

T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN *Escherichia coli* DH10B  
SUŞUNA KARŞI LİTİK BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE  
KLİNİK *Escherichia coli* SUŞLARINA KARŞI  
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**ABDULKERİM KARAYNİR  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF- 19053 proje numarası ile desteklenmiştir ve Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein (REDPROM) Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

**AYDIN-2021**



## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Abdulkerim KARAYNİR tarafından hazırlanan “Çevresel Örneklerden *Escherichia coli* DH10B Suşuna Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Klinik *Escherichia coli* Suşlarına Karşı Etkinliklerinin Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/01/2021

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN	Aydın Menderes Üniversitesi	Adnan .....
Üye	: Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL	Aydın Menderes Üniversitesi	Adnan .....
Üye	: Dr.Öğr.Üyesi Tuğrul HOŞBUL	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	.....

### ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen sayın danışmanım Prof Dr. Bülent BOZDOĞAN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL'e, Doç.Dr. Erman ORYAŞIN'a ve Gıda İşleme Bölümü öğretim üyelerinden Doç.Dr. Dilek KESKİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Değerli görüş ve önerileri için jüri üyeleri Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ve Dr.Öğr.Üyesi Tuğrul HOŞBUL'a, ayrıca TPF-19053 proje numarasıyla tez çalışmamı destekleyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince özveri ve desteklerini esirgemeyen REDPROM laboratuvar arkadaşlarıma, ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca maddi, manevi yanımda ve arkamda duran sevgili aileme teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
RESİMLER DİZİNİ .....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ÖZET .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Bakteriyofajlar .....	3
2.1.1. Bakteriyofajların Keşfi .....	3
2.1.2. Bakteriyofajların Sınıflandırılması .....	4
2.1.3. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri.....	6
2.1.4. Bakteriyofajların Uygulama Alanları .....	9
2.2. Faj Terapi Çalışmaları .....	9
2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> 'nin Tarihçesi.....	14
2.3.2. <i>Escherichia coli</i> 'nin Etiyolojisi .....	15
2.3.3. <i>Escherichia coli</i> 'nin Sebep Olduğu Enfeksiyonlar .....	15
2.3.4. <i>Escherichia coli</i> 'de Antimikrobiyal Direnç .....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Gereç.....	20
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Çevresel Örnekler .....	20
3.1.2. İndikatör Bakteri <i>E. coli</i> DH10B.....	20
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	20
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözelti ve Kimyasallar.....	22
3.2. Yöntem .....	24
3.2.1. Çevresel Örneklerden Bakteriyofaj İzolasyonu.....	24
3.2.1.1. Faj süspansiyonlarının hazırlanışı .....	24

3.2.1.2. Spot test yöntemi ile faj etkinliklerinin belirlenmesi.....	25
3.2.1.3. Tek plak izolasyonu ile bakteriyofajların saflaştırılması.....	25
3.2.2. Bakteriyofaj Titrelerinin Belirlenmesi.....	27
3.2.3. Bakteriyofaj Genomu .....	28
3.2.3.1. Bakteriyofajlardan DNA izolasyonu .....	28
3.2.3.2. İzole edilen bakteriyofaj DNA'larının restriksiyon profillerinin belirlenmesi.....	29
3.2.4. Klinik <i>Escherichia coli</i> İzolatlarının MİK Değerlerinin Belirlenmesi .....	29
3.2.5. Saflaştırılan Fajların Klinik <i>E. coli</i> Suşları Üzerindeki Etkinliklerinin Belirlenmesi ....	31
3.2.6. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu .....	32
3.2.6.1. Restriksiyon ürünlerinin plazmit vektörlere klonlanması .....	32
3.2.7. Bakteriyofajların Konak Aralığının Belirlenmesi (Spot-Test) .....	34
3.2.8. Bakteriyofajların Liyofilizasyonu.....	35
4. BULGULAR .....	36
4.1. Çevresel Örneklerden Bakteriyofaj İzolasyonu.....	36
4.2. İzolasyonu Yapılan Bakteriyofajların Saflaştırılması.....	37
4.3. Bakteriyofaj Titrelerinin Hesaplanması .....	38
4.4. Bakteriyofaj Genomu .....	40
4.4.1. <i>E. coli</i> Bakteriyofajlarından Total Genom İzolasyonu.....	40
4.4.2. İzole Edilen Bakteriyofaj DNA'larının Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi .....	41
4.4.3. Bakteriyofajların Genom Büyüklüklerinin Hesaplanması .....	42
4.5. Saflaştırılan Bakteriyofajların Klinik <i>E. coli</i> Suşları Üzerindeki Etkisi.....	42
4.6. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu .....	45
4.6.1. Bakteriyofaj DNA'sının Dizi Analizi Sonuçları .....	47
4.7. Konakçı Aralığının Belirlenmesi.....	48
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	55
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	64

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum klorür
<b>CDC</b>	: Hastalık Kontrol Merkezi
<b>cfu/ml</b>	: Mililitredeki koloni oluşturma birimi
<b>DAE</b>	: Diyabetik Ayak Enfeksiyonu
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DSÖ/WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>EcoRI</b>	: Restriksiyon endonükleaz enzimi
<b>ESBL</b>	: Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>ICTV</b>	: Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi
<b>IMP</b>	: İmipenem
<b>İYE</b>	: İdrar Yolu Enfeksiyonları
<b>M</b>	: Molarite
<b>MİK</b>	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>MRSA</b>	: Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PEG</b>	: Polietilen glikol
<b>pob/ml</b>	: Mililitredeki plak oluşturma birimi
<b>PstI</b>	: Restriksiyon endonükleaz enzimi
<b>Rpm</b>	: Revolution per minute (santrifüjün dakikadaki dönüş sayısı)
<b>SM</b>	: Saline-Magnesium (Faj Tamponu)
<b>TBE</b>	: Tris borik asit edta tamponu
<b>TEM</b>	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
<b>VRSA</b>	: Vankomisin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>w/v</b>	: Ağırlık/Hacim oranı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bakteriyofajların Tarihsel Evrimi .....	3
Şekil 2. Bakteriyofajların Bradley'e Göre Sınıflandırması.....	4
Şekil 3. Bakteriyofaj Gruplarının Şematik Gösterimi .....	5
Şekil 4. Tipik Bir Bakteriyofaj Yapısı.....	7
Şekil 5. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri .....	8
Şekil 7. Sıralı Bakteriyofaj Dilüsyonu. ....	26
Şekil 8. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Yöntemi .....	30



## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Spot Test Sonucu Bakteriyofajların Oluşturduğu Plaklar.....	32
<b>Resim 2.</b> Konak Aralığı Belirlemede Bazı Spot Test Örnekleri .....	35
<b>Resim 3.</b> Bakteriyofaj Liyofizasyonu .....	35
<b>Resim 4.</b> Çevresel Örneklerden Bakteriyofaj İzolasyonu .....	36
<b>Resim 5.</b> Karışık Morfolojideki Faj Plakları.....	37
<b>Resim 6.</b> Saflaştırılmış Bazı Bakteriyofajların Petri Görüntüleri .....	38
<b>Resim 7.</b> Hazırlanan Faj Dilüsyonlarının 0.2 ml'sinde Oluşan Faj Plakları.....	39
<b>Resim 8.</b> DNA İzolasyonlarının Elektroforez Görüntüleri .....	40
<b>Resim 9.</b> <i>E. coli</i> Bakteriyofajlarının EcoRI ve PstI Kesimi Sonucu Oluşan Fragmentler .....	41
<b>Resim 10.</b> pUC19 ve KK1 Fajının EcorI-PstI ile Kesiminin Jel Görüntüsü.....	45
<b>Resim 11.</b> Transformasyon Sonucu Oluşan Koloniler.....	46
<b>Resim 12.</b> Shotgun Klonlama Sonrası M13 Koloni PCR Jel Görüntüsü.....	46
<b>Resim 13.</b> KK1 Faj Genomuna Ait 909 Bazlık DNA Fragmentinin Dizi Bilgisi.....	47
<b>Resim 14.</b> KK1 Faj Genomuna Ait 909 Bazlık DNA Dizinin Blast Sorgulaması.....	47

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Bakteriyofajların Sınıflandırılması ve Temel Özellikleri.....	6
<b>Tablo 2.</b> Bakteriyofaj Tedavisi Sonuçları (1307 Vaka).....	11
<b>Tablo 3.</b> Farklı Antibiyotiklere Karşı <i>E. coli</i> 'nin Antibiyotik Direnç Oranları.....	18
<b>Tablo 4.</b> Plak Morfolojilerine Göre Saflaştırılmış Fajların Titrelelerinin Belirlenmesi.....	39
<b>Tablo 5.</b> EcoRI ve PstI Kesim Sonucu Oluşan Fragmentler.....	42
<b>Tablo 6.</b> <i>E. coli</i> Fajlarının DAE Kökenli <i>E. coli</i> Klinik Suşları Üzerine Lizis Etkisi .....	43
<b>Tablo 7.</b> Gruplandırılan <i>E. coli</i> Bakteriyofajlarının Klinik Suşlar Üzerine Etkisi.....	44
<b>Tablo 8.</b> <i>E. coli</i> Fajlarının (KK1-KK7) Konakçı Aralığı.....	48

## ÖZET

### ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN *Escherichia coli* DH10B SUŞUNA KARŞI LİTİK BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE KLİNİK *Escherichia coli* SUŞLARINA KARŞI ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

**Karaynir A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.**

Doğada en fazla bulunan biyolojik topluluğu temsil eden bakteriyofajlar bakterileri enfekte eden virüsler olarak tanımlanmaktadır. Bakteriyofajların en iyi bilinen özelliklerinden biri tür spesifik olmalarıdır. Yeni antibiyotiklerin üretiminde yaşanan krizler ve Dünya genelinde artan antibiyotik kullanımından dolayı dirençli bakterilere karşı antibiyotik tedavisine alternatif bir yaklaşım arayışı gündeme gelmiştir. Buna paralel olarak, aslında 100 yıldır var olan bakteriyofajların tedavi amaçlı kullanımı (Faj Terapi) günümüzde tekrar bilim ve tıp dünyasının ilgi odağı haline gelmiştir. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından günümüzde hastane ve toplum etkenli tedavisi zor enfeksiyon hastalıklarının en önemli etmenleri arasında patojenik *Escherichia coli* gösterilmektedir.

Bu tez kapsamında; çevresel örneklerden *E. coli* DH10B suşuna etkili litik bakteriyofajların izolasyonu ve diyabetik ayak enfeksiyon (DAE) kökenli *Escherichia coli* izolatlarına karşı etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında plak morfolojileri farklı 15 bakteriyofaj izole edilmiş ve restriksiyon endonükleaz profilleri belirlenmiştir. Kesilen 9 fajdan 4 farklı faj profili saptanmış ve kesilmeyen 6 faj arasında *E. coli* suşları üzerine etkilerine bakılarak 3 farklı faj biyotipi olduğu belirlenmiştir. Farklı profildeki fajlar KK1'den KK7'e kadar kodlanmış ve çalışmaya dâhil edilen 30 klinik izolata karşı etkinlikleri test edilmiştir. En yüksek litik aktiviteye sahip KK4 fajının izolatların 22'sine (%73) etkili olduğu ve tüm fajların karışımından hazırlanan kokteylin 3 izolat hariç tüm bakterilere etki ettiği belirlenmiştir (%90). İzole ettiğimiz fajlar da dahil olmak üzere fajların tedaviye yanıt vermeyen enfeksiyonlar için antibiyotiklerle birlikte kullanılabilme potansiyeli vardır. Özellikle klinik *E. coli* izolatlarının %73'üne etkili olduğu tespit edilen KK4 fajının bu amaçla kullanılma potansiyeli yüksektir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik direnci, Diyabetik Ayak Enfeksiyonu, *Escherichia coli*, Faj Terapi, Litik Bakteriyofaj

## ABSTRACT

### ISOLATION OF LYTIC BACTERIOPHAGES FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES AGAINST *Escherichia coli* DH10B AND DETERMINATION OF THEIR ACTIVITIES AGAINST CLINICAL *Escherichia coli* ISOLATES

**KARAYNİR A. Aydın Adnan Menderes University Moleculer Biotechnology Department Master's Thesis, Aydın, 2021.**

Bacteriophages representing the most abundant biological community in nature are defined as viruses that infect bacteria. One of the most well-known properties of bacteriophages is that they are species specific. Due to the crises in the production of new antibiotics and the increasing use of antibiotics around the world, a search for an alternative approach to antibiotic treatment against resistant bacteria has come. In parallel with this, the therapeutic use of bacteriophages (Phage Therapy), which had actually existed for 100 years, has again become the focus of attention in the scientific and medical world today. Pathogenic *Escherichia coli* show by World Health Organization (WHO) as one of the most important factors of infectious diseases that are difficult to treat in hospital and community.

Within the scope of this thesis; Isolation of lytic bacteriophages effective against *E. coli* DH10B strain from environmental samples and determination of the activity of these phages against *Escherichia coli* isolates originating from diabetic foot infection (DAI) were aimed. In the study, 15 bacteriophages with different plaque morphologies were isolated and restriction endonuclease profiles were determined. It is determine that there are 4 different cut profiles among the 9 phages that were cut, and 3 different phage biotypes were determined according to their lytic activity on *E. coli* strains among the 6 uncut phages. Phages with different profiles from KK1 to KK7 were coded and their efficacy against the 30 clinical isolates included in the study was tested. It was determined that KK4 phage with the highest lytic activity was effective on 22 (73%) of the isolates and the cocktail prepared from the mixture of all phages affected all bacteria except 3 isolates (90%). Of phages, including the phages we isolated, have the potential to be used with antibiotics for infections that do not respond to treatment. Especially KK4 phage, which is found to be effective on 73% of clinical *E. coli* isolates, has a high potential to be used for this purpose.

**Keywords:** Antibiotic Resistance, Diabetic Foot İnfection, *Escherichia coli*, Lytic Bacteriophage, Phage Therapy.

# 1. GİRİŞ

Bakteriyofajlar 20. Yüzyılın ilk çeyreğinde tanımlanmış ve bakteriyel çalışmaların başlamasından sonra bakteri yiyen virüs olarak literatüre girmiştir. Bakteriyofajlar, bakteriyel konakçıları içeren her ortamda bulunur ve birçok biyolojik süreçte önemli rol oynarlar (Kakasis ve ark, 2019). Bakteriyofajlar, bakterilerin %4 – 50' sini enfekte ederek biyosferdeki jeokimyasal döngünün önemli bir faktörü olarak görev almaktadırlar (Brüssow ve ark, 2005). Fajlar genellikle bakteriyel konakçıları türe veya hatta suşa özel bir şekilde enfekte etmektedirler.

Günümüzde enfeksiyon hastalıklarına sebep olan pek çok bakteri olduğu bilinmektedir. Bunlardan Metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vankomisin dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA), Vankomisin dirençli *Enterococcus* (VRE), çoklu ilaç dirençli *Mycobacterium tuberculosis* ve *Escherichia coli* gibi bazı bakteriler enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklere ve ilaçlara karşı direnç kazanmışlardır. Antibiyotik varlığında canlı kalabilen bakteriler gen mutasyonları veya antibiyotikleri etkisiz kılacak direnç genleri geliştirebilme kabiliyetindedirler. Direnç geliştiren bu bakteriler ayrıca konjugasyon yoluyla yeni kazandıkları direnç genlerini diğer bakterilere de aktarabilirler. Bulaştırıcı ve öldürücü özelliklerinden dolayı bu antibiyotik dirençli organizmalar süper bakteriler olarak adlandırılırlar (Akyar, 2010). Enfeksiyon hastalıklarında önemli rol oynayan ve fırsatçı bir patojen olan diğer bir organizma ise çoklu antibiyotik direncine sahip *Escherichia coli* (*E. coli*) dir. Farklı antijenik özellikleri ile çok sayıda serotipi bulunan bu bakterinin çoğu suşu sıcakkanlı hayvan bağırsaklarının doğal florasında zararsız iken bazı suş ve serotipleri insan ve hayvanlar için patojenite göstermektedir. Kolibasillosis etmeni olarak özellikle buzağı, kuzu, domuz yavruları ve civcivlerde önemli ekonomik kayıplara yol açarken, ineklerde mastitis, kanatlılarda hava kesesi yangısı ve koligraniloma, kedi ve köpeklerde idrar yolları enfeksiyonları hayvanlarda sık görülen *E. coli* enfeksiyonlarıdır. *E. coli* insanlarda ise, safra ve idrar yolları enfeksiyonları, menenjit, septisemi, arteriosklerosis, hemolitik üremik sendrom (HUS), yara enfeksiyonları, çeşitli immünolojik hastalıklar ve karaciğer apsisi gibi ciddi hastalıklara sebep olmaktadır. *E. coli*'nin sebep olduğu enfeksiyonlardan biri olan yara enfeksiyonları, ameliyat sonrasında veya deri yanıklarında açık yaranın enfekte olması gibi yüzeysel enfeksiyonlar olabildiği gibi derin cerrahi operasyonlar sonrası bakteriyel enfeksiyon varlığında derinin en alt katmanlarına

kadar ulaşarak ciddi komplikasyonlara neden olabilirler. Özellikle diyabet hastalarında diyabetik ayak enfeksiyonuna yol açarak diyabetin en sık ve ciddi komplikasyonlardan birini oluşturmaktadır ve diyabetik hastaların %12 – 25’i yaşamlarının bir döneminde ayak sorunları nedeniyle sağlık kuruluşlarına başvurmaktadır (Ertuğrul, 2017).

Enfeksiyon hastalıklarında ilk akla gelen tedavi yöntemi antibiyotikler, enfeksiyon etkeni fırsatçı patojenlere karşı hala potansiyel tedavi yöntemi olarak düşünülmektedir ancak bilinçsiz ve sık antibiyotik kullanımı sonucunda önlenemez bir hızla antibiyotik direncinin arttığı hakkında raporlar her geçen gün artmaktadır. Gelişen antibiyotik dirençliliği, özellikle de çoklu dirençlilik, yeni antibiyotiklerin devreye girmesini zorunlu hale getirmiştir. Ancak antibiyotik araştırmaları ve keşif hızı son yıllarda çok yavaşlamış ve yeni antibiyotik geliştirme çalışmalarının yetersizliği nedeniyle, patojen bakterilere spesifik bakteriyofajların kullanılabileceği tedavi yöntemleri gündeme gelmiştir (WHO, 2018). Patojenlere karşı faj uygulanmasının antibiyotiklerle karşılaştırıldığında birçok avantajı bulunmaktadır. Fajların belli bir bakteri türüne özgü aktivite göstermeleri onların antibiyotiklerin aksine doğal mikrobiyotayı oluşturan diğer mikroorganizmalara zarar vermemesini sağlamaktadır. Antibiyotiklerin etkisi kullanıldıktan sonra azalmaktayken, bakteriyofajlar ortamdaki konakçı bakteriler ölene kadar çoğalmakta ve bakteriler öldüğünde in-aktif hale gelerek kendi üremelerini (oto dozaj) kontrol etmektedirler. Bunların yanısıra bakteriyofajlar çoğunlukla nükleik asit ve proteinlerden oluştukları için toksik değildirler ve bakterilerin oluşturduğu antibiyotiklere direnç mekanizması, bakteriyofajların söz konusu bakteriye etki etmesini engelleyememektedir. Bakteriyofajların doğada fazlalıkla bulunmaları patojen bakterilere karşı etkili fajların bulunmasını kolaylaştırmaktadır ve genellikle kanalizasyon, atık sular gibi çevrelerden izole edilebildikleri için antibiyotiklere göre daha az maliyetlidirler.

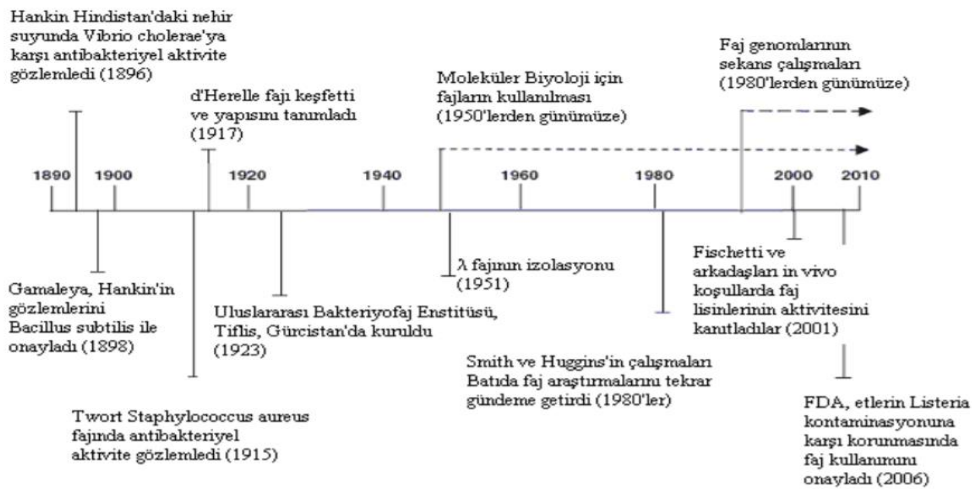
Bu tez kapsamında ise; çevresel örneklerden (hastane kanalizasyon suyu, hayvan dışkısı, hayvan sulukları vb.) *E. coli* DH10B suşuna etkili litik bakteriyofajların izolasyonu ve bu bakteriyofajların Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi (REDPROM) laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan diyabetik ayak enfeksiyon (DAE) kökenli klinik *Escherichia coli* izolatlarına karşı etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bakteriyofajlar

#### 2.1.1. Bakteriyofajların Keşfi

Bakteriyofajların varlığı Ernest Hankin tarafından 1896 yılında ilk kez fark edilmiştir. 1913 yılında ise Frederick Twort tarafından “bakterileri enfekte ederek öldüren bir etmen” olarak tanımlanmış olsa da Felix d’Herelle, 1917’de “dizanteri basilinin görünmez bir mikrobunu” keşfederek bu mikroorganizmaları bakteriyofaj olarak adlandırmış ve bakteriyofajların antimikrobiyal etkisini dünyaya duyuran ilk kişi olmuştur (Ergin ve ark, 2017). Bakteriyofajların tarihsel evrimi Şekil 1’de verilmiştir (O’Flaherty ve ark, 2009). Bakteriyofajların antimikrobiyal ajan olarak kullanımı, 1928’de Alexander Fleming’in bakterilerin çoğalmasını durduran penisilini keşfetmesiyle batı dünyası için önemini yitirmiş ve patojen bakterilere karşı antibiyotik çağı başlamıştır (Nobrega ve ark, 2015). Patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması ve bu durum karşısında yeni geliştirilen antibiyotiklerin de yetersiz kalması, bilim insanlarını patojen bakterilere karşı yeni yöntemler geliştirmeye yönlendirmiştir (Snyder ve ark, 2016). Son yıllarda patojen bakterilere karşı bakteriyofajların kullanımı araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiş ve “faj terapisi” olarak adlandırılan tedavi yönteminin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla artmıştır (Beke ve ark, 2016).

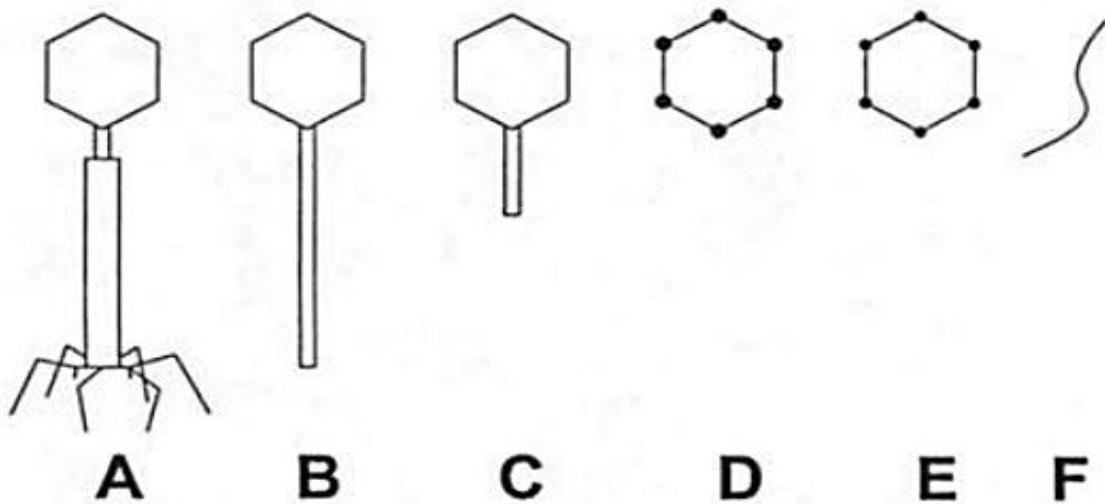


Şekil 1. Bakteriyofajların Tarihsel Evrimi.

### 2.1.2. Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Bakteriyofajların sınıflandırılmasında öncü kabul edilen bilim insanları, 1937'de fajların boyut ve fizikokimyasal ajanlara karşı direnç farklılıkları gösterdiğini kanıtlayan Avustralyalı mikrobiyolog Sir Macfarlane Burnet ve fajların morfolojik olarak çeşitliliğini kanıtlayan Holmes Ruska'dır. 1943'te Ruska, virüslerin elektron mikroskobu ile sınıflandırılmasını önermiştir. Holmes, 1948'de virüsleri üç aileye ayırmış ve bunlardan biri olan Phagineae familyasının fajları oluşturduğunu bildirmiştir. Holmes sınıflandırması, konakçı aralığı ve hastalığın semptomlarına dayanmaktadır. Örneğin, herpesvirüsler ve poksvirüsler ciltte püstül ürettikleri için bir aile olarak kabul edilmiştir. 1962'de ise Lwoff, Horne ve Tournier, virüs sınıflandırmasının virionlar ve onların nükleik asit özelliklerine dayandırılması gerektiğini belirtmiş ve birkaç faj içeren latinleştirilmiş bir terminolojiye sahip bir sistem önermiştir. 1971'de Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV), altı faj "cinsi" içeren ilk raporunu yayınlamıştır. Bunlar; T-çift fajlar,  $\lambda$  faj, lipid faj PM2,  $\Phi$ X grubu, filamentli faj ve ribofaj grubudur. Gruplar, faj türleri ve özelliklerine göre listelenmiştir. Bu rapor faj sınıflandırmasının başlangıç noktası olarak düşünülmektedir (Ackermann, 2011).

Bir diğer yandan fajların sınıflandırılmasında morfolojik ve moleküler özellikleri de dikkate alınmıştır. Bradley 1967 yılında sahip oldukları nükleik asit ve morfolojik yapılarına göre bakteriyofajları A, B, C, D, E ve F olmak üzere 6 tipe ayırmıştır (Şekil 2).

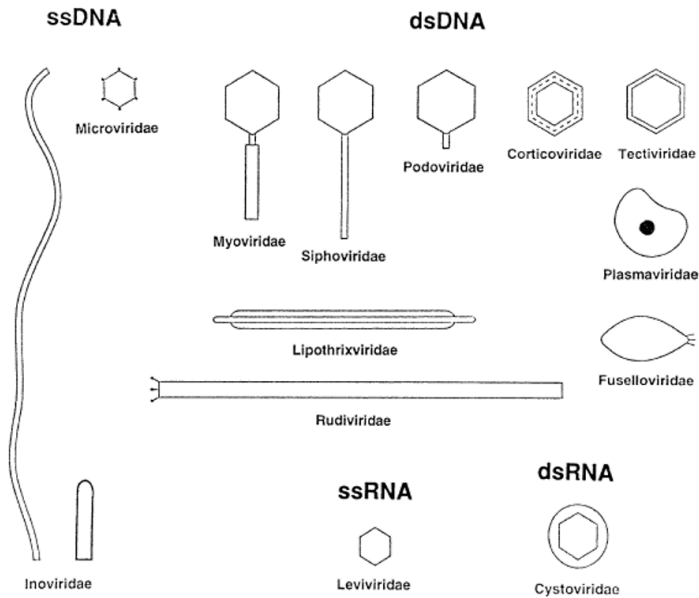


Şekil 2. Bakteriyofajların Bradley'e göre Sınıflandırması.



- A tipi fajlar uzun kuyruklu, kılıflı, kasılabilen ve çift iplikli linear DNA'ya,
- B tipi fajlar uzun kuyruklu, kılıflı ve çift iplikli linear DNA'ya,
- C tipi fajlar kısa kuyruklu, kılıfsız ve çift iplikli linear DNA'ya,
- D tipi fajlar kuyruksuz, büyük kapsomerli, tek iplikçi DNA'ya,
- E tipi fajlar kuyruksuz, küçük kapsomerli, tek iplikçi RNA'ya,
- F tipi fajlar ise başsız, ipliksi ya da filamentöz, tek iplikçi DNA'ya sahiptirler.

İlerleyen yıllarda fajların morfolojik özellikleri yanında nükleik asit yapılarının da dikkate alındığı "Ackermann Sınıflaması" olarak adlandırılan, diğer bir sınıflandırma modeli geliştirilmiştir (Ackermann, 2003). Bu modele göre yaklaşık 5100 bakteriyofaj dört yapısal gruba ayrılmış ve 1 takım, 13 aile ve 30 cins olarak tanımlanmıştır (Tablo 1). Şekil 3'te başlıca faj gruplarının şematik gösterimi verilmiştir. Bakteriyofajların % 95'ten fazlası *Caudovirales* takımı olup kuyruklu ve dsDNA yapısındadır. *Caudovirales* cinsi, *Siphoviridae*, *Myoviridae* ve *Podoviridae* olmak üzere 3 aileye ayrılmıştır. Bakteriyofajların % 60'ının oluşturduğu uzun ve esnek kuyruklu *Siphoviridae*, % 25'nin oluşturduğu çift katlı kısılabilir kuyruklu *Myoviridae*, % 15' ise kalın ve kısa kuyruklu *Podoviridae* ailesidir (Ackermann, 2007).



Şekil 3. Bakteriyofaj gruplarının şematik gösterimi.

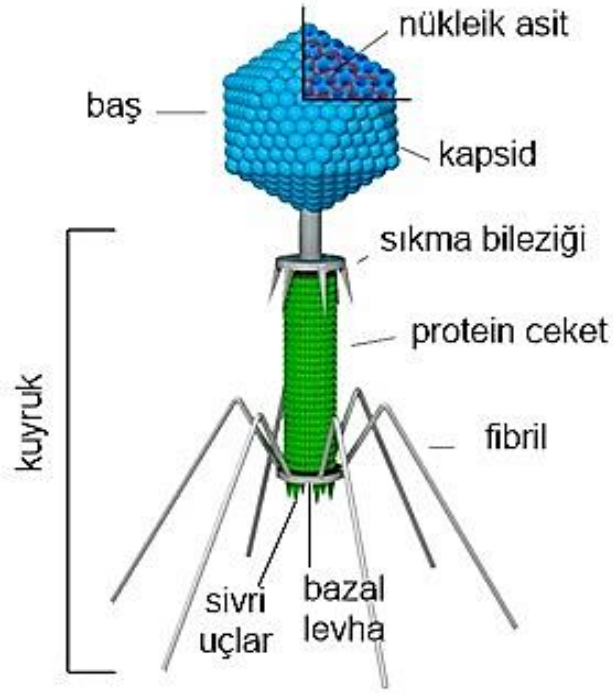
**Tablo 1** Bakteriyofajların sınıflandırılması ve temel özellikleri (Ackermann, 2003; Ackermann, 2007)

Morfoloji	Nükleik Asit	TakımveFamilya	Cins	Örnek	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	Caudovirales	15		
		Myoviridae	6	T4	Kontraktıl Kuyruk
		Siphoviridae	6	$\lambda$	Uzun Kuyruk
		Podoviridae	3	T7	Kısa Kuyruk
Polihedral	DNA, ss, C ds, C, T ds, L RNA, ss, L ds, L, S	Microviridae	4	$\Phi$ X174	Lipit içeren kompleks
		Corticoviridae	1	PM2	kapsid
		Tectiviridae	1	PRD1	Lipoprotein kaplı
		Leviviridae	2	MS2	kapsid
		Cystoviridae	1	$\Phi$ 6	Lipit Zarf
Filamentöz	DNA, ss, C ds, L ds, L	İnoviridae	2	Fd	Uzun veya Kısa
		Lipothrixviridae	1	TTV1	Filament
		Rudiviridae	1	SIRV	Lipit Zarf TMV Benzeri Yapı
Pleomorfik	DNA, ds, C, T ds, C, T	Plasmaviridae	1	L2	Kapsid yok, Lipit Zarf
		Fuselloviridae	1	SSV1	Kapsid yok, Limon formu

C: dairesel; L: linear; S: segmentli; T: süperhelikal; ss: tek zincirli; ds: çift zincirli.

### 2.1.3. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri

Tipik bir faj içerisinde genetik materyali bulundurduğu bir baş, boyun, kuyruk ve kuyruk liflerinden meydana gelir. Baş kısmında nükleik asit moleküllerinin birleşerek yumak şeklini oluşturdukları yapı, protein kılıfıyla kaplı bir şekilde bulunur. Kapsit olarak adlandırılan bu protein kılıf, birbirine benzeyen alt birimlerden oluşmuş, prizma şeklinde bir yapıdır. Kapsitler genelde altıgen şekline sahip olup, polipeptit ünitelerinden meydana gelen kapsomerlerin bir araya gelmesiyle oluşur. Genetik materyali içeren nükleik asit ve kapsiti oluşturan karmaşık yapı 'nükleokapsid' olarak isimlendirilir (Şekil 4) (Ackermann, 2007; Regenmortel ve ark, 2000).

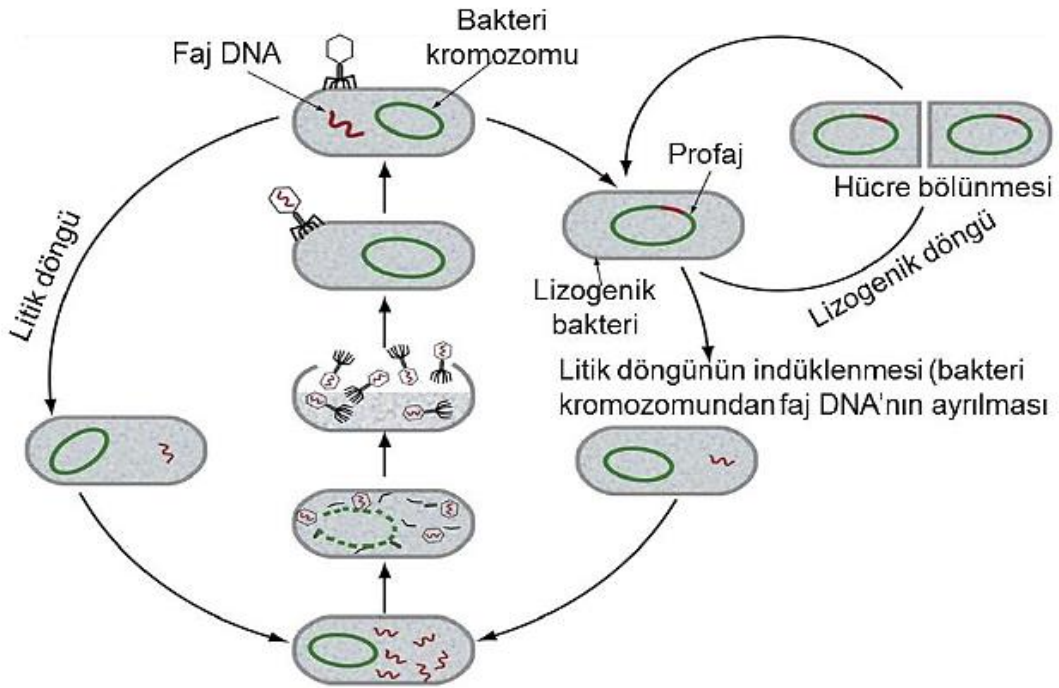


**Şekil 4.** Tipik Bir Bakteriyofaj Yapısı.

Bakteriyofajların litik veya lizojenik hayat döngüleri olabilmekte, bazılarında ise her ikisi de görülmektedir (Şekil 5). Litik hayat döngüsü; adsorpsiyon, penetrasyon, biyosentez ve lizis evrelerinden oluşmaktadır (Guttman ve ark, 2005). Bakteriyofajın bakteriyi enfekte etmesi adsorpsiyon basamağı ile başlamaktadır. Adsorpsiyon basamağı konakçı hücre duvarı ile kuyruklu fajlarda taban fibrillerinin ya da kuyuksuz fajlarda kapsomerlerin yüksek uyumu ile gerçekleşmektedir. Bakteriyofajın bakteriye özgünlüğünde adsorpsiyon basamağı önemli rol oynamaktadır. Bakteriye özgü kapsül yapısı, lipoprotein tabakası, pili, flagella gibi yüzeyde bulunan protein tabiatındaki yapılar adsorpsiyon için gerekmektedir. Bununla birlikte, ortamın pH değeri,  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  gibi iyonların varlığı ile elektrostatik etkileşimler adsorpsiyon basamağını etkileyebilmektedir (Çelik ve ark, 2017). Penetrasyon basamağında faj nükleik asidini enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla konakçı bakteri hücresinin içine aktarmaktadır. Zarar görmeden konakçı bakterinin hücre zarını geçen faj nükleik asidi, periplazmik boşluk içinde bulunan nükleazlardan ve restriksiyon enzimlerinden korunmak için DNA/RNA'sını yapışkan uçlar vasıtasıyla hızla daireselleştirmekte veya lineer uçlarını korumaya almaktadır. Ardından faj DNA/RNA'sı, konakçı bakterinin RNA polimerazına tanıtılmakta ve *erken genlerin* transkripsiyonu gerçekleşmektedir. Erken genler ile faj genomu korunmakta ve konakçı bakteri, fajın çoğalabilmesine olanak sağlayacak şekilde yeniden

yapılandırılmaktadır. İlerleyen aşamada, konakçı bakteride yeni faj DNA/RNA'sının sentezlenmesinde kullanılacak ürünleri kodlayan *ara genlerin* ve faj partiküllerinin şekillenmesi ile DNA/RNA'sının paketlenmesini sağlayan enzimleri kodlayan bir dizi *geç genlerin* transkripsiyonu gerçekleşmektedir (Guttman ve ark, 2005). Morfogenez olarak adlandırılan basamakta bakteriyofajların biyosentezi gerçekleşmektedir. Konakçı bakteri sitoplazmasında sentezlenen yeni faj parçaları bir araya gelmektedir. Son aşama olan liziste ise olgunlaşan yeni fajlar konakçı bakteri hücrelerini parçalamakta ya da hücre zarında bulunan porlardan dışarı çıkmaktadır (Clokier ve ark, 2018).

Lizojenik döngüde ise bakteriyofaj, bakteri hücresi içine girdikten sonra genetik materyalini bakteri DNA'sı ile entegre hale getirmekte ve "profaj" olarak hücre genomunda bulunmaktadır. Profajlar, konakçı bakterinin bölünmesi sırasında bakteri DNA'sı ile birlikte replike olmakta ve yeni bakteri hücrelerine aktarılmaktadır. Bakterinin içinde bulunduğu çevresel koşullar kötüleşmediği sürece bakteriyofaj etkisiz halde varlığını sürdürmektedir. Ancak bakterinin çevresel koşulları bozulduğunda, örneğin besin kaynakları tükendiğinde, bakteri içindeki bakteriyofaj aktif hale gelip çoğalarak bakteriyi parçalamaktadır (Hobbs ve ark, 2016).



Şekil 5. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri.

#### 2.1.4. Bakteriyofajların Uygulama Alanları

Bakteriyofajlar öncelikle patojen bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonlara karşı antibiyotiklere alternatif olarak “faj terapi” adıyla enfeksiyon alanında kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra birçok alanda fajlara yer verilmiştir. Örneğin tarımda elma çiçeği enfeksiyonuna sebep olan *Erwinia amylovora* için bakteriyofajlar etkin bir tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır. Bakteriyofajlar ayrıca gıda kontaminasyonlarına yol açan *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella* ve *E. coli* gibi bakterilerin kontrolünde de kullanılmaktadır. Bu açıdan bakteriyofajlar önemli uygulama alanlarına sahip olmasıyla kayda değer bir rol oynamaktadır (Nnadozie ve ark, 2017).

Fajların uygulama alanları beş başlık altında toplanabilmektedir (Nicastro ve ark, 2016).

- a) Moleküler biyolojide model sistem olarak kullanımları: Rekombinant DNA teknolojisinde vektör olarak kullanılıp bakterilerde istenilen genlerin ekspresyonu sağlanmaktadır.
- b) Faj tiplendirme için kullanımları: Bakteri tanımlanmasında ve patojen bakterilerin gıdalarda olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadır.
- c) Faj terapisi olarak kullanımları: Hayvan ve insanlarda bakteriyel enfeksiyonlara karşı antibiyotiklere alternatif olarak önerilmektedir. Birçok çalışmada *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Vibrio cholera* ve *Staphylococcus* enfeksiyonlarında fajların etkili olduğu belirlenmiştir.
- d) Biyokoruyucu olarak kullanımları: Gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı, gıda ekipmanlarının yüzey dekontaminasyonunda ve biyofilm oluşumunu engellemek amacıyla kullanılmaktadır.
- e) Faj Display olarak kullanımları: Faj gösterimi, proteinleri kodlayan genetik bilgilerle proteinleri birbirine bağlamak için bakteriyofajları (bakterileri enfekte eden virüsler) kullanan, protein-protein, protein-peptit ve protein-DNA etkileşimlerinin incelenmesi için bir laboratuvar tekniğidir.

#### 2.2. Faj Terapi Çalışmaları

Bakteriyel enfeksiyonların önüne geçmek için yıllardan beri kullanılan ve en iyi bilinen tedavi yöntemi antibiyotiklerdir. Ancak son 50 yılda keşfedilen ve artarak devam eden, antimikrobiyal direnç bu tedavi yönteminde önemli bir sorun oluşturmaktadır. İlk olarak 1970’lerde bildirilen çoklu ilaç direnci, dünya çapında enfeksiyon kontrolünde kaydedilen ilerlemeye yönelik büyük bir tehdit haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü, antibiyotik direnci

üzerine verdiği küresel bir raporda, basit enfeksiyonların bile ölümcül olabileceği bir antibiyotik sonrası dönemin tehlikesini vurgulamıştır (WHO, 2013). Hastalık Kontrol Merkezi (CDC), ABD’de yılda en az 23.000 ölümün dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonun bir sonucu olduğunu tahmin ederken, Avrupa’da özellikle yüksek seviyelere sahip ülkelerde artan antibiyotik direnci seviyeleri rapor edilmektedir. Öte yandan, çoğunlukla antibakteriyel pazar diğerlerine göre daha az karlı olduğu için ilaç şirketlerinin yeni antibakteriyel ajanlar geliştirme ve üretme konusundaki çalışmaları düşüş göstermektedir. Şu an enfeksiyona sebep olan antimikrobiyal dirence sahip bakterilerle mücadelede araştırmacıların ilgi odağı olan bakteriyofajlar ve bakteriyofaj bazlı ürünler, en başarılı alternatiflerden biri olma potansiyeline sahiptir. 1915’te İngiliz doktor Frederick Twort, bakterilere zarar verebilecek “ultra mikroskopik bir virüsün” potansiyel varlığını ilk tanımlayan kişi olmuştur. Ancak virüsün mikroskopik görüntüsünü elde etmesine rağmen bu hipotezini doğrulayamamıştır. 1917’de Felix d’Herelle dizanteriden iyileşen hastaların dışkı kültürlerinde benzer bir fenomen gözlemlemiştir. Twort’un aksine d’Herelle, bakteriyel antagonizmanın nedeninin bakteriyofaj adını verdiği bir virüs olan “görünmez bir mikrop” varlığı olduğuna ikna olmuştur. Böylece bu tarihten itibaren bakteriyofajların enfeksiyona neden olan bakteriler üzerine etkisi araştırılmaya başlanmıştır (Kakasis ve Panitsa, 2019).

Birçok faj uygulaması, fajın patojenik bakterilere özgülüğünden yararlanmaktadır. Faj tedavisi, hedeflenen patojeni enfekte etmek ve öldürmek için lokal veya sistemik olarak bir hastaya doğrudan uygulanan litik bakteriyofajın kullanılmasıdır. İlk olarak 1900’lerin başlarında keşfedilmiş olsa da faj kullanımı Batı tıbbında ilgi görmemiş ve II. Dünya Savaşı’ndan sonra antibiyotiklerle yer değiştirmiştir. Antibiyotik sonrası döneme girerken şu an faj tedavisine yeniden artan bir ilgi oluşmuştur (Nicastro ve ark, 2016). Bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için bakteriyofaj kullanımına ilişkin literatür neredeyse 100 yıl öncesine dayanmaktadır ve kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir (Abedon ve ark, 2011). 1920’lerin başında, araştırmacılar tifo ateşi, kolera ve *Staphylococcus aureus* bakteremisini tedavi etmek için başarılı intravenöz faj kullanımını tanımlamışlardır. Los Angeles County Merkez Hastanesinde tifo ateşini tedavi etmek için bakteriyofajların kullanımıyla ilgili 10 yıllık bir çalışma sırasında, araştırmacılar 56 hastayı tür spesifik fajlarla tedavi etmişler ve sonuçta 53’ünde etkili bir iyileşme sağlanmıştır. 2001’de ise pürülan akciğer hastalığı olan ve intravenöz *S. aureus* faji alan hastalarla antibiyotik alan kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Bakteriyofajla tedavi edilen grup için iyileşme oranı %95 iken antibiyotiklerle tedavi edilen grup için bu oran %64’ dür (Sulakvelidze ve ark, 2011).

Faj terapi uygulamaları ilk yıllarda, tifo ateşi, dizanteri, deri ve cerrahi yara enfeksiyonları, peritonit, septisemi, idrar yolu enfeksiyonları ve dış kulak iltihabı gibi durumları tedavi etmek için kullanılsa da 1930'larda, Sulakvelidze ve arkadaşları, Gürcistan, Rusya ve Polonyada yapılan çalışmaları gözden geçirmiş ve kanser hastalarında daha önce bahsedilen durumların yanı sıra pnömoni, menenjit, osteomyelit ve ameliyat sonrası enfeksiyonların tedavisi için başarılı bir bakteriyofaj kullanımını ortaya koymuştur. 20. yüzyılın sonunda ise bazı öncül ve heyecan verici çalışmalar hayvan modellerinde faj tedavisinin kullanımını sunmuş ve daha sonra İngiliz bilim insanlarının insan faj tedavisi denemelerini yeniden keşfetmesini sağlamıştır (Altamirano ve Barr, 2019). Böylece özellikle son 10 yılda faj terapi çalışmaları bilim insanlarının merak konusu olmuştur.

Aşağıdaki tabloda Weber ve arkadaşlarının 2001'de çeşitli bakteriler tarafından enfekte olmuş 1307 vakada yapılan bakteriyofaj uygulamasının bir kısım bulguları gösterilmektedir.

**Tablo 2** Bakteriyofaj Tedavisi Sonuçları (1307 vaka)

Klinik Tanı	Etiyoloji	Faj Terapi Uygulanan	Tamamen İyileşen	Belirgin Gelişme Gösteren	Etki Göstermeyen
Septicemia	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	106	93(87.7%)	8 (7.5%)	5(4.7%)
Purulent otitis media	<i>S. aureus, Klebsiella, Pseudomonas</i>	33	28(88.4%)	3 (9.09%)	2 (6.06%)
Purulent meningitis	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella</i>	10	10 (100%)		
Varicose ulcers of lower extremities	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	77	47(61.0%)	21 (27.2%)	9 (11.6%)
Bronchopneumonia, empyema	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella</i>	57	47 (82%)		10 (18%)
Pleuritis with fistula	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella</i>	49	42 (86%)	5 (10%)	2 (4%)
Suppurative peritonitis	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Pseudomonas</i>	66	60 (91%)	5 (8%)	1 (0.15%)
Urinary tract infections	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella</i>	78	59(75.6%)	9 (11.59c)	10 (12.8%)
Pyogenic infections of burns	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	49	42 (86%)	7 (14%)	

Buna göre 1123 vaka tamamen iyileşirken 134 vakada yapılan tedavi geçici olarak etkili olmuştur. Bunlardan yalnızca 50 vaka bakteriyofajla tedavi edilememiştir. Bu sonuçlar, mevcut antibiyotiklerle tedaviye yanıt vermeyen bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede bakteriyofaj tedavisinin yüksek etkinliğini doğrulamaktadır (Weber-Dąbrowska ve ark, 2001).

Gürcistan'da, Markoishvili ve arkadaşları 2002'de antibiyotik ve litik fajlar ile elde edilmiş biyolojik olarak parçalanabilir bir polimerin uygulanmasıyla, vaskülerize ülserlerin

başarılı bir şekilde iyileştiğini göstermiştir. Bununla birlikte, fajların bağımsız etkisi antibiyotığın etkisinden ayırt edilememiş ve yazarlar bunun üzerine daha fazla çalışma önermiştir (Markoishvili ve ark, 2002).

Yanık tedavisinde yara enfeksiyonlarına sebep olan *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı bakteriyofaj tedavisi uygulamak için 2015'ten 2017'ye kadar süren Fransa, Belçika ve İsviçre'nin çok merkezli olarak gerçekleştirdiği "Phagoburn Projesi"nin sonuçları bakteriyofaj terapisinin büyük ölçüde umut vadettiğini göstermiştir. Çalışmada 25 hastadan izole edilen bakterilere karşı 12 tane faj kokteyli oluşturulmuş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Yayınlanan raporda (Sybesma ve ark, 2018) çalışmanın hem üretim uygulamalarında hem de klinik uygulamalarda şimdiye kadar gerçekleştirilen ilk klinik faj terapisi denemesi olarak vurgulandığı bildirilmiştir. Bunların yanı sıra, hazırlanan faj kokteyli için herhangi bir istenmeyen yan etki bildirilmemiştir.

Bu çalışmalara ek olarak bakteriyofajların oral yolla verilmesine odaklanan çalışmalar da yapılmıştır. *E. coli*'yi hedef alan ve ishali hastalığın tedavisi için tasarlanmış T4 benzeri bir faj preparatı, 2017'de İsviçre ve Bangladeş'ten sağlıklı yetişkinlerde ve hasta çocuklarda yapılan faz I plasebo kontrollü çalışmalarda değerlendirilmiştir. Fiziksel muayene ve hepatik, renal veya hematolojik fonksiyonun laboratuvar testlerinde oral faj uygulamasının herhangi bir yan etkisi bulunmamıştır (Sarker ve ark, 2017).

Çalışmalar ayrıca oral faj preparatlarının biyo-yararlanımı ve aktivitesi hakkında bilgi sağlamıştır. Fajlar, sağlıklı bireylerin bağırsaklarında çoğalmamış ve ilk faj dozunun sadece küçük, doza bağımlı fraksiyonları dışkı örneklerinde tespit edilmiştir. Kan dolaşımında fajlara veya faja özgü antikorlara dair hiçbir kanıt bulunamamakla birlikte faj preparasyonu, bağırsak mikrobiyotasının bileşimini bozmamıştır (Sarker ve ark, 2017).

2018'de Gabisonia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çoklu antibiyotik direncine sahip *E. coli* patojenlerinin buzağılarda neden olduğu enfeksiyonun önüne geçmek için önemli bir alternatif tedavi yöntemi olabilecek litik aktiviteye sahip faj kokteyli oluşturulması amaçlanmıştır. 350 buzağının 120'sinde ishal semptomlarına yol açan patojenik bakteri enfeksiyonları görülmüştür. Bu enfeksiyonun temel nedeninin Enterotoksijenik *E. coli* suşları olduğu ortaya çıkmıştır. Antibiyotik yaklaşımıyla yapılan tedavi sonucunda izolatların tamamı antibiyotiklere direnç sergilemiştir. Çalışmada patojenik *E. coli* suşlarına karşı oluşturulan faj preparatı, suşların % 95,8'ine litik etki göstermiştir (Gabisonia ve ark, 2018)

2019'da Jeon ve arkadaşları karbapenem direncine sahip ve yoğun bakım ünitelerinde ciddi nozokomiyal enfeksiyona neden olan fırsatçı bir patojen olan *Acinetobacter baumannii*ye karşı etkili bir bakteriyofaj tedavisi uygulamayı amaçlamışlardır. *A. baumannii*



fajı, Güney Kore'deki bir üniversite hastanesindeki hastalardan seçilen *A. baumannii* klinik suşları kullanılarak kanalizasyon suyundan izole edilmiştir. Faj, bakteri büyümesini doza bağımlı bir şekilde inhibe etmiş ve yüksek bakteriyolitik aktivite sergilemiştir. Ek olarak in vivo çalışmalarda, faj ile tedavi edilen grupların hiçbir ölüm veya ciddi yan etki göstermediğini bildirmiştir (Jeon ve ark, 2019).

## 2.3. *Escherichia coli*

### 2.3.1 *Escherichia coli*'nin Tarihçesi

*E. coli* ilk kez, bir pediyatrist olan Theodor Escherich tarafından 1885 yılında tanımlanmıştır. Escherich'in bebeklerin bağırsak floraları üzerine yaptığı çalışmalar neticesinde, sağlıklı bireylerin mikrobiyal florasının normal bir üyesi olarak keşfettiği bu mikroorganizma, *Bacterium coli commune* olarak adlandırılmıştır. 1919 yılında Castellani ve Chalmer'in önerisi üzerine bakterinin adı değiştirilerek Escherich'e hitaben *Escherichia coli* olarak isimlendirilmiştir. Farklı sayıda olan antijenik yapılara göre *E. coli*'nin 700'den fazla serotipi tespit edilmiştir (Nataro ve Kaper, 1998). 1945 yılında bir bakımevinde çocuklarda meydana gelen ishal salgınına neden olan serogrup O11 suşu etken olarak gösterilmesi ile bağırsak patojeni *E. coli* (EPEC, Enteropatojenik *E. coli*) suşlarının tanımı yapılmaya başlanmıştır. EPEC'e bağlı enfeksiyonların en belirgin özelliği attaching-effacing (A/E) histopatolojisidir. Mikrovillüslerin etkili hale gelmesi ve bakteri ve epitel hücre membranı arasındaki sıkı aderans intimin olarak bilinen EPEC suşlarının karakteristik adeziv determinantı tarafından gerçekleştirilmektedir (Kossow ve ark, 2016). EPEC ve ETEC'in (Enterotoksijenik *Escherichia coli*) aksine, enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) sadece insanda bulunur. EIEC enfeksiyonu, profüz diyare ve yüksek ateş ile karakterize Shigellosis'e benzer bir sendroma neden olur. EIEC suşları oldukça invazivdir; Bağırsak hücrelerine bağlanma ve internalizasyon, adezinler tarafından teşvik edilir. EIEC suşları hiçbir toksin üretmemesine rağmen, bağırsak duvarı mekanik hücre yıkımı nedeniyle ciddi hasar görür İlk kez 1982'de gıdalarda tanımlanan Enterohemorajik *E.coli* (EHEC ) ise sıklıklı gıda kaynaklı olup, ölümlerden sorumlu tutulan en önemli serotipi O157:H7'dir. *E.coli*'nin, dünyada hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde akut ve kronik ishale neden olan bir diğer tipi ise Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC) 'dir (Maloo ve ark, 2017). EHEC insanlarda Hemorajik kolitis (HC) ve hemolitik üremik sendrom (HUS) gibi klinik tablolara yol açmaktadır. Patojenite mekanizmasında Shiga benzeri toksinler, enterohemolizin gibi sistemler rol oynamaktadır. İlk kez 1987'de Peru'da akut diyaresi olan bir çocukta tanımlanan EAEC, EHEC gibi gıda kaynaklı ishal salgınlarında rol oynamıştır.

### 2.3.2. *Escherichia coli*'nin Etiyolojisi

*E. coli* 1,0 – 1,5 µm eninde, 2 – 6 µm boyunda düz, uçları yuvarlak bakteriyolojik boyalarla iyi boyanan Gram negatif bir basildir. *E. coli* suşları çoğunlukla fimbria oluşturmaktadır. Peritrik flagellalara sahip olan türleri hareketli iken, flagellaları olmayanlar hareketsizdir. Bu enterik mikroorganizma P-pilus ve Tip I flagellaları ile bağırsak epitelinde kolonize olmaktadır(Kuntz ve Kuntz, 1999). Genel üretim besiyerlerinde üreyebilmektedirler. Optimal üreme ısısı 37 °C' olmasına rağmen 20 °C – 44 °C arasında üreyebilmektedirler (Özkuyumcu, 2009). Normal besiyerinde hafif kabarık, yuvarlak, düzgün 1 – 2 mm çapında parlak S tipi koloniler yaparken bazı suşların kolonileri hafif mukoid (M) koloniler şeklindedir. Kanlı agarda bazı suşları β (Beta) – hemoliz oluşturmaktadır (Özkuyumcu, 2009). Enterobacteriaceae familyası içerisinde yer alan *E. coli*, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif ve oksidaz negatif bir bakteridir. *E. coli* insan ve hayvanların bağırsak florasında yaygın olarak bulunmaktadır. Gastrointestinal floranın doğal bir parçası olan *E. coli* türlerinin çoğu zararsız kommensallerdir. Sağlıklı bir bağırsak sisteminin muhafazası için yararlı olarak kabul edilmekte hatta çeşitli enterik hastalıklara karşı probiyotik tedavisi için kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak virülans genleri içeren bazı *E. coli* türleri insanlarda ve hayvanlarda ciddi hastalıklara sebep olabilen patojenik mikroorganizmalardır.

### 2.3.3. *Escherichia coli*'nin Sebep Olduğu Enfeksiyonlar

Patojenik *Escherichia coli*, insanlarda ve hayvanlarda farklı enfeksiyonlara neden olan en önemli bakteri gruplarından biridir. Çocuklarda; kusma, ishal, kolit yetişkinlerde; septisemiden, yara yanıklarında piyojenik enfeksiyona kadar *E. coli* pek çok bakteriyel enfeksiyon ve hastalıkta önemli bir patojendir. Bununla birlikte özellikle yanık ünitelerindeki tedavi sonrası çok sayıda yara enfeksiyonu neredeyse hiç tedavi edilememektedir. *Escherichia coli* yanık yaralarında yaygın bir erken kolonileştirici olmaya devam ederken, *Pseudomonas aeruginosa* yanık hastalarında yaşamı tehdit eden enfeksiyonun en yaygın nedeni olarak bilinmektedir. Her iki bakteri de birçok antibiyotiğe karşı içsel ve edinilmiş dirençleriyle bilinmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, antibiyotiklere alternatif tedavi edici ürünler geliştirme olasılığı antibiyotik direnci ile mücadelede kilit bir rol oynamaktadır (Golkar ve ark, 2014). Bunun yanı sıra diyabetik ayak enfeksiyonlarında patojenlerin prevalansı değişkendir. Ayak enfeksiyonunun gelişmesinden yara mikrobiyolojisinin çeşitli yönleri sorumludur. Bunlar arasında mikrobiyal yük, mikrop çeşitliliği, efektif organizmaların

varlığı ve mikrobiyal türler arasındaki sinerjik ilişki yer alır. Bunlar, mantarlardan aerobik ve anaerobik türlere kadar çeşitlilik göstermektedir. Genellikle bu duruma sebep olan mikroorganizmalar *S. aureus*, *Proteus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *koliform* bakterilerdir. *S. Aureus* ve beta-hemolitik koklar diyabetik ayak enfeksiyonunda en sık izole edilen mikroorganizmalardır. Ayrıca bazı çalışmalar, bu mikroorganizmaların etkileşimlerinin iltihaplanmaya neden olarak yara iyileşmesini engellediği ve enfeksiyonun kronikliğini artıran kollajenazlar, proteazlar, hemolizinler ve kısa zincirli yağ asitleri gibi virülans faktörlerinin üretimine yol açtığını göstermektedir. Enterobacteriaceae ailesinin (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* ve *Proteus mirabilis*) baskınlığı diyabetik ayak enfeksiyonlarında en büyük aerobik Gram-negatif çubuk grubu olarak rapor edilmiştir. Örneğin, bir çalışmada diyabetik yara örneği başına ortalama 1,8 bakteriyel patojen rapor edilmiş olup, bunların %51,2'si Gram negatif bakterilerdir. *Escherichia coli* ayrıca, diyabetik ayak enfeksiyonu olan 342 hastada en yaygın Gram-negatif bakteri olarak bildirilmiştir. *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* ve *Provetella* spp. daha az sayıda rapor edilmiştir (Sadeghpour ve ark, 2019).

Yine 2011 yılında yapılan bir çalışmaya göre (Goswami ve ark, 2011) yara bakım ünitesine bağlı tüm hastalar arasında en yaygın izole edilen patojenler *Proteus mirabilis*, *Enterococcus* sp. ve *Escherichia coli* olduğu belirlenmiştir. Bu etkene bağlı enfeksiyonların tedavisinde en önemli sorun ise antibiyotiklere dirençtir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmaya göre dirençli etkenler ile oluşan DAE'lerinin tedavi başarısızlığı 5 kat artmakta, amputasyon oranları daha yüksek olmakta, hastanede yatış süreleri uzamakta ve tedavi maliyetleri de duyarlı etkenlere göre yaklaşık 2 kat artmaktadır (Ertuğrul ve ark, 2012).

#### **2.3.4. *Escherichia coli*'de Antimikrobiyal Direnç**

*Escherichia coli*, dünyada en çok çalışılan bakterilerden biri olmasıyla ve tartışmasız tüm model organizmalar arasında en çok anlaşılabilen mikroorganizma olarak bilinmektedir. İnsan ve hayvan ekolojisi bağlamında, bu mikroorganizma, doğumdan hemen sonra kolonize olan ilk bakteri türlerinden biri olmakla birlikte, en önemli insan ve hayvan patojenlerinden biri olarak bağırsağın ortak bir parçası gibi düşünülebilmektedir. 1940'larda antibiyotik çağının başlamasıyla birlikte modern tıpta en büyük ve kayda değer gelişme yaşanmış ve bu sayede bulaşıcı hastalıkların önüne geçilmiştir. Ancak patojen bakteriler, her geçen gün onları

antibiyotiklere dirençli hale getiren farklı mekanizmalar geliştirmekte ve bu antimikrobiyal direnç, dünya çapında halk sağlığı sistemleri için küresel bir tehdit haline gelmektedir. *S.aureus*'un penisilin direnci geliştirdiği hastanede yatan hastalara uygulanmasından sadece birkaç yıl sonra tespit edildiğinden dolayı bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirme yeteneği, onların kullanılmalarından hemen sonra başlamıştır. *E. coli*'de ise, antibiyotiklere karşı direnç, bildirilen ilk vakalardan bu yana istikrarlı bir şekilde artmaktadır ve insan sağlığındaki etkisi nedeniyle, Enterobacteriaceae ailesinin geri kalanıyla birlikte Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO, 2017) insan sağlığına en büyük tehdidi oluşturan 12 bakteri ailesi listesinde yer almaktadır. İnsan sağlığı üzerinde geniş bir etkiye sahip olan *E. coli*'nin antimikrobiyal direnç durumunu, bir noktada ortak bir meselede karşılaşılan iki farklı, ancak birbirini tamamlayan bağlam altında analiz etmek gerekmektedir. Bu iki bakış açısı, dünya çapında çoklu ilaca dirençli *E. coli* suşlarının neden olduğu artan enfeksiyon sayısını ve bu bakterinin genetik dirençli özelliklerini diğer bakterilere geçirme yeteneğini içermektedir. *E. coli*'nin, insandan insana ve hayvanlardan insanlara dışkı veya oral yolla bulaşma kolaylığı nedeniyle bu mikroorganizmayı antibiyotik direnci pandemisinde böylesine önemli bir oyuncu haline getirmektedir. İkinci olarak, mikroorganizmanın insanların ve hayvanların bağırsaklarında kolonileşme yeteneği ve çok sayıda farklı bakteri ile yakın etkileşim içinde olması, diğer bakterilere genetik materyal vericisi olarak davranma özelliği sayesinde kurduğu etkileşimi ve diğer mikroorganizmalardan direnç genleri elde etme yeteneği bu mikroorganizmayı önemli bir tehdit haline getirmektedir. *E. coli*'nin antibiyotiklere karşı edinilmiş ve sürekli artan direnci, hali hazırda dünya çapında büyük bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. 2018'de, Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'ne bildirilen *Escherichia coli* izolatlarının yarısından fazlasının, sürveyans altındaki en az bir antimikrobiyal gruba dirençli ve birkaç antimikrobiyal gruba karşı da kombine direnç gösterdiği tespit edilmiştir (CDC 2018). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2017 yılında (Critchley ve ark, 2017), idrar yolu enfeksiyonlarından (İYE) izole edilen geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (ESBL) üreten *E. coli* suşlarının ulusal yaygınlığı %15,7 iken, levofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazole direnç oranları tüm izolatlar arasında %24 olarak rapor edilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde durum, Meksika, Çin ve Türkiye'den alınan ulusal sürveyans verilerinde bildirildiği üzere, *E. coli*'ye dirençli suşların, bakteriyel enfeksiyonları deneysel olarak tedavi etmek için dünya çapında yaygın olarak kullanılan sefalosporinlere, kinolonlara ve trimetoprim / sülfametoksazole (TSX) karşı %40'ın üzerinde bir prevalansa sahip olduğu gösterilmiştir. (Tablo 3).

**Tablo 3** Farklı Antibiyotiklere Karşı *E. coli*'nin Antibiyotik Direnç Oranları (Critchley ve ark, 2017)

Ülke	Direnç Oranı (%)		
	Sefalosporin	Kinolon	TSX
Meksika	54.4	59.0	62.1
Çin	52.4	69.8	Bilinmiyor
Türkiye	40.7	47.2	58.0

1945'te, penisilinin klinik uygulamasına girmesinden sadece birkaç yıl sonra, Alexander Fleming dünyayı antibiyotik aşırı kullanımı konusunda uyarmış ve birkaç yıl sonra ilk kez *S. aureus* suşunun penisiline dirençli olduğu bildirildiğinde bunun gerçeğe dönüştüğünü söylemiştir. Mevcut antibiyotik direnç krizinin temel nedeninin çeşitli insan faaliyetlerine bağlı olabileceği ve antibiyotiklerin aşırı kullanımının direncin evrimini açıkça etkileyebileceği gösterilmiştir (Read ve ark, 2014). Antibiyotiklerin aşırı kullanımına dair rapor edilen eylemler çok faktörlüdür ve sağlık, hayvancılık ve ilaç endüstrileri gibi farklı sektörlerdeki farklı argümanları içermektedir. Bu eylemlerin örnekleri arasında sağlık hizmeti sağlayıcıları tarafından uygunsuz antibiyotik reçetesi verilmesi, hayvancılık ve balık yetiştiriciliğinde yaygın antibiyotik kullanımı, antibiyotik tedavi rejimlerini takip etmeyen hastalar, kötü hijyen, bakteriyel mutasyonlar ve geliştirilen yeni antibiyotiklerin eksikliği sayılabilmektedir (WHO, 2014). Küresel bir antibiyotik satış veritabanını kullanan Klein ve arkadaşları 2018'de (Klein ve ark, 2018) dünya çapında antibiyotik tüketim oranının günlük 11,3 doz olduğunu ve bu oranın çarpıcı biçimde arttığını bildirmiştir. Bunun yanı sıra, karbapenemler ve kolistin gibi antibiyotiklerin tüketimi de artmaktadır ve bu durumda, bu ilaçlara karşı *E. coli* de dirençli suşların ortaya çıkması tutarlı olarak kabul edilmiştir. Bugüne kadar, bu mikroorganizmanın karbapenemlere direnci nadir ve prevalansı dünyanın çalışma alanına bağlı olarak değişmektedir. Ancak hidrolizinden ve dolayısıyla inaktivasyondan sorumlu olan karbapenemazlar, esas olarak plazmidler üzerinde kodlandığı ve yüksek oranda bulaşabilir olduğu için, gelecekte bu antibiyotiğe karşı direnç artışının *E. coli*'de görülebileceği iddia edilmiştir (Nordmann ve Poirel, 2013).

Bir diğer çalışmada Zhang ve arkadaşları antibiyotik direnci ile *E. coli* diyarejenik virülans fenotiplerinin kısmen bağlantılı olabileceğine dair epidemiyolojik kanıt bulmuşlardır. Bu hipotezi diyareli hastaların semptomların başlangıcından önce daha sık antibiyotik kullandıkları ve bu yüzden antibiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasını bozarak dirençli patojenlerin aşırı çoğalmasına neden olabildiği şeklinde açıklamışlardır (Zhang ve ark, 2015).

Sonuçta *Escherichia coli*'nin insanların ve hayvanların bağırsaklarında kolonileşme yeteneği, böylece fekal-oral yolla bulaşmasını kolaylaştırması ve antibiyotik direnç genlerini plazmitler yoluyla diğer bakterilere iletmesi ve diğer bakterilerden alması yeteneği, bu organizmayı antimikrobiyal dirençle mücadelede önemli bir hedef haline getirmiştir. *E. coli* antibiyotiklerin etkisiyle mücadele etmek için farklı mekanizmalar geliştirmiştir ve çoğu durumda tek bir suş direnç genlerini bu ilaçların farklı sınıflarına taşıyarak tedaviyi karmaşık hale getirebilmektedir. (Galindo-Méndez, 2020)

Tüm bunlar göz önüne alınarak günümüzde yapılan çalışmaların kayda değer sonuçlarıyla birlikte, antibiyotik dirençli enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde alternatif antibakteriyal yaklaşımların geliştirilmesi önemlidir. Artan antibiyotik ve antimikrobiyal direncin önüne geçmek için bakteriyofajlarla enfeksiyon tedavisi bu tür alternatif yöntemlerin arasında yerini almaktadır.

## 3.GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Çevresel Örnekler

Bu çalışmada, bakteriyofaj izole edilebilecek potansiyel kaynaklar olarak; hastane kanalizasyon suyu, hayvan dışkısı (inek, keçi, tavuk, güvercin, köpek ve kedi), hayvan suluğu (akvaryum suyu ve hayvanların su içtiği küçük göletler) olmak üzere çeşitli çevresel kaynaklar seçildi. Bu amaçla, farklı bölgelerden, toplam 7 su örneği ve 6 dışkı örneği toplanmıştır.

#### 3.1.2. İndikatör Bakteri *E. coli* DH10B

Faj kaynaklarından bakteriyofajların; izolasyon, saflaştırma ve titrelerinin belirlenmesi amacıyla konak bakteri olarak laboratuvarımızın kültür koleksiyonunda bulunan ticari *E. coli* DH10B suşu seçilmiştir. Bu suşun çoğaltılmasında sıvı besiyeri olarak TSB, katı besiyeri olarakta TSA kullanılmıştır.

#### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

##### **Tryptic Soy Agar (TSA)**

18.5 g hazır besiyeri 500 ml distile suda çözülmüş akabinde otoklavda 121 °C de 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra besiyeri steril petrilere dökülmüştür.

##### **CaCl<sub>2</sub>'lü Luria Bertani (LB) Agar**

Maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L, 15 gr/L agar agar karışımı yeterli miktarda distile su ile çözdürüldükten sonra son konsatrasyon 10 mM olacak şekilde CaCl<sub>2</sub> ilave edilmiştir. Hazırlanan CaCl<sub>2</sub>'lü Luria Bertani Agar besiyeri 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiş akabinde ~15 ml olacak şekilde steril petrilere dökülmüştür.



### **Tryptic Soy Broth (TSB)**

12 g hazır besiyeri 500 ml distile suda çözülmüş ardından otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

### **Luria-Bertani (LB) Broth**

Maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L olacak şekilde hazırlanan karışım yeterli miktara distile su ile çözdürüldükten sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

### **%0,5 Luria Bertani Soft (yumuşak) Agar**

Maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton (kazein) 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L, 5 gr/L agar agar karışımı yeterli miktara distile su ile çözdürüldükten sonra son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde CaCl<sub>2</sub> ilave edilmiştir. Hazırlanan Luria Bertani Soft Agar besiyeri 121°C’de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiş akabinde steril cam tüplere 5ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

### **Mueller-Hilton Broth (MHB)**

17 g hazır besiyeri 500 ml distile suda çözülmüş ardından otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

### **Eosin Methylen-Blue Lactose Sucrose (EMB) Agar**

13 g hazır besiyeri 500 ml distile suda çözülmüş akabinde otoklavda 121°C de 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra besiyeri steril petrilere dökülmüştür.

### **AXI besiyeri**

Önceden hazırlanmış TSA besiyeri 50°C’ye kadar soğutulmuştur. Besiyeri içerisine, final konsantrasyonu ampisilin (100 µg/ml), IPTG (1 mM)( Thermo Scientific, ABD), X-Gal (50 µg/ml) (Thermo Scientific, ABD) olacak şekilde ampisilin, IPTG ve X-Gal eklenmiştir. İyice karıştırılarak steril petrilere dökülmüş ve mavi-beyaz koloniler için seçici besiyeri olarak kullanılmıştır.

### 3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözelti ve Kimyasallar

#### 10X Tris-Borat EDTA (TBE) tamponu pH:8

Trizma Base: 108 g

Borik Asit: 55 g

EDTA: 8.3 g

Bütün maddeler bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüş ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 8'e ayarlandıktan sonra 121 °C 15 dk süre ile otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

#### 0,5 X TBE Tamponu

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan 10x TBE tamponunun 50 ml'si bir mezüre alındıktan sonra distile suyla 1 litreye tamamlanarak seyreltilmiştir.

#### Saline Magnesium buffer (SM buffer)

1 M Tris-HCl (pH 7.5) den 50 ml, 5.8 g NaCl ve 2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 litreye tamamlanarak distile suda çözülmüş ardından 121 °C 15 dk süre ile otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

#### Gel Loading Buffer (6X)

Bromfenol Mavisi: 25 mg

Sükroz: 4 g

H<sub>2</sub>O: 10 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlanmıştır.

#### λ Pst Marker

30 µl λ DNA

30 µl 10X buffer

4 µl Pst Enzim

236 µl dH<sub>2</sub>O eklenerek 30 dakika inkübasyon sonrası 30 µl dye eklenmiştir.

#### Proteinase K solüsyonu

Steril bir eppendorf tüp içerisinde liyofilize proteinaz K'dan 20 mg tartılarak 1 ml steril distile suda çözülürerek stok solüsyon halinde -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### **%1'lik AgaroZ Jel Hazırlanışı**

%1 yoğunluğa sahip agaroz jel hazırlamak için toz haldeki agarozdan 0.8 g tartılarak 80 ml 0.5X TBE solüsyonunda çözüdüürülmüş ve mikrodalga fırında 1-2 dk ısıtılmıştır. Ardından yaklaşık 50°C'ye soğutularak 5 µl SafeView jel görüntüleme dye eklenmiştir. Elektroforez işleminde kullanılmak üzere elektroforez tankına dökülerek uygun şekilde kuyucuk oluşması için taraklar takılmıştır.

### **Liyofilizasyon Tamponu**

Son konsantrasyonu 0.5 M olan Sükroz çözültisi ve %1'lik jelatin karışımı hazırlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Çevresel Örneklerden Bakteriyofaj İzolasyonu

Bakteriyofaj izolasyonu için Merabishvili ve arkadaşları tarafından hazırlanan protokol modifiye edilerek ADÜ-REDPROM laboratuvar standartlarına göre optimize edilmiştir (Merabishvili ve ark, 2014).

#### 3.2.1.1. Faj süspansiyonlarının hazırlanışı

Bakteriyofaj yakalama şansını arttırmak ve maliyeti düşürmek için farklı çevrelerden toplanan katı ve sıvı kaynaklar kendi aralarında birleştirilerek kaynak sayısı ikiye indirilmiştir.

Toplanan 7 su kaynağının her birinden 5 ml alınıp 50ml'lik steril falcon tüp içerisinde birleştirilmiştir. Hayvan dışkı örneklerinin her birinden ise spatula yardımıyla yaklaşık 1g alınıp steril falcon tüp içerisine aktarılmıştır. Ardından distile su ile 50ml'e tamamlanıp vorteksle homojenizasyonu sağlanmıştır (Resim 4-A).

Bu iki karışımın bulunduğu falcon tüplerin içerisindeki partiküllerin uzaklaştırması için 5000 rpm de 15 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonrası üst kısımlarda bulunan süpernatantlardan bakteri ve mantar gibi diğer mikroorganizmaların uzaklaştırılması için 0,22 µm por çapına sahip şırınga uçlu filtrelerden geçirilip steril falcon tüplere aktarılmıştır.

İçerisinde faj olduğu düşünülen filtrenmiş sıvı süspansiyonların bulunduğu falcon tüplere gecelik indikatör bakteri (*E. coli* DH10B) kültüründen 1 ml ( $\sim 10^8$  cfu/ml), TSB sıvı besiyerinden de 10 ml ilave edildikten sonra vortekle iyice karışmaları sağlanmıştır. Hazırlanan sıvı kültürler daha sonra 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından bu kültürler tekrar santrifüj ve filtreleme işlemine tabii tutulmuş ve sonraki adımlarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.1.2. Spot test yöntemi ile faj etkinliklerinin belirlenmesi

Zenginleştirilmiş ve fitrelenmiş sıvı kültürlerde faj varlığının saptanması için spot-test yöntemi kullanılmıştır.

Spot test için ikili agar kaplama yöntemi uygulanmış olup bunun için; içerisinde 45-50°C'de 5 ml yumuşak agar (10 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 0,5% w/v LB agar) bulunan cam tüpe gecelik indikatör bakteri kültüründen 0.1 ml ilave edilmiş ve vorteksle iyice karışmaları sağlanmıştır.

Vorteks işleminden hemen sonra karışım önceden hazırlanan ve içerisinde top agar (10 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 1,5% w/v LB agar) bulunan petriye yayılmış ardından kuruması için petri 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yumuşak agar katılaştıktan sonra petride damlatılacak yerler cam kalemle işaretlenmiştir.

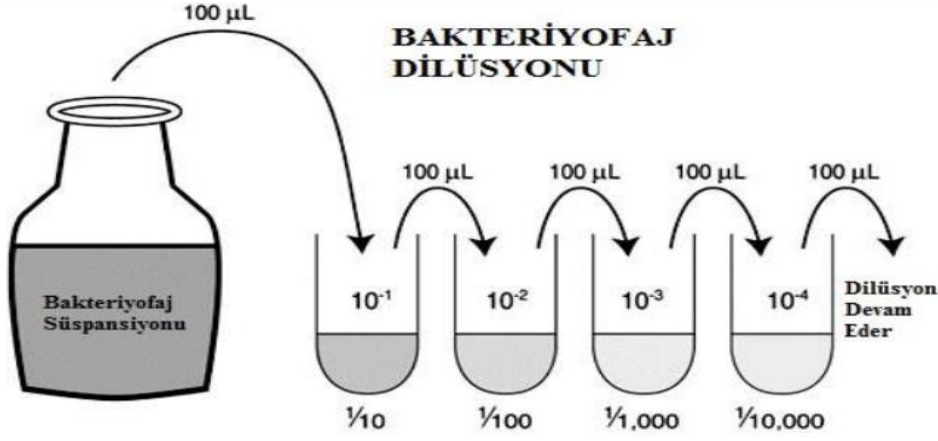
Daha önce zenginleştirilip filtreledikten sonra +4°C'ye kaldırılmış olan sıvı süspansiyonlardan 10-20 µl alınıp petri üzerinde işaretlenen bölgeye mikropipet yardımıyla damlatılmıştır. Damlatma işleminden sonra, petri 1-2 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve kuruyan petri 18-24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

Ertesi gün petri üzerinde oluşan plaklar gözlemlenmiştir. İşaretlenen bölgelerde plak oluşumu görülen petri, üzerine damlatılan filtre edilmiş sıvılarda bakteriyofaj varlığı saptanmıştır.

### 3.2.1.3. Tek plak izolasyonu ile bakteriyofajların saflaştırılması

Bakteriyofaj varlığı spot test yöntemi ile doğrulanan sıvı süspansiyonlardan litik bakteriyofajların pürifikasyonu için literatürde ikili agar kaplama olarak adlandırılan teknik kullanılmıştır (Merabishvili ve ark, 2014).

SM (Saline Magnesium) buffer ile spot test sonucu içerisinde faj varlığı saptanan filtre sıvılardan 10<sup>8</sup>'e kadar sıralı dilüsyonlar hazırlanmış böylece ana stoklardaki faj titrelerinin seyreltilmesi sağlanmıştır (Şekil 6).



**Şekil 6.** Sıralı Bakteriyofaj Dilüsyonu.

Şekil 6' da gösterildiği gibi hazırlanan her bir dilüsyondan 0.2 ml bakteriyofaj süspansiyonu, 0.1 ml taze İndikatör bakteri kültürü ( $\sim 10^8$ cfu/ml) ve 45-50°C'deki 5 ml yumuşak agar (10 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 0,5% w/v LB agar) vortex yardımıyla karıştırılmıştır.

Karışım önceden hazırlanmış top agar (10 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 1,5% w/v LB agar) petrileri üzerine yayılmış ve 10 dk oda sıcaklığında kuruduktan sonra 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün petriler üzerinde farklı morfolojide plak oluşumları gözlemlenmiştir (Resim 5).

Farklı morfolojideki plaklarlar, tek plak oluşumu gözlemlenen petrilerden kesik pipet ucu yardımıyla alınarak içerisinde 10 ml taze İndikatör bakteri kültürü ( $\sim 10^8$ cfu/ml) bulunan 15ml'lik falkon tüplere aktarılmıştır (1.plak saflaştırma). Ardından tüpler vortekslenip 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

Bir sonraki gün 1. plak saflaştırma sonrası bakteriyofaj plaklarını içeren gecelik bakteri faj karışımları tekrar santifüj ve filtreleme işleminden geçirilerek yeni faj süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan yeni faj süspansiyonlarından (1. Plak saflaştırmada ayrıntıları verilen) sıralı dilüsyon hazırlama, ikili agar kaplama tekniği ve plak saflaştırma işlemleri tekrarlanmıştır (2. plak saflaştırma).

Konak Hücreyi yeniden enfeksiyon ve plak saflaştırma işlemi her faj için en az üç kez tekrar edilerek bakteriyofajlar saflaştırılmıştır (Resim 6).

### 3.2.2. Bakteriyofaj Titrelelerinin Belirlenmesi

Bakteriyofajların titresini her bir mililitre örnek içerisinde bulunan bakteriyofaj sayısının hesaplanması ile belirlenmiş olup sonuçlar plak oluşturma birimi (pob/ml) şeklinde verilmiştir.

Plak saflaştırma yoluyla saflaştırılan bakteriyofajların sıvı kültür içerisindeki titrelelerinin belirlenmesi ikili agar kaplama metodu ve sıvı kültürün dilüe edilmesiyle hesaplanmıştır.

İlk olarak sıvı kültür içerisindeki bakteriyofaj stoğundan SM bufferla  $10^1 - 10^8$  e kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır.

Her bir dilüsyonun 0.2ml'si ve gecelik indikatör bakteri kültürünün 0.1ml'si, 45-50°C'deki 5 ml yumuşak agar (10 mM  $\text{CaCl}_2$  içeren 0,5% w/v LB agar) ile karıştırılarak önceden hazırlanmış top agar (10 mM  $\text{CaCl}_2$  içeren 1,5% w/v LB agar) petripleri üzerine yayılmış ve kuruması için 10 dk oda sıcaklığında bekledikten sonra 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon işlemi sonunda petriplerde oluşan faj plakları sayılarak fajların titreleri belirlenmiş ve sonuçlar plak oluşturma birimi (pob/ml) şeklinde verilmiştir. Örneğin  $10^7$  dilüsyonundan hazırlanan agar üzerinde 20 faj plağı görülmüşse;  $20 \times 5$  ( $5 \times 0.2\text{ml} = 1\text{ml}$  faj)  $\times 10^7 = 1 \times 10^9$  pob/ml

### 3.2.3. Bakteriyofaj Genomu

#### 3.2.3.1. Bakteriyofajlardan DNA izolasyonu

Öncelikle titreleri belirlenmiş saf bakteriyofajların volümlerini arttırmak için her bir bakteriyofajın sıvı lizatının 1ml'si, 30 ml taze indikatör bakteri ile karıştırılıp 37 °C 4-6 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından faj – bakteri karışımı 5.000 rpm de 15 dk santrifüjlenip süpernatant 0,22 µm şırınga uçlu filtreden geçirilmiştir. Filtrelenmiş faj süspansiyonunun 20 ml'si eşit şekilde 2ml'lik santrifüj tüplerine dağıtılmış ve +4°C'de 15.000 rpm 2 saat boyunca santrifüjlenerek bakteriyofajların peletlenmesi sağlanmıştır.

2 saatlik santrifüjün ardından tüplerdeki süpernatantlar uzaklaştırılmış ve faj pelletleri 0.2 ml resüspansiyon solüsyonu (1 µg/ml RNAaz) kullanılarak pipetajla birleştirilmiş ve konsantre edilmiştir.

Konsantre edilen faj süspansiyonundan DNA izolasyonu için son konsantrasyonu (1mg/ml) olacak şekilde Proteinaz-K eklenmiş ve 56°C'de 1 saat inkübasyonun ardından klasik fenol-kloroform presipitasyonu uygulanmıştır.

\* Klasik fenol/kloroform presipitasyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş olup izole edilen total faj DNA'larının jel elektroforez görüntüleri alınmıştır (Resim 8).

1:1 hacimsel oranı sağlayacak şekilde Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) eklenmiştir. Sonrasında hafifçe vorteksenerek 13000 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüjlenmiş ve üst faz yeni bir ependorfa alınmıştır.

10:1 hacimsel oranı sağlayacak şekilde 3 M Sodyum Asetat (pH:5.2) eklenmiştir. Sonra 1:1 hacimsel oranı sağlayacak şekilde %100'lük isopropanol eklenerek karıştırıldıktan sonra -20°C'de 30- 60 dakika bekletilmiştir.

İnkübasyondan sonra 30 dk boyunca 15 000 rpm'de +4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet üzerine 2-3 kat %70'lik etanol ekleyip 5 dk 15 000 rpm'de +4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılıp pellet kurutulduktan sonra 50-100 µl distile su ile çözdürülmüş ve izole edilen bakteriyofaj DNA'ları sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.



### 3.2.3.2. İzole edilen bakteriyofaj DNA'larının restriksiyon profillerinin belirlenmesi

İzole edilen bakteriyofaj DNA'larının restriksiyon profilleri belirlenmeden önce total faj DNA elektroforez görüntüsünde (Resim 8-B) DNA konsantrasyonlarının zayıf olduğu tespit edilen beş adet faja titre arttırma işlemi uygulanmıştır.

- Öncelikle DNA konsantrasyonu zayıf olan bu 5 adet bakteriyofajın her birinin sıvı lizatından 1 ml, taze indikatör bakterinin 30ml'si ile karıştırılıp 37°C'de 4-6 saat inkübasyona bırakılmıştır.
  - Bu 5 adet fajın total DNA'ları; 3.2.3'teki adımlar takip edilerek tekrar izole edilmiştir.
- DNA konsantrasyonu arttırılan fajlarla birlikte toplamda 15 adet faj EcoRI ve PstI restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiş ve restriksiyon profilleri belirlenmiştir.

Restriksiyon Enzimleriyle Kesim:

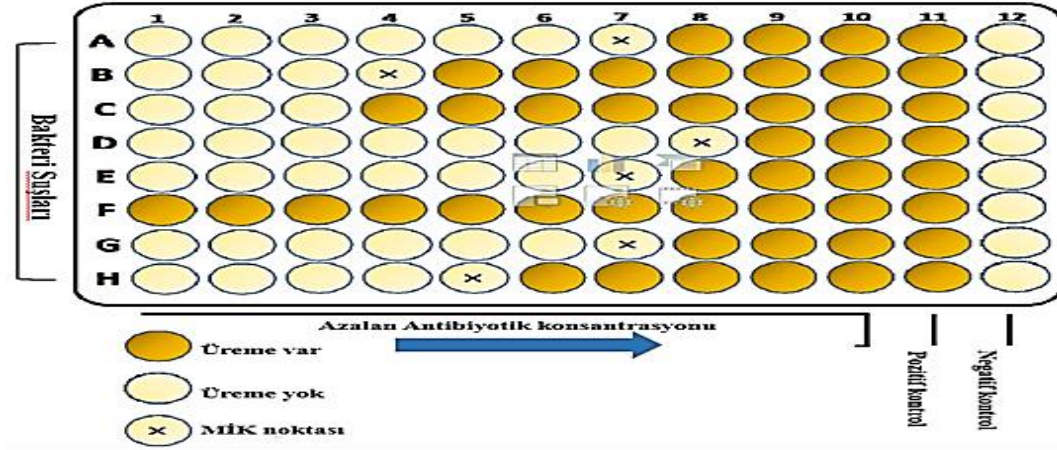
10 µl Total Bakteriyofaj DNA

- 2 µl FastDigest Enzim Tamponu (10X)
- 1 µl FastDigest EcoRI Restriksiyon Enzimi
- 1 µl FastDigest PstI Restriksiyon Enzimi
- 6 µl Distile su

Her bakteriyofaj için yukarda belirlenen bileşenler karıştırılıp 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından restriksiyon ürününün 5µl'si %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp jel görüntüsü alınmıştır.

### 3.2.4. Klinik *Escherichia coli* İzolatlarının MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) Değerlerinin Belirlenmesi

Bir mikroorganizmanın gözle görülebilir olarak çoğalmasının durduğu en düşük antimikrobiyal etken konsantrasyonu MİK olarak belirlenir. Antimikrobiyal ajanların MİK değerlerinin tespit edilmesi için dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Dilüsyon testlerinde, antimikrobiyal ajanın dilüsyonlarını içeren mikropalak kuyucuklarında ya da agar yüzeyinde üremenin gözle görülebilir olması temel alınır. Bu tez çalışmasında MİK değerlerinin tespiti için mikrodilüsyon MİK yöntemi uygulanmıştır.



Şekil 7. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Yöntemi.

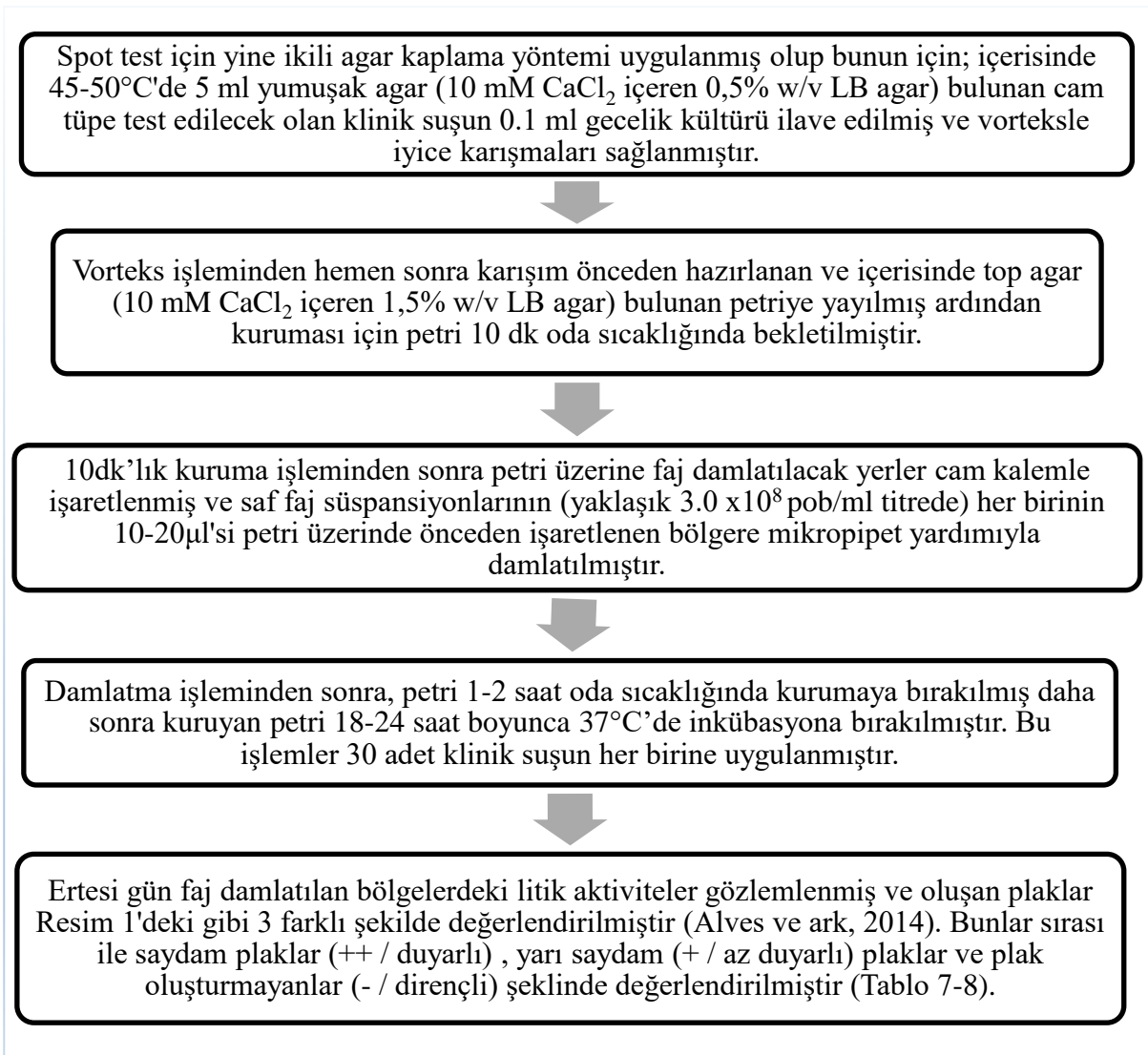
- 1- Öncelikle MİK değerleri ölçülecek olan ADÜ-REDPROM (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi) laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan diyabetik ayak enfeksiyonu (DAE) kökenli klinik *Escherichia coli* stoklarından 30 tane izolat seçilerek EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar) üzerine tek koloni düşecek şekilde ekilmiştir.
- 2- Ertesi gün bu 30 izolattan steril öze yardımıyla tek koloni alınıp içerisinde 1ml TSB bulunan 1.5ml'lik ependorf tüplere geçilerek 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılmıştır.
- 3- Gecelik bakteri kültüründen ( $\sim 10^9$ cfu/ml) son inokülüm konsantrasyonu  $\sim 10^6$ cfu/ml olacak şekilde, 1/1000 oranında sulandırılmıştır.
- 4- Şekil 7'de gösterilen steril 96 kuyucuklu plakanın 2-12 sütunları arasındaki kuyucuklara MH (Mueller-Hinton) brothtan çoklu pipet yardımıyla 100 µl aktarılmıştır.
- 5- Ardından MH broth kullanılarak 5 mg/ml IMP (İmipenem) ana stoğundan hazırlanan 32 µg/ml antibiyotik içeren çözeltilerden, çoklu pipet yardımıyla 1.sutundaki kuyucuklara 200 µl geçilmiştir.
- 6- Daha sonra 32 µg/ml antibiyotik içeren 1. sütundan çoklu pipet ile 100 µl çekilip 2. sütuna pipetaj yapılmıştır. Bu işleme 10.sütuna kadar devam edilmiştir, 11. sütuna geçmeden önce pipet uçları içerisindeki 100 µl ile birlikte atılmıştır.
- 7- Bu işlemin sonucunda 1-10 sütunları arasında antibiyotik konsantrasyonu sırasıyla 32 – 16 – 8 – 4 – 2 – 1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,06 µg/ml olarak hazırlanmıştır.
- 8- Daha sonra her satıra (A-H satırları) farklı bir bakteri suşu gelecek şekilde 1-11. kuyular arasına önceden hazırlanılmış olan son konsantrasyonları  $\sim 10^6$ cfu/ml olacak şekilde ayarlanan bakteri kültürlerinden 10 µl geçirilerek 37°C de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. (11. kuyu pozitif MH broth + bakteri, 12. Kuyu ise negatif MH broth)

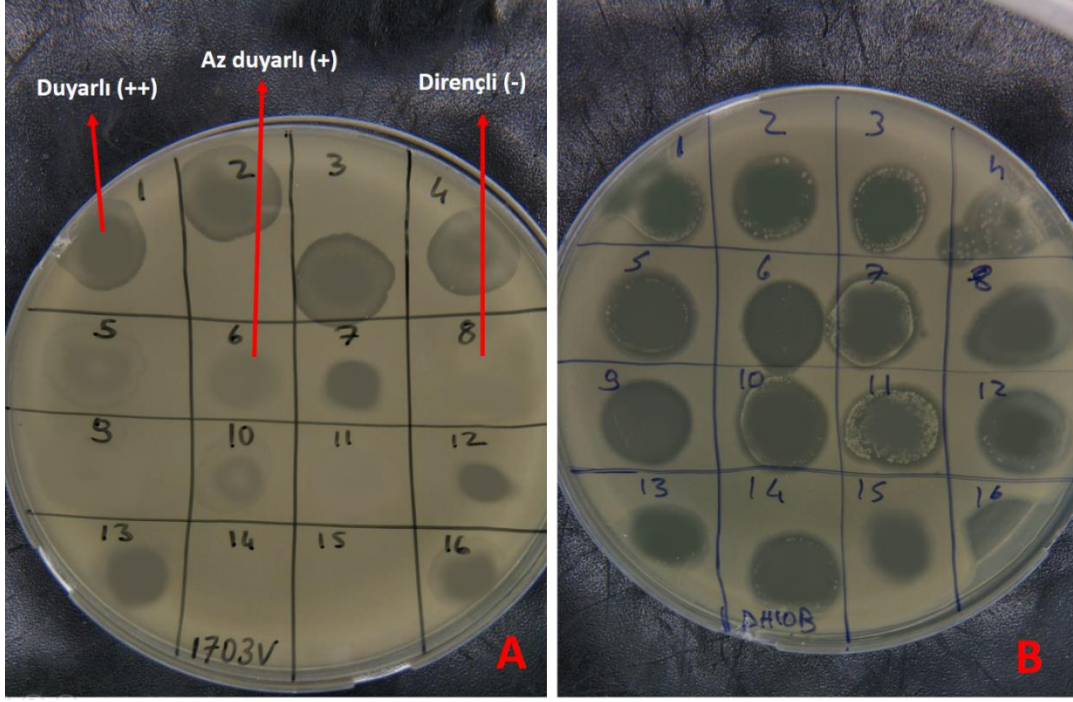
- 9- Ertesi gün 96 kuyucuklu plaka, çıplak gözle ışık altında gözlemlenerek MİK değerleri not alınmıştır (Tablo 7).

### 3.2.5. Saflaştırılan Fajların Klinik *E. coli* Suşları Üzerindeki Etkinliklerinin Belirlenmesi

Plak morfolojilerine göre tek plak saflaştırma metoduyla saflaştırılan 15 adet bakteriyofaj, MİK değerleri belirlenen DAE kökenli klinik *Escherichia coli* suşlarına karşı etkinlikleri test edilmeden önce bütün fajların titreleri dilisyon yöntemiyle yaklaşık  $3.0 \times 10^8$  pob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bakteriyofajların DAE kökenli klinik *E. coli* suşları üzerine etkinlikleri spot-test yöntemi ile belirlenmiştir.





**Resim 1.** Spot Test Sonucu Bakteriyofajların Oluşturduğu Plaklar.

**A:** Plak morfolojilerine göre saflaştırılan fajların spot test yöntemiyle 1703 kodlu klinik *E. coli* izolatına denenmesi (bakterinin; “++”: duyarlı, “+”: az duyarlı ve “-“: dirençli olduğu fajlar).

**B:** Plak morfolojilerine göre saflaştırılan fajların kontrol amaçlı indikatör bakteri üzerine spot test yöntemiyle denenmesi

### 3.2.6. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu

3.2.3'te belirtilen total genom eldesi sonucu fajların restriksiyon profillerinin belirlenmesi ve daha sonra restriksiyon profilleri belirlenen bu fajların 3.2.5'teki gibi klinik izolatlar üzerine denenmesi sonucunda;

Kesim sonrası fragmente olabilen fajlar arasında en yüksek litik etkiye sahip olan KK1 fajı genom karakterizasyonu için seçilmiştir.

#### 3.2.6.1. Restriksiyon ürünlerinin plazmit vektörlere klonlanması

KK1 faj genomunun EcoRI ve PstI enzimleriyle kesilmesi sonucu, oluşan DNA fragmentleri shotgun klonlama yöntemiyle pUC19 plazmitine klonlanmıştır.

**Faj genomu ve pUC19 vektörünün restriksiyon enzimi ile kesimi:** Presto™ Mini Plasmid Kiti ile üreticinin talimatları doğrultusunda izole edilen pUC19 vektörü ve faj genomu ayrı tüplerde restriksiyona tabi tutulmuştur. Bu amaçla 10 µl DNA, 6 µl distile su, 2 µl 10X FastDigest tamponu, 1 µl FastDigest EcoRI ve 1 µl FastDigest PstI enzimleri kullanılarak reaksiyon kurulmuş ve 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir örnekten 5'er µl alınarak agaroz jelde görüntüleme yapılmıştır. Ardından kalan 15 µl restriksiyon ürünleri daha önce anlatılan klasik fenol/kloroform presipitasyon yöntemiyle presipite edilmiş ve pellet 17 µl distile su ile çözülmüştür.

**Saflaştırılmış restriksiyon ürünlerinin ligasyonu:** Ligasyon reaksiyonu için 17 µl restriksiyon ürünlerinin üzerine 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu ve 1 µl T4 DNA Ligaz (5 U/µl) eklenmiş ve gece boyu 22°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, T4 DNA ligazın inaktivasyonu için ligand 65°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

**Ligasyon ürününün transformasyonu ve doğrulanması:** Öncelikle, *E. coli* DH10B suşu kompetan hale getirilmiştir. Bunun için Sambrook'un CaCl<sub>2</sub>'lü kimyasal transformasyon yöntemi kullanılmıştır (Sambrook ve ark, 2001). DH10B suşunun gecelik kültüründen 1 ml alınarak 50 ml TSB besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücreler yaklaşık 3 saat boyunca logaritmik büyüme (log) fazına ulaşana kadar 37°C'de inkübe edilmiştir. Log fazına ulaşmış DH10B kültürü 30 dakika boyunca buzda bekletilmiş ve bu süre sonunda 5000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından hücre pelleti 10 ml soğuk distile su ile resüspanse edildi ve 5000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırılmıştır (su ile yıkama işlemi 2 kere tekrarlandı). Tekrar su ile yıkama gerçekleştirildikten sonra, elde edilen pellet 10 ml 10%'luk gliserollü su ile resüspanse edilmiş ve 5000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pellet 30 ml 80 mM MgCl<sub>2</sub>-20 mM CaCl<sub>2</sub> solüsyonu ile resüspanse edilmiş ve 5000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Son olarak pellet 1 ml 0.1M'lık CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde resüspanse edilmiş ve 100'er µl olacak şekilde eppendorflara dağıtılmıştır.

Kompetan hücreye ligandın transformasyonu için; 100 µl kompetan hücre üzerine 10 µl ligand eklenmiş ve kompetan hücre-ligand karışımı 20 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Sonrasında, 2 dakika boyunca 42°C'de hemen ardından da 2 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 900 µl sıvı besiyeri eklenip 37°C'de 240 rpm'de çalkalanarak bir saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, kültürden 200 µl alınarak

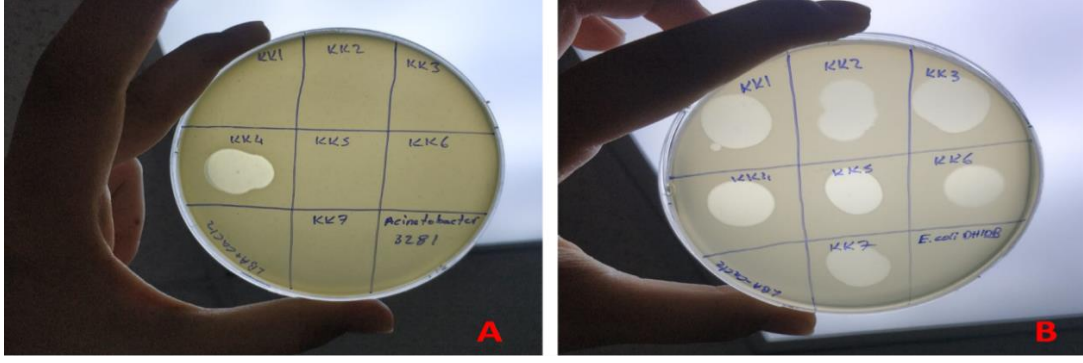
100 µg/ml ampicilin, 1 mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) ve 50 µg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil--D-galaktosidaz (X-gal) olan TSA besiyerine ekim yapılmıştır. Gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, büyüyen beyaz kolonilerden (transformantlardan) rastgele birkaç koloni seçilmiş ve M13F (5’ GTAAAACGACGGCCAGT 3’) & M13R (5’GAGCGGATAACAATTCACACAGG 3’) primer çifti ile koloni PCR kurulmuştur. PCR işleminin sonucunda elde edilen ampikonlar 1%’lik agaroz jelde yürütülmüştür.

**Klonlanan faj DNA fragmentinin sekans analizi:** pUC19 vektörüne yerleştirilmiş ve koloni PCR ile doğrulanmış olan fajDNA fragmentini içeren ampikon, hizmet alımı yoluyla sekanslatılmıştır. Sekans analizi için de M13F & M13R primer çifti kullanılmıştır. Sekanslama sonucu faj DNA fragmentinden elde edilen DNA dizisi veri tabanlarında sorgulanarak benzer dizilerin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla *National Center for Biotechnology* (NCBI) hizalama arama motoru olan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) kullanılmış ve GenBank eşleştirmeleri yapılmıştır.

### 3.2.7. Bakteriyofajların Konak Aralığının Belirlenmesi (Spot-Test)

Çalışmalar sonucunda izolasyon, saflaştırma ve zenginleştirme aşamaları tamamlanan fajların yalnızca *E. coli*’ye özgül olup olmadıklarını tespit etmek amacıyla laboratuvarımızda bulunan *Staphylococcus aureus* (MSSA ve MRSA), *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi diğer diyabetik ayak enfeksiyon etkeni bakterilerin her birinden ikişer adet olmak üzere toplam 18 klinik suşa karşı bu fajların litik aktivite gösterip göstermedikleri spot-test yöntemi ile araştırılmıştır.

Bunun için yine çift tabaka agar yöntemi uygulanmış olup; 0.1 ml bakteri 5 ml yumuşak agara eklenerek önceden dökülmüş olan top agar üstüne yayılmış ve agar kurduktan sonra belirlenen bölgelere her bir fajdan 15’er µl damlatılmıştır. 37 °C’de 18-24 saat inkübasyon sonucunda damlatma yapılan bölgelerdeki liziz oluşumu (Resim 2) gözlenerek izole edilen fajların konak aralıkları belirlenmiştir (Tablo 8).



**Resim 2.** Konak Aralığı Belirlemede Bazı Spot Test Örnekleri.

A: 3281 suş kodlu *Acinetobacter*'e litik etkili KK4 fajı.

B: *E. coli* fajlarının homolog konakçısı olan indikatör bakteri (kontrol).

### 3.2.8. Bakteriyofajların Liyofilizasyonu

Tez çalışmasının başlangıcında indikatör bakteri (*E. coli* DH10B) kullanılarak, plak morfolojilerine göre seçilip saflaştırılan 15 adet bakteriyofajın restriksiyon profilleri (Resim 9) ve DAE kökenli klinik *Escherichia coli* suşlarına karşı etkinlikleri (Tablo 7) göz önünde bulundurularak bu 15 adet bakteriyofaj arasında restriksiyon profili ve klinik suşlara karşı etkinlikleri aynı olan bakteriyofajlar tek bir faj olarak kabul edilip, bu fajlar arasında toplamda 7 adet farklı bakteriyofaj olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra bu 7 adet bakteriyofajın (KK1-KK7) liyofilizasyonu için önceden hazırlanmış olan liyofilizasyon tamponu (0.5 M sukroz ve %1'lik jelatin karışımı) ile yüksek titreli bakteriyofaj süspansiyonu 1:3 hacimsel oranı sağlayacak şekilde 50ml'lik falkon tüp içerisinde birleştirilmiştir. Daha sonra falkon tüpe 45° derecelik eğim verilerek donması için -20 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından fajlar 0,2 mbar basınç altında, -50 °C'de liyofilize edilmiştir (Resim 3). Bu işlem bütün fajlar için tekrarlanmış olup liyofilize faj stokları ileri çalışmalarda kullanılmak üzere alimünyum folyoyla sarıldıktan sonra +4°C'e kaldırılmıştır (Manohar ve Ramesh, 2019).

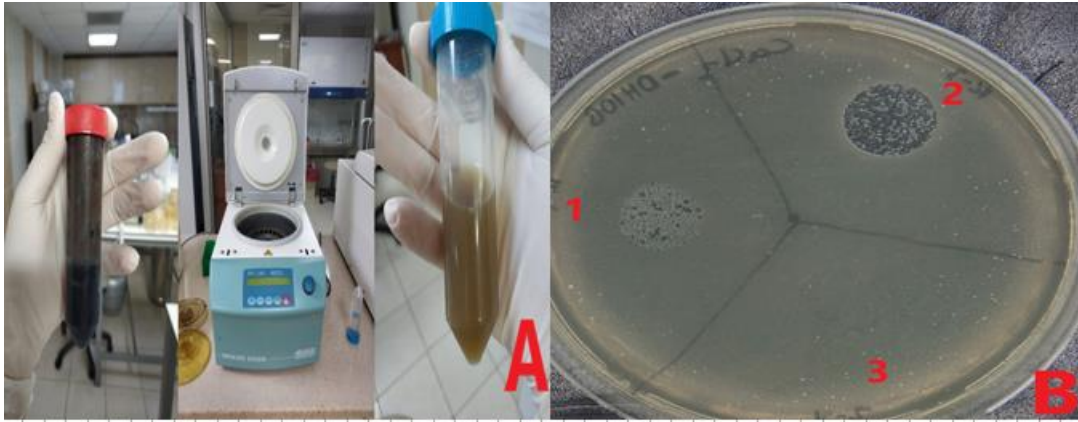


**Resim 3.** Bakteriyofaj Liyofizasyonu

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çevresel Örneklerden Bakteriyofaj İzolasyonu

*E. coli* bakteriyofaj izolasyonu için; hastane kanalizasyon suyu, hayvan dışkısı (inek, keçi, tavuk, güvercin, köpek ve kedi), hayvan suluğu (akvaryum suyu ve hayvanların su içtiği küçük göletler) olmak üzere 7 su örneği ve 6 dışkı örneği toplanmıştır. Toplanan su ve dışkı örnekleri kendi aralarında birleştirilip kaynak sayısı ikiye indirilmiştir. Birleştirilen örnekler santrifüjlenip filtrelerden geçirildikten sonra kaynaklarda bakteriyofaj varlığının doğrulanması için spot-test yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde indikatör bakteri *E. coli* DH10B yumuşak agar ile karıştırılıp top agar petrisi üzerine yayılması sağlanmıştır. Daha sonra filtrelenmiş kaynaklar, indikatör bakterinin bulunduğu petriye damlatılmıştır. İşlem sonucunda her iki kaynaktan da lizis pozitif plaklar tespit edilmiş olup bakteriyofaj varlığı saptanmıştır. Yapılan işlemler resim 4'te verilmiştir.



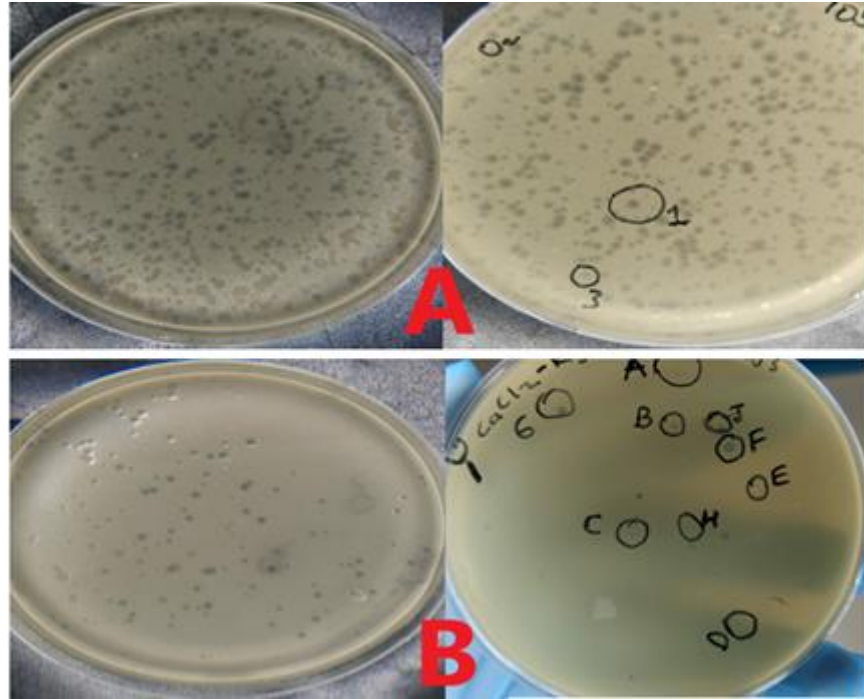
**Resim 4.** Çevresel Örneklerden Bakteriyofaj İzolasyonu.

**A:** Toplanan örneklerden hazırlanan iki karışım; mix-1 (sol: hayvan dışkı örnekleri) ve mix-2 (sağ: su örnekleri) santrifüjlenmesi, **B:** Spot test yöntemiyle faj varlığının doğrulanması (1) mix-1 kaynağının oluşturduğu lizis plağı, (2) mix-2 kaynağının oluşturduğu lizis plağı, (3) kontrol amaçlı steril sıvı besiyeri damlatılmıştır.



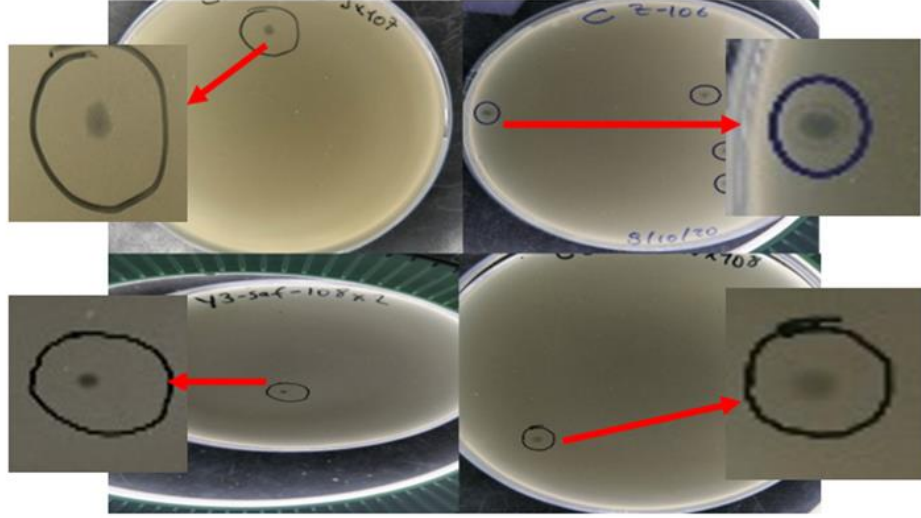
#### 4.2. İzolasyonu Yapılan Bakteriyofajların Saflaştırılması

*E. coli* bakteriyofajı saflaştırmak için içerisinde faj varlığı saptanan mix-1 ve mix-2 kaynaklarının filtrelenmesi ile elde edilen faj solüsyonlarından hazırlanan seri dilüsyonlar ve konak hücre olarak seçilen *E. coli* DH10B kullanılmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan tek plak izolasyonu için ikili agar kaplama tekniği kullanılmıştır. Konakçısını lizise uğrattığı bölgelerde oluşan plakların bulunduğu petrilere morfolojilerine göre 15 farklı faj plağı seçilmiştir (Resim 5). Steril kesik pipet ucu ile ortamdan uzaklaştırılan bu faj plaklarının saflaştırıldığından emin olmak için konakçı hücreyi yeniden enfeksiyon ve plak saflaştırma işlemi en az üç kez tekrar edilerek tek tip plak morfolojisi elde edilmiştir (Resim 6).



**Resim 5.** Karışık Morfolojideki Faj Plakları.

Mix-1(B) ve mix-2(A) faj solüsyonlarından hazırlanan seri dilüsyonlar kullanılarak ikili agar kaplama sonucunda gözle görülür sınırları belirgin farklı morfolojideki faj plaklarının oluşumu.

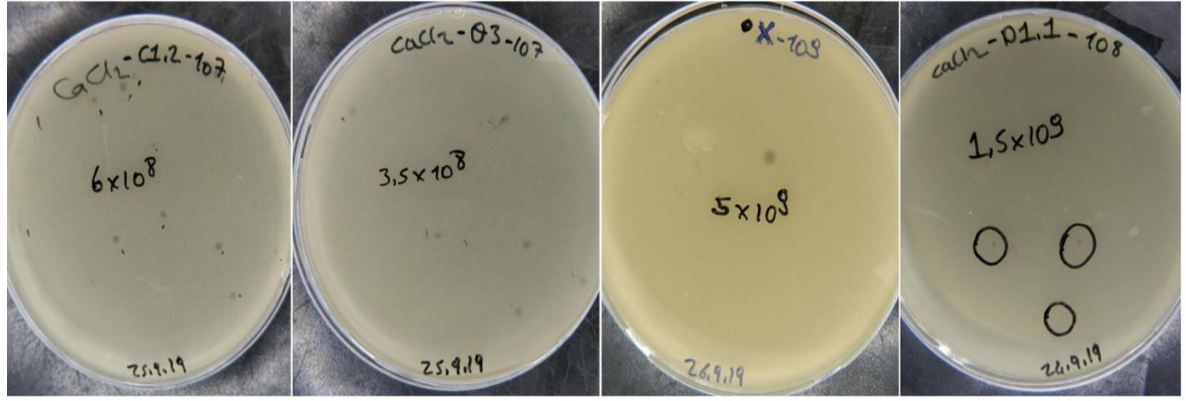


**Resim 6.** Tek Plak İzolasyon Yöntemi ile Saflaştırılmış Bazı Bakteriyofajların Petri Görüntüleri.

#### 4.3. Bakteriyofaj Titrelerinin Hesaplanması

İzole edilmiş ve plak morfolojilerine göre saflaştırılmış olan *E. coli* bakteriyofajlarının titreleri klasik plak oluşturma metodu olan ikili agar kaplama tekniği kullanılarak hesaplanmıştır.

Tek plak izolasyonu ile elde edilen saf faj filtratlarının seri dilüsyonları ile indikatör bakterinin inkübasyonu sonucu oluşan çıplak gözle görülebilir sınırları belli (şeffaf/berrak zonlar) olan plaklar sayılarak her bir mililitre örnek içerisinde bulunan bakteriyofaj sayısı hesaplanmış olup sonuçlar plak oluşturma birimi (pob/ml) şeklinde verilmiştir (Tablo 4). Resim 7’de bakteriyofajların titre edilmesi (sayımından) neticesinde elde edilen plak örnekleri verilmiştir.



**Resim 7.** Hazırlanan faj dilüsyonlarının 0.2ml'sinde oluşan faj plakları.

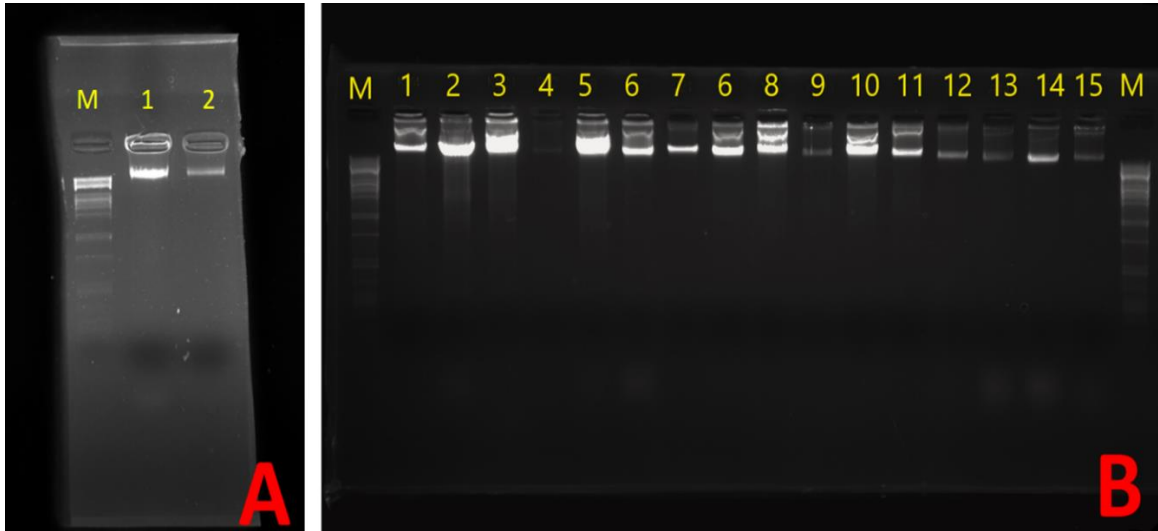
**Tablo 4** Plak morfolojilerine göre saflaştırılmış fajların titrelerinin belirlenmesi

Faj no:	Bakteri	Plak sayımı pob/ml
1	<i>E. coli DH10</i>	$1 \times 10^8$
2		$1.5 \times 10^9$
3		$5 \times 10^9$
4		$3 \times 10^6$
5		$6 \times 10^9$
6		$2 \times 10^8$
7		$4 \times 10^7$
8		$3.5 \times 10^8$
9		$8 \times 10^6$
10		$6 \times 10^8$
11		$4.5 \times 10^7$
12		$9 \times 10^6$
13		$4 \times 10^6$
14		$1 \times 10^7$
15		$4.5 \times 10^6$

#### 4.4. Bakteriyofaj Genomu

##### 4.4.1. *E. coli* Bakteriyofajlarından Total Genom İzolasyonu

Bakteriyofajlardan fenol-kloroform ile DNA izolasyonunun ön hazırlığı olan fajların pelletlenmesi işlemi için seçilen saf fajlardan bir tanesi, hem PEG 8000 ile çöktürme yöntemi hemde laboratuvarımızda kullandığımız uzun süreli yüksek devirde santrifüj yöntemini kullanarak fajın pelletlenmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu iki farklı yolla çöktürülen fajdan izole edilen DNA'lar jel elektroforezinde yürütülerek karşılaştırılmış ve yüksek devirde uzun süreli santrifüjlemenin daha etkili olduğu gösterilmiştir (Resim 8-A). Elde edilen sonuç neticesinde kalan 14 fajda aynı yöntemle pelletlenmiş ve fenol-kloroform ile DNA'ları izole edilip görüntülenmiştir (Resim 8-B).



**Resim 8.** DNA izolasyonlarının elektroforez görüntüleri.

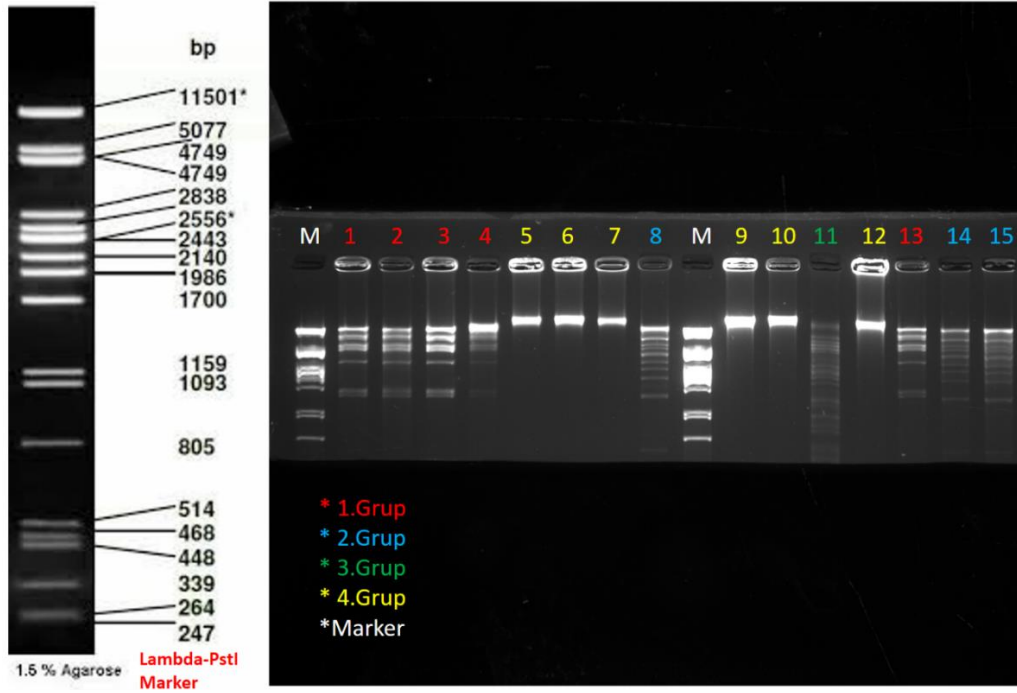
A: (M) lambda-PstI marker, (A1) yüksek devirde uzun süreli santrifüj ile pelletlenerek izole edilen faj DNA'sı, (A2) PEG 8000 ile pelletlenerek izole edilen faj DNA'sı

B: (M) lambda-PstI marker, (1-15): Plak morfolojilerine göre seçilerek saflaştırılmış *E. coli* bakteriyofaj DNA'ları. \*NOT: 6 numaralı faj örneğinden iki kere yükleme yapılmıştır.

\*\*4-9-12-13 ve 15 numaralı fajlardan izole edilen DNA'ların konsantrasyonlarının düşük olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.4.2. İzole Edilen Bakteriyofaj DNA'larının Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi

İzole edilen bakteriyofaj DNA'larının restriksiyon profilleri belirlenmeden önce DNA konsantrasyonları düşük olan (bknz. Resim 8-B) 4-9-12-13 ve 15 numaralı fajlara titre artırma işlemi uygulanarak tekrar DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen bütün faj DNA'ları EcoRI ve PstI enzimleri ile kesilmiş ve jel elektroforezinde görüntülenip kesim profillerine göre fajlar tanımlanmışlardır (Resim 9).



**Resim 9.** *E. coli* bakteriyofajlarının EcoRI ve PstI kesimi sonucu oluşan fragmentler.

Restriksiyon profilleri belirlenen bakteriyofajlar, oluşturdukları fragmentlere göre gruplandırılmıştır.

Bu gruplandırma işleminin sonucunda, moleküler olarak birbirlerinden farklı 4 grup tespit edilmiştir.

1.grup: 1-2-3-4 ve 13 numaralı fajlar

2. grup: 8-14 ve 15 numaralı fajlar

3.grup: 11 numaralı faj

4.grup: 5-6-7-9-10 ve 12 numaralı kesilmeyen fajlardan oluşmaktadır.

#### 4.4.3. Bakteriyofajların Genom Büyüklüklerinin Hesaplanması

Restriksiyon profilleri belirlenen ve oluşturdukları DNA fragmentlerine göre 4 gruba ayrılan (Resim 9) bakteriyofajların tahmini genom büyüklükleri EcoRI ve PstI kesim sonucu oluşturdukları fragmentlerin boyutları lambda-PstI markeriyle karşılaştırılarak hesaplanmıştır (Tablo 5).

**Tablo 5** EcoRI ve PstI kesim sonucu oluşan fragment boyutları

R.E Profili	Lambda-PstI marker fragment boyutları (kb)									Total Boyut(kb)
	>11	~11	5-11	~5	3-5	2-3	1-2	0,8-1	<0,8	
<b>Grup 1</b> (KK1-KK2)	1		4		1		2			~43kb
<b>Grup 2</b> (KK2)	1	1	3	1	2	1	2	1	1	~60kb
<b>Grup 3</b> (KK7)		1	4	1	2	1	2	3	2	~55kb
<b>Grup 4</b> (KK3-4-6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.5. Saflaştırılan Bakteriyofajların Klinik *E. coli* Suşları Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda çevresel örneklerden plak morfolojilerine göre saflaştırılmış 15 fajın, DAE kökenli 30 klinik *E. coli* izolatına denemesi sonucu toplamda bu fajların 27 *E. coli* izolatının üremesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Tablo 6). Ayrıca daha önce restriksiyon profillerine göre 4 farklı gruba ayrılan fajların, klinik izolatlar üzerindeki litik aktivite farkları da değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular neticesinde EcoRI ve PstI enzimleriyle kesilmeyen 4.gruptaki 5-6-10, 7-12 ve 9 numaralı fajların farklı bakteriler üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca grup 1'deki 4 numaralı fajın da diğer bütün fajlardan farklı bakterilere etki ettiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak başlangıçta plak morfolojilerinin farklılıklarına göre saflaştırılan 15 fajın restriksiyon profilleri ve etki ettiği bakteri farklılıkları dikkate alınarak toplamda 7 farklı faj olduğu tespit edilmiştir. Bu fajlar sırasıyla KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6 ve KK7 olarak kodlanmıştır (Tablo 7).

**Tablo 6** Çevresel Kaynaklardan Plak Morfolojilerine Göre Saflaştırılan *E. coli* Bakteriyofajlarının DAE kökenli *E. coli* Klinik Suşları Üzerine Lizis Etkisi

Klinik <i>E.coli</i> Suşları	<i>E. coli</i> Bakteriyofajları															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16**
6855							+					+				+
1955	+	+	+										+			+
1081	+	+	+	+			+				+	+	+			+
164							+					+				+
847							+					+				+
1243					+	+	+			+		+				+
3055							+					+				+
6239	+	+	+		+	+	+		+	+		+	+			+
4074					+	+	+			+		+				+
3267							+					+				+
355	+	+	+	+									+			+
169							+					+				+
187							+					+				+
1904	+	+	+										+			+
5337							+		+			+				+
1703	+	+	+	+	+	+	+			+		+	+			+
2951											+					+
3584							+					+				+
170							+					+				+
2829							+					+				+
714					+	+				+						+
3250	+	+	+		+	+				+			+			+
4278	+	+	+										+			+
5317	+	+	+		+	+	+			+		+	+			+
6292	+	+	+										+			+
5881							+					+				+
1616							+					+				+
465																
5911																
812																
İndikatör Bakteri*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\*İndikatör Bakteri Olarak *E. coli* DH10B Kullanılmıştır.

\*\*Plak Morfolojilerine Göre Saflaştırılmış 15 adet Bakteriyofajın Eşit Hacimde Karıştırılmasıyla Elde Edilmiş Olan Faj Kokteyli

**Tablo 7** Gruplandırılan *E. coli* Bakteriyofajlarının Klinik Suşlar Üzerine Etkisi

Klinik <i>E. coli</i> Suşları	**IMP- MİK (mg/L)	<i>E. coli</i> Bakteriyofajları*							Kokteyl
		KK1	KK2	KK3	KK4	KK5	KK6	KK7	
6292	2	+	-	-	-	-	-	-	+
6855	1	-	+	-	++	-	-	-	++
1955	0.5	+	-	-	-	-	-	-	+
1081	0.5	++	+	-	+	-	-	++	++
164	0.5	-	-	-	++	-	-	-	++
847	0.5	+	-	-	++	-	-	-	++
1243	0.5	-	-	+	+	-	-	-	+
3055	0.5	-	-	-	+	-	-	-	+
6239	0.25	++	+	++	++	-	+	-	++
355	0.25	++	+	-	+	-	-	-	++
169	0.25	-	-	-	++	-	-	-	++
187	0.25	-	-	-	+	-	-	-	+
1904	0.25	+	-	-	-	-	-	-	+
5337	0.25	-	-	-	+	-	+	-	+
1703	0.25	++	++	+	++	-	-	-	++
2951	0.25	-	-	-	+	-	-	++	++
3584	0.25	-	-	-	+	-	-	-	+
170	0.25	-	-	-	+	-	-	-	+
4278	0.25	+	-	-	-	-	-	-	+
5881	0.25	-	-	-	+	-	-	-	+
1616	0.25	-	-	-	+	-	-	-	+
3250	0.125	+	-	+	+	-	-	-	+
2829	0.125	-	-	-	++	-	-	-	++
5317	0.125	+	-	+	+	-	-	-	+
4074	0.125	+	-	++	++	-	-	-	++
3267	0.125	-	-	-	+	-	-	-	+
714	<0.06	-	-	+	-	-	-	-	+
465	2	-	-	-	-	-	-	-	-
5911	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
812	0.125	-	-	-	-	-	-	-	-
İndikatör Bakteri ( <i>E.coli</i> DH10B)		++	++	++	++	++	++	++	++

“++”: duyarlı, “+”: az duyarlı, “-”: dirençli. , / “IMP-MİK”: (ECOFF: 0.5mg/L)

\* Restriksiyon profilleri ve klinik suşlar üzerine etkileri baz alınarak, birbirlerinden farklı oldukları belirlenen *E.coli* fajları.

\*\* İmipenem (IMP) için 30 klinik *E.coli* izolatının MİK değerleri.

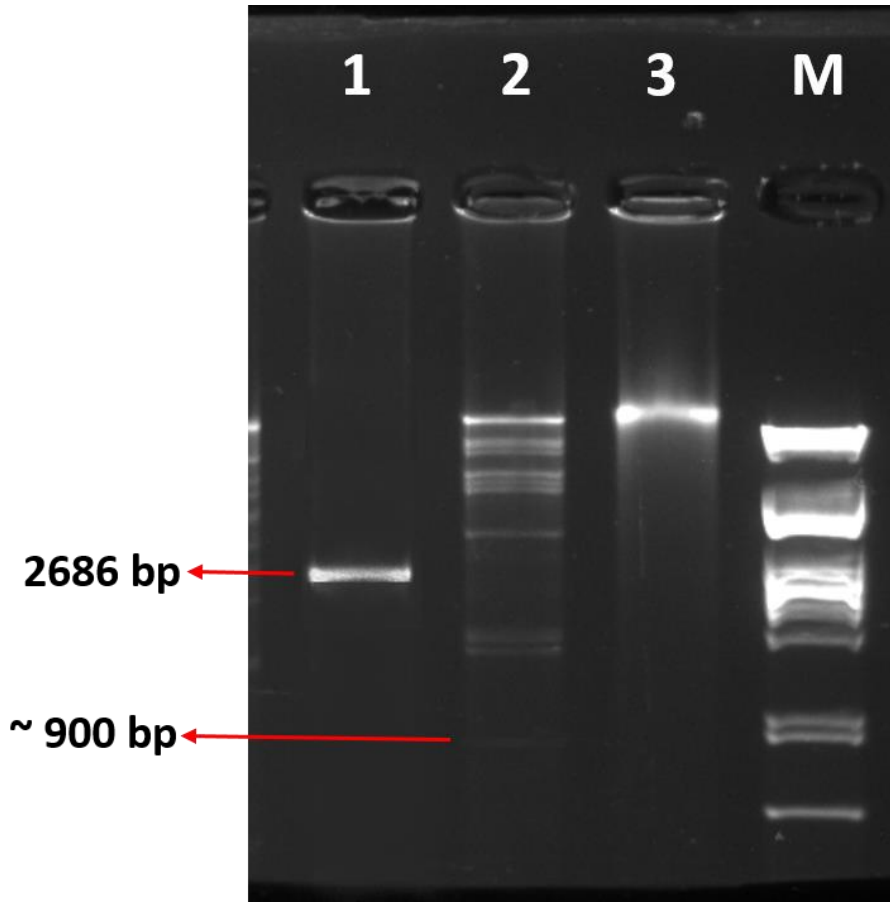
İmipenem / *E.coli* için epidemiyolojik sınır değeri “ECOFF” (<https://www.eucast.org/>, 2021) göz önüne alınarak, IMP’e direnç durumları belirlenen Tablo 7’deki klinik izolatların fajlara karşı duyarlılıkları ile antibiyotik dirençleri arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır.



#### 4.6. Bakteriyofaj Genomunun Karakterizasyonu

Çalışmada elde ettiğimiz ve kesim sonrası fragmente olabilen fajlar arasında, en yüksek litik etkiye sahip olan KK1 fajı (12/30) genom karakterizasyonu için seçilmiştir. KK1 fajının genom bilgisi için;

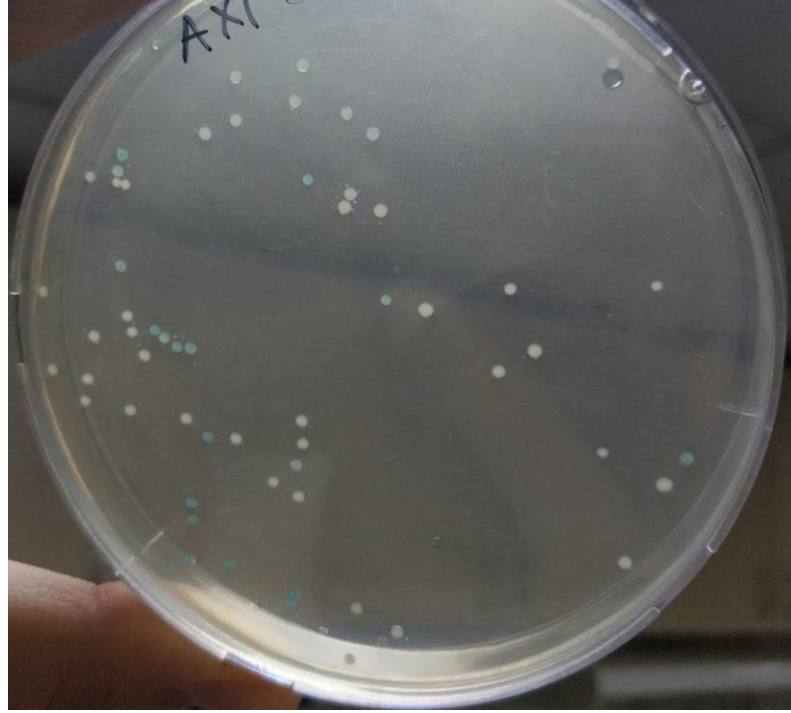
- Saflaştırılan faj DNA'sından, EcoRI ve PstI enzimleri ile kesim sonucu oluşan fajDNA fragmentlerinin klonlanması için pUC19 plazmit DNA'sı da yine aynı enzimlerle kesilmiş ve %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Resim 10).



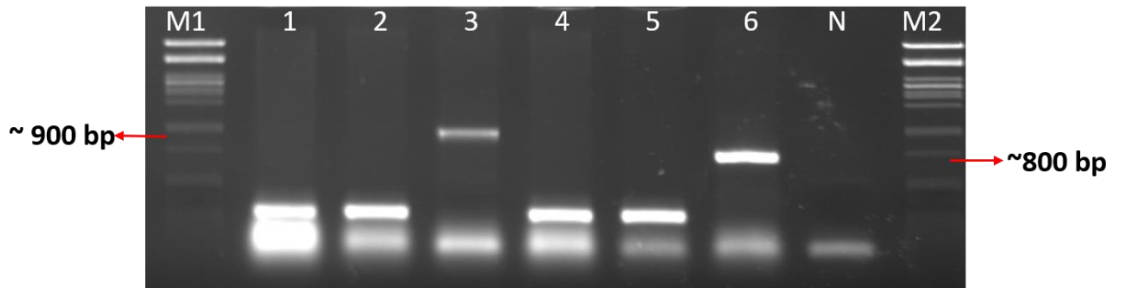
**Resim 10** pUC19 ve KK1 fajının EcoRI-PstI ile kesiminin jel görüntüsü.

**1;** EcoRI ve PstI ile kesilmiş pUC19 vektör DNA'sı, **2;** EcoRI ve PstI ile kesilmiş KK1 faj DNA'sı, **3;** KK1 fajının total genomu, **M;** Lambda PstI marker.

- Restriksiyon sonrası ligasyon için 22 °C'de bir gece bekletilen ürünler daha sonra *E.coli* DH10B suşuna transforme edilmiştir. Ertesi gün transformasyon sonrası oluşan kolonilerden (Resim 11) M13F&M13R primer çifti ile koloni PCR kuruldu ve %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Resim 12).



**Resim 11.** Transformasyon Sonucu Oluşan Koloniler.



**Resim 12.** Shotgun klonlama sonrası M13 koloni PCR jel görüntüsü.

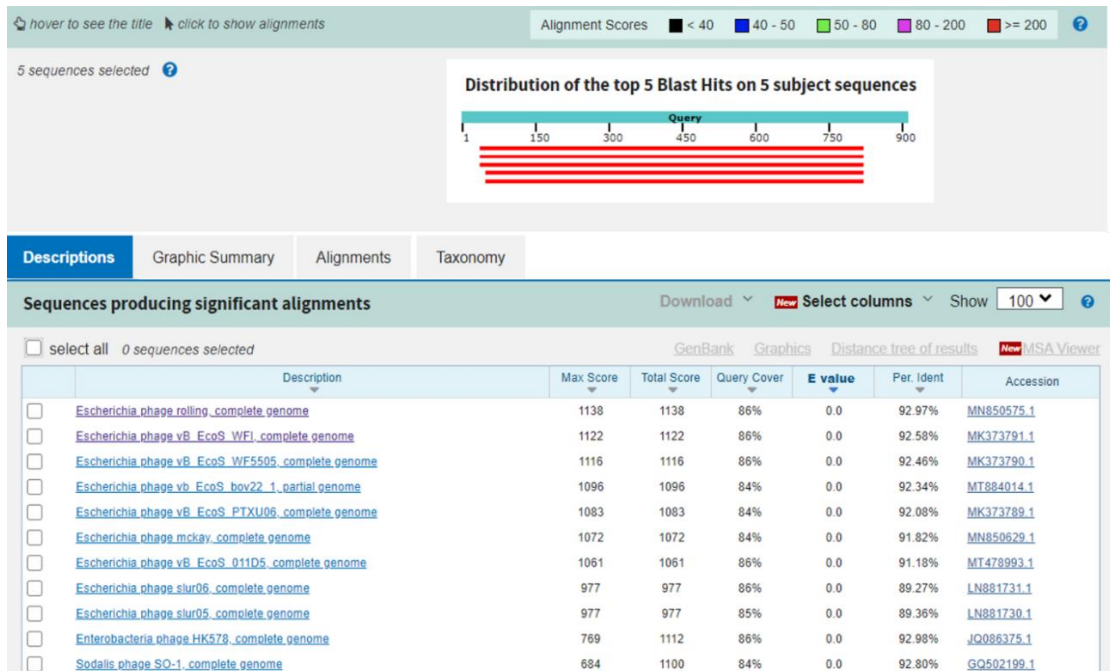
KK1 faj genomunun EcoRI ve PstI ile kesiminden oluşan DNA fragmentlerinin shotgun klonlanması sonucu AXI seçici besiyerinde üreyen beyaz kolonilerden M13F&M13R primerleriyle yapılmış koloni PCR amplikonları görülmektedir. Bu amplikonlardan **~900 bp** boyutunda olan **3** numaralı amplikon sekanslama için seçilmiştir. **M1-M2**; Lambda PstI marker, **N**; negatif, **1-2-4-5 ve 6**; seçici besiyerinde büyüyen kolonilere yapılan koloni PCR amplikonları.

#### 4.6.1. Bakteriyofaj DNA'sının Dizi Analizi Sonuçları

Çalışmamızda elde ettiğimiz KK1 fajının genom bilgisi için “shotgun klonlama” yöntemi ile plazmit üzerine klonladığımız ~900 bp'lik fajDNA fragmentinden elde edilen DNA dizisi, NCBI hizalama arama motoru olan BLAST kullanılarak araştırılmıştır. Bu analiz sonucunda, KK1-Fajına ait 909 bazlık DNA fragmenti, Escherichia phage rolling, complete genome (GenBank: MN850575.1) ile %92,97 benzerlik göstermiştir (Resim 13, Resim 14).

```
1 TTGTGGAGTCGGGGAAAATAAAACATTTTCACACAGGAAAACAGCTATGACCATGATTAACGC 60
61 CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCAGTGAGTACAGCTACGCGCACGT 120
121 AGGCCACTTGCACCACCAGAAGATTGTAGAATCCCGCCAACATGATTGTTGAACAGCACCG 180
181 GACGCTCGCAGCGAAAGACGCCTACGCCAGCCGTGGCGGATGGATGTCAGGTCGTAGTGC 240
241 CAACGTCATTACCTACAGCGCCAACCTACGGCGAAGTTGCACGCTTAACCATTAGCCCCGGA 300
301 AATGTTGAAATGATTAGACAAGTATTCATGAGCAGCAGGCCGATCGCCTGAAAGAACTA 360
361 CGCAAACAACCTCGAAGGCTTGCGCCGATTCGAACGAACGGCAGCGCGGTAGGCATGTCT 420
421 ATCAGCGAACGGATCGAGATACTATCGCAAATACGCTACACAGAAGGCGCGATAAGAGAA 480
481 GTACAAAGCATGTTAACCCGATACTACGGGCGTGACGTTTAAACCCGCCAGCCTGCCGAT 540
541 TTGGTGGGCTTTTTTGTGCCTGTTATAATCCCAATTAGATGGCAGGGCCGTCTCCTATGT 600
601 TGCCGATGGTGGCGCATATGAACAAAAGGGCTTATATCATGGCAGAAATCAAAGTTAAG 660
661 GGCCGACGCGCCAAACTGGACGGACGAGTGGCAGTAACCCCGCGCCGTAAACCAGGCGAG 720
721 CAAACAGAACATAACCAATCTCGACCTGAGATCGAATATGGCAAGCGTCGTAAAGGCGGC 780
781 AAATGTGGGCGCCCGACCGACTACCGCACTGTGTATTGCGACCAGCTTCGCCGCTATTTT 840
841 GCCGATGCCGTAGCCTGGCAGATCAAGTGACTCGTGATCAACAATCCGCCAGAAACAT 900
901 ACCCATAGA 909
```

Resim 13. KK1 litik bakteriyofaj genomuna ait 909 bazlık DNA fragmentinin dizi bilgisi.



Resim 14. KK1 litik bakteriyofaj genomuna ait 909 bazlık DNA dizinin BLAST sorgulaması.

#### 4.7. Konakçı Aralığının Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen 7 fajın (KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6 ve KK7) *E. coli* dışındaki konakçı spektrumunun belirlenmesi için diğer diyabetik ayak enfeksiyon etkeni olan bakterilerden; *S.aureus* (MSSA ve MRSA), *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp, *S. viridans*, *S.epidermidis*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* ve *Klebsiella pneumoniae* olmak üzere laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan 18 DAE kökenli klinik izolat kullanılmış ve sonuçlar Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8’de görüldüğü üzere KK4 fajının sadece 3281 kodlu *Acinetobacter* karşı etkili olduğu bunun dışında diğer fajların kendi homolog konakçısı dışında hiçbir bakteriye karşı litik etkinlik göstermediği tespit edilmiştir.

**Tablo 8** *E. coli* Fajlarının (KK1-KK7) Konakçı Aralığı

**DAE Etkeni Bakteriler	Suş Kodu	<i>E. coli</i> Fajları						
		KK1	KK2	KK3	KK4	KK5	KK6	KK7
<b>Gram Pozitif Bakteriler</b>								
MRSA	43	-	-	-	-	-	-	-
MSSA	BE93	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. viridans</i>	2364	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	BE212	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i>	3178	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i>	3086	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	BE181	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	BE162	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gram Negatif Bakteriler</b>								
<i>P. aeruginosa</i>	1126	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	399	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i>	1143	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	3030	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	687	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	3281	-	-	-	+	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	1152	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	1640	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> spp.	5108	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> spp.	47	-	-	-	-	-	-	-
İndikatör bakteri ( <i>E. coli</i> DH10B)		+	+	+	+	+	+	+

\* “+”: Fajın bakteri üzerinde litik etkisi var. “-”: Fajın bakteri üzerinde litik etkisi yok.

\*\* Diyabetik ayak enfeksiyon etkeni bakteriler

\*\*\* Kontrol olarak kullanılan indikatör bakteri

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda enfeksiyon hastalıklarında kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştiren patojen bakterilerin varlığı antibiyotik tedavisine alternatif bir yaklaşım arayışını gündeme getirmiştir. Günümüzde hastane ve toplum etkenli enfeksiyon hastalıklarında patojen bakteriler önemli bir rol oynamaktadır. Bu bakterilerden *Escherichia coli*, Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre enfeksiyon hastalıklarının en önemli etkenleri arasında yer almaktadır (WHO 2017). *Escherichia coli* özellikle hastane ortamında cerrahi yara enfeksiyonları, komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, diyabetik yara enfeksiyonları, çeşitli organlarda apse, septik artrit, endokardit ve prostatite kadar pek çok klinik tabloya yol açabilmektedir. *E. coli*'nin sebep olduğu enfeksiyonlardan biri olan yara enfeksiyonları, ameliyat sonrasında veya deri yanıklarında açık yaranın enfekte olması gibi yüzeysel enfeksiyonlar olabildiği gibi derin cerrahi operasyonlar sonrası bakteriyel enfeksiyon varlığında derinin en alt katmanlarına kadar ulaşarak ciddi komplikasyonlara neden olabilirler. Yara enfeksiyonlarından biri olan ve diyabet hastalarında en sık karşılaşılan komplikasyonlardan biri ayak ülserleridir ve diyabet hastalarının %12 – 25'i yaşamlarının bir döneminde bu sebepten sağlık kuruluşlarına başvurmaktadır (Ertuğrul ve ark, 2017). Son yıllarda yapılan çalışmalarda diyabetik ayak enfeksiyon etkenlerinin ülkelere ve yaşanan çevreye göre değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (Utlı ve ark, 2019). Diyabetik ayak enfeksiyonu etkenleri ile ilgili Türkiye'de yapılan pek çok çalışmada *P. aeruginosa* ve *Escherichia coli* en sık rastlanan etkenlerdir (Ertuğrul ve ark, 2017). Bu tür enfeksiyon hastalıklarında en etkili olarak düşünülen tedavi yöntemi antibiyotiklerin bilinçsiz ve sıklıkla kullanımlarının bir sonucu olarak önlenemez bir hızla antibiyotik direncinin arttığı hakkında literatürde pek çok bulguya rastlanmıştır. Gelişen antibiyotik dirençliliği, özellikle de çoklu dirençlilik, yeni antibiyotiklerin devreye girmesini zorunlu hale getirmiştir. Ancak antibiyotik araştırmaları ve keşif hızı son yıllarda çok yavaşlamış ve yeni antibiyotik geliştirme çalışmalarının yetersizliği nedeniyle, patojen bakterilere spesifik bakteriyofajların kullanılabileceği tedavi yöntemleri gündeme gelmiştir.

Tez çalışmamız kapsamında indikatör bakteri olarak seçilen *E. coli* DH10B suşu kullanılarak izole edilen *E. coli* bakteriyofajlarının yara enfeksiyonlarından biri olan ve laboratuvarımız (REDPROM) kültür koleksiyonunda bulunan Diyabetik Ayak Enfeksiyon (DAE) kökenli klinik *E. coli* suşlarına karşı bakteriyofajların etkinliği test edilmiştir.

Diyabetik ayak ülserlerinde *E. coli* ve *P. aeruginosa*' dan sonra en yaygın patojenler aerobik gram pozitif koklar ve gram negatif *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp. gibi Enterobacteriaceae familyasına sahip üyelerdir. Stafilokoklar ve enterokoklar çoğunlukla ekstremitenin kaybına yol açmayan enfeksiyonlar oluştururken, Gram negatif ve polimikrobiyal bakteriler çoğunlukla ekstremitte kaybına neden olmaktadır (Gardner ve ark, 2013).

Yapılan çeşitli çalışmalarda diyabetik ayak ülserlerinden izole edilen çoklu ilaç direncine sahip bakterilerde faj terapinin in vitro olumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Çoğu çalışmada bakteriyofaj etkinliği %87, güvenilirliği %67 ve yapılan az sayıda çalışma da faja karşı oluşan direncin %35 civarında olduğu belirtilmektedir (El-Haddad ve ark, 2019). Bu bağlamda enfeksiyon hastalıklarıyla mücadelede bakteriyofaj terapisi uzun yıllar sonra yeniden gündeme gelmiş ve birçok araştırmacının ilgi odağı olmuştur. Bakteriyofaj terapisi, antibiyotik tedavisi ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir. Örneğin, antibakteriyel ajanlara karşı direnç gösteren bakterilere karşı etkindirler ve hedef bakteriye özgün oldukları için normal mikroflorayı etkilemezler (Kutateladzeve Adamia, 2010). Bunun yanı sıra yeni antibiyotik geliştirme stratejileri ile karşılaştırıldıklarında daha ucuza mal olmaktadır.

Bakteriyofajların farklı bakterilerin de sebep olabildiği diyabetik ayak ülserlerine karşı kullanıldığı umut vadeden birçok çalışma vardır. Farelerde deneysel olarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ile oluşturulan diyabetik ayak enfeksiyonu; linezoid, bakteriyofaj ve bakteriyofaj ile linezoid birlikteliği tedavi edilmiştir. Sonuçta linezoid ve bakteriyofaj birlikteliğinin diğer iki tedaviye oranla daha çabuk etki ettiği saptanmıştır. Bu çalışmada yalnızca bakteriyofaj ile yapılan tedavidede, tedavi süresi uzamasına rağmen tam iyileşme gözlenmiştir (Chhibber ve ark, 2013).

Mendes ve arkadaşlarının 2014' de Lizbon Portekiz' de yapmış oldukları çalışmada doğal su kaynaklarından litik etki gösteren bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofajlar, diyabetik ayak ülserlerinden izole edilen ve biyofilm oluşturdukları saptanan *P. aeruginosa* (n=93), *S. aureus* (n=132) ve *Acinetobacter baumannii* (n=103) türlerine karşı denenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre; izole edilen ve *S. aureus* suşuna etkili olduğu saptanan 2 adet bakteriyofajın (F44/10- F125/10) her ikisi de bakterilerin tümüne etkilidir. *P. aeruginosa* bakterilerine etki eden 2 adet bakteriyofaj (F770/05- F510/08) izole edilmiştir. Bu bakteriyofajlardan, F770/05 bakterilerin %63,4' üne ve F510/08 ise bakterilerin %68,8' ine etkili bulunmuştur. İki fajın birlikteliği ile yapılan faj kokteyli ise bakterilerin %80,6' sına etkili olduğu saptanmıştır. F1245/05 kodlu bakteriyofaj ise *A. baumannii* bakterilerininin %74,8'ine etkilidir.

Aynı araştırmada bakteriyofajların, biyofilm tabakasına etkisinde incelenmiştir. Hazırlanan faj kokteyllerinin, biyofilm tabakasını yok edici etkisinin; *S. aureus*' ta %70 (4saat), %90 (24 saat), *P. aeruginosa* bakterilerinde ise %100 (24 saat) 'lere ulaştığı saptanmıştır. *A. baumannii*' için tekli faj uygulamasındaki etkinin ise %90 lara vardığı tespit edilmiştir.

Komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonu etkeni çoklu ilaç dirençli patojenlerin tedavisinde faj kokteyllerinin hazırlanarak tedavi başarısının artırılması sağlanabilmektedir. Gündoğdu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada diyabetik ayak enfeksiyonlarından (DAE) izole edilen çoklu ilaç direncine sahip toplamda 33 (9 *Acinetobacter baumannii*, 9 *P. aeruginosa*, 9 *E. coli*, 3 MRSA ve 3 *K. pneumoniae*) bakteri türüne karşı Eliava Enstitüsü'nden getirilen hazır faj preparatları denenmiştir. Çalışma sonucuna göre, patojenlerin %87,9 (29/33)'unun denenilen faj preparatlarına ya da faj kokteyllerine karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir. Geniş spektrumlu beta laktamaz direncine sahip 2 *E. coli* suşu ile bir *P. aeruginosa* suşu standart faj kokteyllerine karşı dirençli bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilen 3 *K. pneumoniae* suşundan biri denenilen üç adet kütüphane fajına da direnç göstermiştir (Gündoğdu ve ark, 2016). Çalışmamızda elde ettiğimiz 7 farklı faj laboratuvarımız kültür koleksiyonunda yer alan diğer DAE kökenli 8 gram pozitif (MRSA, MSSA, *S. viridans*, *S. epidermidis*, *S. Pyogenes* ve *E. faecalis*) ve 10 gram negatif (*P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *K. Pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacter* spp.) olmak üzere toplam 18 klinik izolata karşı etki spektrumları belirlenmiştir. Fajlar arasında yalnızca KK4 fajının kendi homolog konakçısı olan *E. coli* dışında *Acinetobacter*'e karşı litik etki gösterdiği belirlenmiş olup elde edilen bu fajların yüksek oranda tür spesifik olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuçlar Tablo 8'de gösterilmiştir.

Bakteriyofajların diyabetik ayak enfeksiyonlarının yanı sıra farklı enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılmasını içeren birçok farklı çalışma literatürde yer almaktadır. Rubalskii ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları çalışmada bakteriyofaj tedavisinin kardiyotorasik cerrahiye bağlı kritik bakteriyel enfeksiyon vakalarında geleneksel antibiyotik tedavisine kıyasla uygulanabilir bir tedavi yöntemi olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bunun için 2015'ten bu yana çoklu ilaç direncine sahip *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* enfeksiyonları olan sekiz hasta bakteriyofajlarla tedavi edilmiştir. Tür spesifik olan ve farklı kaynaklardan izole edilerek saflaştırılan faj preparatları, duruma bağlı olarak farklı süreler boyunca lokal, oral veya inhalasyon yoluyla hastalara uygulanmıştır ve bu tedavi sırasında tüm hastalar geleneksel antibiyotiklere devam etmiştir. Hastaların yaş aralığı 13-66 olup, 7 erkek 1 kadın

hasta üzerinde klinik deney gerçekleştirilmiştir. Bu 8 hastanın 7'sinde hedef bakteriye karşı uygulanan faj tedavisi başarılı olmuştur. Çalışmada, kardiyotorasik cerrahiye bağlı kritik bakteriyel enfeksiyon vakalarında geleneksel antibiyotik tedavisi işe yaramadığında bakteriyofajlarla yapılan tedavilerin umut verici sonuçlar ortaya çıkarabileceği sonucuna varılmıştır (Rubalskii ve ark, 2020).

Çocuklarda bakteriyofaj kullanımı ile ilgili bir derlemede (Fortuna ve ark, 2008) Polonya ve Almanya'da çocukların ishal ve uriner sistem enfeksiyonlarında faj tedavisinin başarıyla kullanıldığını, özellikle Polonya'da ayrıca osteomyelit, myosit, irinli yaralar, solunum sistemi enfeksiyonları, furunkuloz ve septisemide %90 başarılı sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir. Aynı makalede, Amerika Birleşik Devletleri'nde faj tedavisinin sinüzit, stafilokokal dermatit ve üst solunum yolu enfeksiyonunda kullanıldığı bildirilmiştir.

Ancak insanlardaki enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde bakteriyofaj tedavisinin uygulanması henüz etik kurullarca güvenilir bulunmamaktadır. Bu yüzden birçok çalışmada deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bu açıdan hayvan çalışmaları, in vitro çalışmalarla faj tedavisinin gerçek klinik uygulaması arasındaki boşluğu doldurmaya yardımcı olabilmektedir. Bununla birlikte, hayvan modelleri, canlı konakçılarda faj tedavisinin etkinliği ve güvenliği konusunda hayati derecede yararlı veriler sağlar ve yaklaşımın daha da geliştirilmesi için önemlidir (Kortright ve ark, 2019).

Sistemik enfeksiyonların tedavisi için farelerde faj tedavisinin etkinliğini araştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur. *P. aeruginosa* sepsisin bağırsaktan türetilmiş bir modelinde Watanabe ve arkadaşlarının 2007'de gerçekleştirdiği faj tedavisinde enfeksiyondan 1 gün sonra ağızdan uygulandığında enfekte farelerin %67 oranında hayatta kaldığını gözlemlemişlerdir. Aynı yıl Capparelli ve arkadaşları ise, sistemik *Staphylococcus aureus* enfeksiyonu olan farelerin başarılı bir şekilde korunmasının faj dozuna bağlı olduğunu gözlemlemiştir.

Gerek moleküler biyolojide gerekse enfeksiyon hastalıkları ve patojenitede önemli rol oynayan *Escherichia coli* yıllardır araştırmacıların ilgi odağındadır. Tüm bu çalışmaların yanı sıra *Escherichia coli*'nin sebep olduğu enfeksiyonlara karşı yapılan birkaç araştırmada;

2017'de Mohamed ve ekibi çoklu ilaç direçli *E. coli* serotiplerine ve ishale sebep olan *E. coli* O157'ye karşı hazırlanan bakteriyofaj kokteylini değerlendirmişlerdir. Kullanılan bakteriyofaj tez çalışmamızdaki gibi kanalizasyon suyundan izole edilmiştir. Hazırlanan faj kokteyli 6 adet çoklu ilaç direncine sahip *E. coli* suşuna karşı denenmiştir. Bu 6 adet *E. coli* suşu antimikrobiyal aktivite testine tabi tutulmuş ve bunun sonucunda *E. coli*'lerin pek çok farklı antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmada birçok



antibiyotiğin yanı sıra tez çalışmamıza paralel olarak imipenem direnci tüm suşlarda dikkat çekmiştir. Çalışmada izole edilen fajların morfolojileri TEM mikroskopisi ile belirlenirken tez çalışmamızda 3 farklı parametreye göre fajların morfolojisi belirlenmiştir. Fiziksel olarak faj plak morfolojileri, moleküler olarak restriksiyon profilleri ve kimyasal olarak klinik suşlar üzerine gösterdikleri lizis etkiye göre 7 farklı bakteriyofaj tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada ek olarak faj kokteyli *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı konakçılar üzerinde de denenmiştir. Sonuçta faj kokteyli denenen tüm suşlara karşı litik etki göstermiştir. Çalışmadaki bu sonuçlar göz önüne alındığında bakteriyofajların bir biyo-kontrol aracı olarak veya birçok gıda ürünü için doğal gıda koruyucu olarak kullanılma olasılığı artmaktadır (Mohamed ve ark, 2017).

Manohar ve arkadaşları 2018'de klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli*'ye karşı bakteriyofaj izole etmeyi ve karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Bu amaç için Ganj nehrinden su örnekleri toplamışlar ve bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada kullanılan klinik *E. coli* suşları ilk olarak PCR amplifikasyonu yapılarak doğrulanmıştır. Daha sonra antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi için MİK testi yapılmış ve karbapenem direncine sahip oldukları tespit edilmiştir. Toplamda 53 bakteriyel suş kullanılmıştır ve toplam 2 tane bakteriyofaj izole edilmiştir. Bunlardan en geniş konakçı aralığına sahip olan bir tanesini bakteriyofaj adlandırma kılavuzuna göre adlandırılmışlardır (myPSH2311). Bu fajdan DNA izole etmek için polietilen glikol (PEG) ile fajın çöktürülmesi sağlanmış, ardından Fenol Kloroform yöntemiyle de faj DNA'sını izole etmişlerdir. myPSH2311 olarak adlandırılan bu bakteriyofaj *E. coli*'nin beş farklı serotipine ve toplamda 25/53 (%47,1) farklı *E. coli* suşuna litik etki göstermiştir. Çalışmada elde ettikleri fajları ileri çalışmalar için liyofilize ederek -20 °C'de saklamışlardır.

Manohar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer olarak, tez çalışmamızda bakteriyofaj kaynakları olarak kirliliği su örnekleri (kanalizasyon suyu, hayvan suluğu vb.) kullanılmış ve buna ek olarak hayvan dışkı örnekleri de çalışmamız kapsamına dahil edilmiştir. Manohar ve arkadaşlarının çalışmasındaki klinik *E. coli* suşlarına karşı bulunan 2 adet fajın aksine, tez çalışmamızda toplam 7 faj izole edilmiş ve tüm çalışma bu 7 faj üzerinden yürütülmüştür. Yine yapılan çalışmaya paralel olarak, tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz 30 klinik *E. coli* izolatında karbapenem direnci için MİK testi yapılmıştır. MİK testi sonucunda 10 izolatın karbapenem dirençli olduğu (imipenem / *E. coli* için epidemiyolojik sınır değeri "ECOFF" / EUCAST 2021) ve bunlardan 8 tanesinin (%80) izole ettiğimiz fajlara hassas oldukları tespit edilmiştir. Manohar ve arkadaşlarının faj DNA izolasyonu öncesi PEG ile fajın çöktürülmesi ve ardından Fenol/Kloroform ile DNA eldesine

ek olarak, tez çalışmamızda hem PEG ile hem de kendi laboratuvarımızda geliştirdiğimiz yüksek devirde uzun süreli santrifüjle fajların çöktürülmesi sağlanmış daha sonra Fenol/Kloroform ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda izole etmiş olduğumuz fajlardan biriyle bu iki yöntem karşılaştırılmış ve yüksek devirde uzun süreli santrifüjün daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Resim 8). Yine yapılan çalışmaya benzer olarak tez çalışmamızda da izole edilen bakteriyofajlar, ileri çalışmalar için liyofilize edilerek saklanmıştır.

Bir diğer çalışma 2020’de Mangieri ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiş olup gıdalarda Shiga-toksin üreten *E. coli* (STEC)’in kontrolü için bir bakteriyofaj kokteyli hazırlanmış ve test edilmiştir. Çalışmada kullanılan 30 STEC serotipinden yalnızca %10’u çoklu antibiyotik direnci gösterirken, ampisilin bu suşların %65 ‘ini inhibe etmiştir. Bir diğer taraftan çalışmada bakteriyofaj izolasyonu için sığırların dışkı ve sulukları ayrıca kanalizasyon suları kullanılmıştır ve toplamda 21 faj izole edilmiştir. Daha sonra her fajdan 3 tane olacak şekilde 7 farklı kokteyl hazırlanmıştır. Çalışmada indikatör bakteri olarak *E. coli* CNCTC 6896 suşu kullanılmıştır. Hazırlanan faj kokteyllerinin STEC suşlarına karşı denenmesi için ikili agar metodu uygulanmış ve her bir faja karşı oluşan hassasiyet ikili agar plakası üzerinde oluşan plakların türlerine göre belirlenmiştir. Berrak plaklar yüksek hassasiyet, bulanık plaklar düşük hassasiyet olarak yorumlanmıştır. Sığır dışkısından izole edilen fajların diğerlerine göre daha etkili olduğu ve geniş bir konak aralığına sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen fajlar, gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerine etkilerinin daha kapsamlı incelenebilmesi için stoklanmıştır (Mangieri ve ark, 2020).

Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında bakteriyofajlarla tedavi yöntemi geçmişten günümüze kadar birçok çalışmayı içinde barındırmakta ve başarılı sonuçlarıyla umut vadetmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında çevresel örneklerden (hastane kanalizasyonları, hayvan dışkı, hayvan sulukları vb.) hazırlanan faj süspansiyonlarından *E. coli* DH10B suşu kullanılarak litik bakteriyofajların izolasyonu ve bu bakteriyofajların Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi (REDPROM) laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan diyabetik ayak enfeksiyonu (DAE) kökenli klinik *Escherichia coli* suşlarına karşı etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmamız kapsamında bakteriyofaj izole edilebilecek potansiyel kaynaklar olarak 6 hayvan dışkı örneği ve 7 atık su örneği toplanmıştır. Bu örnekler katı ve sıvı olarak kendi aralarında birleştirilerek mix1 ve mix2 kaynakları oluşturulmuştur. Bu kaynaklardan bakteriyofaj izolasyonu indikatör bakteri *E. coli* DH10B suşu kullanılarak gerçekleştirilmiş olup bunun sonucunda plak morfolojileri farklı toplam 15 adet bakteriyofaj izole edilmiştir. İzole edilen 15 bakteriyofajın, restriksiyon profilleri ve klinik *E. coli* suşları üzerine etkilerine bakılarak 7 farklı faj olduğu tespit edilmiş ve bunlar KK1-KK2-KK3-KK4-KK5-KK6-KK7 olarak adlandırılmıştır. Bu fajların, çalışmaya dâhil edilen ve MİK (imipenem) değerleri belirlenmiş olan 30 DAE kökenli klinik *E. coli* suşu üzerine etkilerine bakılarak;

- KK4 30 bakteri suşunun 22'sine etki ederek en etkili faj olduğu tespit edilmiştir.
- KK6 ve KK7 2 izolata, KK2 ise 5 izolata etki göstererek en az etkili faj olarak tespit edilmiştir.
- KK3 ve KK1 ise sırasıyla 7 ve 12 izolat üzerine litik etki göstermiştir.
- Ek olarak KK5 fajı indikatör bakteri dışında hiçbir izolata etki göstermemiştir.
- Ayrıca bu 7 fajın karışımıyla hazırlanan faj kokteylinin 3 bakteri izolatu (*E.coli*; 465, 5911 ve 812) harici tüm klinik suşlar üzerine etki ettiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz KK1 fajının EcoRI ve PstI kesimi ile elde edilen yaklaşık 900 bazlık bir fragment vektör plazmide aktarılmış ve dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen DNA dizisinin NCBI Blast sorgulamasında, “*Escherichia phage rolling*” genomu ile %92,97 benzer bulunmuştur.

Çalışmada elde edilen 7 fajın (KK1, KK2, KK3, KK4, KK5 KK6 ve KK7) *E. coli* dışındaki konakçı spektrumunun belirlenmesi için Tablo 8’de belirtilen diğer diyabetik ayak enfeksiyon etkeni bakterilerden toplam 18 klinik izolata karşı etki spektrumları belirlenmiştir. Bunun sonucunda fajlar arasında yalnızca KK4 fajının 3281 kodlu *Acinetobacter* suşuna karşı

etkili olduğu bunun dışında diğer fajların kendi homolog konakçısı dışında hiçbir bakteriye karşı litik etkinlik göstermediği tespit edilmiştir.

Günümüzde çoklu dirence sahip bakterilerin sebep olduğu ve tedavisi zor enfeksiyonlardan biri olan yara enfeksiyonlarına alternatif tedavi arayışları sürmektedir. Tez çalışmamız kapsamında bu yara enfeksiyonlarının en önemli etkenleri arasında yer alan çoklu direnç *E. coli*'ye karşı etkinliği sırasıyla %73 ve %90 olan, KK4 ve faj kokteylinin bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip oldukları düşünölmektedir. Ayrıca tez çalışmamızda elde edilen bakteriyofajlar ileride daha geniş ve kapsamlı çalışmalar için liyofilizasyon işlemine tabi tutularak +4 C'de stoklanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abedon S.T, Kuhl S.J, Blasdel B.G & Kutter E.M.** Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011,1: 66–85.
- Ackermann H.W.** Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia* 2011, 32(2), 90-94.
- Ackermann H.W.** 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology* 2007, 152(2), 227-243.
- Ackermann H.W.** Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology* 2003, 154(4), 245-251.
- Adriaenssens E.M, Wittmann J, Kuhn J.H, Turner D, Sullivan M.B, Dutilh B.E & Switt A.I. M.** Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Archives of Virology* 2018, 163(4), 1125-1129.
- Akyar I.** Süper Bakteriler İçin Antibiyotik Arayışı. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2010, 1(2), 62-67.
- Altamirano F.L.G, Barr J.J.** Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews* 2019, 32(2).
- Alves D.R, Gaudion A, Bean J.E, Esteban P.P, Arnot T.C, Harper D.R & Jenkins A.T.A.** Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 2014, 80(21), 6694-6703.
- Beke G, Stano M & Klucar L.** Modelling the interaction between bacteriophages and their bacterial hosts. *Mathematical Biosciences* 2016, 279, 27-32.
- Bradley D.E.** Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews* 1967, 31(4), 236.
- Brüssow H, Kutter E.** Phage ecology. *Bacteriophages: Biology and Applications* 2005, 70, 129-163.

**Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P & Iannelli D.** Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2007, 51, 2765–2773.

**Chhibber S, Kaur T & Kaur S.** Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. *PloS One* 2013, 8(2).

**Critchley I.A, Cotroneo N, Pucci M.J & Mendes R.** The burden of antimicrobial resistance among urinary tract isolates of *Escherichia coli* in the United States in 2017. *PloS One* 2019, 14(12).

**El Haddad L, Harb C.P, Stibich M, Chemaly R.F & Chemaly R.F.** Bacteriophage Therapy Improves Survival of *Galleria mellonella* Larvae Injected with Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *In Open Forum Infectious Diseases* 2019,6 (2), 329-S329.

**Ergin F, Yıldız G, Çomak Göçer E.M & Küçükçetin A.** Bakteriyofajların Antibakteriyel Ajan Olarak Kullanımı. *Academic Food Journal/Akademik GIDA* 2017, 15(2).

**Ertugrul B.M, Oncul O, Tulek N, Willke A, Sacar S, Tunccan O.G & Yapar N.** A prospective, multi-center study: factors related to the management of diabetic foot infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2012, 31(9), 2345-2352.

**Ertugrul B.M, Oryasin E, Lipsky B. A, Willke A & Bozdogan B.** Virulence genes *fliC*, *toxA* and *phzS* are common among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from diabetic foot infections. *Infectious Diseases* 2018, 50(4), 273-279.

**Ertuğrul B.M, Uyar-Güleç G, Baktıroğlu S, Çörekli E & Türe M.** Diyabetik Ayak İnfeksiyonu Etkenlerinin Yıllara Göre Dağılımı: Değişim Var mı? *Klimik Dergisi* 2017, 30(1).

**Fortuna W, Międzybrodzki R, Weber-Dąbrowska B & Górski A.** Bacteriophage therapy in children: facts and prospects. *Medical Science Monitor* 2008, 14(8).

**Gabisonia T, Loladze M, Chakhunashvili N, Katamadze T, Tamarashvili N, Nadiradze M & Alibegashvili M.** New Bacteriophage Cocktail against Antibiotic Resistant *Escherichia coli*. *Bull. Georg. Natl. Acad. Sci* 2018, 12(3).

**Galindo-Méndez M.** Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. In *E. coli Infection* 2020, IntechOpen.

**Gardner SE, Hillis SL & Heilmann K.** The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes* 2013, 62, 923–930.

**Golkar Z, Bagasra O & Pace D.G.** Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2014, 8(02), 129-136.

**Goswami N.N, Trivedi H.R, Goswami A.P.P, Patel T.K & Tripathi C.B.** Antibiotic sensitivity profile of bacterial pathogens in postoperative wound infections at a tertiary care hospital in Gujarat, India. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* 2011, 2(3), 158.

**Guttman B, Raya R & Kutter E.** Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and Applications* 2005, 4.

**Gündoğdu A, Kılıç H, Ulu Kılıç A & Kutateladze M.** Komplike Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonu Etkeni Çoklu Dirençli Patojenlerin Standart Bakteriyofaj Kokteyllerine Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2016, 50(2), 215-223.

**Hobbs Z, Abedon S.T.** Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with ‘Lytic or lysogenic’. *FEMS Microbiology Letters* 2016, 363(7).

**Jeon J, Park J.H & Yong D.** Efficacy of bacteriophage treatment against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in *Galleria mellonella* larvae and a mouse model of acute pneumonia. *BMC Microbiology* 2019, 19(1), 70.

**Kakasis A, Panitsa G.** Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2019, 53(1), 16-21.

**Klein E.Y, Van Boeckel T.P, Martinez E.M, Pant S, Gandra S, Levin S.A & Laxminarayan R.** Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018, 115(15).

**Kortright K.E, Chan B.K, Koff J.L & Turner P.E.** Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host & Microbe* 2019, 25(2), 219-232.

**Kossow A, Zhang W, Bielaszewska M, Rhode S, Hansen K, Fruth A & Mellmann A.** Molecular characterization of human atypical sorbitol-fermenting enteropathogenic *Escherichia coli* O157 reveals high diversity. *Journal Of Clinical Microbiology* 2016, 54(5), 1357-1363.

**Kuntz TB, Kuntz ST.** Enterohemorrhagic *E. coli* infection. *Primary Care Update* 1999,192-196.

**Kutateladze M, Adamia R.** Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology* 2010, 28(12), 591-595.

**Maloo A, Fulke A. B, Mulani N, Sukumaran S & Ram A.** Pathogenic multiple antimicrobial resistant *Escherichia coli* serotypes in recreational waters of Mumbai, India: a potential public health risk. *Environmental Science and Pollution Research* 2017, 24(12), 11504-11517.

**Manohar P, Ramesh N.** Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Scientific Reports* 2019, 9(1), 1-10.

**Manohar P, Tamhankar A. J, Lundborg C.S & Ramesh N.** Isolation, characterization and in vivo efficacy of *Escherichia* phage myPSH1131. *PloS One* 2018, 13(10).

**Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, Glenn J, Morris Jr M.D & Sulakvelidze A.** A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly (ester amide) s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *International Journal Of Dermatology* 2002, 41(7), 453-458.

**Mendes J.J, Leandro C, Mottola C, Barbosa R, Silva F.A, Oliveira M & Sao-Jose C.** In vitro design of a novel lytic bacteriophage cocktail with therapeutic potential against



organisms causing diabetic foot infections. *Journal of Medical Microbiology* 2014, 63(8), 1055-1065.

**Merabishvili M, Vandenheuvel D, Kropinski A.M, Mast J, De Vos D, Verbeken G & Pirnay J.P.** Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PloS One* 2014, 9(8).

**Nataro J.P, Kaper J.B.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998, 11(1), 142-201.

**Nicastro J, Wong S, Khazaei Z, Lam P, Blay J & Slavcev R.A.** *Bacteriophage Applications Historical Perspective and Future Potential* 2016, Springer International Publishing.

**Nnadozie C.F, Kumari S & Bux F.** Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2017, 16(3), 491-515.

**Nobrega F.L, Costa A.R, Kluskens L.D & Azeredo J.** Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends in Microbiology* 2015, 23(4), 185-191.

**Nordmann P, Poirel L.** Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013, 68(3), 487-489.

**O'Flaherty S, Ross R.P & Coffey A.** Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Review* 2009, 33, 801–819.

**Özkuyumcu C.** Klinik Bakteriyoloji El Kitabı. *Ankara: Güneş Tıp Kitapevi* 2009.

**Read A.F, Woods R.J.** Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine and Public Health* 2014, (1), 147.

**Rubalskii E, Ruemke S, Salmoukas C, Boyle E.C, Warnecke G, Tudorache I & Ziesing S.** Bacteriophage Therapy for Critical Infections Related to Cardiothoracic Surgery. *Antibiotics* 2020, 9(5), 232.

**Sadeghpour Heravi F, Zakrzewski M, Vickery K, G Armstrong D & Hu H.** Bacterial diversity of diabetic foot ulcers: current status and future perspectives. *Journal of Clinical Medicine* 2019, 8(11), 1935.

**Safwat Mohamed D, Farouk Ahmed E, Mohamed Mahmoud A, Abd El-Baky R.M & John J.** Isolation and evaluation of cocktail phages for the control of multidrug-resistant *Escherichia coli* serotype O104: H4 and *E. coli* O157: H7 isolates causing diarrhea. *FEMS Microbiology Letters* 2018, 365(2).

**Sağlam A.G, Şahin M, Çelik E, Çelebi Ö, Akça D & Otlu S.** The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary World* 2017, 10(12), 1481.

**Sambrook J.** Molecular cloning: a laboratory manual/Joseph Sambrook 2001, David W. Russell.

**Sarker S.A, Berger B, Deng Y, Kieser S, Foata F, Moine D & Vuillet V.** Oral application of *Escherichia coli* bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from Bangladesh. *Environmental Microbiology* 2017, 19(1), 237-250.

**Sulakvelidze A, Alavidze Z & Morris JG.** Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2001, 45: 649-659.

**Sybesma W, Rohde C, Bardy P, Pirnay J.P, Cooper I, Caplin J & McCallin S.** Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy—part II. *Antibiotics* 2018, 7(2), 35.

**Utlu Y, Başak B, Bozkurt-Kozan F & Ertuğrul M.B.** Causative agents and factors associated with multidrug resistant pathogens in diabetic foot infections. *Journal of Klinik* 2019, 32(1),84-9.

**Van Regenmortel M.H.** Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. *Seventh Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses* 2000, 395-480.

**Walker E, Lyman A, Gupta K, Mahoney M.V, Snyder G.M & Hirsch E.B.** Clinical management of an increasing threat: outpatient urinary tract infections due to multidrug-resistant uropathogens. *Clinical Infectious Diseases* 2016, 63(7), 960-965.

**Watanabe R, Matsumoto T, Sano G, Ishii Y, Tateda K, Sumiyama Y & Yamaguchi K.** Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007, 51(2), 446-452.

**Weber-Dąbrowska B, Mulczyk M & Górski A.** Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *In Inflammation* 2001, Springer, Dordrecht, 201-209.

**Zhang L, Levy K, Trueba G, Cevallos W, Trostle J, Foxman B & Eisenberg J.N.** Effects of selection pressure and genetic association on the relationship between antibiotic resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015, 59(11), 6733-6740.

## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : KARAYNİR, Abdulkerim  
**Uyruk.** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : İdil/18.04.1994  
**E-mail** : kerimkaraynir@gmail.com  
**Yabancı Dil** : İngilizce

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	22/01/2018

### BURSLAR ve ÖDÜLLER

Markersız plazmid amplikonuyla direnç geni avcılığı. TÜBİTAK 1002 Projesi, 119Z640, Bursiyer

### AKADEMİK YAYINLAR

#### 1. BİLDİRİLER

##### A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Zeynep Erdem AYNUR, M. Bülent ERTUĞRUL, Mehmet AYTAR, **Abdulkerim KARAYNİR**, Bülent BOZDOĞAN. (2019). Diyabetik Ayak Enfeksiyon Etkeni Koagülaz Negatif Stafilokok (KNS) İzolatlarında PVL Taşıyıcılığı. 2<sup>nd</sup> International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara. Sözlü Bildiri.

#### 2. PROJELER

Çevresel Örneklerden *Escherichia coli* DH10B Suşuna Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Klinik *Escherichia coli* Suşlarına Karşı Etkinliklerinin Belirlenmesi. BAP projesi, TPF-19053