % 72	0,08 / % 69	0,06 / % 79	0,07 / % 74	0,09 / % 66	0,11 / % 57	0,08 / % 71	0,07 / % 72	0,06 / % 77	0,1 / % 63
M20	0,5734	0,17 / % 71	0,24 / % 59	0,36 / % 37	0,09 / % 85	0,33 / % 43	0,18 / % 69	0,1 / % 83	0,08 / % 85	0,09 / % 83	0,06 / % 83
M24	0,3837	0,08 / % 78	0,15 / % 62	0,09 / % 76	0,06 / % 83	0,08 / % 78	0,09 / % 77	0,07 / % 81	0,07 / % 82	0,09 / % 78	0,17 / % 55
M27	0,3681	0,09 / % 74	0,11 / % 69	0,07 / % 82	0,1 / % 73	0,24 / % 35	0,21 / % 42	0,11 / % 69	0,06 / % 82	0,06 / % 83	0,11 / % 69
M34	0,2151	0,06 / % 53	0,05 / % 43	0,08 / % 61	0,06 / % 70	0,07 / % 66	0,07 / % 68	0,09 / % 55	0,06 / % 69	0,06 / % 70	0,07 / % 67

Çizelge 3.10. Fajların (F1, F2, F3) ve antibiyotikğin olgun biyofilm üzerine ilavesi sonrası 24. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları (%).

Bakteri No	Biyofilm Kütle	F1			F2			F3			Kolistin
		10 ⁹ pob/mL	10 ⁸ pob/mL	10 ⁷ pob/mL	10 ⁹ pob/mL	10 ⁸ pob/mL	10 ⁷ pob/mL	10 ⁹ pob/mL	10 ⁸ pob/mL	10 ⁷ pob/mL	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C1	0,7121	0,14 / % 80	0,15 / % 79	0,15 / % 78	0,14 / % 80	0,19 / % 72	0,19 / % 73	0,17 / % 75	0,16 / % 77	0,16 / % 77	0,12 / % 82
C3	0,1940	0,08 / % 58	0,09 / % 54	0,11 / % 43	0,07 / % 62	0,08 / % 55	0,08 / % 57	0,14 / % 28	0,13 / % 34	0,08 / % 59	0,06 / % 65
C5	0,1523	0,09 / % 42	0,09 / % 41	0,11 / % 29	0,07 / % 54	0,11 / % 26	0,10 / % 32	0,09 / % 36	0,10 / % 30	0,11 / % 26	0,07 / % 54
C7	0,9178	0,23 / % 75	0,25 / % 72	0,26 / % 71	0,27 / % 70	0,25 / % 72	0,24 / % 74	0,26 / % 72	0,25 / % 73	0,23 / % 74	0,21 / % 77
C10	0,7693	0,19 / % 75	0,15 / % 80	0,18 / % 77	0,21 / % 72	0,19 / % 75	0,18 / % 76	0,21 / % 73	0,19 / % 75	0,18 / % 77	0,17 / % 77
C18	0,6908	0,11 / % 84	0,13 / % 81	0,18 / % 74	0,14 / % 79	0,18 / % 74	0,24 / % 65	0,18 / % 74	0,23 / % 66	0,18 / % 73	0,12 / % 82
C19	0,4118	0,15 / % 63	0,19 / % 54	0,13 / % 69	0,08 / % 81	0,09 / % 76	0,12 / % 71	0,11 / % 74	0,09 / % 77	0,15 / % 64	0,09 / % 75
C22	0,3890	0,09 / % 75	0,09 / % 76	0,19 / % 51	0,17 / % 55	0,23 / % 41	0,16 / % 59	0,16 / % 57	0,09 / % 77	0,22 / % 43	0,09 / % 76
A1	0,1921	0,06 / % 66	0,06 / % 70	0,08 / % 54	0,05 / % 73	0,13 / % 32	0,05 / % 71	0,07 / % 63	0,05 / % 72	0,07 / % 61	0,05 / % 69
A4	0,3648	0,1 / % 70	0,15 / % 58	0,14 / % 61	0,11 / % 69	0,09 / % 73	0,07 / % 80	0,13 / % 64	0,11 / % 68	0,5 / % 45	0,05 / % 85
A7	0,2542	0,1 / % 60	0,11 / % 56	0,11 / % 56	0,11 / % 53	0,09 / % 64	0,07 / % 70	0,14 / % 44	0,13 / % 48	0,07 / % 71	0,05 / % 77
A8	0,6434	0,15 / % 76	0,15 / % 76	0,18 / % 72	0,21 / % 67	0,22 / % 65	0,17 / % 70	0,28 / % 56	0,26 / % 58	0,16 / % 75	0,12 / % 81
SU1	0,5853	0,14 / % 75	0,11 / % 81	0,11 / % 81	0,17 / % 70	0,11 / % 80	0,08 / % 85	0,14 / % 73	0,19 / % 67	0,09 / % 85	0,16 / % 71

Çizelge 3.10. Devam. Fajların (F1, F2, F3) ve antibiyotikğin olgun biyofilm üzerine ilavesi sonrası 24. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları (%).

SU2	0,4632	0,14 / % 69	0,09 / % 80	0,22 / % 51	0,33 / % 28	0,11 / % 76	0,13 / % 71	0,12 / % 38	0,12 / % 73	0,09 / % 80	0,08 / % 81
SU3	0,2856	0,15 / % 45	0,16 / % 43	0,08 / % 70	0,18 / % 35	0,15 / % 48	0,10 / % 63	0,11 / % 62	0,15 / % 46	0,18 / % 35	0,06 / % 78
ATCC	1,6330	0,63 / % 61	0,55 / % 66	0,73 / % 55	0,29 / % 82	0,47 / % 71	0,73 / % 55	0,35 / % 78	0,51 / % 68	0,36 / % 77	0,24 / % 85
M1	0,6130	0,29 / % 53	0,36 / % 41	0,41 / % 33	0,29 / % 53	0,29 / % 52	0,19 / % 68	0,17 / % 72	0,24 / % 61	0,25 / % 59	0,08 / % 84
M2	0,1918	0,11 / % 42	0,14 / % 23	0,15 / % 24	0,06 / % 66	0,09 / % 48	0,05 / % 72	0,11 / % 41	0,09 / % 52	0,08 / % 56	0,06 / % 69
M6	0,3254	0,16 / % 49	0,15 / % 55	0,19 / % 42	0,07 / % 77	0,12 / % 63	0,08 / % 75	0,16 / % 49	0,11 / % 66	0,14 / % 55	0,05 / % 80
M7	0,2765	0,13 / % 53	0,12 / % 55	0,15 / % 43	0,13 / % 52	0,19 / % 27	0,07 / % 73	0,19 / % 29	0,14 / % 48	0,18 / % 33	0,05 / % 77
M20	0,5734	0,47 / % 18	0,31 / % 46	0,19 / % 66	0,35 / % 39	0,25 / % 57	0,23 / % 59	0,42 / % 27	0,44 / % 23	0,35 / % 39	0,07 / % 85
M24	0,3837	0,18 / % 51	0,16 / % 60	0,16 / % 59	0,10 / % 73	0,13 / % 65	0,16 / % 59	0,09 / % 75	0,14 / % 62	0,12 / % 69	0,06 / % 83
M27	0,3681	0,18 / % 51	0,17 / % 52	0,09 / % 73	0,18 / % 50	0,13 / % 65	0,13 / % 63	0,13 / % 64	0,15 / % 59	0,11 / % 69	0,08 / % 73
M34	0,2151	0,09 / % 55	0,09 / % 56	0,13 / % 35	0,09 / % 57	0,14 / % 34	0,10 / % 52	0,13 / % 40	0,10 / % 51	0,08 / % 63	0,05 / % 70

Çizelge 3.11. Fajların (F1, F2, F3) ve antibiyotikğin olgun biyofilm üzerine ilavesi sonrası 48. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları (%).

Bakteri No	Biyofilm Kütle	F1				F2				F3				Kolistin
		10 ⁹ pob/mL	10 ⁸ pob/mL	10 ⁷ pob/mL	10 ⁶ pob/mL	10 ⁸ pob/mL	10 ⁷ pob/mL	10 ⁶ pob/mL	10 ⁵ pob/mL	10 ⁹ pob/mL	10 ⁸ pob/mL	10 ⁷ pob/mL	10 ⁶ pob/mL	MİK
		1	2	3	4	5	6	7	8	9				10
C1	0,7121	0,15 / % 78	0,16 / % 77	0,17 / % 76	0,14 / % 80	0,22 / % 68	0,23 / % 67	0,17 / % 76	0,18 / % 74	0,16 / % 77				0,16 / % 77
C3	0,1940	0,11 / % 41	0,13 / % 31	0,14 / % 24	0,09 / % 49	0,10 / % 45	0,12 / % 39	0,18 / % 7	0,14 / % 26	0,09 / % 54				0,09 / % 51
C5	0,1523	0,12 / % 21	0,15 / % 2,8	0,15 / % 1	0,09 / % 40	0,15 / % 1	0,14 / % 6	0,09 / % 36	0,11 / % 25	0,13 / % 14				0,09 / % 41
C7	0,9178	0,23 / % 75	0,27 / % 71	0,26 / % 71	0,28 / % 69	0,27 / % 70	0,26 / % 72	0,28 / % 70	0,28 / % 69	0,25 / % 73				0,21 / % 77
C10	0,7693	0,19 / % 75	0,21 / % 73	0,29 / % 62	0,23 / % 70	0,23 / % 70	0,28 / % 64	0,23 / % 70	0,22 / % 72	0,20 / % 74				0,17 / % 78
C18	0,6908	0,13 / % 81	0,19 / % 72	0,24 / % 65	0,27 / % 60	0,26 / % 62	0,43 / % 37	0,18 / % 74	0,29 / % 57	0,21 / % 70				0,12 / % 82
C19	0,4118	0,17 / % 57	0,17 / % 58	0,15 / % 62	0,09 / % 76	0,14 / % 66	0,16 / % 59	0,12 / % 69	0,09 / % 76	0,15 / % 63				0,09 / % 76
C22	0,3890	0,10 / % 74	0,13 / % 67	0,22 / % 43	0,19 / % 50	0,23 / % 41	0,17 / % 56	0,16 / % 58	0,11 / % 72	0,24 / % 37				0,09 / % 76
A1	0,1921	0,09 / % 52	0,08 / % 57	0,08 / % 55	0,08 / % 58	0,10 / % 46	0,11 / % 39	0,13 / % 29	0,07 / % 62	0,08 / % 54				0,05 / % 67
A4	0,3648	0,17 / % 53	0,28 / % 22	0,27 / % 26	0,31 / % 14	0,30 / % 17	0,26 / % 28	0,24 / % 33	0,25 / % 30	0,29 / % 36				0,05 / % 75
A7	0,2542	0,1 / % 60	0,12 / % 53	0,15 / % 39	0,20 / % 19	0,16 / % 34	0,12 / % 50	0,19 / % 22	0,14 / % 44	0,09 / % 64				0,05 / % 78
A8	0,6434	0,18 / % 71	0,21 / % 67	0,19 / % 70	0,29 / % 55	0,43 / % 33	0,41 / % 36	0,17 / % 72	0,17 / % 74	0,24 / % 63				0,12 / % 77
SU1	0,5853	0,28 / % 51	0,24 / % 57	0,13 / % 77	0,27 / % 53	0,24 / % 58	0,19 / % 68	0,16 / % 72	0,15 / % 74	0,14 / % 76				0,14 / % 76

Çizelge 3.11. Devam. Fajların (F1, F2, F3) ve antibiyotiklerin olgun biyofilm üzerine ilavesi sonrası 48. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları (%).

SU2	0,4632	0,19 / % 57	0,09 / % 80	0,16 / % 65	0,09 / % 80	0,09 / % 80	0,11 / % 76	0,08 / % 81	0,15 / % 69	0,22 / % 53	0,07 / % 80
SU3	0,2856	0,16 / % 42	0,17 / % 37	0,10 / % 62	0,13 / % 53	0,10 / % 63	0,08 / % 69	0,15 / % 46	0,12 / % 56	0,10 / % 62	0,05 / % 80
ATCC	1,6330	1,06 / % 35	1,36 / % 17	1,07 / % 34	1,33 / % 18	1,44 / % 11	1,02 / % 40	1,28 / % 21	1,07 / % 34	1,30 / % 20	0,51 / % 68
M1	0,6130	0,38 / % 38	0,36 / % 42	0,43 / % 29	0,25 / % 58	0,29 / % 51	0,45 / % 27	0,18 / % 70	0,31 / % 49	0,35 / % 43	0,08 / % 80
M2	0,1918	0,11 / % 41	0,10 / % 45	0,13 / % 30	0,17 / % 11	0,14 / % 26	0,12 / % 33	0,17 / % 13	0,15 / % 21	0,14 / % 25	0,08 / % 55
M6	0,3254	0,18 / % 42	0,26 / % 19	0,19 / % 39	0,24 / % 24	0,16 / % 50	0,18 / % 44	0,19 / % 41	0,10 / % 67	0,23 / % 28	0,09 / % 71
M7	0,2765	0,19 / % 28	0,14 / % 47	0,16 / % 41	0,14 / % 47	0,19 / % 28	0,18 / % 31	0,19 / % 29	0,16 / % 39	0,22 / % 17	0,09 / % 64
M20	0,5734	0,39 / % 32	0,36 / % 37	0,43 / % 24	0,30 / % 47	0,46 / % 29	0,29 / % 49	0,32 / % 44	0,26 / % 54	0,56 / % 1	0,19 / % 66
M24	0,3837	0,31 / % 18	0,20 / % 47	0,16 / % 57	0,24 / % 37	0,18 / % 52	0,19 / % 49	0,14 / % 63	0,14 / % 63	0,18 / % 53	0,13 / % 65
M27	0,3681	0,18 / % 51	0,23 / % 35	0,19 / % 48	0,15 / % 59	0,19 / % 48	0,19 / % 49	0,19 / % 46	0,25 / % 31	0,19 / % 48	0,23 / % 36
M34	0,2151	0,09 / % 53	0,12 / % 43	0,13 / % 37	0,15 / % 30	0,21 / % 1	0,21 / % 1	0,16 / % 22	0,21 / % 1	0,06 / % 69	0,07 / % 63

Çizelge 3.12. Faj 1, Faj 2 ve Faj 3'ün kütle azalması yönünden en etkin konsantrasyonları (pob/mL).

Bakteri No	F1 (C2 fajı) (pob/mL)	F2 (K3 Fajı) (pob/mL)	F3 (F1+F2) (pob/mL)	Kolistin MİK (µg/mL)
C1	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁷	0,25
C3	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁷	0,5
C5	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	0,25
C7	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	0,5
C10	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁷	0,25
C18	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁷	0,5
C19	10 ⁷	10 ⁹	10 ⁸	0,5
C22	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁸	256
A1	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁸	0,25
A4	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁸	0,25
A7	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁷	0,25
A8	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁷	1
SU1	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	0,5
SU2	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷	0,125
SU3	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	0,25
ATCC 19606	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁷	1
M1	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸	0,25
M2	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁷	0,25
M6	10 ⁷	10 ⁹	10 ⁸	0,25
M7	10 ⁷	10 ⁹	10 ⁷	0,25
M20	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	0,25
M24	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	0,25
M27	10 ⁷	10 ⁹	10 ⁷	16
M34	10 ⁷	10 ⁹	10 ⁷	0,25

MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyon.

3.7. Bakteriyofaj ile Antibiyotiğin Olgun Biyofilm Üzerine Etkinliği

Çalışmamızın son aşamasında *A. baumannii* biyofilmine karşı antibiyotik ile fajın birlikte uygulanmasının tedavi potansiyeli üzerine etkisi incelenmiştir. Faj 1, Faj 2 ve Faj 3 için daha önce saptanan en etkin konstrasyonlar bu aşamada kullanılmıştır. Belirlenen faj konsantrasyonları ile MİK değerlerinde kolistinin eş zamanlı ve ardışık kullanımlarının tedavi etkinliği saptanmıştır. Eş zamanlı uygulamada; 48 saatlik biyofilm kütlesi üzerine Faj 1 (C2) + antibiyotik, Faj 2 (K3) + antibiyotik, Faj 3+ antibiyotik (kolistin MİK) uygulanarak, 24 ve 48 saat temas sonrası sonuçlar kütle azalması yönünden incelenmiştir. Ardışık uygulama yönteminde ise; kuyucuklara öncelikli olarak Faj 1 (C2), Faj 2 (K3), Faj 3 ilavesi yapıp, 6. saatin ardından antibiyotik (kolistin MİK) eklenerek 24 saat ve 48 saatte biyofilm kütlesi üzerine etkisi incelenmiştir. Çizelge 3.13 ve 3.14’de *A. baumannii* suşlarının olgun biyofilmleri üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiğin birlikte ve ardışık uygulamasının 24. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları verilmiştir. Çizelge 3.15 ve 3.16’de *A. baumannii* suşlarının olgun biyofilmleri üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiğin birlikte ve ardışık uygulamasının 48. saatte ölçülen OD değerleri ve biyofilme etki oranları verilmiştir.

Antibiyotik ve fajların ardışık ve birlikte kullanımının 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamaları birbiri ile kıyaslanmıştır. 48 saatlik tedavide suşların genelinde, etkinin hala yüksek oranda korunduğu; 24 saatlik uygulama ile etkide anlamlı bir farklılığın olmadığı ($p<0,001$) ancak etkide artışa da neden olmadığı, aksi yönde suşların genelinde etkide azalmaya neden olduğu görülmüştür ($p=0,038$).

Antibiyotik ile fajın tek başlarına ve birlikte kullanımlarının olgun biyofilm kütlesi üzerine azaltma etkisi de değerlendirilmiştir. Fajların (Faj 1, Faj 2, Faj 3) ve antibiyotiğin (kolistin MİK değerlerinde) tek başlarına 6 saatlik muamelesi ile birlikte ve ardışık uygulamanın 24 saatlik protokolleri kıyaslandığında, tüm suşlarda ardışık ve birlikte uygulamanın, antibiyotiğin tek başına uygulanmasından daha etkin bir

biyofilm kütle azalması sağladığı görülmüştür ($p<0,001$). Birlikte uygulama protokolü suşların % 54,16'sında antibiyotiğin tek başına kullanımından daha etkili bulunmuştur. F1 fajının tek başına etkisi ile ardışık uygulama kıyaslandığında suşların % 87,5'inde anlamlı aktivite artışı görülürken; M7 suşunun bu duruma kısmen direnç gösterdiği, etkinin F1 fajının tek başına sağladığı etkiden de düşük olduğu görülmüştür. F2 fajının tek başına etkisi ile ardışık uygulama kıyaslandığında suşların % 87,5'inde anlamlı aktivite artışı görülürken; M1 suşunda faj ve antibiyotik için aktivitenin tekli uygulamaya göre yarı oranında azaldığı görülmüştür. F3 fajının tek başına etkisi ile ardışık uygulama kıyaslandığında suşların % 84'ünde anlamlı aktivite artışı görülmüştür.

Olgun biyofilm kütlesi üzerine, antibiyotik ile fajların tek başına 24 saatlik muamelesi, birlikte ve ardışık uygulamanın 24 saatlik protokolleri ile karşılaştırılmıştır ($p<0,001$). Buna göre suşların tamamında sadece ardışık uygulamanın tekil uygulamalara göre daha etkin veya benzer olduğu, bu etki derecesinin bazı suşlarda (M20 suşu) iki katına çıktığı görülmüştür. Birlikte uygulama protokolü 24 saatlik tekli uygulama ile kıyaslandığında suşların % 25'inde etki, antibiyotik ve fajın tek başlarına oluşturdukları etkiden daha düşüktür ($p=0,012$). Bununla birlikte suşların % 54,6'sında birlikte uygulama protokolündeki etki, ardışık uygulama protokolü ile eşdeğer kütle azalması sağlamıştır.

Olgun biyofilm kütlesi üzerine, antibiyotik ile fajların tek başına 48 saatlik terapisi, birlikte ve ardışık uygulamanın 48 saatlik protokolleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre M2 ve M34 suşunun antibiyotik ile fajın birlikte kullanıldığı protokolü hariç tüm suşlarda ardışık ve birlikte uygulamanın tekil uygulamalara kıyasla daha etkin olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.13. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiklerin birlikte ve ardışık uygulamasının 24. saatte ölçülen OD değerleri.

		ARDIŞIK UYGULAMA (6 SAAT FAJ+ ANT)						BİRLİKTE UYGULAMA					
		F1		F2		F3		F1+A		F2+A		F3+A	
Bakteri No	Biyofilm Kütle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C1	0,7121	0,0555	0,0489	0,0533	0,0489	0,0496	0,0548	0,0617	0,0595	0,0544	0,0565	0,0576	0,0780
C3	0,1940	0,0421	0,0327	0,0509	0,0493	0,0451	0,0243	0,0965	0,0620	0,0490	0,0994	0,0720	0,0800
C5	0,1523	0,0579	0,0572	0,0631	0,0542	0,0787	0,0982	0,1172	0,1147	0,1155	0,0995	0,1160	0,0996
C7	0,9178	0,1672	0,1619	0,2493	0,3068	0,1108	0,1103	0,1421	0,1705	0,1468	0,1505	0,1824	0,1958
C10	0,7693	0,1465	0,0994	0,0933	0,1058	0,0972	0,0968	0,1284	0,1604	0,0801	0,0712	0,1174	0,1359
C18	0,6908	0,0512	0,0505	0,0512	0,0484	0,0498	0,0475	0,0550	0,0505	0,0478	0,0458	0,0565	0,0517
C19	0,4118	0,0555	0,0495	0,0480	0,0452	0,0505	0,0481	0,0495	0,0512	0,0462	0,0544	0,0490	0,0540
C22	0,3890	0,0641	0,0686	0,0588	0,0711	0,0579	0,0575	0,0574	0,0772	0,0698	0,0567	0,0650	0,0813
A1	0,1921	0,0616	0,0716	0,0569	0,0707	0,0588	0,0586	0,0630	0,0588	0,0747	0,0878	0,0621	0,0894
A4	0,3648	0,0641	0,0544	0,0521	0,0514	0,0516	0,0612	0,0562	0,0647	0,1063	0,1161	0,0902	0,0739
A7	0,2542	0,0652	0,0531	0,0545	0,0530	0,0517	0,0541	0,0640	0,0898	0,1034	0,1090	0,0548	0,0597
A8	0,6434	0,0542	0,0580	0,0652	0,0695	0,0591	0,0762	0,0566	0,0562	0,0461	0,0491	0,0552	0,0667
SU1	0,5853	0,0676	0,0540	0,0821	0,1060	0,1508	0,1353	0,1589	0,1367	0,0803	0,0679	0,0973	0,0854

Çizelge 3.13. Devam. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiğin birlikte ve ardışık uygulamasının 24. saatte ölçülen OD değerleri.

SU2	0,4632	0,0610	0,0503	0,0521	0,0670	0,0504	0,0694	0,1074	0,0978	0,1390	0,1376	0,1524	0,1513
SU3	0,2856	0,0986	0,1109	0,0713	0,0558	0,0704	0,0553	0,1574	0,1608	0,0971	0,0912	0,2187	0,2314
ATCC	1,6330	0,2353	0,2159	0,2583	0,2018	0,2050	0,1819	0,2309	0,2303	0,1435	0,1640	0,3443	0,3274
M1	0,6130	0,2447	0,2710	0,3295	0,3085	0,0672	0,0860	0,3624	0,3945	0,1880	0,2131	0,2203	0,2693
M2	0,1918	0,0779	0,0804	0,0660	0,0537	0,0864	0,0821	0,1556	0,1675	0,1376	0,1477	0,1859	0,1789
M6	0,3254	0,0694	0,0718	0,0479	0,0526	0,680	0,0576	0,1694	0,1414	0,1856	0,1792	0,2037	0,2253
M7	0,2765	0,1039	0,1058	0,0521	0,0613	0,1012	0,1010	0,1725	0,1887	0,1796	0,1887	0,1935	0,2094
M20	0,5734	0,0558	0,0691	0,1474	0,0989	0,0745	0,1014	0,1369	0,1627	0,1506	0,1477	0,1356	0,1209
M24	0,3837	0,0559	0,0512	0,0536	0,0687	0,0506	0,0802	0,1242	0,1639	0,1401	0,1433	0,1261	0,1208
M27	0,3681	0,0726	0,0651	0,0544	0,0622	0,0579	0,0693	0,0522	0,0525	0,0493	0,0491	0,0591	0,0888
M34	0,2151	0,0554	0,0499	0,0518	0,0533	0,0642	0,0750	0,1668	0,1675	0,1376	0,1454	0,1104	0,1173

Çizelge 3.14. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotigin birlikte ve ardışık uygulamasının 24. saatte biyofilme etki oranları (%).

BİRLİKTE UYGULAMA													
ARDIŞIK UYGULAMA (6 SAAT FAJ+ ANT)													
F1		F2		F3		F1+A		F2+A		F3+A			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Bakteri No	Biyofilm Kütle												
C1	0,7121	92,2	93,1	92,5	93,1	92,3	91,3	91,6	92,3	92,1	91,9	89	
C3	0,1940	78,3	83,1	73,	74,6	76,7	87,4	50,2	68	74,7	48,7	62,9	58,7
C5	0,1523	62	62,4	58,5	64,4	48,3	35,5	23	24,7	24,1	34,6	23,8	34,6
C7	0,9178	81,8	82,3	72,8	66,6	87,9	87,9	84,5	81,4	84	83,6	80,1	78,6
C10	0,7693	81	87,1	87,9	86,2	87,3	87,4	83,3	79,1	89,6	90,7	84,7	82,3
C18	0,6908	92,5	92,7	92,6	93	92,8	93,1	92	92,7	93	93,3	91,8	92,5
C19	0,4118	86,5	88	88,3	89	87,7	88,3	87,9	87,5	88,8	86,8	88,1	86,9
C22	0,3890	83,5	82,3	84,9	81,7	85,1	85,2	85,2	80,1	82	85,4	83,3	79,1
A1	0,1921	67,6	62,3	703	62,8	69,	69,1	66,8	69	60,7	53,8	67,3	52,9
A4	0,3648	82,2	84,9	85,5	85,7	85,6	83	84,4	82	70,4	67,7	74,9	79,5
A7	0,2542	73,9	78,7	78,2	78,8	79,3	78,3	74,4	64	58,6	56,4	78,1	76,1
A8	0,6434	91,5	90,9	89,8	89,1	90,8	88,1	91,1	91,2	92,8	92,3	91,4	89,6
SU1	0,5853	88,3	90,7	85,8	81,7	74	76,7	72,6	76,4	86,1	88,3	83,2	85,3

Çizelge 3.14. Devam. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiğin birlikte ve ardışık uygulamasının 24. saatte biyofilme etki oranları (%).

SU2	0,4632	86,7	89,1	88,7	85,4	89	84,9	76,6	78,7	69,8	70,1	66,9	67,1
SU3	0,2856	64,8	60,4	74,5	80,1	74,8	80,2	43,8	42,6	65,3	67,4	21,9	17,3
ATCC	1,6330	85,5	86,7	84,1	87,6	87,4	88,8	85,8	85,8	91,2	89,9	78,9	79,9
M1	0,6130	60,1	55,8	46,2	49,7	89	85,9	40,9	35,6	69,3	65,2	64	56
M2	0,1918	59,4	58,1	65,6	72	54,9	57,2	18,9	12,6	28,2	22,9	3,1	6,7
M6	0,3254	78,3	77,5	85	83,5	78,7	82	47	55,8	42	44	36,3	29,6
M7	0,2765	61,5	60,8	80,7	77,3	62,5	62,6	36,1	30,1	33,5	30,1	28,3	22,4
M20	0,5734	90,2	87,9	74,3	82,7	87	82,3	76,1	71,6	73,7	74,2	76,3	79
M24	0,3837	85,4	86,6	86	82,1	86,8	79,1	67,6	57,3	63,5	62,6	67,1	60,7
M27	0,3681	80,3	82,3	85,2	83,1	84,3	81,2	85,8	85,7	86,6	86,6	83,9	75,9
M34	0,2151	73,6	76,2	75,3	74,6	69,4	64,3	20,6	20,2	34,5	30,7	47,4	44,1

Çizelge 3.15. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotüğün birlikte ve ardışık uygulamasının 48. saatte ölçülen OD değerleri.

Bakteri No	Biyofilm Kütle	ARDIŞIK UYGULAMA (6 SAAT FAJ+ ANT)										BİRLİKTE UYGULAMA				
		F1		F2			F3		F1+A			F2+A		F3+A		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
C1	0,7121	0,0711	0,0733	0,0559	0,0519	0,0539	0,0584	0,0575	0,0530	0,0507	0,0581	0,0485	0,0609			
C3	0,1940	0,0982	0,1100	0,0523	0,0613	0,0984	0,0805	0,0730	0,0684	0,0666	0,0701	0,0537	0,0680			
C5	0,1523	0,1178	0,1071	0,0876	0,1010	0,1088	0,0940	0,1196	0,1036	0,0714	0,0596	0,0746	0,0550			
C7	0,9178	0,2415	0,2635	0,4458	0,4191	0,1944	0,2283	0,0661	0,0710	0,0530	0,0560	0,1020	0,0800			
C10	0,7693	0,2841	0,2898	0,1003	0,1114	0,1020	0,0888	0,1047	0,0934	0,0836	0,0703	0,0707	0,1051			
C18	0,6908	0,0526	0,0503	0,0474	0,0572	0,0469	0,0714	0,0708	0,0465	0,0475	0,0472	0,0468	0,0489			
C19	0,4118	0,0640	0,0556	0,0567	0,0558	0,0682	0,0755	0,0828	0,0526	0,0677	0,0936	0,0508	0,0669			
C22	0,3890	0,0677	0,0625	0,0542	0,0551	0,0549	0,0528	0,0746	0,0506	0,1060	0,1150	0,0684	0,0520			
A1	0,1921	0,0766	0,0861	0,0587	0,0668	0,0614	0,0747	0,0736	0,0678	0,0941	0,0745	0,0852	0,0710			
A4	0,3648	0,0848	0,0816	0,0589	0,0646	0,0750	0,0687	0,1274	0,1577	0,0725	0,0830	0,0932	0,0915			
A7	0,2542	0,0512	0,0492	0,0525	0,0522	0,0545	0,0568	0,0503	0,0524	0,0686	0,0794	0,0769	0,0978			
A8	0,6434	0,0758	0,0555	0,0888	0,0644	0,0738	0,0764	0,1157	0,0979	0,1975	0,1617	0,1347	0,0985			
SU1	0,5853	0,1357	0,1071	0,0711	0,0756	0,0870	0,0815	0,0824	0,0905	0,1188	0,0970	0,1171	0,1527			

Çizelge 3.15. Devam. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiklerin birlikte ve ardışık uygulamasının 48. saatte ölçülen OD değerleri.

SU2	0,4632	0,0595	0,0558	0,0546	0,0560	0,0484	0,0557	0,0695	0,0753	0,0858	0,0839	0,0984	0,1345
SU3	0,2856	0,2243	0,2446	0,0670	0,0606	0,0487	0,0626	0,0902	0,1046	0,1279	0,1513	0,1553	0,1713
ATCC	1,6330	0,2486	0,2988	0,1552	0,1603	0,1377	0,1282	0,5765	0,6151	0,4779	0,4578	0,5401	0,5499
M1	0,6130	0,1534	0,1701	0,1589	0,1319	0,0819	0,1067	0,3814	0,3912	0,2539	0,1752	0,3053	0,3647
M2	0,1918	0,0971	0,0934	0,0512	0,0577	0,0582	0,0648	0,1749	0,1838	0,2016	0,2066	0,1592	0,1809
M6	0,3254	0,0581	0,0560	0,0604	0,0650	0,1080	0,1238	0,2153	0,2368	0,2014	0,1915	0,2206	0,2059
M7	0,2765	0,0678	0,0525	0,0477	0,0534	0,1453	0,1365	0,2042	0,2288	0,1758	0,1810	0,2114	0,2140
M20	0,5734	0,1079	0,1192	0,1414	0,1530	0,1884	0,1796	0,1625	0,1252	0,1180	0,1768	0,2132	0,1895
M24	0,3837	0,0735	0,0722	0,0526	0,0499	0,0550	0,0525	0,1099	0,1098	0,0908	0,1726	0,3174	0,3010
M27	0,3681	0,0672	0,0842	0,0467	0,0459	0,0597	0,0575	0,0527	0,0491	0,0453	0,0488	0,0580	0,0432
M34	0,2151	0,0791	0,0864	0,0552	0,0586	0,0984	0,1174	0,2307	0,2384	0,229	0,2470	0,2373	0,2292

Çizelge 3.16. Olgun biyofilmlerin üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiklerin birlikte ve ardışık uygulamasının 48. saatte biyofilme etki oranları (%).

		ARDIŞIK UYGULAMA (6 SAAT FAJ+ ANT)						BİRLİKTE UYGULAMA					
		F1		F2		F3		F1+A		F2+A		F3+A	
Bakteri No	Biyofilm Kütle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C1	0,7121	90,0	89,7	92,1	92,7	92,4	91,8	91,9	92,5	92,9	91,8	93,1	91,4
C3	0,1940	49,4	43,3	73	68,4	49,3	58,5	62,3	64,7	65,7	63,9	72,3	64,9
C5	0,1523	22,6	29,7	42,5	33,7	28,5	38,3	21,5	31,9	53,1	60,8	51	63,8
C7	0,9178	73,7	71,3	51,4	54,3	78,8	75,1	92,8	92,3	94,2	93,9	88,8	91,3
C10	0,7693	63	62,3	87	85,5	86,7	88,4	86,4	87,8	89,1	90,9	90,8	86,3
C18	0,6908	92,3	92,7	93	91,7	93,2	89,6	89,7	93,3	93,1	93,1	93,2	92,9
C19	0,4118	84,4	86,5	86,2	86,4	83,4	81,6	79,9	87,2	83,5	77,2	87,6	83,7
C22	0,3890	82,6	83,9	86	85,8	85,9	86,4	80,8	86,9	72,7	70,4	82,4	86,6
A1	0,1921	59,7	54,7	69	64,8	67,7	60,7	61,3	64,3	50,5	60,8	55,1	62,6
A4	0,3648	76,4	77,3	83,6	82,1	79,1	80,9	64,6	56,2	79,9	76,9	74,1	74,6
A7	0,2542	79,5	80,3	79	79,1	78,2	77,28	79,88	79,04	72,56	68,24	69,2	60,8
A8	0,6434	88,1	91,3	86,1	89,9	88,5	88,1	81,9	84,7	69,1	74,7	78,9	84,6
SU1	0,5853	76,6	81,5	87,7	86,9	85	85,9	85,8	84,4	79,5	83,3	79,8	73,6

Çizelge 3.16. Devam. Olgun biyofilm üzerine fajlar (F1, F2, F3) ile antibiyotiğin birlikte ve ardışık uygulamasının 48. saatte biyofilme etki oranları (%).

SU2	0,4632	87	87,9	88,1	87,82609	89,5	87,9	84,9	83,6	81,3	81,8	78,6	70,7
SU3	0,2856	19,9	12,6	76,1	78,4	82,6	77,6	67,8	62,6	54,3	45,9	44,5	38,8
ATCC	1,6330	84,7	81,6	90,5	90,2	91,5	92,1	64,6	62,3	70,7	71,9	66,9	66,3
M1	0,6130	75	72,2	74,1	78,5	86,6	82,6	37,8	36,2	58,6	71,4	50,2	40,5
M2	0,1918	49,3	51,3	73,3	69,9	69,6	66,2	8,8	4,2	0	0	17	5,7
M6	0,3254	81,8	82,5	81,1	79,7	66,2	61,3	32,7	26	37,1	40,1	31,1	35,6
M7	0,2765	74,9	80,5	82,3	80,2	46,2	49,4	24,4	15,2	34,9	32,9	21,7	20,7
M20	0,5734	81,2	79,2	75,3	73,3	67,1	68,7	71,6	78,2	79,4	69,1	62,8	66,9
M24	0,3837	80,8	81,2	86,3	87	85,6	86,3	71,4	71,4	76,3	55	17,3	21,5
M27	0,3681	81,7	77,1	87,3	87,5	83,8	84,4	85,7	86,7	87,7	86,7	84,2	88,3
M34	0,2151	62,3	58,8	73,7	72,1	53,1	44,1	0	0	0	0	0	0

4. TARTIŞMA

Son yıllarda çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* suşları dünya çapında yayılmaktadır. Bu suşlar, uzun hastanede kalış süresi, artan maliyetler ve yüksek ölüm oranlarına neden olmaktadır. Ek olarak, panrezistan türlerin ortaya çıkması ciddi bir klinik problem haline gelmiştir. Çünkü sınırlı sayıda antibiyotik bu tür suşlar için etkilidir. Bu nedenle, nozokomiyal bulaş, enfeksiyon risk faktörleri, ilaca dirençli suşlar ve etkili tedavileri dahil olmak üzere, *Acinetobacter* enfeksiyonunun özelliklerini açıklığa kavuşturmak için son zamanlarda çok sayıda araştırma yapılmaktadır (Kiyasu ve ark., 2020).

A. baumannii ventilatörle ilişkili pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının en yaygın olduğu, deri ve yumuşak doku, yara, idrar yolu enfeksiyonları ve ikincil menenjit dâhil olmak üzere geniş bir yelpazede ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı bir patojendir (Vincent ve ark., 2009). Beş kıtada, 75 ülke yoğun bakım ünitelerinde yapılan bir prevalans çalışmasında, bu mikroorganizmanın en yaygın beşinci patojen olduğu ve ölüm oranlarının % 50'ye ulaşabildiği bildirilmiştir (An ve ark., 2017). Toplum kaynaklı enfeksiyonlar da bildirilmiştir, ancak çevresel kaynaklardan çok az suş izole edilmiş ve hastane dışındaki enfeksiyon rezervuarları tanımlanmamıştır. Ek olarak, *A. baumannii*'nin virülans özellikleri ve patojenik potansiyeli de çoğunlukla tam aydınlatılamamıştır. *A. baumannii* sekans veri tabanının zamanla genişlemesi ile bir insan patojeni olarak evrimi ve adaptasyonu hakkında bilgiler sunan geniş dizili filogenomik ve fenotipik analizlerin geliştirilmesi bu nedenle önem kazanmıştır (An ve ark., 2017; Antunes ve ark., 2014).

A. baumannii'nin kuruluğa ve dezenfektanlara karşı doğal direnci ve plazmitler, integronlar, transpozonlar gibi genetik elemanların edinimi ile çok çeşitli direnç mekanizmalarını kazanması, çevrede uzun süre hayatta kalmasını sağlamakta, klinik

ortamdan yok edilmesini ve enfeksiyonuyla mücadelesini zorlaştırmaktadır (Roca ve ark., 2012).

A. baumannii enfeksiyonlarının tedavisinde, direnç profilleri de düşünüldüğünde mevcut olan farklı tedavi seçeneklerini hesaba katmak önemlidir. İki binli yılların başlarında karbapeneme dirençli *A. baumannii* klinik izolatlarının tedavisinde, sulbaktam β -laktam antibiyotiklerle kombine kullanılmış olsa da, günümüzde sulbaktama direnç yüzdesi de artmıştır. Benzer şekilde *A. baumannii*'nin neden olduğu hastane enfeksiyonlarının tedavisinde tigesiklin ile tedavi sırasında olası direnç gelişimini önlemek için diğer antimikrobiyallerle kombine rejimlerin kullanılması önerilmektedir (Karaoglan ve ark., 2013; Principe ve ark., 2009).

2013 yılında 50 karbapenem dirençli *A. baumannii* suşu üzerinde yapılan bir çalışmada, suşların % 96'sı kolistin'e ve % 64'ü tigesikline duyarlı olarak bulunmuştur. Suşlar üzerinde çeşitli antibiyotik kombinasyonları test edilmiş ve tigesiklin, sefoperazon/sulbaktam veya piperasilin / tazobaktam ile kombine kolistin, bazı karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarında sinerjik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar klinisyenlere, karbapeneme dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin ile diğer antibiyotiklerin veya β -laktamaz inhibitörlerinin birlikte kullanılması gerektiğini düşündürmektedir (Karaoglan ve ark., 2013).

A. baumannii karbapenemler ve bazen kolistin de dâhil olmak üzere birçok antibakteriyel maddeye dirençlidir. Bu nedenle, çoğu durumda, bu mikroorganizmanın neden olduğu hastane enfeksiyonları için optimal tedavi mevcut değildir. Güncel çalışmalara bakıldığında benzer şekilde ülkemizde de yıllar içinde kolistin direnci artmaktadır. Ülkemizde 2015-2018 yılları arasında bir üniversite hastanesinde yapılan çalışmada 1148 *A.baumannii* izolatının kolistin direnci 2015, 2016, 2017 ve 2018 yılları için sırasıyla % 0,8, % 1,4, % 2,9 ve % 3,2 olarak tespit edilmiştir (Özekinci ve ark., 2020). Çalışmamızda 4 farklı hastaneden alınan 78 *A. baumannii* izolatının antibiyotik duyarlılık profilleri çıkartılarak, suşların çoklu ilaç dirençli olduğu

belirlenmiştir. *A. baumannii* izolatları için sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen kolistin MİK değerlerinin 0,125-64+ mg/mL arasında değiştiği saptanmıştır. Bu şuşlardan 7 (% 8,9) tanesinin kolistine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Bakteriyofajlar, özellikle konakçı bakterilere saldırıp onları öldürebilen virüslerdir. Bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için Félix d'Herelle tarafından ilk kez 1919 yılında uygulanmıştır (Dublanchet ve Fruciano, 2008). Bakterileri öldürme yetenekleri nedeniyle, kısa süre sonra, Güneydoğu Asya'daki hıyarcıklı veba, Fransa'daki dizanteri ve Hindistan'daki kolera gibi dünya çapında çeşitli bakteriyel enfeksiyonlarda, ikinci Dünya Savaşı sırasında da bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmıştır (Summers, 2001). Bununla birlikte, antibiyotiklerin keşfedilmesinin ardından 20. yüzyılın ortalarında faj tedavisi büyük ölçüde terk edilmiştir (Cooper ve ark., 2016). O zamandan beri, çoğu umut verici çeşitli faj tedavi denemeleri yapılmıştır (Sulakvelidze ve ark., 2001). *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* ve *E. coli*'nin neden olduğu bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılmak üzere, çeşitli fajları içeren faj preparatları geliştirilmiştir (Abedon, 2016; Brüssow, 2012).

Çoklu ilaca dirençli bakterilerin küresel yükselişi, bir "antibiyotik kıyametinin" hızla yaklaşmakta olduğu fikrine yol açmıştır. Bu durum, Doğu Avrupa'da faj tedavisinin uzun klinik geçmişi yeni in vitro ve in vivo denemelerin başarıları ile birleştiğinde, tam faj veya faj bazlı antibakteriyel ajanlar için potansiyel bir alan oluşturmaktadır (Cooper ve ark., 2016).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ilki 2006 yılında olmak üzere gıda katkı maddeleri olarak kullanılacak faj preparatlarını onaylamıştır (örn., Listex, EcoShield vb.). Ayrıca 2013 yılında Dünya Tıp Birliği, Helsinki Bildirgesi'nde, geleneksel olmayan tıp türlerinin bir temsilcisi olarak, insan denekleri içeren tıbbi araştırmalar etik ilkelerine uygun olarak kullanılmak kaydıyla, faj tedavisi uygulamasının önünü açmıştır (Patey ve ark., 2018). Günümüzde Avrupa ülkeleri fajları biyolojik ajanlar

olarak kabul etmekte, bu nedenle faj denemelerinin mevcut biyolojik tıbbi ürün kılavuzlarını takip etmesi gerekmektedir, ABD'de ise denemelerin aşısı bölümü ve ilgili ürün uygulamalarına ilişkin yönergeler uyması zorunludur. Ancak bugüne kadar, bu yetkili kurumların hiçbiri tarafından faj tedavisine özgü bir kılavuz yayınlanmamıştır (Oliveira ve ark., 2015). Halen Eliava Enstitüsünde (Gürcistan) çok sayıda ticari faj preparatı mevcuttur; bu fajların tümü, bir dizi ilgili klinik izolata karşı geniş etkinliğe sahiptir ve çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkinliği gösterilmiştir (Chanishvili, 2012).

Son zamanlarda antibiyotiğe dirençli bakteriyel enfeksiyonların yaygınlığı nedeniyle faj tedavi çalışmaları yükseliş yaşamaktadır. Geleneksel antibiyotik tedavisine alternatif olarak fajlar, konakçı spesifikliğı, lokal mikrobiyota üzerindeki minimal etkileri, konakçı bakterilerde kendi kendine replikasyon ve kritik yan etkilerinin olmaması gibi birçok avantajı nedeniyle tıbbi kullanımlarına ek olarak dekontaminasyon ajanı olarak gıdalarda kullanılabilmektedir (Kumari ve ark., 2011; Oliveira ve ark., 2015). Fajların çevre biyokontrol ajanı olma potansiyelini araştıran çalışmalar mevcuttur. Chen ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada hastane enfeksiyonu etkeni çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* (ÇİD Ab) izolatları kullanılmış ve araştırmacılar sert yüzeyler ile süspansiyonlarda ÇİD Ab kontaminasyonlarının azaltılmasında fajların faydalı olabileceğini önermişlerdir. Fajların aynı zamanda, el antiseptiğı üretiminde solüsyon içine inoküle edilerek kullanılabileceğı; içerikteki faj konsantrasyonu ve inkübasyon zamanının (bakteri ile faj temas süresi) önemli olacağı vurgulanmıştır (Chen ve ark., 2013).

Oliveira ve ark. (2016)'nın yaptıkları çalışmada Gram negatif patojenlere karşı etkin faj endolizinlerinin antibakteriyel potansiyeli gösterilmiştir. *Acinetobacter* faj vb-AbaP-CEB1 (ABgb46)'den eksprese edilen ve karakterize edilen endolizin bir vektöre klonlanmış ve ÇİD Ab izolatlarına karşı antibakteriyel etkinliğı test edilmiştir. ABgp46 fajını, dış zar geçirgenleştirici maddeler olarak işlev gören birkaç organik asit ile birleştirerek, antibakteriyel aktiviteyi diğer Gram-negatif bakteriyel patojenleri içerecek şekilde artırmak ve genişletmek mümkün olabilmektedir. Sonuç olarak

çalışmada, faj endolizinlerinin Gram negatif patojenlere karşı geniş ve yüksek aktivite gösterdiği, beşeri ve veteriner tıpta kullanılabileceği gösterilmiştir (Oliveira ve ark., 2016).

Günümüzde enfeksiyon etkeni farklı bakterileri tedavi etmek için birden fazla faj türünden faj kokteylleri hazırlanmaktadır (Ross ve ark., 2016). Bir çalışmada, farklı ancak örtüşen konakçı suşlarına sahip üç fajdan (GH-K1, GH-K2 ve GH-K3) faj kokteyli hazırlanmış, faj kokteylinin herhangi bir fajın tek başına etkinliği ile karşılaştırıldığında, *K. pneumoniae*'nin mutasyon sıklığını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Aynı zamanda faj kokteylinin minimum koruyucu dozu, monofajdan önemli ölçüde daha az bulunmuştur (Gu ve ark., 2012).

A. baumannii'ye özgü litik fajların in vivo etkinliklerinin değerlendirildiği araştırmalar sınırlı sayıda olmakla birlikte çalışmalar sıklıkla fajların haricen kullanımları üzerinedir. Shivaswamy ve ark. (2015) tarafından diyabetik ratlarda *A. baumannii* ile enfekte yaralarda faj terapisi ile 8 günün sonunda yaradan bakteri izole edilemediği bildirilmiştir (Shivaswamy ve ark., 2015). Benzer şekilde Kusradze ve ark. (2016) Gürcistan'da yaptıkları çalışmada 6 günlük tedavi sonunda enfekte yaralarda bakteri yükünde anlamlı bir azalma gözlemiştir (Kusradze ve ark., 2016). Mendes ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, diyabetik fare ve domuzlarda *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* ile ayrı yara modelleri oluşturmuş ve bu yaralara bu üç etkene karşı antimikrobiyal etki ve yara iyileştirme potansiyeline sahip olduğu daha önce belirlenen 5 fajın kokteylini hazırlayarak uygulamıştır. Her 4 saatte bir tekrarlanan tedavinin, hücre aktivitesinde daha fazla azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Mendes ve ark., 2014).

Bununla birlikte birkaç çalışma grubunun, inhaler ve intravenöz kullanımları test eden çalışmaları mevcuttur. Ekim 2017'de MDR *A. baumannii* enfeksiyonu ile komplike hale gelen nekrotizan pankreatitli 68 yaşındaki bir diyabetik hastaya, kişiselleştirilmiş bakteriyofaj kokteylinin intravenöz olarak başarıyla uygulandığı bir

vaka bildirilmiştir. Hastaya ait *A. baumannii* izolatu için litik aktiviteye sahip dokuz farklı bakteriyofaj izole edilmiş, bu fajların apse boşluklarına intravenöz ve perkütan olarak uygulanması ile enfeksiyon temizlenmiştir (Schooley ve ark., 2017). Benzer şekilde aynı yıl Hindistan’da, *E. coli* bakteriyofajının oral uygulamasının güvenliği ve etkinliğini kanıtlayan çalışma yayınlanmıştır (Sarker ve ark., 2017). Bu klinik deneyler, bakteriyofaj esaslı terapötiklerin kullanılabilirliğini açıklamakta ve faj tedavisi için umut verici bir gelecek sağlamaktadır.

Bakteriyofajlar deniz suyu, tatlı su ve toprak gibi hemen hemen her ortamda bulunabilmektedirler. Literatürdeki çalışmalarda çeşitli izolasyon materyallerinin faj kaynağı olarak kullanıldığı görülmektedir. Bir çalışmada Çin’in Kuzeydoğu bölgesindeki bir hastanenin yanık servisinden izole edilen çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* AB1 izolatına özgü, Abp1 fajını, yine aynı bölgede bulunan kanalizasyon suyunu kullanarak izole etmişlerdir (Yin ve ark., 2017). *S. typhimurium*’un konak hücre olarak kullanıldığı başka bir çalışmada toplam 189 dışkı örneğinden 55 *Salmonella* fajı; 86 toprak örneğinin kullanıldığı başka bir çalışmada 10 (% 11,6) *Burkholderia pseudomallei* fajı; yine başka bir çalışmada Almanya’nın farklı atık su kaynaklarından 35 *Achromobacter xylosoxidans* fajı izole edilmiştir (Bardina ve ark., 2012; Withatanung ve ark., 2016; Wittmann ve ark., 2014).

Bizim çalışmamızda da *A. baumannii*’ye özgü litik karakterde faj izole etmek amacıyla Ankara ili çevresi çevresel su kaynakları kullanılmıştır. Toplamda alınan 31 su örneğinden 13’ünde *A. baumannii* fajının varlığı saptanmıştır.

Literatürde bakterinin ekspanansiyel fazında faj ilavesi yapıldığı bildirilmektedir (Jin ve ark., 2012; Kwiatak ve ark., 2017; Sasikala ve Srinivasan, 2016). Bu sürede bakteri üreme fazında olduğundan, hücre duvarının yeni sentezlenmiş olması ve bakteriyofajın bu fazda hücre duvarına kolay adsorbe olması açısından önemlidir. Stasyonier fazdaki hücrelerde lizisin azalmasını sağlayan bazı temel faktörler vardır. Bunlar arasında, daha az faj adsorpsiyon bölgesi, enfeksiyon

başına daha düşük faj projenisi ve hücre duvarı kalınlığı nedeniyle azalmış hücre lizizi sayılabilmektedir (Weitz ve Dushoff, 2008). Konak bakterinin çıkarılan üreme eğrisi grafiğinde ve hesaplanan ikiye bölünme zamanlarında tespit edildiği üzere bakterinin en hızlı bölünme gösterdiği zaman üçüncü saattir. Çalışmamızda bu nedenle konak bakterinin üç saatlik kültürü kullanılmıştır.

Bakteriyofajın faj terapisine seçilebilmesi için en temel özellik güçlü litik etkisi ve konak özgüllüğüdür. Bakteriyofajların bazı uygulamalarında da geniş konak aralığı gösteren fajların daha faydalı olduğu görülmektedir. Bu amaçla konak aralığı geniş fajların izole edilmesi ve karakterize edilmesi yüksek tedavi etkinliği için bir gerekliliktir. Faj tedavisi için geniş konak aralıklı fajın, geniş spektrumlu bir antibiyotiğe eşdeğer olacağı düşünülmektedir (Ross ve ark., 2016). Literatürde geniş konak aralığına sahip *A. baumannii* fajları bildirilmektedir. Hua ve ark. (2017) karbapenem dirençli *A. baumannii* klinik suşlarının neden olduğu akciğer enfeksiyonlarına karşı izole ettikleri litik fajların potansiyel terapötik etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında konak aralığını % 84,5 (42/48) olarak bulmuşlardır (Hua ve ark., 2017).

Bizim çalışmamızda izole edilen 80 *A. baumannii* fajının 4 farklı hastaneden temin edilen 78 *A. baumannii* izolatu üzerinde denenen konak aralığı sonucu fajların etkinliklerinin % 32 ile % 78 arasında değiştiği görülmektedir. Çalışmanın devamında karakterizasyon ve biyofilm çalışmaları için seçilen K3 fajının % 78, C2 fajının % 32 etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur. K3 fajı petride, 1 mm çapında büyük plaklar oluşturmaktadır ve geniş konak aralığı göstermesi nedeniyle seçilmiştir. Tespit edilen stok konsantrasyonu 9×10^{14} pob/mL'dir. C2 fajı petride saydam göbekli zon ve geniş bir hale oluşturmaktadır. Tespit edilen stok konsantrasyonu 4×10^{12} pob/mL'dir.

Literatürde fajların birçoğunun, Gram negatif bakteriyel ekzopolisakkaritleri depolimerize etme yeteneğindeki enzimlere sahip olduğu bildirilmektedir. Literatürde aynı zamanda plak merkezinin etrafındaki halenin, *A. baumannii* hücreleri tarafından

salgılanan ekzopolisakkarit degrade etme yeteneğindeki faj depolimeraz varlığını gösterdiği belirtilmektedir (Domingo-Calap ve Delgado-Martinez, 2018).

Benzer şekilde Çin’de yapılan bir çalışmada *A. baumannii*’ye özgü izole edilen Abp1 fajının, petride oluşturduğu temel liziz zonu etrafında ikinci bir liziz zonu görüldüğü ve inkübasyon süresinin artışı ile temel liziz zonunun çapı değişmezken, bu ikinci zonun daha da büyüdüğü gösterilmiştir. Çalışmada Abp1 fajının, konak bakterinin hücre duvarını lizize uğratabilen etkili bir depolimeraz veya endolizin kodlamasının etken olabileceği belirtilmiştir (Yin ve ark., 2017). Bu durum çalışmamızdaki C2 fajının gösterdiği plak morfolojisi ile benzerlik göstermektedir. Bakteriyofajın depolimeraz aktivitesine sahip olması bu özelliği gösteremeyen fajlara kıyasla biyofilm formasyonunun yok edilmesinde faja avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle C2 fajı, petride gösterdiği özgün plak morfolojisi ve konak aralığına giren farklı hastane suşları nedeniyle çalışmanın sonraki kısmı için K3 fajı ile birlikte seçilmiştir.

Sınıflandırılmış Acinetobacter fajlarının çoğu, çift sarmallı DNA genomlarına sahip kuyruklu virüslerdir. *Caudovirales* takımı *Myoviridae*, *Podoviridae* ve *Siphoviridae* olmak üzere üç aileye ayrılmaktadır (Yang ve ark., 2010). Bu tez çalışmasında izole edilen C2 ve K3 fajının geçirimli elektron mikroskopunda morfolojik görüntüleri incelenmiştir. Ackermann’a göre kuyruklu fajların baş ve kuyruk büyüklükleri sırasıyla; 30-160 nm, 10-800 nm aralığında değişmektedir (Ackermann, 2009a). Alınan TEM görüntülerinde C2 fajının 50 x 41,6 nm baş ve 12,5 x 6,25 kuyruğa sahip *Podoviridae* ailesi üyesi olduğu, K3 fajının 127,59 x 124,14 nm ve 117,24 x 13,79 nm kuyruğa sahip *Myoviridae* ailesi üyesi olduğu belirlenmiştir. Bir çalışmada izole edilen 5 fajdan, 2 *Myoviridae* familyasının üyesinin geniş litik aktivite spektrumu sergilediği; 3 *Podoviridae* ailesi virüsünün ise daha dar bir spektrum sergilemiş olduğu görülmüştür (Mendes ve ark., 2014). Çalışmamızda seçilen K3 fajının geniş litik etkinlik gösteren *Myoviridae* ailesi üyesi; C2 fajının daha dar litik etkinliğe sahip *Podoviridae* ailesi üyesi olması literatürle paralellik göstermektedir.

Literatürde düşük MOI değerlerinde, faj progenisinin arttığı görülmektedir. Hua ve ark. (2017) yaptıkları çalışmalarında YBÜ'lerinde nozokomiyal karbapenem dirençli *A. baumannii*'ye etkide faj SH-Ab15519'ın düşük MOI değerlerinde yüksek verimlilik gösterdiğini bildirmişlerdir (Hua ve ark., 2017). Çalışmamızda benzer şekilde C2 ve K3 için farklı optimal MOI değerleri bulunmuştur. C2 fajı için optimal MOI: 0,1, K3 fajı için optimal MOI: 0,01 olarak tespit edilmiştir.

Faj terapi çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen fajların karakterize edilmesi ve iyi karakteristik özellik göstermeleri beklenmektedir. Bu nedenle faj izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları literatürde geniş yer tutmaktadır. *A. baumannii*'ye özgü geniş konak aralığına sahip faj izole etmek amacıyla Popova ve ark. (2012) *Myoviridae* ailesine ait AP22 fajını izole ederek karakterize etmişlerdir. AP22 fajı, farklı kliniklere ait 130 çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* izolatının 89'una karşı (% 68 litik etkinlik) etkin bulunmuştur. AP22 fajı petride, saydam 2-3 mm çapında yuvarlak plaklar oluşturmaktadır. Elektron mikroskopunda yapılan morfolojik karakterizasyonunda 64 nm boyutunda ikozahedral başa ve 85-90 nm uzunluğunda kasılabilir kuyruğa sahip *Myoviridae* ailesine ait olduğu görülmüştür. AP22 fajı, hücreye 5 dakikada % 99 adsorblanarak hızlı adsorbsiyon özelliği göstermiş; patlama boyutu 240 pob/ mL olarak bulunmuştur. AP22'nin geniş pH aralıklarında stabilitesini sürdürdüğü görülmüştür. Çalışma sonucunda AP22 fajının, *A. baumannii* ilişkili hastane enfeksiyonlarının kontrolünde faj kokteyl hazırlamada aday olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Popova ve ark., 2012).

Başka bir çalışmada, *A. baumannii* ATCC 17978 suşu konak bakteri olarak kullanılmış ve vB- AbaS-Loki fajı izole edilerek karakterize edilmiştir. TEM'de Loki fajının 176±3 nm uzunluğunda kuyruğa, 57 ±4 nm boyutunda izomerik kapside sahip olduğu görülmüştür. Tek aşamalı gelişim eğrisi grafiğinde, latent periyodu 40 sn, patlama büyüklüğü 43 pob/ mL olarak bulunmuştur (Turner ve ark., 2017).

Çalışmamızda karakterizasyonu yapılan C2 fajının ilk 15 dakikada % 90'ının; K3 fajının ise ilk 10 dakika içerisinde ~% 94,6'sının konak hücreye adsorbe olduğu belirlenmiştir. C2 fajının litik enfeksiyon siklusunda faj için latent sürenin 30 dk (latent periyot), yükselme süresinin 40 dk ve hücre başına üretilen faj partikül sayısının (patlama boyutu) 126 pob/mL olduğu hesaplanmıştır. K3 fajının litik enfeksiyon siklusunda faj için latent sürenin 20 dk (latent periyot), yükselme süresinin 40 dk ve hücre başına üretilen faj partikül sayısının (patlama boyutu) 198 pob/mL olduğu hesaplanmıştır.

Karakterizasyonu yapılan C2 ve K3 fajlarının geniş sıcaklık ve pH değerlerinde etkinlikleri kıyaslandığında fajların düşük sıcaklık ve yüksek pH değerlerine daha toleran oldukları 70 °C gibi yüksek sıcaklık ve pH<3 değerlerinde aktivite kayıplarına uğradıkları görülmüştür. Bu sonuçların literatürde benzer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir. Yin ve ark. (2017)'nin izole ettikleri Abp1 fajının stabilite çalışmaları sonucunda, Abp1'in 37 °C'nin üzerinde termostabil olmadığı görülmüştür. 60 °C'de 1 saat inkübasyon sonrasında faj varlığını % 0,01 sürdürürken; 70 °C ve 80 °C'de 15 dakika bekletme sonrasında faj varlığına rastlanmamıştır. Abp1'in pH değişimlerine cevabına bakıldığında da pH 5-10 aralığındaki değişimlere karşı toleran olduğu bulunmuştur. pH 3'ün altında ve pH 12'nin üstündeki değerlerde faj varlığı gözlenmemiştir (Yin ve ark., 2017). Termal dirençli fajlar genellikle ekstrem ortamlardan izole edilmekte, ancak başka ortamlarda da bulunabilmektedirler. Termal dirençli fajların, çeşitli süt ürünlerinden izole edilip karakterize edildiği bir çalışmada faj AB1'in ısıya oldukça dirençli olduğu, 90 °C'de 15 dakika inkübasyondan sonra kontrole (10^{10} - 10^{11} pob/ mL) göre % 0,03'ünün ($1,23 \times 10^7$ pob/ mL) hayatta kaldığı gösterilmiştir. AB1 fajının, 100 °C'de 5 dakika kaynatma sonrası, canlı faj konsantrasyonu yaklaşık 10^5 - 10^6 pob/ mL olarak titre edilmiştir (Yang ve ark., 2010).

Çalışmamızda C2 ve K3 fajlarının en uygun saflaştırma ürünlerinin tespiti için SDS-PAGE gradient jel elektroforezi yapılmıştır. Jelde seçilen bakteriyofajların protein profilleri de görülmektedir ancak protein bantlarının yapısal elemanlarından

hangisine ait olduğuna dair, literatürdeki bazı çalışmalarda (Turner ve ark., 2017) olduğu gibi, ayrıntılı bir yol izlenmemiştir.

Çalışmada tüm genom dizilemesi de yapılan C2 ve K3 fajlarının benzer fajlarla yakın ilişkisi ortaya konmuştur. C2 fajının Obolenskivirus cinsi ile benzerlik gösterdiği ve yeni bir üyesi olarak sınıflandırılabilceği düşünülmektedir. K3 fajı ise *Sacclayvirus* cinsi içinde, % 94 *Acinetobacter phage vB_AbaM_phiAbaA1* ile yüksek benzerlik göstermektedir. Genom sekans maliyetlerindeki azalmalar, uluslararası sekans veri tabanlarında tüm genom faj sayılarında artışa önemli ölçüde katkı sağlayacaktır. Bu sekans verileri faj çeşitliliğini göstererek; farklı zamanlarda ve coğrafik bölgelerden izole edilecek fajlar arasında yeni taksonomik ilişkilerin kurulmasına yol açacaktır.

Bakteriyofajların çeşitli antibiyotiklerle birlikte etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda mevcuttur. Polimiksinler (polimiksin B ve kolistin dâhil) polikasyonik antimikrobiyal peptitlerdir ve Gram negatif bakterilerde anyonik lipopolisakkaridin (LPS) lipid-A kısmı ile etkileşerek bakterilerde dış zarın düzensizleşmesine neden olmakta ve hızla bakteriyi yok etmektedirler (Sato ve ark., 2018).

Polimiksinlerin *A. baumannii* ve diğer çeşitli bakterilerin biyofilmi üzerine etkisini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Ozbek ve Mataraci (2012) kateter modeline gömülü *A. baumannii*'yi yok etmek için tek başına veya klaritromisin ve / veya heparin ile kombinasyon halinde kolistin, tigesiklin ve levofloksasinin in vitro stabilitesini ve etkinliğini belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında kolistini, biyofilmlere gömülü *A. baumannii*'ye karşı tigesiklin ve levofloksasinden anlamlı derecede daha aktif bulmuşlardır. Kolistin tek başına veya kombinasyon halinde, biyofilmlere gömülü organizmaları 96 saat boyunca ortadan kaldırmış ve yeniden büyümesini engellemiştir. Araştırmacılar, *A. baumannii*'ye bağlı kateterle ilişkili enfeksiyonların tedavisi veya önlenmesi için en etkili tedavi seçeneği olarak kolistini önermektedir (Ozbek ve Mataraci, 2012).

Biyofilm oluşumu, *A. baumannii*'nin çevrede uzun süreli hayatta kalmasını sağlayan virülans faktörlerinden biridir ve antibiyotiklere direncini arttırmaktadır (Gaddy ve ark., 2009; Wroblewska ve ark., 2008). Biyofilm kuru biyokütlesinin yalnızca % 10'unun hücre olduğu tahmin edilmektedir. Biyofilm matriksi ise % 90'ını oluşturur ve biyofilmlerin yapışması ve kohezyonunda yer alan karmaşık üç boyutlu yapıların oluşturulmasından sorumlu olan hücre dışı polimerik maddeler (EPS) olarak da bilinen farklı polimerlerden (karbonhidratlar, nükleik asitler, proteinler ve diğer makromoleküller) oluşmaktadır. EPS matriksi, fajlar da dâhil olmak üzere antimikrobiyal ajanların biyofilm içine gömülü bakteri hücrelerine difüzyonunu sınırlayan ana engellerden biri olarak kabul edilmiştir (Flemming ve Wingender, 2010). Bakterileri antimikrobiyal stres faktörlerine, antibiyotiklere veya temizlemeye planktonik benzerlerine göre daha dirençli hale getirir ve bu nedenle biyofilm oluşturma yeteneği önemli bir virülans faktörü olmaktadır (Gaddy ve ark., 2009; Wroblewska ve ark., 2008). Biyofilmler, planktonik hücrelere göre 1000 kat daha yüksek antibiyotik konsantrasyonlarını tolere edebilmekte ve kimyasal, fiziksel ve biyolojik zorluklara karşı barikat görevi görebilmektedirler (Kirby ve ark., 2012).

Bu gözlemler, patojenik bakterilerin kontrolünün sadece planktonik hücrelerle sınırlı kalmaması gerektiğini ve yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmeye ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Şu anda iki yaklaşım geliştirilmektedir: biyofilmin yapışmasını ve oluşumunu sınırlamak veya kalıcı hücreleri öldürerek hedef biyofilm toleransını düşürmek. Üçüncü umut verici yaklaşım olarak ise bakteriyofajlar görülmektedir (D'Andrea ve ark., 2020).

Biyofilmleri kontrol etmek için fajların kullanılması birkaç nedenden dolayı potansiyele sahiptir. Fajlar enfeksiyon yerinde çoğalabilmekte, böylece en çok ihtiyaç duyulan yerlerde sayıları artmaktadır. Ayrıca litik replikasyon döngüsü sırasında, bir bakteriyel konakçı hücrenin tek bir faj virionu tarafından enfeksiyonu, belirli faj ve konakçı suşlarına bağlı olarak düzinelerce veya yüzlerce döl fajı üretimiyle sonuçlanacaktır (Hanlon ve ark., 2001). Fajlar matriks içindeki metabolik olarak inaktif persister hücreleri enfekte edebilirler, içlerinde uykuda kalırlar ve ancak

metabolik olarak aktif hale geldiklerinde yeniden aktive olmaktadır (Harper ve ark., 2014).

Ek olarak fajlar biyofilm ile ilişkili EPS matriksini bozabilen, polisakkarit depolimerazlar üreterek biyofilm matriksi boyunca hem fajların hem de antibiyotiklerin difüzyonunu desteklemekte ve böylece bakteri hücrelerine erişimlerini kolaylaştırabilmektedir (D'Andrea ve ark., 2020). Bir çalışmada SH-Ab15519 fajının plak morfolojisinde depolimeraz geninin varlığını gösteren geniş haleli plaklar oluşturduğu bildirilmiştir (Hatfull, 2008).

Bakteriyofajların, polisakkarit depolimerazlar üretmedikleri zaman (veya bunlar çok kısıtlı bir işleve sahip olduklarında) bile biyofilmlere nüfuz ettiğine dair bilimsel çalışmalar da mevcuttur (Harper ve ark., 2014). Sillankorva ve ark. (2010) *Pseudomonas fluorescens* ve *Staphylococcus lentus*'un bakteriyofajlarını kullandıkları bir çalışmalarında, bu ajanlarla tek tür ve karışık biyofilmlerin etkili bir şekilde azaltıldığını göstermiş; her iki bakteriyofajın da tüm genom sekansı yapılmış ve her ikisinde de polisakkarit depolimeraz geninin kodlanmadığını göstermişlerdir (Sillankorva ve ark., 2010). Benzer şekilde Doolittle ve ark. (1996), *E. coli* bakteriyofaj T4'ün bir biyofilm içinde verimli bir şekilde yayıldığını ancak herhangi bir polisakkarit depolimeraz kodlamadığını bulmuşlardır (Doolittle ve ark., 1996).

Fajların biyofilm etkinlikleri üzerine yapılan çalışmalar sınırlı olmakla birlikte olumlu sonuçları itibariyle umut vaat etmektedir. Pires ve ark. (2011) *P. aeruginosa* suşlarını enfekte edebilen litik fajların izolasyonunu ve karakterizasyonunu yaptıkları çalışmalarında yeni izole edilen fajların biyofilm kontrol potansiyelini de araştırmışlardır. İzole ettikleri iki fajı (phiIBB-PAA2 ve phiIBB-PAP21), 1 MOI değerinde kullanarak 24 saatlik biyofilmlere karşı test etmişlerdir. Her iki faj da 2 saatlik enfeksiyondan sonra biyofilm popülasyonunu yaklaşık 1-2 log azaltmış ve 6 saatlik biyofilm enfeksiyonundan sonra azalma daha da artmıştır. 24 saatlik muameleden sonra phiIBB-PAA21 fajında hücre sayısında bir artış gözlenmiş, fakat

phiIB-PAA2 fajı, enfeksiyondan 24 saat sonra bile biyofilm hücrelerini yok etmeye devam etmiştir (Pires ve ark., 2011).

Ribeiro ve ark. (2018) önceden oluşturulmuş *E. coli* biyofilm kütlelerinin, degradasyon deneyinde faja maruz kaldıktan sonra kütlelerin % 79 azaldığını bildirmiştir (Ribeiro ve ark., 2018).

Fusobacterium nucleatum (*F. nucleatum*), periodontitis ve kolorektal kanser gibi kronik hastalıkların gelişimiyle bağlantılı olan önemli bir oral bakteridir. Kabwe ve ark. (2019), *F. nucleatum*'a karşı yeni litik bir bakteriyofaj olan FNU1'in morfolojik, genomik ve fonksiyonel özelliklerini açıkladıkları çalışmalarında FNU1 fajının, *F. nucleatum* biyofilm kütlelerini % 70 oranında azalttığını bulmuşlardır (Kabwe ve ark., 2019).

Kim ve ark. (2019) *V. alginolyticus* rm-8402 suşunu, 48 saat süreyle biyofilm oluşturmaya bırakmışlar ardından üzerine faj pVa-21 ($1,6 \times 10^8$ pob/mL) ilavesi yapmışlardır. Biyofilm kütleindeki bakteri sayısı, plak sayısı ve toplam biyofilm biyokütlesindeki değişiklikler kristal viyole ile boyama sonrası ölçülmüştür. Toplam biyofilm biyokütlesi, 5 saatlik faj maruziyetinden sonra önemli bir azalma ($p < 0,001$) göstermiş ve ilk 24 saatte canlı hücre sayılarının hızla azaldığı ve sonraki 24 saat içinde artmadığının görülmesi biyofilimde yeniden büyümenin olmadığını göstermiştir. Faj konsantrasyonunun başlangıç konsantrasyonuna kıyasla 24 saat sonra 10 kattan fazla arttığı; 48 saat sonrasında hafif azalma göstererek, konsantrasyonun $1,19 \times 10^8$ pob/mL'de korunduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2019).

Çalışmamızın son aşamasında ilk önce *A. baumannii* izolatlarının olgun biyofilmleri üzerine F1 (C2), F2 (K3), hazırlanan faj kokteyli (F3) ve antibiyotığın (kolistin MİK) tek başına kullanımlarının 6, 24 ve 48. saatin sonunda etkisi incelenmiştir. Suşların ortak duyarlılık gösterdikleri antibiyotik olması ve literatürde yukarıda da belirtilen bilgiler dikkate alınarak biyofilm çalışmalarında antibiyotik

olarak kolistin seçilmiştir. Yapılan ölçüm sonrası kütle azalmasının en fazla 6 saatlik tedavide sağlandığı görülmüştür. F2 fajının, suşların % 62,5'inde F1 fajına kıyasla daha etkin kütle azalması sağladığı ve düşük konsantrasyonda (10^7 pob/mL) daha etkin olduğu görülmüştür. Fajların kokteyl olarak kullanımı F1 ve F2'nin tek başına kullanımlarına göre suşların % 79,2'unda anlamlı biyofilm kütle azalmasına neden olmazken; fajların daha düşük konsantrasyonları ile benzer etki gösterebildikleri görülmüştür. Fajların etkisi antibiyotikle kıyaslandığında suşların % 41,6'sında faj ile daha güçlü kütle azalması sağlandığı, fajların daha etkin biyofilm eradikasyonu sağladığı bulunmuştur.

Mikroorganizmalar, tıbbi cihazlarda kalıcı biyofilmler geliştirebilmekte ve cihazla ilişkili enfeksiyonlar önemli morbidite ve mortalite ile sonuçlanmaktadır. Faj kokteyllerinin biyofilm üzerine etkisini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Hidrojel kaplı kateterlerin *P. aeruginosa* bakteriyofajları ile ön işlemden geçirilmesinin, *P. aeruginosa* tarafından biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kateterler, bakteriyel aşılama öncesi 37 °C'de 2 saat süreyle *P. aeruginosa* faj M4 kokteyline maruz bırakılmıştır. Faj uygulanan kateterler, işlem yapılmayan kontrol grubu kateterlerle 24 saat sonra kıyaslandığında ortalama canlı sayısında anlamlı düşüş görüldüğü bildirilmiştir ($P < 0,001$). Aynı gruba 24 saat faj ile tamamlayıcı bir uygulama yapıldığında, kontrol grubuna göre 48 saatlik ortalama biyofilm hücre yoğunluğunu % 99,9 azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, klinik olarak ilgili bakteriler tarafından biyofilm oluşumunu önlemek için kalıcı tıbbi cihazların yüzeylerine faj kokteylleri uygulama potansiyelini göstermektedir (Fu ve ark., 2010).

Bir başka çalışmada ise kistik fibrozis hastalarından alınan *P. aeruginosa* izolatları ile biyofilm oluşumu üzerine, özel olarak geliştirilen faj kokteyllerinin etkisi değerlendirilmiştir. Suşların 48 saatlik biyofilmi üzerine dört faj kokteyli ile muamele edilmiştir. Biyofilm biyokütlesi kristal viyole ile boyanarak ölçülmüştür. 24 ve 48 saat sonra biyofilm biyokütlesinin önemli ölçüde azaldığı ($p < 0,0001$) ve tekli fajların izolatların biyofilmlerini % 53-73'ünü azaltmasına rağmen, faj kokteylinin biyofilmler üzerindeki etkinliğinin % 89 olduğu bildirilmiştir ($P < 0,05$). 24 ve 48 saatlik tedavide

bakteriyofaj konsantrasyonları sırasıyla % 76 ila % 160 artmıştır. Bu sonuçlar, bakteriyofaj kokteyllerinin sadece mevcut biyofilmlerdeki *P. aeruginosa* popülasyonlarını önemli ölçüde azaltmasının yanı sıra biyofilm gelişimini de önleyebildiğini göstermesi açısından önemlidir (Fong ve ark., 2017).

Yapılan çalışmalarda faj kokteylinin daha düşük dozlarda faj kullanımına olanak sağlaması ve bakteriyel mutasyon sıklığını azaltmada etkin olması nedeniyle çalışmamızda C2 ve K3 fajlarından hazırlanan faj kokteyl etkinliği de değerlendirilmiş ve suşların genelinde fajların daha düşük dozları ile benzer hatta bazı uygulamalarda daha yüksek etkinlik elde edilmiştir.

Literatürde mikropalak yönteminin biyofilmleri incelemek için yaygın bir yöntem olarak kullanılması ve bununla birlikte temelde basitliği, düşük fiyatı ve çok parametreliliğe izin vermesi nedeniyle seçilmiştir. Phee ve ark. (2013) mikropalak yöntemi kullanarak *Pseudomonas aeruginosa* PA14 suşunun 24 saatlik ve 96 saatlik biyofilmleri üzerine, JBD4 VE JBD44a fajlarını uygulamışlar ve işlem sonrası biyoküteller spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Mikropalaklarda büyütülen 24 saatlik ve 96 saatlik biyofilmlerde ortalama biyokütle yüzdesinde önemli bir azalma sağlamış; biyokütlenin % 90'ına kadarını temizlemeyi başarmışlardır. Çalışmada ayrı ayrı kullanılmalarına kıyasla fajların kokteyl halinde kullanılmasının biyoküttelede ek bir azalmaya neden olmadığı görülmüştür (Phee ve ark., 2013).

Alves ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* biyofilmi üzerine faj aktivitesini test etmişlerdir. 10^6 kob/mL başlangıç konsantrasyonuna sahip izolatlar mikropalaklarda 48 saat 37 °C'de üretime bırakılmıştır. Oluşan biyofilm tabakası fosfat tamponu ile iki kere yıkanmış ve fajın farklı MOI değerleri (MOI: 1 ve MOI:10) ile muamele edilmiştir. Biyofilm biyokütle yoğunluğu 0, 2, 4, 24 ve 48. saatlerde ölçülmüştür. Biyofilm kütlelerinde MOI:1'de, ilk 4 saatte en fazla % 80 oranında azalma görülürken; MOI:10'da % 99'dan fazla azalma görüldüğü bildirilmiştir (Alves ve ark., 2016) . Benzer şekilde Sillankorva ve ark. (2008) yaptıkları bir çalışmada Faj ϕ IBB-

PF7A'nın, kısa zaman aralığında *P. fluorescens* biyofilmlerini gidermede oldukça etkili olduğunu; faj uygulamasının, biyofilm hücre sayısını en fazla 4. saatte azalttığını tespit etmişlerdir (Sillankorva ve ark., 2008).

Yaklaşımlarımız farklı olsa da çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürde yer alan benzer çalışmalarla; biyofilm üzerine fajların 6 saat gibi kısa sürelerde daha etkin olması ve fajların kokteyl olarak kullanımının fajların daha düşük konsantrasyonları ile monofaj benzeri etki gösterebildiklerinin görülmesi yönünden benzerlik göstermektedir. Çalışmanın genelinde 2 faj da antibiyotikle sağlanan etkiye paralel etki aralığı göstermişlerdir.

Çalışmamızın son aşamasında, olgun biyofilmler üzerine fajların antibiyotikle ardışık ve sıralı olarak 24 ve 48 saatlik kullanımının etkisi incelenmiş ve sonuçlar tekli kullanım modelleri ile de karşılaştırılmıştır. 48 saatlik uygulamada suşların genelinde, etkinin hala yüksek oranda korunduğu; 24 saatlik uygulama ile etkide anlamlı bir farklılığın olmadığı ($p < 0,001$) ancak etkide artışa da neden olmadığı görülmüştür. Tüm suşlarda ardışık ve birlikte uygulamanın, antibiyotiğin tek başına uygulanmasından daha etkin bir biyofilm kütle azalması sağladığı görülmüştür.

Akturk ve ark. (2019) çalışmalarında, bakteriyofaj ve antibiyotiğin birleşik uygulamasının ümit verici olduğunu; bunun bakteri öldürme mekanizmalarındaki farklılık nedeniyle olabileceğini belirtmiştir. Bu çalışmalarında, mono ve dual türlerin biyofilmleri üzerine faj ve antibiyotiğin sinerjik etkisini araştırmışlardır. *P. aeruginosa* ve *S. aureus* polimikrobiyal biyofilmleri üzerine *P. aeruginosa*'yı infekte eden (EPA1) fajının ve yedi farklı antibiyotik (gentamisin, kanamisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, siprofloksasin ve meropenem) kombinasyonunun etkileşimini incelemişlerdir. 48 saatlik tek ve dual tür biyofilmler üzerine, faj ve antibiyotiklerin tek başına ve eşzamanlı veya sıralı kombinasyonlarının etkinliklerini karşılaştırmışlardır. Tek başlarına biyofilm bakterilerini azaltma etkileri orta düzey bir etkiye sahipken, birlikte ve eşzamanlı olarak uygulandığında, öldürme etkisinde büyük

bir gelişme gözlemlenmiştir. Dual tür biyofilmlerin, tüm uygulamalarda, tek türe göre daha toleranslı olduğunu bulmuşlardır (Akturk ve ark., 2019).

Önceden optimize edilmiş bir faj kokteylinin *C. difficile* ribotip 014/020 biyofilmleri ve *Galleria mellonella* larva modelinde vankomisin tedavisine yardımcı olarak etkisinin araştırıldığı bir çalışmada fajların ve/veya vankomisinin enfeksiyon profilleri ve etkinlikleri, kolonizasyon seviyeleri ve larva hayatta kalma oranları izlenmiştir. Vankomisinle kıyaslandığında; tek doz faj uygulamasının kolonizasyonu azaltarak iyileştirici tedavide uzun ömürlülüğe neden olduğu ve çoklu faj dozlarının, larva iyileştirme rejimini önemli ölçüde iyileştirdiği bulunmuştur. Aynı zamanda hem fajlar hem de vankomisin biyofilm özellikleri üzerinde etkili olurken, fajların vankomisine göre olumlu bir şekilde biyofilm oluşumunu önlediği ve yerleşik biyofilmlere nüfuz ettiği bildirilmiştir (Nale ve ark., 2016).

Chang ve ark. (2019) yaptıkları çalışmalarında kistik fibroz ve yaralı hastalardan izole edilen altı *P. aeruginosa* ve bir laboratuvar suşunun oluşturduğu biyofilmleri, PEV20 fajı ve siprofloksasin kombinasyonları ile muamele etmişlerdir. Bu suşlardan üçü faja yüksek oranda duyarlıyken, biri kısmen dirençli ve biri tamamen dirençli bulunmuştur. PEV20 ve siprofloksasin ile kombinasyon tedavisinin, tek tedaviye kıyasla biyofilm eradikasyonunu artırdığı görülmüştür. Faj ve siprofloksasin sinerjisinin, hedef bakterilerin faj direnç profiline bağlı olduğu bulunmuştur. PEV20 fajına yüksek oranda duyarlı PA365707 ve PA364077 suşunun, PEV20 ve MİK değerinde siprofloksasin ile kombinasyon tedavisi her iki suş için biyofilmlerin % 98'ini azaltmıştır. Aksine faja dirençli MANC3733 CF suşunun biyofilmi üzerine, 3xMİK gibi yüksek siprofloksasin konsantrasyonunda biyofilmi gideremediği; PEV20'nin (MANC3733'e kısmen dirençli) eklenmesi ile kullanılan siprofloksasin konsantrasyonundan (MİK ila 3xMİK) bağımsız olarak biyofilm canlılığını yarı yarıya azalttığı görülmüştür (Chang ve ark., 2019). Sonuçlar, faj direncinin kapsamlı bir şekilde taranmasının, faj-antibiyotik formülasyonu tasarlamak için çok önemli olduğunu göstermesi ve aynı zamanda etkili fajın eklenmesiyle biyofilm ile bağlantılı

enfeksiyonlarda gereken antibiyotik konsantrasyonunu azaltabileceğini göstermesi açısından da önem taşımaktadır.

Günümüzde *A. baumannii* önemli enfeksiyon etkenlerinden biridir ve antimikrobiyal direnci nedeniyle tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır. Bazı durumlarda etkili antibiyotik tedavisi artık mevcut değildir ve bu nedenle bu hastalarda enfeksiyonu kontrol etmenin alternatif yollarının geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Çalışmamızda *A. baumannii*'ye özgü litik bakteriyofaj izole ederek seçimi yapılan 2 fajın karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmamızda olgun biyofilm kütlesi üzerine faj ile antibiyotiğin ardışık ve birlikte uygulanmasının tekil uygulamalara kıyasla daha etkin olduğu görülmüştür. Yapılan literatür taraması sonucunda *A. baumannii* olgun biyofilmleri üzerine bu kapsamda yapılmış çalışma bulunmamakta ve çalışmamız farklı zaman parametreleri ve uygulama yöntemlerinin etkisini de değerlendirmesi nedeniyle özgün değer taşımaktadır. Çalışmamızda gelecek için ümit vaadeden sonuçlar elde edilmiştir. Bakteriyel enfeksiyonlarda terapötik amaçlı kullanılmak üzere faj uygulamalarının oldukça yüksek potansiyeli olduğu saptanmıştır.

Fajlarla yapılan dekontaminasyon ve tedavilerde lokal fajların önemli olduğundan hareketle, fajlar ve etkenler ülkemizden izole edildiği için özellikle ulusal düzeyde *A. baumannii* ile ilişkili enfeksiyonlarda kullanım potansiyelinin olacağını düşünmekteyiz. Şimdiye kadar yapılan faj çalışmalarında herhangi bir yan etki bildirilmemiş olsa da terapinin etkinliğini kanıtlayacak deney tasarımı iyi yapılmış daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, önemli hastane enfeksiyonu etkeni *A. baumannii* izolatlarına özgü litik bakteriyofajlar izole edilmiştir. İzole edilen 80 fajın, 4 farklı hastanenin, farklı kliniklerinden izole edilen *A. baumannii* izolatları üzerine litik aktivitesi belirlenmiştir. Seçilen iki fajın yapılan karakterizasyon testleri sonucunda, *A. baumannii* ile ilişkili enfeksiyonların biyolojik kontrolü için terapötik ajanlar olarak kullanılma potansiyeli olduğu bulunmuştur. Fajlara ait elde edilen sekans verileri de faj çeşitliliğini göstererek; farklı zamanlarda ve coğrafik bölgelerden izole edilecek fajlar arasında yeni taksonomik ilişkilerin kurulmasına yol açacaktır.

Çalışmamızda aynı zamanda klinik *A. baumannii* biyofilmlerine karşı C2 ve K3 fajının kombinasyonu kullanılarak kütle azalması yönünden aktiviteleri incelenmiştir. Bunun sonucunda faj ve antibiyotik kombinasyonunun, biyofilm eradikasyonunu artırabileceği görülmüştür. Faj eklenmesi, dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi etmek için gereken antibiyotik konsantrasyonunu potansiyel olarak düşürebilmektedir. Bu, genellikle yüksek dozda antibiyotiklerin uygulanmasıyla ilişkili yan etkilerden kaçınmaya yardımcı olarak, daha düşük dozaj rejimini uygulamaya olanak tanımaktadır. Bununla birlikte, antagonistik etkiden kaçınmak için, hedef bakterilere karşı etkinliği yüksek fajların seçilmesi de önemlidir.

ÖZET

Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Acinetobacter baumannii* Suşlarına Özgü Litik Bakteriyofajların Elde Edilmesi ve Tedavide Kullanım Potansiyelinin Araştırılması

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*), çoklu ilaç dirençli suşların ortaya çıkması ve neden olduğu enfeksiyonlarda artış nedeniyle önemli insan patojenleri arasında sayılmaktadır. Bu durum antibiyotiklere alternatif tedavi yöntem ve stratejilerinin geliştirmesinin önemini artırmıştır. Bakteri türlerine özgü olan bakteriyofajlar, tedavide önemli bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. ‘Faj terapi’ olarak adlandırılan, enfeksiyon etkenlerinin bakteriyofajlarla ortadan kaldırılması işlemi günümüzde yeniden önem kazanmıştır. Bakteriyofajlar, biyofilm içerisindeki bakteriler üzerinde kimyasal antibiyotikler veya biyositlerden daha farklı davranmakta ve biyofilmin ortadan kaldırılmasında farklı aşamalarda etkin olabilmektedirler. Çalışmamızda önemi her geçen gün artan dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı, tedavide alternatif olabileceği düşünülen faj terapisine katkıda bulunmak amacıyla hastane enfeksiyonu etkeni *A. baumannii* suşlarına özgü litik bakteriyofajların elde edilmesi ve tedavide kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı çevresel su örneklerinden litik bakteriyofajlar izole edilmiş, elde edilen bakteriyofajlardan plak morfolojisi ve litik aktivitesine göre 2 faj seçilerek morfolojik olarak karakterize edilmiş ve tüm genom dizileri elde edilerek *A. baumannii* biyofilmlerine karşı etkinliği değerlendirilmiştir. Ayrıca bu fajların *A. baumannii* izolatlarının olgun biyofilmleri üzerine etkisi antibiyotikle (kolistin) ardışık ve sıralı olarak denenmiş ve sonuçlar tekli kullanım modelleri ile de karşılaştırılmıştır. Alınan 31 su örneğinin 13’ünde *A. baumannii* fajının varlığı saptanmıştır. Bu çalışmada izole edilen 80 *A. baumannii* fajının, 4 farklı hastaneden temin edilen 78 *A. baumannii* izolatu üzerinde denenilen konak aralığının % 32 ile % 78 arasında değiştiği görülmektedir. Karakterizasyon ve biyofilm çalışmaları için seçilen K3 fajının % 78, C2 fajının % 32 etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur. Alınan TEM görüntülerinde C2 fajının 50 x 41,6 nm baş ve 12,5 x 6,25 kuyruğa sahip *Podoviridae* ailesi üyesi olduğu, K3 fajının 127,59 x 124,14 nm ve 117,24 x 13,79 nm kuyruğa sahip *Myoviridae* ailesi üyesi olduğu belirlenmiştir. Çalışmada tüm genom dizilemesi de yapılan C2 ve K3 fajının benzer fajlarla yakın ilişkisi ortaya konmuştur. C2 fajının Obolenskvirus cinsi ile benzerlik gösterdiği ve yeni bir üyesi olarak sınıflandırılabilmesi düşünülmektedir. K3 fajı ise Saclayvirus cinsi içinde, % 94 *Acinetobacter phage* vB_AbaM_phiAbaA1 ile yüksek benzerlik göstermektedir. *A. baumannii* olgun biyofilmleri üzerine 2 fajın biyofilm etkinlikleri arasında belirgin fark bulunmamıştır ve fajlar, antibiyotikle sağlanan etkiye paralel etki aralığı göstermişlerdir. Fajların biyofilm üzerine 6 saat gibi kısa sürelerde daha etkin olduğu tespit edilmiş ve kokteyl olarak kullanımının fajların daha düşük konsantrasyonlarını kullanmaya olanak sağladığı bulunmuştur. Çalışmamızda aynı zamanda olgun biyofilm kütlesi üzerine faj ile antibiyotiğin ardışık ve birlikte uygulanmasının tekil uygulamalara kıyasla daha etkin olduğu görülmüştür. Çalışmamızda gelecek için ümit vaadeden olumlu sonuçlar elde edilmiştir ve bakteriyel enfeksiyonlarda terapötik amaçlı kullanılmak üzere faj uygulamalarının oldukça yüksek potansiyeli olduğu saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, Bakteriyofaj, Biyofilm, Çift tabaka agar, Direnç.

SUMMARY

Acquisition of Lytic Bacteriophages Specific to *Acinetobacter baumannii* Strains Affecting Hospital Infection and Investigation of Potential to Use in Treatment

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) is considered one of the most important human pathogens due to the emergence of multi-drug resistant strains and the increase in infections caused. This has increased the importance of developing alternative therapies and strategies for antibiotics. Bacteriophages specific to bacterial species and destroying / eating bacteria are emerging as an important option in treatment. The process of removing the infection agents from the bacteriophages, called 'phage therapy', is now important again. Bacteriophages behave differently than bacterial antibiotics or biocides on the bacteria in the biofilm and may behave differently in different situations during the lifting of the biofilm. In our study, it was aimed to obtain lytic bacteriophages specific to the nosocomial infection agent *A. baumannii* strains and to investigate the potential of use in treatment in order to contribute to phage therapy, which is thought to be an alternative in treatment against resistant *A. baumannii* infections, whose importance is increasing day by day. For this purpose, lytic bacteriophages were isolated from different environmental water samples, 2 phages were selected from the obtained bacteriophages according to their plaque morphology and lytic activity, and they were morphologically characterized and their efficacy against *A. baumannii* biofilms was evaluated by obtaining all genome sequences. In addition, the effects of these phages on mature biofilms of *A. baumannii* isolates were tested simultaneously and sequentially with antibiotics (colistin) and the results were compared with single use models. The presence of *A. baumannii* phage was detected in 13 of 31 water samples taken in total. In this study, it is observed that the efficacy of the phages varied between 32% and 78% as a result of the host range tested on 78 *A. baumannii* isolates of 80 *A. baumannii* phages isolated from 4 different hospitals. In the continuation of the study, it was found that K3 phage selected for characterization and biofilm studies had 78% and C2 phage 32%. In TEM images taken, the C2 phage is a member of the *Podoviridae* family with 50 x 41.6 nm head and 12.5 x 6.25 nm tail, while K3 phage has 127.59 x 124.14 nm and 117.24 x 13.79 nm tail determined to be a member *Myoviridae*. In the study, the close relationship of C2 and K3 phages, which were also sequenced in the whole genome, with similar phages was revealed. It is thought that the C2 phage is similar to the Obolenskivirus genus and can be classified as a new member. The K3 phage has high similarity with 94% *Acinetobacter phage* vB_AbaM_phiAbaA1 within the *Saclayvirus* genus. There was no significant difference between the biofilm activities of the 2 phages on *A. baumannii* mature biofilms, and the phages showed a range of action parallel to the antibiotic effect. Phages have been found to be more effective on biofilm in as little as 6 hours, and the use of phages as cocktails has been found to allow the use of lower concentrations of phages. In our study, it was also observed that the sequential and combined application of phage and antibiotic on the mature biofilm mass was more effective than single applications. In our study, promising positive results for the future were obtained and phage applications were found to have a very high potential to be used for therapeutic purposes in bacterial infections.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Bacteriophage, Biofilm, Double layer agar, Resistance.

KAYNAKLAR

- ABEDON ST (2016). Bacteriophage exploitation of bacterial biofilms: phage preference for less mature targets? *FEMS Microbiol Lett*, **363(3)**: 1-5.
- ABHILASH M, VIDYA AG, JAGADEVI T (2008). Bacteriophage Therapy: A War Against Antibiotic Resistant Bacteria. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, **7**: 1-5.
- ACKERMANN H-W (2012). Who went into phage research? *Bacteriophage*, **2(1)**: 55-59.
- ACKERMANN HW (2009a). Basic phage electron microscopy. *Methods Mol Biol*, **501**: 113-126.
- ACKERMANN HW (2009b). Phage classification and characterization. *Methods Mol Biol*, **501**: 127-140.
- ADAMS MH. (1959). Bacteriophages. (Ed.): Interscience publishers, p.:80-102.
- ADRIAENSSENS E, BRISTER JR (2017). How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. *Viruses*, **9(4)**: 1-9.
- AKTURK E, OLIVEIRA H, SANTOS SB, COSTA S, KUYUMCU S, MELO LDR, AZEREDO J (2019). Synergistic Action of Phage and Antibiotics: Parameters to Enhance the Killing Efficacy Against Mono and Dual-Species Biofilms. *Antibiotics (Basel)*, **8(3)**: 1-19.
- ALJINDAN R, ALSAMMAN K, ELHADIN (2018). ERIC-PCR genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical specimens. *Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences*, **6(1)**: 13-17.
- ÁLVAREZ-FRAGA L, VÁZQUEZ-UCHA JC, MARTÍNEZ-GUITIÁN M, VALLEJO JA, BOU G, BECEIRO A, POZA M (2018). Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, **9(1)**: 496-509.
- ÁLVAREZ A, FERNÁNDEZ L, IGLESIAS B, RODRÍGUEZ J, RODRÍGUEZ A, GARCÍA P (2019). Phage therapy: unexpected drawbacks to reach hospitals. *Future Virology*, **14(12)**: 779-782.
- ALVES DR, PEREZ-ESTEBAN P, KOT W, BEAN JE, ARNOT T, HANSEN LH, ENRIGHT MC, JENKINS ATA (2016). A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. *Microb Biotechnol*, **9(1)**: 61-74.
- AN JH, KIM YH, MOON JE, JEONG JH, KIM SH, KANG SJ, PARK KH, JUNG SI, JANG HC (2017). Active surveillance for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical intensive care unit: Can it predict and reduce subsequent infections and the use of colistin? *Am J Infect Control*, **45(6)**: 667-672.

- ANTUNES LC, VISCA P, TOWNER KJ (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis*, **71(3)**: 292-301.
- AYDIN B (2018). İnsani amaçlı ilaca erken erişim programları. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **32(3)**: 237-242.
- BARDINA C, SPRICIGO DA, CORTÉS P, LLAGOSTERA M (2012). Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. *Appl Environ Microbiol*, **78(18)**: 6600-6607.
- BASAK S, SINGH P, RAJURKAR M (2016). Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. *J Pathog*, **2016**: 4065603-4065603.
- BEHESHTI MAAL K, SOLEIMANI DELFAN A, SALMANIZADEH S (2015). Isolation and Identification of Two Novel *Escherichia coli* Bacteriophages and Their Application in Wastewater Treatment and Coliform's Phage Therapy. *Jundishapur J Microbiol*, **8(3)**: e14945-e14945.
- BENTANCOR LV, CAMACHO-PEIRO A, BOZKURT-GUZEL C, PIER GB, MAIRA-LITRÁN T (2012). Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*, **194(15)**: 3950-3960.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN E, TOWNER KJ (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*, **9(2)**: 148-165.
- BONOMO RA, SZABO D (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*, **43**: 49-56.
- BOYD EF, BRÜSSOW H (2002). Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol*, **10(11)**: 521-529.
- BREITBART M, ROHWER F (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol*, **13(6)**: 278-284.
- BROSSARD KA, CAMPAGNARI AA (2012). The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infection and immunity*, **80(1)**: 228-233.
- BRUTTIN A, BRÜSSOW H (2005). Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, **49(7)**: 2874-2878.
- BRÜSSOW H (2012). What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology*, **434(2)**: 138-142.
- CHANG RYK, DAS T, MANOS J, KUTTER E, MORALES S, CHAN HK (2019). Bacteriophage PEV20 and Ciprofloxacin Combination Treatment Enhances Removal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Isolated from Cystic Fibrosis and Wound Patients. *Aaps j*, **21(3)**: 49-57.

- CHANISHVILI N. (2012). A literature review of the practical application of bacteriophage research. (Ed.). New York: Nova Biomedical Books, p.: 60-99.
- CHAUDHRY WN, CONCEPCIÓN-ACEVEDO J, PARK T, ANDLEEB S, BULL JJ, LEVIN BR (2017). Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS One*, **12(1)**: 1-16.
- CHEN L-K, LIU Y-L, HU A, CHANG K-C, LIN N-T, LAI M-J, TSENG C-C (2013). Potential of bacteriophage ΦAB2 as an environmental biocontrol agent for the control of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, **13(1)**: 154-164.
- CHIN CY, TIPTON KA, FAROKHYFAR M, BURD EM, WEISS DS, RATHER PN (2018). A high-frequency phenotypic switch links bacterial virulence and environmental survival in *Acinetobacter baumannii*. *Nat Microbiol*, **3(5)**: 563-569.
- CHOI AHK, SLAMTI L, AVCI FY, PIER GB, MAIRA-LITRÁN T (2009). The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *Journal of bacteriology*, **191(19)**: 5953-5963.
- CHOI CH, LEE EY, LEE YC, PARK TI, KIM HJ, HYUN SH, KIM SA, LEE SK, LEE JC (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol*, **7(8)**: 1127-1138.
- COOPER CJ, KHAN MIRZAEI M, NILSSON AS (2016). Adapting Drug Approval Pathways for Bacteriophage-Based Therapeutics. *Front Microbiol*, **7**: 1209-1224.
- D'ANDREA MM, FREZZA D, ROMANO E, MARMO P, HENRICI DE ANGELIS L, PERINI N, THALLER MC, DI LALLO G (2020). The lytic bacteriophage vB_EfaH_EF1TV, a new member of the *Herelleviridae* family, disrupts biofilm produced by *Enterococcus faecalis* clinical strains. *J Glob Antimicrob Resist*, **21**: 68-75.
- DIJKSHOORN L, NEMEC A, SEIFERT H (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*, **5(12)**: 939-951.
- DOI Y, MURRAY GL, PELEG AY (2015). *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. *Semin Respir Crit Care Med*, **36(1)**: 85-98.
- DOMINGO-CALAP P, DELGADO-MARTINEZ J (2018). Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics (Basel)*, **7(3)**: 1-16.
- DOOLITTLE MM, COONEY JJ, CALDWELL DE (1996). Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. *Journal of Industrial Microbiology*, **16(6)**: 331-341.
- DUBLANCHET A, FRUCIANO E (2008). A short history of phage therapy. *Med Mal Infect*, **38(8)**: 415-420.

- EIJKELKAMP BA, HASSAN KA, PAULSEN IT, BROWN MH (2011). Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics*, **12**: 126-140.
- EL-SHIBINY A, EL-SAHHAR S (2017). Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. *Can J Microbiol*, **63(11)**: 865-879.
- ELHOSSEINY NM, ATTIA AS (2018). Acinetobacter: an emerging pathogen with a versatile secretome. *Emerg Microbes Infect*, **7(1)**: 33-48.
- EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING
 EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing.
 Versiyon 11.0. Erişim Adresi:
[\[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_4/Reading_guide_v_11.0_EUCAST_Disk_Test.pdf\]](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_4/Reading_guide_v_11.0_EUCAST_Disk_Test.pdf).
 Erişim Tarihi: 20 Mart 2020.
- FALAGAS ME, KASIAKOU SK (2006). Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*, **10(1)**: 1-13.
- FALAH F, SHOKOOHIZADEH L, ADABI M (2019). Molecular identification and genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients by PCR and ERIC-PCR. *Scars, Burns & Healing*, **5**: 1-7.
- FIESTER SE, ARIVETT BA, SCHMIDT RE, BECKETT AC, TICAK T, CARRIER MV, GHOSH R, OHNECK EJ, METZ ML, SELLIN JEFFRIES MK, ACTIS LA (2016). Iron-Regulated Phospholipase C Activity Contributes to the Cytolytic Activity and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, **11(11)**: 1-26.
- FISHBAIN J, PELEG AY (2010). Treatment of Acinetobacter infections. *Clin Infect Dis*, **51(1)**: 79-84.
- FITZSIMONS TC, LEWIS JM, WRIGHT A, KLEIFELD O, SCHITTENHELM RB, POWELL D, HARPER M, BOYCE JD (2018). Identification of Novel *Acinetobacter baumannii* Type VI Secretion System Antibacterial Effector and Immunity Pairs. *Infect Immun*, **86(8)**: 1-23.
- FLEMMING H-C, WINGENDER J (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, **8(9)**: 623-633.
- FONG SA, DRILLING A, MORALES S, CORNET ME, WOODWORTH BA, FOKKENS WJ, PSALTIS AJ, VREUGDE S, WORMALD P-J (2017). Activity of Bacteriophages in Removing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Chronic Rhinosinusitis Patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7(418)**: 1-11.
- FU W, FORSTER T, MAYER O, CURTIN JJ, LEHMAN SM, DONLAN RM (2010). Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. *Antimicrob Agents Chemother*, **54(1)**: 397-404.

- GADDY JA, TOMARAS AP, ACTIS LA (2009). The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, **77(8)**: 3150-3160.
- GARBE J, WESCHE A, BUNK B, KAZMIERCZAK M, SELEZSKA K, ROHDE C, SIKORSKI J, ROHDE M, JAHN D, SCHOBERT M (2010). Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. *BMC Microbiology*, **10(1)**: 301-311.
- GARNACHO-MONTERO J, AMAYA-VILLAR R (2010). Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **23(4)**: 332-339.
- GEISINGER E, ISBERG RR (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog*, **11(2)**: 1-27.
- GILBERT P, DAS J, FOLEY I (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*, **11(1)**: 160-167.
- GOLKAR Z, BAGASRA O, PACE DG (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*, **8(2)**: 129-136.
- GORDON NC, WAREHAM DW (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, **35(3)**: 219-226.
- GREENE C, WU J, RICKARD AH, XI C (2016). Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Lett Appl Microbiol*, **63(4)**: 233-239.
- GU J, LIU X, LI Y, HAN W, LEI L, YANG Y, ZHAO H, GAO Y, SONG J, LU R, SUN C, FENG X (2012). A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*, **7(3)**: 316-326.
- GUTTMAN B, RAYA R, KUTTER E (2005). Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and applications*, p.: 44.
- HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, **2(2)**: 95-108.
- HANLON GW, DENYER SP, OLLIFF CJ, IBRAHIM LJ (2001). Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, **67(6)**: 2746-2753.
- HARADA LK, SILVA EC, CAMPOS WF, DEL FIOLE FS, VILA M, DABROWSKA K, KRYLOV VN, BALCAO VM (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol Res*, **212-213**: 38-58.
- HARDING CM, HENNON SW, FELDMAN MF (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol*, **16(2)**: 91-102.
- HARPER DR, PARRACHO HMRT, WALKER J, SHARP R, HUGHES G, WERTHÉN M, LEHMAN S, MORALES S (2014). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, **3(3)**: 270-284.

- HATFULL GF (2008). Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol*, **11(5)**: 447-453.
- HOOD MI, SKAAR EP (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*, **10(8)**: 525-537.
- HOOD RD, SINGH P, HSU F, GÜVENER T, CARL MA, TRINIDAD RRS, SILVERMAN JM, OHLSON BB, HICKS KG, PLEMEL RL, LI M, SCHWARZ S, WANG WY, MERZ AJ, GOODLETT DR, MOUGOUS JD (2010). A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host & Microbe*, **7(1)**: 25-37.
- HUA Y, LUO T, YANG Y, DONG D, WANG R, WANG Y, XU M, GUO X, HU F, HE P (2017). Phage Therapy as a Promising New Treatment for Lung Infection Caused by Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Mice. *Front Microbiol*, **8**: 2659-2670.
- HUANG W, YAO Y, WANG S, XIA Y, YANG X, LONG Q, SUN W, LIU C, LI Y, CHU X, BAI H, YAO Y, MA Y (2016). Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*, **6**: 20724-20736.
- HUANG Y, ZHOU Q, WANG W, HUANG Q, LIAO J, LI J, LONG L, JU T, ZHANG Q, WANG H, XU H, TU M (2019). *Acinetobacter baumannii* Ventilator-Associated Pneumonia: Clinical Efficacy of Combined Antimicrobial Therapy and in vitro Drug Sensitivity Test Results. *Frontiers in Pharmacology*, **10**: 92-103.
- JANG TN, LEE SH, HUANG CH, LEE CL, CHEN WY (2009). Risk factors and impact of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study. *J Hosp Infect*, **73(2)**: 143-150.
- JAULT P, LECLERC T, JENNES S, PIRNAY JP, QUE YA, RESCH G, ROUSSEAU AF, RAVAT F, CARSIN H, LE FLOCH R, SCHAAL JV, SOLER C, FEVRE C, ARNAUD I, BRETAUDEAU L, GABARD J (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*, **19(1)**: 35-45.
- JEON J, RYU C-M, LEE J-Y, PARK J-H, YONG D, LEE K (2016). In Vivo Application of Bacteriophage as a Potential Therapeutic Agent To Control OXA-66-Like Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* Strains Belonging to Sequence Type 357. *Applied and environmental microbiology*, **82(14)**: 4200-4208.
- JEONG HW, SON BR, SHIN DI, RYU D, HONG SB, HAN K, SHIN KS (2011). Characterization of *Acinetobacter baumannii* co-producing carbapenemases OXA-23 and OXA-66, and ArmA 16S ribosomal RNA methylase at a University hospital in South Korea. *Korean Journal of Clinical Microbiology*, **14(2)**: 67-73.
- JIN J, LI Z-J, WANG S-W, WANG S-M, HUANG D-H, LI Y-H, MA Y-Y, WANG J, LIU F, CHEN X-D, LI G-X, WANG X-T, WANG Z-Q, ZHAO G-Q (2012). Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BMC Microbiology*, **12(1)**: 156-164.

- JUNG JY, PARK MS, KIM SE, PARK BH, SON JY, KIM EY, LIM JE, LEE SK, LEE SH, LEE KJ, KANG YA, KIM SK, CHANG J, KIM YS (2010). Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. *BMC Infectious Diseases*, **10(1)**: 228-239.
- KABWE M, BROWN TL, DASHPER S, SPEIRS L, KU H, PETROVSKI S, CHAN HT, LOCK P, TUCCI J (2019). Genomic, morphological and functional characterisation of novel bacteriophage FNU1 capable of disrupting *Fusobacterium nucleatum* biofilms. *Sci Rep*, **9(1)**: 9107-9120.
- KANAFANI ZA, ZAHREDDINE N, TAYYAR R, SFEIR J, ARAJ GF, MATAR GM, KANJ SS (2018). Multi-drug resistant *Acinetobacter* species: a seven-year experience from a tertiary care center in Lebanon. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, **7(1)**: 1-8.
- KARAOGLAN I, ZER Y, BOSNAK VK, METE AO, NAMIDURU M (2013). In vitro synergistic activity of colistin with tigecycline or beta-lactam antibiotic/beta-lactamase inhibitor combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Int Med Res*, **41(6)**: 1830-1837.
- KAZI M, ANNAPURE US (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *J Food Sci Technol*, **53(3)**: 1355-1362.
- KIM SG, JUN JW, GIRI SS, YUN S, KIM HJ, KIM SW, KANG JW, HAN SJ, JEONG D, PARK SC (2019). Isolation and characterisation of pVa-21, a giant bacteriophage with anti-biofilm potential against *Vibrio alginolyticus*. *Scientific Reports*, **9(1)**: 6284.
- KIRBY AE, GARNER K, LEVIN BR (2012). The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, **56(6)**: 2967-2975.
- KIYASU Y, HITOMI S, FUNAYAMA Y, SAITO K, ISHIKAWA H (2020). Characteristics of invasive *Acinetobacter* infection: A multicenter investigation with molecular identification of causative organisms. *J Infect Chemother*, **26(5)**: 475-482.
- KOCHETKOVA VA, MAMONTOV AS, MOSKOVTSOVA RL, ERASTOVA EI, TROFIMOV EI, POPOV MI, DZHUBALIEVA SK (1989). Phagotherapy of postoperative suppurative-inflammatory complications in patients with neoplasms. *Sov Med*, **6**: 23-26.
- KROPINSKI AM, MAZZOCCO A, WADDELL TE, LINGOHR E, JOHNSON RP (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **501**: 69-76.
- KUMARI S, HARJAI K, CHHIBBER S (2011). Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055. *J Med Microbiol*, **60(Pt 2)**: 205-210.
- KUMBURU HH, SONDA T, VAN ZWETSELAAR M, LEEKITCHAROENPHON P, LUKJANCENKO O, MMBAGA BT, ALIFRANGIS M, LUND O, AARESTRUP FM, KIBIKI GS (2019). Using WGS to identify antibiotic resistance genes and predict antimicrobial resistance phenotypes in MDR *Acinetobacter baumannii* in Tanzania. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74(6)**: 1484-1493.

- KUSRADZE I, KARUMIDZE N, RIGVAVA S, DVALIDZE T, KATSITADZE M, AMIRANASHVILI I, GODERDZISHVILI M. (2016). Characterization and Testing the Efficiency of *Acinetobacter baumannii* Phage vB-GEC_Ab-M-G7 as an Antibacterial Agent. *Frontiers in microbiology*, **7**: 1590-1611.
- KWIATEK M, PARASION S, RUTYNA P, MIZAK L, GRYKO R, NIEMCEWICZ M, OLENDER A, ŁOBOCKA M (2017). Isolation of bacteriophages and their application to control *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm models. *Res Microbiol*, **168(3)**: 194-207.
- LEE CR, LEE JH, PARK M, PARK KS, BAE IK, KIM YB, CHA CJ, JEONG BC, LEE SH (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol*, **7**: 55-90.
- LEE YT, TSAO SM, HSUEH PR (2013). Clinical outcomes of tigecycline alone or in combination with other antimicrobial agents for the treatment of patients with healthcare-associated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **32(9)**: 1211-1220.
- LIMA WG, ALVES MC, CRUZ WS, PAIVA MC (2018). Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **37(6)**: 1009-1019.
- LIN DM, KOSKELLA B, LIN HC (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, **8(3)**: 162-173.
- LIN M-F, LAN C-Y (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J Clin Cases*, **2(12)**: 787-814.
- LIU C-C, KUO H-Y, TANG CY, CHANG K-C, LIOU M-L (2014). Prevalence and mapping of a plasmid encoding a type IV secretion system in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics*, **104(3)**: 215-223.
- LOOD R, ERTÜRK G, MATTIASSON B (2017). Revisiting Antibiotic Resistance Spreading in Wastewater Treatment Plants – Bacteriophages as a Much Neglected Potential Transmission Vehicle. *Frontiers in Microbiology*, **8(2298)**: 1-7.
- LYON J (2017). Phage Therapy's Role in Combating Antibiotic-Resistant Pathogens. *Jama*, **318(18)**: 1746-1748.
- MALEKI A, VANDYOUSEFI J, MIRZAIIE Z, GHAFOURIAN S, KAZEMIAN H, SADEGHIFARD N (2017). Molecular Analysis of the Isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from Tehran Hospitals Using ERIC-PCR Method. *Modern Medical Laboratory Journal*, **1(1)**: 12-16.
- MARTÍN-ASPAS A, GUERRERO-SÁNCHEZ FM, GARCÍA-COLCHERO F, RODRÍGUEZ-ROCA S, GIRÓN-GONZÁLEZ J-A (2018). Differential characteristics of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: risk factors, clinical picture, and mortality. *Infect Drug Resist*, **11**: 861-872.

- MCCONNELL MJ, ACTIS L, PACHON J (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*, **37**(2): 130-155.
- MENDES JJ, LEANDRO C, MOTTOLA C, BARBOSA R, SILVA FA, OLIVEIRA M, VILELA CL, MELO-CRISTINO J, GÓRSKI A, PIMENTEL M, SÃO-JOSÉ C, CAVACO-SILVA P, GARCIA M (2014). In vitro design of a novel lytic bacteriophage cocktail with therapeutic potential against organisms causing diabetic foot infections. *Journal of Medical Microbiology*, **63**(8): 1055-1065.
- MERABISHVILI M, PIRNAY J-P, VERBEKEN G, CHANISHVILI N, TEDIASHVILI M, LASHKHI N, GLONTI T, KRYLOV V, MAST J, VAN PARYS L, LAVIGNE R, VOLCKAERT G, MATTHEUS W, VERWEEN G, DE CORTE P, ROSE T, JENNES S, ZIZI M, DE VOS D, VANEECHOUTTE M (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PloS one*, **4**(3): e4944-e4944.
- MOFFATT JH, HARPER M, HARRISON P, HALE JDF, VINOGRADOV E, SEEMANN T, HENRY R, CRANE B, ST. MICHAEL F, COX AD, ADLER B, NATION RL, LI J, BOYCE JD (2010). Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**(12): 4971-4977.
- MORRIS FC, DEXTER C, KOSTOULIAS X, UDDIN MI, PELEG AY (2019). The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, **10**: 1601-1601.
- MOUBARECK C, HAMMOUDI D (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics*, **9**: 119-148.
- NAIRN BL, LONERGAN ZR, WANG J, BRAYMER JJ, ZHANG Y, CALCUTT MW, LISHER JP, GILSTON BA, CHAZIN WJ, DE CRÉCY-LAGARD V, GIEDROC DP, SKAAR EP (2016). The Response of *Acinetobacter baumannii* to Zinc Starvation. *Cell host & microbe*, **19**(6): 826-836.
- NALE JY, CHUTIA M, CARR P, HICKENBOTHAM PT, CLOKIE MRJ (2016). 'Get in Early'; Biofilm and Wax Moth (*Galleria mellonella*) Models Reveal New Insights into the Therapeutic Potential of *Clostridium difficile* Bacteriophages. *Frontiers in microbiology*, **7**: 1383-1383.
- OLIVEIRA H, PINTO G, OLIVEIRA A, OLIVEIRA C, FAUSTINO MA, BRIERS Y, DOMINGUES L, AZEREDO J (2016). Characterization and genome sequencing of a *Citrobacter freundii* phage CfP1 harboring a lysin active against multidrug-resistant isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**(24): 10543-10553.
- OLIVEIRA H, SILLANKORVA S, MERABISHVILI M, KLUSKENS L, AZEREDO J (2015). Unexploited opportunities for phage therapy. *Frontiers in Pharmacology*, **6**(180-184).
- ORLOVA EV (2009). How viruses infect bacteria? *The EMBO journal*, **28**(7): 797-798.

- ORLOVA EV. (2012). Bacteriophages and Their Structural Organisation. In: *Bacteriophages* Ed.p.: 345-400.
- OZBEK B, MATARACI E (2012). In vitro effectiveness of colistin, tigecycline and levofloxacin alone and combined with clarithromycin and/or heparin as lock solutions against embedded *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68(4)**: 827-830.
- ÖZEKİNCİ T, HABİP Z, ÖNDER N, KOÇOĞLU ME (2020). 2015-2018 Yıllarında İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direnci. *Van Med J.* , **27(3)**: 340-344.
- ÖZSOY M, SÖNMEZER M, KİNKİLİ S (2019). Hastanelerde güncel bir sorun: çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi. *Anadolu Güncel Tıp Dergisi*, **1(2)**: 37-41.
- PATEY O, MCCALLIN S, MAZURE H, LIDDLE M, SMITHYMAN A, DUBLANCHET A (2018). Clinical Indications and Compassionate Use of Phage Therapy: Personal Experience and Literature Review with a Focus on Osteoarticular Infections. *Viruses*, **11(1)**: 1-21.
- PELEG AY, SEIFERT H, PATERSON DL (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, **21(3)**: 538-582.
- PENG F, MI Z, HUANG Y, YUAN X, NIU W, WANG Y, HUA Y, FAN H, BAI C, TONG Y (2014). Characterization, sequencing and comparative genomic analysis of vB_AbaM-IME-AB2, a novel lytic bacteriophage that infects multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BMC Microbiol*, **14**: 181-193.
- PHEE A, BONDY-DENOMY J, KISHEN A, BASRANI B, AZARPAZHOOH A, MAXWELL K (2013). Efficacy of bacteriophage treatment on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Endod*, **39(3)**: 364-369.
- PIRES D, SILLANKORVA S, FAUSTINO A, AZEREDO J (2011). Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Res Microbiol*, **162(8)**: 798-806.
- PIRES DP, MELO L, VILAS BOAS D, SILLANKORVA S, AZEREDO J (2017). Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr Opin Microbiol*, **39**: 48-56.
- POPOVA A, ZHILENKOV E, MYAKININA V, KRASILNIKOVA V, VOLOZHANTSEV N (2012). Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters*, **332**: 40-46.
- PRINCIPE L, D'AREZZO S, CAPONE A, PETROSILLO N, VISCA P (2009). In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **8**: 18-29.
- REGEIMBAL JM, JACOBS AC, COREY BW, HENRY MS, THOMPSON MG, PAVLICEK RL, QUINONES J, HANNAH RM, GHEBREMEDHIN M, CRANE NJ, ZURAWSKI DV, TENEZA-MORA NC, BISWAS B, HALL ER (2016). Personalized Therapeutic Cocktail of Wild Environmental Phages Rescues Mice from

Acinetobacter baumannii Wound Infections. *Antimicrob Agents Chemother*, **60(10)**: 5806-5816.

RIBEIRO KVG, RIBEIRO C, DIAS RS, CARDOSO SA, DE PAULA SO, ZANUNCIO JC, DE OLIVEIRA LL (2018). Bacteriophage Isolated from Sewage Eliminates and Prevents the Establishment of *Escherichia Coli* Biofilm. *Adv Pharm Bull*, **8(1)**: 85-95.

RICHARDS AM, ABU KWAIK Y, LAMONT RJ (2015). Code blue: *Acinetobacter baumannii*, a nosocomial pathogen with a role in the oral cavity. *Mol Oral Microbiol*, **30(1)**: 2-15.

RITCHIE DJ, GARAVAGLIA-WILSON A (2014). A Review of Intravenous Minocycline for Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Infections. *Clinical Infectious Diseases*, **59(6)**: S374-S380.

ROCA I, ESPINAL P, VILA-FARRÉS X, VILA J (2012). The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front Microbiol*, **3**: 148-169.

RODRÍGUEZ GUARDADO A, BLANCO A, ASENSI V, PÉREZ F, RIAL JC, PINTADO V, BUSTILLO E, LANTERO M, TENZA E, ALVAREZ M, MARADONA JA, CARTÓN JA (2008). Multidrug-resistant *Acinetobacter meningitis* in neurosurgical patients with intraventricular catheters: assessment of different treatments. *J Antimicrob Chemother*, **61(4)**: 908-913.

ROHDE C, RESCH G, PIRNAY JP, BLASDEL BG, DEBARBIEUX L, GELMAN D, GÓRSKI A, HAZAN R, HUYS I, KAKABADZE E, ŁOBOCKA M, MAESTRI A, ALMEIDA GMF, MAKALATIA K, MALIK DJ, MAŠLAŇOVÁ I, MERABISHVILI M, PANTUCEK R, ROSE T, ŠTVERÁKOVÁ D, VAN RAEMDONCK H, VERBEKEN G, CHANISHVILI N (2018). Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains. *Viruses*, **10(4)**: 178-193.

ROSS A, WARD S, HYMAN P (2016). More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, **7(1352)**: 1-6.

RUSSELL DW, SAMBROOK J. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. (Ed. Vol. 1): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 2, Protocol:1, p.: 1448, NY.

RUSSO TA, BEANAN JM, OLSON R, MACDONALD U, LUKE NR, GILL SR, CAMPAGNARI AA (2008). Rat pneumonia and soft-tissue infection models for the study of *Acinetobacter baumannii* biology. *Infect Immun*, **76(8)**: 3577-3586.

SABOURI GHANNAD M, MOHAMMADI A (2012). Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. *Iran J Basic Med Sci*, **15(2)**: 693-701.

SAIPRIYA K, SWATHI CH, RATNAKAR KS, SRITHARAN V (2020). Quorum-sensing system in *Acinetobacter baumannii*: a potential target for new drug development. *Journal of Applied Microbiology*, **128(1)**: 15-27.

- SANDKVIST M (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun*, **69(6)**: 3523-3535.
- SARKER SA, BERGER B, DENG Y, KIESER S, FOATA F, MOINE D, DESCOMBES P, SULTANA S, HUQ S, BARDHAN PK, VUILLET V, PRAPLAN F, BRÜSSOW H (2017). Oral application of *Escherichia coli* bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from Bangladesh. *Environ Microbiol*, **19(1)**: 237-250.
- SASIKALA D, SRINIVASAN P (2016). Characterization of potential lytic bacteriophage against *Vibrio alginolyticus* and its therapeutic implications on biofilm dispersal. *Microb Pathog*, **101**: 24-35.
- SATO Y, UNNO Y, UBAGAI T, ONO Y (2018). Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *PLoS One*, **13(3)**: e0194556.
- SAUVAGE E, KERFF F, TERRAK M, AYALA JA, CHARLIER P (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, **32(2)**: 234-258.
- SCHOOLEY RT, BISWAS B, GILL JJ, HERNANDEZ-MORALES A, LANCASTER J, LESSOR L, BARR JJ, REED SL, ROHWER F, BENLER S, SEGALL AM, TAPLITZ R, SMITH DM, KERR K, KUMARASWAMY M, NIZET V, LIN L, MCCAULEY MD, STRATHDEE SA, BENSON CA, POPE RK, LEROUX BM, PICEL AC, MATECZUN AJ, CILWA KE, REGEIMBAL JM, ESTRELLA LA, WOLFE DM, HENRY MS, QUINONES J, SALKA S, BISHOP-LILLY KA, YOUNG R, HAMILTON T (2017). Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother*, **61(10)**: e00954-00917.
- SEIFERT H, DIJKSHOORN L, GERNER-SMIDT P, PELZER N, TJERNBERG I, VANEECHOUTTE M (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol*, **35(11)**: 2819-2825.
- SHARMA R, GODA R, BORKAR SA, KATIYAR V, AGARWAL S, KUMAR A, MOHAPATRA S, KAPIL A, SURI A, KALE SS (2019). Outcome following postneurosurgical *Acinetobacter meningitis*: an institutional experience of 72 cases. *Neurosurg Focus*, **47(2)**: E8-15.
- SHARMA S, VAIRALE M, DATTA S, CHATTERJEE S, DUBEY D, PRASAD R, BUDHAULIYA R, DAS B, VEER V. (2016). Bacteriophages for Sustainable Wastewater Treatment: Application in Black Water Decontamination with an Emphasis to DRDO Biotoilet. (Ed.). 2nd Ed.: Chapter 2: 39-66.
- SHARP R, HUGHES G, HART A, WALKER J (2006). Bacteriophage for the treatment of bacterial films. *United States Patent application 20060140911*, **1516**.
- SHIVASWAMY VC, KALASURAMATH SB, SADANAND CK, BASAVARAJU AK, GINNAVARAM V, BILLE S, UKKEN SS, PUSHPARAJ UN (2015). Ability of bacteriophage in resolving wound infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in uncontrolled diabetic rats. *Microb Drug Resist*, **21(2)**: 171-177.

- SHLAES DM, BRADFORD PA (2018). Antibiotics—From There to Where? *Pathogens and Immunity*, **3(1)**: 19-43.
- SIEGMAN-IGRA Y, BAR-YOSEF S, GOREA A, AVRAM J (1993). Nosocomial acinetobacter meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clin Infect Dis*, **17(5)**: 843-849.
- SILLANKORVA S, NEUBAUER P, AZEREDO J (2008). *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC Biotechnol*, **8**: 79-85.
- SILLANKORVA S, NEUBAUER P, AZEREDO J (2010). Phage control of dual species biofilms of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. *Biofouling*, **26(5)**: 567-575.
- SILLANKORVA SN, P; AZAREDO, J (2011). Use of bacteriophages to control biofilms. Vol. 31(1), p:3-24.
- SIMOES LC, SIMOES M, VIEIRA MJ (2010). Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **98(3)**: 317-329.
- SMANI Y, DOMINGUEZ-HERRERA J, PACHÓN J (2013). Association of the Outer Membrane Protein Omp33 With Fitness and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Infectious Diseases*, **208(10)**: 1561-1570.
- SMANI Y, MCCONNELL MJ, PACHÓN J (2012). Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS One*, **7(4)**: e33073.
- SOPHIO R, IRINA T, DAREJAN J, TEONA D, JAMES C, MARINA G (2013). Comparative analysis of the biological and physical properties of *Enterococcus faecalis* bacteriophage vB_EfaS_GEC-EfS_3 and *Streptococcus mitis* bacteriophage vB_SmM_GEC-SmitisM_2. *Canadian Journal of Microbiology*, **59(1)**: 18-21.
- STAHL J, BERGMANN H, GÖTTIG S, EBERSBERGER I, AVERHOFF B (2015). *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. *PLoS One*, **10(9)**: e0138360.
- SULAKVELIDZE A, ALAVIDZE Z, MORRIS JG (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, **45(3)**: 649-659.
- SUMMERS WC (2001). Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol*, **55**: 437-451.
- TANJI Y, MIZOGUCHI K, YOICHI M, MORITA M, KIJIMA N, KATOR H, UNNO H (2003). Seasonal change and fate of coliphages infected to *Escherichia coli* O157: H7 in a wastewater treatment plant. *Water research*, **37(5)**: 1136-1142.
- TESTING ECOAS. (2016). EUCAST disk diffusion test manual, version 4.0. Erişim Adresi: [\http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test . Erişim Tarihi: 31 Mayıs 2020.
- TEWARI R, CHOPRA D, WAZAHAT R, DHINGRA S, DUDEJA M (2018). Antimicrobial Susceptibility Patterns of an Emerging Multidrug Resistant Nosocomial Pathogen: *Acinetobacter baumannii*. *Malays J Med Sci*, **25(3)**: 129-134.

- TILLEY D, LAW R, WARREN S, SAMIS JA, KUMAR A (2014). CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. *FEMS Microbiology Letters*, **356(1)**: 53-61.
- TIPTON KA, RATHER PN (2017). An ompR-envZ Two-Component System Ortholog Regulates Phase Variation, Osmotic Tolerance, Motility, and Virulence in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. *Journal of Bacteriology*, **199(3)**: e00705-00716.
- TOMARAS AP, FLAGLER MJ, DORSEY CW, GADDY JA, ACTIS LA (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology* **154(Pt 11)**: 3398-3409.
- TURNER D, WAND ME, BRIERS Y, LAVIGNE R, SUTTON JM, REYNOLDS DM (2017). Characterisation and genome sequence of the lytic *Acinetobacter baumannii* bacteriophage vB_AbaS_Loki. *PloS one*, **12(2)**: e0172303-e0172313.
- VILLAR M, CANO ME, GATO E, GARNACHO-MONTERO J, MIGUEL CISNEROS J, RUÍZ DE ALEGRÍA C, FERNÁNDEZ-CUENCA F, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, VILA J, PASCUAL A, TOMÁS M, BOU G, RODRÍGUEZ-BAÑO J, GROUP GEGR-A (2014). Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: a reappraisal. *Medicine (Baltimore)*, **93(5)**: 202-210.
- VINCENT JL, RELLO J, MARSHALL J, SILVA E, ANZUETO A, MARTIN CD, MORENO R, LIPMAN J, GOMERSALL C, SAKR Y, REINHART K (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*, **302(21)**: 2323-2329.
- WALLACE L, DAUGHERTY SC, NAGARAJ S, JOHNSON JK, HARRIS AD, RASKO DA (2016). Use of Comparative Genomics To Characterize the Diversity of *Acinetobacter baumannii* Surveillance Isolates in a Health Care Institution. *Antimicrob Agents Chemother*, **60(10)**: 5933-5941.
- WEITZ JS, DUSHOFF J (2008). Alternative stable states in host–phage dynamics. *Theoretical Ecology*, **1(1)**: 13-19.
- WHITELEY M, DIGGLE SP, GREENBERG EP (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, **551(7680)**: 313-320.
- WISPLINGHOFF H, PAULUS T, LUGENHEIM M, STEFANIK D, HIGGINS PG, EDMOND MB, WENZEL RP, SEIFERT H (2012). Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection*, **64(3)**: 282-290.
- WISPLINGHOFF H, PERBIX W, SEIFERT H (1999). Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. *Clin Infect Dis*, **28(1)**: 59-66.
- WITHATANUNG P, CHANTRATITA N, MUANGSOMBUT V, SAIPROM N, LERTMEMONGKOLCHAI G, KLUMPP J, CLOKIE MRJ, GALYOV EE, KORBSRISATE S (2016). Analyses of the Distribution Patterns of *Burkholderia pseudomallei* and Associated Phages in Soil Samples in Thailand Suggest That Phage

Presence Reduces the Frequency of Bacterial Isolation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **10(9)**: e0005005.

WITTEBOLE X, DE ROOCK S, OPAL SM (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, **5(1)**: 226-235.

WITTMANN J, DREISEIKELMANN B, ROHDE C, ROHDE M, SIKORSKI J (2014). Isolation and Characterization of Numerous Novel Phages Targeting Diverse Strains of the Ubiquitous and Opportunistic Pathogen *Achromobacter xylosoxidans*. *PLOS ONE*, **9(1)**: 1-12.

WONG D, NIELSEN TB, BONOMO RA, PANTAPALANGKOOR P, LUNA B, SPELLBERG B (2017). Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev*, **30(1)**: 409-447.

WOOD DE, SALZBERG SL (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, **15(3)**: 46-58.

WROBLEWSKA MM, SAWICKA-GRZELAK A, MARCHEL H, LUCZAK M, SIVAN A (2008). Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **53(1)**: 140-144.

YANG H, LIANG L, LIN S, JIA S (2010). Isolation and Characterization of a Virulent Bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, **10(1)**: 131-141.

YILMAZ C, COLAK M, YILMAZ BC, ERSOZ G, KUTATELADZE M, GOZLUGOL M (2013). Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am*, **95(2)**: 117-125.

YIN S, HUANG G, ZHANG Y, JIANG B, YANG Z, DONG Z, YOU B, YUAN Z, HU F, ZHAO Y, PENG Y (2017). Phage Abp1 Rescues Human Cells and Mice from Infection by Pan-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Cell Physiol Biochem*, **44(6)**: 2337-2345.

ZHANG C, GONG YL, LUO XQ, LIU MX, SHI YL, LIU TF, LI HY, PENG YZ (2020). Analysis of the pathogenic characteristics of fungal bloodstream infection in severe burn patients. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, **36(1)**: 37-41.