



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOK-İLACA-DİRENÇLİ *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii*'ye  
ÖZGÜ BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU ve BU FAJLARIN BİYOFİLME  
ETKİSİ

Yelda İŞLEK

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

Aralık, 2022

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Yelda İŞLEK

*Sevgili aileme ve Saygıdeğer hocama ithaf ediyorum...*



## BÜTÇE DESTEKLERİ

**ÇOK-İLACA-DİRENÇLİ *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii*'ye ÖZGÜ BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU ve BU FAJLARIN BİYOFİLME ETKİSİ**

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim ve öğretim hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca deneyimleri, kıymetli bilgi ve birikimleri ile bana yol gösteren, hoşgörüsünü, yakın ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR'a,

Eğitimim süresince yetişmemde emekleri geçen Anabilim Dalımızın çok değerli. hocaları Sayın Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK'e, Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ'a, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'ye, saygı ve rahmetle andığımız Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye, Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN'a, Prof. Dr. Sevgi ERGİN'e, Doç. Dr. Erdal POLAT'a, Doç. Dr. A. Suat SARIBAŞ'a ve Doç. Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU'ya,

Hayatımın her döneminde sevgilerini, güvenlerini ve desteklerini hissettiğim, her zaman arkamda duran canım annem Helen İŞLEK'e, babam Murad İŞLEK'e, biricik kız kardeşim Mary İŞLEK'e ve sevgili anneannem Leyla BAKİSTANLI'ya,

Her zaman yanımda olan ve tez dönemimde bana yardımcı olan arkadaşlarım Uzm. Dr. Nur HAMZELİ'ye, MSc. Özge AKSU'ya, Dr. Tansu DÜNDAR'a,

Geçirdiğim zor dönemlerde beni asla yalnız bırakmayan, manevi desteklerini esirgemeyen ve sevgilerini hissettiren manevi ablalarım Ferda ŞAKARER KOÇ'a ve Dr. Ayşe CEYLAN KILINÇARSLAN'a, sevgili arkadaşlarım Zeynep OCAKOĞLU'na ve PhD Duygu Tarhan'a, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına, Anabilim Dalımızın güler yüzlü sekreteri Tuba Soysal Mumcu'ya destek ve sevgileri için, teşekkür ederim.

Bu çalışmada herhangi bir kurumdan destek alınmamıştır.

Aralık 2022

Yelda İŞLEK

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|   |      |
|---|------|
| TEZ KABUL VE ONAYI.....                               | ii   |
| BEYAN .....   | iii  |
| BÜTÇE DESTEKLERİ .....                                | v    |
| TEŞEKKÜR.....   | vi   |
| İÇİNDEKİLER.....                                      | vii  |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                   | x    |
| TABLO LİSTESİ.....                                    | xii  |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....                       | xiii |
| ÖZET .....  | xv   |
| ABSTRACT .....  | xvii |
| 1. GİRİŞ.....   | 1    |
| 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE .....                            | 3    |
| 2.1. <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .....             | 3    |
| 2.1.1. Tarihçe.....                                   | 3    |
| 2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri .....               | 4    |
| 2.1.3. Virülans Faktörleri .....                      | 4    |
| 2.1.4. Neden Olduğu Enfeksiyonlar .....               | 6    |
| 2.1.5. Direnç Durumu.....                             | 7    |
| 2.2. <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> .....               | 9    |
| 2.2.1. Tarihçe.....                                   | 9    |
| 2.2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri .....               | 10   |
| 2.2.3. Virülans Faktörleri .....                      | 11   |
| 2.2.4. Neden Olduğu Enfeksiyonlar .....               | 12   |
| 2.2.5. Direnç Durumu.....                             | 13   |
| 2.3. ÜLKEMİZDE ve DÜNYADA ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ ..... | 14   |
| 2.4. BİYOFİLM .....                                   | 16   |
| 2.4.1. Tarihçe.....                                   | 16   |
| 2.4.2. Biyofilm Yapısı .....                          | 17   |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.3. Biyofilm Tanı Yöntemleri.....   | 19        |
| 2.5. BAKTERİYOFAJ.....   | 21        |
| 2.5.1. Tarihçe.....  | 21        |
| 2.5.2. Bakteriyofaj Biyolojisi .....   | 22        |
| 2.5.3. Bakteriyofajların Yapısal Özellikleri .....                                   | 23        |
| 2.5.4. Bakteriyofajların Sınıflandırılması.....                                      | 24        |
| 2.5.5. Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü .....   | 25        |
| 2.5.6. Bakteriyofaj Tedavisi .....   | 26        |
| 2.5.7. Antibiyotik ve Bakteriyofaj Tedavisinin Karşılaştırılması .....               | 28        |
| <b>3. YÖNTEM .....</b>   | <b>29</b> |
| 3.1. KULLANILAN ARAÇ ve GEREÇLER.....  | 29        |
| 3.1.1. Kullanılan Besiyerleri .....  | 30        |
| 3.1.2. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması.....                                   | 30        |
| 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....  | 30        |
| 3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN BAKTERİ SUŞLARININ SEÇİLMESİ.....                          | 31        |
| 3.2.1. Bakteri Suşlarının Saklanması .....   | 31        |
| 3.2.2. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması.....                                       | 31        |
| 3.3. ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU .....                              | 31        |
| 3.3.1. Spot Test Yöntemi ile Faj Etkinliklerinin Belirlenmesi.....                   | 32        |
| 3.3.2. Tek Plak İzolasyonu ile Faj Saflaştırılması.....                              | 32        |
| 3.3.3. Sıralı Bakteriyofaj Dilüsyonu .....   | 33        |
| 3.3.4. Bakteriyofaj Konsantrasyonlarının Hesaplanması.....                           | 33        |
| 3.4. <i>IN VITRO</i> BİYOFİLM TABAKASININ OLUŞTURULMASI.....                         | 33        |
| 3.4.1. Biyofilm Oluşumu İçin Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması.....            | 33        |
| 3.4.2. Biyofilm Oluşumunun Tespiti ve Kristal Viyole ile Boyanması.....              | 33        |
| 3.5. BAKTERİYOFAJLARIN BİYOFİLM ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....       | 34        |
| 3.6. BAKTERİYOFAJLARIN BİYOFİLM ÜZERİNE ERADİKASYON ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....      | 34        |
| 3.6.1. İnhibisyon ve Eradikasyon Oranlarının Hesaplanması .....                      | 35        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>   | <b>36</b> |
| 4.1. SUŞLARIN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI.....  | 36        |
| 4.2. BAKTERİYOFAJ VARLIĞININ ve ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ .....                      | 37        |
| 4.2.1. Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofaj Saflaştırılması ve pob Belirlenmesi..... | 41        |
| 4.3. BİYOFİLM OLUŞUMUNUN TESPİTİ .....   | 43        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                 | <b>53</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>       | <b>61</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                   | <b>62</b> |
| <b>İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI .....</b> | <b>71</b> |
| <b>ETİK KURUL İZİN YAZISI .....</b>     | <b>72</b> |
| <b>KURUM İZİN YAZILARI.....</b>         | <b>73</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                    | <b>74</b> |



## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

|  |    |
|--|----|
| Şekil 2.1: <i>A. baumannii</i> 'nin Chrom Agar (Sol), MacConkey Agardaki (Orta) üremesi ve koloni yapısı (Sağ). (Çalışmamızdan) .....  | 4  |
| Şekil 2.2: <i>K. pneumoniae</i> 'nin Chrom agar (Sol), MacConkey agardaki (Orta) üremesi ve Mukoid koloni yapısı (Sağ). (Çalışmamızdan) .....  | 11 |
| Şekil 2.3: Biyofilm oluşum basamakları [77].....   | 18 |
| Şekil 2.4: Modifiye Christensen yöntemi ile biyofilm oluşumu tespiti (Çalışmamızdan). .....  | 20 |
| Şekil 2.5: Kongo Kırmızı Agar'da biyofilm oluşumu tanımlanması Biyofilm oluşumu pozitif koloniler (solda), Biyofilm oluşumu negatif koloniler (sağda)[84]. .....   | 20 |
| Şekil 2.6: Spektrofotometrik mikropalak yöntemi, kristal viyole boyası ile biyofilm tespiti (Çalışmamızdan).....   | 21 |
| Şekil 2.7: Elektron mikroskopunda bakteriyofaj görüntüsü [91]. .....   | 22 |
| Şekil 2.8: Bakteriyofaj Yapısı [99].....   | 23 |
| Şekil 2.9: Bradley'e göre Bakteriyofaj Sınıflandırması [91].....   | 24 |
| Şekil 2.10: Bakteriyofaj Ailelerinin Genom Yapıları ve Morfolojileri [102]. .....  | 25 |
| Şekil 2.11: Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü [103]. .....   | 26 |
| Şekil 4.1: Çalışmamızda kullanılan atık su örneği. ....  | 38 |
| Şekil 4.2: A; Atık su süspansiyonunun santrifüj edilmeden önceki hali. B; Santrifüj işlemi sonrasındaki sıvı süspansiyon. C; Atık su süspansiyonunun santrifüj işlemi sonrası filtrelenmiş (Sol) ve filtrelenmemiş hali (Sağ). ..... | 38 |
| Şekil 4.3: <i>A. baumannii</i> suşlarına etkili bakteriyofajların saptanması için yapılan spot test sonuçları. ....  | 39 |
| Şekil 4.4: <i>K. pneumoniae</i> suşlarına etkili bakteriyofajların bulunması amacıyla yapılan spot test sonuçları. ....  | 41 |
| Şekil 4.5: Bakteriyofaj plaklarının steril bistüri ile alınması (Sol), Tek plak izolasyonu için hazırlanan süspansiyonun santrifüj sonrası (Sağ).....  | 42 |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 4.6: 96 kuyucuklu plakların inkübasyon sonrası (Sol). Kristal viyole ile boyanması sonrası (Sağ). .....                            | 43 |
| Şekil 4.7: Suşların biyofilm oluşumunun kristal viyole ile boyanması ve Spektrofotometre cihazında OD ölçümü ile değerlendirilmesi ..... | 44 |
| Şekil 4.8: Mikroplakların inkübasyon sonrası (Sol). Kristal viyole yöntemi ile boyanması sonrası (Sağ). .....                            | 47 |



## TABLO LİSTESİ

|   | Sayfa No |
|---|----------|
| Tablo 2.1: Bakteriyofaj Sınıfları ve Nükleik Asit Özellikleri. ....   | 24       |
| Tablo 4.1: <i>Acinetobacter baumannii</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ....   | 36       |
| Tablo 4.2: <i>Klebsiella pneumoniae</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ....   | 37       |
| Tablo 4.3: Bakteriyofajların etki spektrumları .....  | 38       |
| Tablo 4.4: İzole edilen fajların <i>A. baumannii</i> suşlarına litik etkisi.....  | 39       |
| Tablo 4.5: İzole edilen fajların <i>K. pneumoniae</i> suşlarına litik etkisi.....   | 40       |
| Tablo 4.6: <i>A. baumannii</i> suşları için seçilen bakteriyofajlar ve fajların konsantrasyonları. ....   | 42       |
| Tablo 4.7: <i>K. pneumoniae</i> suşlarına seçilen bakteriyofajlar ve bu fajların konsantrasyonları. ....  | 43       |
| Tablo 4.8: Seçilen bakteriyofajların <i>A. baumannii</i> suşlarının biyofilmleri (AB <sup>b</sup> 1 - AB <sup>b</sup> 10) üzerine inhibisyon etkisi.....  | 44       |
| Tablo 4.9: Seçilen bakteriyofajların farklı konsantrasyonlarının <i>A. baumannii</i> suşlarının oluşturduğu biyofilmler (AB <sup>b</sup> 1-AB <sup>b</sup> 10) üzerine eradikasyon etkisi.....    | 45       |
| Tablo 4.10: <i>K. pneumoniae</i> suşları için seçilen bakteriyofajların <i>K. pneumoniae</i> biyofilmleri (KP <sup>b</sup> 1 - KP <sup>b</sup> 10) üzerine inhibisyon etkisi.....                 | 48       |
| Tablo 4.11: İzole edilen ve her bakteri suşu için seçilen fajların farklı konsantrasyonlarının <i>K. pneumoniae</i> biyofilmlerine (KP <sup>b</sup> 1-KP <sup>b</sup> 10) eradikasyon etkisi..... | 49       |
| Tablo 4.12: İzole edilen ve suşlar için seçilen fajların <i>A. baumannii</i> suşlarının oluşturdukları biyofilmlere etki oranları. ....   | 51       |
| Tablo 4.13: <i>K. pneumoniae</i> biyofilmlerine bakteriyofajların etki oranları.....  | 52       |

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

### Simgeler

### Açıklama

|    |                    |
|----|--------------------|
| °C | : Santigrat Derece |
| μ  | : Mikro            |

### Kısaltmalar

### Açıklama

|        |  |
|--------|--|
| μg     | : Mikrogram  |
| μL     | : Mikrolitre   |
| AB     | : <i>Acinetobacter baumannii</i>                                   |
| ABD    | : Amerika Birleşik Devletleri                                      |
| ABF    | : <i>Acinetobacter baumannii</i> Fajı                              |
| CAESAR | : Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Merkezi |
| CDC    | : Amerika Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi                      |
| DNA    | : Deoksiribo Nükleik Asit  |
| DSÖ    | : Dünya Sağlık Örgütü  |
| ECDC   | : Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi                        |
| EPS    | : Hücre Dışı Polimerik Madde                                       |
| EUCAST | : Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Testi Komitesi                     |
| GSBL   | : Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz                                   |
| HKE    | : Hastane Kaynaklı Enfeksiyon                                      |
| KP     | : <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                     |
| KPF    | : <i>Klebsiella pneumoniae</i> Fajı                                |
| KV     | : Kristal Viyole   |
| LPS    | : Lipopolisakkarit   |
| MBEK   | : Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu                      |
| MBİK   | : Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu                       |
| MİK    | : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu                                 |
| ml     | : Mililitre  |
| NIH    | : Ulusal Sağlık Enstitüleri  |
| OD     | : Optik Dansite  |
| PBS    | : Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi                                    |
| pob    | : Plak Oluşturan Birim   |

|            |                                   |
|------------|-----------------------------------|
| <b>RNA</b> | : Ribo Nükleik Asit               |
| <b>TEM</b> | : Transmisyon Elektron Mikroskoku |
| <b>TSA</b> | : Tryptic Soy Agar                |
| <b>TSB</b> | : Tryptic Soy Broth               |
| <b>YBÜ</b> | : Yoğun Bakım Ünitesi             |



## ÖZET

### [YÜKSEK LİSANS TEZİ]

#### [ÇOK-İLACA-DİRENÇLİ *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii*'ye ÖZGÜ BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU ve BU FAJLARIN BİYOFİLME ETKİSİ]

[Yelda İŞLEK]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

[Danışman : Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR ]

*Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae*, yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarda rol oynayan önemli patojenlerdir. Bu patojenlerin, zorlu çevresel koşullarda uzun süre hayatta kalabilmeleri, kullanımda olan neredeyse tüm antimikrobiklere karşı gelişen direncin hızla artması ve biyofilm oluşturabilme yetenekleri nedeniyle tedavileri güçtür. Biyofilm içerisindeki bakteriler, dezenfektan ve antimikrobiklere daha dirençli hale gelirler. Bu nedenle bu bakterilerin biyofilmlerini ortadan kaldırmak çok daha güç hale gelmektedir. Bakteriyofajlar, dirençli mikroorganizmaları ortadan kaldırabilme yetenekleriyle, biyofilmlere karşı umut vadeden seçenek olarak öne çıkmaktadır. Çalışmamızda, çok-ilaca-dirençli *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* suşlarına etkili bakteriyofajların atık sulardan izole edilmesi ve bu fajların biyofilm oluşumuna inhibisyon ve eradikasyon etkinliklerinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır.

Bu kapsamda, İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na yoğun bakım ve servislerden gelen kan kültürü örneklerinden izole edilen çok-ilaca-dirençli 10 *A.baumannii* ve 10 *K.pneumoniae* suşu çalışmaya dahil edilmiş ve bu suşlara özgü bakteriyofajlar atık su örneklerinden izole edilmiştir. Bakterilerin, 96 kuyucuklu plaklarda *in vitro* biyofilmleri oluşturulmuş ve bakteriyofajların farklı konsantrasyonlarda bu biyofilmler üzerine etkileri kristal viyole yöntemiyle tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, atık sulardan 12 farklı *A.baumannii* fajı(ABF) izole ve 12 farklı *K.pneumoniae* fajı(KPF) izole edildi. En etkili seçilen toplam 5 ABF'nin, *A.baumannii* biyofilmlerine, en yüksek %96-83,8; en düşük %66,9-41,4 oranlarında inhibisyon, en yüksek %95,4-80,4; en

düşük %70,5-28,3 oranlarında eradikasyon etkisi saptandı. Ayrıca en etkili seçilen toplam 3 KPF'nin, *K.pneumoniae* suşu biyofilmlerine, en yüksek %87,4-79,2; en düşük %61,1-38,5 oranlarında inhibisyon etkisi, en yüksek %94,4-80,1; en düşük %73-46,8 oranlarında eradikasyon gösterdi.

ABF2 fajı kolistin dirençli *A.baumannii* biyofilmlerini %94-88,3 oranlarında inhibe; %94,5-80,4 oranlarında eradike etti. KPF6, KPF9, KPF10 kolistin dirençli *K.pneumoniae* biyofilmlerini %87,4-83 oranlarında inhibe %94,4-86 oranlarında eradike etti.

Bu sonuçlar, bakteriyofajların test edilen en düşük konsantrasyonda bile, çok-ilaca-dirençli *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* suşlarının oluşturdukları biyofilmi inhibe ve eradike etme güçlerinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Bakteriyofajların, tedavi alternatifi olarak kullanımları üzerine geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. |

Aralık 2022 , |95| sayfa.

**Anahtar kelimeler:** |Bakteriyofaj, Biyofilm, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, Çok-İlaca-Direnç |

## ABSTRACT

[M.Sc. THESIS]

[SPECIFIC BACTERIOPHAGE ISOLATION TO MULTI-DRUG-RESISTANT  
*Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* and EFFECT OF THIS PHAGES  
ON BIOFILM ]

[Yelda İŞLEK]

İstanbul University-Cerrahpaşa  
Institute of Graduate Studies  
Department of Medical Microbiology  
Microbiology Programme

[Supervisor : Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR ]

*Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* are pathogens that play a significant role in healthcare-associated infections. Treatment is challenging wherefore long-term survival in harsh environment, fast becoming resistant to almost all antimicrobials in use, and the ability to form biofilms. Since bacteria in the biofilm are more resistant to disinfectants and antimicrobials, it is much more difficult to remove the biofilms of these bacteria. Bacteriophages stand out as a new treatment option against biofilm producing resistant bacteria. In our study, it was aimed to investigate *in vitro* biofilm formation inhibition and eradication activities of bacteriophages effective against multi-drug-resistant *A. baumannii* and *K. pneumoniae* strains.

Thus, 10 of each multi-drug-resistant *A.baumannii* and *K.pneumoniae* strains isolated from blood cultures of intensive care and service patients, were included in the study and bacteriophages specific to these strains were isolated from wastewater samples. Biofilms of bacteria were formed in 96-well plates *in vitro* and the effects of bacteriophages at different concentrations on these biofilms were determined by crystal violet method.

In our study, 12 of each *A.baumannii* phages(ABF) and *K.pneumoniae* phages(KPF) were isolated from wastewater and selected 5 most effective ABFs. Inhibition rates were maximum 96%-83.8%; minimum 66.9%-41.4% and eradication rates were maximum 95.4%-80.4%; minimum 70.5%-28.3%. In addition, 3 KPFs selected the most effective. Inhibition rates of

*K.pneumoniae* biofilms were maximum 87.4%-79.2%; minimum 61.1%-38.5% and eradication rates were maximum 94.4%-80.1%; minimum 73%-46.8%.

ABF2 inhibited biofilms of colistin-resistant *A.baumannii* strains by 94%-88.3% and eradicated by 94.5%-80.4%. KPF6,KPF9,KPF10 inhibited biofilms of colistin-resistant *K.pneumoniae* strains by 87.4%-83% and eradicated by 94.4%-86%.

These results show that, even at the lowest concentration tested, bacteriophages have a very high ability to inhibit and eradicate the biofilm formed by multi-drug-resistant *A. baumannii* and *K.pneumoniae* strains. However, the use of bacteriophages as therapeutic alternatives require further study. |

December 2022, |95| pages.

**Keywords:** |Bacteriophage, Biofilm, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, Multi-Drug-Resistance|

## 1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2017 yılında yayınlamış olduğu 'öncelikli patojenler' listesinde, yüksek düzeyde antibiyotik direnci bulunan ve aynı zamanda tedavilere cevap vermeme özelliği olan 6 patojen bakteri vardır. Bunlar ilk defa Rice tarafından, kısaca ESKAPE olarak adlandırılmıştır ve bu bakteriler; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter spp.* 'dir [1][2]. Hastane enfeksiyonlarında önemli rol oynayan bu patojenler, özellikle yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastaların %40'tan fazlasını enfekte etmektedir [3].

*Moraxellaceae* ailesinden olan *Acinetobacter baumannii* zorunlu aerobik, kokobasil şeklinde, hareketsiz bir Gram-negatif bakteridir. *Enterobacteriaceae* ailesinden olan *Klebsiella pneumoniae* ise kapsüllü, basil şeklinde hareketsiz bir Gram negatif bakteridir. *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olan patojenlerdendir ve mortaliteleri yüksektir. Patojenlerin antibiyotik direncinin hızla artması dünya çapında bir sorun haline gelmiştir [4]. Ülkemizde de çok-ilaca-direnci bulunan Gram negatif patojenler ile oluşan enfeksiyonların yüksek maddi kayıplara da yol açtığını bildirmektedir. Ayrıca en sık izole edilen ve çok-ilaca-dirençli patojenler arasında *Acinetobacter* ve *Klebsiella* türleri gelmektedir [5].

Hastanemizde 2006 ile 2007 yılları arasında yapılan kan kültürlerinden en sık izole edilen patojenleri araştıran çalışmada, %18,8 oranla *Klebsiella* cinsi ikinci; %15,5 oranla ise *Acinetobacter* cinsi dördüncü sırada tespit edilmiştir [6]. 2011 ile 2014 yıllarını kapsayan diğer bir çalışmada ise servislerde ve yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastaların kan kültürlerinden Gram negatif bakterilerde sıklıkla *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* ve *Acinetobacter spp.* izole edildiğini bildirilmiştir. Ayrıca *Klebsiella* ve *Acinetobacter* cinslerinin çok-ilaca-dirençli bakteriler olduklarını belirtilmiştir [7].

Direnç sorununun en önemli nedenlerinden biri de mikroorganizmaların biyofilm oluşturabilmesidir. Ulusal Sağlık Enstitüleri(National Institutes of Health-NIH)'nin bilgilerine göre tüm mikrobiyal enfeksiyonların %65'i, kronik enfeksiyonların ise %80'i biyofilm oluşumu ile bağlantılıdır [8]. Biyofilm, mikroorganizmaların kendilerini çevresel faktörlerden,

antibiyotik ve dezenfektanların etkisinden, besin yokluğundan koruyabilmek amacıyla oluşturdukları ekosistemlerdir. Bu oluşum, antimikrobiyallerin penetrasyonunu azaltarak ve bakterilerin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını önleyerek tedaviyi zorlaştırır [9]. Biyofilm içerisindeki bakteriler ile serbest planktonik formları kıyaslandığında; antimikrobiyallere 10 ile 1000 kat arasında daha dirençli oldukları bilinmektedir. Tek başına antibiyotiklerin, biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde yetersiz olduğu, klinik gözlemler ve deneysel çalışmalarca ortaya konmuştur [10]. Halihazırda kullanımda olan antimikrobiyallere direnç gelişimine ek olarak bu dirençli suşların biyofilm oluşturması tedaviyi çok daha zorlaştırmaktadır. Bu nedenle biyofilm oluşturan bakterilere etkili yeni tedavi alternatiflerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Hedef bakteriyi enfekte ederek yok eden virüsler bakteriyofaj olarak adlandırılmaktadır ve özellikle son zamanlarda üzerinde çalışılan, çok-ilaca-dirençli bakteriler ile oluşan enfeksiyonlarda umut vadeden tedavi alternatiflerindedir. Bakteriler üzerinde litik etkisi olduğu bilinen fajların biyofilm inhibisyonu ve eradikasyonu mekanizması ile de tedaviye katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [11].

Çalışmamızda bakteriyofajların, çok-ilaca-dirençli bakterilerin biyofilminin üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, artan antimikrobiyal direnci ile insan sağlığına tehdidi her geçen gün artmakta olan ESKAPE grubu bakterilerden, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* suşları çalışmamıza dahil edilmiştir. Bu etkenlerin enfeksiyonlarına karşı, alternatif bir tedavi olabileceği düşünülen bakteriyofajlar atık su örneklerinden izole edilerek, bu bakterilerin biyofilmlerine olan etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, çok-ilaca-dirençli ve biyofilm oluşturan 10 *A. baumannii* ve 10 *K. pneumoniae* suşlarına özgü bakteriyofajlar atık sulardan izole edilmiştir. İzole edilen bakteriyofajlardan en etkilileri seçilerek, bu suşların oluşturdukları biyofilmler üzerine bakteriyofajların farklı konsantrasyonlarının inhibisyon ve eradikasyon yetenekleri *in vitro* araştırılmıştır.

## 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

### 2.1. ACINETOBACTER BAUMANNII

#### 2.1.1. Tarihçe

*Acinetobacter* türleri; doğada, toprakta ve suda bulunabilen; fermentatif-olmayan, hareketsiz, katalaz-pozitif, oksidatif-negatif, zorunlu aerobik Gram-negatif kokobasillerdir. Taksonomik sınıflandırması;

Alem: Bacteria

Şube: Proteobacteria

Sınıf: Gammaproteobacteria

Takım: Pseudomonales

Aile: *Moraxellaceae*

Cins: *Acinetobacter*

1911 yılında topraktan izole edilmiş, Beijerinck tarafından *Micrococcus calcoaceticus* olarak adlandırılmıştır. Yıllar içerisinde *Diplococcus mucosus*, *Moraxella lwoffii*, *Alcaligenes haemolyans*, *Achromobacter anitratus* ve *Achromobacter mucosus* gibi isimler de verilmiştir [12]. DeBord, 1939 yılında üretral numuneden kokobasilleri üretilip tanımlamıştır. *Acinetobacter* cinsinin ismi Yunanca'da 'hareketsiz çubuk' anlamına gelen 'Akinetos' sözcüğünden gelmektedir [13]. *A. baumannii* ise tür adını bakteriyolog Paul Baumann'dan almıştır [14].

1968 yılında Baumann ve arkadaşları, *Acinetobacter* cinsinin biyokimyasal ve morfolojik özellikleri tanımlanmıştır, 1971 yılında ise *Moraxellaceae* ailesinde sınıflandırılmıştır. *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* cinsinin tanımlanan ilk türüdür [15].

DNA dizi analizi ile yapılan çalışmalarda 17 genotip ve 7 farklı tür belirlenmiştir. Bu *Acinetobacter* türleri arasında, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. radiorezistens*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. calcoaceticus* ve *A. baumannii* bulunur. Son dönemlerde tanımlanan yeni türler ile

bu sayı 20'yi geçmiştir [16]. Bu türlerden dördü (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* ve *A. nosocomialis*) birbirine yakın olduklarından dolayı *A. calcoaceticus*-*A.baumannii* kompleksi olarak kabul edilmektedir [17].

### 2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

35-37°C'de üreyebilen *Acinetobacter* cinsi indol-negatif, DNase-negatif, katalaz-pozitif Gram negatif bakterilerdir. DNA'larında %39 ile %47 arasında G+C içeriğine sahiptirler [18]. Gram boyamada 1.0 x 0.7 µm boyutlarında kok veya kokobasil şeklinde görülürler. Üreme fazında çomak, stabil dönemde ise diplokok morfolojisinde görünmektedirler. Laktozu fermente edemediklerinde MacConkey agarda, kolonileri soluk bir pembe tonundadır. Üretilenimleri için seçici-ayırıcı besiyerleri olarak Leeds *Acinetobacter* Medium ve Herellea agar kullanılmaktadır [19]. *A. baumannii* glukozu okside ederken; *A. lwoffii* ve *A. haemolyticus* glukozu okside etmemektedir. *A. baumannii* 44°C'de üreyebilmekte ve bu özelliği diğer *Acinetobacter* türlerinden ayırımında kullanılmaktadır. *A. haemolyticus* koyun kanlı agarda hemoliz oluşturur ve bu özelliğiyle diğer türlerden ayrılmaktadır.

Besin yokluğu, kuruluk ve antimikrobiyal ilaçlar gibi olumsuz koşullar da bile canlılığını sürdürebilen *A. baumannii*, polistiren ve cam gibi abiyotik yüzeylerde; epitel hücreleri, mantar filamentleri gibi biyotik yüzeylerde biyofilm oluşturabilmektedir.



Şekil 2.1: *A. baumannii*'nin Chrom Agar (Sol), MacConkey Agardaki (Orta) üremesi ve koloni yapısı (Sağ). (Çalışmamızdan)

### 2.1.3. Virülans Faktörleri

*Acinetobacter* türleri arasında en yüksek virülansa sahip mikroorganizma *A. baumannii*'dir ve çeşitli virülans faktörleri vardır. Hedef hücreyle etkileşimin ilk aşaması olan hücreye tutunmada Tip I pili ile Lipopolisakkarit(LPS) tabakanın antijenik O-polisakkariti

birlikte görev almaktadır [20]. Tip I Pili Gram negatif bakterilerin hedef hücreye yapışmasında önemli bir rol almaktadır. *A. baumannii*'de bu pili, aynı zamanda biyofilm oluşumuna da katkıda bulunan bir yapıdır. Tip IV Pili hem iç hem de dış zarlarda yapısal bileşenlere sahip olan büyük protein kompleksleridir ve bu pilinin motiliteyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. *A. baumannii* hareketsiz bir bakteri olmasına karşın Tip IV Pili sayesinde kendisini itme ve çekme hareketlerini yapabilmektedir [21]. Ayrıca bu pililer gen transferinden de sorumludur.

Gram negatif bakterilerin çoğunda olduğu gibi *A. baumannii*'de de protein sekresyon sistemi bulunmaktadır. Bu sistem sayesinde mikroorganizmanın konağa ve çevreye olan adaptasyonu kolaylaşmaktadır.

Dış Membran Bileşenlerinden (Outer Membran Protein - OMP) OmpA, konak hücre üzerinde sitotoksik etki göstermekle beraber, biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca hücrenin istila edilmesi, penetrayon ve apoptozdaki rolü çok önemlidir [22].

*A. baumannii*'nin sahip olduğu fosfolipaz enzimleri, hidrolitik enzimlerdir. Bu enzimler; insan hücrelerinin zarında bulunan fosfolipidlerin geçirgenliğini artırarak hücre yapılarını bozmaktadır. Fosfolipaz C insan epitel hücrelerine toksik etkilidir. Proteaz enzimi olan cpaA kan pıhtılaşmasını önlemekte ve bakterinin yayılmasına katkıda bulunmaktadır [23].

*A. baumannii*'nin zorlu ortam şartlarında yaşamını devam ettirebilmesine katkıda bulunan önemli bir diğer virülans faktörü ise mikrobesein toplama sistemleridir. Bu sistem sayesinde ortamda bulunan magnezyum, çinko ve demir gibi besin moleküllerini yakalayabilmektedir. *A. baumannii*'de bu sistemin ana mekanizması siderofor olarak bilinen demir şelatlama molekülüne sahip olmasıdır, en yaygın olarak bilinen ise "acinetobactin"dir. Acinetobactin konak hücrede hasara yol açarak virülansı artırır.

Quorum Sensing mekanizması 'otomatik indükleyici' denilen sinyal ileten moleküller aracılığıyla bakteriler arası iletişim sağlanmakta ve çoğunluk algılanmaktadır. Oto-indükleyiciler bakteriler tarafından büyümeleri süresince üretilmekte, bakteri sayısı yükseldikçe oto-indükleyici konsantrasyonu da yükselmektedir. Bu mekanizma bakterinin biyofilm oluşturmasını sağlamaktadır. Biyofilm üretebilen *A. baumannii*'ler, biyofilm üretemeyenler ile kıyaslandığında kuruluğa karşı daha dirençlidir [24]. Bu sayede hastane ortamında daha uzun süre kalabilmektedirler.

#### 2.1.4. Neden Olduğu Enfeksiyonlar

*Acinetobacter* cinsi bakteriler genel olarak yüksek virülansa sahip olmamalarına karşın immün sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyona neden olabilmektedir. Düşük virülansa sahip olmaları, düşük invazyon ve adhezyon yetenekleri ile ilişkilidir. *A. baumannii*'nin hücre adhezyon yeteneği *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* gibi bakterilere kıyasla düşüktür [25]. Hücre adhezyon yeteneğinin düşük olmasına karşın; kateter gibi plastik yabancı maddelere hidrofobik yeteneği sayesinde iyi tutunabilmektedir. Hastalardan izole edilen suşlar ile mikrobiyotadan izole edilen suşlar karşılaştırıldığında; hasta suşlarının yüzey hidrofobisitesi ve adhezyon yeteneği çok daha yüksektir [18].

1999 yılında ülkemizde meydana gelen Marmara depremi sonrasında yaralanan kazazedelerin yara enfeksiyonlarından en fazla izole edilen mikroorganizma *A. baumannii* olmuştur [26]. 2003-2005 yıllarında Irak ve Afganistan savaşında yaralanan ABD'li askerlerde yara enfeksiyonları ve osteomyelit gelişmiştir; bu enfeksiyonlardan *A. baumannii* izole edilmiştir ve bu nedenle *A. baumannii* 'İraçbakter' olarak anılmaktadır. Yaralı askerler ülkelerine döndüklerinde, çapraz bulaş ile çoklu ilaç direnci bulunan *A. baumannii* suşlarını sivil hastanelere taşımışlardır [27].

*Acinetobacter* türleri arasında *Acinetobacter baumannii* dünya çapında hastane kaynaklı enfeksiyonlarla (HKE) ilişkili en önemli fırsatçı patojenlerden biridir. 1970'li yıllarda hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) sıklıkla karşılaşılmış ve sonrasında klinik önem kazanmıştır. Bu aerobik Gram-negatif kokobasil, düşük virülanslı bir patojen olarak kabul edilmesine rağmen cilt, yara, sekonder menenjit, kan dolaşımı, idrar yolu ve diğer yumuşak dokuların fırsatçı enfeksiyonlarından sorumlu olabilmektedir. Çevrede uzun süre canlı kalabilme ve çevresel streslere uyum sağlama yeteneği ile hastanelerde kolayca bulaşabilmekte ve rutin dezenfeksiyon işlemlerine rağmen canlı kalabilmektedir [12].

*A. baumannii* enfeksiyonlarının çoğu, YBÜ ortamındaki kritik durumdaki hastalarda meydana gelmekte ve dünya çapındaki YBÜ'deki enfeksiyonların %20'sini oluşturmaktadır. Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (Infectious Diseases Society of America), *A. baumannii*'yi hastanelerdeki en önemli çoklu ilaç direnci bulunan mikroorganizmalardan biri olarak sınıflandırmıştır [28]. YBÜ'lerde antibiyotik kullanımının yoğun olmasından dolayı çok dirençli suşlar izole edilmektedir [29]. HKE'lere yol açan *A. baumannii*'nin en sık neden olduğu enfeksiyonlar; ventilatör ilişkili pnömoni, yara enfeksiyonları, kan dolaşımı

enfeksiyonları, sekonder menenjit, idrar yolu enfeksiyonudur [30]. Hastane kaynaklı kan dolaşımı ve ventilatör ilişkili pnömoni enfeksiyonlarında mortalite %5 ile %54 arasındadır [20]. Nadir olarak osteomyelit, konjunktivit ve peritonite neden olmaktadır.

Enfeksiyon oluşumundaki risk faktörleri; hemodiyaliz, mekanik ventilasyon, venöz kateter kullanımı, uzun zamanlı antibiyotik kullanımı ve YBÜ'de yatış süresinin uzun olmasıdır. Hastanede en sık bulunabileceği yerler arasında; mekanik ventilatör cihazları, nemli yatak bölgeleri, arteriyel ölçüm cihazları, aspirasyon kateterleri vardır.

Dirençli *A. baumannii* suşları ile enfekte olan hastalarda %70'e varan mortalite oranı bildirilmiştir [31]. Morbidite ve mortalite oranları bağışıklık sistemi baskılanmış, çoklu organ yetmezliği olan hastalarda yüksektir. Ayrıca, toplum kökenli *A. baumannii* enfeksiyonlarının sıklığı giderek artmaktadır ve pnömonilerde mortalite oranı yaklaşık %40-60'tır [30]. Toplum kökenli *A. baumannii* pnömonileri, hastane kaynaklı olanlardan daha ağır seyretmektedir [32]. Toplum kaynaklı *A. baumannii* enfeksiyonlarında Kronik obstrüktif akciğer hastalığı(KOAH), diyabet, alkolizm ve kanser gibi altta yatan hastalıklar risk faktörleri arasındadır.

### 2.1.5. Direnç Durumu

*A. lwoffii* dışındaki *Acinetobacter* türleri çoğu antibiyotiğe direnç geliştirmişlerdir. *A. lwoffii* en duyarlı tür iken *A. baumannii* en dirençli türdür. *A. baumannii*'nin doğal dirençli olduğu antibiyotikler Amoksisilin/Klavulanat, Ampisilin, Seftriakson, Sefotaksim, Aztreonam, Trimetoprim, Ertapenem, Fosfomisin ve Kloramfenikoldür [33].

*A. baumannii*'de beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı çeşitli direnç mekanizmaları vardır. Bunlardan en önemlisi beta-laktamaz enzimi ile antibiyotiklerin parçalanmasıdır. Ambler Sınıflanmasına göre karbapenemazlar A, B, C ve D olmak üzere 4 farklı gruba ayrılmaktadır.

Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar (GSBL) A sınıfında bulunmaktadır. A sınıfı beta-laktamazlar, Sefamisin dışındaki bütün penisilin ve sefalosporinleri hidrolize edebilirler. *A. baumannii*'de bulunan GES, PER, TEM, VEB SHV, SCO ve CTX-M enzimleri bu sınıfa aittir. Sefalosporin ve penisilinlere yüksek düzeyde dirençli, PER-1'e sahip olan *A. baumannii* suşları Türkiye'de sıklıkla izole edilmektedir [34].

B sınıfı beta-laktamazlar içinde metalo-beta-laktamazlar (MBL) bulunmaktadır ve bu enzimler aztreonam dışındaki tüm beta-laktam grubu antibiyotikleri hidrolize

edebilmektedirler. *A. baumannii*'den iki MBL ailesi bildirilmiştir, bunlar; IMP ve VIM'dir [34]. B sınıfında en çok endişe verici olan NDM-1'dir ve Çin'de 2011 yılında izole edilmiştir [20].

C sınıfı beta-laktamazlar; *Acinetobacter* türü sefalosporinazlardır (*Acinetobacter* Derive Cephalosporinase - ADC). *bla* genleri tarafından kromozomal olarak kodlanan C sınıfı sefalosporinazlar; penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize ettiklerinden *A. baumannii*, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler, ertapenem ve aminopenisilinler antibiyotik gruplarına doğal olarak dirençlidir. Karboksipenisilinler ve 3. kuşak sefalosporinlere karşı kazanılmış direnç, AmpC tipi sefalosporinazların aşırı üretimi ile ilişkilendirilmiştir [35].

En yaygın karbapenemazlar olan D sınıfı beta-laktamazlar, oksasilinaz (OXA) olarak bilinmektedirler [30]. *A. baumannii*'de bulunan karbapenem hidrolize eden enzimlerden; kromozomal OXA-51 ve kazanılmış OXA-24, OXA-23 ve OXA-58 öne çıkmaktadırlar [36]. OXA-58 plazmid aracılığı ile aktarılan bir enzim olup; ülkemizde, İngiltere, Yunanistan, Fransa, Romanya, İspanya ve İskoçya gibi Avrupa ülkelerinden bildirilmiştir [37]. *A.baumannii*'de ilk İmipenem direnci 1985 yılında Edinburg Üniversitesi'nden bildirilmiştir. Kan kültüründen izole edilen bu suşta karbapenem hidrolize eden enzim saptanmış, bu enzim biyokimyasal ve genetik incelemelerin sonucunda OXA-23 olarak isimlendirilmiştir [38]. Doğal olarak *A. baumannii*'nin kromozomunda bulunan OXA-51'in aşırı üretimi sonucunda da kazanılmış karbapenem direnci gelişebilmektedir [39].

Beta-laktam antibiyotiklere direnç durumunun başka bir mekanizması ise porinlerin yapısındaki ve sayısındaki değişikliklerden kaynaklıdır. Porin kanalları antimikrobialerin bakteri hücrelerine girmesine olanak sağlayan yapılardır. Bu yapıların kaybı dış membran antibiyotiklere karşı geçirgenliğinin azalmasına neden olur. Sefalosporin ve penisilin direncine sebep olmaktadır [20].

Eflüks pompaları, sitoplazmik membrana zarar verme ihtimali olan antibiyotik gibi maddeleri uzaklaştırmakta ve dirence yol açmaktadır. En önemli eflüks pompalarından biri "AdeABC"dir. çoklu ilaç direncine yol açar. Eflüks pompası, tetrasiklin direncinden sorumludur. tet(A) ve tet(B) genleri tetrasiklin direncinde önemli bir rol oynar [18].

Penisilin Bağlayıcı Proteinler (PBP)'deki değişiklikler, beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin bir diğer mekanizmasıdır. PBP'ler beta-laktam grubu antibiyotiklere bağlanabilme

yeteneklerinden dolayı şekilde adlandırılmışlardır. *A. baumannii*'de '1a, 1c, 2, 3, 4, 4b ve 5' olmak üzere 7 farklı PBP vardır. PBP'ler, bakterinin hücre duvarındaki peptidoglikanın oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. Karboksipeptidaz ve transpeptidaz enzimlerindeki değişiklikler, antibiyotiklerin bağlanmasını azaltır ve beta-laktamaz aktivitesi göstererek direnç sağlamaktadır.

Dirençli bakterilere karşı son çare olarak kullanılan kolistin ve tigesikline de karşı direnç gelişmektedir. İlk kolistin dirençli *A. baumannii* 1999 yılında Çek Cumhuriyeti'nde yürütülen bir çalışmadan bildirilmiştir [40]. İlk tigesiklin dirençli *A. baumannii* ise 2007 yılında İsrail, Tel Aviv Üniversitesi'nde yapılan çalışmada rapor edilmiştir [41].

1947 yılında keşfedilen ve 1959'dan beri Gram negatif bakterilerin tedavisinde kullanılmakta olan polimiksinler; polipeptit yapıda antibiyotiklerdir. Polimiksinlerin 5 farklı grubu bulunur ancak klinik uygulamalarda sadece polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılır. Kolistin; *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* spp. ve *Enterobacter* spp. gibi Gram negatif bakterilere etkilidir [42]. Kolistin dış membrandaki lipid A ile etkileşime girer ve membran geçirgenliğinde artışa neden olur; bu artış nedeni ile hücresel içerik hücre dışına çıkar ve bakteri hücresi ölür [43]. *A. baumannii*'de bulunan *lpxC*, *lpxC* veya *lpxA* genleri, lipid A'nın biyosentezinden sorumludur. Bu genlerde gelişen nokta mutasyonu ile liposakkariti eksik veya lipid A'sı kaybolmuş bir dış membran oluşur. Kolistin direncinin en önemli nedenlerinden biri bu spontan nokta mutasyonudur [44]. Kolistin direnç geni olan *mcr-1*, 2015 yılında Çin'de tanımlanmıştır. Bu gen, dış membrandaki lipid A'nın fosfoetanolamin ile değişmesine sebep olmakta ve kolistin bağlanmasını azaltmaktadır.

## **2.2. KLEBSIELLA PNEUMONIAE**

### **2.2.1. Tarihçe**

*Enterobacteriaceae* ailesinden olan *Klebsiella pneumoniae* ilk olarak 1882'de Carl Friedlander tarafından pnömoniden ölen hastaların akciğerlerinden izole edilen bir bakteri olarak tanımlanmıştır. Bu sebeple uzun yıllar boyunca 'Friedlander basili' olarak isimlendirilmiştir. 1887 yılında ise Trevisan tarafından, Edward Klebs'in onuruna bu bakteri *Klebsiella pneumoniae* olarak isimlendirilmiştir. *K. pneumoniae*; fermenter, hareketsiz, kapsüllü, üreaz-pozitif, indol-negatif ve oksidaz-negatif bir Gram negatif çomaktır.

Taksonomik sınıflandırması;

Alem: Bacteria

Şube: Proteobacteria

Sınıf: Gammaproteobacteria

Takım: Enterobacteriales

Familiya: *Enterobacteriaceae*

Cins: *Klebsiella*

*K. pneumoniae* klasik ve hipervirülan olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tayvan'da 1980'lerin sonlarında hipervirülan *K. pneumoniae* (hvKp) suşları tanımlanmıştır. Klasik suşlar, aşırı kapsül üretmemekte ve sağlıklı kişilerde nadiren enfeksiyon yapmaktadır [45]. Ancak hem sağlıklı hem de immünsuprese kişilerde enfeksiyon yapabilmekte olan hipervirülan suş, idrar yolu enfeksiyonu, karaciğer apseleri, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, göz ve akciğer enfeksiyonlarına neden olmaktadır. hvKp suşları polisakkarit kapsülün aşırı üretimi ile kalın kapsüle sahiplerdir ve bu nedenle hipermukoviskoz koloniler oluşturmaktadırlar [46].

*Klebsiella* cinsi bakterilerde tanımlanmış 11 tür bulunmaktadır. Bunlar; *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. variicola*, *K. granulomatis*, *K. grimonti*, *K. aerogenes*, *K. africanensis*, *K. quasipneumoniae*'dir. İnsan sağlığı açısından tehdit oluşturan türler ise *K. pneumoniae*, *K. granulomatis* ve *K. oxytoca*'dır.

### 2.2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

*K. pneumoniae*'nin non-fermentatif alt türleri arasında *K. ozaenae* ve *K. rhinoscleromatis* bulunmaktadır. Bu istisna bakteriler hariç geri kalanlar laktozu fermente eder ve hareketsizdir. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* metil kırmızısı negatif ve 44,5 °C'de laktozdan gaz oluşturur iken; *K. pneumoniae* subsp. *ozanae* ve subsp. *rhinoscleromatis* metil kırmızısı pozitif ve 44,5 °C'de laktozdan gaz oluşturmaz [47].

*Klebsiella* türleri yüzey suları, toprak, kanalizasyon ve hayvanların mukozal yüzeyleri dahil olmak üzere doğada her yerde bulunmaktadır [47]. *Enterobacteriaceae* ailesinden olan *Klebsiella* cinsi; sağlıklı hayvan ve insanların gastrointestinal sistemlerinde ve nazofarenkslerinde bulunan bir mikrobiyota üyesidir. Ayrıca insanların gastrointestinal sisteminde en çok bulunan ikinci enterik cinstir. Bazı çalışmalar *Klebsiella* cinsi bakterilerin, *Escherichia coli*'nin asidik metabolitlerini tüketerek duodenal sistemin pH dengesini koruduğu

öne sürülmüştür [48]. Bir bebeğin bağırsak mikrobiyotasında zarar vermeden bulunabilen *K. pneumoniae*, yaşlılık döneminde akciğerlere yayılarak ölümcül olabilmektedir [49].



Şekil 2.2: *K. pneumoniae*'nin Chrom agar (Sol), MacConkey agardaki (Orta) üremesi ve Mukoid koloni yapısı (Sağ). (Çalışmamızdan)

### 2.2.3. Virülans Faktörleri

*Klebsiella pneumoniae*'de lipopolisakkarit, kapsül, sideroforlar, salgılama sistemi ve pili gibi virülans faktörleri bulunmaktadır [47].

*K. pneumoniae*'nin kapsülü, kapsüler polisakkarit sentezi (*cps*) bölümü tarafından üretilir ve bakteri hücresinin dış zarına bağlıdır. Kapsüllü suşlar ile kapsülsüz suşlar kıyaslandığında, kapsüllü suşların daha yüksek mortaliteye sahip oldukları bilinmektedir. Kapsül sayesinde bakteri fagositozdan, antimikrobiallardan, spesifik antikorlardan ve kompleman sisteminden kaçmaktadır.

Sahip oldukları fimbria sayesinde hedef hücreye bağlanmaktadır. Bu fimbria aynı zamanda biyofilm oluşumu, makrofajlar ile etkileşim, bakteri agregasyonu gibi işlevleri de vardır. Tip 1 Fimbria çoğu *Enterobacteriaceae* üyesinde ve *K. pneumoniae*'nin yaklaşık %90'ında bulunmaktadır [45]. Bu fimbrianın yapışma yeteneği FimH adhezin sayesinde. Bu adhezin, mannoz içeren glikoproteinlere yapışarak insan üriner sisteminde, epitelyal ve mukozal yüzeylere yapışabilmektedir [50]. Tip 3 fimbrialar ise hücre dışında bulunan matris proteinlerine bağlanmayı sağlamaktadır, bu nedenle biyofilm oluşumunu desteklemektedir. Endotrakeal tüp ve aspirasyon aletlerinde kolonize olabilmelerinden dolayı akciğer enfeksiyonlarına sebep olmaktadır [45].

Lipopolisakkarit (LPS); oligosakkarit çekirdek, O-antijeni ve Lipid A'dan oluşmaktadır. Tanımlanmış 9 farklı O-antijeni vardır, en yaygın olanı O1'dir. Endotoksin olarak da isimlendirilir, bakterilerin sebep olduğu toksik şokun nedenidirler [50]. Humoral savunma

mekanizmalarına, komplemana karşı ilk koruma aracıdır. O antijeni, Kompleman bileşenlerinin hücre membranına bağlanmasına imkan vermemekte ve bakteriyi lizisten korumaktadır [51].

Diğer bir virülans faktörü ise demir alım sistemleridir, bakteri büyümek ve çoğalmak için dış ortamdaki demiri almak zorundadır. Demir, metabolik süreçlerde gerekli olan kritik bir elementtir. Bu amaçla sideroforlar ortamdaki demiri bağlayıp spesifik reseptörler ile mikroorganizma hücrelerine sokabilen moleküllerdir. Aerobaktin, enterobaktin, salmoşelin ve yersiniabaktin olmak üzere dört farklı demir taşıyıcı molekül vardır [45].

#### 2.2.4. Neden Olduğu Enfeksiyonlar

*K. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonlar arasında; bronşit, pnömoni, otitis media, sinüzit, beyin ve diğer dokularda apseler, safra yolu iltihapları, menenjit, idrar yolu enfeksiyonları ve septisemi vardır. Gram negatif enfeksiyonların yaklaşık olarak üçte birini oluşturmaktadır [52]. Dünyadaki en yaygın hastane kaynaklı patojenler sırasında ikinci olarak gelmektedir. Bakteriyel pnömonilerin %2'sinden sorumlu olup Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ise hastane kaynaklı pnömonilerden en sık izole edilen bakteridir [53]. Klasik *K. pneumoniae*'nin aksine, hipervirülan *K. pneumoniae* toplum kökenli enfeksiyonlara neden olmaktadır. KOAH, kanser, diyabet ve alkolizm gibi faktörler, toplum kaynaklı pnömoni riskini arttıran faktörlerdendir [54]. *K. pneumoniae* pnömonisi olan kişilerde bulantı, taşikardi, ateş gibi belirtilerin yanı sıra kanlı balgam görülmektedir. Bu patojen hastaların boğazlarında kommensal olarak yerleşir ve bu şekilde hastalar arası yayılarak salgınlara neden olmaktadır. Hastanede yatmakta olan hastalarda, hastane kaynaklı pnömonide *Streptococcus pneumoniae* sonrası en sık izole edilen ikinci etken bakteridir. *K. pneumoniae*, çeşitli hastalıklara neden olan ve giderek antibiyotiklere daha sık direnç kazanan fırsatçı bir patojendir [55]. *K. pneumoniae* enfeksiyonları, hastane kaynaklı enfeksiyonlar haricinde dünya çapında önemli sayıda toplum kökenli enfeksiyondan da sorumludur.

Üriner sistem enfeksiyonları (sistit, böbrek ve perirenal apse, piyelonefrit) ise *K. pneumoniae* ile kontamine olmuş üriner kateterler ile ilişkilendirilmiştir [50]. Menenjit, kan dolaşımı enfeksiyonları, karaciğer apsesi ve pnömoni gibi enfeksiyonlarda ise kontamine sağlık ürünleri ve sağlık çalışanlarının elleri bulaş kaynağı olarak belirtilmiştir. Kateter, entübasyon tüpü ve implant gibi tıbbi aletler patojenin hasta vücuduna giriş kapısıdır. Özellikle solunum destek cihazları, yenidoğan cihazları, kateterler ve sonda gibi tıbbi aletleri kullanan hastalarda enfeksiyon gelişme riski daha yüksektir.

*K. pneumoniae* ayrıca piyojenik karaciğer apselerine neden olmaktadır, karaciğer yağlanması, bozulmuş açlık şekeri ve diyabet risk faktörlerindedir. En sık izole edilen etken *E. coli*, ikinci olarak *K. pneumoniae*'dir [56].

*K. pneumoniae* ilişkili enfeksiyonlarda risk faktörleri arasında cinsiyet, yaş, hastanede yatış durumu ve süresi, yetersiz beslenme, kronik hastalıklar ve immün yetmezlikler bulunmaktadır.

### 2.2.5. Direnç Durumu

*K. pneumoniae* SHV-1 enzimi sayesinde Ampisilin, Amoksisilin/Klavulanat, Karbenisilin ve Tikarsilin antibiyotiklerine doğal dirençlidir [50]. 1980'lerde 3. kuşak sefalosporinlerin sık kullanımı sonrasında, 1983 yılında Almanya'da plazmid kaynaklı yeni bir beta-laktamaz (SHV-2) bulunmuştur. SHV-2 enzimi, SHV-1 beta-laktamazının mutasyonu ile oluşmuştur. SHV-3 beta-laktamazi içeren suş ise 1986 yılında Fransa'da izole edilmiştir [57].

*K. pneumoniae*'deki karbapenem direncinden, beta-laktamaz adı verilen karbapenemleri hidrolize eden enzimler sorumludur. Karbapenemaz üreten suşlar penisilinleri, monoaktamları ve sefalosporinlerin çoğunu hidrolize etmekte ve birçok antimikrobiyale dirençli olmaktadır.

A sınıfı'nda bulunan KPC (Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase) klinik açıdan en önemlisidir. Aztreonamı, sefalosporinleri, karbapenemleri ve penisilinleri hidrolize etme yetenekleri ile bakteriye direnç sağlamaktadır [58]. KPC-1 ilk olarak 1996 yılında Kuzey Carolina'da (bütün beta-laktamlara dirençli), KPC-2 ise 1998 yılında Maryland'de keşfedilmiştir [59]. TEM-1 tanımlanmış olan ilk GSBL'dir ve bu enzime karşı sefotaksim, seftazidim gibi sefalosporinler geliştirilmiştir. TEM-3 ilk kez 1985'te Fransa'da hastane salgınına neden olan *K. pneumoniae* suşlarında saptanmıştır [60].

Aktif bölgelerinde  $Zn^{2+}$  iyonları içeren B sınıfı karbapenemazlar 'metallo-beta-laktamazlar' olarak da isimlendirilmektedir. Bu sınıfta en sık karşılaşılan beta-laktamazlar; kromozomal kodlanan VIM, plazmid kaynaklı NDM ve IMP'dir. Bu enzimler karbapenemlere ek olarak penisilini ve çoğu sefalosporinleri hidrolize ederken, aztreonamı hidrolize edemez. İlk kez Hindistan, Yeni Delhi'de bir hastadan izole edilen NDM enzimine sahip *K. pneumoniae* suşunun tespit edilmesiyle metallo-beta-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri

tehdit oluşturmuştur [61]. Hindistan'dan sonra Balkan ülkelerinde ve İngiltere'de görülen NDM-1 *K. pneumoniae* suşu ülkemizde ilk defa 2011 yılında tanımlanmıştır [62].

C sınıfı karbapenemazlarda bulunan sefalosporinazlar, çoğu *Enterobacteriaceae* türlerinde ve bazı diğer Gram negatif bakterilerde kromozomal olarak kodlanmaktadır. Plazmidle aktarılan CMY, FOX, MIR, ACT ve DHA gibi enzimler de son yıllarda tanımlanmıştır.

D sınıfı karbapenemazların aktif bölgelerinde serin bulunmaktadır ve oksasilini hidrolize edebilmelerinden dolayı 'oksasilinaz' ya da 'OXA-tipi' olarak isimlendirilmektedirler [63]. Kromozomda kodlanan OXA-48 bu gruptaki en önemli enzimdir, karbapenem ve penisilinleri hidrolize ederken sefalosporinleri iyi hidrolize edememektedir. OXA-48 ilk olarak 2001 yılında Türkiye'de izole edilen bir *K. pneumoniae*'de bildirilmiştir [64], bu enzimin sadece Türkiye'de görüldüğü düşünülse de sonrasında diğer Akdeniz ülkelerine yayılmıştır.

Kolistinin nörotoksisite ve nefrotoksisitesinin yüksek olması nedeni ile yıllarca kullanımı tercih edilmemiş ancak çok ilaca dirençli Gram negatif bakterilerin hızlı artışı nedeniyle kolistin kritik hastalıkların tedavisi için yeniden değerlendirilmiştir [65]. Ancak çok ilaca dirençli Gram negatif bakterilerin çok sık izole edilmesi ve tedavide kolistin kullanılmasıyla birlikte, kolistin dirençli *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* bildirilmiştir. Kolistin dirençli *K. pneumoniae* ise Kuzey Amerika, Asya, Avrupa ve Güney Afrika dahil birçok bölgeden bildirilmiş olup, en sık izole edilen ülke Yunanistan olarak bildirilmiştir [66]. *mcr-1* geni, dünyada en sık bildirilen ve rastlanan kolistin direnç genidir. *mcr-8* ve *mcr-3* genleri yalnızca *K. pneumoniae*'de bildirilmiştir [63].

### 2.3. ÜLKEMİZDE ve DÜNYADA ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ

Amerika Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) ve Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC) bakterilerin direnç profilleri ile ilgili uluslararası bir terminoloji geliştirmiştir. Bu terminolojiye göre bakterilerdeki kazanılmış dirençleri; Çoklu ilaç direnci (Multiple Drug Resistance-MDR), Aşırı ilaç direnci (Extreme Drug Resistance-XDR) ve Tüm İlaça Dirençli (Pan-Drug Resistance-PDR) olarak direnç gruplarında toplamışlardır. MDR, bir mikroorganizmanın 3 ve/veya daha fazla antimikrobiyal kategorideki, en az bir antimikrobiyale dirençli olması durumudur. XDR bakteriler iki ve/veya daha az

antimikrobiyal grup dışında en az 1 ajana karşı dirençli olmasıdır. PDR bakteriler, var olan tüm antimikrobiyal kategorilerdeki tüm ilaçlara karşı dirençlidirler. Bu tanımlamaları yapmak için antimikrobiyal gruplardaki ajanların neredeyse hepsi test edilmelidir [67].

DSÖ antibiyotiğe dirençli ‘öncelikli patojenler’ listesini 2017 yılında yayınlamıştır. Bu liste, insan sağlığına en büyük tehdidi oluşturduğu düşünülen 11 tür ve bir bakteri grubundan oluşmaktadır. Bu patojenler önceliklerine göre Kritik, Yüksek ve Orta olarak 3 gruba sınıflandırılmıştır. Listede yüksek düzeyde antibiyotik direnci bulunan ve aynı zamanda tedavilere cevap vermeme özelliği olan 6 patojen bakteri vardır. Bu bakteriler kısaca ESKAPE olarak adlandırılan; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter spp.* ’dir [1]. Antimikrobiyaller insanlarda ve diğer hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmekte sıkça kullanılmaktadır. İnsan göçleri, ticaret ve seyahat bu mikroorganizmaların yayılmasında büyük etkiye sahiptir. 1940’lardan beri insanların bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmekte kullandığı antibiyotiklere olan direnç hızla artmakta, çeşitlenmekte ve insan hayatını tehdit etmektedir. Her yıl 700.000 kişi dirençli bakteriler ile enfekte olmakta ve tedavi edilemediği için hayatını kaybetmektedir. DSÖ, dirençli mikroorganizmalar ile oluşan enfeksiyonların, 2050 yılına kadar toplamda 350.000.000 kişinin ölümüne yol açacağını tahmin etmektedir.

Türkiye Sağlık Bakanlığının 2016 yılında yayınladığı ‘Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi’ raporunda 59 ilden 105 merkez çalışmaya dahil edilmiştir. Beyin omurilik sıvıları (BOS) ve kan kültürü örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları kayıt altına alınmıştır. İnvaziv *K. pneumoniae* suşlarının %58’i GSBL pozitif ve üçüncü kuşak sefalosporinlere %68 direnç oranı bildirilirken, Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde bu oran %72’lere kadar çıkmaktadır. Ülkemizde *K. pneumoniae* için çoklu ilaç direnci %46 iken AB ortalaması %15,8 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde izole edilen *A. baumannii* suşlarında çoklu ilaç direnci %83,5; AB ülkelerinde ise ortalama %32 olarak bildirilmiştir [68].

İçlerinde Türkiye’nin de bulunduğu 19 ülkenin üye olduğu Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı Merkezi (Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance - CAESAR)’nin sunduğu veriler, Avrupa’da antibiyotik direncinin

yaygın olduğunu göstermektedir. *K. pneumoniae*'de yüksek düzeyde karbapenem direnci, *Acinetobacter spp.*'de ise yüksek oranda çok-ilaca-direnç gözlenmiştir.

Çok-ilaca-dirençli *K. pneumoniae*, Kuzey Avrupa'daki ülkelerde düşük oranda, Güney ve Doğu Avrupa'daki ülkelerde daha yüksek oranda; Bulgaristan, Sırbistan, Karadağ ve Polonya gibi ülkelerde ise %50'nin üstünde oranda bildirilmiştir.

CAESAR'ın 2020 yılında yayınladığı bildiri de *K. pneumoniae*'nin karbapenem direnci Güney ve Doğu Avrupa'da yüksek iken, İskandinav ülkelerinde %10'un altında olarak belirlenmiştir. Direnç oranları; İtalya, Bulgaristan, Sırbistan, Romanya ve Türkiye'den %25 ile %50 iken Ukrayna'da bu oran %50'nin üstünde bildirilmiştir. *Acinetobacter spp.*'nin karbapenem direnci Belçika, Danimarka, Finlandiya gibi ülkelerde %1'in altında iken, Güney ve Doğu Avrupa'daki birçok ülkede %50'nin üstünde bildirilmiştir. 2019 yılında ülkemizdeki 120 laboratuvarın verileri ile yapılan araştırmanın sonucunda en sık izole edilen 4 patojen bakteri sırasıyla; *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* ve *Acinetobacter spp.* olarak tespit edilmiştir. *K. pneumoniae*'nin çoklu ilaç direnç oranı %40, *Acinetobacter spp.*'de ise %80 olarak bildirilmiştir [69].

Dünya genelinde antibiyotiklerin aşırı ve kontrolsüz tüketimi, ilaçlara direnç gelişimini tetiklemiş ve son yıllarda tedavi edilemez enfeksiyonların hızla yayılmasına sebep olmuştur. Mevcut antimikrobiyal ajanlar etkinliklerini yitirmesinden ve yeni ilaç geliştirme çalışmalarının istenilen sonuçlara ulaşmamasından dolayı, bakteriyel enfeksiyonlar insan hayatını tehdit etmektedir. Bilim insanları yeni ve güçlü bir antibiyotik üretmeye çalışsa da son yıllarda etkili antibiyotiklerin keşfi neredeyse yok denecek kadar azdır. Ayrıca yeni keşfedilen antibiyotiklere hızla gelişen direnç, umutları tüketmektedir.

## 2.4. BİYOFİLM

### 2.4.1. Tarihçe

Van Leeuwenhoek, 17. yüzyılda kendi diş minesinden kazıdığı plakları mikroskop ile incelemiş ve gözlemlediği mikrobiyal kümelerden bahsetmiştir. Jones ve ark. Taramalı elektron mikroskobu ile su filtrelerinde oluşan biyofilm tabakasını incelemiş ve biyofilmin çeşitli mikroorganizmalardan oluştuğunu, biyofilmin çevresindeki yapının polisakkarit özellikte olduğunu saptamışlardır [70]. 1970'li yıllarda ışık mikroskobundaki gelişmeler ile biyofilmler ile ilgili detaylı bilgiler edinilmiştir. Ancak biyofilm ilk olarak 1978'de 'bir yüzeye tutunan ve

hücre dışı polisakkarit bir matriks üreten mikroorganizmalar topluluğu' olarak tanıtılmıştır [71]. 1978 yılından sonra biyofilmin yapısı ve genel bilgileri ile ilgili bildirimler giderek artmıştır. Biyofilm canlı veya cansız ortamlarda oluşabilen, mikroorganizmaların bu ortamlara bağlanarak oluşturdukları topluluklardır. Tıbbi cihazlar, kateterler ve kontakt lenslerde biyofilm oluşabildiği gibi, kalp zarı iltihabı, periodontit, orta kulak iltihabı gibi enfeksiyonlara da neden olmaktadır.

#### 2.4.2. Biyofilm Yapısı

%97'lik kısmı sudan oluşan biyofilmin 2 ana bileşeni vardır; ekstraselüler polimerik madde (EPS) ve mikroorganizmalardır. EPS; bakterilerin bir arada olmasını ve birbirlerine tutulmasını sağlamaktadır. Biyofilm içeriğinde magnezyum ve kalsiyum iyonlarının var olması biyofilmi güçlendirmektedir. Ortamda karbon varlığının bol olması, potasyum, azot ve fosfat varlığı da EPS üretimini arttırmaktadır [72]. Heterojen yapıya sahip olan biyofilm, tek tür mikroorganizmadan oluşabileceği gibi birkaç farklı tür mikroorganizmadan da meydana gelebilmektedir. Mikroorganizmalar mikrokoloniler şeklinde bir araya gelir ve bu mikrokoloniler arasında su kanalları vardır; sıvı akışı, oksijen, besin maddesi iletimi bu kanallardan yapılmaktadır [73].

Biyofilmin; mikroorganizmaların yüzeye tutunması, mikrokoloni oluşumu, biyofilmin olgunlaşması ve dağılma olmak üzere 4 ana basamakta meydana geldiği düşünülmektedir.

1) *Yüzeye Tutunma*: İlk basamak olan bağlanma, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz bağlanma olmak üzere 2 türlü olabilir [74]. Geri dönüşümlü bağlanmada planktonik haldeki mikroorganizmalar yüzeye kendiliğinden bağlanmaktadır. Bu evrede hidrostatik güçler, yerçekimi kuvveti ve Brown hareketi önemli rol almaktadır [75]. Bakterinin sahip olduğu pili, fimbria ve flagella yapıları yüzey ile etkileşime katkı sağlamaktadır. Yüzey ile temastan sonra hücre dışına salgılanmaya başlanan polisakkaritler, proteinler, adhezinler ve nükleik asitler bağlanmayı geri dönüşümsüz olmasını sağlamaktadır [75].

2) *Mikrokoloni Oluşumu*: Mikroorganizmalar canlı veya cansız olan yüzeye kalıcı olarak tutunduktan sonra EPS oluşmaya başlamaktadır ve içindeki çeşitli sinyal molekülleri ile hücrelerin bölünerek çoğalmasını ve mikrokolonilerinin oluşumunu sağlamaktadır [8].

3) *Biyofilmin Olgunlaşması*: Bu aşamada mikroorganizmalar otoindükleyici sinyaller yardımıyla iletişim kurmaktadır, bu iletişim gerekli hücre yoğunluğunun kazanıldığı

işlemdir. Çevredeki planktonik hücreler EPS'ye yapışarak kolonizasyonu arttırmaktadır. Antibiyotiklere karşı direnç bu aşamada en yüksek seviyededir [76].

4) *Dağılma/Kopma*: olgun hale gelen biyofilm tabakasının en üst yüzeyindeki bakteriler, biyofilmden ayrılarak aynı yüzeydeki farklı noktalara giderek başka yerlerde biyofilm oluşumunu sağlayabilmektedir. Aşırı nüfus artışı, besin eksikliği gibi faktörler ve dış kuvvetlerin etkisi gibi faktörler ile bu dağılma gerçekleşebilmektedir.



**Şekil 2.3: Biyofilm oluşum basamakları [77].**

EPS bakterileri çevre koşullarından, antibiyotiklerin etkisinden ve fagositozdan korumaktadır. Çevredeki tehlikeyi fark eden bakteriler sahip oldukları genler sayesinde biyofilm oluşturarak kendilerini korumaya almaktadırlar. Biyofilm içerisindeki bakteriler, planktonik bakterilere kıyasla besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, antibiyotikler ve dezenfektanlara karşı daha dirençlidirler.

Biyofilm oluşturan bakterilerin antimikrobilyallere olan direnci, planktonik bakterilere kıyasla 10-1000 kat fazla olma durumu bildirilmiştir [78]. Biyofilm, antimikrobilyallerin penetrasyonunu azalttığı ve immün sistem tarafından tanınmasını engellediği için tedaviyi zorlaştırmaktadır [9]. Deneysel çalışmalar ve klinik gözlemler ışığında biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde tek başına antibiyotik kullanımının yetersiz olduğu görülmektedir [10].

Mikroorganizmalar implant, sonda, kateter gibi hastayla direkt temas eden tıbbi ekipmanlara tutunup biyofilm oluşturabilmektedir. Enfekte olmuş ekipmanların çıkarılması ve biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların antimikrobilyallere dirençli olması; sağlık

maaliyetlerini arttırmaktadır. Biyofilm enfeksiyonları düşük dereceli bağışık yanıt gösterdiğinden hasta morbiditesine ciddi derecede katkıda bulunur. Kültür yöntemleri ile biyofilm enfeksiyonlarının tespit edilmesi zordur ve tedavide zorluk çıkarmaktadır [79].

Biyofilm oluşturabilen mikroorganizmalar endokardit, idrar yolu enfeksiyonları, osteomyelit, periodontitis, sinüzit, kistik fibrozis hastalarında akciğer enfeksiyonu ve tıbbi cihazlarla ilgili hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Cihazlardan sık olarak izole edilen Gram negatif bakteriler arasında *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*, Gram pozitif bakteriler arasında ise *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus epidermidis* bulunmaktadır. Stentler, kontakt lensler, implantlar ve kateterlerde biyofilm oluşumuna sık rastlanmaktadır [79].

Kistik fibrozis hastalarında görülen kronik akciğer enfeksiyonları, kronik yara enfeksiyonları, tüberküloz, endokardit, kronik sinüzit ve otitis media, dış çürükleri ve safra yolu enfeksiyonları, cihazla ilişkili olmayan biyofilm enfeksiyonları arasındadır [80].

#### 2.4.3. Biyofilm Tanı Yöntemleri

Biyofilm varlığının gösterilmesi için çeşitli *in vitro* ve *in vivo* yöntemler kullanılmaktadır. Biyofilmlerin dinamiğini ve karmaşıklığını anlayabilmek, yüzeye tutunmuş olan mikroorganizmaların morfolojisini gözlemek ve miktarını (var-yok, bol) nicel olarak gözlemleyebilmek amacıyla ışık mikroskopisi kullanılmaktadır. Ucuz, basit ve hızlı bir yöntemdir. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile mikroorganizmaların yapışma yapıları görüntülenmektedir, altın-işaretili antikorlar ile birleştirilerek biyofilmdeki mikroorganizmaların sahip olduğu spesifik antijenik yapılar gözlemlenebilmektedir [81].

En sık kullanılan *in vitro* yöntemler arasında Modifiye Christensen yöntemi (Modifiye tüp aderans yöntemi), Kongo kırmızılı agar yöntemi, Spektrofotometrik mikroplak yöntemleri vardır. Mikroorganizmaların biyofilm üretiminin saptanması için kalitatif bir yöntem olan Modifiye tüp aderans yöntemi uygulanmaktadır. Deney tüpündeki Triptik Soya Buyyona (TSB) biyofilm oluşumu gözlenmek istenilen mikroorganizma inoküle ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmektedir. İnkübasyon süresi sonunda mikroorganizmalı besiyeri deney tüpünden uzaklaştırılmaktadır ve planktonik hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla fosfat tamponlu tuzlu suyla (PBS) tüp iki kez yıkanmaktadır. 1 saat kristal viyole, safranin veya tripan mavisi ile yapılan boyama işleminin ardından tüp PBS ile iki kez daha yıkanmakta ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmaktadır. Tüpün çevresindeki boyanan yapı biyofilm üretimini

göstermektedir [82]. Boyanan tabakanın kalınlığı ve oluşan rengin koyuluğuna göre mikroorganizmanın biyofilm oluşturabilme yeteneği zayıf, güçlü ve çok güçlü olarak değerlendirilebilmektedir. Renk değişimi gözlenmez ise biyofilm oluşumu negatif kabul edilmektedir.



**Şekil 2.4: Modifiye Christensen yöntemi ile biyofilm oluşumu tespiti (Çalışmamızdan).**

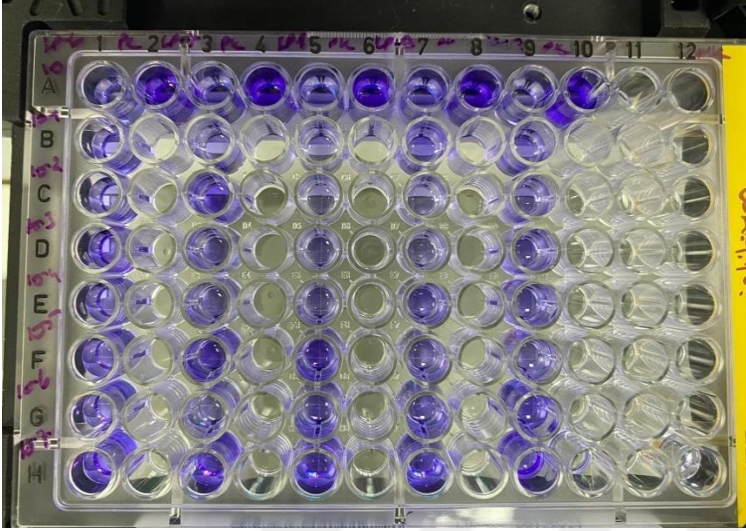
Kongo kırmızılı agar yöntemi ile biyofilm oluşumu saptanmasında, içerisinde Kongo kırmızısı, beyin kalp infüzyon buyyonu, sükröz ve agar içeren besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerine biyofilm oluşumu saptanmak istenilen mikroorganizmanın ekimi yapılarak 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonra besiyerindeki kolonilerin rengine göre mikroorganizmanın biyofilm oluşturup oluşturmadığı saptanmaktadır. Siyah koloniler biyofilm oluşturan, pembe koloniler ise biyofilm oluşturmayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır [83].



**Şekil 2.5: Kongo Kırmızı Agar'da biyofilm oluşumu tanımlanması  
Biyofilm oluşumu pozitif koloniler (solda), Biyofilm oluşumu negatif koloniler (sağda)[84].**

Kullanılan bir diğer yöntem ise Spektrofotometrik mikroplak yöntemidir. Bu yöntemde 96 kuyucuklu mikroplaklara, besiyerine inoküle edilmiş mikroorganizmalar dağıtılmakta ve inkübe edilmektedir. İnkübasyon süresi sonunda boşaltılan kuyucuklar PBS ile yıkanarak

planktonik hücreler uzaklaştırılmaktadır. Daha sonra kuyucuklar boyanmakta ve spektrofotometrede seçilen dalga boyunda ölçümü yapılmaktadır. Ölçümü yapılan değerler kontrol kuyucuklarındaki değerler ile kıyaslanarak mikroorganizmanın biyofilm oluşumu değerlendirilmektedir [85].



**Şekil 2.6: Spektrofotometrik mikropalak yöntemi, kristal viyole boyası ile biyofilm tespiti (Çalışmamızdan).**

## 2.5. BAKTERİYOFAJ

### 2.5.1. Tarihçe

Bakteriyofajlar (fajlar); kendilerine özgü bakteriyi hedef alarak, o bakteriyi enfekte ederek öldüren bakteri virüsleri olarak tanımlanmaktadır. Bakteriyofaj kelimesi Yunanca kökenli olup (bacteria ve phagei) ‘bakteri yiyen’ anlamına gelmektedir [86].

Bakteriyofajların, bakterisidal etkinliği ilk olarak Ernest Hankin’in gözlemleriyle ortaya konmuştur. Hankin, 1896 yılında Hindistan’ın Ganj ve Jumna Nehri’nde yıkanan kişilerin kolera hastalığına yakalanmadıklarını gözlemlemiştir. Bu nehirlerin sularında *Vibrio cholerae*’ya karşı antibakteriyel aktivite gösteren ve salgının yayılmasını önleyecek tanımlanamayan bir maddeden söz etmiştir [87]. 1898 yılında ise benzer bir gözlem Nikolay Gamaleya tarafından yapılmıştır [86]. Hankin ve Gamaleya tarafından gözlemlenen antibakteriyel ajana bir virüsün eşlik ettiği hipotezini ortaya atan ilk kişi ise Frederick Twort olmuştur [88]. 1915 yılında Twort, The Lancet’te yayınlanan makalesinde ‘*Staphylococcus* kolonilerinin yenilmiş’ olduğundan ve ‘filtrelenebilen, bakterileri enfekte edip öldüren’ bir

etmeden bahsetmiştir [88,89]. Ancak Twort maddi yetersizliklerden dolayı hipotezini kanıtlanamamıştır.

1917’de Felix d’Herelle, Paris’te bulunan Pasteur Enstitüsü’nde yaptığı çalışmalar ile bakteri virüslerini keşfetmiş ve bakteriyofaj olarak adlandırmıştır. Bu şekilde bakteriyofajları ve antimikrobiyal etkisini dünyaya tanıtan ilk kişi olmuştur.

20. yüzyılın başlarında bakteriyofajların temel yapısı henüz keşfedilememiştir, aktif veya canlı olmasıyla ilgili sorular yanıtızsız kalmıştır. Faj biyolojisi hakkındaki bilgiler yeterli ve kapsamlı değildir. 1933 yılında Ernst Ruska’nın elektron mikroskopunu icat etmesinin ardından 1940 yılında kardeşi Helmut Ruska, bakteri membranına bağlanan bakteriyofajları incelemiştir. ‘Sperm şekilli’ olarak tanımladığı parçacıklar, fajların yapısı hakkındaki ilk bilgi olmuştur [90].



**Şekil 2.7: Elektron mikroskopunda bakteriyofaj görüntüsü [91].**

### 2.5.2. Bakteriyofaj Biyolojisi

Bakteriyofajlar dünyanın her yerinde, biyosferde ve özellikle okyanuslarda çok sayıda bulunmaktadır. 200 litre deniz suyunda 5000 viral genotipin var olduğu tahmin edilmektedir [92]. Bakteriyofajlar konağı olan bakterileri barındıran toprak, deniz ve tatlı su atıkları, kanalizasyon suları gibi yerlerde bulunabilmektedirler [93,94]. Toprak, dışkı, göller, deniz, çöl, hayvanların bağırsakları ve lağım sularında sık buldukları bildirilmektedir [95]. Fajların dünyada en fazla bulunan organizmalar olduğu tahmin edilmektedir ve sayılarının  $10^{31}$  olduğu düşünülmektedir [92,96].

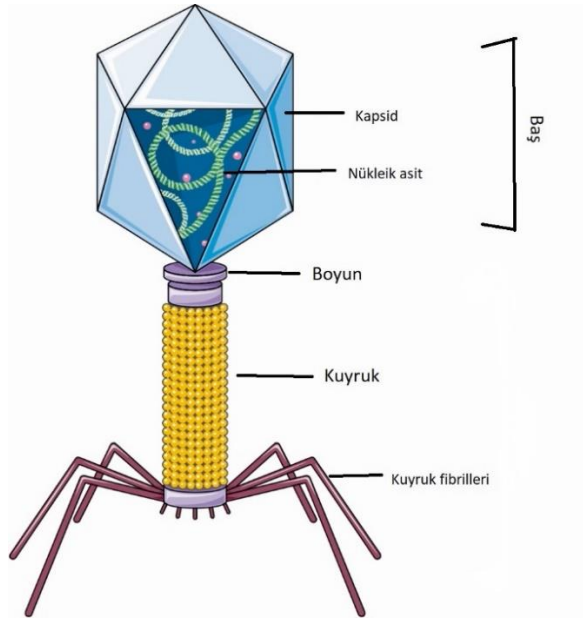
Aleksander Sulakvelidze, bakteriyofajları “dünyadaki mikrobiyal dengenin sürekliliğinde önemli rol oynayan, dünyada en bol ve yaygın bulunan organizmalar” olarak

tanımlamıştır [86]. Bakterilerin parçalanması ile ortamda kalan bakteri artıkları besin kaynağı olarak kullanılabilirler, bu sayede; karbon, nitrojen ve fosfor döngüleri zenginleşmektedirler. Bu nedenle bakteriyofajlar çevrede önemli bir rol oynamaktadırlar [94].

Bakterilerin bulunduğu vajina, bağırsak, deri, ağız ve solunum yolu gibi vücut bölgelerinde bakteriyofajlar da bulunmaktadır. Ayrıca fajlar doğal ortamlar haricinde insanların yaşadığı veya etkilediği yapay ortamlarda da bulunabilmektedirler. Atıksu arıtma merkezleri, hastaneler ve hastanelerin kanalizasyonları fajların zengince bulunduğu yerlerdendir [94,97].

### 2.5.3. Bakteriyofajların Yapısal Özellikleri

Bir bakteriyofajın büyüklüğü 20-200 nm kadar olup; baş, boyun, kuyruk kısımlarından oluşmaktadır. Fajın genetik materyali baş kısmının içinde bulunur; nükleik asit molekülleri (çift veya tek iplikli RNA veya DNA) birleşerek yumak şeklini almaktadır. Bu yapı kapsit adı verilen protein bir kılıf ile kaplıdır, kapsitler genellikle altıgen şeklinde olup kapsomerlerin bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Kuyruk fibrilleri ile hedef bakterinin hücre duvarındaki özgül reseptörlere bağlanan fajlar, nükleik asitlerini kuyruk yardımı ile bakteriye enjekte ederek hayat döngülerini tamamlamaktadırlar. Bakteriyofajların çok büyük bir kısmı (yaklaşık olarak %96'sı) kuyrukludur ve tüm kuyruklu fajlar çift sarmallı DNA'ya sahiplerdir [86,98].

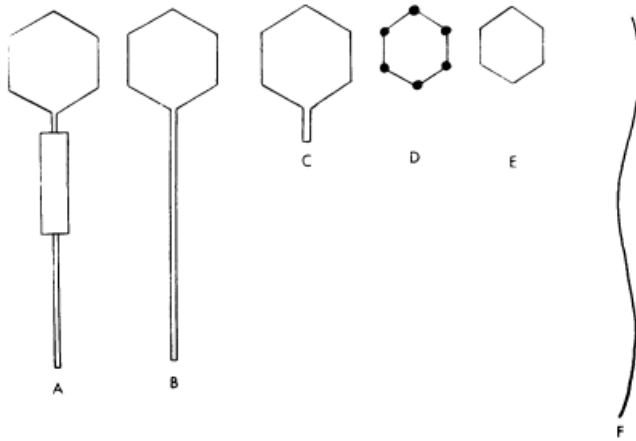


Şekil 2.8: Bakteriyofaj Yapısı [99].

### 2.5.4. Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Bakteriyofaj klasifikasyonunun öncülerinden olan Avustralya'lı mikrobiyolog Macfarlane Burnet, 1937 yılında fajların boyutsal ve fizikokimyasal ajanlara olan direnç durumlarına göre farklılıklara sahip olduklarını kanıtlamıştır [100]. 1943 yılında, Holmes Ruska fajları elektron mikroskopunda inceleyerek morfolojik yapılarına göre sınıflandırılmasını önermiştir. 1948 yılında ise Ruska, virüsleri 3 aileye bölmüştür ve bakteriyofajlar için 'Phagineae' ailesini oluşturmuştur. 1962 yılında Lwoff, Horne ve Tournier virüs sınıflandırmasının nükleik asit ve virion özelliklerine dayanarak yapılması gerektiğini belirtmişlerdir .

1967 yılında David Bradley bakteriyofajları morfolojik yapılarına (baş ve kuyruk özellikleri) göre 6 gruba (A-F) ayırmış ve sınıflandırmıştır. Şekil 2.9'da Bradley sınıflandırması gösterilmiştir [91]. Altı temel morfolojik tipin nükleik asit içerikleri belirlenmiştir. (Tablo 2.1)



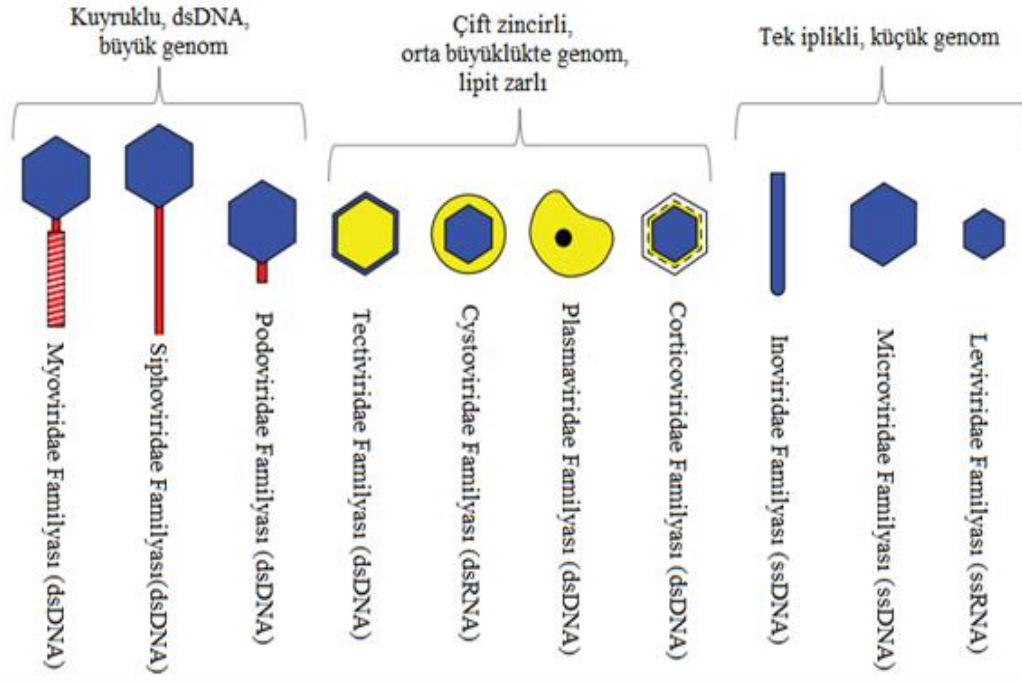
Şekil 2.9: Bradley'e göre Bakteriyofaj Sınıflandırması [91].

Tablo 2.1: Bakteriyofaj Sınıfları ve Nükleik Asit Özellikleri.

| Tip | Fajın Morfolojik Özelliği                    | Nükleik Asit    |
|-----|--|-----------------|
| A   | Polihedral baş, kasılabilen kuyruklu         | dsDNA, lineer   |
| B   | Polihedral baş, uzun ve kasılamayan kuyruklu | dsDNA, lineer   |
| C   | Polihedral baş, kısa kuyruklu                | dsDNA, lineer   |
| D   | İkozahedral baş, kuyuksuz, büyük kapsomerli  | ssDNA, sirküler |
| E   | İkozahedral baş, kuyuksuz, küçük kapsomerli  | ssRNA, lineer   |
| F   | Flamentöz                                    | ssRNA, lineer   |

(dsDNA: çift iplikli DNA, ssDNA: tek iplikli DNA, ssRNA: tek iplikli RNA)

1971 yılında Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) bir rapor yayınlamış ve bu raporda 'ribofaj, , lifli faj, T-çift fajlar,  $\lambda$ , f X grubu ve lipid fajı PM2' olmak üzere 6 bakteriyofaj cinsini, tip ve tür özelliklerine göre sınıflandırmıştır [101]. Bu sınıflandırma, bakteriyofaj sınıflandırmasının başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Günümüzde kullanılan sınıflandırma bakteriyofajların nükleik asit ve morfolojik yapıları dikkate alınarak yapılmıştır.



Şekil 2.10: Bakteriyofaj Ailelerinin Genom Yapıları ve Morfolojileri [102].

### 2.5.5. Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü

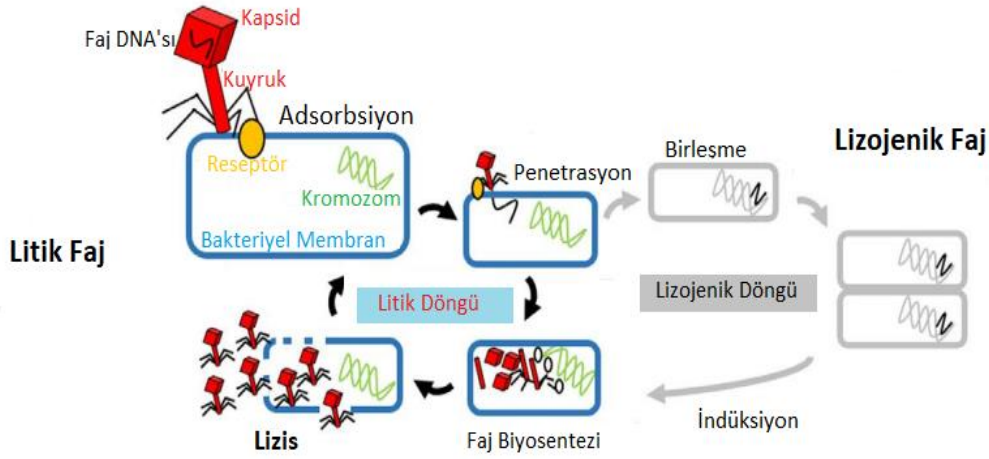
Bakteriyofajlar zorunlu hücre içi parazitlerdir, yaşamlarının devamı için bakteri hücresine ihtiyaç duymaktadırlar. Fajlar, konak bakteride enfeksiyon derecelerine göre litik, lizojenik ve nonlitik olarak sınıflandırılmaktadır.

Litik yaşam döngüsünde olan bakteriyofajlar virülan, lizojenik yaşam döngüsünde olan fajlar ise ılımlı olarak tanımlanmaktadır. Litik yaşam döngüsü 4 aşamadan oluşur. Bunlar sırası ile; adsorbsiyon, penetrasyon, latent dönem ve lizis ile fajın dışarı çıkmasıdır. Adsorbsiyon evresinde: bakteriyofaj hedef bakteri yüzeyine bağlanmaktadır. Bu bağlanma kuyruklu olan fajlarda kuyruk ile, diğerlerinde (kuyuksuz veya filamentöz) ise faj yüzeyi ile sağlanmaktadır. Pilus, flagella, teikoik asit, lipopolisakarit molekülleri bakteri yüzeyindeki bağlanma noktaları

arasındadır. Adsorbsiyonu takiben penetrasyon evresinde fajın genetik materyali bakteri hücrelerine aktarılmaktadır. Latent dönemde fajın nükleik asitleri bakteri sitoplazmasına girmekte ve olgun faj oluşmaktadır. Son aşama olan lizisde ise olgun fajlar bakteriyi parçalamakta ve serbest kalmaktadır.

Nonlitik döngüde, bakteri içinde olgun infektif fajlar oluştuktan sonra hücre lizise uğramamaktadır. Fajlar bakteri hücre duvarından dışarı çıkmaktadırlar ve bakteride herhangi bir değişiklik meydana gelmemektedir.

Lizojenik döngüde ise fajın viral DNA'sı ile bakteri DNA'sı birleşmektedir. Böylece bakteriyel DNA ne zaman replike olsa faj DNA'sı da replike olup çoğalmaktadır. Bu yeni hücreye 'profaj' denmektedir. Lizojenik döngüde olan bakteriyofajlar fiziksel veya kimyasal etkenler ile bakteri hücrelerinden dışarı çıkarılarak virülan faj formuna dönüşebilmektedirler.



Şekil 2.11: Bakteriyofajların Yaşam Döngüsü [103].

### 2.5.6. Bakteriyofaj Tedavisi

Bakteriyofaj tedavisi; enfeksiyona neden olan bakterilerin tedavisine yönelik fajların kullanılmasıdır. Tedavinin temeli, saflaştırılan fajın hastaya verilmesini takiben enfeksiyon etkeninin faj aracılığı ile patojeni yok etmesine dayanmaktadır.

Bakteriyofaj tedavisinin kökeni, 1890'ların sonunda, daha varlıkları tam olarak kanıtlanmadığı dönemlere dayanmaktadır. Ernest Hankin, Ganj ve Jumna Nehirlerinin yakınlarında oturan kişilerin gastrointestinal enfeksiyonlara özellikle koleraya yakalanmadığını gözlemlemiştir. d'Herelle 1919'da Enfants-Malades Hastanesi'nde, şiddetli bakteriyel dizanterisi olan 12 yaşındaki hastaya faj tedavisi uygulamış, başarılı sonuç almıştır. Ardından

3 hastaya da aynı tedaviyi uygulamış ve 24 saat içinde iyileşme rapor edilmiştir [86,88]. Bu şekilde faj tedavisi hayata geçirilmiştir. 1921'de Fransa'da Stafilokokkal cilt lezyonlarının tedavisinde, lezyonların içine ve çevresine faj enjekte edilerek 24-48 saat içerisinde enfeksiyonların gerilediği gözlemlenmiştir. 1920'lerde faj tedavisi yaygınlaştırılmış, Hindistan'da hıyarcıklı veba ve kolera dahil olmak üzere enfeksiyon tedavileri için fajlar kullanılmıştır [93]. Fajlar ile tedavi edilen hastalıklar arasında deri enfeksiyonları, konjonktivit, dizanteri, kolera ve bubonik veba bulunmaktadır [104].

1928 yılında Alexander Fleming kültür ortamında stafilokoklar ile çalışırken, küf üreyen yerde bakterilerin üremediğinin gözlemlemiş ve penisilinin keşfi ile antibiyotikler insan hayatına girmiş, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. 1940 ve 1970 yılları arası 'antibiyotiklerin altın çağı' olarak bilinmektedir. Antibiyotikler; daha kolay elde edilebilir olması ve etki ettiği bakteri grubunun daha fazla olması sebebi ile faj tedavisini geri planda bırakmıştır. Tıp tarihindeki en başarılı terapötik müdahalelerden biri antibiyotikler olarak kabul edilmektedir; ancak antibiyotiklerin yaygın ve kontrolsüz kullanımı nedeni ile gelişen ve giderek artan antibiyotik direnci dönemimizin en büyük sorunlarından biri haline gelmiştir. Mevcut direnç gelişim oranı, antibiyotik keşif ve geliştirme oranını fazlasıyla aşmakta ve bu durum küresel olarak insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde alternatif yöntemler geliştirilmelidir. Faj tedavisinin artan antibiyotik direnciyle mücadelede çekici bir çözüm olabileceği düşünülmektedir [105].

Biyofilmin inhibe ve eradike edilmesinde bakteriyofajların 4 farklı etki mekanizması olabileceği düşünülmektedir [11];

1. Bakteriyofajlar, biyofilmin EPS'sini bozan enzimlere sahip olabilir veya eksprese edebilirler.
2. Bakteriyofajlar, bakteri genomunda EPS'yi bozan enzimleri indükleyebilir.
3. Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerinin içerisinde çoğalarak sayılarını arttırabilir. Biyofilmin yayılması ile EPS üreten bakterileri, bakteriyofajlar yok etmeye başlar ve biyofilm kademeli olarak ortadan kaldırılabilir.
4. Bakteriyofajlar kalıcı hücreleri de enfekte edebilirler. İnaktif hücrelerin içerisinde çoğalamasalar da bakteriler yeniden aktifleşinceye kadar ve aktifleştikten sonrasında zarar verici bir enfeksiyon başlatabilirler.

### 2.5.7. Antibiyotik ve Bakteriyofaj Tedavisinin Karşılaştırılması

- Bakteriyofajlar, bakteri türüne özgüdür ve sadece hedef bakteriyi yok etmektedirler. Antibiyotiklerin etki spektrumunun geniş olması nedeniyle patojen bakterilerle beraber mikrobiyota bakterilerinin de yok olmasına neden olabilmektedir.
- Bakteriyofajların etki mekanizmaları antibiyotiklerden farklıdır. Bu nedenle çoklu antibiyotik direnci bulunan bakterilerin tedavisinde fajlar kullanılabilirler.
- Antibiyotiklerin aksine, bakteriyofajların insan sağlığı açısından bildirilen istenmeyen etkisinin olmamasından dolayı; profilaktik tedavi amacıyla da kullanılabilirler.
- Antibiyotiklerin kontrolsüz kullanımı nedeni ile bakteriler antibiyotiklere karşı hızlı bir şekilde direnç kazanmış ve günümüzde de direnç kazanmaya devam etmektedirler. Ancak günümüzde litik bakteriyofajların enfekte ettiği bakterilerin direnç gelişimi kanıtlanmamıştır.
- Yeni antibiyotikler keşfetmek zordur ancak bakteriyofajlar dünyanın her yerinde, bol miktarda bulduklarından dolayı yeni bakteriyofajlar bulmak nispeten daha kolaydır.
- Antibiyotiklerin maliyeti bakteriyofajların maliyeti ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir.
- Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre bakterileri öldürmekte veya üremelerini durdurmaktadır ancak fajlar bakterileri enfekte ederek direkt öldürmektedirler.
- Hastalıkların tedavisinde; antibiyotikler belirli dozda ve uzun süreli olarak kullanılmaktadırlar fakat faj tedavisinde tekrar dozlarına ihtiyaç duyulmamaktadır. Çünkü fajlar hedef bakteri hücresi içerisinde üstel olarak çoğalmakta ve diğer bakterileri enfekte etmektedirler.
- Geniş spektrumlu antibiyotikler hastalıktan şüphelenildiği anda başlanabilmekte iken bakteriyofaj tedavisine başlanmadan önce etkenin tam olarak doğru bir şekilde tanımlanması ve fajın etkinliğinin bilinmesi gerekmektedir.

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. KULLANILAN ARAÇ ve GEREÇLER

- Steril plastik öze (Looplast,Italy)
- -80 °C ve +4 °C buzdolabı (Nüve)
- İnkübatör (36± 2°C) (Nüve)
- Çalkalamalı etüv
- Otoklav (Nüve)
- Steril kabin (Nüve)
- Pastör fırını (Nüve)
- Benmari (Nüve)
- Spektrofotometre (ThermoScientific)
- Santrifüj (Hettich)
- Hassas terazi (KERN)
- Vorteks (Dlab Scientific)
- Mikropipet (Transferpette)
- Pipet uçları (10-200-1000 µL) (Isolab)
- Cam tüp
- Balon joje
- 96 kuyucuklu steril Mikroplak
- Petri kabı (Isolab)
- 0.22 µm enjektör uçlu filtre
- 50 ml steril Falkon tüpü (Greiner)
- Eppendorf tüpler (Laborant)

- Steril bisturi ucu
- Steril öze (Tek kullanımlık)
- Steril eküvyon (Tek kullanımlık)
- Antibiyotik Diskleri: Amikasin (AK,30 µg), Amoksilin/Klavulonat (AMC, 20/10 µg), Gentamisin (CN, 10 µg), İmipenem (IPM, 10 µg), Meropenem (MEM, 10 µg), Siprofloksasin (CIP, 5 µg), Seftazidim (CAZ, 10 µg), Sefriakson (CRO, 30 µg), Piperasilin/Tazobaktam (TPZ, 30-6 µg), Trimetoprimsulfametoksazol (SXT, 25), µgAmpisilin (AM, 10 µg), Ertapenem (ETP, 10 µg), Sefepim (FEP, 30 µg), Sefuroksim (CXM, 30 µg), Sefotaksim (CTX, 5 µg) (Bioanalyse-Türkiye)
- Kolistin E-test (0016-256 µg/ml) (Bioanalyse-Türkiye)

### **3.1.1. Kullanılan Besiyerleri**

Triptik Soya Agar (Tryptic Soya Agar, TSA) (Condalab, Madrid)

Triptik Soya Buyyon (Tryptic Soy Broth, TSB) (Condalab, Madrid)

%0.4'lük Yumuşak TSA (Yarı-katı) (Condalab, Madrid)

Brucella Broth (Condalab, Madrid)

MacConkey Agar (Oxoid)

Mueller Hinton Agar (Biolab)

### **3.1.2. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması**

Hazır toz besiyerleri yönergelerde verilen grama göre, distile su kullanılarak hazırlanmıştır. 121°C'de 15 dakika, otoklavda sterilizasyon işlemi uygulanmıştır.

### **3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Kristal viyole

Absolute Etanol

%99 Metanol

#### **Kristal Viyole Hazırlanması**

Kristal viyole; biyofilm oluşumunu tespit etmek amacıyla 100 ml'de 1 gr olacak şekilde distile su ile hazırlanmıştır.

### 3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN BAKTERİ SUŞLARININ SEÇİLMESİ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli servis ve YBÜ'lerden gelen kan kültürü örneklerinde çok-ilaca-direnci bulunan 10 *K. pneumoniae* ve 10 *A. baumannii* üremeleri çalışmaya dahil edilmiştir. Tanımlamalar otomatize sistem olan BD Phoenix™ ile yapılmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi, kolistin duyarlılığı ise gradiyent testi ile çalışılmıştır. Zon çapları ve Minimal İnhibitör Konsantrasyonu(MİK) sonuçları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda duyarlı (S), dirençli (R) olarak belirlenmiştir.

#### 3.2.1. Bakteri Suşlarının Saklanması

Çalışmaya dahil edilen çok ilaca dirençli *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* suşlarının taze kültürü yapılmış , eküvyon ile besiyerinden toplanarak %10 Gliserinli Brucella Broth sıvı besiyerinin içinde -80°C'lik buzdolabında muhafaza edilmiştir. Her çalışma öncesi besiyerine pasajı alınmış ve tüm çalışmalarda taze kültür kullanılmıştır.

#### 3.2.2. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Seçilen ve -80°C'de saklanan bakteriler, çalışma öncesinde çıkarılıp TSA besiyerine azaltma metodu ile ekimi yapılmış 18-24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Taze kültürden tek düşen koloniler kullanılmıştır. Bakteriler öze yardımı ile steril tuzlu su içerisinde 0.5 McFarland bulanıklık standardına ( $1 \times 10^8$  kob/mL) uygun olacak şekilde sıvı bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan sıvı bakteri süspansiyonundan bir öze dolusu (10 µL) alınıp içerisinde 5 ml TSB sıvı besiyeri olan tüpe aktarılmıştır. Bu tüp 0.5 McFarland bulanıklık standardına ulaşmıca kadar çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübe edilmiştir.

### 3.3. ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU

Toplanan atık su örneklerinden bakteriyofaj izolasyonu için Merabishvili ve diğ. [106] tarafından kullanılan protokol İÜ-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Ekrem Kadri UNAT Laboratuvarı'nın şartlarına uygun olarak modifiye edilmiştir. Atık su örneğinden 35 ml Falkon tüpüne alınarak, üstüne 15 ml distile su eklenmiştir. Karışımın homojenizasyonunu sağlamak için vorteks işlemi uygulanmıştır. İki sıvının bulunduğu falkon tüplerindeki partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve işlem sonrası üst kısımdaki süpernatantın içinde bulunan mikroorganizmaların (bakteri, mantar) uzaklaştırılması için 0.22 µm por çapına sahip enjektör uçlu filtreden geçirilip steril falkon

tüpüne aktarılmıştır. Filtrelenmiş sıvı süspansiyonun bulunduğu falkon tüpüne indikatör bakteri (her *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* suşları farklı tüplere olacak şekilde) kültüründen 1 ml ( $\sim 10^8$  kob/ml), sıvı TSB besiyerinden 10 ml ilave edilmiştir ve vorteks ile iyice karışmaları sağlanmıştır. Bu işlem her bakteri suşu için ayrı ayrı uygulanmıştır. Hazırlanan süspansiyon 18-24 saat 120 rpm, 37°C’de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda bu süspansiyona tekrar santrifüj ve filtreleme işlemi uygulanmıştır. İçinde faj olduğu düşünülen filtrelenmiş sıvı sonraki adımlarda kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

### 3.3.1. Spot Test Yöntemi ile Faj Etkinliklerinin Belirlenmesi

Filtrelenmiş ve zenginleştirilmiş sıvı kültürlerde faj varlığının saptanabilmesi için spot test yöntemi kullanılmıştır. Spot test için ‘ikili agar kaplama metodu’ uygulanmıştır. İçinde 5 ml yumuşak TSA (%0,4 Agar) bulunan tüpler, 40-45°C’ye ayarlanmış benmariye bırakılmıştır. Bu tüpe indikatör bakteri kültüründen 100 µL konulmuş ve vorteks ile iyice karışması sağlanmıştır. Vorteks işleminden sonra, yumuşak agar-bakteri karışımı; içerisinde top agar TSA bulunan petriye yayılmış ve donması için steril kabin içerisinde 15-20 dakika bekletilmiştir. Yumuşak agar donduktan sonra, faj süspansiyonunun damlatılacağı yerler petriye cam kalemi ile işaretlenmiştir. Zenginleştirme ve filtrelenme işlemi uygulanan içinde faj bulunduğu düşünülen süspansiyondan 10-20 µL işaretlenen bölgelere mikropipet yardımı ile damlatılmıştır. Bu işlemler her bakteri suşu için ayrı ayrı yapılmıştır. Petri oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır ve daha sonra kuruyan petri 37°C’de 18-24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan faj plakları gözlemlenmiş ve bu şekilde faj varlığı saptanmıştır.

### 3.3.2. Tek Plak İzolasyonu ile Faj Saflaştırılması

Her bakteri için en saf faj plağının olduğu (içerisinde hiç koloni olmayan) kısım, petrilere steril bisturi ucu ile kesilerek uzaklaştırılmış ve steril falkon tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 3 ml TSB sıvı besiyerinden eklenmiş ve vorteks ile fajların sıvı besiyerine geçmesi sağlanmıştır. İndikatör bakteri kültürü tarif edildiği gibi hazırlanmış ve 100 µL alınarak bu tüp içerisine eklenmiştir. Faj-bakteri adsorbsiyonunu sağlamak amacıyla tekrar vortekslenmiş ardından 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda tüpe 5 ml daha TSB besiyerinden ilave edilmiştir. Hazırlanan falkon tüpü 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücre ve besiyeri artıklarının uzaklaştırılması için 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı 0.22 µm por çapına sahip enjektör uçlu filtreden geçirilip steril falkon tüpüne aktarılmıştır. İleri işlemler için +4 °C’de saklanmıştır.

### 3.3.3. Sıralı Bakteriyofaj Dilüsyonu

Bakteriyofaj titresini belirleyebilmek amacıyla sıralı bakteriyofaj dilüsyonları yapılmıştır. Bunun için mikroplağın ilk kuyucuğuna 200 µL faj, diğer kuyucuklara 100 µL TSB sıvı besiyeri koyulmuştur. İlk kuyucuktan itibaren sırasıyla her kuyucuktan 100 µL alınmış ve altındaki kuyucuğa eklenmiştir. Bu şekilde  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,...,  $10^{-7}$ 'ye kadar dilüe edilmiş faj süspansiyonları elde edilmiştir.

### 3.3.4. Bakteriyofaj Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Her bakteriye ayrı olarak izole edilen ve tek plak izolasyonu ile saflaştırılan fajların konsantrasyonlarının hesaplanması için 'ikili agar kaplama metodu' kullanılmıştır. Tek plak izolasyonu ile saflaştırılan fajlar, stok faj solüsyonu olarak kabul edilmiştir ve bu solüsyonların sıralı dilüsyonları ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,...  $10^{-7}$ ) hazırlanmıştır. Bakteri kültüründen 100 µL ve bakteriyofaj solüsyonundan 200 µL alınarak, içerisinde 5 ml yumuşak agar TSA bulunan tüpe konulmuştur. Her dilüsyon için aynı işlem ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. İçerisinde faj ve bakteri bulunan yumuşak agar vorteks yardımı ile iyice karıştırılmış ve TSA top agar üstüne yayılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra 37 °C etüve kaldırılmış, 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda petrideki faj plakları sayılmıştır. Aşağıdaki formül ile bakteriyofajların pob/ml cinsinde konsantrasyonları hesaplanmıştır.

|  |
|--|
| $\text{Plak Oluşturan Birim (pob/ml)} = \frac{\text{Plak Sayısı} \times \text{Dilüsyon}}{\text{Eklenen Faj Miktarı (ml)}}$ |
|--|

## 3.4. IN VITRO BİYOFİLM TABAKASININ OLUŞTURULMASI

### 3.4.1. Biyofilm Oluşumu İçin Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Bakteri kültürleri yukarıda 3.2.2'de açıklandığı gibi; TSB içerisindeki bakteri 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde hazırlanmıştır. İnkübasyonu tamamlanan bakteri süspansiyonu önce  $1/100$  daha sonra  $1/2$  oranında TSB ile dilüe edilmiştir. Bakteri yükü " $5 \times 10^5$  kob/ml" olacak şekilde ayarlanmıştır.

### 3.4.2. Biyofilm Oluşumunun Tespiti ve Kristal Viyole ile Boyanması

3.4.1'de belirtilen şekilde hazırlanan bakteri süspansiyondan 200 µL alınarak, 96 kuyucuklu U tabanlı mikropalak kuyucuğuna konulmuş ve 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak belirlenen kuyucuğa 200 µL TSB konulmuştur.

İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar mikropipet yardımıyla nazikçe boşaltılmış ve kuyucuklar 250 µL PBS ile iki kez yıkanmıştır. Ardından, mikroplak oda sıcaklığında havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra kuyucuklara 200 µL %99'luk metanol eklenmiş ve 15 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda kuyucuklar boşaltılmış ve mikroplak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuyucuklar kuruduktan sonra %1'lik kristal viyole boyasından her kuyucuğa 200 µL eklenmiş ve 15 dakika bekletilmiştir. Kuyucuklar boşaltılmış ve mikroplakta kalan fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla su ile yıkanmıştır. Biyofilm tabakasındaki boyanın çözünmesi amacıyla her kuyucuğa %96'lık etanolden 200 µL eklenmiş ve 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra mikroplak, OD600 nm'de plak okuyucuda okutulmuştur.

### **3.5. BAKTERİYOFAJLARIN BİYOFİLM ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Çalışmada kullanılmak üzere seçilen çok-ilaca-dirençli suşlar son konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  kob/ml olacak şekilde 3.4.1'de verildiği gibi ayarlanmıştır. Bakteriyofaj süspansiyonları  $10^{-7}$  'ye kadar sıralı bir şekilde dilüe edilmiştir. Stok bakteriyofaj solüsyonu (başlangıç konsantrasyonu-10) ve dilüe edilen konsantrasyonlardan ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , ...  $10^{-7}$ ) her kuyucukta 100 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu U tabanlı mikroplak kuyucuklarına eklenmiştir. Daha sonra içinde bakteriyofaj süspansiyonu bulunan her kuyucuğa, hazırlanan bakteri süspansiyonundan 100 µL ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak 200 µL bakteri süspansiyonu; negatif kontrol olarak ise 200 µL TSB sıvı besiyeri kullanılmıştır. Mikroplak 37°C'de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kuyucuklar boşaltılmış ve 3.4.2'deki şekilde, mikroplak kuyucukları kristal viyole ile boyanıp spektrofotometrede okutulmuş sonuçlar kaydedilmiştir. Fajların biyofilmi inhibe ettiği en düşük konsantrasyon Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu (MBİK) olarak kabul edilmiştir.

### **3.6. BAKTERİYOFAJLARIN BİYOFİLM ÜZERİNE ERADİKASYON ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Bakterilerin kültürleri 3.4.1'de açıklandığı gibi hazırlanmış ve mikroplak kuyucuklarına 200 µL dağıtılmıştır. Pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla; 200 µL bakteri süspansiyonu ve 200 µL TSB kullanılmıştır. 37°C'lik etüvde 18 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda, otomatik pipet yardımıyla kuyucuklar boşaltılmış, oluşan biyofilm tabakasına zarar vermekten kaçınılmıştır. Kuyucuklar 250 µL PBS ile iki kez yıkanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Başka bir steril mikroplakta her bakteri için seçilmiş bakteriyofajların sıralı dilüsyonu yapılmıştır (Yöntem 3.3.3). Hazırlanmış olan dilüsyonlar ( $10-10^{-7}$ ) halihazırda biyofilm oluşturulan mikroplağa inokulum sırasına göre aktarılmıştır. Pozitif ve negatif kontrol kuyucuklarına ise 100 µL TSB eklenmiştir. Mikroplak tekrar 18 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltılmış, Yöntem 3.4.2'deki gibi kristal viyole boyasıyla boyanmıştır. Spektrofotometrede okunan değerler kaydedilmiştir. Fajların biyofilmi eradike ettiği en düşük konsantrasyon Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu (MBEK) olarak kabul edilmiştir.

### 3.6.1. İnhibisyon ve Eradikasyon Oranlarının Hesaplanması

İzole edilen fajların, seçilen bakterilerin biyofilmi üzerindeki inhibisyon ve eradikasyon etkileri plak okuyucuda OD600nm'de okutulduktan sonra kaydedilmiştir. Negatif kontrole en yakın olan okuma değeri, inhibisyon ve eradikasyonun en başarılı; Pozitif kontrole en yakın değer ise inhibisyon ve eradikasyonun en düşük olduğu değer olarak kabul edilmiştir.

$$\frac{[(OD_{PK} - OD_{NK}) - (OD_{ÖRNEK} - OD_{NK})]}{(OD_{PK} - OD_{NK})} \times 100$$

OD: Optik Dansite  
 PK: Pozitif Kontrol (Bakterinin oluşturduğu biyofilm)  
 NK: Negatif Kontrol (Besiyeri)

Yukarıda verilen formül ile fajların bakterilerin oluşturduğu biyofilmler üzerine en iyi ve en düşük, inhibisyon ve eradikasyon yüzdeleri (%) hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. SUŞLARIN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen kan kültürü örneklerinden izole edilen çoklu ilaç direnci bulunan ve çalışmaya dahil edilen 10 *A. baumannii* suşları AB1'den AB10'a kadar; 10 *K. pneumoniae* suşları ise KP1'den KP10'a kadar numaralandırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen suşların antibiyotik duyarlılıkları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de verilmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen *A. baumannii* suşlarımızın tümü test edilen tüm antibiyotiklere (İmipenem, Amikasin, Gentamisin, Siprofloksasin, Meropenem ve Trimetoprim-sulfametoksazol) dirençli bulunmuştur. Kolistin duyarlılıkları gradiyent test yöntemi ile Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) belirlenmiştir. AB2, AB8, AB9 ve AB10 suşlarının kolistine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 4.1: *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.**

| Bakteri / Antibiyotik | AB1           | AB2         | AB3         | AB4            | AB5            | AB6         | AB7         | AB8         | AB9         | AB10        |
|-----------------------|---------------|-------------|-------------|----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| AK                    | R             | R           | R           | R              | R              | R           | R           | R           | R           | R           |
| CN                    | R             | R           | R           | R              | R              | R           | R           | R           | R           | R           |
| MEM                   | R             | R           | R           | R              | R              | R           | R           | R           | R           | R           |
| CIP                   | R             | R           | R           | R              | R              | R           | R           | R           | R           | R           |
| SXT                   | R             | R           | R           | R              | R              | R           | R           | R           | R           | R           |
| IPM                   | R             | R           | R           | R              | R              | R           | R           | R           | R           | R           |
| CT (MİK)*             | S (0,5 µg/ml) | R (8 µg/ml) | S (1 µg/ml) | S (0,25 µg/ml) | S (0,25 µg/ml) | S (1 µg/ml) | S (1 µg/ml) | R (8 µg/ml) | R (4 µg/ml) | R (4 µg/ml) |

Amikasin (AK), Gentamisin (CN), Meropenem (MEM), Siprofloksasin(CIP), Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT), İmipenem (IPM),.

\* Kolistin (CT) Gradiyent testi ile MİK belirlenmiştir.

R: Dirençli, S: Duyarlı

Çalışmamıza dahil edilen 10 *K. pneumoniae* suşundan 4'ünde (KP4, KP5, KP7 ve KP10) kolistin direnci; bütün suşlarda ise karbapenem direnci saptanmıştır. KP8 suşunun, Gentamisin ve Amikasine duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 4.2: *Klebsiella pneumoniae* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.**

| Bakteri<br>Antibiyotik | KP1            | KP2            | KP3            | KP4             | KP5            | KP6              | KP7            | KP8              | KP9            | KP10           |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| AK                     | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | S                | R              | R              |
| CN                     | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | S                | R              | R              |
| ETP                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| IPM                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| MEM                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| CAZ                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| CRO                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| FEP                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| TZP                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| SXT                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| CIP                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| AMP                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| CXM                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| AMC                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| CTX                    | R              | R              | R              | R               | R              | R                | R              | R                | R              | R              |
| CT*                    | S (1<br>µg/ml) | S (1<br>µg/ml) | S (1<br>µg/ml) | R (16<br>µg/ml) | R (8<br>µg/ml) | S (1,5<br>µg/ml) | R (8<br>µg/ml) | S (0,5<br>µg/ml) | S (1<br>µg/ml) | R (8<br>µg/ml) |

Amikasin (AK), Gentamisin (CN), Ertapenem (ETP), İmipenem (IPM), Meropenem (MEM), Seftazidim (CAZ), Seftriakson (CRO), Sefepim (FEP), Piperasilin/Tazobaktam (TZP), Trimetoprim sulfametoksazol (SXT), Siprofloksasin (CIP), Ampisilin (AMP), Sefuroksim (CXM), Amoksilin/Klavulonat (AMC), Sefotaksim (CTX),

\* Kolistin (CT) Gradyent testiyle MİK belirlenmiştir.

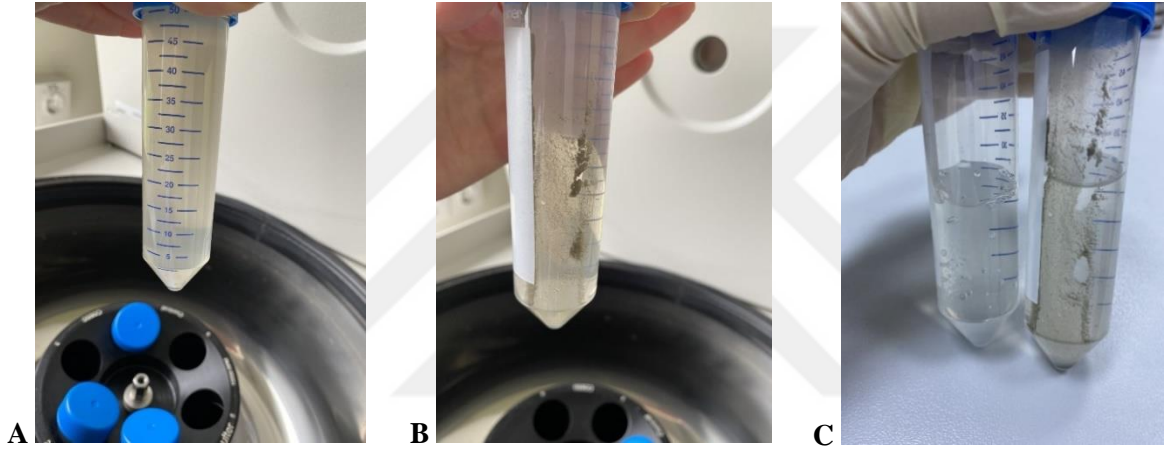
R: Dirençli, S: Duyarlı

## 4.2. BAKTERİYOFAJ VARLIĞININ ve ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Toplanan atık su örneklerinden yöntem kısmında 3.2’de belirtildiği şekilde, 10 *K. pneumoniae* suşu için 12 değişik bakteriyofaj, 10 *A. baumannii* suşu için 12 değişik bakteriyofaj izole edilmiştir.



**Şekil 4.1:** Çalışmamızda kullanılan atık su örneği.



**Şekil 4.2:** A; Atık su süspansiyonunun santrifüj edilmeden önceki hali. B; Santrifüj işlemi sonrasındaki sıvı süspansiyon. C; Atık su süspansiyonunun santrifüj işlemi sonrası filtrelenmiş (Sol) ve filtrelenmemiş hali (Sağ).

İzole edilen bakteriyofajların etkinlikleri ‘Spot test yöntemi’ kullanılarak saptandı. Fajların etki spektrumları aşağıdaki tabloda gösterildiği şekilde belirlenmiştir;

**Tablo 4.3: Bakteriyofajların etki spektrumları**

|   |      |
|---|------|
| Litik etki gözlenmeyenler (faj plağı oluşumu olmayanlar)                                | → -  |
| Az litik etki gösterenler (faj plağının içinde yoğun üreme olanlar)                     | → +  |
| Orta derece litik etki gösterenler (faj plağı içerisinde birkaç koloni üremesi olanlar) | → ++ |
| Çok litik etki gösterenler (plak içerisinde hiç üreme olmayanlar)                       | →+++ |

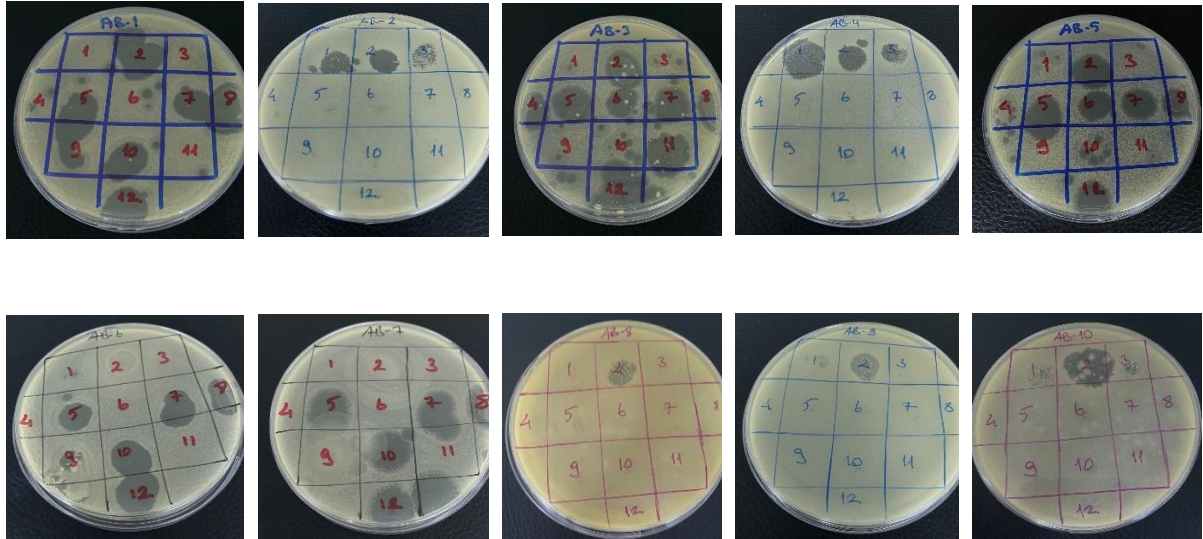
Atık sularından izole edilmiş 12 *A. baumannii* fajının ABF1'den ABF12'ye kadar numaralandırılmıştır. Bu fajların çok-ilaca-dirençli 10 *A. baumannii* suşlarına (AB1 - AB10) olan etkinlikleri Tablo 4.4 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

**Tablo 4.4: İzole edilen fajların *A. baumannii* suşlarına litik etkisi.**

| Faj \ Bakteri | ABF1 | ABF2 | ABF3 | ABF4 | ABF5 | ABF6 | ABF7 | ABF8 | ABF9 | ABF10 | ABF11 | ABF12 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| AB1           | -    | ++   | -    | -    | +++  | -    | ++   | ++   | +++  | +++   | -     | ++    |
| AB2           | ++   | +++  | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -     | -     | -     |
| AB3           | +    | ++   | +    | +    | ++   | +++  | +++  | ++   | +++  | +     | ++    | +++   |
| AB4           | +++  | +++  | ++   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -     | -     | -     |
| AB5           | +    | +++  | -    | +    | +++  | +++  | +++  | +    | -    | +     | -     | +++   |
| AB6           | -    | -    | -    | -    | ++   | -    | +++  | ++   | +    | ++    | -     | +++   |
| AB7           | -    | -    | -    | -    | ++   | -    | +++  | +++  | +++  | ++    | -     | +++   |
| AB8           | -    | ++   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -     | -     | -     |
| AB9           | +    | ++   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -     | -     | -     |
| AB10          | +    | +++  | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -     | -     | -     |

-; Litik etki gözlenmedi.  
 +; Az litik etki gözlemlendi.  
 ++; Orta seviye litik etki gözlemlendi.  
 +++; Çok litik etki gözlemlendi.

Her *A. baumannii* suşuna en yüksek litik etki (+++) gösteren faj, o bakteri için ileri deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen fajlar kırmızı ile işaretlenmiştir.



**Şekil 4.3: *A. baumannii* suşlarına etkili bakteriyofajların saptanması için yapılan spot test sonuçları.**

ABF2 numaralı bakteriyofaj AB6 ve AB7 haricindeki tüm suşlara farklı düzeylerde (+, ++, +++) litik etki gösterir iken dört *A. baumannii* suşuna (AB2, AB8, AB9 ve AB10) birden en iyi litik etkiyi (+++) göstermiştir. ABF1 fajı AB4 suşuna; ABF5 fajı AB5 suşuna; ABF10 fajı ise AB1 suşuna en iyi litik etki göstermiştir. ABF12 numaralı faj ise üç *A. baumannii* suşuna (AB3, AB6 ve AB7) birden en iyi litik etki saptanmıştır. (Tablo 4.4)

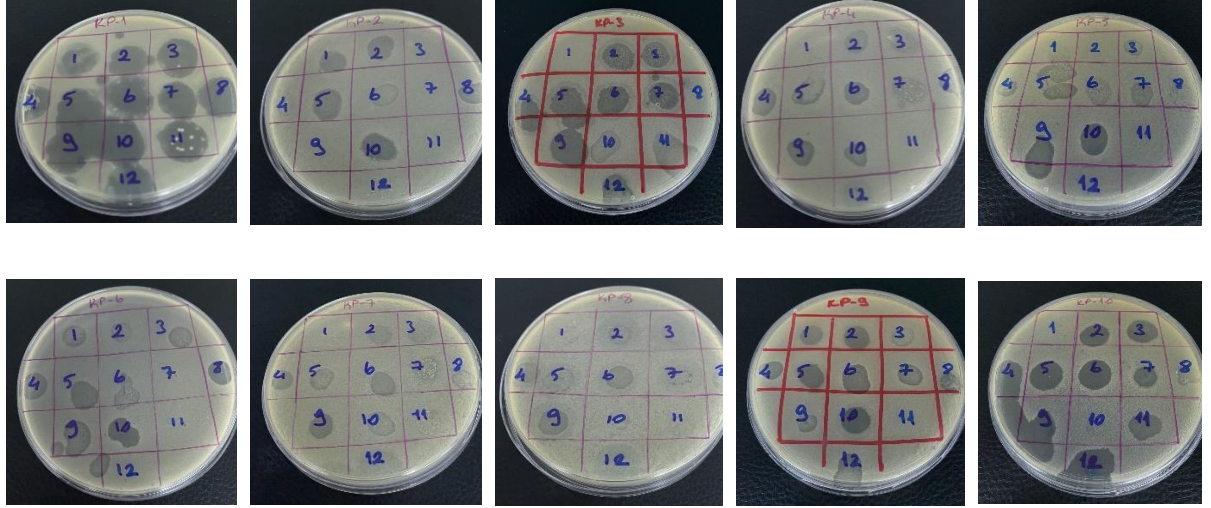
Kolistin dirençli *A. baumannii* suşlarında, fajlara karşı daha düşük düzeyde duyarlılık tespit edilmiştir. ABF12 fajı çalışmamızdaki 10 suştan 5'ine farklı düzeylerde etkili olarak saptanmıştır. Bu fajın etkisiz olduğu diğer 5 suştan 4'ünün de kolistine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Kolistine dirençli bulduğumuz AB8 suşuna, izole ettiğimiz 12 bakteriyofajdan sadece bir tanesi (ABF2) litik etki göstermiştir. Diğer fajların hiçbiri bu suşa etki göstermemiştir. Kolistin direnci bulunan AB2 ve AB10 suşlarına etkili 3, AB9 suşuna ise 2 etkili faj vardır. Kolistin direnci bulunmayan AB6 ve AB7 suşlarına 12 fajdan 6'sı; AB1 suşuna 7'si; AB5 suşuna 9'u ve AB3 suşuna ise izole edilen tüm fajların farklı düzeylerinde etkili olduğu saptanmıştır. (Tablo 4.4)

Atık sulardan izole edilen 12 *K. pneumoniae* fajı KPF1'den KPF12'ye kadar numaralandırılmıştır. Bu fajların 10 *K. pneumoniae* suşlarına (KP1 - KP10) olan litik etkileri Tablo 4.5 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

**Tablo 4.5: İzole edilen fajların *K. pneumoniae* suşlarına litik etkisi.**

| Faj<br>Bakteri   | KPF1 | KPF2 | KPF3 | KPF4 | KPF5 | KPF6  | KPF7 | KPF8 | KPF9 | KPF10 | KPF11 | KPF12 |
|--|------|------|------|------|------|---|------|------|------|-------|-------|-------|
| KP1  | +    | ++   | ++   | +    | ++   | ++  | ++   | ++   | +++  | +     | +     | ++    |
| KP2  | +    | ++   | -    | -    | ++   | +   | -    | ++   | -    | +++   | -     | -     |
| KP3  | -    | +    | +    | ++   | +++  | +++   | ++   | -    | +++  | ++    | +     | ++    |
| KP4  | -    | +    | +    | ++   | +    | +++   | +    | -    | ++   | ++    | -     | +     |
| KP5  | +    | -    | +    | +    | +    | +   | +    | +    | ++   | +++   | -     | -     |
| KP6  | ++   | -    | ++   | ++   | ++   | +   | -    | ++   | ++   | +++   | -     | -     |
| KP7  | -    | +    | +    | ++   | +    | ++  | -    | +    | +++  | +     | -     | +     |
| KP8  | -    | +    | -    | -    | +    | +++   | +    | -    | ++   | -     | -     | +     |
| KP9  | ++   | +++  | +    | +    | +++  | ++  | +    | +    | +    | +++   | -     | +     |
| KP10   | -    | +++  | ++   | ++   | +++  | +++   | ++   | +    | +++  | -     | +     | ++    |
| -; Litik etki gözlenmedi.<br>+; Az litik etki gözlemlendi. |      |      |      |      |      | ++; Orta seviye litik etki gözlemlendi.<br>+++; Çok litik etki gözlemlendi. |      |      |      |       |       |       |

Her *K. pneumoniae* suşuna en iyi litik etki gösteren faj, o bakteri için ileri deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen fajlar kırmızı ile işaretlenmiştir.



**Şekil 4.4: K. pneumoniae suşlarına etkili bakteriyofajların bulunması amacıyla yapılan spot test sonuçları.**

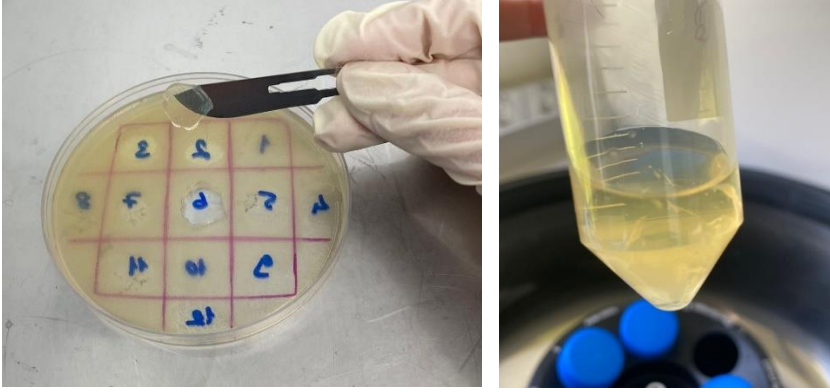
KPF5 ve KPF6 olarak isimlendirilmiş bakteriyofajlar en iyi litik etkiyi KP4 ve KP8 suşlarına göstermiştir. Aynı bakteriyofajlar, tüm *K. pneumoniae* suşlarına farklı düzeyde litik etkili bulunmuştur.

KPF9 bakteriyofajı ise KP2 suşu hariç tüm suşlara farklı derecede litik etki göstermiştir. KPF9 bakteriyofajı, KP1, KP3, KP7 ve KP10 suşlarına en iyi litik etkiyi göstermiştir. KPF10 numaralı faj ise, KP8 ve KP10 suşları haricindeki tüm suşlara farklı düzeylerde litik etki gösterir iken, KP2, KP5, KP6 ve KP9 suşlarına en iyi litik etkiyi göstermiştir. (Tablo 4.5)

*K.pneumoniae* suşlarından 4'ü (KP4, KP5, KP7, KP10) kolistine dirençli saptanmıştır. İzole edilmiş 12 bakteriyofajdan 9'u değişik etki düzeylerinde (+, ++, +++) KP4, KP5 ve KP7 suşlarına etki göstermiştir. KP10 suşuna ise 12 fajdan 10'u etkili bulunmuştur. Kolistin dirençli KP4 suşuna ise KPF6 fajı çok iyi litik etki göstermiş, 3 faj orta ve 5 faj ise az litik etkili saptanmıştır. KP5 numaralı suşa en iyi litik etkiyi KPF10 fajı gösterirken etkili olan diğer fajlar az düzeyde etkili olmuştur. KPF9 fajı KP7 suşuna çok litik etki göstermiş, 2 faj orta ve 6 faj ise az litik etkili tespit edilmiştir.

#### **4.2.1. Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofaj Saflaştırması ve pob Belirlenmesi**

Her bakteriye en iyi litik etkinin “+++” saptandığı bakteriyofajlar steril bistüri yardımıyla petriden uzaklaştırılmış (Şekil 4.5) ve yöntem kısmında 3.2.2’de belirtildiği gibi tek plak izolasyonu ile saflaştırılmıştır.



**Şekil 4.5: Bakteriyofaj plaklarının steril bistüri ile alınması (Sol), Tek plak izolasyonu için hazırlanan süspansiyonun santrifüj sonrası (Sağ).**

Her bakteri suşu için ayrı ayrı çok litik etki gösterip seçilen ve bu suşlara özel tek plak izolasyonu ile saflaştırılan bakteriyofajların konsantrasyonları plak oluşturan birim/ml (pob/ml) cinsinden belirlenmiştir. Biyofilm tabakasının inhibisyon ve eradikasyonunu gözlemek amacıyla çalışmamızda seçilen bakteriyofajlar ve konsantrasyonları Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de verilmiştir.

**Tablo 4.6: *A. baumannii* suşları için seçilen bakteriyofajlar ve fajların konsantrasyonları.**

| Bakteri | Seçilen Bakteriyofaj | Bakteriyofaj Konsantrasyonu (pob/ml) |
|---------|----------------------|--------------------------------------|
| AB1     | ABF10                | $2,2 \times 10^7$                    |
| AB2     | ABF2                 | $2,9 \times 10^7$                    |
| AB3     | ABF12                | $2,6 \times 10^7$                    |
| AB4     | ABF1                 | $1,5 \times 10^8$                    |
| AB5     | ABF5                 | $2,6 \times 10^7$                    |
| AB6     | ABF12                | $1,8 \times 10^7$                    |
| AB7     | ABF12                | $2,6 \times 10^7$                    |
| AB8     | ABF2                 | $5,5 \times 10^6$                    |
| AB9     | ABF2                 | $5,5 \times 10^6$                    |
| AB10    | ABF2                 | $2,9 \times 10^7$                    |

**Tablo 4.7: *K. pneumoniae* suşlarına seçilen bakteriyofajlar ve bu fajların konsantrasyonları.**

| Bakteri | Seçilen Bakteriyofaj | Bakteriyofaj Konsantrasyonu (pob/ml) |
|---------|----------------------|--------------------------------------|
| KP1     | KPF9                 | $6,5 \times 10^8$                    |
| KP2     | KPF10                | $1,8 \times 10^8$                    |
| KP3     | KPF9                 | $6,5 \times 10^8$                    |
| KP4     | KPF6                 | $1,4 \times 10^{10}$                 |
| KP5     | KPF10                | $7,6 \times 10^7$                    |
| KP6     | KPF10                | $1,3 \times 10^8$                    |
| KP7     | KPF9                 | $1,4 \times 10^8$                    |
| KP8     | KPF6                 | $1,4 \times 10^{10}$                 |
| KP9     | KPF10                | $2,1 \times 10^8$                    |
| KP10    | KPF9                 | $1,4 \times 10^8$                    |

### 4.3. BİYOFİLM OLUŞUMUNUN TESPİTİ

Her bakteriye en etkili olarak seçilen ve tek plak izolasyonu ile saflaştırılan fajların, bakterilerin biyofilmine olan inhibisyon ve eradikasyon etkisine bakılmıştır. Bu amaçla izole ettiğimiz bakteriyofajların;  $10$  (başlangıç konsantrasyonu),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ve  $10^{-7}$ 'ye kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bakteriyofajların biyofilm üzerindeki inhibisyon ve eradikasyon yeteneğini saptamak amacıyla kuyucuklar kristal viyole ile boyanmış ve spektrofotometrede  $600 \text{ nm}$ 'de okutulmuştur. Fajların biyofilmi inhibe ettiği en düşük konsantrasyon Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu (MBİK) olarak kabul edilmiştir. Fajların biyofilmi eradike ettiği en düşük konsantrasyon Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu (MBEK) olarak kabul edilmiştir. Deneyler 2 tekrarlı yapılmış ve ortalama değerler alınmıştır.



**Şekil 4.6: 96 kuyucuklu plakların inkübasyon sonrası (Sol). Kristal viyole ile boyanması sonrası (Sağ).**



Şekil 4.7: Suşların biyofilm oluşumunun kristal viyole ile boyanması ve Spektrofotometre cihazında OD ölçümü ile değerlendirilmesi

Tablo 4.8: Seçilen bakteriyofajların *A. baumannii* suşlarının biyofilmleri (AB<sup>b</sup>1 - AB<sup>b</sup>10) üzerine inhibisyon etkisi.

| Biyofilm ve Faj<br>Faj Dilüsyonu | AB <sup>b</sup> 1<br>(ABF10) | AB <sup>b</sup> 2<br>(ABF2) | AB <sup>b</sup> 3<br>(ABF12) | AB <sup>b</sup> 4<br>(ABF1) | AB <sup>b</sup> 5<br>(ABF5) | AB <sup>b</sup> 6<br>(ABF12) | AB <sup>b</sup> 7<br>(ABF12) | AB <sup>b</sup> 8<br>(ABF2) | AB <sup>b</sup> 9<br>(ABF2) | AB <sup>b</sup> 10<br>(ABF2) |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 10                               | 0,141                        | 0,148                       | 0,188                        | 0,236                       | 0,248                       | 0,120                        | 0,156                        | 0,203                       | 0,157                       | 0,214                        |
| 10 <sup>-1</sup>                 | 0,248                        | 0,194                       | 0,241                        | 0,275                       | 0,300                       | 0,130                        | 0,340                        | 0,318                       | 0,264                       | 0,251                        |
| 10 <sup>-2</sup>                 | 0,283                        | 0,213                       | 0,259                        | 0,276                       | 0,352                       | 0,184                        | 0,214                        | 0,380                       | 0,310                       | 0,251                        |
| 10 <sup>-3</sup>                 | 0,209                        | 0,298                       | 0,289                        | 0,322                       | 0,293                       | 0,215                        | 0,560                        | 0,389                       | 0,297                       | 0,475                        |
| 10 <sup>-4</sup>                 | 0,164                        | 0,215                       | 0,250                        | 0,263                       | 0,369                       | 0,373                        | 0,166                        | 0,475                       | 0,391                       | 0,350                        |
| 10 <sup>-5</sup>                 | 0,347                        | 0,323                       | 0,302                        | 0,470                       | 0,536                       | 0,448                        | 0,270                        | 0,468                       | 0,229                       | 0,511                        |
| 10 <sup>-6</sup>                 | 0,547                        | 0,420                       | 0,375                        | 0,287                       | 0,584                       | 0,473                        | 0,455                        | 0,555                       | 0,335                       | 0,557                        |
| 10 <sup>-7</sup>                 | 0,483                        | 0,484                       | 0,440                        | 0,588                       | 0,695                       | 0,563                        | 0,604                        | 0,689                       | 0,523                       | 0,694                        |
| PK                               | 1,063                        | 0,998                       | 0,990                        | 1,063                       | 1,132                       | 1,186                        | 1,146                        | 1,156                       | 1,427                       | 1,568                        |
| NK                               | 0,078                        |                             |                              |                             |                             | 0,077                        |                              |                             |                             |                              |

AB<sup>b</sup>: *A. baumannii* biyofilmi  
PK: Pozitif Kontrol , NK: Negatif Kontrol

Çok-ilaca-dirençli *A. baumannii* suşlarına özgü izole ettiğimiz bakteriyofaj konsantrasyonlarının (10 - 10<sup>-7</sup>), 10 farklı *A. baumannii* suşları ile oluşturulan biyofilmlerin hepsi üzerine bir inhibisyon sağladığını tespit ettik.

ABF10 numaralı bakteriyofajın AB<sup>b1</sup> biyofilmi üzerine en etkili inhibisyon konsantrasyonu, başlangıç konsantrasyonunda (0,141) %93,6 olarak tespit edilmiştir. En düşük inhibisyon ise, 10<sup>-6</sup> (0,547) konsantrasyonda % 52,3 oranında gözlenmiştir. (Tablo 4.8)

ABF2 numaralı bakteriyofajın AB<sup>b2</sup>, AB<sup>b8</sup>, AB<sup>b9</sup> ve AB<sup>b10</sup> biyofilmleri üzerine en etkili konsantrasyonu başlangıç konsantrasyonu olmuştur. AB<sup>b9</sup> biyofilmine %94 (0,157); AB<sup>b2</sup> biyofilmine %92,3 (0,148); AB<sup>b10</sup> biyofilmine %90,8 (0,214) ve AB<sup>b8</sup> biyofilmine ise %88,3 (0,203) oranında etkili olduğu tespit edilmiştir. ABF2 fajının, AB<sup>b2</sup>, AB<sup>b8</sup>, AB<sup>b9</sup> ve AB<sup>b10</sup> biyofilmlerine en düşük inhibisyonu ise, en son sulandırma konsantrasyonumuz olan 10<sup>-7</sup> konsantrasyonunda göstermiştir. Bakteriyofajın 10<sup>-7</sup> konsantrasyonunda, AB<sup>b9</sup> biyofilmine %66,9 (0,523); AB<sup>b10</sup> biyofilmine %58,6 (0,694); AB<sup>b2</sup> biyofilmine %55 (0,484) ve AB<sup>b8</sup> biyofilmine %43,2 (0,689) oranında etkili olduğu hesaplanmıştır. (Tablo 4.8)

ABF12 numaralı bakteriyofaj, AB<sup>b3</sup>, AB<sup>b6</sup> ve AB<sup>b7</sup> biyofilmlerini en etkili başlangıç konsantrasyonunda inhibe etmiştir. AB<sup>b6</sup> biyofilmine %96 (0,120); AB<sup>b7</sup> biyofilmine %92,6 (0,156) ve AB<sup>b3</sup> biyofilmine ise %87,9 (0,188) oranında etkili olmuştur. En düşük inhibisyon ise bu üç biyofilimde 10<sup>-7</sup> konsantrasyonda gözlemlenmiştir. AB<sup>b3</sup> %60,3 (0,440), AB<sup>b6</sup> %56,1 (0,563) ve AB<sup>b7</sup> biyofilmi %50,7 (0,604) oranında inhibe etmiştir. (Tablo 4.8)

ABF1 numaralı bakteriyofajın AB<sup>b4</sup> biyofilmi üzerine en etkili inhibisyon konsantrasyonu başlangıç konsantrasyonunda (0,236) %83,9 olarak; en düşük inhibisyon ise 10<sup>-7</sup> konsantrasyonda (0,588) %48,2 oranında tespit edilmiştir. (Tablo 4.8)

ABF5 olarak isimlendirilmiş faj AB<sup>b5</sup> biyofilmi üzerine başlangıç konsantrasyonunda (0,248) %83,8 oranında en etkili inhibisyonu göstermiştir. En düşük inhibisyon ise 10<sup>-7</sup> konsantrasyonunda (0,695) %41,4 oranında gözlenmiştir. (Tablo 4.8)

Çalışmamızda AB2, AB8, AB9 ve AB10 suşları kolistin dirençli bulunmuştur. ABF2 olarak isimlendirilen faj kolistin dirençli AB<sup>b2</sup>; AB<sup>b8</sup>; AB<sup>b9</sup> ve AB<sup>b10</sup> biyofilmlerini , sırasıyla %92,3; %88,3; %94 ve %90,8 oranlarında en etkili şekilde inhibe edildiği saptanmıştır.

**Tablo 4.9: Seçilen bakteriyofajların farklı konsantrasyonlarının *A. baumannii* suşlarının oluşturduğu biyofilmler (AB<sup>b</sup>1-AB<sup>b</sup>10) üzerine eradikasyon etkisi.**

| Biyofilm ve Faj Eri Dilüsyonu | AB <sup>b</sup> 1 (ABF10) | AB <sup>b</sup> 2 (ABF2) | AB <sup>b</sup> 3 (ABF12) | AB <sup>b</sup> 4 (ABF1) | AB <sup>b</sup> 5 (ABF5) | AB <sup>b</sup> 6 (ABF12) | AB <sup>b</sup> 7 (ABF12) | AB <sup>b</sup> 8 (ABF2) | AB <sup>b</sup> 9 (ABF2) | AB <sup>b</sup> 10 (ABF2) |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 10                            | 0,165                     | 0,171                    | 0,136                     | 0,198                    | 0,224                    | 0,208                     | 0,211                     | 0,293                    | 0,177                    | 0,242                     |
| 10 <sup>-1</sup>              | 0,170                     | 0,257                    | 0,147                     | 0,208                    | 0,264                    | 0,357                     | 0,192                     | 0,408                    | 0,203                    | 0,219                     |
| 10 <sup>-2</sup>              | 0,203                     | 0,266                    | 0,167                     | 0,206                    | 0,276                    | 0,340                     | 0,274                     | 0,353                    | 0,440                    | 0,262                     |
| 10 <sup>-3</sup>              | 0,247                     | 0,298                    | 0,293                     | 0,200                    | 0,298                    | 0,330                     | 0,338                     | 0,442                    | 0,250                    | 0,296                     |
| 10 <sup>-4</sup>              | 0,204                     | 0,255                    | 0,291                     | 0,309                    | 0,368                    | 0,424                     | 0,469                     | 0,575                    | 0,279                    | 0,305                     |
| 10 <sup>-5</sup>              | 0,297                     | 0,324                    | 0,367                     | 0,286                    | 0,270                    | 0,560                     | 0,363                     | 0,732                    | 0,349                    | 0,579                     |
| 10 <sup>-6</sup>              | 0,617                     | 0,331                    | 0,502                     | 0,399                    | 0,541                    | 0,945                     | 0,510                     | 0,755                    | 0,647                    | 0,481                     |
| 10 <sup>-7</sup>              | 0,829                     | 0,494                    | 0,832                     | 0,533                    | 0,897                    | 0,748                     | 0,838                     | 0,813                    | 1,056                    | 1,089                     |
| PK                            | 1,462                     | 1,476                    | 1,199                     | 1,009                    | 1,546                    | 1,286                     | 1,663                     | 1,157                    | 1,810                    | 1,912                     |
| NK                            | 0,085                     |                          |                           |                          |                          | 0,083                     |                           |                          |                          |                           |

AB<sup>b</sup>: *A. baumannii* biyofilmi

PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

Çok-ilaca-dirençli *A. baumannii* suşlarına özgü izole ettiğimiz bakteriyofaj konsantrasyonlarının(10-10<sup>-7</sup>), 10 farklı *A. baumannii* suşlarının oluşturdukları biyofilmlerin hepsi üzerine bir eradikasyon sağladığını tespit ettik.

ABF10 numaralı bakteriyofajın AB<sup>b</sup>1 biyofilmi üzerine en etkili eradikasyonu başlangıç konsantrasyonunda (0,265) %94,1 oranında tespit edilmiştir. En düşük eradikasyon ise 10<sup>-7</sup> konsantrasyonunda (0,829) %45,9 olarak gözlenmiştir. (Tablo 4.9)

ABF2 numaralı bakteriyofaj AB<sup>b</sup>2, AB<sup>b</sup>8 ve AB<sup>b</sup>9 biyofilmleri üzerine başlangıç konsantrasyonunda, AB<sup>b</sup>10 biyofilmine ise 10<sup>-1</sup> konsantrasyonunda en fazla etki gözlemlenmiştir. AB<sup>b</sup>9 biyofilmini %94,5 (0,177), AB<sup>b</sup>2 biyofilmini %93,8 (0,171), AB<sup>b</sup>10 biyofilmini %92,5 (0,219) ve AB<sup>b</sup>8 biyofilmini ise %80,4 (0,293) oranında eradike etmiştir. En düşük eradikasyon ise dört biyofilimde de 10<sup>-7</sup> konsantrasyonunda olmuştur. AB<sup>b</sup>2 biyofilmi %70,5 (0,494), AB<sup>b</sup>10 biyofilmi %44,9 (1,089), AB<sup>b</sup>9 biyofilmi %43,6 (1,056) ve AB<sup>b</sup>8 biyofilmi ise %32 (0,813) oranında eradikasyon tespit edilmiştir. (Tablo 4.9)

ABF12 numaralı bakteriyofaj, AB<sup>b3</sup> ve AB<sup>b6</sup> biyofilmlerini en etkili başlangıç konsantrasyonunda, AB<sup>b7</sup> biyofilmini ise en etkili 10<sup>-1</sup> konsantrasyonunda eradike etmiştir. AB<sup>b3</sup> biyofilmi %95,4 (0,136), AB<sup>b7</sup> biyofilmi %93,1 (0,192) ve AB<sup>b6</sup> biyofilmi ise %89,6 (0,208) oranında eradike edilmiştir. En düşük eradikasyon ise AB<sup>b3</sup> ve AB<sup>b7</sup> biyofilmlerinde 10<sup>-7</sup> konsantrasyonda gözlenmiştir. AB<sup>b7</sup> biyofilmi %52,2 (0,838), AB<sup>b3</sup> biyofilmi ise %32,9 (0,832) oranında eradike edilir iken AB<sup>b6</sup> biyofilmi en düşük 10<sup>-6</sup> konsantrasyonunda (0,945) %28,3 oranında eradikasyona uğramıştır. (Tablo 4.9)

ABF1 olarak isimlendirilmiş bakteriyofajın AB<sup>b4</sup> biyofilmi üzerine en etkili eradikasyon konsantrasyonu başlangıç konsantrasyonunda (0,198) %87,7 olarak; en düşük eradikasyon ise 10<sup>-7</sup> konsantrasyonunda (0,533) %51,5 oranında tespit edilmiştir. (Tablo 4.9)

ABF5 numaralı fajı AB<sup>b5</sup> biyofilmini en etkili başlangıç konsantrasyonunda (0,224) %90,4 oranında eradike etmiştir. En düşük etki ise 10<sup>-7</sup> konsantrasyonunda (0,897) %44,4 oranında tespit edilmiştir. (Tablo 4.9)

ABF2 olarak isimlendirilmiş bakteriyofaj kolistin dirençli AB<sup>b2</sup>; AB<sup>b8</sup>; AB<sup>b9</sup> ve AB<sup>b10</sup> suşlarını, sırasıyla %93,8; %80,4; %94,5 ve %92,5 oranlarında eradike ettiği saptanmıştır.



**Şekil 4.8: Mikroplakların inkübasyon sonrası (Sol). Kristal viyole yöntemi ile boyanması sonrası (Sağ).**

**Tablo 4.10: *K. pneumoniae* suşları için seçilen bakteriyofajların *K. pneumoniae* biyofilmleri (KP<sup>b</sup>1 - KP<sup>b</sup>10) üzerine inhibisyon etkisi.**

| Biyofilm ve Faj<br>Eş. Dilüsyonu | KP <sup>b</sup> 1<br>(KPF9) | KP <sup>b</sup> 2<br>(KPF10) | KP <sup>b</sup> 3<br>(KPF9) | KP <sup>b</sup> 4<br>(KPF6) | KP <sup>b</sup> 5<br>(KPF10) | KP <sup>b</sup> 6<br>(KPF10) | KP <sup>b</sup> 7<br>(KPF9) | KP <sup>b</sup> 8<br>(KPF6) | KP <sup>b</sup> 9<br>(KPF10) | KP <sup>b</sup> 10<br>(KPF9) |
|----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 10                               | 0,199                       | 0,307                        | 0,282                       | 0,273                       | 0,267                        | 0,269                        | 0,311                       | 0,265                       | 0,291                        | 0,252                        |
| 10 <sup>-1</sup>                 | 0,275                       | 0,358                        | 0,319                       | 0,287                       | 0,289                        | 0,343                        | 0,409                       | 0,303                       | 0,310                        | 0,406                        |
| 10 <sup>-2</sup>                 | 0,267                       | 0,328                        | 0,350                       | 0,299                       | 0,303                        | 0,374                        | 0,406                       | 0,387                       | 0,338                        | 0,392                        |
| 10 <sup>-3</sup>                 | 0,300                       | 0,371                        | 0,352                       | 0,381                       | 0,393                        | 0,465                        | 0,412                       | 0,317                       | 0,337                        | 0,393                        |
| 10 <sup>-4</sup>                 | 0,367                       | 0,418                        | 0,392                       | 0,369                       | 0,362                        | 0,377                        | 0,501                       | 0,545                       | 0,509                        | 0,428                        |
| 10 <sup>-5</sup>                 | 0,433                       | 0,396                        | 0,452                       | 0,424                       | 0,408                        | 0,453                        | 0,652                       | 0,585                       | 0,557                        | 0,456                        |
| 10 <sup>-6</sup>                 | 0,551                       | 0,412                        | 0,392                       | 0,521                       | 0,632                        | 0,459                        | 0,683                       | 0,608                       | 0,619                        | 0,575                        |
| 10 <sup>-7</sup>                 | 0,491                       | 0,588                        | 0,616                       | 0,531                       | 0,770                        | 0,559                        | 0,621                       | 0,717                       | 0,895                        | 0,646                        |
| PK                               | 1,168                       | 1,199                        | 1,211                       | 1,250                       | 1,290                        | 1,073                        | 1,565                       | 1,233                       | 1,408                        | 1,479                        |
| NK                               | 0,074                       |                              |                             |                             |                              | 0,076                        |                             |                             |                              |                              |

KP<sup>b</sup> : *K.pneumoniae* Biyofilmi  
PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

Çok-ilaca-dirençli *K. pneumoniae* suşlarına özgü izole ettiğimiz bakteriyofaj konsantrasyonlarının (10-10<sup>-7</sup>), 10 farklı *K. pneumoniae* suşları ile oluşturulan biyofilmlerin hepsi üzerine bir inhibisyon sağladığını tespit ettik.

KPF9 numaralı bakteriyofaj KP<sup>b</sup>1, KP<sup>b</sup>3, KP<sup>b</sup>7 ve KP<sup>b</sup>10 biyofilmleri üzerine en etkili inhibisyon konsantrasyonu başlangıç konsantrasyonunda tespit edilmiştir. KP<sup>b</sup>1 biyofilmini %88,5 (0,199), KP<sup>b</sup>10 biyofilmini %87,4 (0,252), KP<sup>b</sup>7 biyofilmini %84,2 (0,311) ve KP<sup>b</sup>3 biyofilmini ise %81,7 (0,282) oranında inhibe etmiştir. KP<sup>b</sup>1 ve KP<sup>b</sup>7 biyofilmleri üzerine en düşük inhibisyon 10<sup>-6</sup> konsantrasyonunda gözlenmiştir. KP<sup>b</sup>7 biyofilmi %59,2 (0,683), KP<sup>b</sup>1 biyofilmi ise %56,3 (0,551) oranında inhibe edilmiştir. KP<sup>b</sup>3 ve KP<sup>b</sup>10 biyofilmlerinde ise en düşük inhibisyon 10<sup>-7</sup> konsantrasyonunda gözlenmiştir. KP<sup>b</sup>10 biyofilmi ise %59,3 (0,646), KP<sup>b</sup>3 biyofilmi %52,3 (0,616) oranında en düşük oranda inhibe edilmiştir. (Tablo 4.10)

KPF10 numaralı bakteriyofaj KP<sup>b</sup>2, KP<sup>b</sup>5, KP<sup>b</sup>6 ve KP<sup>b</sup>9 biyofilmleri üzerine en etkili inhibisyon başlangıç konsantrasyonunda olmuştur. KP<sup>b</sup>5 biyofilmini %84,1 (0,267), KP<sup>b</sup>9 biyofilmini %83,8 (0,291), KP<sup>b</sup>6 biyofilmini %80,6 (0,269) ve KP<sup>b</sup>2 biyofilmini %79,2 (0,307)

oranında inhibe etmiştir. En düşük inhibisyon  $10^{-7}$  konsantrasyonunda kaydedilmiştir. KP<sup>b</sup>2 biyofilmi %54,3 (0,588), KP<sup>b</sup>6 biyofilmi %51,5 (0,559), KP<sup>b</sup>5 biyofilmi %42,7 (0,770) ve KP<sup>b</sup>9 biyofilmi %38,5 (0,895) oranında inhibisyona uğramıştır. (Tablo 4.10)

KPF6 numaralı faj KP<sup>b</sup>4 ve KP<sup>b</sup>8 biyofilmleri üzerine en etkili inhibisyon konsantrasyonu başlangıç konsantrasyonunda görülmüştür. KP<sup>b</sup>8 biyofilmi %83,6 (0,265), KP<sup>b</sup>4 biyofilmi ise %83 (0,273) oranında en fazla inhibisyona uğramıştır. Her iki biyofilm için de en düşük inhibisyon ise  $10^{-7}$  konsantrasyonunda kaydedilmiştir. KP<sup>b</sup>4 biyofilmi %61,1 (0,531) ve KP<sup>b</sup>8 biyofilmi %44,5 (0,717) oranında inhibe edilmiştir. (Tablo 4.10)

Çalışmamızdaki KP4, KP5, KP7 ve KP10 suşlarında kolistin direnci saptanmıştır. KPF9 fajının, KP7 ve KP10 suşlarının oluşturduğu biyofilmleri sırasıyla %84,2 ve %87,4 oranlarıyla en iyi inhibisyonu sağladığı gözlemlenmiştir. Kolistin dirençli bir diğer suş olan KP4'ün oluşturduğu biyofilmi KPF6 fajı %83; KP5 suşunun biyofilmini ise KPF10 fajı %84,1 oranında inhibe etmiştir.

**Tablo 4.11: İzole edilen her bakteri suşu için seçilen fajların farklı konsantrasyonlarının *K. pneumoniae* biyofilmlerine (KP<sup>b</sup>1-KP<sup>b</sup>10) eradikasyon etkisi.**

| Biyofilm ve Faj<br>Faj Dilüsyonu | KP <sup>b</sup> 1<br>(KPF9) | KP <sup>b</sup> 2<br>(KPF10) | KP <sup>b</sup> 3<br>(KPF9) | KP <sup>b</sup> 4<br>(KPF6) | KP <sup>b</sup> 5<br>(KPF10) | KP <sup>b</sup> 6<br>(KPF10) | KP <sup>b</sup> 7<br>(KPF9) | KP <sup>b</sup> 8<br>(KPF6) | KP <sup>b</sup> 9<br>(KPF10) | KP <sup>b</sup> 10<br>(KPF9) |
|----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 10                               | 0,381                       | 0,271                        | 0,202                       | 0,216                       | 0,164                        | 0,250                        | 0,146                       | 0,237                       | 0,248                        | 0,348                        |
| 10 <sup>-1</sup>                 | 0,389                       | 0,338                        | 0,298                       | 0,220                       | 0,217                        | 0,305                        | 0,155                       | 0,322                       | 0,299                        | 0,364                        |
| 10 <sup>-2</sup>                 | 0,398                       | 0,464                        | 0,357                       | 0,262                       | 0,251                        | 0,268                        | 0,220                       | 0,288                       | 0,336                        | 0,442                        |
| 10 <sup>-3</sup>                 | 0,419                       | 0,435                        | 0,382                       | 0,225                       | 0,377                        | 0,327                        | 0,263                       | 0,371                       | 0,385                        | 0,397                        |
| 10 <sup>-4</sup>                 | 0,509                       | 0,522                        | 0,412                       | 0,401                       | 0,456                        | 0,313                        | 0,395                       | 0,383                       | 0,468                        | 0,471                        |
| 10 <sup>-5</sup>                 | 0,508                       | 0,547                        | 0,393                       | 0,456                       | 0,384                        | 0,397                        | 0,449                       | 0,442                       | 0,429                        | 0,868                        |
| 10 <sup>-6</sup>                 | 0,420                       | 0,546                        | 0,527                       | 0,411                       | 0,538                        | 0,529                        | 0,566                       | 0,475                       | 0,632                        | 0,611                        |
| 10 <sup>-7</sup>                 | 0,885                       | 0,596                        | 0,575                       | 0,511                       | 0,655                        | 0,541                        | 0,595                       | 0,543                       | 1,024                        | 0,967                        |
| PK                               | 1,595                       | 1,798                        | 1,428                       | 1,328                       | 1,287                        | 1,507                        | 1,415                       | 1,735                       | 2,017                        | 2,045                        |
| NK                               | 0,081                       |                              |                             |                             |                              | 0,072                        |                             |                             |                              |                              |

KP<sup>b</sup> : *K.pneumoniae* Biyofilmi  
PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

Çok-ilaca-dirençli *K. pneumoniae* suşlarına özgü izole ettiğimiz bakteriyofaj konsantrasyonlarının ( $10 \cdot 10^{-7}$ ), 10 farklı *K. pneumoniae* suşları ile oluşturulan biyofilmlerin hepsi üzerine bir eradikasyon sağladığını tespit ettik.

KPF9 numaralı bakteriyofaj KP<sup>b</sup>1, KP<sup>b</sup>3, KP<sup>b</sup>7 ve KP<sup>b</sup>10 biyofilmleri üzerine en etkili eradikasyon konsantrasyonu başlangıç konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Kolistin dirençli olan KP<sup>b</sup>7 biyofilmini %94,4 (0,146), KP<sup>b</sup>10 biyofilmini ise %86 (0,348) oranında eradike etmiştir. KPF9 fajı KP<sup>b</sup>3 biyofilmini %91 (0,202), ve KP<sup>b</sup>1 biyofilmini %80,1 (0,381) oranında eradike etmiştir. KPF9 fajı için en düşük eradikasyon ise KP<sup>b</sup>1, KP<sup>b</sup>3, KP<sup>b</sup>7 ve KP<sup>b</sup>10 biyofilmlerinde  $10^{-7}$  konsantrasyonda tespit edilmiştir. KP<sup>b</sup>3 biyofilmi %63,3 (0,575), KP<sup>b</sup>7 biyofilmi %61 (0,595), KP<sup>b</sup>10 biyofilmi %54,6 (0,967) ve KP<sup>b</sup>1 biyofilmi %46,8 (0,885) oranında eradikasyona uğramıştır. (Tablo 4.11)

KPF10 bakteriyofajı KP<sup>b</sup>2, KP<sup>b</sup>5, KP<sup>b</sup>6 ve KP<sup>b</sup>9 biyofilmleri üzerine en etkili eradikasyon konsantrasyonu başlangıç konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Kolistin dirençli KP<sup>b</sup>5 biyofilmi %92,4 (0,164) oranında eradike etmiştir. KP<sup>b</sup>9 biyofilmi %90,6 (0,248), KP<sup>b</sup>2 biyofilmi %88,9 (0,271) ve KP<sup>b</sup>6 biyofilmi ise %87,5 (0,250) oranında eradike edilmiştir. KPF10 bakteriyofajının en düşük eradikasyonu KP<sup>b</sup>2, KP<sup>b</sup>5, KP<sup>b</sup>6 ve KP<sup>b</sup>9 biyofilmlerinde  $10^{-7}$  konsantrasyonunda görülmüştür. KP<sup>b</sup>5 biyofilmi %73 (0,655), KP<sup>b</sup>2 biyofilmi %69,6 (0,596), KP<sup>b</sup>6 biyofilmi %67,3 (0,541) ve KP<sup>b</sup>9 biyofilmi %51 (1,024) oranında eradike etmiştir. (Tablo 4.11)

KPF6 olarak isimlendirilen bakteriyofajının KP<sup>b</sup>4 ve KP<sup>b</sup>8 biyofilmleri üzerine en etkili eradikasyonu başlangıç konsantrasyonunda saptanmıştır. KP<sup>b</sup>8 biyofilmi %90 (0,237) ve Kolistin dirençli olan KP<sup>b</sup>4 biyofilmi %89,1 (0,216) oranında eradike edilmiştir. En düşük eradikasyon ise iki biyofilm için de  $10^{-7}$  konsantrasyonunda kaydedilmiştir. KP<sup>b</sup>8 biyofilmi %71,6 (0,543) ve KP<sup>b</sup>4 biyofilmi %65,5 (0,511) oranında eradike edilmiştir. (Tablo 4.11)

KPF6 bakteriyofajı Kolistin dirençli KP<sup>b</sup>4 suşunun olgun biyofilmini %89,1; KPF10 fajı ise Kolistin dirençli KP<sup>b</sup>5 biyofilmini %92,4 olarak en başarılı oranda eradike etmiştir. KPF9 numaralı fajın Kolistin direnci bulunan KP<sup>b</sup>7 ve KP<sup>b</sup>10' un oluşturduğu olgun biyofilmleri sırasıyla; %94,4 ve %86 oranlarında en etkili eradikasyonu sağladığı saptanmıştır.

**Tablo 4.12: İzole edilen ve suşlar için seçilen fajların *A. baumannii* suşlarının oluşturdukları biyofilmlere etki oranları.**

| Biyofilm \ Oranlar | En İyi İnhibisyon Oranı | En Düşük İnhibisyon Oranı | En İyi Eradikasyon Oranı | En Düşük Eradikasyon Oranı |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| AB <sup>b</sup> 1  | %93,6                   | %52,3                     | %94,1                    | %45,9                      |
| AB <sup>b</sup> 2  | %92,3                   | %55                       | %93,8                    | %70,5                      |
| AB <sup>b</sup> 3  | %87,9                   | %60,3                     | %95,4                    | %32,9                      |
| AB <sup>b</sup> 4  | %83,9                   | %48,2                     | %87,7                    | %51,5                      |
| AB <sup>b</sup> 5  | %83,8                   | %41,4                     | %90,4                    | %44,4                      |
| AB <sup>b</sup> 6  | %96                     | %56,1                     | %89,6                    | %28,3                      |
| AB <sup>b</sup> 7  | %92,6                   | %50,7                     | %93,1                    | %52,2                      |
| AB <sup>b</sup> 8  | %88,3                   | %43,2                     | %80,4                    | %32                        |
| AB <sup>b</sup> 9  | %94                     | %66,9                     | %94,5                    | %43,6                      |
| AB <sup>b</sup> 10 | %90,8                   | %58,6                     | %92,5                    | %44,9                      |

Atık sulardan izole ettiğimiz bakteriyofajlar, çok-ilaca-dirençli *A. baumannii* suşları ile oluşturulan biyofilmleri %94 ile %41,4 oranları arasında inhibe, %94,50 ile %28,3 oranları arasında ise eradike etmiştir. (Tablo 4.12)

ABF2 numaralı bakteriyofaj AB<sup>b</sup>2, AB<sup>b</sup>8, AB<sup>b</sup>9 ve AB<sup>b</sup>10 suşlarının oluşturdukları biyofilmlerin inhibisyonunda ortalama %91,3, eradikasyonunda ise %90,3 oranında etki etmiştir.

ABF12 numaralı bakteriyofaj AB<sup>b</sup>3, AB<sup>b</sup>6 ve AB<sup>b</sup>7 suşlarının oluşturdukları biyofilmleri ortalama %92,1 oranında inhibe, %92,7 oranında ise eradike etmiştir.

**Tablo 4.13: *K. pneumoniae* biyofilmlerine bakteriyofajların etki oranları.**

| Biyofilm \ Oranlar | En İyi İnhibisyon Oranı | En Düşük İnhibisyon Oranı | En İyi Eradikasyon Oranı | En Düşük Eradikasyon Oranı |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| KP <sup>b</sup> 1  | %88,5                   | %56,3                     | %80,1                    | %46,8                      |
| KP <sup>b</sup> 2  | %79,2                   | %54,3                     | %88,9                    | %69,6                      |
| KP <sup>b</sup> 3  | %81,7                   | %52,3                     | %91                      | %63,3                      |
| KP <sup>b</sup> 4  | %83                     | %61,1                     | %89,1                    | %65,5                      |
| KP <sup>b</sup> 5  | %84,1                   | %42,7                     | %92,4                    | %73                        |
| KP <sup>b</sup> 6  | %80,6                   | %51,5                     | %87,5                    | %67,3                      |
| KP <sup>b</sup> 7  | %84,2                   | %59,2                     | %94,4                    | %61                        |
| KP <sup>b</sup> 8  | %83,6                   | %44,5                     | %90                      | %71,6                      |
| KP <sup>b</sup> 9  | %83,8                   | %38,5                     | %90,6                    | %51                        |
| KP <sup>b</sup> 10 | %87,4                   | %59,3                     | %86                      | %54,6                      |

İzole ettiğimiz fajlar, çok-ilaca-dirençli *K. pneumoniae* suşlarının oluşturdukları biyofilmleri %88,5 ile %38,5 oranları arasında inhibe, %94,4 ile %46,8 oranları arasında ise eradike etmiştir. (Tablo 4.13)

KPF9 numaralı bakteriyofaj KP<sup>b</sup>1, KP<sup>b</sup>3, KP<sup>b</sup>7 ve KP<sup>b</sup>10 suşlarının oluşturdukları biyofilmlerin inhibisyonunda ortalama %85,4, eradikasyonunda ise %87,7 oranında etki etmiştir.

KPF10 numaralı bakteriyofaj KP<sup>b</sup>2, KP<sup>b</sup>5, KP<sup>b</sup>6 ve KP<sup>b</sup>9 suşlarının biyofilmlerinin inhibisyonunda ortalama %81,9, eradikasyonunda ise %89,8 oranında etki etmiştir.

KPF6 bakteriyofajı KP<sup>b</sup>4 ve KP<sup>b</sup>8 suşlarının biyofilmlerini ortalama %83,3 oranında inhibe, %89,5 oranında eradike etmiştir.

## 5. TARTIŞMA

2017’de DSÖ’nün yayınladığı ‘öncelikli patojenler’ listesinde, antibiyotik direncinin yüksek düzeyde bulunduğu ve tedavilere cevap vermeme özelliği bulunan 6 patojen bakteri arasında *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* yer almaktadır. Bu bakteriler hastane enfeksiyonlarında kritik rol oynar ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olurlar.

*A. baumannii* dünya çapında HKE ilişkili en önemli fırsatçı patojenlerdendir. Neden olduğu enfeksiyonlar arasında; kan dolaşımı enfeksiyonları, ventilatör ilişkili pnömoni, sekonder menenjit, yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonu vardır. Dünya çapında YBÜ’de meydana gelen enfeksiyonların %20’sini *A. baumannii* oluşturur. Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, bu patojeni hastanelerdeki çok-ilaca-dirençli en önemli mikroorganizmalar arasında tanımlamıştır [28]. Çok-ilaca-dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu olan hastalarda mortalite %70 olarak bildirilmiştir [31].

*K. pneumoniae*’nin neden olduğu enfeksiyonlar arasında; septisemi, bronşit, pnömoni, safra yolu iltihapları, menenjit ve idrar yolu enfeksiyonları vardır ve Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların neredeyse üçte birinden sorumludur [52]. ABD’de hastane kaynaklı pnömonilerin en sık nedenlerinden biridir ve tüm hastane enfeksiyonlarının %3 ile %8’ini *K. pneumoniae* oluşturmaktadır [53].

Biyofilm, mikroorganizmaların kendilerini çevresel etkenlerden, antibiyotik ve dezenfektanlardan, besin azlığından koruyabilmek amacıyla meydana getirdikleri ekosistemler olarak tarif edilebilmektedir. Biyofilm içerisindeki bakteriler, planktonik formları ile kıyaslandığında antimikrobiyal ajanlara 10 - 1000 kat daha dirençli oldukları bilinmektedir [78]. Deneyler ve klinik gözlemler ışığında biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde tek başına antibiyotik kullanımının yetersiz olduğu görülmektedir [10].

*A. baumannii*, besin yokluğu, kuruluk ve antimikrobiyal ilaçlar gibi olumsuz koşullarda bile canlılığını sürdürebilir. Bu yüzden epitel hücreleri gibi biyotik yüzeylerde; kateter ve cam gibi abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturabilirler. *A. baumannii*’ler sahip oldukları Tip I Pili sayesinde hücrelere tutunur ve oluşturdukları biyofilmler ile hastane ekipmanlarında

canlılıklarını sürdürüp, hastane enfeksiyonlarında önemli rol oynarlar. *K. pneumoniae*, kapsülü sayesinde fagositozdan kaçarken sahip olduğu fimbria sayesinde hedef hücreye bağlanır ve biyofilm oluşturabilir. Endotrakeal tüpte kolonize olup akciğer enfeksiyonlarına neden olur [45].

1917’de Felix d’Herelle, yaptığı araştırmalarla bakteri virüslerini keşfetmiş, ‘bakteriyofaj’ olarak adlandırmıştır. 1919 yılında ise bir hastasına bakteriyofaj tedavisi uygulamıştır ve bu tedavi başarı ile sonuçlanmıştır [86,88]. 1920’lerde fajlar ile tedavi edilen hastalıklar arasında dizanteri, deri enfeksiyonları, kolera, bubonik veba ve konjonktivit bulunmaktadır [104].

Antibiyotikler, 1928’de Alexander Fleming’in penisilini keşfetmesi ile insanların hayatına girmiş ve bakteriyel hastalıkların tedavisinde etkin şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Antibiyotikler; etki ettiği bakteri grubunun geniş olması ve fajlara nispeten daha basit elde edilebilir olması nedeniyle faj tedavisinin önüne geçmiştir. Özellikle savaş döneminde, hızlı ve etkili bir tedavi yöntemi olan antibiyotikler çok tercih edilen bir yöntem olduğundan faj tedavisini geri planda bırakmıştır.

Türkiye Sağlık Bakanlığı tarafından 2016 yılında yayınlanan ‘Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi’ raporunda; ülkemizde *K. pneumoniae* için çoklu ilaç direnci oranı %46, *A. baumannii* suşlarında ise %83,5 olarak bildirilmiştir. CEASER’in 2020 raporuna göre Türkiye’de hastalardan izole edilen *A. baumannii* suşlarının çoklu ilaç direnç oranı %80 iken *K. pneumoniae* suşlarının %40 olarak bildirilmiştir.

Son yıllarda geliştirilen ertapenem, tigesiklin ve kolistin Gram negatif bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Ertapeneme doğal dirençli olan *A. baumannii*, tigesiklin ve kolistin direnci de çalışmalarda bildirilmiştir [39–41]. Sentetik beta-laktamaz inhibitör kombinasyonu olarak kullanılan Seftazidim-avibaktam da son zamanlarda gelişen direnç [107] ile halihazırda kullanımda olan çoğu antibiyotiğe direnç gelişmesi günümüzün en önemli sorunlarından birisidir.

Antibiyotik geliştirme ve keşif oranları düşük iken halihazırda mevcut olan direnç oranı küresel bir sorun haline gelmiştir ve insan sağlığını ciddi boyutta tehdit etmektedir. Bu sebeple bakteriyel enfeksiyonların etkin tedavisinde alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Giderek artan antibiyotik direnciyle mücadelede bakteriyofaj tedavisinin çekici ve etkin bir çözüm olabileceği düşünülmektedir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar faj tedavisinin,

antibiyotik direnci bulunan bakterilerin tedavisinde olumlu sonuçlar verdiğini göstermektedir [105].

Bakteriyofajlar, geniş spektrumlu modern antibiyotiklerin çoğuna veya tümüne dirençli olan mikroorganizmaları öldürebilme yeteneğine sahiptir. Antibiyotiklerin insanlar üzerine var olan istenmeyen etkilerine karşın bakteriyofajların bildirilen bir istenmeyen etkisi yoktur. Bakteriyofajlar bol miktarda ve çeşitli yerlerde (kanalizasyon suları, nehir, okyanus suları, toprak ve büyükbaş hayvanların gastrointestinal sistemleri) bulunurlar, bu nedenle yeni bakteriyofajlar bulmak yeni antibiyotikler keşfetmeye kıyasla nispeten daha kolaydır. Bu sebeplerden dolayı bakteriyofaj tedavisi umut vadeci bir tedavi olarak görülmektedir.

Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilmiş çoklu ilaç direncine sahip *K.pneumoniae* ve *A. baumannii* suşları için, bu suşlara özgü litik etkili bakteriyofajlar atık sulardan izole edildi. Fajların, bu bakterilerin oluşturdukları biyofilmlerine olan inhibisyon ve eradikasyon etkisine bakıldı.

*K. pneumoniae* ve *A. baumannii* bakterilerine özgü bakteriyofaj izole etme amacıyla yapılan çok sayıda çalışma vardır.

Loh ve diğ. [108], kolistin dirençli *A. baumannii* XH198 suşuna özgü litik etkili bakteriyofajı nehir suyundan izole etmişler ve bu fajı “Phab24” olarak isimlendirmişlerdir.

Yang ve diğ. [110], *A. baumannii* KD311 suşuna özgü bakteriyofajı deniz tortusu örneğinden izole etmişler ve “AB1” olarak isimlendirmişlerdir.

Çalışmamızda kan kültüründe izole edilen 10 farklı çok-ilaca-dirençli *A. baumannii* suşuna özgü, 12 farklı litik etkili bakteriyofaj atık sulardan izole edildi. Bu fajlar ABF1, ABF2,..., ABF12 olarak isimlendirildi.

Merabishvili ve diğ. [106], hastane atık su örneklerinden *A. baumannii* bakterilerine etkili 26 farklı bakteriyofajı izole etmişlerdir. Bu fajların arasında “Acibel004” ve “Acibel007” olarak isimlendirilen 2 fajın, 28 farklı *A. baumannii* klinik izolatu üzerine litik etkisi araştırılmış ve sırasıyla; %89,2 ve %71,4 olarak etkili bulunmuştur. 28 suştan 2’si ise her iki bakteriyofaja direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda atık sularından izole ettiğimiz 12 farklı bakteriyofajın etkinlikleri, kan kültüründen izole edilen 10 farklı çok-ilaca-dirençli *A. baumannii* suşuna, litik etkisi araştırıldı. Etki düzeyleri +, ++ ve +++ olarak gruplandırıldı. ABF2 olarak isimlendirilen faj; çalışmamızdaki 10 suştan 8'ine etkili bulundu, 4 suşa en iyi litik etkiyi (+++), 4 suşa ise orta düzey litik etki (++) gösterdi. ABF5 bakteriyofajı; çalışmamızdaki 5 suşa etkili bulundu, 2 suşa en iyi düzeyde, 3 suşa ise orta düzeyde litik etki gösterdi. ABF7 fajı; 10 suştan 5'ine etkili oldu, 4'üne en iyi, 1'ine ise orta düzeyde litik etki gösterdi. ABF12 fajı ise suşlardan 5'ine etkili oldu. Bunlardan 4 suşa en iyi, 1 suşa ise orta düzeyde litik etki gösterdi.

Ebrahimi ve diğ. [111]'nin çalışmasında; yanık yaralarından izole edilen, çoklu ilaç dirençli 15 *A. baumannii* suşunun %26,6'sında kolistin direnci saptanmıştır. Hastane atık sularından izole ettikleri ve "IsfAB78" olarak isimlendirdikleri bakteriyofajın *A. baumannii* suşlarıyla oluşturulan olgun biyofilmi %19 ile %87 oranları arasında eradike ettiğini saptanmıştır.

Çalışmamızda, 10 farklı çok-ilaca-dirençli *A. baumannii* suşunun %40'ında kolistin direnci vardı. Kolistin direnci bulunan suşların (AB2, AB8, AB9 ve AB10), izole edilen bakteriyofajlara daha az duyarlı olduğu tespit edildi. AB2 ve AB10 suşlarına, izole edilen 12 fajdan 3'ü, AB9 suşuna 2'si ve AB8 suşuna ise sadece ABF 2 bakteriyofajı etkili oldu. AB8 suşuna ABF 2 bakteriyofajından başka hiçbir faj etkili bulunmadı.

Yele ve diğ. [112], AIIMS 7 olarak adlandırılan çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* suşuna karşı yeni bir litik bakteriyofajı kanalizasyon suyundan izole etmişler ve bu fajı "AB7-IBB1" olarak adlandırmışlardır. Cansız yüzeylerdeki biyofilm oluşumunun tespiti için kristal viyole yöntemi kullanılmıştır. Faj, cansız yüzeydeki biyofilmin %40 ile %50'den fazlasını inhibe ederken, olgun biyofilmi ise %35 ile %75 oranları arasında eradike ettiğini tespit etmişlerdir. İzole edilen fajın canlı yüzeydeki biyofilmin %50'den fazlasını inhibe ettiğini saptamışlardır.

Thawal ve diğ. [113]'nin yapmış olduğu çalışmada ise *A. baumannii* AIIMS 7 özgü *Podoviridae* ailesine ait "AB7-IBB2" fajı atık sularından izole edilmişler ve cansız yüzeylerdeki *A. baumannii* biyofilmini %50 ile %60 oranları arasında inhibe, %40 ile %80 oranları arasında eradike ettiği tespit edilmiştir.

Liu ve diğ. [114], çoklu ilaç dirençli 5 *A. baumannii* suşunu YBÜ'de yatmakta olan pnömoni hastalarının balgam örneklerinden izole etmişler. Aynı hastanenin atık sularından

“vB\_AbaM-IME-AB2” adı verilen litik bakteriyofaj izole etmişler. İzole ettikleri *A. baumannii* suşları arasında güçlü biyofilm oluşturduğu saptanan MDR-AB2 suşunu seçmişler ve suşa özgü bakteriyofajın MDR-AB2 biyofilmine olan etkisi araştırılmıştır. vB\_AbaM-IME-AB2 fajının MDR-AB2 suşunun biyofilmini %88,5 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir.

Grygorcewicz ve diğ. [115], çeşitli çevresel örneklerden izole ettikleri Aba-1, Aba-2, Aba-3, Aba-4, Aba-5 ve Aba-6 olarak isimlendirdikleri 6 bakteriyofajın çoklu ilaç direnci bulunan 25 *A. baumannii* biyofilmine litik etkisini incelemişler ve en iyi aktiviteyi Aba-1 bakteriyofajının gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aba-1 fajının biyofilmi %77.69 oranında inhibe ve % 67.45 oranında eradike ettiğini saptamışlardır.

Çalışmamızda ise, kan kültürü örneklerinden izole edilen çok-ilaca-dirençli 10 *A. baumannii* için atık sularından izole edilen 12 farklı bakteriyofajdan her bakteri için en etkili (litik etkisi “+++” olan) faj seçildi. Seçilen her fajın, etkili olduğu *A. baumannii* suşunun oluşturduğu *in vitro* biyofilmi inhibe ve eradike etme durumları incelendi. Seçilen bakteriyofajların, *A. baumannii* suşlarının oluşturdukları biyofilmlerin çoğunu en fazla başlangıç konsantrasyonunda inhibe ve eradike ettiği gözlemlendi. Fajlar 10 farklı *A. baumannii* biyofilmini en fazla %96 ile %83,8 oranında inhibe, olgun biyofilmleri ise %95,4 ile %80,4 oranları arasında eradike ettiği saptandı. Başlangıç konsantrasyonuna göre, En düşük inhibisyon ve eradikasyon ise çoğu biyofilmde, çalışmamızın en son faj dilüsyonu olan  $10^{-7}$  konsantrasyonunda gözlemlendi. Bu konsantrasyonda inhibisyon, 10 suşta %66,9 ile %41,4, eradikasyon ise %70,5 ile %28,3 oranları arasında saptandı.

Çalışmamızdaki *A. baumannii* suşları arasında en fazla inhibisyon %96 oranında; ABF12 fajının AB6 suşunun biyofilmi üzerinde ve en fazla eradikasyon ise %95,4 oranında ABF12 fajının AB3 suşunun biyofilmi üzerinde saptandı. Kolistin dirençli *A. baumannii* suşlarının biyofilmlerini ABF12 ve ABF2 fajları %96-88,3 oranları arasında inhibe; %94,5-80,4 oranları arasında eradike etti.

Loh ve diğ. [109], tarafından yapılan çalışmada ise karbapenem ve üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli *K. pneumoniae* suşuna özgü bakteriyofajı hastane atık sularından izole etmişler ve bu fajı “Geezett” olarak isimlendirmişlerdir.

Gan ve diğ. [116], pnömoni hastalarından izole ettikleri *K. pneumoniae* ST11 ve ST383 suşlarına özgü iki bakteriyofajı hastane atık suyundan izole etmişlerdir. ST11 suşuna özgü olan

fajı “pKp11”, ST383 suşuna özgü olan fajı ise “pKp383” olarak isimlendirmişlerdir. ST11, ST383 harici ST23, ST65, ST218, ST700, ST412 gibi suşları olmak üzere 194 suş çalışmaya dahil edilmiştir. pKp11 fajının ST23, ST367, ST218, ST412, ST399 ve ST700 suşlarına; pKp388 fajının ise ST23, ST65 ve ST218 suşlarına da etkili olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda ise çeşitli servislerde ve YBÜ’de yatmakta olan hastaların kan kültürü örneklerinden izole edilen çok-ilaca-dirençli 10 farklı *K. pneumoniae* suşları kullanıldı. Bu suşlara özgü, 12 bakteriyofaj atık sulardan izole edildi. Bu fajlar KPF1, KPF2,....., KPF12 olarak isimlendirildi.

Horváth ve diğ. [117], yaptıkları bir çalışmada, hastaların idrar, kan ve balgam gibi çeşitli örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli K24 kapsül tipine sahip *K. pneumoniae* suşlarına özgü “vB\_KpnS\_Kp13” bakteriyofajını atık sulardan izole etmişlerdir. Bu bakteriyofajın 89 farklı *Klebsiella spp.* suşu üzerine bir etkisi olmadığını ancak K24 kapsül tipine sahip olan 40 *K. pneumoniae* suşunun hepsine (%100) etkili olduğunu tespit etmişlerdir. K24 kapsül tipine sahip olmayan 30 *K. pneumoniae* suşuna da etkili olmayan bu bakteriyofajın K24 kapsülüne spesifik etki gösteren bir faj olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca izole edilen fajın güçlü bir biyofilm üreticisi olan *K. pneumoniae* 533 suşunun oluşturduğu biyofilme etkisi incelenmiştir. 24 saatte biyofilm tabakasının %50’sini, 48 saatte ise %70’ini eradike ettiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda 10 farklı çok-ilaca-dirençli *K. pneumoniae* suşuna, atık sulardan izole ettiğimiz 12 farklı bakteriyofajın etkinlikleri araştırıldı. KPF5 VE KPF6 olarak isimlendirdiğimiz fajlar çalışmamızdaki tüm *K. pneumoniae* suşlarına farklı düzeylerde(+, ++, +++) litik etki gösterdi. KPF5 fajı, 10 suştan 4’üne az düzeyde (+); 3’üne orta düzeyde (++); 3’üne ise en iyi düzeyde (+++) litik etki gösterdi. KPF6 fajı, çalışmamızdaki suşların 3’üne az; 3’üne orta ve 4’üne ise en iyi düzeyde litik etkili oldu. KPF9 fajının çalışmamızdaki suşların 9’una etkili, 1’ine etkisiz olduğu saptandı. Bu faj suşların 4’üne çok iyi, 4’üne orta ve 1’ine az düzeyde etkili oldu. KPF10 fajı ise 10 suştan 8’ine etkili oldu. 4’üne en iyi, 2’ine orta ve 2’ine ise az düzeyde litik etkili olduğu saptandı. KPF10 fajının ise suşların 8’ine etkili olduğu tespit edildi. 4 suşa en iyi, 2 suşa orta ve 2 suşa az düzeyde litik etkiye sahip olduğu gözlemlendi.

Taha ve diğ. [118], tarafından yapılan çalışmada *K. pneumoniae* KP/01 suşu diyabetik ayak hastasından alınan örneklerden izole edilmiştir. Bu suşa özgü bakteriyofaj Mısır’da piramitlerin yanındaki temiz sulardan izole edilmiştir ve bu fajı “ZCKP1” olarak

isimlendirmişlerdir. Çalışmada toplamda 21 *K. pneumoniae* suşu kullanılmış ve izole edilen faj bunlardan 15'ine karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca izole edilen fajın, *K. pneumoniae* KP/01 suşunun oluşturduğu biyofilme inhibisyon etkisine bakılmış ve 4 saat sonunda en iyi inhibisyon gözlenmiştir. Tek doz faj uygulaması yapılan biyofilmde %30 ile %50 arasında eradikasyon gözlenirken birden fazla doz faj uygulanan biyofilmde ise eradikasyon %75'lere çıkmıştır.

Hao ve diğ. [119], karbapenem dirençli, K47 kapsüler serotipine sahip *K. pneumoniae* suşuna özgü bakteriyofajı hastane yakınlarındaki atık sulardan izole etmiş ve “ΦSRD2021” olarak isimlendirmişlerdir. İzole edilen fajın ST1493 ve ST11 suşlarına karşı etkili olduğunu tespit etmişlerdir ve ST1493 tarafından oluşturulan biyofilmi %80 oranında eradike ettiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamıza dahil edilen 10 *K. pneumoniae* suşundan 4'ünde (%40) kolistin direnci, bütün suşlarda ise karbapenem direnci saptandı. İzole edilen 12 bakteriyofajdan 9'u kolistin dirençli KP4, KP5 ve KP7 suşlarına farklı düzeylerde etkili oldu. Bu fajlardan sadece 1 tanesi en iyi litik etkiyi (++++) gösterdi. KP4 suşuna KPF6; KP5 suşuna KPF10 ve KP7 suşuna KPF9 fajı en iyi düzeyde litik etkili tespit edildi. Kolistin dirençli KP10 suşuna ise 10 faj etkili oldu, bunlardan 4'ü iyi litik etkiyi gösterirken KPF9 fajı en iyi olarak seçildi. KPF9, Kolistin dirençli KP10 suşunun biyofilmini %87,4 oranında inhibe, %86 oranında ise eradike ettiği saptandı.

Mulani ve diğ. [120], tarafından yapılan çalışmada çoklu ilaç direncine sahip *K. pneumoniae* G14 suşuna özgü bakteriyofaj atık sulardan izole edilmiştir ve “PG14” olarak isimlendirilmiştir. Aynı faj *K. pneumoniae* G5, S69 ve S71 suşları üzerinde de litik etki göstermiştir. İzole edilen PG14 fajının, *K. pneumoniae* G14 suşunun oluşturduğu biyofilm üzerine etkisini çalışmamızda olduğu gibi kristal viyole yöntemi ile saptamışlardır. Biyofilmi %80 oranında inhibe, %71 oranında ise eradike ettiğini gözlemlemişlerdir.

Tabassum ve diğ. [121], çoklu ilaç direnci bulunan *K. pneumoniae* ShA2 suşuna özgü “TSK1” bakteriyofajını atık sulardan izole etmişlerdir. TSK1 fajı, bu suşun oluşturduğu biyofilmi 24 saatlik inhibisyonunda %99,9 oranında, 48 saatlik inkübasyonda %90 ve 72 saatlik inkübasyonda %84 inhibe ettiği tespit edilmiştir. Aynı faj, olgun biyofilmi %91 ile %100 oranları arasında eradike etmiştir. İlk 24 saatlik süreçte biyofilm biyokütlesinde %95'ten fazla azalma bildirilmiştir.

Cano ve diğ. [122], yapmış oldukları çalışmada 62 yaşında erkek hastada gelişen uzuv tehdit edici duruma gelmiş olan protez eklem enfeksiyonundan izole edilen *K. pneumoniae* suşuna özgü “KpJH46Φ2” bakteriyofajı PhageBank koleksiyonundan bulunmuş. *In vitro* olarak yapılan deneylerde oluşturulan *K. pneumoniae* biyofilmini Minosiklin, Minosiklin + Faj ve Sadece Faj olmak üzere 3 farklı eradikasyon etkisi denenmiştir. %0,1’lik safranin boyası ile biyofilm oluşumu tespit edilmiş ve OD492’de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Hasta örneğinden izole edilen suşun biyofilm oluşumu 0,260 olarak tespit edilmiştir. Sadece faj ile eradike edilen biyofilm kuyucuğu 0,098, sadece minosiklin ile tedavi edilen biyofilm kuyucuğu 0,116 ve hem minosiklin hem de faj ile tedavi edilen biyofilm ise 0,163 değerinde ölçülmüştür. En iyi eradikasyon KpJH46Φ2 fajı ile olurken kombinasyon tedavisi en etkisiz olarak saptanmıştır. Hasta bu faj ile tedavi edilmiştir.

Çalışmamızda atık sulardan izole edilen 12 *K. pneumoniae* fajından; her suş için ayrı ayrı, en iyi litik etkiyi (+++) gösteren faj seçildi. 10 suş için toplamda 3 faj seçildi ve suşların oluşturdukları biyofilmler üzerine inhibisyon ve eradikasyon durumları incelendi. Fajlar *K. pneumoniae* suşlarının biyofilmlerini en fazla başlangıç konsantrasyonunda inhibe ve eradike ettiği gözlemlendi. Tüm suşların en iyi inhibisyonu %88,5 ile %79,2; en iyi eradikasyonları ise %94,4 ile %80,1 oranları arasında saptandı. En düşük inhibisyon ve eradikasyon ise en düşük konsantrasyon olan  $10^{-7}$  konsantrasyonunda gözlemlendi. Seçilen fajlar *K. pneumoniae* biyofilmlerini en düşük %61,1 ile %38,5 oranları arasında inhibe; %73 ile %46,8 oranları arasında eradike ettiği saptandı.

Çalışmamızdaki *K. pneumoniae* suşları arasında en iyi inhibisyon etkisi %88,5 oranında KPF9 fajının KP1 suşunun oluşturduğu biyofilimde tespit edildi. En iyi eradikasyon ise %94,4 oranında KPF9 fajının KP7 biyofilminin üzerine gözlemlendi. Kolistin dirençli *K.pneumoniae* biyofilmlerini; KPF9, KPF6, KPF10 fajları %87,4 ile %83 oranları arasında inhibe eder iken, %94,4 ile %86 oranları arasında eradike etti.

Çok ilaca dirençli *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* suşlarına özgü atık su örneklerinden izole ettiğimiz fajlarımız çalışmamızdaki suşların oluşturduğu biyofilmler üzerine oldukça başarılı sonuçlar verdi. Özellikle ABF2, ABF12, KPF6, KF9 ve KPF10 numaralı fajlar en yüksek litik etki gösterdi.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda izole edilen bakteriyofajların, seçilen çok-ilaca-dirençli suşların oluşturduğu biyofilmleri etkili bir şekilde inhibe ve eradike ettiği saptandı. Fajların artan antibiyotik direnciyle mücadelede umut vadeditici bir çözüm yolu olabileceği, özellikle HKE'lerde rol oynayan patojenleri ve bu patojenlerin oluşturdukları biyofilmleri engellemek amacıyla kullanılabilecekleri *in vitro* olarak gözlemlendi.

Çalışmamızı hiçbir kurumdan destek almadan, kendi imkanlarımız dahilinde yürütüldü. Bu nedenle çalışmamızın kısıtlılığı bakteriyofajların elektron mikroskopundaki morfolojik yapısının görüntülenememesi ve moleküler yöntemlerle incelenememesidir. İzole ettiğimiz bakteriyofajların hangi aileden olduğu, bakterilerin hangi bölgesini hedef aldığı ve fajların sekanslanması gibi ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

İleri çalışmalarda biyofilmler üzerine, izole ettiğimiz fajlar ile antibiyotiklerin kombine tedavisi ve etkili fajların kokteyllerinin etkinlikleri araştırılabilir.

Deney hayvanları üzerinde faj tedavisinin *in vivo* etkinlikleri saptanabilir ve insanlık için etkili bir çözüm yolu olup olamayacağı daha detaylı olarak incelenebilir.

## KAYNAKLAR

- [1] Chan, B. K., Stanley, G., Modak, M., Koff, J. L., & Turner, P. E., 2021, Bacteriophage therapy for infections in CF. *Pediatric Pulmonology*, 56(S1), S4-S9. <https://doi.org/10.1002/ppul.25190>
- [2] Rice, L. B., 2008, Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079-1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- [3] Rice, L. B., 2010, Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(S1), S7-S10. <https://doi.org/10.1086/655995>
- [4] Paramythiotou, E., & Routsis, C., 2016, Association between infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria and mortality in critically ill patients. *World Journal of Critical Care Medicine*, 5(2), 111-120. <https://doi.org/10.5492/wjccm.v5.i2.111>
- [5] Alay, H., Yilmaz, S., & Kesmez Can, F., 2021, Yoğun Bakım Ünitelerinde Gram-Negatif Bakteri İnfeksiyonlarında Çoklu İlaç Direnci ve Maliyet Analizi: Retrospektif Çalışma. *Flora*, 26(1). <https://doi.org/10.5578/flora.20219915>
- [6] Küçükbaşmacı, Ö., Samasti, M., Algingil, R. Ç., Hamaçça, Ö., Çelik, Ş., Köksal, F., & Gönüllü, N., 2007, Kan örneklerinden üretilen gram negatif çomakların antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37(4), Art. 4.
- [7] Köksal-Çakırlar F, Uyar F, Özdemir S, Barış A, Gözün-Şaylan E, Habip Z, et al. 2011-2014 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal direnç durumları. *Türk Hij Den Biyoi Derg.* 2017;74(1):55-70.
- [8] Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A., 2018, Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- [9] Gil-Perotin, S., Ramirez, P., Marti, V., Sahuquillo, J. M., Gonzalez, E., Calleja, I., Menendez, R., & Bonastre, J., 2012, Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: A state of concept. *Critical Care*, 16(3), R93. <https://doi.org/10.1186/cc11357>
- [10] Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N., & Song, Z.-J., 2015, Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65>
- [11] Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S., & Morales, S., 2014, Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 3(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030270>
- [12] Almasaudi, S. B., 2018, Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3), 586-596. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>
- [13] Cox, T. R., Roland, W. E., & Doian, M. E., 1998, Ventilator-Related Acinetobacter Outbreak in an Intensive Care Unit. *Military Medicine*, 163(6), 389-391. <https://doi.org/10.1093/milmed/163.6.389>

- [14] Lin, M.-F., & Lan, C.-Y., 2014, Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases : WJCC*, 2(12), 787-814. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.787>
- [15] Dal, T., & Dal, M. S., (t.y.). *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnci ve AdeABC Aktif Pompa Sistemleri: Literatürün Gözden Geçirilmesi. 12.
- [16] Bergogne-Bérézin, E., & Towner, K. J., 1996, *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148-165. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.2.148>
- [17] Bouvet, P. J. M., & Grimont, P. A. D. Y., 1986, Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. Nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. Nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. Nov., and *Acinetobacter junii* sp. Nov. And Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(2), 228-240. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-228>
- [18] Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L., 2008, *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538-582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- [19] Aygün, D. G., & Öztürk, D. R. (t.y.). *Acinetobacter Cinsi Bakteriler ve*. 8.
- [20] Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D., 2020, Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics*, 9(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>
- [21] May, H. C., Yu, J.-J., Zhang, H., Wang, Y., Cap, A. P., Chambers, J. P., Guentzel, M. N., & Arulanandam, B. P., 2019, Thioredoxin-A is a virulence factor and mediator of the type IV pilus system in *Acinetobacter baumannii*. *PLOS ONE*, 14(7), e0218505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218505>
- [22] Lee, C.-R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C.-J., Jeong, B. C., & Lee, S. H., 2017, Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>
- [23] Tilley, D., Law, R., Warren, S., Samis, J. A., & Kumar, A., 2014, CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. *FEMS Microbiology Letters*, 356(1), 53-61. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12496>
- [24] Greene, C., Vadlamudi, G., Newton, D., Foxman, B., & Xi, C., 2016, The impact of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. *American journal of infection control*, 44(5), e65-e71. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.12.012>
- [25] Asif, M., Alvi, I. A., & Rehman, S. U., 2018, Insight into *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1249-1260. <https://doi.org/10.2147/IDR.S166750>
- [26] Öncül, O., Keskin, Ö., Acar, H. V., Küçükardalı, Y., Evrenkaya, R., Atasoyu, E. M., Top, C., Nalbant, S., Özkan, S., Emekdaş, G., Çavuşlu, Ş., Us, M. H., Pahsa, A., & Gökben, M., 2002, Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *Journal of Hospital Infection*, 51(1), 47-51. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1205>
- [27] *Frontiers | Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options.* (t.y.). Geliş tarihi 12 Ekim 2022, gönderen <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00055/full>

- [28] Talbot, G. H., Bradley, J., Edwards, J. E., Gilbert, D., Scheld, M., Bartlett, J. G., & Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. 2006, Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(5), 657-668. <https://doi.org/10.1086/499819>
- [29] Bergogne-Bérézin, E., Friedman, H., & Bendinelli, M., 2008, *Acinetobacter: Biology and Pathogenesis*. Springer Science & Business Media.
- [30] Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H., 2007, An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12), Art. 12. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
- [31] Brady, M. F., Jamal, Z., & Pervin, N., 2021 *Acinetobacter*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/books/NBK430784>
- [32] Falagas, M. E., & Rafailidis, P. I., 2007, Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: No longer a controversial issue. *Critical Care*, 11(3), 134. <https://doi.org/10.1186/cc5911>
- [33] Veeraghavan, B., Vijayakumar, S., Pragasam, A. K., Bakthavachalam, Y. D., & Prakash, J. A. J., 2019, Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for *Acinetobacter* spp. İçinde I. Biswas & P. N. Rather (Ed.), *Acinetobacter baumannii* (C. 1946, ss. 23-37). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_3)
- [34] Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A., 2007, Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3471-3484. <https://doi.org/10.1128/AAC.01464-06>
- [35] Kumburu, H. H., Sonda, T., van Zwetselaar, M., Leekitcharoenphon, P., Lukjancenka, O., Mmbaga, B. T., Alifrangis, M., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Kibiki, G. S., 2019, Using WGS to identify antibiotic resistance genes and predict antimicrobial resistance phenotypes in MDR *Acinetobacter baumannii* in Tanzania. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(6), 1484-1493. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz055>
- [36] Özdemir, M., Çiftci, İ. H., Öksüz, L., Köksal Çakırlar, F., Berktaş, M., Seyrek, A., Sesli Çetin, E., Ayyıldız, A., Yağci, S., Atasoy, A. R., Gültepe, B., Karakeçe, E., Kurtoğlu, M. G., Gül, M., Koçoğlu, E., & Aşık, G., 2013, *Acinetobacter baumannii* izolatlarında blaOXA genlerinin dağılımı: Çok merkezli bir çalışma. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47(4), Art. 4.
- [37] Manchanda, V., Sanchaita, S., & Singh, N., 2010, Multidrug Resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 291-304. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.68538>
- [38] Paton, R., Miles, R. S., Hood, J., Amyes, S. G. B., Miles, R. S., & Amyes, S. G. B., 1993, ARI 1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2(2), 81-87. [https://doi.org/10.1016/0924-8579\(93\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0924-8579(93)90045-7)
- [39] Wang, H., Guo, P., Sun, H., Wang, H., Yang, Q., Chen, M., Xu, Y., & Zhu, Y., 2007, Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* spp. From Chinese Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4022-4028. <https://doi.org/10.1128/AAC.01259-06>
- [40] Hejnar, P., Kolář, M., & Hájek, V., 1999, *CHARACTERISTICS OF ACINETOBACTER STRAINS (PHENOTYPE CLASSIFICATION, ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY AND*

- PRODUCTION OF  $\beta$ -LACTAMASES) ISOLATED FROM HAEMOCULTURES FROM PATIENTS AT THE TEACHING HOSPITAL IN OLOMOUC. 142, 5.*
- [41] Navon-Venezia, S., Leavitt, A., & Carmeli, Y., 2007, High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 772-774. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm018>
- [42] Conly, J., & Johnston, B., 2006, Colistin: The phoenix Arises. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5), 267-269. <https://doi.org/10.1155/2006/901873>
- [43] Wand, M. E., Bock, L. J., Bonney, L. C., & Sutton, J. M., 2015, Retention of virulence following adaptation to colistin in *Acinetobacter baumannii* reflects the mechanism of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(8), 2209-2216. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv097>
- [44] Ghahraman, M. R. K., Hosseini-Nave, H., Azizi, O., Shakibaie, M. R., Mollaie, H. R., & Shakibaie, S., 2020, Molecular characterization of lpxACD and pmrA/B two-component regulatory system in the colistin resistance *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Gene Reports*, 21, 100952. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100952>
- [45] Paczosa, M. K., & Meccas, J., 2016, *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 80(3), 629-661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- [46] C, S., Cc, R., M, S., Sg, S., Ds, H., Dm, E., Ps, A., Em, D., P, K., & Ka, K., 2015, Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *MBio*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00630-15>
- [47] Podschun, R., & Ullmann, U., 1998, *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603.
- [48] Hakalehto, E., Humpi, T., & Paakkanen, H., 2008, Dualistic acidic and neutral glucose fermentation balance in small intestine: Simulation in vitro. *Pathophysiology*, 15(4), 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2008.07.001>
- [49] Pereira, L. A., & Santos, A. (Ed.), 2013, *Klebsiella infections: Epidemiology, pathogenesis and clinical outcomes*. Nova Biomedical.
- [50] Martin, R. M., & Bachman, M. A., 2018, Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00004>
- [51] Merino, S., Camprubí, S., Albertí, S., Benedí, V. J., & Tomás, J. M., 1992, Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infection and Immunity*, 60(6), 2529-2535.
- [52] Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A., 2017, *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252-275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- [53] Ashurst, J. V., & Dawson, A., 2022, *Klebsiella Pneumonia*. İçinde *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
- [54] Mandell, L. A., Wunderink, R. G., Anzueto, A., Bartlett, J. G., Campbell, G. D., Dean, N. C., Dowell, S. F., File, T. M., Jr., Musher, D. M., Niederman, M. S., Torres, A., & Whitney, C. G., 2007, Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clinical Infectious Diseases*, 44(Supplement\_2), S27-S72. <https://doi.org/10.1086/511159>

- [55] Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S., & Wu, Y., 2020, Klebsiella pneumoniae: An increasing threat to public health. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0343-8>
- [56] Rahimian, J., Wilson, T., Oram, V., & Holzman, R. S., 2004, Pyogenic Liver Abscess: Recent Trends in Etiology and Mortality. *Clinical Infectious Diseases*, 39(11), 1654-1659. <https://doi.org/10.1086/425616>
- [57] Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A., 1991, More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(9), 1697-1704. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.9.1697>
- [58] Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C., 2001, Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151-1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
- [59] Queenan, A. M., & Bush, K., 2007, Carbapenemases: The Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440-458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- [60] Medeiros, A. A. (t.y.). *Evolution and Dissemination of  $\beta$ -Lactamases Accelerated by Generations of (3-Lactam Antibiotics)*. 27.
- [61] Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R., 2009, Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in Klebsiella pneumoniae Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046-5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- [62] Poirel, L., Özdamar, M., Ocampo-Sosa, A. A., Türkoglu, S., Ozer, U. G., & Nordmann, P., 2012, NDM-1-Producing Klebsiella pneumoniae Now in Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2784-2785. <https://doi.org/10.1128/AAC.00150-12>
- [63] Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N., 2006, OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 373-383. <https://doi.org/10.1093/jac/dki482>
- [64] Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P., 2004, Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 15-22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>
- [65] *The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosi... : Current Opinion in Pulmonary Medicine*. (t.y.). Geliş tarihi 20 Ekim 2022, gönderen [https://journals.lww.com/copulmonarymedicine/Fulltext/2001/11000/The\\_clinical\\_use\\_of\\_colistin\\_in\\_patients\\_wi th.13.aspx](https://journals.lww.com/copulmonarymedicine/Fulltext/2001/11000/The_clinical_use_of_colistin_in_patients_wi th.13.aspx)
- [66] Ah, Y.-M., Kim, A.-J., & Lee, J.-Y., 2014, Colistin resistance in Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.016>
- [67] Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L., 2012, Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- [68] *Gürler vd. - UAMDSS BİLİMSEL KOMİSYON ÜYELERİ (2016).pdf*. (t.y.). Geliş tarihi 27 Kasım 2022, gönderen

- [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji\\_Referans\\_Laboratuvarlari\\_ve\\_Biyolojik\\_Urunler\\_DB/uamdss/yillik\\_raporlar/UAMDSS\\_2016\\_Rapor.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/yillik_raporlar/UAMDSS_2016_Rapor.pdf)
- [69] World Health Organization. Regional Office for Europe., 2020, *Central Asian and European surveillance of antimicrobial resistance: Annual report 2020* (WHO/EURO:2020-3469-43228-60585). World Health Organization. Regional Office for Europe. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345873>
- [70] Jones, H. C., Roth, I. L., & Sanders, W. M., 1969, Electron Microscopic Study of a Slime Layer. *Journal of Bacteriology*, 99(1), 316-325.
- [71] Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., 2020, Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02894>
- [72] Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O., 2010, Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322-332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- [73] Gün, İ., & Ekinci, F. Y., 2009, Biyofilmler: Yüzeyledeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda*, 34(3), Art. 3.
- [74] Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O., 2015, Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- [75] Akçelik, N., & Akçelik, M., 2017, Bakteriye Biyofilmler ve Konakçı Savunma Sistemi ile Etkileşimleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 33(1), Art. 1.
- [76] Marsh, P. D., 2004, Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Research*, 38(3), 204-211. <https://doi.org/10.1159/000077756>
- [77] *Biofilms Made Easy—Wounds International*. (t.y.). Geliş tarihi 23 Ekim 2022, gönderen <https://www.woundsinternational.com/resources/details/biofilms-made-easy>
- [78] *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents | Nature Reviews Drug Discovery*. (t.y.). Geliş tarihi 23 Ekim 2022, gönderen <https://www.nature.com/articles/nrd1008>
- [79] Römling, U., & Balsalobre, C., 2012, Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, 272(6), 541-561. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>
- [80] Del Pozo, J. L., 2018, Biofilm-related disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16(1), 51-65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
- [81] Christensen, G. D., Simpson, W. A., Anglen, J. O., & Gainor, B. J., 2000, Methods for Evaluating Attached Bacteria and Biofilms: An Overview. İçinde Y. H. An & R. J. Friedman, *Handbook of Bacterial Adhesion* (C. 0, ss. 213-233). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-224-4:213>
- [82] *Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices*. (t.y.). <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
- [83] Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T., 1989, New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872-874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
- [84] Rampelotto, R. F., Lorenzoni, V. V., Silva, D. da C., Coelho, S. S., Wust, V., Garzon, L. R., Nunes, M. S., Meneghetti, B., Brites, P. C., Hörner, M., & Hörner, R., 2018, Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns. *Revista Da*

- Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(6), 761-767.  
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0171-2018>
- [85] Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A., 2011, Growing and Analyzing Static Biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, 22(1).  
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s22>
- [86] Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G., 2001, Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649-659.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>
- [87] Abedon, S. T., Thomas-Abedon, C., Thomas, A., & Mazure, H., 2011, Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage*, 1(3), 174-178. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16591>
- [88] Phage Therapy—History from Twort and d'Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches., 2012, *Advances in Virus Research*, 83, 3-40.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>
- [89] Duckworth, D. H. (t.y.). *Who discovered bacteriophage?* 10.
- [90] Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M., 2014, A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1), 226-235. <https://doi.org/10.4161/viru.25991>
- [91] Bradley, D. E., 1967, Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31(4), 230-314.
- [92] Breitbart, M., & Rohwer, F., 2005, Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*, 13(6), 278-284.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.04.003>
- [93] *Antibiotics | Free Full-Text | Bacteriophage Therapy: Developments and Directions.* (t.y.). Geliş tarihi 28 Mayıs 2022, gönderen <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/3/135>
- [94] Domingo-Calap, P., & Delgado-Martínez, J., 2018, Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics*, 7(3), Art. 3.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>
- [95] Díaz-Muñoz, S. L., & Koskella, B., 2014, Bacteria–Phage Interactions in Natural Environments. İçinde *Advances in Applied Microbiology* (C. 89, ss. 135-183). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00004-4>
- [96] Weinbauer, M. G., & Rassoulzadegan, F., 2004, Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, 6(1), 1-11.  
<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00539.x>
- [97] Lood, R., Ertürk, G., & Mattiasson, B., 2017, Revisiting Antibiotic Resistance Spreading in Wastewater Treatment Plants – Bacteriophages as a Much Neglected Potential Transmission Vehicle. *Frontiers in Microbiology*, 8.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02298>
- [98] Ackermann, H.-W., 2009, Phage Classification and Characterization. İçinde M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Ed.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (ss. 127-140). Humana Press.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13)
- [99] Bacteriophage—Definition, Structure, Life Cycle, Importance. (2022, Haziran 27). *GeeksforGeeks*. <https://www.geeksforgeeks.org/bacteriophage-definition-structure-life-cycle-importance/>
- [100] Ackermann, H. W., 2011, Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2), 90.  
<https://doi.org/10.1071/MA11090>

- [101] Ackermann, H.-W., 2012, Who went into phage research? *Bacteriophage*, 2(1), 55-59. <https://doi.org/10.4161/bact.18680>
- [102] Hyman, P., & Abedon, S. T., 2012, Smaller Fleas: Viruses of Microorganisms. *Scientifica*, 2012, 734023. <https://doi.org/10.6064/2012/734023>
- [103] Valente, L., Prazak, J., Que, Y.-A., & Cameron, D. R., 2021, Progress and Pitfalls of Bacteriophage Therapy in Critical Care: A Concise Definitive Review. *Critical Care Explorations*, 3(3), e0351. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000351>
- [104] Altamirano, F. L. G., & Barr, J. J., 2019, Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
- [105] *Frontiers | Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles | Cellular and Infection Microbiology*. (t.y.). Geliş tarihi 28 Mayıs 2022, gönderen <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00376/full>
- [106] Merabishvili, M., Vandenhevel, D., Kropinski, A. M., Mast, J., Vos, D. D., Verbeke, G., Noben, J.-P., Lavigne, R., Vaneechoutte, M., & Pirnay, J.-P., 2014, Characterization of Newly Isolated Lytic Bacteriophages Active against *Acinetobacter baumannii*. *PLOS ONE*, 9(8), e104853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104853>
- [107] Wang, Y., Wang, J., Wang, R., & Cai, Y., 2020, Resistance to ceftazidime–avibactam and underlying mechanisms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.12.009>
- [108] *Complete Genome Sequence of the Lytic Bacteriophage Phab24, Which Infects Clinical Strains of the Nosocomial Pathogen Acinetobacter baumannii*. (t.y.). <https://doi.org/10.1128/MRA.00669-21>
- [109] *Complete Genome Sequence of the Virulent Klebsiella pneumoniae Phage Geezett Infecting Multidrug-Resistant Clinical Strains | Microbiology Resource Announcements*. (t.y.). Geliş tarihi 21 Kasım 2022, gönderen <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MRA.00685-21>
- [110] Yang, H., Liang, L., Lin, S., & Jia, S., 2010, Isolation and Characterization of a Virulent Bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, 10(1), 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-131>
- [111] Ebrahimi, S., Sisakhtpour, B., Mirzaei, A., Karbasizadeh, V., & Moghim, S., 2021, Efficacy of isolated bacteriophage against biofilm embedded colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Gene Reports*, 22, 100984. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100984>
- [112] Yele, A. B., Thawal, N. D., Sahu, P. K., & Chopade, B. A., 2012, Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: Isolation, characterization and its effect on biofilm. *Archives of Virology*, 157(8), 1441-1450. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1320-0>
- [113] Thawal, N. D., Yele, A. B., Sahu, P. K., & Chopade, B. A., 2012, Effect of a Novel Podophage AB7-IBB2 on *Acinetobacter baumannii* Biofilm. *Current Microbiology*, 65(1), 66-72. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0127-2>
- [114] Liu, Y., Mi, Z., Niu, W., An, X., Yuan, X., Liu, H., Wang, Y., Feng, Y., Huang, Y., Zhang, X., Zhang, Z., Fan, H., Peng, F., Li, P., Tong, Y., & Bai, C., 2016, Potential of a lytic bacteriophage to disrupt *Acinetobacter baumannii* biofilms in vitro. *Future Microbiology*, 11(11), 1383-1393. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0104>
- [115] Grygorcewicz, B., Wojciuk, B., Roszak, M., Łubowska, N., Błażejczak, P., Jurska-Kulesza, J., Rakoczy, R., Masiuk, H., & Dołęgowska, B., 2021, Environmental Phage-Based Cocktail and Antibiotic Combination Effects on *Acinetobacter baumannii* Biofilm in a Human Urine Model. *Microbial Drug Resistance*, 27(1), 25-35. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0083>

- [116] *Bacteriophage Effectively Rescues Pneumonia Caused by Prevalent Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae in the Early Stage.* (t.y.). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02358-22>
- [117] *Identification of a newly isolated lytic bacteriophage against K24 capsular type, carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae isolates* / *Scientific Reports.* (t.y.). Geliş tarihi 21 Kasım 2022, gönderen <https://www.nature.com/articles/s41598-020-62691-8>
- [118] Taha, O. A., Connerton, P. L., Connerton, I. F., & El-Shibiny, A., 2018, Bacteriophage ZCKP1: A Potential Treatment for Klebsiella pneumoniae Isolated From Diabetic Foot Patients. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02127>
- [119] Hao, G., Shu, R., Ding, L., Chen, X., Miao, Y., Wu, J., Zhou, H., & Wang, H., 2021, Bacteriophage SRD2021 Recognizing Capsular Polysaccharide Shows Therapeutic Potential in Serotype K47 Klebsiella pneumoniae Infections. *Antibiotics*, 10(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080894>
- [120] Mulani, M. S., Kumkar, S. N., & Pardesi, K. R., 2022, Characterization of Novel *Klebsiella* Phage PG14 and Its Antibiofilm Efficacy. *Microbiology Spectrum*, e01994-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01994-22>
- [121] Tabassum, R., Shafique, M., Khawaja, K. A., Alvi, I. A., Rehman, Y., Sheik, C. S., Abbas, Z., & Rehman, S., 2018, Complete genome analysis of a Siphoviridae phage TSK1 showing biofilm removal potential against Klebsiella pneumoniae. *Scientific Reports*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36229-y>
- [122] Cano, E. J., Caflisch, K. M., Bollyky, P. L., Van Belleghem, J. D., Patel, R., Fackler, J., Brownstein, M. J., Horne, B., Biswas, B., Henry, M., Malagon, F., Lewallen, D. G., & Suh, G. A., 2021, Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee Klebsiella pneumoniae Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity. *Clinical Infectious Diseases*, 73(1), e144-e151. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa705>

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ÇOK-İLACA-DİRENÇLİ *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii*'ye ÖZGÜ BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU ve BU FAJLARIN BİYOFİLME ETKİSİ

### ORJİNALLİK RAPORU

|                   |                     |           |                  |
|-------------------|---------------------|-----------|------------------|
| <b>%8</b>         | <b>%7</b>           | <b>%2</b> | <b>%3</b>        |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR  | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |  |               |
|----------|--|---------------|
| <b>1</b> | <b>acikbilim.yok.gov.tr</b><br>İnternet Kaynağı  | <b>%3</b>     |
| <b>2</b> | <b>Submitted to The Scientific &amp; Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)</b><br>Öğrenci Ödevi | <b>%2</b>     |
| <b>3</b> | <b>dergipark.org.tr</b><br>İnternet Kaynağı  | <b>&lt;%1</b> |
| <b>4</b> | <b>www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b><br>İnternet Kaynağı  | <b>&lt;%1</b> |
| <b>5</b> | <b>www.esp.org</b><br>İnternet Kaynağı   | <b>&lt;%1</b> |
| <b>6</b> | <b>Submitted to Uludag University</b><br>Öğrenci Ödevi   | <b>&lt;%1</b> |
| <b>7</b> | <b>acikerisim.pau.edu.tr:8080</b><br>İnternet Kaynağı  | <b>&lt;%1</b> |
| <b>8</b> | <b>openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b><br>İnternet Kaynağı  | <b>&lt;%1</b> |

## ETİK KURUL İZİN YAZISI



## KURUM İZİNİ YAZILARI



## ÖZGEÇMİŞ

