

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANA BİLİM DALI



**ANTİBİYOTİĞE DİRENÇLİ *Escherichia coli* SUŞLARINA
SPESİFİK LİTİK BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE LİTİK
SPEKTRUMLARININ BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Bahar GÜNGÖR

Danışman
Prof. Dr. Oktay GENÇ

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.21.034 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Bahar GÜNGÖR tarafından, **Prof. Dr. Oktay GENÇ** danışmanlığında hazırlanan “**ANTİBİYOTİĞE DİRENÇLİ *Escherichia coli* SUŞLARINA SPESİFİK LİTİK BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE LİTİK SPEKTRUMLARININ BELİRLENMESİ**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 5.1.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Fatih BÜYÜK Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Oktay GENÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli Mi?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

05/01/2023
Bahar GÜNGÖR

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : ANTİBİYOTİĞE DİRENÇLİ *Escherichia coli* SUŞLARINA SPESİFİK LİTİK BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE LİTİK SPEKTRUMLARININ BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 12.12.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 13

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

12/12/2022
Prof. Dr. Oktay GENÇ

ÖZET

ANTİBİYOTİĞE DİRENÇLİ *Escherichia coli* SUŞLARINA SPESİFİK LİTİK BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE LİTİK SPEKTRUMLARININ BELİRLENMESİ

Bahar GÜNGÖR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Ocak/2023

Danışman: Prof. Dr. Oktay GENÇ

Escherichia coli, kanatlı hayvanlarda kolibasillozise neden olan patojen bir bakteridir. Kolibasillozis tedavisinde antibiyotikler yoğun şekilde kullanılmaktadır. Buna karşın, antibiyotiklerin fazla ve yanlış şekilde kullanılması neticesinde son zamanlarda *E. coli* suşlarının antibiyotiklere dirençli hale gelmesi kolibasillozisle mücadeleyi zorlaştırmakta ve önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden virüsler olarak tanımlanmakta ve antibiyotiklere alternatif olarak düşünülmektedir. Bu çalışma kolibasillozis şüpheli etlik piliçlerden izole edilen çoklu antibiyotik dirençli *E. coli* suşlarına karşı litik etkili bakteriyofaj izolasyonu ve litik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada *E. coli* izolasyonu için 14 kolibasillozis şüpheli etlik piliç sekumları kullanılmıştır. Bakteriyofajların tespiti, 14 sekum içeriğinin birleştirilmesiyle oluşturulan karışımdan soft agar yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda 14 adet *E. coli* izolasyonu gerçekleştirilmiş olup seçilen 6 suşun antibiyotik direnç profilleri belirlenerek *E. coli* suşlarının en az 3 antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edilmiştir. Suşların dirençli oldukları antibiyotikler sırasıyla linkomisin (%100), basitrasin (%100), amoksisilin (%83), siprofloksasin (%83), sülfametoksazol (%67), kolistin (%17) ve ampisilin (%17) olarak belirlenmiştir. Buna karşın, *E. coli* suşlarının tetrasiklin ve gentamisine duyarlı oldukları belirlenmiştir. Spot test yöntemiyle, çoklu antibiyotik dirençli 6 *E. coli* suşuna karşı 4 bakteriyofaj tespit edilmiş olup bunların 3 tanesi (BF1, BF2, BF4) saflaştırılmıştır. İzole edilen bakteriyofajların titreleri çoğaltma öncesi 1.41×10^6 ile 2.04×10^6 PFU/ml arasında bulunurken, çoğaltma sonrası 4.02×10^8 ile 4.36×10^{11} PFU/ml arasında tespit edilmiştir. Bakteriyofajların, çalışmada kullanılan konak bakterilerin haricinde, 9 klinik *E. coli* suşuna karşı litik spektrumları belirlenmiş olup BF1 fajının ve üç fajın karıştırılmasıyla oluşturulan faj kokteylinin litik spektrumu %22.2 bulunurken, BF2 ve BF4 fajları klinik suşlara litik etki göstermemiştir.

Anahtar Sözcükler: Antibiyotik direnç, Bakteriyofaj, Kolibasillozis, *Escherichia coli*

ABSTRACT

ISOLATION OF LYTIC BACTERIOPHAGES AGAINST ANTIBIOTIC-RESISTANT *Escherichia coli* AND DETERMINATION OF THE LYTIC SPECTRUMS

Bahar GUNGOR
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Veterinary Microbiology
Master, January/2023
Supervisor: Prof. Dr. Oktay GENC

Escherichia coli is a pathogenic bacterium that causes colibacillosis in poultry. Antibiotics are used extensively in the treatment of colibacillosis. On the other hand, as a result of excessive and incorrect use of antibiotics, *E. coli* strains have become resistant to antibiotics recently. This complicates the fight against colibacillosis and emerges as an important problem. Bacteriophages are defined as viruses that infect bacteria and can be considered as an alternative to antibiotics. This study was carried out to isolate lytic bacteriophages against *E. coli* strains obtained from colibacillosis-suspected broilers and to determine the lytic activities of isolated bacteriophages against various clinical *E. coli* strains. In the study, the cecums of 14 colibacillosis suspected broilers were used for the isolation of *E. coli*. Detection of bacteriophages was carried out by the soft agar method from the mixture formed by combining 14 caecum samples. As a result of the study, 14 *E. coli* were isolated and antibiotic resistance profiles of 6 selected strains were determined. *E. coli* strains were found to be resistant to at least 3 antibiotics. *E. coli* strains were found to be resistant to lincomycin (100%), bacitracin (100%), amoxicillin (83%), ciprofloxacin (83%), sulfamethoxazole (67%), colistin (17%) and ampicillin (17%). In contrast, *E. coli* strains are sensitive to tetracycline and gentamicin antibiotics. Four bacteriophages were detected by spot test method against 6 multi-antibiotic resistant *E. coli* strains and 3 of them (BF1, BF2, BF4) were purified. The titers of isolated bacteriophages were found between 1.41×10^6 and 2.04×10^6 PFU/ml before amplification, and between 4.02×10^8 and 4.36×10^{11} PFU/ml after amplification. The lytic spectra of bacteriophages were determined against 9 clinical *E. coli* strains in addition to the host bacteria used in the study. While the lytic spectrum of the BF1 phage and the phage cocktail prepared by mixing all three phages were found to be 22.2%, the BF2 and BF4 phages did not show lytic activity against the clinical strains.

Keywords: Antibiotic resistance, Bacteriophage, Colibacillosis, *Escherichia coli*

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bakteriyel enfeksiyonların önlenmesinde antibiyotikler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Buna karşın, son yıllarda insan ve kanatlı hayvanlarda patojen bakteriler antibiyotiklere dirençli hale gelmiş ve vakalarda hızlı bir artış belirlenmiştir. Bakteriyofajlar, antibiyotiklere karşı sahip olduğu avantajlar nedeniyle kanatlı hayvanlarda antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilir. Bu tez çalışmada, kolibasillosis şüpheli etlik piliçlerden çoklu antibiyotik dirençli *Escherichia coli* izolasyonu ve *E. coli* suşlarına litik etkili bakteriyofajların izolasyonu ile litik spektrumları araştırılmıştır.

Lisansüstü eğitimim süresince, akademik birikim ve tecrübeleriyle bana rehber olan ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Oktay GENÇ'e ve tez çalışmamın laboratuvar çalışmalarında yardımları için Araş. Gör. Evrim GENÇ'e ve destekleri için Doç. Dr. Aydın ALTOP'a teşekkür ederim. Ayrıca PYO.VET.1904.21.034 proje numarası ile tez çalışmamı destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana destek olan annem, babam ve kardeşime, son olarak tez çalışmamın her adımında yanımda olup deneyimlerini benimle paylaşan sevgili eşim Araş. Gör. Dr. Emrah GÜNGÖR'e teşekkür ederim.

Bahar GÜNGÖR

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> 'nin Sebepl Olduğu Enfeksiyonlar	4
2.2. Bakteriyofajlar	4
2.2.1. Bakteriyofaj Araştırmalarının Tarihçesi	4
2.2.2. Bakteriyofajların Morfolojisi ve Sınıflandırması	5
2.2.3. Bakteriyofajların Üremeleri	8
2.2.3.1. Adsorbsiyon	8
2.2.3.2. Penetrasyon	8
2.2.3.3. Latent Dönem.....	8
2.2.3.4. Lizis ve Dışarı Çıkış.....	9
2.2.4. Bakteriyofajların Uygulama Alanları.....	11
2.2.5. Kanatlı Hayvanlarda Faj Kullanımı	12
2.2.5.1. <i>Escherichia coli</i> Enfeksiyonlarında Faj Tedavisi	13
2.2.5.2. Gıda Kontaminasyonlarının Azaltılması (Biyokontrol).....	15
2.2.5.3. Bakteriyofajların Dezenfektan Olarak Kullanımı	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Çevresel Örnekler	17
3.1.2. Besiyerleri	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. <i>Escherichia coli</i> İzolasyonu	17
3.2.2. <i>Escherichia coli</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	18
3.2.3. Litik Bakteriyofaj İzolasyonu	20
3.2.3.1. Litik Bakteriyofaj Süspansiyonlarının Hazırlanması	20
3.2.3.2. Litik Bakteriyofaj Tespiti (Spot Test Yöntemi)	20
3.2.3.3. Bakteriyofajların Saflaştırılması (Tek Plak İzolasyonu).....	21
3.2.4. Bakteriyofajların Çoğaltılması	22
3.2.5. Bakteriyofaj Sayımı	23
3.2.6. Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	23
4. BULGULAR.....	25
4.1. <i>E. coli</i> İzolasyonu.....	25
4.2. <i>E. coli</i> Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	25
4.3. Bakteriyofaj İzolasyonu	26
4.4. Bakteriyofaj Titrelelerinin Belirlenmesi	27
4.5. Klinik <i>E. coli</i> suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	28
4.6. Bakteriyofajların Antibiyotik Dirençli <i>E. coli</i> Suşları Üzerine Etkileri.....	28
5. TARTIŞMA.....	30
6. SONUÇ	35
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

APEC	: Avian Patojenik <i>Escherichia coli</i>
CFU	: Koloni Oluşturabilir Birim
DAEC	: Diffüz Aderent <i>Escherichia coli</i>
EAEC	: Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>
EHEC	: Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
EIEC	: Enteroinvazif <i>Escherichia coli</i>
EPEC	: Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
ETEC	: Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
PFU	: Plak Oluşturabilir Birim
STEC	: Shiga Toksini Üreten <i>Escherichia coli</i>
STEC	: Shigatoksijenik <i>Escherichia coli</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bakteriyofajların genel yapısı (a) ve elektron mikroskop görüntüsü (b) (Aydoğan ve Hadımlı, 2016).....	6
Şekil 2.2. Bakteriyofajlarda litik ve lizogenik yaşam döngüsü (Anonim, 2020).....	9
Şekil 2.3. Kanatlılarda bakteriyofaj kullanım alanları (Żbikowska vd., 2020).....	12
Şekil 3.1. Sekum örneklerinden <i>Escherichia coli</i> izolasyonunda MacConkey agar (a), Simmons Sitrat agar (b), indol testi (c), TSI agar testi (d), Gram boyama (e) görüntüleri	19
Şekil 4.1. Etlik piliç sekumlarından <i>Escherichia coli</i> izolasyonu.....	25
Şekil 4.2. <i>Escherichia coli</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi	26
Şekil 4.3. Bakteriyofaj izolasyonu	27
Şekil 4.4. Bakteriyofajların litik spektrumlarının belirlenmesi.....	29

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri.....	25
Tablo 4.2. Bakteriyofaj titreleri.....	27
Tablo 4.3. Klinik <i>E. coli</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri	28
Tablo 4.4. Bakteriyofajların klinik <i>E. coli</i> suşları üzerine etkileri.....	29



1. GİRİŞ

Escherichia coli, insan ve hayvanlarda hem intestinal hem de ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olan *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram-negatif çomak şekilli bir bakteridir (Cabal vd., 2016). Kanatlı hayvanların doğal bağırsak mikrobiyotasını oluşturmakla birlikte fakültatif patojen (oportünist) özelliği nedeniyle yüksek düzeyleri kolibasillozis'e neden olmaktadır (Glombowsky vd., 2020). Kolibasillozis kanatlı hayvanlarda verimi düşürerek, ölüm oranını ve karkas kusurlarını arttırarak, profilaksi ve tedavi masrafları ile ekonomik kayıplara neden olmaktadır (İbrahim vd., 2019).

Kanatlılarda kolibasillozisin önlenmesi ve bağırsaklarda *E. coli* düzeyinin azaltılması amacıyla sıklıkla antibiyotikler kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2012 yılında üretilen toplam antibiyotiklerin %70'inin (8.9 ton) hayvanlar tarafından tüketildiği, Çin'de ise 2030 yılına kadar üretilen antibiyotiklerin %30'unun hayvanlarda kullanılabileceği bildirilmiştir (Van Boeckel vd., 2015; Piddock, 2016). Kanatlı sektöründeki yoğun antibiyotik kullanımı dikkate alındığında, patojen bakterilerdeki antibiyotik direncinin kaçınılmaz olduğu, ilerleyen zamanlarda antibiyotik tedavilerinin yetersiz kalabileceği ve patojenlerin yayılması sonucu ciddi üretim kayıplarının oluşabileceği düşünülmektedir (Gigante ve Atterbury, 2019). Antibiyotik dirençleri hızla artan *E. coli* suşlarının gıda yoluyla insanlara geçerek çapraz direnç oluşturması mevcut durumu daha da ciddi bir hale getirmektedir (Kutateladze ve Adamia, 2010). Nitekim antibiyotik dirençli bakterilerin insanlarda ve kanatlı hayvanlarda oluşturduğu enfeksiyon vakalarının son yıllarda hızlı bir artış gösterdiği bildirilmiştir (Żbikowska vd., 2020). Benzer şekilde, Dünya Sağlık Örgütü, son yıllarda *E. coli*'nin antibiyotiklere dirençli hale geldiğini ve antibiyotiğe yeni alternatifler bulunması gerektiğini bildirmiştir (Dünya Sağlık Örgütü, 2017). Bu durumlar dikkate alındığında antibiyotiklerin yerine kullanılabilecek probiyotik, prebiyotik, bakteriyofaj, bitkisel ekstraktlar, nanopartiküller ve antimikrobiyal peptitler gibi alternatif ürünlerin geliştirilmesinin sektör için kaçınılmaz bir hale geldiği düşünülmektedir (Żbikowska vd., 2020). Bakteriyofajlar, yapılan bilimsel çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar ve antibiyotiklere karşı sahip olduğu önemli avantajlar nedeniyle kanatlı hayvanlarda antibiyotiğe alternatif olarak düşünülmektedir (Ushanov vd., 2020).

Bakteriyofajlar (fajlar), ilk kez 1896 yılında bakteriyolog Ernest Hankin tarafından tespit edilen ve spesifik olarak bakterileri enfekte eden virüslerdir. Fajlar su, bitkiler ve yiyecekler dahil olmak üzere bakterilerin kolonize olduğu tüm habitatlarda bulunabilirler. Dolayısıyla fajlar, atık sular, insan ve hayvan atıkları, doğal su kaynakları, toprak, bitki örtüsü, gıda kaynakları ve diğer mikroorganizmaları içeren doğal çevreden izole edilebilmektedir (Wernicki vd., 2017). Protein kılıf (kapsid) ile sarılmış genetik materyal (dsDNA, ssDNA veya RNA) içeren bakteriyofajlar bakterilerden 1000 kat daha küçük boyutlara (20 nm ile 200 nm) sahiptir. Bakteriyofajlar, bakteri hücresindeki aktivitelerine göre litik ve lizojenik (ılımlı) fajlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Lizojenik fajlar genetik materyallerini bakteriye aktarmalarını takiben profaj (yavru hücre) halinde kalarak, bakteri çoğaldıkça çoğalan ve lizojenik döngü gösteren fajlardır. Litik fajlar ise bakteriye tutunarak genetik materyalini aktaran, bakteri içerisinde çoğalan ve bakteriyi ortalama 20-60 dakikada lize ederek terk edip, yeni bakterileri enfekte eden fajlardır ki biyokontrol çalışmalarında özellikle bu tip fajlar tercih edilmektedir (Çufaoğlu ve Ayaz, 2018).

Patojen mikroorganizmalarla mücadelede bakteriyofajların en önemli avantajı ve tercih edilme nedeni antibiyotiklerden daha spesifik etki göstermeleridir. Bu sayede, antibiyotikler patojenik bakteriler yanında yararlı bakterileri de öldürerek disbiyoz, immünosupresyon ve dolayısıyla ikincil enfeksiyonlara yol açarken bakteriyofajlar spesifik olarak patojen bakterileri etkilemekte ve ikincil enfeksiyonlara neden olmamaktadırlar (Lin vd., 2017). Bunun yanında, antibiyotiklerin vücut sıvılarındaki konsantrasyonları doz alındıktan sonra çeşitli eliminasyon yollarıyla zamanla azalmaktayken, bakteriyofajlar hızla ve sürekli replike oldukları için hedef bakteri etkisiz hale getirilene kadar çoğalmaya devam etmektedir (Otlı vd., 2016). Fajların ökaryotik hücrelere bağlanmaması ve bu hücrelerde çoğalmaması fajların diğer bir avantajıdır.

Bakteriyofaj terapisi, ilk kez 1919 yılında şiddetli dizanterisi olan bir çocuğun tedavisinde uygulanmıştır (Haq vd., 2012). Günümüzde ise enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve gıdaların paketlenmesinde koruyucu madde olarak insan beslenmesinde kullanılmaktadır (Dalmasso vd., 2014). Yapılan çalışmalarda bakteriyofaj tedavisinin insanlar üzerinde herhangi bir patojenik etkisi bildirilmemiştir. Nitekim bakteriyofajların insan sağlığı için güvenliği olduğu Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kabul edilmiş ve 2006 yılında bazı faj

preparatlarının gıdalarda koruyucu olarak kullanılması onaylanmıştır (Garcia vd., 2008).

Kanatlı hayvanlarda bağırsaktaki *E. coli* sayısının azaltılması amacıyla bakteriyofajların kullanıldığı çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmıştır. Lau vd. (2010) tavuk dışkılarından izole edilen bakteriyofajların *E. coli* ile enfekte edilmiş etlik piliçlere intratrakeal uygulamanın 14. ve 21. gün canlı ağırlığını arttırdığını, ölüm oranını %70'den %13.3'e düşürdüğünü, akciğerlerde *E. coli* sayısını düşürdüğünü (7.20 cfu'dan 5.87 cfu'ya), perihepatitis görülme oranını azalttığını (%66'dan %0'a) bildirmiştir. Benzer şekilde, tavuk dışkılarından izole edilen bakteriyofaj karışımının (kokteyl) *E. coli* ile enfekte edilmiş etlik piliçlerin içme suyuna katılmasının dışkıdaki *E. coli* sayısını düşürdüğü bildirilmiştir (Kittler vd., 2020). Sorour vd. (2020) ise *E. coli* 0119 ile enfekte edilmiş etlik piliçlere oral gavaj ile bakteriyofaj verilmesinin sekum *E. coli* O119 sayısını 1.25 cfu düzeyinde azalttığını bildirmiştir. Benzer şekilde kanatlı işletmelerinin atık sularından izole edilen *E. coli* APEC O78 spesifik bakteriyofajın *E. coli* APEC O78 bulaştırılmış etlik piliçlerin akciğer *E. coli* sayısını düşürdüğü bildirilmiştir (Tawakol vd., 2019).

Kesimhane atık suyundan izole edilen bakteriyofajların (DAF6 ve SPR02) aerosol sprey ile etlik piliçlere verilmesinin kolibasillosis kaynaklı ölüm oranını %53'den %17'ye düşürdüğü (Huff vd., 2003), kas içi (sol but) verilmesinin %48'den %7'ye düşürdüğü (Huff vd., 2006), içme suyuyla verilmesinin ise ölüm oranını %85'den %0'a (Huff vd., 2002), başka bir çalışmada %68'den %15'e, airsakkulitis (hava kesesi yangısı) lezyon görülme sıklığını %35'den 14.6'ya ve lezyon skorunu 1.3'den 0.4'e düşürdüğü bildirilmiştir (Huff vd., 2004). Benzer şekilde, kanalizasyon suyundan izole edilen bakteriyofajın içme suyu ile etlik piliçlere verilmesinin kolibasillosis morbiditesini %100'den %0'a ve ölüm oranını %58'den %0'a düşürdüğü bildirilmiştir (Sajjad vd., 2004).

Bu tez çalışmasında, kolibasillosis şüpheli etlik piliçlerden çoklu antibiyotik dirençli *E. coli* izolasyonu ve izole edilen *E. coli* suşlarına karşı litik etkili bakteriyofajların izole edilmesi ile litik spektrumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli, insan ve hayvanlarda doğal olarak bulunan 2-6 µm uzunluğunda, 1.0-1.5 µm çapında Gram-negatif çubuk şeklinde (basil) bir bakteridir. *E. coli*, genellikle belirli yüzeylere tutunmasını sağlayan fimbrial yapılara sahiptir. Flagella yapısına sahip *E. coli* suşları hareketliken, flagellaları olmayanlar hareketsizdirler. *E. coli*, jeloz besiyerinde tipik yuvarlak, hafif kabarık, düzgün 1–2 mm çapında parlak S tipi koloniler oluşturur. Bazı suşları kanlı agarda β-hemoliz oluşturmaktadır (Özkuyumcu, 2009).

2.1.1. *Escherichia coli*'nin Sebep Olduğu Enfeksiyonlar

Escherichia coli, kanatlı hayvanların sindirim sisteminde doğal olarak bulunan ve yaygın olarak dışkı ile atılan bir bakteridir. *E. coli* suşlarının birçoğu patojenik etki göstermezken bazı patojenik serotipler kanatlı hayvanlarda septisemi, artitis, enterititis, granülom, yumurta sarı kesesi yangısı, salpingitis gibi sendromları içeren kolibasilozis adı verilen enfeksiyona neden olabilmektedir (Yassin vd., 2017). Kümes hayvanlarında kolibasilozise neden olan *E. coli* suşları APEC (avian patojenik *E. coli*) olarak adlandırılmaktadır. Kanatlı işletmelerinde patojenik *E. coli* suşlarının bulaşması daha çok dışkı tozunun solunum yoluyla alınması ve sonrasında tüm vücuda yayılması şeklinde gerçekleşir (Poirel vd., 2018). Kolibasilozis enfeksiyonlarının en belirgin bulgusu şiddetli ishaldir (Elitok ve Bingüler, 2018).

Escherichia coli, kanatlı sindirim sisteminin doğal bir üyesi olmasına karşın yüksek miktarları enfeksiyonun gelişmesine neden olmaktadır. *E. coli* ile ilişkili enfeksiyonlar, her yaştan kümes hayvanlarını etkilemekle birlikte genç yaştaki piliçlerin bağırsak mikroflorasının tam olarak gelişmemesi nedeniyle daha hassas olduğu bilinmektedir (Elitok ve Bingüler, 2018). Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) ve onun Shiga toksini (Stx) üreten alt grubu (STEC), dünya çapında gıda kaynaklı önemli bir patojendir (Nolan vd., 2013).

2.2. Bakteriyofajlar

2.2.1. Bakteriyofaj Araştırmalarının Tarihçesi

Bakteriyofajlar ilk kez 1896 yılında İngiliz bakteriyolog Ernest Hankin tarafından Hindistan'ın Jumna ve Ganges nehri sularında *Vibrio cholerae*'ya karşı

antibakteriyel bir aktivitenin tespiti ile fark edilmiştir. Nikolay Fyodorovich Gamaleya, *Bacillus subtilis* üzerine çalışırken benzer bir olgunun varlığını gözlemlemiştir. Frederick Twort ise 1915 yılında bunun antibakteriyel bir virüs etkinliği olabileceği düşüncesini savunmuştur. D’Herelle, Maisons-Laffitte bölgesinde Fransız askerleri arasındaki ciddi bir dizanteri salgınında hastalardan alınan dışkı örneklerinde tespit ettiği bakteri içermeyen filtratları 1917 yılında “görünmez mikrop” olarak tanımlamış ve fajları 1919 yılında dizanteri tedavisinde kullanmıştır (Haq vd., 2012). D’Herelle ayrıca fajları izole ve karakterize eden ilk kişidir ve tavuklarda *Salmonella Gallinarum*’un neden olduğu tifoya karşı ilk faj tedavisini geliştirmiştir (Atterbury, 2006). D’Herelle, daha sonra Hindistan, Gürcistan, ABD ve Fransa’da faj terapi ve araştırma merkezlerinin kurulmasına öncülük etmiştir. 1930 yılından itibaren ise farklı patojenlere karşı üretilen fajlar ticarileştirilmeye başlanmıştır. Bakteriyofajların elektron mikroskopunda görüntülenmesi ise ilk kez Helmut Rushka tarafından 1940 yılında gerçekleştirilmiştir (Aydoğan ve Hadımlı, 2016).

İkinci Dünya Savaşı sonrası antibiyotiklerin keşfedilmesinin ardından tedavi amaçlı faj kullanımı azalmasına rağmen özellikle eski SSCB (Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği)’de, Gürcistan ve Polonya’daki araştırmalar aynı şekilde devam etmiştir (Sulakvelidze vd., 2001; Abedon vd., 2011). Faj tedavisi 1982 yılında Smith ve Bob Huggins tarafından yeniden canlanmış, Batı’daki çalışmalar, Polonya ve eski SSCB’de yapılan çalışmaların tekrar ele alınmasıyla ivme kazanmıştır (Sulakvelidze vd., 2001; Summers, 2001; O’Flaherty vd., 2009; Aydoğan ve Hadımlı, 2016; Fernandez vd., 2019; Baş, 2020).

2.2.2. Bakteriyofajların Morfolojisi ve Sınıflandırması

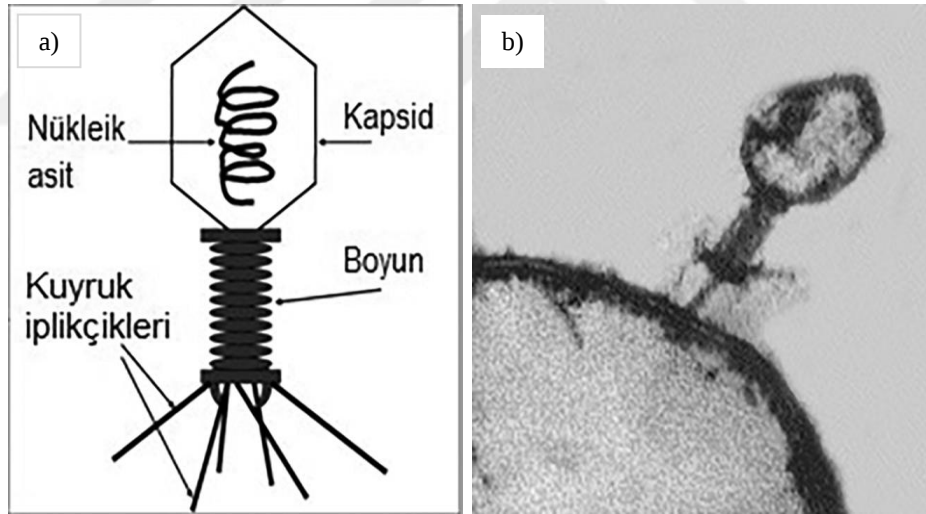
Ökaryotları enfekte eden virüsler gibi fajlarda da büyük bir yapısal ve işlevsel çeşitlilik vardır. Viral bir yapıya sahip olan fajlar, protein bir kılıf ile sarılmış genetik materyalden oluşmaktadır. Bakteriyofajlar DNA yapılarına göre çift zincirli DNA (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) ve RNA içerenler olarak üç gruba ayrılmaktadır. Boyutları yaklaşık 20 nm ile 200 nm arasında değişir ki bu da onları ortalama bir bakteriden (0.5–20 µm) 1000 kat daha küçük yapar (Gazeev, 2018; Żbikowska vd., 2020).

Fajlar, hem fiziksel hem de kimyasal etkilere karşı bakterilerden daha dirençlidir; örneğin, 5 ile 8 arasında değişen pH değerlerine dayanabilirler ve etanol,

fenol, siyanür veya kloroform ile inaktive edilemezler. Ancak kaynatma, asitler, formalin ve UV ışığı fajları inaktive edebilmektedir (Bykov vd., 2003).

Tanımlanmış fajlar genel olarak; morfolojik özellikleri, nükleik asit türü, zarf ya da lipidlerin mevcudiyetine göre 13 familyaya 140'dan fazla türe ve 5300'den fazla faj tipine ayrılmaktadır. Şekil, yapı, nükleik asit ve mikrobiyal konakçı etkileşimi ile ayırt edilebilirler. Fajlar boyut olarak küçük, orta, büyük; şekil olarak ipliksi, küresel; ayrıca baş ve kuyruk bölgelerinin olup olmamasına göre de ayırt edilebilmektedir (Gazeev, 2018). Ayrıca fajlar kapsid yapılarına göre izometrik (çok yüzlü) ve sarmal (spiral) olarak sınıflandırılmaktadır (Wernicki vd., 2017).

Bakteriyofajlar, morfolojik özellikleri bakımından farklılık göstermesine rağmen, %90'ı baş kısmında çift zincirli DNA genomu bulunduran litik fajlardır ve ikozahedral (kübik) simetri göstermektedirler. Faj, bakteri hücresinin yüzeyindeki reseptörlere tutunmada kullanılan, iplikçiklerden oluşmuş bir kuyrukla bağlanır (Şekil 2.1). Kuyruk, hedef bakteri reseptörlerine adsorbe olur ve faj DNA'sı bakteri hücresine aktarılır (Haq vd., 2012).



Şekil 2.1. Bakteriyofajların genel yapısı (a) ve elektron mikroskop görüntüsü (b) (Aydoğan ve Hadımlı, 2016)

Fajlar; *Myoviridae* (uzun, kasılabilen kuyruk), *Siphoviridae* (uzun, esnek, kasılamayan kuyruk), *Podoviridae* (kısa, kasılamayan kuyruk) olmak üzere morfolojik olarak üç temel aileye ayrılmaktadırlar (Parisien vd., 2008).

Fajların bakteri hücrelerinde litik ve lizogenik olarak ifade edilen 2 tür aktivitesi mevcuttur. Litik aktivite virülant fajların bir özelliği iken lizogenik aktivite genetik materyalin latent dönemde hücreye girişi ile ilgilidir. Ancak spontan olarak

güneş ışığına maruz kalma, UV radyasyonu, alkali ajanlar, mitomisin C gibi bazı antibiyotikler ile lizojenite giderilebilir (Weinbauer, 2004; Brüssow, 2005).

Çevre şartları ve bakteri hücre tipine bağlı olarak kronik enfeksiyon, psodolizogenik enfeksiyon ve abortif enfeksiyon gibi birçok farklı enfeksiyon tipleri mevcuttur. Ayrıca siklusların hepsi bakteri hücre ölümü ve faj partiküllerinin replikasyonu ile sonuçlanmaz. Birçok durumda bakteri hücrelerinde lizis uyarılmaksızın virionlar oluşur ve hücre dışına salınmazlar (Weinbauer, 2004; Abedon, 2008; Hagens ve Loessner, 2010).

Fajlar su, bitkiler ve yiyecekler dahil olmak üzere bakteriler tarafından kolonize edilmiş tüm habitatlarda bulunabilirler. Dolayısıyla fajlar, atık sular, insan ve hayvan atıkları, doğal su kaynakları, toprak, bitki örtüsü, gıda kaynakları ve diğer mikroorganizmaları içeren doğal çevreden izole edilebilmektedir (Wernicki vd., 2017). Son araştırmalar da dahil olmak üzere çok sayıda çalışma, fajların muhtemelen bu gezegendeki en eski mikroorganizmalar olduğunu (Brüssow, 2007) ve Dünya üzerinde yaşamı destekleyen tüm ortamlarda en çok bulunan organizmalar olduğunu göstermektedir. Birkaç örnek vermek gerekirse, toprağın her gramında tahmini olarak 1.5×10^8 faj parçacığı bulunur (Ashelford vd., 2003; Williamson vd., 2003). Tatlı su göllerinde (Mohiuddin ve Schellhorn, 2015) ml’inde 7 ila 15×10^6 ve deniz suyunun ml’inde 10^6 ila 10^9 faj partikülü vardır (Bergh vd., 1989). Ayrıca 2017 yılına kadar 25.000’ den fazla bakteriyofaj nükleotid sekansının belirlendiği bilinmektedir (Adriaenssens ve Brister, 2017).

Bakteriyofajların replikasyonu birçok yönüyle ökaryotik virüslere benzerlik göstermektedir. Her ikisi de adsorbsiyon, penetrasyon, nükleik asit replikasyonu, virion oluşumu ve konakçı hücreden salınım aşamalarını içermektedir. Bakteriyofajlar suş spesifik olup hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterilerde güçlü bir bakterisidal aktivite gösterir. Bazı fajlar tek tip bakteri için spesifik affinite gösterirken bazıları ise geniş bir etkinlik yelpazesine sahiptir. Fajların özgüllük ve affinite aralığı bakteri yüzeyinde bulunan reseptörlerin varlığı ile belirlenmektedir (Weinbauer, 2004; Skurnik ve Strauch, 2006; Domingo-Calap vd., 2016). Ayrıca fajlar, çeşitli bakteriler için özgüllüklerine göre monovalent (bir tür bakteriye) ve polivalent fajlar (farklı, iki veya daha fazla bakteriye) olarak klasifiye edilmektedir. Çoğu çalışmada, Gram pozitif bakterileri hedef alan bakteriyofajların Gram negatiflere karşı etkili olmadığı gösterilmiştir (Żbikowska vd., 2020).

2.2.3. Bakteriyofajların Üremeleri

Bakteriyofajlar duyarlı bakteri konaklarında dört evrede enfeksiyon oluştururlar (Arda, 2011).

2.2.3.1. Adsorbsiyon

Bakteriyofajlardan kuyruklu olanlar kuyruklarını kullanarak, kuyruklu olmayanlar ise yüzeyleri aracılığıyla bakteriye bağlanırlar. Bakteri yüzeyindeki pilus, teikoik asit, flagella, lipoprotein, protein ve lipopolisakkarid molekülleri ve hücre duvarının bazı diğerk bileşenleri bakteriyofaj adsorbsiyon bölgeleri olarak bilinmektedir. (Arda, 2011).

2.2.3.2. Penetrasyon

Bakteri hücre duvarından adsorbe olan bakteriyofajlar, enzim ile bakteri hücre duvarını delerek genetik materyallerini bakteri sitoplazmasına aktarırlar. Bazı bakteriyofajlar genom aktarımını içi boş tüp şeklindeki bir organelden bakteri içersine aktararak gerçekleştirirler. Genomun aktarılması için açılan delik bakteri tarafından onarılır. Ancak, bakteriye çok sayıda fajın adsorbe olduğu durumda, hücre materyallerinin açılan deliklerden dışarı çıkması sonucu bakteriyofajlar üreyemeden bakteri lize olur (Arda, 2011).

2.2.3.3. Latent Dönem

Latent dönem, bakteriyofajların bakteri sitoplazmasına genomunu aktarmasından olgun fajların gelişmesine kadar geçen süreyi ifade etmektedir. Bu dönem genellikle çoğalma ve gelişim dönemi olmak üzere ikiye ayrılır.

2.2.3.3.1. Çoğalma

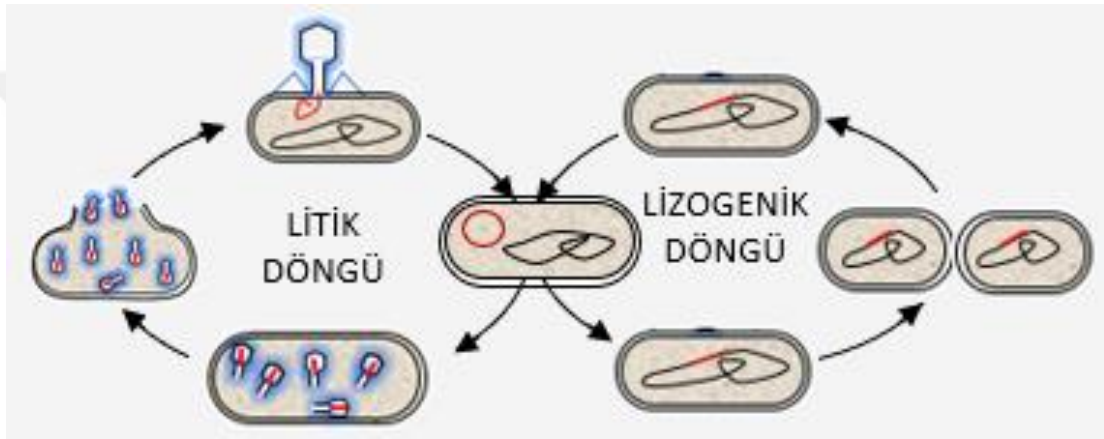
Bu aşamada, bakteriyofajların genetik materyalleri ile kodlanan enzimler bakterilerin protein, RNA ve DNA gibi makromolekül yapılarının sentezini durdurur. Bakteriyofaj kendi genomunu kopyalar ve bakterinin metabolizmasını kullanarak bakteriyofaj enzimlerini ve yapısal bileşenlerini sentezler. Bu dönemde hiçbir olgun faja rastlanmaz (Arda, 2011).

2.2.3.3.2. Olgunlaşma

Bu aşamada, bakterinin metabolizmasıyla sentezlenen bakteriyofaj bileşenleri genetik materyal etrafında birleştirilerek olgun fajlar oluşturulur (Arda, 2011).

2.2.3.4. Lizis ve Dışarı Çıkış

Bakteriyofajların bakteri hücrelerini yıkımlayarak dışarı çıktıkları evredir. Bakteriyofajlar, konakçı bakteride hayat döngüsü sırasında genellikle litik, non-litik ve lizojenik (ılıman) enfeksiyonlara neden olmaktadır (Şekil 2.2). Non-litik enfeksiyonlarda, olgun fajların konak bakteride gelişimi ve hücreyi terk etmesi sonrasında bakteri yaşamına devam eder (Arda, 2011). Litik enfeksiyonlar, konakçı bakteri hücresinin hızlı bir şekilde yıkımına ve ölümüne neden olurken, lizojenik fajlarda, yaşam döngüsünün bir bölümü profaj adı verilen sakin bir dönemde geçer (Hanlon, 2007).



Şekil 2.2. Bakteriyofajlarda litik ve lizojenik yaşam döngüsü (Anonim, 2020)

2.2.3.4.1. Nonlitik Enfeksiyon

Bu tip enfeksiyonlarda bakteriyofajlar bakteri hücrelerinde üremesine ve dışarı çıkmasına karşın, konak bakterinin gelişme ve çoğalmasında herhangi bir değişiklik olmaz. Bakteriyofajlar, konak bakterinin her bölünmesinde çoğalarak bir kopyasını diğer bir bakteri hücreğine aktarmaktadır (Arda, 2011).

2.2.3.4.2. Litik Enfeksiyon

Litik enfeksiyonda bakteriyofajlar konak bakteri ile karşılaştıktan sonra protein, oligosakkarit, teikoik asit, peptidoglikan ve lipopolisakkarit gibi spesifik reseptör bölgeleri aracılığıyla konak bakteri hücreğine bağlanır (Hanlon, 2007). Bazı durumlarda fajın bağlandığı nokta; hücre kapsülü, flagella veya konjugatif pilus olabilir. Bağlanmanın ilk aşamasında adsorpsiyon başarısız olabilir. Buna karşın daha sonra daha güçlü bir bağ kurularak faj genetik materyalini konak hücreye aktarır. Faj genomunun bakteri hücreğine enjeksiyonu faj morfolojisine bağlı olarak

çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir. Faj DNA'sında bulunan bazların birçoğu, hücresel kısıtlama ve nükleaz enzimlerinden etkilenmemek için değiştirilir. Konakçı hücre RNA polimerazı, bakterinin metabolizmasını kontrol altında tutmak için mRNA üreterek, bakterinin metabolik süreçlerini yeni virüs bileşenlerinin üretimine yönlendirir ve faj genomu kopyalanır. Faj bileşenleri daha sonra virion olarak birleştirilir. Konak hücre içerisindeki faj bileşenlerinin oluşturulması ve birleştirilmesi sonrasında üretilen fajların yeni hücrelere erişimi için hücre dışına çıkması gerekmektedir. Neredeyse tüm dsDNA fajları, bakteriyel peptidoglikana yıkımlayan (şeker bağlarını hedef alan) lizozimler, (peptid bağlarını etkileyen) endopeptidaz ve (amid bağlarını hedef alan) amidaz gibi enzimler geliştirmiştir (Fischetti, 2005). Muralitik enzimler veya endolizinler olarak adlandırılan bu litik enzimler, sitoplazmada üretilmektedir. Bu enzimlerin sitoplazmik membranı geçmeleri ve substrata ulaşabilmeleri gerekir. Bu amaçla rol oynayan önemli enzimlerden biri lizinin yıkımlanmasını sağlayan holin'dir (Young vd., 2000; Fischetti, 2005). Holin, hücre yıkımlanmasının zamanlamasını ve üretilen fajların salınımının kontrolünde rol oynamaktadır. İpliksi morfolojiye sahip bazı fajlar ise konakçıyı tahrip etmeden hücre duvarından ekstrüzyon yoluyla konakçı hücreden kaçabilmektedir. Ancak bu fajlar, faj terapisinde dikkate alınmazlar (Hanlon, 2007). Tek bir bakteri hücresinden 100'den fazla yeni faj serbest kalabilmekte ve bunların her biri yeni bir bakteri hücresini enfekte edebilmektedir. Litik enfeksiyon döngülerinin tüm duyarlı bakteri hücreleri ölene kadar devam etme potansiyeli vardır (Hanlon, 2007).

2.2.3.4.3. Lizojenik (İlımlı) Enfeksiyon

İlımlı fajlar, otomatik olarak bir litik döngüye girmeyen, bunun yerine DNA'larını konak hücre DNA'sına entegre eden virüslerdir. İlımlı faj enfeksiyonu sonucu bakteri hücreleri lizojenik olarak adlandırılır. Lizojenik enfeksiyonda faj DNA'sı genellikle konak bakteri DNA'sına entegre edilir ve aynı zamanda bir plazmid olarak da bulunabilir. Konak hücre DNA'sı çoğaltılırken profaj DNA'sı da kopyalanır ve böylece yavru hücreler viral DNA'ya sahip olur. İlımlı fajların konak hücreyi yıkımlayarak dışarı çıkma yeteneği yoktur. Bakteri hücresi birkaç kez bölünmeye maruz bırakılır ve konak hücre kendiliğinden parçalanırsa profajlar çevreye yayılabilir. Alternatif olarak, bir lizojenik hücre popülasyonu mutajenik ajanlarla muamele edilerek veya ultraviyole ışığa maruz bırakılarak yıkımlama teşvik

edilebilir. Bu sayede lizojenik bir faj çevre koşullarının değişmesi veya değiştirilmesiyle litik faza girebilmektedir. Profaj, kendi genlerinin veya yakından ilişkili bakteriyofajların genlerinin transkripsiyonunu bloke eden baskılayıcı protein sentezini kontrol etmektedir. Bu nedenle bir profaj, konak bakteri hücresinde diğer fajların neden olduğu enfeksiyonlara karşı bir tür bağışıklık sağlayabilir (Hanlon, 2007).

2.2.4. Bakteriyofajların Uygulama Alanları

Bakteriyofajlar, başlangıçta alınan tutarsız sonuçlar ve antibiyotiklerin ortaya çıkması nedeniyle göz ardı edilmiştir. Ancak, faj biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve çoklu dirençli bakteriyel patojen prevalansının artması nedeniyle son yıllarda birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır (Nicastro, 2016). Bakteriyofajlar, genel olarak biyokontrol, biyokoruyucu, probiyotik, kaplama materyali, biyodedektör olarak, bağışıklığı geliştirmek ve gen aktarımı amacıyla kullanılabilir (Nicastro, 2016; Karaynir, 2021).

Biyokontrol amacıyla faj kullanımı (Faj terapisi): Bakteriyofajlar bakteriler üzerindeki litik etkileri nedeniyle patojen bakterilerle mücadele amacıyla kullanılabilir. Özellikle *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia trachomatis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Helicobacter pylori* gibi önemli patojenlere karşı litik etkili fajlar araştırılmaktadır.

Biyokoruyucu olarak kullanımı: Bakteriyofajlar, gıda ürünlerindeki mikroorganizma yükünün azaltılması ve/veya gelişiminin engellenmesi ile ürünlerdeki bozulma ve yıkımlama süreçlerinin geciktirilmesi amacıyla kullanılabilir.

Probiyotik olarak faj kullanımı: Bakteriyofajlar, patojen mikroorganizmaların baskılanması bağırsak mikrobiyotasının yararlı bakterilerce zengin olmasının sağlanması noktasında probiyotik olarak kullanılabilir.

Bağışıklığı geliştirmek için faj kullanımı: Bakteriyofajlar, bağışıklık sistemini etkileyerek bağışıklığı artırıcı özellikleri sayesinde bağışıklık uyarıcı olarak kullanılabilir.

Kaplama materyali olarak faj kullanımı: Bakteriyofajlar özellikle tıbbi cihaz yüzeylerinde biyofilm oluşumunu engellemek amacıyla kaplama materyali olarak kullanılmaktadır.

Biyodedektör olarak kullanımı: Bakteriyofajlar, bakteriyel enfeksiyonların

tespitinde ve gıdalardaki bakteriyel yükün belirlenmesinde hızlı sonuçların alınması amacıyla kullanılabilir.

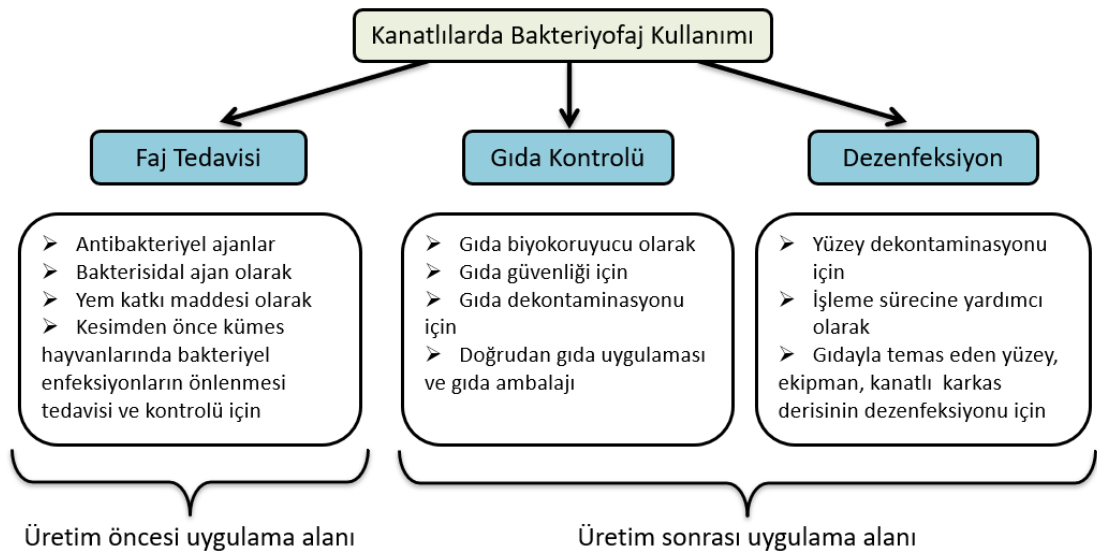
Gen aktarımı amacıyla faj kullanımı: Bakteriyofajlar moleküler biyolojide bakterilere istenilen DNA'nın aktarılmasında ökaryotik viral vektörler yerine protein/gen taşıyıcı olarak kullanılmaktadır.

Faj gösteriminde kullanımı: Bakteriyofajlar, proteinleri kodlayan genetik bilgiler ile proteinleri birbirine bağlamak amacıyla faj gösterimi teknolojisinde kullanılmaktadır.

2.2.5. Kanatlı Hayvanlarda Faj Kullanımı

Son yıllarda, antibiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı ile endüstri ve tarım alanlarında yaygın ve sık kullanımı sonucu çoklu dirençli (MDR) bakterilerin ortaya çıktığı bildirilmiştir. Ayrıca MDR bakterileri hayvanlar ve insanlar arasında doğrudan temas yoluyla da bulaşabilmektedir (Kirbis ve Krizman, 2015; Lin vd., 2017).

Araştırmacılar antibiyotiklerin yerine aşı, probiyotik, prebiyotik, bakteriyofaj, nanopartikül, antimikrobiyal peptid (AMP) gibi virülens önleyici bileşiklerle bakterilere karşı savaşmanın alternatif yollarını aramaya başlamışlardır. Son yıllarda kümes hayvanları ve endüstrisinde bakteriyofajların kullanımına yönelik araştırma ve ilgi artmıştır. Böylece, küresel pazarda bakteriyofaj preparatları geliştiren yeni şirketler ortaya çıkmıştır. Kümes hayvanları yetiştiriciliği, üretimi ve işlenmesinde faj uygulamalarının örnekleri Şekil 2.3'te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Kanatlılarda bakteriyofaj kullanım alanları (Żbikowska vd., 2020)

2.2.5.1. *Escherichia coli* Enfeksiyonlarında Faj Tedavisi

Artan dünya nüfusunun et ihtiyacının karşılanabilmesi için et üretiminde önemli bir artışa ihtiyaç duyulmaktadır. Şu ana kadar bu talebin çoğunluğu ülkemizde özellikle kanatlı, dünya genelinde ise kanatlı ve domuz yetiştiriciliği ile karşılanmıştır. Ancak yaygın yetiştiricilik sistemleri hastalıkların bulaşmasını kolaylaştırmaktadır (Jones vd., 2013).

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), 1961-2016 yılları arasında dünya kanatlı eti üretiminin 9 milyon tondan 120 milyon tona, yumurta üretiminin de 15 milyondan 81 milyon tona ulaştığını bildirmiştir. Güncel FAO verileri dünya kanatlı eti üretiminin 2018'de 123.9 milyon ton olduğunu göstermektedir (FAO, 2019, 2020). Ülkemizde ise 2019 yılı itibarıyla kanatlı eti üretimi 2.1 milyon tona ulaşmıştır (TÜİK, 2019).

Dünyanın birçok bölgesinde antimikrobiyaller; büyümeyi teşvik, hastalıkların önlenmesi ve hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Jones vd., 2013). ABD'de 2012 yılında tıbbi olarak önemli antibiyotiklerin %70'inin (8.9 ton) hayvanlar tarafından tüketildiği, Çin'de de 2030 yılına kadar hayvancılık endüstrisinde antimikrobiyal üretiminin %30 kadarının kullanılacağı bildirilmektedir (Van Boeckel vd., 2015; Piddock, 2016).

Son yıllarda halk sağlığının korunmasına yönelik kanatlı sektörde problem teşkil eden en yaygın zoonozlar olan, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Clostridium spp.* gibi patojenlere karşı ilgi artmıştır. Ayrıca bu patojenlerin birçok antibiyotiğe karşı dirençli olduğu Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından bildirilmektedir (EFSA, 2018, 2019). Antibiyotik dirençliliği, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ve litik bakteriyofaj kullanımı ile kontrol altına alınabilmektedir. Birçok çalışmada bakteriyofajlar, bakteri düzeyinin azaltılması ve zoonotik bakteriyel enfeksiyonların kontrolü için değerlendirilmiştir (Wernicki vd., 2017; Moye vd., 2018).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC) ve EFSA'nın 2019 yılı raporuna göre, kampilobakteriyozun ardından Salmonelloz, Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) enfeksiyonu ve Yersinioz Avrupa Birliği'nde (AB) en sık bildirilen zoonozlardır (EFSA ve ECDC, 2019). Patojenlerin ortadan kaldırılması amacıyla bakteriyofaj kullanımı, özellikle her ekosistemde mevcut olmaları ve karakterize edilen bakteri sayısından 10 kat daha fazla olmaları (10^{31}) nedeniyle oldukça ümit

verici görünmektedir (Brüssow, 2005; Urban-Chmiel vd., 2015). Bakteriyofajlar arasında litik bakteriyofajlar bakteri öldürme yetenekleri sayesinde bakteriyel enfeksiyonların önlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bakteriyofajlar, antibiyotiklerden çok daha spesifiktir. Antibiyotik tedavisinin sadece patojenik bakterileri öldürmekle kalmayıp aynı zamanda normal bağırsak mikrobiyotasını da etkilediği ve potansiyel olarak disbiyoz, immünosupresyon ve dolayısıyla ikincil enfeksiyonlara yol açtığı unutulmamalıdır (Lin vd., 2017). Faj tedavisinin etkinliği, fajların özel reseptörlere spesifitesi sebebiyle tek bir tür, suş ya da serotipe özgül olmasıyla ilgilidir. Bu mekanizma sayesinde kommensal mikroorganizmalarda yıkımlama meydana gelmez. Ayrıca fajların self-replikasyonu da tedavi esnasında uygulama tekrarını önlemektedir. Fajların diğer bir avantajı da ökaryotik hücrelere bağlanmaması ve bu hücrelerde çoğalmamasıdır. Bakteriyofajların toksik özellik göstermemeleri de son derece önemlidir. Dolayısıyla, bakteriyofaj uygulaması, kümes hayvanlarında bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi için mükemmel bir araç olarak görülmektedir.

Escherichia coli'yi enfekte eden bakteriyofajlara kolifaj adı verilir. Kanatlılarda kolibasillozis tedavisine yönelik faj bazlı ticarileşmiş bir ürün henüz bulunmamaktadır. Buna karşın gerçekleştirilen hayvan denemelerinden olumlu sonuçlar alınmıştır. Barrow vd. (1998), çalışmalarında kanalizasyondan elde edilen bakteriyofaj R'nin tavuklarda septisemi ve serebrit veya menenjitin önlenmesinde ve tedavisinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Tavuklar intramüsküler veya intrakranial şekilde *E. coli* ile aşılanırken, faj preparatları kas içi (gastrocnemius kası, sağ but) uygulanmıştır. Her iki yöntemle de enfekte edilmiş ve tedavi edilmemiş 3 haftalık piliçler ile yeni yumurtadan çıkmış civcivlerde %100'e yakın ölüm oranı bildirilmiştir. Öncesinde intrakraniyal olarak *E. coli* ile enfekte edilmiş tavuklarda fajların beyne ulaştığı belirtilmiştir. Fajlar hızla çoğalabilmiş ve bakteri sayısını azaltabilmiştir. Ayrıca, önceki çalışmalar, bakteriyofajın, *E. coli* ile enfekte edilmeden önce veya klinik belirtilerin başlangıcı sırasında preparat uygulandığında bile tavukları koruma yeteneği (1-2 gün) olduğunu göstermişlerdir. Bu durum fajların dokularda uzun süre kalabileceği ve bu sayede kolibasillozis'den korunma ve tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Huff vd. (2009), 7 günlük civcivlerde *E. coli* enfeksiyonu öncesinde bakteriyofajların aerosol uygulanmasının *E. coli*'nin neden olduğu hava kesesi iltihabını önleyebildiğini bildirmişlerdir. Buna karşın *E. coli* bulaştırıldıktan sonra

uygulanan bakteriyofajların aerosol spreyinin etkisiz olduğu gözlenmiştir. Bakteriyofaj tedavisinin etkinliğinin, dolaşımdaki bakteriyofaj titrelerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bakteriyofajların aerosol sprey uygulanması, kas içi uygulama yolu ile karşılaştırıldığında, aerosol uygulama ile kanda düşük bakteriyofaj düzeylerinin olduğu ve çok az sayıda tavukta tespit edildiği bildirilmektedir. Bakteriyofaj uygulanmasının, enrofloksasin tedavisine benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ayrıca, bakteriyofaj ve enrofloksasin kombinasyon halinde kullanıldığında, sinerjik etkilerinin kolibasillosis tedavilerinin etkinliğini artırdığı bildirilmiştir. Bu doğrultuda antibiyotik tedavisinin bakteriyofaj tedavisi ile birleştirilmesinin, bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotik düzeylerini azaltmada önemli olduğu rapor edilmiştir.

Huff vd. (2002), patojenik *E. coli* suşlarına karşı yaptıkları çalışmalar ile mortalitede önemli ölçüde azalmalar elde etmişlerdir. Ayrıca, DAF6 ve SPROZ fajları ile aerosol ve intramuskular uygulamalar yapılmış ve enjeksiyon tarzında uygulama ile daha başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Huff vd., 2003). Ayrıca antibiyotik ile birlikte faj sinerjisinin tek başına faj ve antibiyotik uygulamasından daha başarılı olduğu da bildirilmiştir (Huff vd., 2004).

Enteropatojenik *E. coli*'ye karşı antibiyotik (kloramfenikol) ve oral faj uygulamasının 20 günlük tavuklarda etkinliğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Xie vd., 2005), ikinci haftada, faj uygulanan kanatlılarda ishal görülmezken, antibiyotik uygulananlarda ishal oranı %12,4, (su ile tedavi edilen) kontrol grubunda %25,2 olmuştur. Kontrol grubunun ölüm oranı antibiyotik grubundan 2 kat, faj grubundan 5 kat fazla olarak belirlenmiştir. Yazarlar, faj tedavisinin güvenli olduğunu ve antibiyotik tedavisiyle karşılaştırıldığında hastalığa neden olmadığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca, faj uygulanan tavuklarda ağırlık artışı gözlenmiştir. Faj uygulamasının bağırsak mikrobiyotik homeostazının sürdürülmesi için yararlı bakterileri etkilemeyen yüksek bir özgüllüğe sahip olduğu belirtilmiştir.

Tawakol vd. (2019), bakteriyofaj uygulamasının (intratrakeal aşılama) sadece *E. coli* enfeksiyonunun değil aynı zamanda *E. coli* ve enfeksiyöz bronşit virüsü (IBV) kombinasyonunun neden olduğu hastalığın şiddetini azalttığını bildirmiştir.

2.2.5.2. Gıda Kontaminasyonlarının Azaltılması (Biyokontrol)

Dekontaminasyon, gıda ürünlerindeki mikroorganizmaların uzaklaştırılmasını ve nötralizasyonunu (inaktivasyon) içeren ürünlerin bozulma ve yıkımlama

süreçlerini geciktiren bir işlemdir. İnsan enfeksiyonlarıyla mücadele, esas olarak bakterilerin gıdalardan uzaklaştırılmasıyla mümkündür. Isı pastörizasyonu, yüksek basınç, radyasyon gibi birçok yöntem gıdaların güvenliğini artırmak için kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler taze et ve ürünlerinin dekontaminasyonu için uygun olmadığından kullanımları sınırlıdır. Bu nedenle organik asitlerin kullanılması gibi diğer yöntemler (düşük pH'ları nedeniyle) daha etkilidir. Ancak bakterisidal aktivitenin görülmesi uygun konsantrasyonlarda asitliğin sağlanmasına bağlıdır. Buna karşın asitin yüksek konsantrasyonları da et kalitesini ve görsel özellikleri (doku, renk, oksidatif stabilite, pH, vb.) olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Moye vd., 2018).

Patojenlerin azaltılmasında faj uygulaması temel olarak çiğ etler, tüketime hazır ürünler ve karkasların dekontaminasyonunda uygulanmaktadır (Garcia vd., 2008). Günümüzde gıdaların *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella* ve *E. coli*'ye karşı korunması amacıyla ticarileştirilmiş bazı faj ürünleri bulunmaktadır. Buna karşın gıda dekontaminasyonu için en yeni yöntemler bile standart hijyen ilkelerinin yerini alamamaktadır (Żbikowska vd., 2020).

2.2.5.3. Bakteriyofajların Dezenfektan Olarak Kullanımı

Kanatlı işletmelerindeki bakteri sayısının azaltılmasıyla ilgili çeşitli yaklaşımlar önerilmiştir (yasal düzenlemeler, katı biyogüvenlik stratejileri ve özel koşullar gibi). Kanatlı eti kontaminasyonunun ana kaynağının yetiştirme koşulları olduğu düşünüldüğünde kanatlı etindeki bakteri düzeyinin azaltılmasının çiftlik düzeyindeki uygulamalarla başarılabileceği öngörülmektedir. Buna ek olarak, kanatlı işletmelerinde uygulanan aerosol sprey ve kullanılan altlık materyali de patojenin yatay geçişinin önlenmesinde katkısı olabileceği düşünülen unsurlardır. Bakteriyofajlar kuluçkahanelerde, çiftliklerde, taşıma bölmelerinde, kanatlı işleme ünitelerinde ve gıda ambalajlarında biyosanitizör olarak kullanılabilir. Buna ek olarak, bakteriyofajların biyofilm oluşumunu ve dispersiyonu inhibe etmede etkili olduğu düşünülmektedir (Żbikowska vd., 2020).

Bu tez çalışması, kolibasillosis şüpheli etlik piliçlerden çoklu antibiyotik dirençli *E. coli* izolasyonu ve izole edilen *E. coli* suşlarına karşı litik etkili bakteriyofajların izole edilmesi ile litik spektrumlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çevresel Örnekler

Mevcut çalışmada kolibasilloz şüpheli 42 günlük etlik piliçlerden 14 adet sekum örneği *E. coli* izolasyonu için kullanıldı. Bakteriyofaj izolasyonunda ise etlik piliç sekum içeriklerinin birleştirilmesiyle hazırlanan karışım “pooling” kullanıldı.

3.1.2. Besiyerleri

Çalışmada *E. coli* izolasyonu için MacConkey Agar (100205, Merck), Eosin Methylene Blue (EMB) Agar (103858, Merck), Triple Sugar Iron (TSI) Agar (103915, Merck), Brain Heart Infusion (BHI) Broth (110493, Merck), BHI agar (103870, Merck), Simmons Sitrat Agar (103855, Merck), Üre Agar (108492, Merck) kullanıldı. Bakterilerin antibiyogram testleri için Mueller-Hinton (MH) agar (103872, Merck) ve Brain Heart Infusion (BHI) Broth’dan yararlanıldı.

Bakteriyofaj izolasyonu için Brain Heart Infusion (BHI) Broth, BHI yumuşak agar (%0.7 agar), BHI agar (%1.5 agar), CaCl₂ ile zenginleştirilmiş BHI agar (10 mM CaCl₂), CaCl₂ ile zenginleştirilmiş BHI yumuşak agar (10 mM CaCl₂), CaCl₂ ile zenginleştirilmiş 2 X BHI broth (10 mM CaCl₂) kullanıldı.

3.2. Yöntem

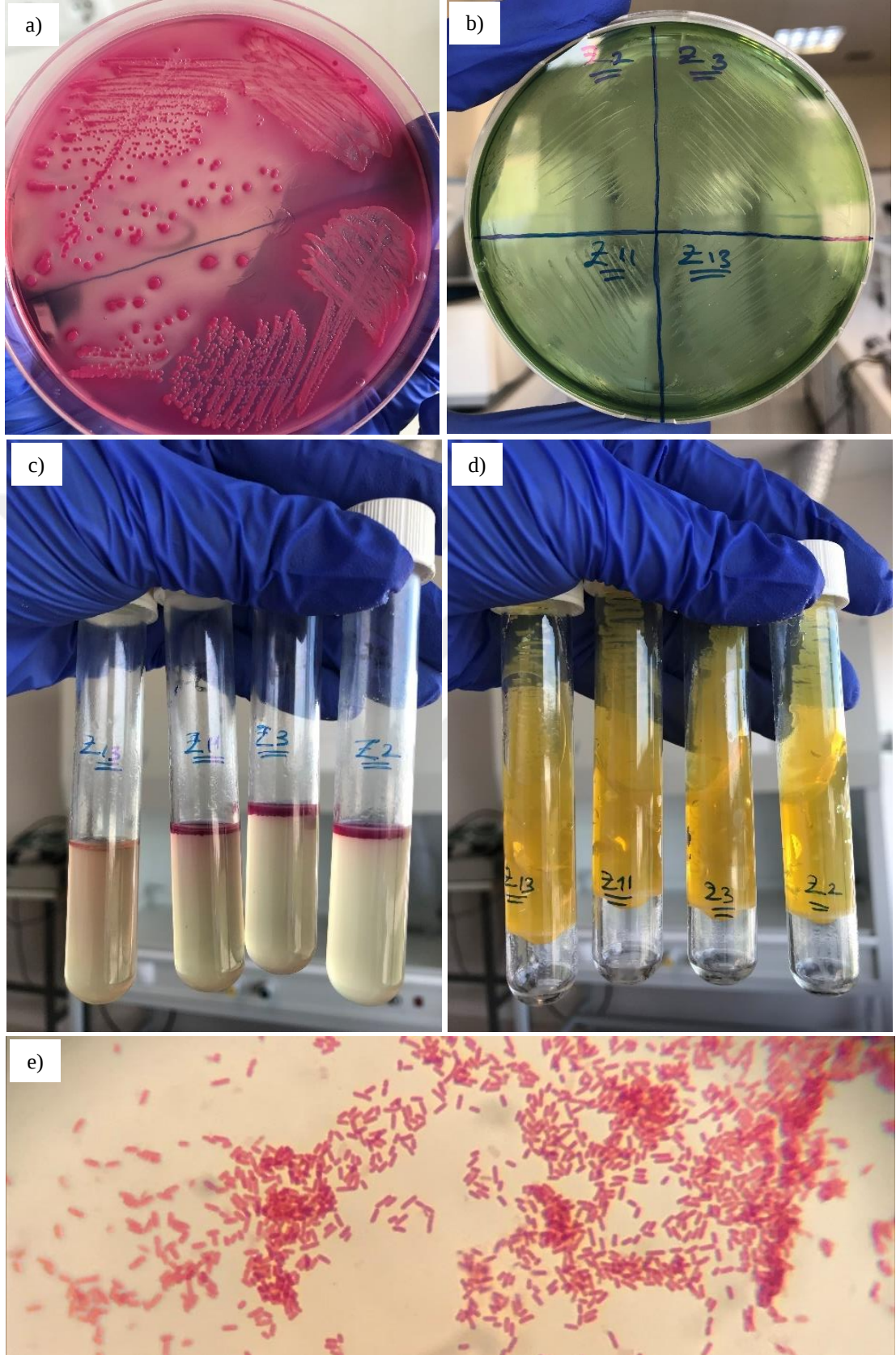
3.2.1. *Escherichia coli* İzolasyonu

Etlik piliç sekum içerikleri 1 gram 9 ml steril fizyolojik tuzlu su (PBS) olacak şekilde seyreltildikten sonra Eosin-Methylene Blue (EMB) agara ekimi yapılarak 37 °C’de aerobik koşullarda 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında laktoz pozitif, metalik parlak yeşil refle veren, 2-3 mm çaplı koloniler *E. coli* şüpheli olarak değerlendirildi ve klasik testler sonucunda Gram negatif, hidrojen sülfid, simmon sitrat, oksidaz ve üreaz testlerinde negatif, üçlü şeker (TSI agar; laktoz-glikoz-sükroz) ve indol testinde pozitif olan koloniler *E. coli* olarak tanımlanarak stok kültüre alındı (Şekil 3.1). Gelişen koloniler steril öze yardımıyla alınarak EMB agar besiyerine tek koloni elde edilecek şekilde ekimi yapıldı. Saflaştırılan bakterilerden bir koloni 5 ml sıvı besiyerine (Brain Heart Infusion (BHI) broth) alınarak bir gece çalkalamalı inkübatörde bırakıldı. Sıvı besiyerinde üreyen bakteriler ikişer adet olacak şekilde steril endorf tüplere alınarak %15 gliserol ilave edildikten sonra bir

örnek -20 °C’de diğeri ise -80 °C’de saklandı.

3.2.2. *Escherichia coli* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Escherichia coli suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre gerçekleştirildi (Cariolato vd., 2008). Brain Heart Infusion (BHI) broth besiyerinde 37 °C’de 24 saat üretilen *E. coli* kültürlerinden 2’şer ml alınarak ependorf tüplere aktararak tüpler 1000 g’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz dökülerek kalan çözelti 1 ml PBS ile yıkandı. PBS ile yıkama işlemi iki kez tekrar edildikten sonra ependorf tüpler 1000 g’de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen *E. coli* hücre süspansiyonlarının yoğunluğu 0.5 McFarland olarak standardize edildikten sonra steril eküvyon çubuğu ile Mueller Hinton (MH) agar besiyerine yayma ekim yöntemiyle inokule edildi. Agar üzerine linkomisin (2 µg), basitrasin (10 µg), amoksisilin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), sülfametoksazol (25 µg), kolistin (10 µg), ampisilin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), gentamisin (10 µg) içeren antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Ankara) yerleştirilerek petriler 37 °C’de 24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında antibiyotik diskleri etrafında oluşan zon çapları ölçülerek. *E. coli* antibiyotik duyarlılık düzeyleri CLSI kılavuzuna göre değerlendirildi.



Şekil 3.1. Sekum örneklerinden *Escherichia coli* izolasyonunda MacConkey agar (a), Simmons Sitrat agar (b), indol testi (c), TSI agar testi (d), Gram boyama (e) görüntüleri

3.2.3. Litik Bakteriyofaj İzolasyonu

3.2.3.1. Litik Bakteriyofaj Süspansiyonlarının Hazırlanması

Bakteriyofaj izolasyonu etlik piliş sekumlarından Yazdi vd. (2020) tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirildi.

1. Sekum içerikleri 1:10 (1 gram örnek, 10 ml besiyeri) oranında 2 X BHI broth ve 10 mM CaCl_2 ile sulandırılarak 250 ml'lik erlenmayerlere konuldu.
2. BHI broth'ta üretilen konak *E. coli* (10^8 cfu/ml; 0.5 McFarland) kültüründen 1 ml erlenmayer içerisine aktarıldı.
3. Bakteriyofaj zenginleştirilmesi için örnekler çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 120 rpm'de 24 saat inkübe edildi.
4. Bakterilerin lize olmasını sağlamak amacıyla her 1 ml içeriğe 100 µl kloform eklendi.
5. Örnekler 30 saniye vorteksle karıştırıldıktan sonra 30 dakika bekletildi.
6. Karışım 10 dakika boyunca +4 °C'de 1000 g'de santrifüj edildi ardından üst faz alınarak steril tüplere aktarıldı.
7. Örnekler önce 0.45 µl'lik, sonrasında 0.22 µl'lik membran filtreden (Millipore Sigma, ABD) geçirilerek filtre edildi.
8. Filtre edilen sıvı faj kaynağı olarak kullanıldı (Süzüntünün bir kısmı steril ependorf tüplere aktararak +4 °C'de saklandı).

3.2.3.2. Litik Bakteriyofaj Tespiti (Spot Test Yöntemi)

Bakteriyofaj içermesi muhtemel filtratlarda bakteriyofaj varlığının tespiti için spot test yöntemi kullanıldı (Karaynir, 2021). Spot test uygulanırken soft agar metodu kullanıldı (Fortier ve Moineau, 2009). Bu yöntem kısaca;

1. Spot test için alt katman ve üst katman olarak kullanılmak üzere iki farklı besiyeri hazırlandı. Öncelikle alt katman olarak, içerisine 15 g/L agar ve 10 mM CaCl_2 yer alacak şekilde BHI besiyerinden alt katman hazırlanarak +4 C'de bekletildi. Sonrasında, küçük plak oluşturan fajların düşük agar konsantrasyonlarında daha kolay görünmesini sağlamak amacıyla üst katman hazırlandı. Bu amaçla 7 g/L agar içerecek şekilde yumuşak agar hazırlanarak 5 ml'lik deney tüplerinde 46-48 °C'de bekletildi.
2. İzole edilen *E. coli* suşlarının BHI broth'da bir gece boyunca 37 °C'de kültürü (10^8 cfu/ml; 0.5 McFarland) hazırlandı.

3. Bakteri kültürlerinden 100 µl alınarak hazırlanan 5 ml yumuşak agara aktarılaraq 30 saniye vorteksle karıştırıldı.
4. Karışım öncesinde alt katmanları hazırlanan petrilere dökülerek yayıldı ve katılaşması için oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi.
5. Yumuşak agar katılaştıktan sonra faj süspansiyonu damlatılacak bölgeler petri üzerine kalemle işaretlendi.
6. Öncesinde filtrasyon ile hazır hale getirilmiş faj süspansiyonlarından 15 µl miktarında petri üzerinde işaretlenen bölgelere damlatıldı.
7. Petriler oda sıcaklığında 1 saat kurutularak gece boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petri üzerinde oluşan plaklar gözlemlendi. Sonrasında plak oluşumu tespit edilen faj süspansiyonlarının saflaştırılması, çoğaltılması, litik spektrumunun belirlenmesi işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.3.3. Bakteriyofajların Saflaştırılması (Tek Plak İzolasyonu)

Bakteriyofaj varlığı tespit edilen örneklerde fajların saflaştırılması soft agar yöntemine göre gerçekleştirildi (Fortier ve Moineau, 2009);

1. Bunun için alt katman ve üst katman olarak kullanılacak besiyerleri “Faj Varlığının Tespiti (Spot Test Yöntemi)” başlığı altında açıklandığı gibi hazırlandı. Alt katmanı dökülüp soğutulan petriler +4 °C’de hazır bekletildi. Üst katman ise 5 ml deney tüplerine aktarıldıktan sonra 46-48 °C’de bekletildi.
2. İzole edilen *E. coli* suşların BHI broth’da bir gece boyunca 37 °C’de kültürü (10^8 cfu/ml; 0.5 McFarland) hazırlandı.
3. Ertesi gün, tek plak elde edebilmek için faj stoklarının 10 kat seri dilüsyonları hazırlandı. Seyreltmede CaCl_2 ile zenginleştirilmiş BHI broth kullanıldı. Seri seyreltme 100 µl’lik faj örneği 900 µl’lik BHI broth çözeltilisine aktarılaraq seyreltmeler 10^{-9} ’a kadar gerçekleştirildi.
4. Gece boyunca kültürü yapılan bakteri kültürlerinden (10^8 cfu/ml; 0.5 McFarland) 100 µl ve faj seyreltmelerinden de 100 µl alınarak yumuşak agara aktarılaraq 30 saniye vorteksle karıştırıldı.
5. Karışım önceden alt katmanları hazırlanmış petrilere dökülerek yayıldı ve ardından katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
6. Petriler ters çevrilerek 37 °C’de 24 saat plaklar görünür hale gelene kadar

inkübasyona bırakıldı.

7. Ertesi gün petrilerde oluşan plaklar kontrol edilerek tek plak izolasyonu için uygun, belirgin plaklı petriler seçilerek faj plaklarının tek düştüğü bölgeden steril pastör pipeti ile kesilip alınarak steril falkon tüpü içerisine aktarıldı.
8. Faj plaklarının aktarıldığı tüplere 10 ml CaCl_2 ile zenginleştirilmiş BHI buyyon ile test edilecek bakteri kültürlerinden 100 μl eklenerek 30 saniye vorteksle karıştırıldı.
9. Karışım, çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 120 rpm'de 24 saat inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrası örnekler 1000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlara seri seyreltme yapılarak tekrar ikili agar kaplama yöntemine tabi tutuldu.
11. Bu saflaştırma işlemleri her petride aynı morfolojiye sahip plak formasyonu görülene kadar (en az 3 kez) sürdürüldü.
12. Saflaştırma işlemi tamamlanan süpernatant 0.45 μl 'lik membran filtreden geçirilerek faj filtratı olarak kullanıldı.
13. Saflaştırılan bakteriyofajlar steril bir tüp içerisine aktarılacak +4 °C ve -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.4. Bakteriyofajların Çoğaltılması

Saflaştırılan bakteriyofajların çoğaltılması Van Twest ve Kropinski (2009)'nin bildirdiği yöntemle göre gerçekleştirildi.

1. Saflaştırma sonrası elde edilen 10 ml'lik faj filtratı, 100 μl konakçı bakteri ve 10 ml 10 mM CaCl_2 ile zenginleştirilmiş 2 X BHI buyyon içeren 250 ml'lik erlenmayere aktarıldı.
2. Faj süspansiyonu içeren erlenmayer çalkalamalı inkübatörde 50 rpm ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.
3. Bakterilerin lize olmasını sağlamak amacıyla her 1 ml içeriğe 100 μl kloform eklendi.
4. İnkübasyon sonrası örnekler 1000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant önce 0.45 μl 'lik, sonrasında 0.22 μl 'lik membran filtreden (Millipore Sigma, ABD) geçirildi ardından %20 kloroform eklenerek -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.5. Bakteriyofaj Sayımı

Faj süspansiyonlarındaki faj konsantrasyonları soft agar yöntemine göre belirlendi (Kropinski vd., 2009);

1. Bunun için alt katman ve üst katman olarak kullanılan besiyerleri “Faj Varlığının Tespiti (Spot Test Yöntemi)” başlığı altında açıklandığı gibi hazırlandı.
2. İzole edilen bakteri suşlarının BHI buyyonda gece boyunca 37 °C’de kültürü hazırlandı (10^8 cfu/ml; 0.5 McFarland).
3. Her bir faj için 10^{-9} dilüsyona kadar hazırlık yapıldı. Dilüsyon için 9 tüp, 900 µl BHI buyyon ile dolduruldu.
4. Her bir faj ve bakteri için 7 petri (6 adet faj seyreltiği ve 1 adet kontrol; fajsız bakteri kültürü) hesaplandı.
5. Faj solüsyonları 10 kat seri seyretlemeye tabi tutularak fajların 10^{-9} ’a kadar dilüsyonları hazırlandı.
6. Gece boyunca kültürü yapılan bakteri kültürlerinden 100 µl ve faj seyreltmelerinden 100 µl alınarak yumuşak agarda 30 saniye vorteksle karıştırıldı.
7. Karışım önceden alt katmanları hazırlanmış petrilere dökülerek yayıldı ardından katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
8. Petriler ters çevrilerek 37 °C’de plaklar görünür hale gelene inkübasyona bırakıldı.
9. Inkübasyon sonrası 30-300 arasında plak oluşturmuş petrillerdeki plaklar sayılarak kaydedildi.
10. Stok solüsyondaki faj konsantrasyonu (pfu/ml); “plak sayısı x 10 x seyreltme oranı” formülüne göre hesaplaması yapıldı.

3.2.6. Bakteriyofajların Litik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Saflaştırılmış ve konsantre edilmiş bakteriyofaj örneklerinin antibiyotik dirençli konak *E. coli* suşları ve diğer klinik *E. coli* suşları üzerine litik aktiviteleri belirlendi. Litik spektrumun belirlenmesinde kullanılmak üzere kolibasillozis şüpheli tavuklardan izole edilmiş 9 klinik *E. coli* suşu temin edildi ve antibiyotik duyarlılık profilleri belirlendi.

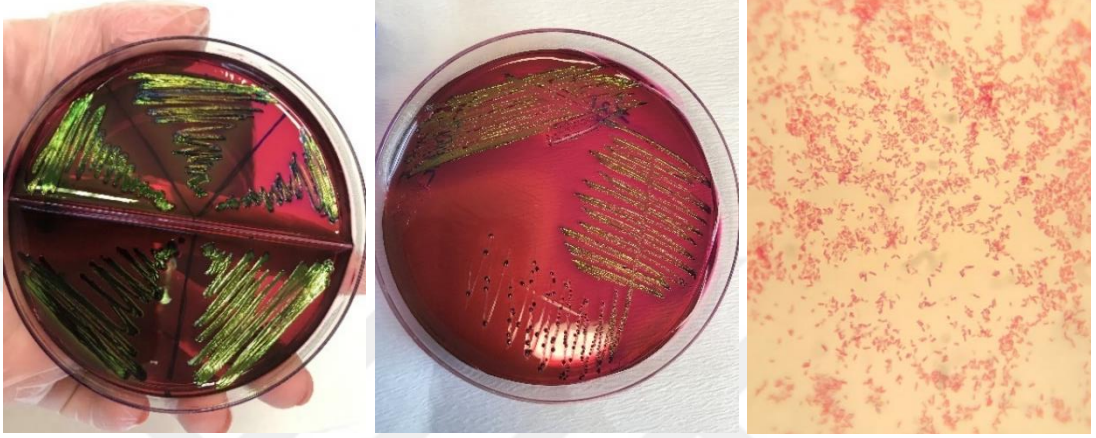
Litik aktivitelerin belirlenmesinde spot test yöntemi kullanıldı. Spot test için soft agar yöntemi kullanıldı (Fortier ve Moineau, 2009);

1. Bunun için bakteri kültürlerinden (10^8 cfu/ml; 0.5 McFarland) 100 µl alınarak 5 ml CaCl_2 ile zenginleştirilmiş yumuşak agara ilave edildi ve vorteksle karıştırıldı.
2. Karışım, öncesinde petrilere dökülerek hazırlanan agara yayıldı ve katılaşması için oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi.
3. Yumuşak agar katılaştıktan sonra faj süspansiyonu damlatılacak bölgeler petri üzerine kalemle işaretlendi.
4. Sonrasında konsantre faj süspansiyonlarından 15 µl alınarak petri üzerinde işaretlenen bölgelere damlatıldı.
5. Petriler oda sıcaklığında 1 saat kurutuldu ve gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı (Bu işlemler her bir bakteriyofaj ve *E. coli* suşu kombinasyonuna uygulandı).
6. İnkübasyon sonrası petri üzerinde oluşan plaklar, söz konusu faja duyarlı (++) , az duyarlı (+) ve dirençli (-) şeklinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. *E. coli* İzolasyonu

Araştırmada kolibasillozis şüpheli 42 günlük etlik piliçlerden 14 sekum örneği toplandı. Sekum örneklerinden 14 *E. coli* suşu izole edilerek 6 tanesi seçilerek bakteriyofaj izolasyonunda konak bakteri olarak kullanıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Etlik piliç sekumlarından *Escherichia coli* izolasyonu

4.2. *E. coli* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

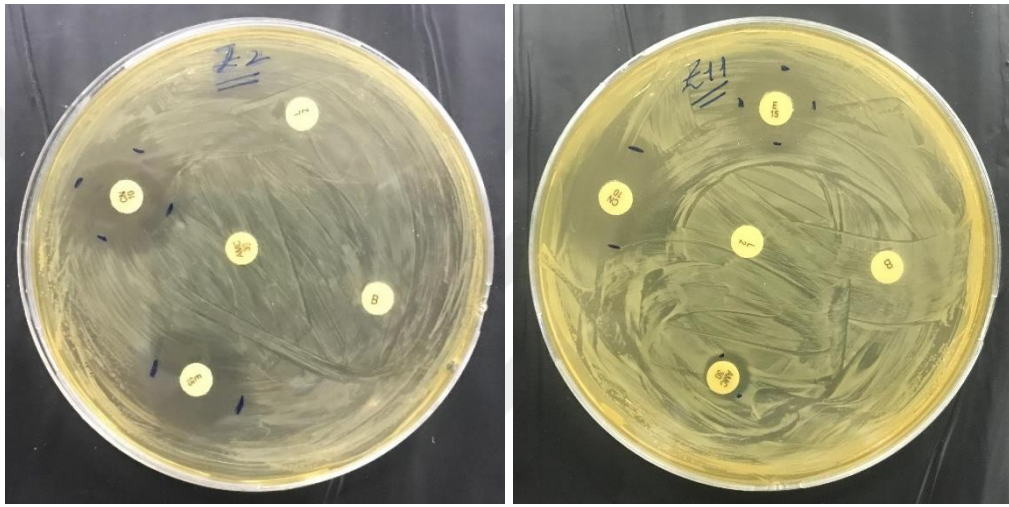
İzole edilen suşlar arasından seçilen 6 *E. coli* suşunun; linkomisin (2 µg), basitrasin (10 µg), amoksisilin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), sulfametoksazol (25 µg), kolistin (10 µg), ampisilin (10 µg), tetrasiklin (30 µg) ve gentamisin (10 µg) antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. İzole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

<i>E. coli</i> suşları	L ₂	B ₁₀	AMC ₃₀	CIP ₅	SXT ₂₅	CT ₁₀	AM ₁₀	TE ₃₀	CN ₁₀
EC1	R	R	R	R	R	R	S	S	S
EC2	R	R	R	R	R	I	S	S	S
EC3	R	R	R	S	S	S	S	S	S
EC4	R	R	R	R	R	I	S	S	S
EC5	R	R	R	R	R	S	R	S	S
EC6	R	R	S	R	S	S	S	S	S

R: dirençli, I: orta duyarlı, S: duyarlı, L₂: linkomisin (2 µg), B₁₀: basitrasin (10 µg), AMC₃₀: amoksisilin (30 µg), CIP₅: siprofloksasin (5 µg), SXT₂₅: sülfametoksazol (25 µg), CT₁₀: kolistin (10 µg), AM₁₀: ampisilin (10 µg), TE₃₀: tetrasiklin (30 µg), CN₁₀: gentamisin (10 µg)

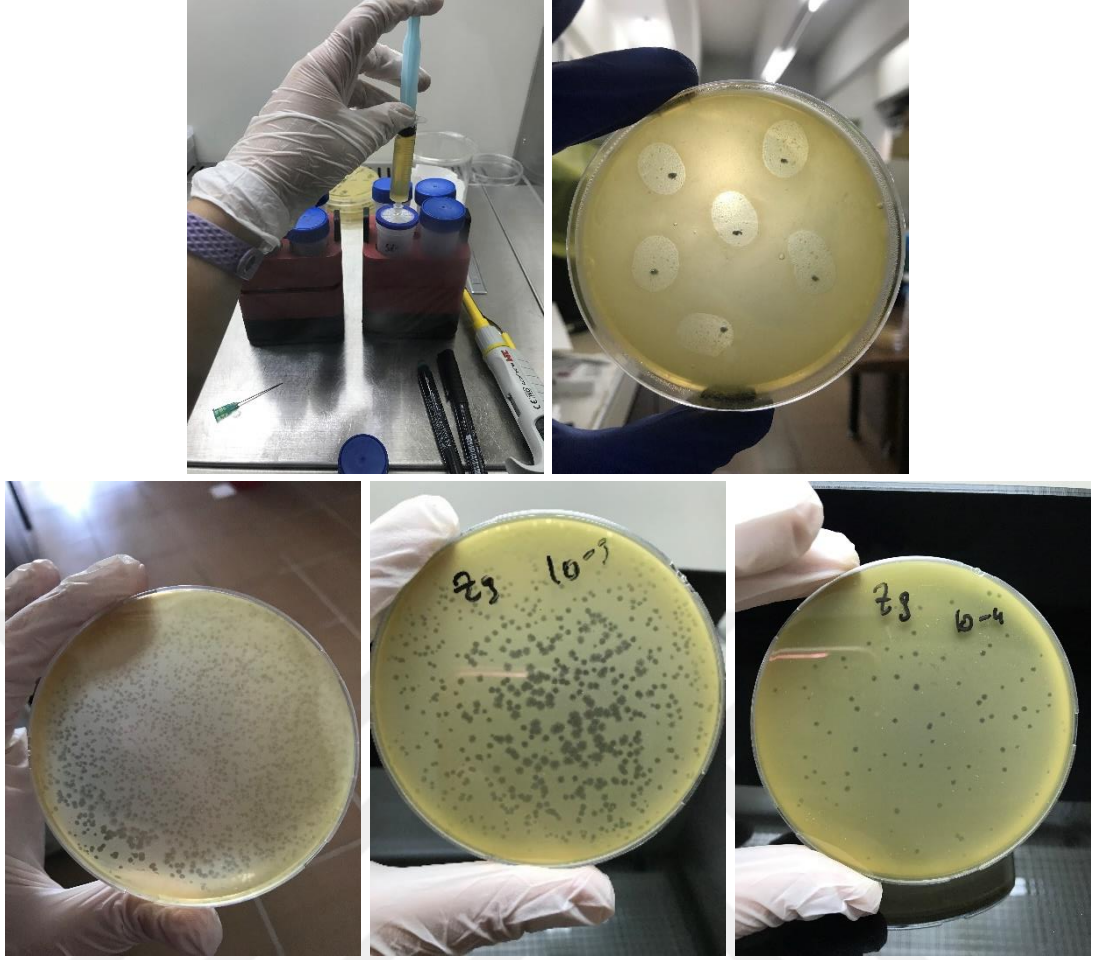
Test edilen *E. coli* suşlarının tamamının en az 3 antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi (Şekil 4.2). Antibiyotik direnç profillerine bakılarak en dirençli bakteri EC1 ve EC5 nolu bakteriler olurken (6 antibiyotiğe dirençli), bunları sırasıyla EC2, EC4 (5 antibiyotiğe dirençli, 1 antibiyotiğe orta duyarlı) ve EC3 ve EC6 (3 antibiyotiğe dirençli) takip etmiştir. Çalışmada *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç oranları (µg/disk) sırasıyla linkomisin (2) %100 (6/6), basitrasin (10) %100 (6/6), amoksisilin (30) %83 (5/6), siprofloksasin (5) %83 (5/6), sulfametoksazol (25) %67 (4/6), kolistin (10) %17 (1/6), ampisilin (10) %17 (1/6) olarak belirlendi. Buna karşın *E. coli* suşlarının tetrasiklin (30) ve gentamisine (10) duyarlı olduğu belirlendi.



Şekil 4.2. *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

4.3. Bakteriyofaj İzolasyonu

İzole edilen *E. coli* suşlarından seçilen 6 suşa (EC1, EC2, EC3, EC4, EC5 ve EC6) karşı bakteriyofaj izolasyonu çalışmaları yapılarak 6 bakteriyofaj süspansiyonundan 4 tanesi (BF1, BF2, BF3 ve BF4, %66.6'sı) spot test yönteminde tespit edildi. Spot test yönteminde tespit edilen 4 faj örneğinin 3 tanesi (BF1, BF2 ve BF4, %75'i) saflaştırıldı. Saflaştırma ile tek tip plak morfolojisi tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Bakteriyofaj izolasyonu

4.4. Bakteriyofaj Titrelerinin Belirlenmesi

İzole edilen ve saflaştırılan bakteriyofaj örneklerinin titreleri soft agar yöntemine göre belirlendi. Bakteriyofaj titreleri ile faj titre artış oranları Tablo 4.2’de gösterilmektedir. İzole edilen bakteriyofajların çoğaltma öncesi titreleri BF1 için 2.04×10^6 , BF2 için 1.53×10^6 ve BF4 için 1.41×10^6 olarak hesaplandı. Çoğaltma sonrası BF1 fajının titresi çoğaltma öncesine göre 213 bin kat artarak 4.36×10^{11} PFU/ml, BF4 fajının titresi 2283 kat artarak 3.22×10^9 PFU/ml ve BF2 fajının titresi 262 kat artarak 4.02×10^8 olarak belirlendi.

Tablo 4.2. Bakteriyofaj titreleri

Bakteriyofajlar	Çoğaltma Öncesi Titre (PFU/ml)	Çoğaltma Sonrası Titre (PFU/ml)	Artış (Kat)
BF1	2.04×10^6	4.36×10^{11}	213725
BF2	1.53×10^6	4.02×10^8	262
BF4	1.41×10^6	3.22×10^9	2283

4.5. Klinik *E. coli* suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Klinik *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç profilleri belirlenerek sonuçlar Tablo 4.3'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yaygın antibiyotik dirençliliği belirlenen suş C20 iken, en az dirençli bulunan suş, test edilen 6 antibiyotiğin 1 tanesine direnç gösteren, 1 tanesine ise orta derecede duyarlı olan PVKE7 ve PVKE16 suşlarıdır.

Tablo 4.3. Klinik *E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

<i>E. coli</i> suşları	L ₂	B ₁₀	AMC ₃₀	CIP ₅	SXT ₂₅	CT ₅₀	AM ₁₀	TE ₃₀	CN ₁₀	FFC ₃₀	E ₁₅	T ₃₀	DO ₃₀	C ₃₀
C3	R	R	R	-	-	S	R	R	S	-	-	R	I	S
C18	R	R	R	-	-	S	R	S	S	-	-	I	S	S
C19	R	R	R	-	-	R	I	S	I	-	R	I	I	S
C20	R	R	R	-	-	R	R	R	R	-	R	R	R	R
C21	R	R	R	-	-	R	R	S	R	-	R	S	S	R
PVKE3	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
PVKE5	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	I	I	S	R
PVKE7	-	-	-	S	S	S	I	S	S	S	R	-	-	-
PVKE16	-	-	-	-	-	S	I	S	S	S	R	-	-	-

R: dirençli, I: orta duyarlı, S: duyarlı, -: test edilmedi, L₂: linkomisin (2 µg), B₁₀: basitrasin (10 µg), AMC₃₀: amoksisilin (30 µg), CIP₅: siprofloksasin (5 µg), SXT₂₅: sülfametoksazol (25 µg), CT₅₀: kolistin (50 µg), AM₁₀: ampisilin (10 µg), TE₃₀: tetrasiklin (30 µg), CN₁₀: gentamisin (10 µg), FFC₃₀: florfenikol (30 µg), E₁₅: eritromisin (15 µg), T₃₀: tetrasiklin (30 µg), DO₃₀: doksisisiklin (30 µg), C₃₀: kloramfenikol (30 µg)

4.6. Bakteriyofajların Antibiyotik Dirençli *E. coli* Suşları Üzerine Etkileri

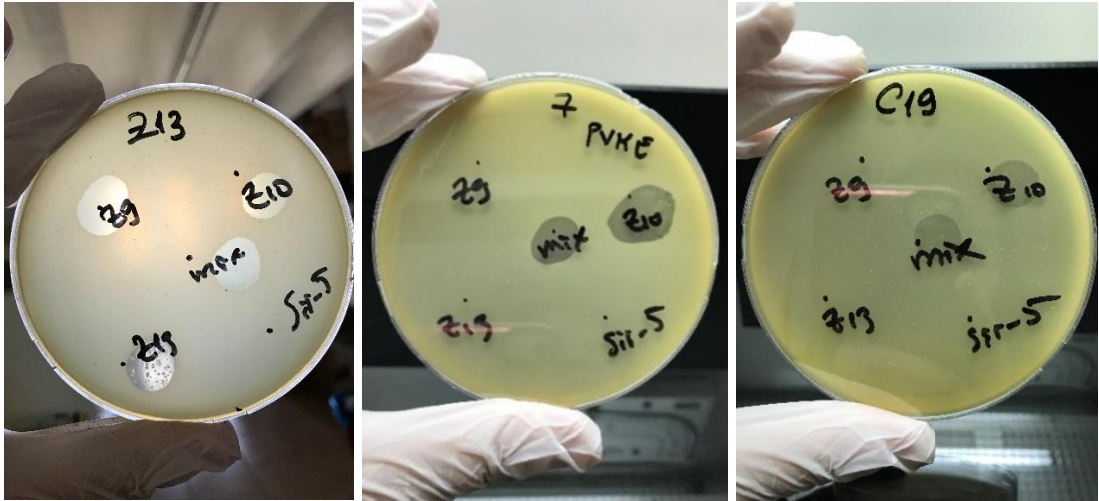
Bakteriyofajların konak *E. coli* suşları ve antibiyotik dirençli klinik *E. coli* suşları üzerine etkileri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Mevcut çalışmada izole edilen fajların tamamı mevcut çalışmada izole edilen konak dışındaki diğer *E. coli* suşlarının ikisine etkili olduğu belirlendi (Şekil 4.4). Bakteriyofajlardan BF1 konak suş harici test edilen 9 klinik *E. coli* suşundan 2 tanesine (*E. coli* C19 ve PVKE7, %22.2) litik etkili olurken diğer fajlar (BF2 ve BF4)'a litik aktivite belirlenmedi.

Tablo 4.4. Bakteriyofajların klinik *E. coli* suşları üzerine etkileri

<i>E. coli</i> suşları	Kaynak	BF1	BF2	BF4	BFK
<i>E. coli</i> (EC1)	Etlik piliç	+	+	+	+
<i>E. coli</i> (EC2)	Etlik piliç	+	+	+	+
<i>E. coli</i> (EC4)	Etlik piliç	+	+	+	+
<i>E. coli</i> C3	Etlik piliç	-	-	-	-
<i>E. coli</i> C18	Etlik piliç	-	-	-	-
<i>E. coli</i> C19	Etlik piliç	+	-	-	+
<i>E. coli</i> C20	Etlik piliç	-	-	-	-
<i>E. coli</i> C21	Etlik piliç	-	-	-	-
<i>E. coli</i> PVKE3	Etlik piliç	-	-	-	-
<i>E. coli</i> PVKE5	Etlik piliç	-	-	-	-
<i>E. coli</i> PVKE7	Etlik piliç	+	-	-	+
<i>E. coli</i> PVKE16	Etlik piliç	-	-	-	-

BF1: EC1 nolu *E. coli* suşuna karşı litik etkili bakteriyofaj, BF2: EC2 nolu *E. coli* suşuna karşı litik etkili bakteriyofaj, BF4: EC4 nolu *E. coli* suşuna karşı litik etkili bakteriyofaj, BFK:BF1, BF2 ve BF4 fajlarının birleştirilmesiyle oluşturulan faj kokteyli



Şekil 4.4. Bakteriyofajların litik spektrumlarının belirlenmesi

5. TARTIŞMA

Escherichia coli, sebep olduğu bağırsak enfeksiyonları (kolibasillozis) nedeniyle kanatlı hayvanlarda verim kayıpları, karkas kusurları ve ölümlere neden olarak ciddi ekonomik zararlara yol açabilmektedir (İbrahim vd., 2019). Son yıllarda antibiyotiklerin kanatlı hayvanların enfeksiyonlarının sağaltımında yoğun şekilde kullanılması ve bazı ülkelerde koruyucu olarak yemlerin bileşiminde yer alması *E. coli* suşlarının antibiyotik direnci geliştirmesine neden olmuştur (Dünya Sağlık Örgütü, 2017). Bu nedenle tedavilerin yetersiz kaldığı durumlarda antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilecek antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç ortaya çıkmaktadır (Żbikowska vd., 2020). Bu sebeple bakteriyofajların kanatlı hayvan enfeksiyonlarıyla mücadelede antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilme potansiyeli ön plana çıkmıştır (Vaiyapuri vd., 2021). Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda çoklu antibiyotik dirençli *E. coli* suşlarına (Khorshibtalab, 2016; Coşkun, 2021; Karaynir, 2021) ve virulent özellikli suşlara (Lukman vd., 2020) karşı litik etkili bakteriyofajlar izole edilmiştir.

Günümüze kadar antibiyotiklere dirençli *E. coli* suşlarına yönelik bakteriyofaj tespiti amaçlı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda farklı hayvan türleri ve dokuları ile çeşitli çevresel örnekler faj izolasyonu amacıyla değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bakteriyofaj kaynağı olarak hayvan dışkısı, bağırsak içeriği, organlar, kesimhane atık suyu, kanalizasyon suyu, akarsu ve toprak incelenmiştir. Bu çalışmalarda Kazibwe vd. (2020), tavuk dışkı ve atık su örneklerinden, Jamalludeen vd. (2009), kanatlı dışkı ve kesimhane atık su örneklerinden, benzer şekilde Karaynir (2021), 6 hayvan dışkısı (tavuk, güvercin, inek, keçi, köpek ve kedi) ve 7 atık su örneğinden, Coşkun (2021) ise altlık, su, kanalizasyon suyu ve buzağı dışkı örneklerinden bakteriyofaj izole ettiklerini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, gübre ve su örneklerinden (Korf vd., 2020), tavuk taşlık, deri ve karaciğerinden (Duc vd., 2020) litik bakteriyofaj izole edildiği bildirilmiştir. Benzer araştırmalarda (Oliveira vd., 2009), kanatlı işletmesi atık su örneklerinden, Kittı vd. (2022) ise tavuk eti örneklerinden ve atık su örneklerinden bakteriyofaj izole edildiğini bildirmiştir.

Benzer şekilde farklı canlı türleri olarak tavuk, koyun, sığır, domuz, insan ve ördek çiftliği kanalizasyon sularından *E. coli* suşlarına karşı litik bakteriyofaj tespiti bildirilmiştir (Chen vd., 2016; Khorshibtalab, 2016; Xu vd., 2016; Wilczyński vd., 2022). Abdelrahman vd. (2022), kanalizasyon suyu örneklerinden çoklu antibiyotik

dirençli *E. coli* suşlarına litik etkili bakteriyofaj izole edildiğini bildirmişlerdir. Maal vd. (2015) akarsu örneklerinden, Ngu vd. (2020) ise tavuk ve etlik piliç çiftliği toprak örneklerinden bakteriyofaj izole edildiğini bildirmiştir. Coşkun (2021), buzağılarda ishale sebep olan *E. coli* suşlarına karşı litik bakteriyofaj izolasyonu hedefli tez çalışmasında, 13 akarsu ve 2 altlık örneği olmak üzere toplam 15 örneğin 7 akarsu örneğinden faj tespit edildiğini (%46.7), altlık örneklerinde ise faj tespit edilemediğini bildirmiştir.

E. coli faj çalışmaları, antibiyotiklere alternatif yaratma düşüncesi ile dirençli, virulent *E. coli* suşlarına etkili fajların belirlenmesi üzerine odaklanmıştır (Fakhouri vd., 2019). Bu çalışmalarda *E. coli* patotipleri (ETEC, EPEC, EIEC, EAEC, EHEC, DAEC) veya çoklu antibiyotik dirençli *E. coli* suşları konak hücre olarak seçilerek faj izolasyonları yapılmıştır. Virulent suşlara yönelik faj çalışmalarında daha çok *E. coli*'nin enteropatojenik (EPEC) ve enterohemorajik (EHEC) patotipleri konak suş olarak seçilmiştir. Konak suş olarak EPEC ve EHEC kullanılan bir çalışmada, EPEC için tavuk bağırsağı, derisi ile sığır akciğeri ve bağırsağından 4 adet, EHEC için ise sığır akciğeri ve bağırsağından 2 adet olmak üzere toplamda 6 adet bakteriyofaj izole edildiği bildirilmiştir (Lukman vd., 2020). Benzer şekilde, 4 adet kanatlı EPEC suşuna yönelik litik etkili bakteriyofaj tespitine yönelik bir çalışmada 1 bakteriyofajın izole edildiği bildirilmiştir (Fakhouri vd., 2019).

Mevcut tez çalışmasında antibiyotik dirençli *E. coli* konak suş seçimi ve bakteriyofaj izolasyonu için etlik piliç sekum örnekleri kullanılmıştır. Toplam 14 *E. coli* suşundan 6 çoklu dirençli suş seçilerek konak suş olarak kullanılmış ve faj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında hazırlanan bakteriyofaj süspansiyonlarından 4 tanesinde spot test yöntemiyle faj tespit edilmiştir. Buna karşın tespit edilen 4 bakteriyofajın 3 tanesi (%75'i) saflaştırılabildiği bildirilmiştir. Benzer şekilde, Kazibwe vd. (2020) kolibasillozisli tavuklardan bakteriyofaj araştırdıkları çalışmalarında 10 litik bakteriyofaj izole edildiğini bildirmiş ancak izole edilen 10 litik bakteriyofajın 7 tanesinin (%70'i) saflaştırılabildiğini belirtmiştir.

Faj izolasyon çalışmalarında faj konsantrasyonları 10^6 - 10^{10} pfu/ml konsantrasyonunda tespit edilmektedir. Yapılan çalışmalarda Karaynir (2021), diyabetik ayak enfeksiyon (DAE) kökenli *E. coli* izolatlarına ve *E. coli* DH10B suşuna karşı atık su ve dışkı örneklerinden 15 bakteriyofaj izole ederek titrelerinin 3×10^6 ile 6×10^9 PFU/ml arasında olduğunu bildirmiştir. Maal vd. (2015) ise kanalizasyon suyundan izole edilen bir *E. coli* suşuna (SBSWF27) ve *E. coli*

PTCC1399 suşuna karşı akarsu örneklerinden izole edilen bakteriyofaj titrelerinin 2.15×10^9 PFU/ml olarak belirlendiğini bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada izole edilen bakteriyofajların titrelerinin 1.41×10^6 ile 2.04×10^6 PFU/ml arasında olduğu tespit edildi. Benzer şekilde Lukman vd. (2020), konak suş olarak enteropatogenik ve enterohemorajik *E. coli* (sırasıyla EPEC ve EHEC) kullandıkları çalışmalarında tavuk bağırsağı, derisi ile sığır akciğeri ve bağırsağından 6 adet bakteriyofaj izole etmişlerdir. Araştırmacılar izole ettikleri bakteriyofajların titrelerinin 2.30×10^9 ile 2.62×10^{10} PFU/ml arasında olduğunu bildirmişlerdir. İlk izolasyon için yüksek oranlarda fajların belirlenmesi faj ve konak suşların aynı ortamdan bulunması ile açıklanabilir. Konak suşlar ile faj örneklerinin farklı çevrelerden olması durumunda inokulumdaki faj sayıları az olabileceğinden yüksek titrede faj izolasyonu güç olabilecektir. Tez çalışmasında 14 sekum örneğinin hepsinden *E. coli* izolasyonu yapılarak 6'sı çoklu dirençli olması sebebiyle faj çalışmalarında kullanıldı. Altı konak suşun 4'üne karşı faj tespit edilmesine rağmen fajlardan biri BF3 saflaştırılamadı. Çalışma sonucu 14 olgudan 3 faj tespiti ortamda test edilen suşlara yönelik fajların bulunduğunu göstermiştir.

Mevcut çalışmada izole edilen bakteriyofajların 9 klinik *E. coli* suşu üzerine BF1 ve üç bakteriyofajın karıştırılmasıyla oluşturulan faj kokteylinin litik spektrumu %22.2 (2 suş) olarak belirlenmiş olup BF2 ve BF4 fajları klinik *E. coli* suşları üzerine litik aktivite göstermemiştir. Çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde, ördek çiftliği kanalizasyon suyundan izole edilen bakteriyofajların kanatlı patojen *E. coli* suşlarına karşı litik spektrumları %26.3 (5/19) olarak, test edilen tüm *E. coli* suşlarına karşı ise %36 (27/75) olarak tespit edilmiştir (Wilczyński vd., 2022). Abdelrahman vd. (2022) ise kanalizasyon suyu örneklerinden izole edilen 3 bakteriyofajın 23 patojen *E. coli* suşlarından aynı 5 tanesine (%21.7) litik etkili olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, tavuk işletmesi ve kesimhanelerinden alınan tavuk dışkısı ve atık suyu örneklerinden izole edilerek saflaştırılan 7 bakteriyofajların 56 *E. coli* suşları üzerine konak spektrumlarının %1.8 ile %17.9 arasında olduğu bildirilmiştir (Kazibwe vd., 2020). Bakteriyofajların konak bakterilerine karşı oldukça spesifik olduğu bildirilmiştir (Naghizadeh vd., 2019). Bakteriyofajların bu suş spesifik özellikleri, konak aralıklarının düşük olmasını açıklayabilmektedir.

Mevcut çalışmada *E. coli* suşları farklı etlik piliç sekum örneklerinden izole edilirken, bakteriyofaj tespitinde sekum örneklerinin birleştirilmesiyle oluşturulan bir karışımdan yararlanılmıştır. Çalışmadaki bakteriyofajların litik spektrum sonuçlarına

bakıldığında, 3 bakteriyofajın her biri konak bakterisiyle birlikte diğer iki bakteriyofajın konak bakterilerine de litik etkili bulunmuştur. Bu durum *E. coli* suşlarının aynı sürünün hayvanlarından izole edilmesinden kaynaklanmış olabilir. Benzer şekilde, kanatlı dışkısı ve kesimhane atık suyu örneklerinden izole edilen 2 bakteriyofajın test edilen 12 *E. coli* suşunun tamamına litik etkili olduğu bildirilmiştir (Jamalludeen vd., 2009). Aynı şekilde, tavuk dışkısı ile atık suyu örneklerinden izole edilen bakteriyofajın test edilen 4 *E. coli* suşunun tamamına karşı litik etkili olduğu bildirilmiştir (Fakhouri vd., 2019).

Antibakteriyel direnç gelişiminin polifaktoriyel temelli olması ve daha çok gelişigüzel antibiyotik uygulamalarına bağlı oluşumu hangi bakterilere ve hangi antibiyotiklere karşı geliştiğinin izlenmesi gerekliliğini göstermektedir. Bu amaçla bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için kullanılan antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi ve dirençli antibiyotikler yerine duyarlı olanların tercih edilmesi gerekmektedir. Antibiyotiklere alternatif sunulduğunda, dirençli suşlara duyarlı olabilen veya bu duyarlılığı sağlamaya yönelik alternatiflerin olması istenir. Fajlar bu amaçla en çok istenen biyolojik ajanlar olmakta ancak spesifitesinin suş odaklı olması hatta suşlar arasında farklılık göstermesi kullanım spektrumunu daraltmaktadır (Naghizadeh vd., 2019). Bu amaçla tez çalışmasında da dirençli bakterilerle mücadele hedefi düşünülerek konak suşlar dirençli bakteri suşlarından oluşturulmuştur. Hem aynı çevreden faj izolasyonunda hem de klinik dirençli suşların test edilmesinde antibiyotik duyarlılık test sonucuna göre dirençli suşlar konak suş ve/veya test suşu olarak kullanılmıştır.

Konak suşların Kirby-Bauer disk difüzyon ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonucunda, direnç oranları sırasıyla linkomisin (2 µg) için %100 (6/6), basitrasin (10 µg) için %100 (6/6), amoksisilin (30 µg) için %83 (5/6), siprofloksasin (5 µg) için %83 (5/6), sülfametoksazol (25 µg) için %67 (4/6), kolistin (10 µg) için %17 (1/6), ampisilin (10 µg) için %17 (1/6) olarak belirlendi. Buna karşın *E. coli* suşlarının tetrasiklin (30 µg) ve gentamisin (10 µg) antibiyotiklerine duyarlı oldukları belirlendi.

Benzer çalışmalarda aynı veya farklı antibiyotik sınıflarına çoklu direnç tespit edilmiştir. Kanatlılarda *E. coli*'nin çoklu antibiyotik direncini ortaya koyan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde Kazibwe vd. (2020), kanatlı orijinli patojenik 56 *E. coli* suşunun sülfametoksazol (%87.5), ampisilin (%80.4), amoksisilin'e (%69.6), çalışmanın sonuçlara zıt şekilde,

tetrasiklin'e (%83.9) dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Korf vd. (2020) ise kanatlı etinden izole edilen 10 *E. coli* suşunun linkomisin, basitrasin ve ampisilin'e %100 dirençli olduğu, buna karşın gentamisin'e %100, tetrasiklin'e %60 oranında duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Buna ek olarak, tavuk ve hindilerde kolibasillosisli organlardan (karaciğer, dalak ve akciğer) izole edilen 148 *E. coli* suşunun %66.5 oranında amoksisilin, %61.6 oranında sülfametoksazol'a ve ayrıca %80-90 oranında tetrasiklin'e dirençli olduğu bildirilmiştir (Oliveira vd., 2009). Çalışmalarda kullanılan *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç profillerindeki farklılıklar, klon farklılığına ve işletmelerde uygulanan koruma-kontrol yöntemlerindeki farklılıklara atfedilebilir.

Kanatlı işletmesi atık suyu örneklerinden izole edilen 5 bakteriyofajın antibiyotik dirençli 148 *E. coli* suşuna konak aralığının %23.7 ile %48.0 arasında değiştiği bildirilmiştir (Oliveira vd., 2009). Bununla birlikte, izole edilen 5 fajdan hazırlanan faj kokteylinin litik aktivitesi %72.5 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, atık su ve dışkı örneklerinden izole edilen 7 bakteriyofaj içerisinde en etkili fajın (KK4), test edilen klinik izolatların %73'üne litik etkili olduğu, buna karşın fajların karıştırılmasıyla oluşturulan faj kokteylinin ise %90 oranında litik etki gösterdiği bildirilmiştir (Karaynir, 2021). Mevcut çalışmada ise BF2 ve BF4 fajları klinik *E. coli* suşları üzerine litik aktivite göstermezken, çalışmada izole edilen fajların birleştirilmesiyle oluşturulan faj kokteylinin litik spektrumu %22.2 olduğu belirlenmiştir.

Mevcut tez çalışmasında konak bakteri suşları farklı etlik piliç sekum örneklerinden izole edilirken, bakteriyofaj tespiti aynı sekum örneklerinin birleştirilmesiyle oluşturulan bir karışımdan yapılmıştır. Çalışmadaki bakteriyofajların litik aktivitelerine bakıldığında, izole edilen 3 bakteriyofajın her biri konak bakterisiyle birlikte diğer iki konak bakteri suşuna da litik etkili bulunmuştur. Bu durum *E. coli* suşlarının diğer etlik piliçlerde de benzer olmasından, ortak suş yapılarına karşı reseptör içermesinden kaynaklanmış olabilir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında kolibasillozis şüpheli etlik piliçlerden antibiyotik dirençli *Escherichia coli* izolasyonu, elde edilen *E. coli* suşlarına karşı litik bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmiş ve tespit edilen bakteriyofajların çeşitli klinik *E. coli* suşlarına karşı litik aktiviteleri belirlenmiştir.

Çalışma sonunda:

1. 14 etlik piliç sekumundan 14 adet *E. coli* izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
2. İzole edilen 14 *E. coli* suşundan seçilen 6 suşun antibiyotik direnç profilleri belirlenerek *E. coli* suşlarının en az 3 antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edilmiştir. Suşların dirençli oldukları antibiyotikler sırasıyla linkomisin (%100), basitrasin (%100), amoksisilin (%83), siprofloksasin (%83), sülfametoksazol (%67), kolistin (%17) ve ampisilin (%17) olarak belirlenmiştir. Buna karşın *E. coli* suşlarının tetrasiklin ve gentamisin antibiyotiklerine duyarlı oldukları tespit edilmiştir.
3. Çoklu antibiyotik dirençli 6 *E. coli* suşuna karşı litik etkili bakteriyofaj izolasyonuna yönelik çalışmalar yapılmış olup spot test yöntemiyle 4 bakteriyofaj tespit edilmiştir.
4. Spot test yöntemiyle belirlenen 4 bakteriyofajın 3 tanesi saflaştırılmıştır.
5. Saflaştırılan bakteriyofajların titreleri çoğaltma öncesinde 1.41×10^6 ile 2.04×10^6 PFU/ml arasında bulunurken, çoğaltma sonrasında 4.02×10^8 ile 4.36×10^{11} PFU/ml arasında titrelere sahip olduğu belirlenmiştir.
6. Bakteriyofajların konak bakteri haricinde 9 klinik *E. coli* suşuna karşı litik aktivitesi belirlenmiş olup BF1 fajının litik spektrumu %22.2 bulunurken, BF2 ve BF4 fajları klinik *E. coli* suşları üzerine litik etki göstermemiştir.

Çalışmanın sonuçları, BF1, BF2 ve BF4 fajlarının çoklu antibiyotik dirençli konak bakteri suşlarına, BF1 fajının ise konak bakteri ve klinik C19 ve PVKE7 *E. coli* suşlarına spesifik olduğunu gösterdi. Bu çalışma, tavukçuluk sektöründe prevalansı yüksek olan *E. coli* suşlarının belirlenerek veya referans suş koleksiyonlarından bu suşların temin edilerek faj izolasyon çalışmalarının sürdürülmesi gerektiği sonucunu göstermiştir. Tüm bu çalışmalar sonucunda bakteriyofaj koleksiyonları oluşturulabilecektir. Daha sonrasında izole edilen bakteriyofajların tanımlanması için elektron mikroskopunda görüntüsünün alınarak familyasının belirlenmesi, genom diziliminin çıkarılarak sınıflandırılması ve olası

toksik genlerin varlığı açısından değerlendirilmesi, konak duyarlılık spektrumlarının daha fazla sayıda klinik *E. coli* suşu ile belirlenmesi, biyolojik aktivite testlerinin (latent periyod, burst size vb.) yapılması, bağırsaklarda bulunan yararlı bakteriler üzerindeki etkileri ile sıcaklık ve pH faktörlerinden etkilenme durumlarının araştırılması gerekmektedir. En nihayetinde, tespit edilen fajlar üzerine yapılacak ayrıntılı analizlerinden olumlu sonuçlar alınması neticesinde çoklu antibiyotik dirençli *E. coli* suşlarına karşı kullanılabilecek bir ürün çıkarılabilmesi mümkün olabilecektir.



KAYNAKLAR

- Abdelrahman, F., Rezk, N., Fayez, M. S., Abdelmoteleb, M., Atteya, R., Elhadidy, M. ve El-Shibiny, A. (2022). Isolation, characterization, and genomic analysis of three novel *E. coli* bacteriophages that effectively infect *E. coli* O18. *Microorganisms*. 10 (3). 589.
- Abedon, S. T. (2008). *Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*: Cambridge University Press.
- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G. ve Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 1 (2). 66-85.
- Adriaenssens, E. ve Brister, J. R. (2017). How to name and classify your phage: an informal guide. *Viruses*. 9 (4). 70.
- Anonim (2020). *Bakteriyofaj nedir*. Erişim: 15.12.2020. <https://bakteriyofaj.nedir.org/>
- Arda, M. (2011). "Bakteriyofajlar (bakteriyel viruslar)". *Temel Mikrobiyoloji*. (s. 182-194). Ankara: Medisan Yayınevi.
- Ashelford, K. E., Day, M. J. ve Fry, J. C. (2003). Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (1). 285-289.
- Atterbury, R. (2006). The age of phage the past, present and future of bacteriophage therapy. *Poultry International*. 45 (5). 18-23.
- Aydoğan, D. Y. ve Hadımlı, H. H. (2016). Bakteriyofaj tedavisi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 27 (1). 38-47.
- Barrow, P., Lovell, M. ve Berchieri, A. (1998). Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5 (3). 294-298.
- Baş, B. (2020). Bakteriyofajlar (bakteri virusları) antibiyotiklere alternatif tedavi. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneđi Bülteni*. 11 (1). 38-43.
- Bergh, O., Borsheim, K. Y., Bratbak, G. ve Haldal, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*. 340 (6233). 467-468.
- Brüssow, H. (2005). Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology*. 151 (7). 2133-2140.
- Brüssow, H. (2007). Bacteria between protists and phages: from antipredation strategies to the evolution of pathogenicity. *Molecular Microbiology*. 65 (3). 583-589.
- Bykov, A., Vorobyov, A., Pashkov, E. ve Rybakov, A. (2003). *Microbiology (2nd edition)*.
- Cabal, A., García-Castillo, M., Cantón, R., Gortázar, C., Domínguez, L. ve Álvarez, J. (2016). Prevalence of *Escherichia coli* virulence genes in patients with diarrhea and a subpopulation of healthy volunteers in Madrid, Spain. *Frontiers in Microbiology*. 7. 641.
- Cariolato, D., Andrighetto, C. ve Lombardi, A. (2008). Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*. 19 (9). 886-892.
- Chen, M., Xu, J., Yao, H., Lu, C. ve Zhang, W. (2016). Isolation, genome sequencing and functional analysis of two T7-like coliphages of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Gene*. 582 (1). 47-58.
- Coşkun, M. R. (2021). *Yeni Dođan Buzağılardan Patojenik Escherichia coli İdentifikasyonu ve Bu Etkenlere Karşı Etkin Bakteriyofaj İzolasyonu*. Doktora Tezi. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 134, Kars.

- Çufaoğlu, G. ve Ayaz, N. D. (2018). "Kanatlı Kesimhane Atık Sularından İzole Edilen *Listeria* Fajların Litik Etki Profillerinin Belirlenmesi". 4. Uluslararası Beyaz Et Kongresi, BESD-BİR, Antalya.
- Dalmaso, M., Hill, C. ve Ross, R. P. (2014). Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends in Microbiology*. 22 (7). 399-405.
- Domingo-Calap, P., Georgel, P. ve Bahram, S. (2016). Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools. *Hla*. 87 (3). 133-140.
- Duc, H. M., Son, H. M., Yi, H. P. S., Sato, J., Ngan, P. H., Masuda, Y., Honjoh, K.-i. ve Miyamoto, T. (2020). Isolation, characterization and application of a polyvalent phage capable of controlling *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in different food matrices. *Food Research International*. 131. 108977.
- Dünya Sağlık Örgütü (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.
- EFSA (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. 16 (12). e05500.
- EFSA ve ECDC (2019). The European Union one health 2018 zoonoses report (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi). *EFSA Journal*. 17 (1-276).
- EFSA (2019). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal*. 17 (2). e05598.
- Elitok, B. ve Bingüler, N. (2018). Kanatlılarda *Escherichia coli* enfeksiyonları. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 11 (1). 34-38.
- Fakhouri, H., Juneidi, O., Al Mohtaseb, H. ve Ishnaiwer, M. (2019). Isolation and characterization of a bacteriophage that hosts on avian-pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *International Journal of Poultry Science*. 18 (5). 223-230.
- FAO (2019). Meat market review. Erişim: 4.12.2020. <http://www.fao.org/3/ca3880en/ca3880en.pdf>
- FAO (2020). Gateway to poultry production and products. Erişim: 4.12.2020. <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/en>
- Fernandez, L., Gutierrez, D., Garcia, P. ve Rodriguez, A. (2019). The perfect bacteriophage for therapeutic applications—A quick guide. *Antibiotics*. 8 (3). 126.
- Fischetti, V. A. (2005). Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*. 13 (10). 491-496.
- Fortier, L.-C. ve Moineau, S. (2009). "Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes". *Bacteriophages*. (s. 203-219). Springer.
- Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J. ve Rodriguez, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*. 47 (6). 479-485.
- Gazeev, S. (2018). Applications of phage therapy in veterinary medicine. *Swedish University of Agricultural Sciences, Biomedical Sciences and Veterinary Public Health*.
- Gigante, A. ve Atterbury, R. J. (2019). Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively-reared livestock. *Virology Journal*. 16 (1). 1-9.
- Glombowsky, P., Campigotto, G., Galli, G. M., Griss, L. G., da Rosa, G., Lopes, M. T., Araújo, D. N., Boiago, M. M. ve Da Silva, A. S. (2020). Experimental infection with *Escherichia coli* in broilers: Impacts of the disease and benefits of preventive

- consumption of a stimulator of homeopathic immunity. *Microbial Pathogenesis*. 149. 104570.
- Hagens, S. ve Loessner, M. J. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 11 (1). 58-68.
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30 (2). 118-128.
- Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S. ve Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal*. 9 (1). 1-8.
- Huff, G., Huff, W., Rath, N. ve Donoghue, A. (2009). Critical evaluation of bacteriophage to prevent and treat colibacillosis in poultry. *Journal of the Arkansas Academy of Science*. 63 (1). 93-98.
- Huff, W., Huff, G., Rath, N., Balog, J., Xie, H., Moore Jr, P. ve Donoghue, A. (2002). Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poultry Science*. 81 (4). 437-441.
- Huff, W., Huff, G., Rath, N., Balog, J. ve Donoghue, A. (2003). Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poultry Science*. 82 (7). 1108-1112.
- Huff, W., Huff, G., Rath, N., Balog, J. ve Donoghue, A. (2004). Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. *Poultry Science*. 83 (12). 1944-1947.
- Huff, W., Huff, G., Rath, N. ve Donoghue, A. (2006). Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. *Poultry Science*. 85 (8). 1373-1377.
- Ibrahim, R. A., Cryer, T. L., Lafi, S. Q., Basha, E.-A., Good, L. ve Tarazi, Y. H. (2019). Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors. *BMC Veterinary Research*. 15 (1). 1-16.
- Jamalludeen, N., She, Y.-M., Lingohr, E. ve Griffiths, M. (2009). Isolation and characterization of virulent bacteriophages against *Escherichia coli* serogroups O1, O2, and O78. *Poultry Science*. 88 (8). 1694-1702.
- Jones, B. A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M. Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J. ve McDermott, J. (2013). Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110 (21). 8399-8404.
- Karaynir, A. (2021). Çevresel Örneklerden *Escherichia coli* DH10B Suşuna Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Klinik *Escherichia coli* Suşlarına Karşı Etkinliklerinin Belirlenmesi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı.
- Kazibwe, G., Katami, P., Alinaitwe, R., Alafi, S., Nanteza, A. ve Nakavuma, J. L. (2020). Bacteriophage activity against and characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from colibacillosis cases in Uganda. *PLoS One*. 15 (12). e0239107.
- Khorshibtalab, M. (2016). Atık Sulardan Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 60, Trabzon.
- Kirbis, A. ve Krizman, M. (2015). Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and vice versa. *Procedia Food Science*. 5. 148-151.

- Kitti, T., Kongfak, S., Leungtongkam, U., Thummeepak, R., Tasanapak, K., Thanwisai, A. ve Sitthisak, S. (2022). Comparative genome analysis of *Escherichia coli* bacteriophages isolated from sewage and chicken meat. *Virus Research*. 315. 198784.
- Kittler, S., Mengden, R., Korf, I. H., Bierbrodt, A., Wittmann, J., Plötz, M., Jung, A., Lehnherr, T., Rohde, C. ve Lehnherr, H. (2020). Impact of bacteriophage-supplemented drinking water on the *E. coli* population in the chicken gut. *Pathogens*. 9 (4). 293.
- Korf, I. H., Kittler, S., Bierbrodt, A., Mengden, R., Rohde, C., Rohde, M., Kroj, A., Lehnherr, T., Fruth, A. ve Flieger, A. (2020). In vitro evaluation of a phage cocktail controlling infections with *Escherichia coli*. *Viruses*. 12 (12). 1470.
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E. ve Johnson, R. P. (2009). "Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay". *Bacteriophages*. (s. 69-76). Springer.
- Kutateladze, M. ve Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*. 28 (12). 591-595.
- Lau, G., Sieo, C., Tan, W., Hair-Bejo, M., Jalila, A. ve Ho, Y. (2010). Efficacy of a bacteriophage isolated from chickens as a therapeutic agent for colibacillosis in broiler chickens. *Poultry Science*. 89 (12). 2589-2596.
- Lin, D. M., Koskella, B. ve Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 8 (3). 162.
- Lukman, C., Yonathan, C., Magdalena, S. ve Waturangi, D. E. (2020). Isolation and characterization of pathogenic *Escherichia coli* bacteriophages from chicken and beef offal. *BMC Research Notes*. 13 (1). 1-7.
- Maal, K. B., Delfan, A. S. ve Salmanizadeh, S. (2015). Isolation and identification of two novel *Escherichia coli* bacteriophages and their application in wastewater treatment and coliform's phage therapy. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8 (3).
- Mohiuddin, M. ve Schellhorn, H. (2015). Spatial and temporal dynamics of virus occurrence in two freshwater lakes captured through metagenomic analysis. *Frontiers in Microbiology*. 6. 960.
- Moye, Z. D., Woolston, J. ve Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses*. 10 (4). 205.
- Naghizadeh, M., Torshizi, M. A. K., Rahimi, S. ve Dalgaard, T. S. (2019). Synergistic effect of phage therapy using a cocktail rather than a single phage in the control of severe colibacillosis in quails. *Poultry Science*. 98 (2). 653-663.
- Ngu, N., Loc, H., Nhan, N., Huan, P., Anh, L. ve Xuan, N. (2020). Isolation and characterization of bacteriophages against *Escherichia coli* isolates from chicken farms. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 8 (2). 161-166.
- Nicastro, J. (2016). "Overview of Bacteriophage Lifecycles and Applications". *Bacteriophage Applications-Historical Perspective and Future Potential*. (s. 1-8). Springer.
- Nolan, L. K., Barnes, H. J., Vaillancourt, J. P., Abdul-Aziz, T. ve Logue, C. M. (2013). "Colibacillosis". *Diseases of Poultry* (13). (s. 751–805). USA: Wiley-Blackwell.
- O'Flaherty, S., Ross, R. P. ve Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 33 (4). 801-819.

- Oliveira, A., Sillankorva, S., Quinta, R., Henriques, A., Sereno, R. ve Azeredo, J. (2009). Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 106 (6). 1919-1927.
- Otlu, B., Yakupoğulları, Y., Bayındır, Y., Engin, D., Gürsoy, N., Gül, M., Acar, C., Tunç, E. ve Kayabaş, Ü. (2016). *Escherichia coli* O157:H7 Suşuna Özgü Potansiyel Litik Bakteriyofaj Araştırılması. *TÜBİTAK Proje Kesin Sonuç Raporu*.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. ve Lan, C. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*. 104 (1). 1-13.
- Piddock, L. J. (2016). Reflecting on the final report of the O'Neill review on antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*. 16 (7). 767-768.
- Poirol, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P. ve Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*. 6 (4).
- Sajjad, M., Rahman, S., Hussain, I. ve Rasool, M. (2004). Application of coliphage lysate: A preliminary trial to treat an experimental *Escherichia coli* infection in broiler chicken. *International Journal of Poultry Science*. 3. 538-542.
- Skurnik, M. ve Strauch, E. (2006). Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*. 296 (1). 5-14.
- Sorour, H. K., Gaber, A. F. ve Hosny, R. A. (2020). Evaluation of the efficiency of using *Salmonella* Kentucky and *Escherichia coli* O119 bacteriophages in the treatment and prevention of salmonellosis and colibacillosis in broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology*. 71 (4). 345-350.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. ve Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (3). 649-659.
- Summers, W. C. (2001). Bacteriophage therapy. *Annual Reviews in Microbiology*. 55 (1). 437-451.
- Tawakol, M. M., Nabil, N. M. ve Samy, A. (2019). Evaluation of bacteriophage efficacy in reducing the impact of single and mixed infections with *Escherichia coli* and infectious bronchitis in chickens. *Infection Ecology & Epidemiology*. 9 (1). 1686822.
- TÜİK (2019, 01.12.2020). Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist>
- Urban-Chmiel, R., Wernicki, A., Stegierska, D., Dec, M., Dudzic, A. ve Puchalski, A. (2015). Isolation and characterization of lytic properties of bacteriophages specific for *M. haemolytica* strains. *Plos One*. 10 (10). e0140140.
- Ushanov, L., Lasareishvili, B., Janashia, I. ve Zautner, A. E. (2020). Application of *Campylobacter jejuni* phages: challenges and perspectives. *Animals*. 10 (2). 279.
- Vaiyapuri, M., Raveendran, K., George, I., Gundubilli, D., Sivam, V., Krishnan, S. G., George, J. C., Mothadaka, M. P., Nagarajara, R. C. ve Badireddy, M. R. (2021). Comparison of single and multi-host enrichment approach for harnessing lytic phages against antimicrobial-resistant *E. coli*: Repurposing the enrichment step. *Biologia*. 76 (3). 1041-1052.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A. ve Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112 (18). 5649-5654.
- Van Twest, R. ve Kropinski, A. M. (2009). "Bacteriophage enrichment from water and soil". *Bacteriophages*. (s. 15-21). Springer.

- Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*. 28 (2). 127-181.
- Wernicki, A., Nowaczek, A. ve Urban-Chmiel, R. (2017). Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virology Journal*. 14 (1). 179.
- Wilczyński, J., Stępień-Pyśniak, D., Wystalska, D. ve Wernicki, A. (2022). Molecular and serological characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli* Isolated from various clinical cases of poultry bolibacillosis in Poland. *Animals*. 12 (9). 1090.
- Williamson, K. E., Wommack, K. E. ve Radosevich, M. (2003). Sampling natural viral communities from soil for culture-independent analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (11). 6628-6633.
- Xie, H., Zhuang, X., Kong, J., Ma, G. ve Zhang, H. (2005). Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 51 (3). 159-163.
- Xu, J., Chen, M., He, L., Zhang, S., Ding, T., Yao, H., Lu, C. ve Zhang, W. (2016). Isolation and characterization of a T4-like phage with a relatively wide host range within *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*. 56 (4). 405-421.
- Yassin, A. K., Gong, J., Kelly, P., Lu, G., Guardabassi, L., Wei, L., Han, X., Qiu, H., Price, S. ve Cheng, D. (2017). Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *Plos One*. 12 (9). e0185326.
- Yazdi, M., Bouzari, M., Ghaemi, E. A. ve Shahin, K. (2020). Isolation, characterization and genomic analysis of a novel bacteriophage VB_EcoS-Golestan infecting multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. *Scientific Reports*. 10 (1). 1-13.
- Young, R., Wang, N. ve Roof, W. D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology*. 8 (3). 120-128.
- Żbikowska, K., Michalczuk, M. ve Dolka, B. (2020). The use of bacteriophages in the poultry industry. *Animals*. 10 (5). 872.

ÖZGEÇMİŞ

Bahar GÜNGÖR, Beylikdüzü Cahit Zarifoğlu Anadolu Lisesi’ni bitirdikten sonra Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden 2017 yılında mezun oldu. 2020 yılında OMÜ LEE Veterinerlik Mikrobiyolojisi Yüksek Lisans programına kaydoldu. Bahar Güngör, orta derecede İngilizce bilmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0001-7338-5878

Yayınlar:

1. Güngör, B. ve Genç, O. (2022). Antimicrobial activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts with different solvents on the six different multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. VI. International Congress on Domestic Animal Breeding Genetics and Husbandry. 3-5 Ekim 2022, Samsun.
2. Güngör B., Özlü Ş., Güngör E., Altop A. ve Erener G. (2022). Effect of liquid state fermentation using *Lactobacillus* spp. on the nutritional composition of the stalk parts of *Agaricus bisporus* in different pH levels. IV. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, 29-31 Ağustos 2022, Edirne.
3. Güngör B., Özlü Ş., Güngör E., Altop A. ve Erener G. (2022). Liquid state fermentation using *Lactobacillus* spp. affect the nutritional composition of the cap parts of *Agaricus bisporus*. IV. Balkan Agricultural Congress, 31 Ağustos-2 Temmuz 2022, Edirne.
4. Güngör B. ve Genç O. (2022). Çoklu antibiyotik dirençli *Escherichia coli* suşlarına spesifik litik bakteriyofaj izolasyonu. XV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Ekim 2022, Şanlıurfa.