



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK METİSİLİN DİRENÇLİ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) ETKENİ KULLANILARAK
SPONDİLODİSKİT MODELİ OLUŞTURULAN RATLARDA
BAKTERİYOFAJ VE ANTİBİYOTİK TEDAVİLERİNİN ETKİLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Hüseyin Emre Karaca

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mutlu Çobanoğlu

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 64583101/2020/034 sayılı proje olarak onaylanmıştır.

AYDIN – 2021

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLARAK METİSİLİN DİRENÇLİ
***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) ETKENİ KULLANILARAK**
SPONDİLODİSKİT MODELİ OLUŞTURULAN RATLARDA
BAKTERİYOFAJ VE ANTİBİYOTİK TEDAVİLERİNİN ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Hüseyin Emre Karaca

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mutlu Çobanoğlu

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 64583101/2020/034 sayılı proje olarak onaylanmıştır.

AYDIN – 2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca başarılı bir ortopedi ve travmatoloji uzmanı olmam için benimle tüm birikimini paylaşan, akademik ve etik olarak tecrübelerini aktaran, hayatım boyunca desteklerini esirgemeyecekleri bildiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Şevki Öner Şavk, Prof. Dr. Emre Çullu, Dr. Ferit Tufan Özgezmez ve Dr. Vahit Yıldız hocalarıma,

Uzmanlık eğitimim boyunca bana mesleki olarak yol gösterici olan, tez yazım sürecinde ve akademik eğitimimde büyük katkıları olan tez danışmanı hocam Doç. Dr. Mutlu Çobanoğlu'na,

Patolojik değerlendirmeleri ile bu çalışmanın gerçekleşmesine katkıda bulunan Prof. Dr. Canten Tataroğlu hocama,

Mikrobiyolojik değerlendirmeleri ile çalışmamda önemli katkıları bulunan Prof. Dr. Bülent Bozdoğan hocama,

Radyolojik görüntülerin elde edilmesi ve değerlendirmesinde önemli katkıları bulunan Dr. Mustafa Gök hocama,

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında bir dost gibi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalındaki araştırma görevlisi, hemşire, personel ve sekreter arkadaşlarıma,

Tez yazım aşamasında desteklerini eksik etmeyen değerli arkadaşlarım Dr. Dilruba Ceren Aslan, Dr. Ömer Faruk Rahman, Dr. Ertuğ Dinçer, Dr. Aysima Dinçer'e

Hayatımın her anında desteklerini ve dualarını benden esirgemeyen, onur ve gurur duyduğum canım aileme,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
RESİM DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR	vii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Tarihçe ve Epidemiyoloji	2
2.2 Fizyopatoloji.....	3
2.3 Öykü, Klinik Belirti ve Bulgular	4
2.4 Enfeksiyon Etkenleri	6
2.4.1 Mrsa	8
2.5 Tanı Yöntemleri.....	9
2.5.1 Laboratuvar Testleri	9
2.5.2 Direkt Grafi	10
2.5.3 Bilgisayarlı Tomografi	10
2.5.4 Manyetik Rezonans Görüntüleme	10
2.5.5 Nükleer Görüntüleme Yöntemleri	12
2.6 Omurga Enfeksiyonlarında Tedavi.....	13
2.6.1 Medikal Tedavi.....	13
2.6.1.1. Antibiyoterapi.....	15
2.6.1.2. Faj Terapi.....	15
2.6.2 Cerrahi Tedavisi	18

3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1 Araştırmanın Tipi	20
3.2 Araştırmanın Yeri	20
3.3 Etik Kurul Onayı	20
3.4 Kullanılan Deney Materyali	20
3.5 Deney Grupları ve Uygulama Protokolü	21
3.6 Tedavi Ajanlarının Hazırlanması.....	22
3.6.1 Bakteriyofaj Hazırlanması.....	22
3.6.1.1. Bakteriyofaj İzolasyonu ve Pürifikasyon	22
3.6.1.2. Titrelerin Belirlenmesi ve Faj Kokteylinin Hazırlanışı	23
3.6.1.3. Bakteri Kültürünün Hazırlanması.....	23
3.6.2. Vankomisin Hazırlanması	23
3.7 Cerrahi Yöntem	23
3.8 Dokuların Histopatolojik İncelemesi.....	26
3.8.1 Histopatolojik Skorlama	26
3.9 Radyolojik inceleme	26
3.11 İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ.....	43
7. ÖZET	44
8. ABSTRACT	46
9. KAYNAKÇA	48

TABLO DİZİNİ

Tablo I. Spinal Enfeksiyonlarda Etken Olan Mikroorganizmalar	6
Tablo II. Vertebra Enfeksiyonlarında Predispozan Faktörlere Göre Patojenlerin Sınıflandırılması	7
Tablo III. Piyojenik Spinal Enfeksiyonlarda Sık Görülen Enfeksiyonlar ve Tedavi Seçenekleri	14
Tablo IV. Çalışma Grupları ve Uygulanan İşlemler.....	21
Tablo V. Tedavi Öncesi ve Sonrası MRG Skorlarının Grup İçi Karşılaştırılması	28
Tablo VI. Gruplar Arasındaki Tedavi Öncesi ve Sonrası MRG Skorlarındaki Değişimin Karşılaştırılması.....	30
Tablo VII. Gruplar Arasındaki Histopatolojik Skorlamanın Ortanca ve İnterkuartil Aralık Değerleri	33
Tablo VIII. Gruplar Arasındaki Histopatolojik Skorlamalarının Karşılaştırılması	34

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Vertebral arteriyel sistemi temsil eden şematik çizimler	3
Şekil 2. Tipik bir bakteriyofajın yapısı.....	16
Şekil 3. Lambda (λ) bakteriyofaj üremesinin litik ve lizojenik döngüleri	17
Şekil 4. Tedavi öncesi ve sonrası MRG skorlarının grup içi karşılaştırılması.....	29
Şekil 5. Gruplar arasındaki tedavi öncesi ve sonrası MRG skorlarındaki değişimin karşılaştırılması.....	31
Şekil 6. Gruplar arasındaki histopatolojik skorlamaların karşılaştırılması	35

RESİM DİZİNİ

Resim 1. İntraperitoneal anestezi uygulaması.....	24
Resim 2. Cerrahi insizyon ve Mrsa inokülasyonu	25
Resim 3. Deneklerin enfeksiyon inokülasyonundan on gün sonrasında enfeksiyonun gösterilmesi açısından çekilen MRG tetkiki (A: T1 sekansı B: T2 sekansı C: STIR sekansı) 32	
Resim 4. Deneklerin enfeksiyonlarının MRG ile görüntülenmesinden dört hafta sonraki kontrol MRG tetkiki (A: T1 sekansı B: T2 sekansı C: STIR sekansı)	32
Resim 5. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x40 büyütmede vertebral osteomyelit	36
Resim 6. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x100 büyütmede granülasyon dokusu.....	36
Resim 7. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x40 büyütmede fistül traktı ve yoğun inflamasyon	37
Resim 8. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x200 büyütmede yumuşak dokular içerisinde dev hücreler	37
Resim 9. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x100 büyütmede yeni reaktif kemik odağı	38
Resim 10. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x20 büyütmede yumuşak dokularda hafif inflamasyon	38

KISALTMALAR

BT	Bilgisayarlı Tomografi
CFU	Colony Forming Unit
CRP	C Reaktif Protein
ESH	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDG	Fluoro-2-Deoksi-D-Glukoz
Ga	Galyum
GLUT	Glukoz Taşıyıcı Transmembran Protein
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HMPA	Heksa Metil Propilen Aminoksim
In	İndiyum
I	İyot
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRSA	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus Aureus</i>
MSSA	Metisiline Duyarlı <i>Staphylococcus Aureus</i>
PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein
PFU	Plaque Forming Unit
PET-BT	Pozitron Emisyon Tomografisi
SD	Spondilodiskit
SM	Salin Magnezyum

STIR	Short Tau Inversion Recovery
PBS	Phosphate Buffered Salin
PSD	Piyojenik Spondilodiskit
SPECT	Single Photon Emission Tomografi
SCCmec	Stafilokokal Kromozom Casette
SUD	Standart Uptake Değeri
Tbc	Tüberküloz
Tc	Teknesyum
TSB	Tryptic Soy Broth
TVS	Tüm Vücut Kemik Sintigrafisi
USG	Ultrasonografi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Piyojenik spondilodiskit seyrek görülen bir enfeksiyon olmasıyla birlikte, yaşlı popülasyonun ve immün yetmezlikli hasta sayısının çoğalmasıyla görülme sıklığı artmaktadır (1, 2). Seyrek görülmekle birlikte ciddi ve hayatı tehdit edebilen bu hastalığa tanı koyması genellikle zordur. Piyojenik spondilitin erken ve doğru tanısı, spinal deformite ve disfonksiyon oluşumunu azaltma ve etkili tedavi için önemlidir. *Staphylococcus aureus* vertebral osteomiyelitte karşılaşılan en yaygın mikroorganizma olarak tespit edilmiştir (3, 4). Çoklu ilaç direncine sahip bakterilerin oluşturduğu piyojenik enfeksiyonların tedavisinde oldukça eski bir tedavi yöntemi olsa da araştırmacılar bakteriyofaj tedavisini “yeni” bir alternatif gibi tekrar ele almaya başlamıştır (5, 6). Bakteriyofajlar, çeşitli virulans genlerini taşıyabilirler ve bunları bakterilere aktarabilirler (7). Litik durumda, faj konakçı hücreye bağlanır ve nükleik asidini enjekte eder. Daha sonra transkripsiyon, translasyon ve replikasyon meydana gelir ve ardından faj paketlenir. Sonuç olarak konakçı hücre, çoğalan fajların uyguladığı basınçtaki artışa bağlı olarak yırtılır (8). Bakteriyofajlar oldukça spesifik ajanlar oldukları için normal flora üyelerine ve ökaryotik hücrelere, antibiyotikler kadar zarar vermezler (9, 10). Literatürde bakteriyofaj tedavisinin farklı enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (11, 12) Ancak literatürde omurga enfeksiyonları tedavisinde bakteriyofaj kullanımına yönelik çalışma saptanmamıştır. Çalışmamızda ratlarda oluşturulan spondilodiskit modelinde bakteriyofaj ve/veya antibiyotikten oluşan tedavi protokollerinin etkinliğini karşılaştırmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

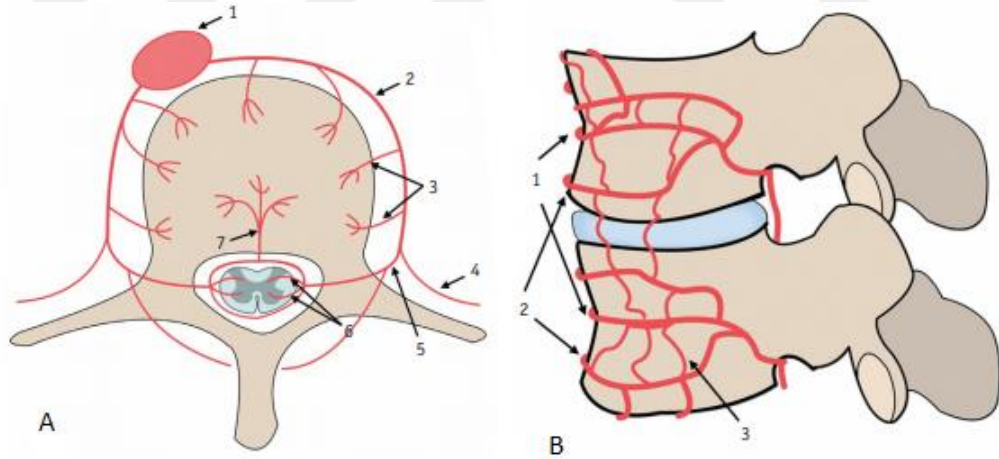
2.1 Tarihçe ve Epidemiyoloji

Omurga enfeksiyonlarının insanlık tarihinin eski dönemlerine kadar dayandığı düşünülmektedir. Omurga enfeksiyonları tarihine ışık tutulduğunda tüm gelişmelerin tüberküloza bağlı spondilit etrafında şekillendiği görülür. Zimmerman ve ark. tarafından MÖ 3000-5000 yılları arasında yaşadığı düşünülen mumyalarda saptanan kaviter akciğer lezyonları ve kifotik omurga deformiteleri böyle düşünülmesine neden olan ilk bulgulardandır (13). MÖ 4. Yüzyılda yaşadığı düşünülen Hipokrat, tüberküloz için ‘tükenme,erime’ anlamına gelen ‘phititis’ terimini kullanmıştır (14). 1779 yılında Sir Percival Pott tarafından paraplejiyle seyreden ayrı bir hastalık olarak omurga tüberküloz enfeksiyonu ilk kez tanımlanmıştır (15). Günümüzde insanoğlunun mikroorganizmalarla savaşı devam etmekte olup, koruyucu hekimlik ve kitlesel aşılama kavramlarındaki prensipler gelişmiş ülkelerde iyice yer edinmiş konumdadır. Ancak geri kalmış veya gelişmekte olan ülkelerde başta tüberküloz olmak üzere enfeksiyon hastalıkları; endemilere, göçle ve enfekte hayvan ticaretiyle pandemilere sebep olmaya devam etmektedir. Tüberkülozun, geliştirilen kemoterapötik ilaçlar ve tedaviler sayesinde özellikle gelişmiş ülkelerdeki sıklığında ciddi azalmalar görülmektedir. Hastalığın daha iyi anlaşılması ve tanı yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte hastalığın saptanması daha kolay hale gelmiştir. Osteomiyelit olgularının %2 ile %8’ini, omurganın piyojenik osteomiyelit olguları oluşturmaktadır. Prevelansı %0,001 ile %0,0025 rapor edilmektedir (16, 17). Hastalığa yakalanan erkek/kadın oranı:2/1 dir (3, 18-21). Genel ölüm oranı raporlar arasında farklılık göstermekle birlikte %2 ile %20 arasındadır (22-24). Piyojenik spondilodiskit olgularında en sık tutulum bölgesi %48-50 oranıyla lomber bölge olurken, daha sonrasında %35 ile torakal tutulum, %3-10 servikal bölge ve %5 torakolomber bileşkede tutulum raporlanmıştır (25, 26). Dünyadaki literatürlere bakıldığında 20 yaş altında ve 50-70 yaşlar arası olmak üzere hastalığın 2 farklı yaş grubunda pik yaptığı saptanmıştır (19, 27). Spinal enfeksiyonlarda etken genellikle tek bir patojen iken komşu yumuşak doku enfeksiyonlarından yayılım ile bulaş gerçekleşirse polimikrobiyal de olabilir. Hadjipavlou ve arkadaşların yaptıkları doku kültürlerinde %75 bakteri izole edildiği bildirilmiş olup, izole edilen ajanların %51 i tek patojen iken %16 iki farklı patojen ve %8 polimikrobiyal olarak belirtilmiştir (28). Omurganın genellikle (%88-97) anterior

cismi ve intervertebral diskinde tutulum olurken, posterior nöral arkta bir tutulum görülürse daha çok fungal veya mikobakteriyel etkenlerden şüphelenilmelidir (29).

2.2 Fizyopatoloji

Patojenik mikroorganizmalar hematogen yol, direkt dışardan ekim ve etkilenen komşu dokulardan yayılma olmak üzere omurgayı üç yoldan enfekte edebilir. Spontan spondilodiskit, çoğunlukla vücudun herhangi bir yerinde enfeksiyöz bir odaktan kaynaklanan hematogen yayılımının bir komplikasyonudur. Endokarditli hastaların spondilodiskit geliştirme riski %2 ile 20 arasında değişirken, spondilodiskitli hastaların üçte birine endokardit tanısı konur (30). Çocuklarda, spinal arterlerde birçok intradiskal anastomoz varlığı nedeniyle enfeksiyon disk içinde sınırlı kalmaktadır. Yetişkinlerde, spinal arterler, intervertebral disklere kan akışı sağlamadan, uçlarından ikiye ayrılırlar (31). Bu mekanizma nedeniyle enfeksiyon bir kural olarak, iki bitişik vertebral gövdeyi etkiler (31). Nükleus pulpozusta herhangi bir yaşta kan veya lenf damarı bulunmamasına rağmen, besleyici damarlar 7 yaşa kadar vertebral uç plakada kalır ve annulus fibrozusta 20 yaşına kadar devam edebilir (32, 33).



Şekil 1. Vertebral arteriyel sistemi temsil eden şematik çizimler (34)

A. Vertebranın arteriyel sisteminin aksiyel şeması: 1, aort; 2, segmental arter; 3, vertebral cismi besleyen arter; 4, interkostal/musküler arter; 5, dorsal spinal arter; 6, radiküler arter; 7, besleyici arter. B. Vertebranın arteriyel sisteminin sagittal şeması: 1, segmental arter; 2, metafiziyel anastomoz; 3, intermetafiziyel anastomoz. Yeom ve ark. çalışmasından uyarlanmıştır (34).

Septik emboliler, vertebral yıkıma yol açan iskemi ve enfarktüse neden olarak vertebra cisminin strüktürel yapısında yıkıma, kompresyon kırıklarına ve bunların sonucunda; spinal instabilite ve deformasyona neden olur. Omurganın arka elemanları (pediküller, lamina, transvers ve spinöz prosesler), hematogen enfeksiyonlarda, omurun gövdesine kıyasla yetersiz arteriyel beslemesi nedeniyle çok nadiren etkilenir (35). Kontrol edilemeyen enfeksiyon, çevredeki yumuşak dokulara yayılıp spinal kanala ilerleyerek epidural apselere ve ilerleyen durumlarda parapleji, subdural apse ve menenjitte neden olabilir. Venöz sistem, spondilodiskit patogeneğinde oldukça küçük bir role sahiptir. Karın içi basınç artışına bağlı olarak pelvisten paravertebral pleksusa olan venöz geri dönüşle birlikte pelvisteki enfeksiyon omurgaya taşınabilir (36). Komşu yapılardan yayılım yoluyla enfekte aort greftleri, özofagus rüptürü veya retrofaringeal apse gelişebilir (3). Son yıllarda cerrahi, epidural veya spinal ponksiyon prosedürlerinden sonra direkt enfeksiyonlarda artış görülmüştür ve bunların sıklığı bazı serilerde %25-30'a kadar değişmektedir (30, 37). Omurga enfeksiyonlarının yaklaşık olarak %40'ında değişik nedenlerle bağışıklık sisteminde zayıflamaya neden olan hastalıklar görüldüğü için bu hasta grubunda immün yetmezlik oluşturabilecek farmakolojik ajan kullanımı, diabetes mellitus, alkol bağımlılığı, HIV, damar içi ilaç kullanımı, siroz, beslenme yetersizliği ve kanser etiyojisi açısından hastalar detaylı olarak değerlendirilmelidir (1, 2, 38).

2.3 Öykü, Klinik Belirti ve Bulgular

Omurga enfeksiyonlarının tanısında öykünün doğru ve ayrıntılı olarak alınması tanıda ve ayırıcı tanıda en önemli basamağı oluşturmaktadır. Öncelikle hastanın yakın zamanda geçirdiği solunum yolu ve üriner sistem enfeksiyonları sorgulanmalıdır. Hastanın hayatının herhangi bir döneminde geçirdiği brusella ve akciğer tüberkülozu enfeksiyonları nüks açısından değerlendirilmelidir. Hastanın yaşadığı bölge, sosyoekonomik koşullar, kalabalık aile yapısı ve yakın çevresinde tüberküloz öyküsü akıllara tüberkülozu getirmelidir. Süt ve süt ürünleriyle teması bulunan ve ateşli ataklar görülen hastalarda brusella enfeksiyonu akıllarda bulundurulmalıdır. Sokak köpekleri veya vahşi hayvanlarla temaslarda ekinokok araştırılmalıdır. Çiğ et tüketenlerde paraziter enfeksiyonlar akıllarda bulundurulmalıdır. Güvercin besleyenlerde ve dışkılarını gübre olarak kullananlarda kriptokok, kanalizasyon gibi rutubetli yerlerde çalışanlarda ise blastomikoz ve koksidiyomikoz enfeksiyonları akla gelmelidir (39). Klinik belirti ve bulgular etiyojik

faktöre göre değişmekle birlikte hastaların büyük kısmında travma öyküsü olmadan sinsi başlangıçlı sırt ve bel ağrısı temel bulgulardır (16, 18, 40-42). Hastaların çoğunda ağrının sinsi başlaması ve enfeksiyona özgü sistemik belirti ve bulguların (ateş gibi) başlangıçta olmaması nedeniyle tanıda gecikmeler görülür. Bu nedenle omurga enfeksiyonlarının tanısında en önemli faktör şüphelenmektir. Erken dönemlerde laboratuvar bulguları yanıltıcı olabilir, normal kan lökosit sayısı yaygın bir bulgudur. Eritrosit sedimentasyon hızında artma en sık laboratuvar bulgusu olmasına rağmen, CRP medikal tedavinin etkisini göstermede klinisyenler tarafından daha etkili olarak kullanılmaktadır (28, 43, 44). Düz radyografik incelemeler erken dönemlerde yardımcı değildir. Tanıdan şüphe edildiğinde MRG en güvenilir tanı yöntemidir (45). Akut olgularda ağrı, ateş ve spazm bulguları var iken, subakut ve kronik olgularda omurga ile ilgili belirtilere rastlanmayabilir ve hastalar göğüs, karın, kalça veya bacak ağrısı gibi atipik bulgularla doktora başvurabilirler. Ağrı hastalığın bulunduğu segmentte olup hareketle artan karakterdedir. Zamanla dinlenme ve ağrı kesicilere cevap vermeyecek düzeylere ulaşabilir. Piyojenik spondilodiskit olgularında en sık tutulum bölgesi %48-50 oranıyla lomber bölge olurken, daha sonrasında %35 ile torakal tutulum, %3-10 servikal bölge ve %5 torakolomber bileşkede tutulum raporlanmıştır (25, 26). Lomber omurga tutulumu, pozitif düz bacak kaldırma testi, ağırlık kaldırmada ağrı, lomber lordoz kaybı veya kalçada fleksiyon kontraktürü ile birlikte dir. Servikal omurga tutulumu tortikollis ve disfajiye yol açar. Collert yaptığı çalışmada nörolojik defisit görülme oranı %4-17 olarak bildirilmiştir (46). Eismont ve ark. yaptıkları çalışmada nörolojik defisit insidansının diyabet, romatoid artrit, sistemik steroid kullanımı, 50 yaş ve üst hastalar, daha üst omurga segmenti tutulumu ve S. aureus enfeksiyonlarında artış gösterdiğini bildirmişlerdir (47). Omurga enfeksiyonlarının yaklaşık olarak %40' ında değişik nedenlerle bağışıklık sisteminde zayıflamaya neden olan hastalıklar görüldüğü için bu hasta grubunda immün yetmezlik oluşturabilecek farmakolojik ajan kullanımı, diabetes mellitus, alkol bağımlılığı, HIV, damar içi ilaç kullanımı, siroz, beslenme yetersizliği ve kanser açısından detaylı olarak değerlendirilmelidir (1, 2, 38).

2.4 Enfeksiyon Etkenleri

Staphylococcus aureus, koagülaz negatif stafilokok ve *Streptococcus spp* vertebral osteomyelitte karşılaşılan en yaygın mikroorganizmalar olarak tespit edilmiştir (3, 4). *Mycobacterium tuberculosis* ve *Brucella spondylodiskit* endemik bölgelerde daha yaygındır (48, 49). İntravenöz ilaç bağımlılarında, immün sistemi baskılanmış hastalarda ve postoperatif hastalarda gram negatif aerobik bakterilerin ve *Candida spp* in neden olduğu omurga enfeksiyonları daha sık görülür (50, 51). İnsan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonu, konjenital veya iyatrojenik immün sistem yetmezliği olan hastalar, *Mycobacterium avium* kompleksi ile tüberküloz dışı mikobakterilerin neden olduğu vertebral osteomyelit vakalarında artış rapor edilmektedir (52).

Tablo I. Spinal Enfeksiyonlarda Etken Olan Mikroorganizmalar*(17)

Sık Görülen Etkenler > % 50	• <i>Staphylococcus aureus</i> • Koagülaz negatif stafilokok	
Orta Sıklıkla Görülen Etkenler > % 25	• <i>Streptococci</i> • <i>Pseudomonas spp.</i> • <i>Proteus spp.</i> • <i>Serratia spp.</i>	• <i>Enterococci</i> • <i>Enterobacter spp.</i> • <i>Escherichia coli</i> • Anaeroblar (<i>Clostridium spp.</i>, <i>Bacteroides flagilis</i>, <i>Peptostreptococcus spp.</i>)
Nadir Görülen Etkenler < % 5	• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> • <i>Candida spp.</i> • <i>Mycoplasma spp.</i> • <i>Brucella spp.</i> • <i>Actinomyces</i>	• <i>Mycobacterium avium complex</i> • Dimorfik mantarlar • <i>Aspergillus spp.</i> • <i>Tropheryma whipplei</i> • <i>Salmonella spp.</i>

*Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th Ed., Elsevier Saunders, Philadelphia 2015 basımından uyarlanmıştır (53).

Tablo II. Vertebra Enfeksiyonlarında Predispozan Faktörlere Göre Patojenlerin Sınıflandırılması*(54)

Klasifikasyon	Patojen
Hematojen vertebra osteomyeliti	S.aureus, S.viridans, gram negatif basil
Spontan çocukluk diskiti	S.aureus
Spinal kanal enfeksiyonları	S.aureus, Streptococcus spp.
Yumuşak doku enfeksiyonları	S.aureus, Mycobacterium spp
Predispozan faktörler (diabet, neoplaziler)	S. agalactia, Grup B Streptokok, gram negatif basil
Üriner sistem enfeksiyonu	E.coli, gram negatif basil
İmmünkomprime hasta	Aspergillus spp., cryptococcus spp, atipik mikobakteri
IV ilaç kullanıcıları	Serratia spp.
Travma	Serratia spp.
Epidural enjeksiyon	S.aureus, Pseudomonas spp
Basınç ülserleri	Polimikrobiyal enfeksiyonlar, gram negatif basil, anaeroplara
Pastörize edilmemiş süt ürünleri	Brucella spp.
Talasemi	Salmonella spp.
Endemik bölgeler	Endemik mantar, parazitler.

*Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Sekizinci Basımdan uyarlanmıştır.

2.4.1 Mrsa

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisilin kullanılmaya başlanmasından kısa bir süre sonra 1961'de tanımlanmış ve aynı dönemlerde MRSA salgınları bildirilmiştir (55, 56). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*' un toplumdaki yaygınlığı toplumla ilişkili MRSA suşlarının epidemisine bağlı olarak artmaktadır (57, 58). MRSA kolonizasyonu olan yetişkinlerde MRSA enfeksiyonu gelişme riski normal popülasyona göre % 30'a kadar daha fazladır (59). MRSA hem üçüncü basamak hem de devlet hastanelerinde cerrahi alan enfeksiyonunun önde gelen nedenidir (60, 61) MRSA bulaşmasını önlemek ve MRSA enfeksiyonlarını azaltmak amacıyla birçok hastane, MRSA kolonizasyonu için yüksek riskli hastaları tarama ve MRSA taşıyıcılarının izolasyonu olmak üzere kapsamlı MRSA kontrol programları uygulamaya koymuştur (62). MRSA enfeksiyonu olan hastalar, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) enfeksiyonu olan hastalara göre daha yüksek mortaliteye, daha uzun hastanede kalış sürelerine ve daha yüksek sağlık bakım maliyetlerine, yüksek oranlarda akut böbrek yetmezliği, hemodinamik instabilite ve uzun süreli ventilatör bağımlılığı vardır (63-65). MRSA ile kolonizasyon, invazif tıbbi veya cerrahi prosedürleri takiben stafilokok enfeksiyon riskini artırır. Hastane hastalarının taranması, bu patojen için birincil kolonizasyon bölgesi olan burun deliklerine odaklanmıştır. Bununla birlikte, bazı kişilerde sadece boğazda MRSA kolonizasyonu vardır, bu nedenle rutin burun taramasında bu göz ardı edilir. Mertz ve arkadaşlarının 2009 yılında 3464 İsviçreli hastayı içeren bir çalışmada, katılımcıların %48'inin *S. aureus* taşıyıcısı olduğu ve bunların da %12'sinde özel boğaz taşıyıcılığı rapor edilmiştir (66). Penisilin bağlayıcı proteinler, hücre duvarı sentezi sırasında peptidoglikanın transpeptidasyon reaksiyonlarını katalize eden, bakteriyel membranda bulunan peptidaz enzimleridir. mecA, yarı sentetik penisilinaza dirençli beta-laktamlara direnç oluşturan uyarılabilir bir protein olan penisilin bağlayıcı protein (PBP) 2a'yı kodlar (67, 68). MecA geni, stafilokokal kromozom kaseti (SCCmec) adı verilen hareketli bir genetik element üzerinde bulunur. EUCAST(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) sınır değeri olarak, oksasilin MIC> 2 mcg / ml belirlemiştir (69). Oksasilin, metisilin artık piyasada bulunmadığı için metisilin yerini alan yarı sentetik bir penisilindir. Mec genini saptamak için sefoksitin disk difüzyon testinin kullanılması veya birkaç polimeraz zincir reaksiyonundan biri gibi diğer yöntemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Oksasilin veya metisiline dirençli izolatlar,

sefalosporinler dahil çoğu beta-laktam maddesine de dirençlidir; istisnalar arasında seftarolin ve seftobiprol bulunur.

2.5 Tanı Yöntemleri

2.5.1 Laboratuvar Testleri

Omurga enfeksiyonlarda gecikmiş veya yanlış tanı, tedavinin önündeki en büyük engellerdir. Ateş öyküsü olan hastalarda mutlaka kan kültürü alınmalıdır. Bakteriyolojik tanı elde etmenin en hızlı ve en az invaziv yöntemi olan kan kültüründe etken organizmanın %34-70 oranında üretildiği literatürde belirtilmiştir (19, 70). Tanı konulabilmesi için ultrason veya BT eşliğinde perkütan biyopsiyle doku kültürü yapmak altın standart olmakla birlikte doku kültüründe bile etken izole edilemeyebilir. Hastalar septik veya kritik derecede hasta olmadığı sürece uygun kültürler yapıncaya kadar antibiyotik tedavisine başlanmaması daha anlamlıdır (71). Etken izolasyonu için aerobik, anaerobik, mantar ve tüberküloz kültürleri yapılmalıdır. Yavaş üreyen mikroorganizmalar açısından 10 gün kültür takibi yapılmalıdır. Alınan biyopsi örnekleri mutlaka Gram ve EZN (Erich Ziehl Neelsen) boyama, patolojik ve histolojik inceleme için laboratuvar testleri yapılmalıdır.

Thurnher ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada tanıda ortalama 2,6 ay gecikildiğini ve %33,7 oranında yanlış tanı alındığını belirtmişlerdir (72). 2008 yılında yayımlanan, 14 çalışma ve 1008 piyozjenik vertebra osteomyelit hastasını içeren bir derlemede BT eşliğinde veya açık biyopsi yoluyla mikroorganizmayı izole etmenin kan kültüründen daha anlamlı olduğu belirtilmiştir (42).

Eritrosit sedimentasyon hızında artma en sık laboratuvar bulgusu olmasına rağmen, CRP seviyesi özellikle medikal tedavinin etkisini göstermede klinisyenler tarafından daha etkili olarak kullanılmaktadır (22, 28, 44, 73). CRP düzeyinin haftalık %50 düşmesi tedavi açısından olumlu bir göstergedir (22).

Biyopsi, esas olarak kan kültürü negatif olan hastalarda endikedir. Osteomyelit tanısında ve etken ajanın gösterilmesinde altın standart BT eşliğinde biyopsi ve kültürler

ile histopatolojik ve mikrobiyolojik incelemeler olup %70-%90 oranında pozitif sonuç bildirilmiştir (74-76).

2.5.2 Direkt Grafi

Belirsiz spinal semptomları olan hastalarda ilgili spinal segmentin konvansiyonel radyolojik görüntülemesi birinci basamak görüntüleme araştırmasıdır; duyarlılığı %82 ve özgüllüğü %57'de olarak değerlendirilmiştir (77). Lokalize osteopeni ve disk aralığında daralma düz radyografilerde görülen en erken bulgulardır. Enfeksiyon başlangıcından ancak 2-8 hafta sonra direkt grafide görülebilecek düzeyde yaklaşık %35-40 kemik yıkımı ortaya çıkar. Ayrıca trabeküler kemikte %50'nin üzerinde kayıp olduğunda direkt grafide ile lezyon tanımlanabilir. Bu süreç altı ay sürebilir (42, 78). Paravertebral yumuşak doku gölgeleri apse oluşumu hakkında bilgi verebilir. Gaz oluşturan mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonlarda disk aralığında gaz görüntüsü olabilir. İlerleyen dönemlerde çökme, kifoz ve instabilite görülebilir. Reaktif skleroz çözünürlüğü gösterir ve olguların yaklaşık yarısında spontan füzyon ile sonuçlanır. Direkt grafide bulgu olmaması spondilodiskiti dışlamaz, ancak yine de hastalığın ilerlemesini değerlendirmek için önemlidir.

2.5.3 Bilgisayarlı Tomografi

BT, MRG uyumsuz kalp pilleri ve hastaya özgü faktörlere bağlı olarak MRG' nin kontrendike olduğu durumda alternatif olarak sıklıkla kullanılır. Paravertebral apse kontrastlı BT ile MRG' den daha iyi gösterilebilir. Ayrıca BT; ince iğne biyopsisini veya apse drenajının yerleştirilmesini kolaylaştırır (79, 80). BT, kemik destrüksiyonu ve sekestrumun lokalizasyonunu saptamada faydalıdır (45).

2.5.4 Manyetik Rezonans Görüntüleme

MRG yumuşak dokuları, nöral yapıları, erken enfeksiyonu, hastalığın spinal yayılımını ve apse formasyonunu göstermede üstünlüğü nedeniyle tercih edilir(45). MRG, spondilodiskiti saptamak için görüntüleme çalışmalarında altın standarttır ve bir kontrast ajan eklenmesi, spondilodiskit, dejenerasyon (Modic tip I) veya neoplazi (81, 82) için

şüpheli bulgular arasında bir ayırım yapılmasını sağlar. Özgüllük %96 ve duyarlılık %92 ile oldukça yüksektir(81, 83, 84). Gadolinyumla güçlendirilmiş MRG, duyarlılığı %95,4'e kadar artırabilir(85).

Kontrast madde olmaksızın alınan T1 ve T2 ağırlıklı görüntüler, epidural mesafedeki inflamatuvar kitlenin saptanmasında yetersizdir. Çünkü beyin omurilik sıvısı ve inflamatuvar doku benzer sinyal intensitesindedir. Epidural enfeksiyonun varlığı ve gerçek uzanımı ancak intravenöz kontrast madde enjeksiyonu sonrası gösterilebilmektedir. Kontrast madde tutulumu PSD' de tipiktir ve henüz ödeme bağlı sinyal değişiklikleri oluşmamışsa bile pozitif olabilir (86-89).

MRG' de akut enfeksiyonda kemik iliği ödemeine bağlı olarak sıvı sinyal artışı ve buna bağlı olarak T1 ağırlıklı imajlarda sinyal azalması, T2 ağırlıklı imajlarda sinyal artışı izlenmektedir (78, 90-92). Vertebral cisim çökmesi ve kemik sklerozunda da PSD ile benzer karakterde sinyal değişiklikleri izlenebilir. Kontrast tutulumunun enfeksiyonda tipik olması ile ayırım yapılabilir (86, 89). MRG' de kontrast sonrası görüntülerde PSD' de vertebra ve disklerde homojen kontrast tutulumu izlenirken; tüberküloz PSD' den daha heterojen kontrast tutulumu gösterir(78, 93).

MRG' de, erken iyileşme bulguları; inflamatuvar yumuşak dokudaki kalınlığın azalması ve kontrast tutulumunda azalma olarak belirtilmektedir. Kontrast tutulumunun olmaması ve normal sinyal paterni iyileşmenin tamamlandığının bulgularıdır (89-91). Disk mesafesi çoğunlukla kalıcı olarak daralır (94, 95).

Vertebraları tutan enfeksiyon ve tümörlerin de ayrımının yapılması gerekmektedir. T2 ağırlıklı görüntülerde, özellikle solid içerikli metastazlarda izlenen sinyal, beyin omurilik sıvısı sinyaline oranla daha düşükken enfeksiyöz durumlarda daha yüksektir. Tümörlerde genellikle disk korunsa da multipl miyelom, lenfoma, kordoma, eozinofilik granülom, anevrizmal kemik kisti ve dev hücreli tümörlerde disk tutulumu görülebilir (78, 86, 87, 89, 90).

Tüm bu durumların göz önüne alındığı vertebral kemik iliği incelemelerinde kullanılan standart MR protokollerinde, T1 ağırlıklı ve yağ baskılı T2 ağırlıklı hızlı SE ya

da hızlı STIR sekanslar mutlaka bulunmalıdır. Lezyona yönelik en az iki ortagonal düzeyde görüntü alınmalıdır. Gerekğinde kontrastlı inceleme de eklenmelidir (96-99).

2.5.5 Nükleer Görüntüleme Yöntemleri

Flor-18 florodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi / BT (18F-FDG-PET-BT), onkoloji ve bulaşıcı hastalıklarda iyi bilinen bir prosedürdür ve spondilodiskit tanısında giderek daha önemli bir rol oynadığı görülmektedir (84, 85).

PET-BT, özellikle kontrastlı MRG/BT' nin böbrek yetmezliği gibi kontrendikasyonlarında iyi bir alternatiftir. Bununla birlikte, pahalı bir teknik olması ve sadece belirli merkezlerde yapılabilmesi en önemli sınırlayıcılarıdır. Fizyolojik olarak, uygun şekilde işaretlenmiş glikoz kemik iliğinde ve omurgada birikmez, öyle ki artmış glikoz aktivitesi olan iltihaplanma süreçleri PET-BT' de "sıcak noktalar" olarak görünür.

Yapılan bazı çalışmalarda MRG' nin PET-BT' ye eşdeğer olduğunu ancak hastalığın başlangıcını izleyen ilk 2 haftada PET-BT' nin az da olsa avantajlar sağladığını, sonraki dönemlerde anlamlı fark olmadığı belirtilmiştir(100-102).

Son çalışmalar, PET-BT' nin dejeneratif (Modic tip I) ve inflamatuvar değişiklikler arasındaki ayrımında MRG' ye üstünlüğü gösterilmiştir (103-105). Bununla birlikte, PET-BT' nin neoplazi, spondilodiskit ve travma sonrası kemik iliği ödemi arasında ayrım yapma özgülüğünün olmaması önemli bir dezavantajdır (106, 107). Bu nedenle MRG ile kombinasyonu önerilir. Öte yandan PET-CT, metal implantlar ve MRG uyumlu olmayan kalp pillerinden bağımsız olarak tüm hastalarda uygulanabilme avantajını sunmaktadır.

2.6 Omurga Enfeksiyonlarında Tedavi

2.6.1 Medikal Tedavi

Osteomyelit tanı, patofizyoloji ve klinik olarak heterojen bir spektrumu bulunan tedavisi zor bir hastalıktır. Tedavide amaç enfeksiyonun elimine edilmesi ve fonksiyonların geri kazanılmasıdır. Klinik semptom ve bulguların hafif olduğu ve cerrahi riski yüksek olan olgularda, immobilizasyon ve sistemik antibiyotik uygulaması ile konservatif tedavi piyojenik spondilit için ilk tedavi seçeneğidir (108).

Enfeksiyonun erken evresinde akut ağrı düzelene kadar yatak istirahatine devam edilmelidir. Ancak özellikle yaşlı hastalarda pnömoni, demans, dekübitus, ülserasyon, derin ven trombozu ve pulmoner emboli gibi yatak istirahatinin neden olabileceği komplikasyonlara dikkat edilmelidir. Hastaların daha sonra omurga hareketlerini en aza indirmek için uygun bir korse 3 ile 4 ay kadar takılmalıdır (109). Harici immobilizasyon, omurgayı stabilize etmeye, ağrıyı azaltmaya ve deformiteyi ve nörolojik bozulmayı önlemeye yardımcı olur (74).

Lomber diskler, yetişkin vücudundaki en büyük avasküler yapılardır ve pasif difüzyon, antibiyotikler de dahil olmak üzere tüm moleküllerin merkezi bölgelere verilmesi için kritiktir (110). Nükleus pulpozusdaki yüksek miktarlardaki glikozaminoglikan konsantrasyonu nedeniyle yüksek yoğunlukta negatif yük oluşturur. Sonuç olarak, negatif yüklü moleküllerin diske dış anülüsün damarlarından difüzyon yoluyla girme olasılığı daha yüksektir, pozitif yüklü moleküller uç plakayı çevreleyen kan damarlarından geçer ve yüksüz çözünen maddeler diske her iki yoldan da girecektir (111).

Optimal antibiyotik tedavisi süresi iyi tanımlanmamıştır, birkaç çalışma altı ila sekiz haftalık intravenöz tedavi önermektedir ve diğerleri sadece dört hafta önermektedir. Dört haftadan daha kısa süreli antibiyotik tedavisi, kabul edilemeyecek kadar yüksek rekürrens oranına neden olabilir (112).

Tablo III. Piyojenik Spinal Enfeksiyonlarda Sık Görülen Enfeksiyonlar ve Tedavi Seçenekleri (113)

Mikroorganizma	İlk Seçenek	Alternatif	Tedavi Süresi(hafta)
Metisilin Duyarlı <i>S. Aerus</i> (MRSA)	1. Kuşak sefalosporin, Ampisilin/Sulbaktam 600 mg PO 4x1	Vankomisin 15mg/kg IV, 2x1 Daptomisin 6- 8 mg/kg 1x1 IV Linezolid 600 mg 2x1 PO/IV Levofloksasin 500-750 mg 1x1+Rifampisin 600 mg 1x1 PO Klindamisin 600-900 mg IV 3x1	4-6
Metisilin Dirençli <i>S. Aerus</i> (MRSA)	Vankomisin 15mg/kg IV, 2x1	Daptomisin 6- 8 mg/kg 1x1 IV Linezolid 600 mg 2x1 PO/IV Levofloksasin 500-750 mg 1x1+Rifampisin 600 mg 1x1 PO	6
<i>Enterococcus spp.</i> penisilin duyarlı	Penisilin G 20-24 milyon ünite/24 saat IV 1x1 Ampisilin sodyum 12 gr IV 1x1	Vankomisin 15mg/kg IV, 2x1 Daptomisin 6- 8 mg/kg 1x1 IV Linezolid 600 mg 2x1 PO/IV	4-6
<i>Enterococcus spp.</i> penisilin Dirençli	Vankomisin 15mg/kg IV, 2x1	Daptomisin 6- 8 mg/kg 1x1 IV Linezolid 600 mg 2x1 PO/IV	4-6
<i>Pseudomonas</i> <i>Aeruginosa</i>	Sefepim 2 gr 3x1 IV Meropenem 1 gr 3x1 IV	Siprofloksasin 750 mg 2x1 po veya 400 3x1 IV Seftazidim 2 gr 3x1 IV	6
<i>Beta Hemolitik</i> <i>Streptokok</i>	Penisilin G 20-24 milyon ünite/24 saat IV 1x1, Seftriakson 2gr 1x1 IV	Vankomisin 15mg/kg IV, 2x1	6
<i>Salmonella spp.</i>	Siprofloksasin 750 mg 2x1 po veya 400 3x1 IV	Seftriakson 2gr 1x1 IV	6- 8

2.6.1.1 Antibiyoterapi

Vertebral osteomyelitin medikal tedavisinde oral ve parenteral tedaviler kullanılmaktadır. Beta laktam grubu antibiyotikler ve vankomisin spondilodiskit tedavisinde en sık tercih edilen kemoterapötiklerdir. Sefalosporinler ve penisilinaze dirençli penisilinler, düşük yan etki profili ve stafilokoklar dahil olmak üzere diğer spondilodiskit etkenlerine karşı etkili olmaları sayesinde tedavide kullanılmaktadırlar (114). Vankomisin, MRSA ve ampisilin dirençli enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Vankomisin tedavisinin dezavantajları arasında, ilacın kemik dokulara geçişinin çok iyi olmaması, MRSA enfeksiyonlarında vankomisin MİK değerinde artış ihtimalinin olması ve vancomisinle tedavi edilen olgularda nüks gelişebilme ihtimali bulunmaktadır (115). Oral ve parenteral kullanımı mevcut olan ve oral biyoyararlanımı yüksek olan linezolid, stafilokoklar, streptokoklar ve vancomisin dirençli enterokoklara bağlı spondilodiskit tedavisinde tercih edilmektedir (116). Linkozamid grubu olan klindamisin yüksek oral biyoyararlanımı olan ve gram pozitif etkinliği bulunan bir antibiyotiktir. Gram negatif mikroorganizmalara bağlı vertebral osteomyelitlerde siprofloksasin tedavisinde %64-90 arasında etkinlik gösterilmiştir (117, 118). Nüks genellikle 6 ay içinde görülebilmekle birlikte nadiren antibiyotik tedavisinin tamamlanmasından 1 yıl sonrasında bile ortaya çıkabilir. Antibiyotik döneminde piyogenik spondilit için tedavi edilen hastaların %1-22'sinde nüks görülmüştür (108). Organizma belirsiz kalırsa, birinci nesil sefalosporin veya penisilini içeren ampirik antibiyotikler genellikle yaygın enfektif organizmaları, yani stafilokok ve streptokokları kapsamak için kullanılır. Antibiyotik seçimi, sonraki bakteri kültürü sonuçlarına göre ayarlanır. Mikrobiyologlara danışmak, antibiyotik kapsamını optimize etmek ve olası bakteriyemi kaynaklarını belirlemek için önemlidir. Uygun olmayan antibiyotik kullanımı, hastanede kalış sürelerinin uzamasına ve maliyetlerin artmasına neden olabilir ve ayrıca hastanın prognozu üzerinde olumsuz sonuçlara yol açabilir.

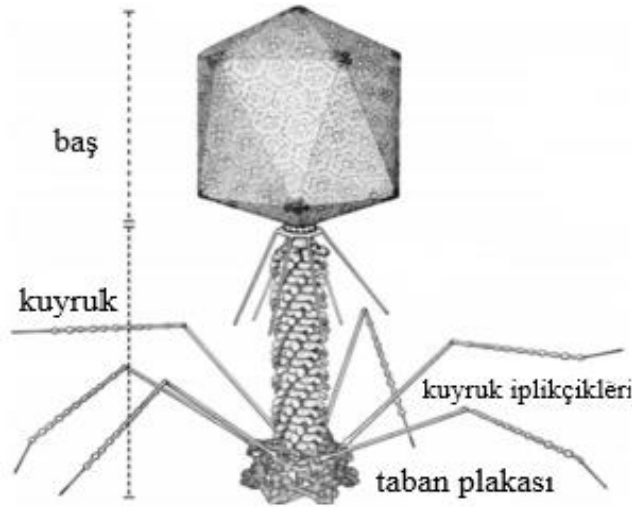
2.6.1.2 Faj Terapi

Faj terapi insanlardaki enfeksiyonları tedavi etmek için Orta Doğu, Asya ve özellikle Rusya, Polonya ve Gürcistan gibi Doğu Avrupa ülkelerinde klinik olarak

kullanılmıştır (119, 120). Biyosferdeki en yaygın virüs olan fajlar, bakterilerin var olabileceği tüm ortamlardan kolaylıkla bulunabilir ve izole edilebilirler (121, 122)

İnsanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde en ölümcül ve yaşamı tehdit eden bakteriyel hastalıkların ve komplikasyonların tedavisinde de kullanılabilirler (123, 124) Bununla birlikte, deneysel olarak enfekte olmuş hayvanlarda (5, 125) net başarılar elde edilmiştir ve matematiksel modelleme fizibilite beklentilerini desteklemektedir (126).

Litik bakteriyofajın bakterileri hedef alma ve öldürme yeteneği, enfeksiyon bölgesinde çoğalabilmeleri ve konak florası üzerinde hiçbir etkisi olmadan yalnızca belirli bakterileri hedefleyebilecekleri ve konakçıları ortadan kalktığında da yavaş yavaş ortadan kaybolması, antibiyotiğe dirençli suşlarda biyofilmler üzerinde bir etkiye sahip olması potansiyel avantajları olarak görülmektedir (124, 127-129).

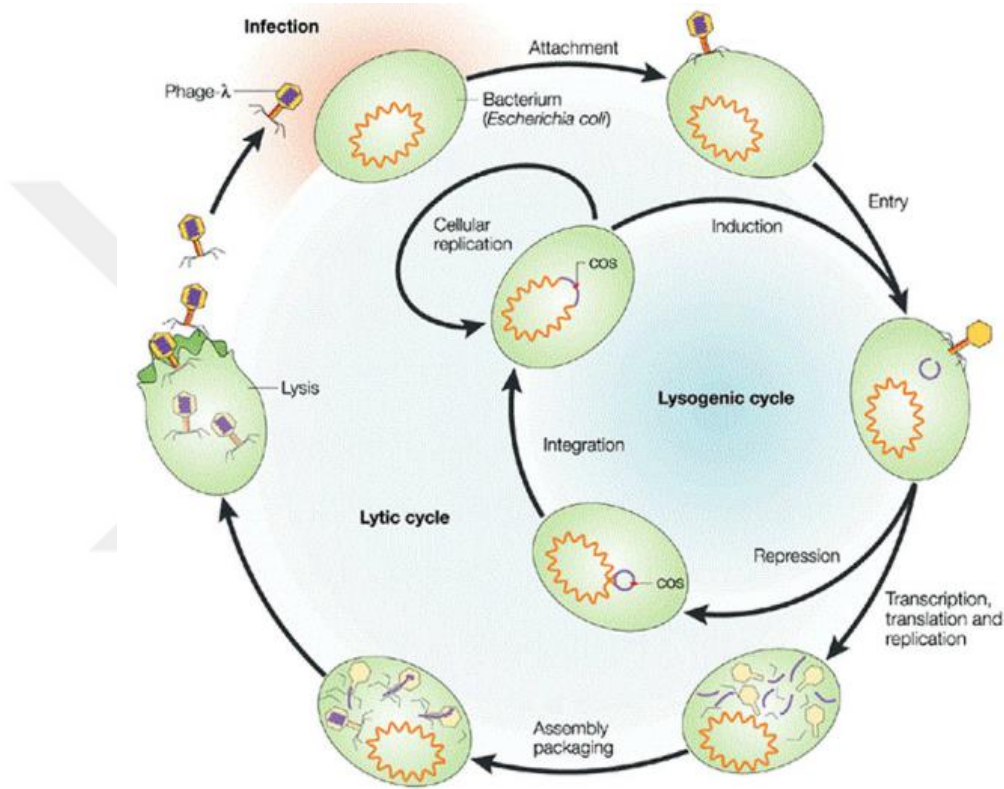


Şekil 2. Tipik bir bakteriyofajın yapısı

Tipik bir bakteriyofaj, kurbağa yavrusu şeklinde olup, nükleik asidi çevreleyen bir kafa, bir taban plakası ve kuyruk lifine sahip bir kuyruktan oluşur. Yap ve ark. çalışmasından alınmıştır (130).

Bakteriyofajlar bazı istisnalar dışında kapsid ve / veya kuyruktan oluşur (131). Kapsid genetik materyali, DNA'yı veya RNA'yı kapsar ve korur (132). Bakteriyofajların boyutları 24 ila 400 nm arasında değişir (133). Kapsid, enzimlerin genetik materyalden yararlanmasını engellediği için önemlidir (134). Kuyruklar bir

konektör aracılığıyla faj kapsidine tutturulur. Bakteriyel suşu tanımanın diğer rolleriyle birlikte, konektör, genetik materyalin konakçı hücreye aktarılmasına yardımcı olur (135). Konektör, bakteri hücre duvarını parçalayan ve genetik materyali kapsidden konakçı bakteriye aktarmanın yolunu açan birkaç proteinden oluşan altıgen, hetero-oligomerdir (136, 137)



Şekil 3. Lambda (λ) bakteriyofaj üremesinin litik ve lizojenik döngüleri (8)

Şekil 2’de lambda (λ) fajlarının litik ve lizojenik olmak üzere iki tür yaşam döngüsü gösterilmiştir (8). Litik durumda, faj konakçı hücreye bağlanır ve nükleik asidini enjekte eder. Daha sonra transkripsiyon, translasyon ve replikasyon meydana gelir ve ardından faj paketlenir. Sonuç olarak konakçı hücre, artan fajların uyguladığı basınca bağlı olarak yırtılır. Öte yandan lizojenik yaşam döngüsünde, faj nükleik asidi giriş yaptıktan sonra bakteri kromozomuna entegre olur. Faj ile entegre olan DNA profaj olarak adlandırılır. Uyur halde bulunan lizojenik profajlar ile birlikte sonsuza kadar çoğalabilir ancak radyasyon veya bazı kimyasalların varlığı gibi belirli

çevresel uyaranlara yanıt olarak bakteri genomundan çıkarılırsa, virülan forma geri dönebilir ve litik döngüyü başlatabilir.

Yapılan bazı çalışmalarda bir bakteriyofaj kokteyli (138, 139) ve bakteriyofajın bir antibiyotikle (140) kombinasyon halinde kullanılması biyofilm üretimini azaltır. Bu avantajlara rağmen fajlar, sürekli değişen dinamik yapıları nedeniyle hala antimikrobiyal ajanlar olarak rutin olarak kullanılmamaktadırlar. Bazıları toksinler gibi istenmeyen genleri edinebilir, bakteriyel genleri bakteriler arasında transdüksiyon ile transfer edebilir ve potansiyel olarak insan bağışıklık sistemi ile etkileşime girebilirler (127, 141).

Güvenli bir terapötik fırsat olarak faj terapisinin potansiyeli göz önünde bulundurulduğunda (9, 10), istenmeyen faj konakçı etkileşimine veya kodlanmasına dahil olabileceklerinden, yeni virülans faktörlerinin ve gen ürünlerinin işlevini anlamak için faj genomlarının daha fazla araştırılması önemlidir (142).

2.6.2 Cerrahi Tedavisi

Omurga enfeksiyonunda cerrahi bir şekilde tedavinin olması için cerrahi ve anestezi tekniklerin gelişmesi beklenmiştir. 1911 yılına gelindiğinde birbirinden bağımsız olarak Hibbs ve Albee omurgaya bağlı tüberküloz hastalıklarında posterior spinal füzyon teknikleri geliştirmişlerdi (143, 144). Dr. Hibbs tüberkülozlu dizlere gerçekleştirdiği artrodezlerden esinlenerek posterior spinal füzyonu tanımladığı tarihlerde Dr. Albee ise; hastanın tibiasından aldığı greft ile posterior spinal füzyon uygulamıştır (143, 144).

Kemoterapötiklerin tedavide kullanılmaya başlanmasından önce omurgayı tutan enfeksiyonlar deformite, nörolojik defisit ve %25-75 arasında değişen oranlarda mortalite ve eşlik eden ciddi morbidite nedeni olan bir hastalık olarak görülmekteydi (145).

Kemoterapötiklerin gelişmesiyle birlikte cerrahi uygulamalar daha cesur bir şekilde uygulamaya başlandı. 1950'li yılların sonunda bugün bile hastalığın cerrahi tedavisinde altın standart olarak görülen soğuk apsenin drenaj ve debritleme prosedürü, Hodgson ve ekibi tarafından Hong Kong'da tanımlanmıştır (145, 146).

Enfeksiyon omurganın önünde vertebra cisminde yer aldığından, anteriordan gerçekleşen ve trikortikal greftlerle desteklenen anterior füzyon cerrahisi Hong Kong prosedürü olarak literatürde yerini almıştır (145, 146).

Yapılan çalışmalarda hastaların çoğunluğunun medikal tedavi ve istirahatle düzeldiğini ve çok az sayıda hastada cerrahi tedaviye ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir (18, 108, 147).

Hastalığın cerrahi tedavisinde ideal cerrahi için literatürde farklı yorumlar olmakla birlikte tedavide enfekte dokunun tamamen debride edilmesi, yeterli doku iyileşmesi için kanlanmanın sağlanması ve spinal stabilizasyon tedavi için olmazsa olmazlardır.

Nörolojik defisit varlığı, epidural apse ve ilerleyici nörolojik defisit, uzun süreli medikal tedaviye rağmen düzelmeyen antibiyotik tedavisine dirençli olgular, disk aralığında ve vertebra cisminde belirgin destrüksiyonu, yapısal instabilite ve spinal deformite gelişmesi cerrahi tedavi endikasyonları arasında yer almaktadır (42, 47, 148).

Günümüzde, enfekte kemiğin radikal eksizyonu ve rijit internal fiksasyon, yardımcı desteğin yeterli olması koşuluyla rutin olarak uygulanmaktadır.

Caragee, piyojenik osteomyeliti olan 17 hastada gerçekleştirilen enstrümantasyondan sonra %47 komplikasyon oranı bildirmiştir (149).

Faraj ve Webb primer omurga enfeksiyonu nedeniyle internal fiksasyon uygulanan 31 hastada enfeksiyonun tedavi edildiğini ancak 1 hastanın enfeksiyon nedeniyle öldüğünü, 1 hastada implant yetmezliği geliştiği ve 3 hastada ise daha ileri debritleme gerektiren yara yeri sorunları geliştiği bildirilmiş (150).

Krödel ve arkadaşları omurga enfeksiyonlarının tedavisinde anterior dekompresyon ve kemik grefti uygulanmasına ek olarak posterior enstrümantasyon uygulanmasının fazladan risk oluşturmadığını bildirilmiş (151).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Deneyisel olarak Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*(MRSA) etkeni kullanılarak spondilodiskit modeli oluşturulan ratlarda bakteriyofaj ve/veya antibiyotik tedavilerinin etkilerini karşılaştırmayı amaçladık.

3.2 Araştırmanın Yeri

Tüm çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunda 09 Temmuz 2020 tarihli ve 64583101/2020/034 sayılı proje olarak onaylanmıştır.

3.4 Kullanılan Deney Materyali

Bu çalışmada kullanılan ratlar Adnan Menderes Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneyisel Araştırma Merkezi'nden temin edilmiş olup çalışmada 48 adet Wistar-Albino cinsi, 12-14 haftalık dişi (250-300 g) ratlar kullanıldı. Bakım ve beslenmeleri çalışma boyunca 24° çevre sıcaklığı, %55–60 nem ve 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü şartlarında gerçekleştirildi. Kuru yem ve musluk suyuna serbest erişimi sağlandı.

3.5 Deney Grupları ve Uygulama Protokolü

Çalışmada spondilodiskit geliştiği gösterilen toplam 40 adet rat rastgele 4 gruba ayrıldı. Grup 1(Kontrol), Grup 2(Vankomisin), Grup 3(Faj), Grup 4(Vankomisin+Faj) olmak üzere gruplar adlandırıldı. (Tablo IV)

Tablo IV. Çalışma Grupları ve Uygulanan İşlemler

Çalışma Grupları	Uygulanan İşlemler
Grup 1	Kontrol grubu (Enfeksiyon olduğu gözlemlenen ratlara tedavi uygulanmayıp 28. Gün kontrol MRG görüntülemesi yapıldı)
Grup 2	Vankomisin grubu (Enfeksiyon olduğu gözlemlenen ratlara Vankomisin HCL 15 mg/kg günde 2 doz uygulandı. 28. Gün kontrol MRG görüntülemesi yapıldı.)
Grup 3	Bakteriyofaj grubu (Enfeksiyon olduğu gözlemlenen ratlara 10^{10} PFU/ml bakteriyofaj tedavisi günde 0,1 ml tek doz lokal olarak disk aralığına uygulandı. 28. Gün kontrol MRG görüntülemesi yapıldı.)
Grup 4	Bakteriyofaj + vankomisin grubu (Enfeksiyon olduğu gözlemlenen ratlara Vankomisin HCL 15 mg/kg günde 2 doz ve 10^{10} PFU/ml bakteriyofaj tedavisi günde 0,1 ml tek doz lokal olarak disk aralığına uygulandı. 28. Gün kontrol MRG görüntülemesi yapıldı.)

3.6 Tedavi Ajanlarının Hazırlanması

3.6.1 Bakteriyofaj Hazırlanması

3.6.1.1 Bakteriyofaj İzolasyonu ve Pürifikasyonu

Bakteriyofaj izolasyonu için, Aydın ilinde farklı çevrelerden toplanan hayvan dışkı örnekleri ve atık su örnekleri kullanıldı. Hayvan dışkı örnekleri (1 g), SM (Saline-Magnesium) faj tamponu: 5,8 g/L NaCl, 2 g/L MgSO₄ 7H₂ O, 50 ml/L 1 M Tris-HCl, 5 ml/L %2'lik Jelatin solüsyonu) buffer ile sulandırılıp homojenize edilerek, atık su örnekleri (20 ml) ise direkt olarak santrifüj edildikten (4°C, 5.000 rpm'de 10 dk) sonra 0,2 µm' lik filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirildi. İçerisinde faj olduğu düşünülen filtratlar eşit miktarda (5'er ml) 50 mL' lik steril falkon tüp içerisinde birleştirildi ve litik bakteriyofajların saflaştırılmasında bakteriyofaj kaynağı olarak kullanıldı. Enfeksiyon etkeni olarak kullanılan klinik suş koleksiyonumuzdan metisilin dirençli *Staphylococcus Aureus* ADU26 suşu konak olarak kullanıldı. Ayrıca bakteriyofaj üremesini indüklemesi nedeniyle çalışma boyunca kullanılan besiyerleri (alt katı agar ve üst yumuşak agar) hazırlanırken, içerisine son konsantrasyonu 0.01M olacak şekilde CaCl₂ eklendi.

Litik bakteriyofajların pürifikasyonu için ikili agar kaplama yöntemi kullanıldı (152). Bunun için, faj kaynağından SM (saline–magnezyum) buffer yardımıyla seri dilüsyonlar hazırlandı. Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra her dilüsyondan 200 µl, 5 ml yumuşak agara (LB Broth 20 g/L, Bakteriyolojik Agar 5 g/L) eklendi ve sonra hızlıca 100 µl TSB (Tryptic Soy Broth) içerisinde 37°C'de 18-24 saat boyunca çoğaltılmış konak bakteri eklenerek vortekslendi. Karışım yüzeyi kurumuş dip agara (LB Broth 20 g/L, Bakteriyolojik Agar 15 g/L) döküldü ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu işlem her dilüsyon için tekrarlandı. Kuruyan plaklar ters çevrilerek 18-24 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tek plak oluşumu gözlenen bir petriden 4 adet faj plağı (morfolojileri farklı olduğu düşünülen) seçildi. Seçilen plaklar steril kesik pipet ucu yardımıyla kesilip, steril tüpler içerisine alındı. Daha sonra bu tüplere 5 ml TSB eklenip iyice karıştırılarak fajların besiyerine geçmesi sağlandı ve gecelik indikatör bakteri kültüründen 0.5 ml, adsorpsiyon için aynı tüpe eklendi. 37°C'de 18-24 saat inkübasyonun ardından konak hücre artıklarını uzaklaştırmak için 4°C, 5.000 rpm de 10 dk'lık santrifüj işlemi uygulandı. Bu işlemler her bir bakteriyofaj için 3 kez tekrarlanarak fajların purifikasyonu tamamlandı ve faj stoku olarak kullanıldı.

3.6.1.2 Titrelelerin Belirlenmesi ve Faj Kokteylinin Hazırlanışı

Plak izolasyonu sonucu saflaştırılan 4 adet fajın (S1, S2, S3, S4) titreleri, daha önce açıklanan ikili agar kaplama yöntemiyle belirlendi. Titreleleri belirlenen yüksek titrelili faj stoklarının ($>10^{10}$ pfu/ml) her biri, SM (saline–magnezyum) buffer yardımıyla 10^{10} pfu/ml olacak şekilde dilüe edildi. Dilüe edilen faj filtratlarının her biri eşit hacimlerde (10’ar ml) karıştırılarak 50 mL’lik steril falkon tüp içerisine aktarıldı ve sonraki çalışmalarda faj kokteyli olarak kullanılmak üzere 4°C’de muhafaza edildi.

3.6.1.3 Bakteri Kültürünün Hazırlanması

Enfeksiyon modeli oluşturmak klinik suş koleksiyonumuzdan metisilin dirençli *Staphylococcus Aureus* ADU26 klinik izolatu kullanıldı. -20 °C de %10’luk skim milkde saklanan stok kültür, içerisinde TSA (Tryptic Soy Agar) bulunan petriye tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı ve 37°C’de 18-24 saat aerobik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tipik bir *Staphylococcus Aureus* kolonisi seçildi ve gecelik sıvı kültür için 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth) içerisinde aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra gecelik kültürün ($\sim 10^8$ CFU/ml) pelletlenmesi amacıyla 4°C, 5.000 rpm de 10 dk’lık santrifüj işlemi uygulandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet, son konsantrasyonu $\sim 10^8$ CFU/ml olacak şekilde 0,01M PBS (Phosphate Buffered Saline, BioShop, Kanada) içerisinde çözüldü ve kullanıma hazır hale getirildi. Enfeksiyon amacıyla ratlara hazırlanan bakteri solüsyonundan 0,1ml (10^7 CFU) verildi.

3.6.2 Vankomisin Hazırlanması

İşlemden önce deneklerin kiloları ölçüldü. Kiloya uygun şekilde toz halinde Vankomisin HCL 1 ml serum fizyolojik ile sulandırıldı. 12 saat arayla 15 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak yavaş infüzyon şeklinde uygulandı.

3.7 Cerrahi Yöntem

Çalışma öncesinde ratlar 12 saat süreyle aç bırakıldı. Bu süre içinde su içmelerine izin verildi. Anestezi için intraperitoneal yoldan 90 mg/kg Ketamine hydrochloride (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg xylazine hydrochloride

(Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) uygulandı. Bu dozun 1/3' ü gerektiğinde intramuskuler olarak tekrarlandı.



Resim 1. İntraperitoneal anestezi uygulaması

İşlem, bir ısıtma lambası altında, ratlar lateral pozisyonda kuyruk proksimal bölgesinden 2 santimlik insizyonla girilip disk aralığına 0,05 ml 10^7 CFU/ml ADÜ26 MRSA etkeni inoküle edildi. Ardından katlar usulüne uygun olarak kapatıldı



Resim 2. Cerrahi insizyon ve MRSA inokülasyonu

Operasyondan 10 gün sonra MRG sistemleri kullanılarak T1 sekansında sinyal azalması ve T2 sekansında sinyal artışı ile spondilodiskit gelişimi gösterildi. Enfeksiyon olduğu gözlemlenen ratlara daha önceden planlanan gruplara göre işlemler uygulandı. 28. gün kontrol MRG yapıldı. Görüntüleme sonrasında anestezi altında ratların işaretli diskleri, alt ve üst vertebraları ve diskleri de içerecek şekilde patoloji laboratuvarında incelenmek üzere blok halinde eksize edildi. Ratlar anestezi altında servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

3.8 Dokuların Histopatolojik İncelemesi

Histopatolojik incelemeler için alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Daha sonra otomatik doku takip cihazında (Leica TP1020, Leica Microsystems, Nussloch, Germany) alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan tüm kesitler Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyandı(153). Boyamaları yapılan preparatlar, binoküler başlıklı ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelendi. Gerekli görülen olgulardan fotoğraflar çekildi. (Olympus DP12, microscopic digital camera systems, Tokyo, Japan)

3.8.1 Histopatolojik Skorlama

Disk ve vertebra örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesinde inflamasyon, ödem, damarlanmada artma, diskte mikroid dejenerasyon, diskte apse ve nekroz, komşu vertebralarda osteomyelit, kemik yıkımı incelenerek tedavi sonuçları değerlendirildi. Bakılan parameterelerin şiddetine göre en düşük 0 ile en yüksek 3 arası olmak üzere skorlama yapıldı. (0; Yok, 1; Hafif, 2; Orta, 3; Şiddetli)

3.9 Radyolojik inceleme

Sakroiliak MR incelemeleri 1,5 Tesla manyetik alan gücüne sahip MR cihazında (Achieva, Philips, Holland), sense knee coil kullanılarak gerçekleştirildi. hastalar prone pozisyonda kuyruk proksimal vertebralara hedeflenecek şekilde sekanslar alındı.

Kuyruk vertebra MR incelemede kullanılan sekanslar aşağıdaki gibiydi;

- 1- T1 ağırlıklı sekans; sagittal (TR/TE: 436/9ms, kesit kalınlığı 1mm)
- 2- T2 ağırlıklı sekans; sagittal (TR/TE:2578/100ms, kesit kalınlığı 1,2mm)
- 3- STIR (Short Tau Inversion Recovery) sekans; sagittal (TR/TE:4900/75ms, kesit kalınlığı 1,3mm)
- 4- STIR (Short Tau Inversion Recovery) sekans; Koronal (TR/TE:4900/75ms, kesit kalınlığı 1mm)

Tüm olgular, öncelikle sinyal özellikleri açısından görsel olarak değerlendirildi. Görsel değerlendirmede, iki deneyimli radyolog tarafından, lezyonların sinyal özellikleri normal vertebralara göre sinyal yoğunluklarına göre sınıflandırıldı.

3.11 İstatistiksel Analiz

Bakteri inokülasyonundan 10 gün sonrasında enfeksiyon gelişimini göstermek amacıyla yapılan ilk MRG' de grupların enfeksiyon düzeyleri arasında eşdeğerlik gösterilmesi amacıyla MRG skorlaması değerlendirilecektir.

Grupların tedavi öncesi ve sonrası MRG skorlamalarındaki değişimin ikili karşılaştırılması gösterilecektir.

Grupların tedavi yöntemleri sonrası histopatolojik skorlamalarının ikili karşılaştırılması gösterilecektir.

Deneklerin uygulanan tedavi yöntemleri sonrasında yapılan kontrol MRG skorları ile tedavi sonrası elde edilen dokuların histopatolojik skorlamaları arasındaki korelasyon değerlendirilecektir.

Araştırma verileri SPSS 25 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmanın tanımlayıcı istatistikleri için normal dağılıma uyan verilerde ortalama ve standart sapma, normal dağılıma uymayan verilerde ortanca ve minimum-maksimum kullanılarak gösterilmiştir. Araştırmada kategorik değişkenler arasında fark olup olmadığını göstermek için Ki Kare Testi kullanılmıştır. Bağımsız gruplarda sürekli değişkenlerin parametrik özellikleri taşıyanlarının karşılaştırılmasında Student-t Testi veya One Way Anova Varyans Analizi, bağımsız gruplarda sürekli değişkenlerin parametrik özellikleri taşımayanlarının karşılaştırılmasında Mann Whitney U Testi veya Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanılmıştır. Alt analiz olarak Dwass-Steel-Critchlow-Fligner ikili karşılaştırması kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için p değerinin 0,05'ten küçük olması kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Her grupta toplam 10' ar adet hayvan kullanılarak değerlendirme gerçekleştirildi.

Bakteri inokülasyonundan 10 gün sonrasında enfeksiyon gelişimini göstermek amacıyla yapılan ilk MRG' de grupların enfeksiyon düzeyleri arasında MRG skorlaması açısından anlamlı fark saptanmadı. ($p=0.552$) Bu durumda grupların enfeksiyon gelişimi açısından birbirleriyle eşdeğer olduğu görüldü.

Tedavi öncesi ve sonrası iyileşme açısından yapılan MRG skorlamalarının grup içi karşılaştırmasında tüm gruplarda anlamlı bir iyileşme saptanmıştır. ($p<0.05$) (Tablo V)

Tablo V. Tedavi öncesi ve sonrası MRG skorlarının grup içi karşılaştırılması

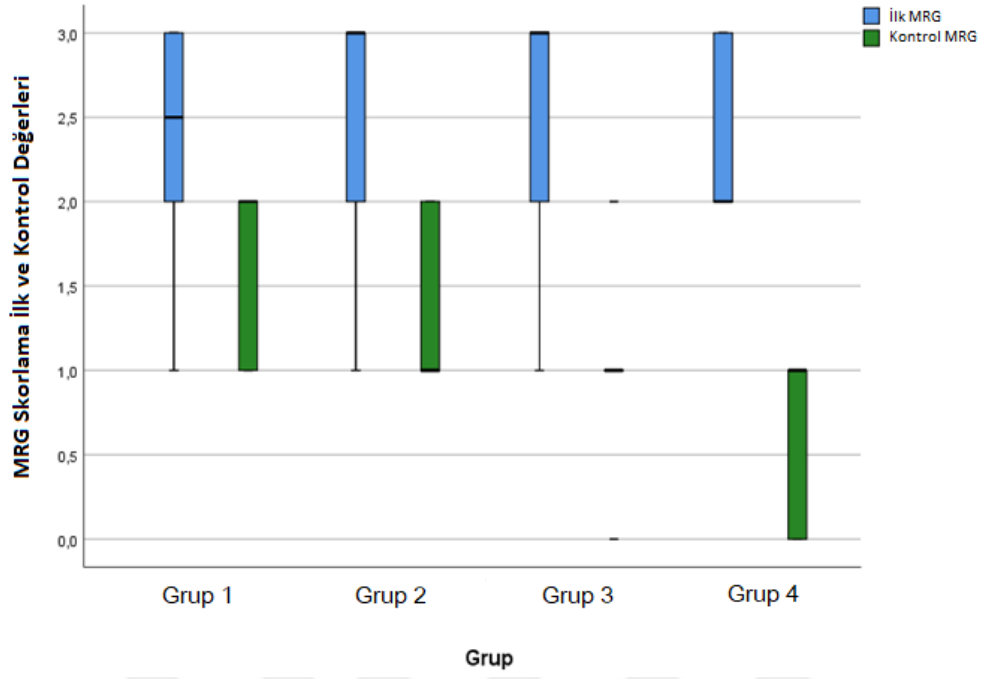
Gruplar *	n	İlk MRG (Ortanca,İKA**)	Kontrol MRG (Ortanca,İKA**)	p değeri***
Grup 1	10	2,5 (1)	2 (1)	0,011
Grup 2	10	3 (1)	1 (1)	0,006
Grup 3	10	3 (1)	1 (1)	0,004
Grup 4	10	2 (1)	1 (1)	0,005

*Grup 1(Kontrol), Grup 2(Vankomisin), Grup 3(Faj), Grup 4(Vankomisin+Faj)

**İKA: İnterkuartil Aralık

*** Wilcoxon Testine göre $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tedavi öncesi ve sonrası iyileşme açısından yapılan MRG skorlamalarının grup içi karşılaştırması Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Tedavi öncesi ve sonrası MRG skorlarının grup içi karşılaştırılması

Gruplar arasında tedavi öncesi ve sonrası MRG skorlarındaki değişimin ikili karşılaştırılmasında tedavi uygulanmayan grup 1 ile faj+vankomisin tedavi uygulanan grup 4 ($p=0.013$) ve faj terapi uygulanan grup 3 ($p=0.026$) arasında anlamlı bir fark tespit edildi. Faj+vankomisin terapi uygulanan grup 4 ile faj terapi uygulanan grup 3 arasında iyileşme açısından anlamlı bir fark görülmedi. ($p=0.972$) Vankomisin uygulanan grup 2 ile faj terapi uygulanan grup 3 ($p=0.705$), faj+vankomisin terapi uygulanan grup 4 ($p=0.469$) ve tedavi uygulanmayan grup 1 ($p=0.259$) arasında anlamlı bir fark görülmedi. (Tablo VI)

Şekil 5’ de gruplar arası karşılaştırma şekilsel olarak verilmiştir.

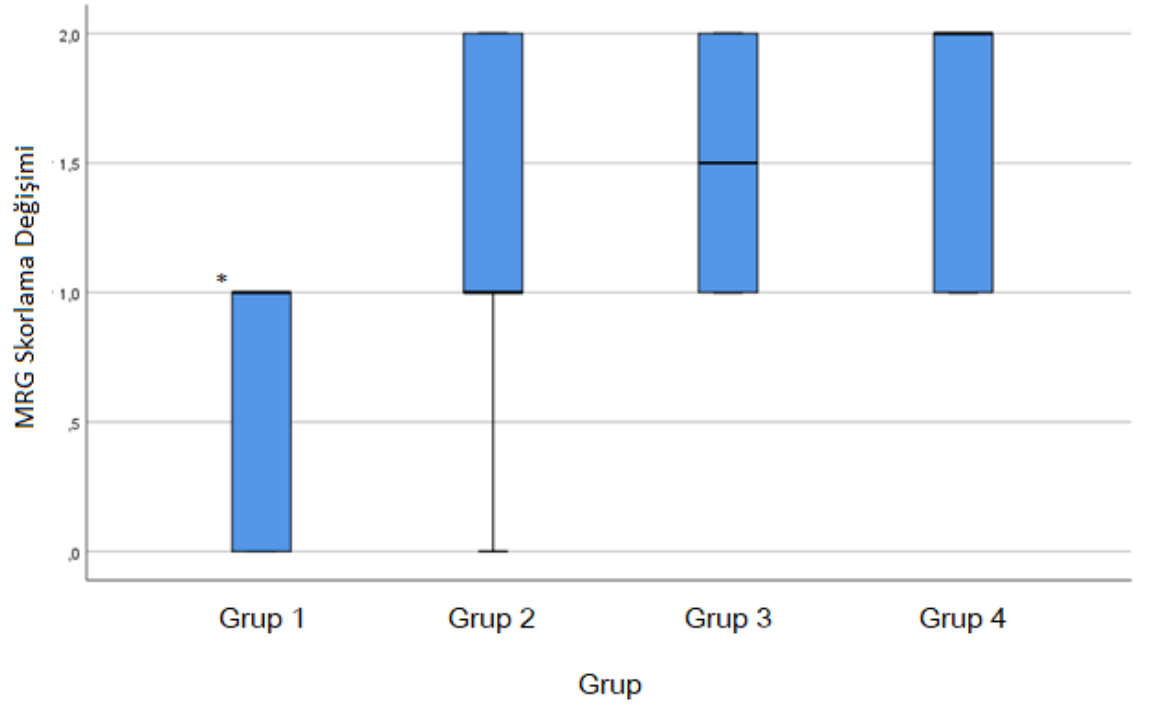
Tablo VI. Gruplar arasındaki tedavi öncesi ve sonrası MRG skorlarındaki değişimin karşılaştırılması

Gruplar*	W değeri***	P değeri**
Grup 2-Grup 1	-2.590	0.259
Grup 2-Grup 3	1.521	0.705
Grup 2-Grup 4	2.05	0.469
Grup 3-Grup 4	0.620	0.972
Grup 3-Grup 1	-3.967	0.026
Grup 4-Grup 1	-4289	0.013

*Grup 1(Kontrol), Grup 2(Vankomisin), Grup 3(Faj), Grup 4(Vankomisin+Faj)

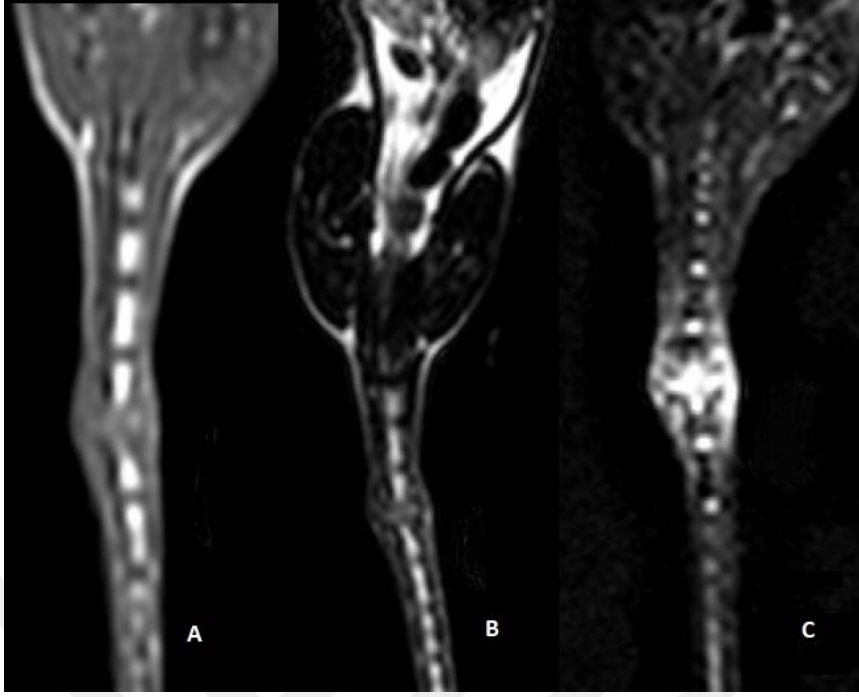
** Kruskal-Wallis testine göre $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

*** Dwass-Steel-Critchlow-Fligner ikili karşılaştırması w(wilcoxon) değeri

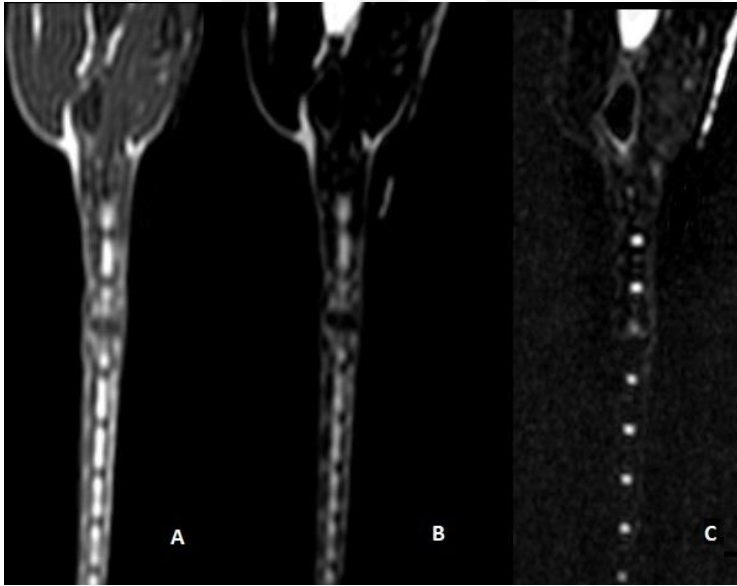


*: Grup 3 ve grup 4, grup 1' e göre anlamlı derecede farklılık gösteriyor. ($p < 0.05$)

Şekil 5. Gruplar arasındaki tedavi öncesi ve sonrası MRG skorlarındaki değişimin karşılaştırılması



Resim 3. Deneklerin enfeksiyon inokülasyonundan on gün sonrasında enfeksiyonun gösterilmesi açısından çekilen MRG tetkiki (A: T1 sekansı B: T2 sekansı C: STIR sekansı)



Resim 4. Deneklerin enfeksiyonlarının MRG ile görüntülenmesinden dört hafta sonraki kontrol MRG tetkiki (A: T1 sekansı B: T2 sekansı C: STIR sekansı)

Tablo VII.' de grupların histopatolojik skorlamalarının ortanca ve interkuartil aralıkları verildi. Tedavi protokollerinin tamamlanması sonrasında enfeksiyon düzeyini göstermek açısından yapılan histopatolojik değerlendirmede; en yüksek histopatolojik skorlama ortanca değerinin kontrol grubunda (2), vankomisin uygulanan grupta kontrol grubundan daha düşük bir ortanca değeri (1.5) olduğunu ve en düşük histopatolojik skorlama ortanca değerinin faj ve faj+vankomisin gruplarında (1) olduğu gösterildi. Protokoller sonrasında faj+vankomisin ve faj uygulanan grupların diğer gruplara göre daha çok iyileşme gösterdiği görülmüştür.

Tablo VII. Grupların Histopatolojik Skorlamalarının Ortanca ve İnterkuartil Aralık Değerleri

Gruplar*	Ortanca, (İKA)**
Grup 1	2 (0)
Grup 2	1,5 (1)
Grup 3	1 (1)
Grup 4	1(1)

*Grup 1(Kontrol), Grup 2(Vankomisin), Grup 3(Faj), Grup 4(Vankomisin+Faj)

**İKA: İnterkuartil Aralık

Tablo VIII' de grupların tedavi yöntemleri sonrası histopatolojik skorlamaların ikili karşılaştırılması gösterildi.

Yapılan ikili analizlerde faj+vankomisin tedavi uygulanan grup 4 ile tedavi uygulanmayan grup 1 arasında ($p<0.001$), faj terapi uygulanan grup 3 arasında ($p=0.049$) ve vankomisin uygulanan grup 2 ($p=0.027$) arasında iyileşme açısından anlamlı bir fark görüldü. Faj terapi uygulanan grup 3 ile tedavi uygulanmayan grup 1 arasında ($p=0.442$) ve vankomisin uygulanan grup 2 arasında ($p=0.987$), vankomisin uygulanan grup 2 ile tedavi uygulanmayan grup 1 arasında iyileşme açısından anlamlı bir fark görülmedi.

(p=0.667) Histopatolojik olarak faj+vankomisin kombine terapisinin diğer protokollere göre daha üstün olduğu gösterilmiştir.

Şekil 6’te grupların karşılaştırılması şekilsel olarak verilmiştir.

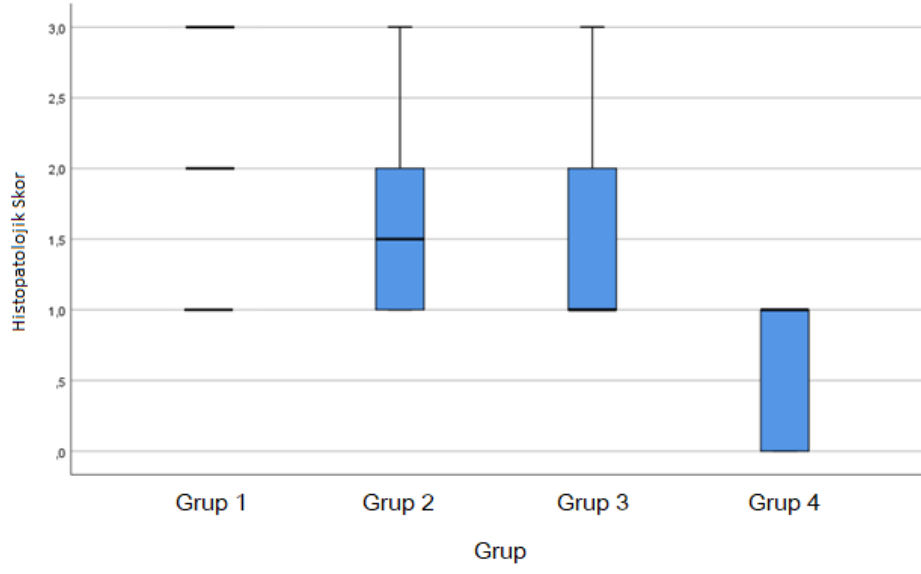
Tablo VIII. Gruplar Arasındaki Histopatolojik Skorlamalarının Karşılaştırılması

Gruplar*	W değeri***	P değeri**
Grup 2-Grup 1	1.608	0.667
Grup 2-Grup 3	-0,475	0.987
Grup 2-Grup 4	-3.939	0.027
Grup 3-Grup 4	-3.649	0.049
Grup 1-Grup 3	2.111	0.442
Grup 4-Grup 1	5.327	0.001

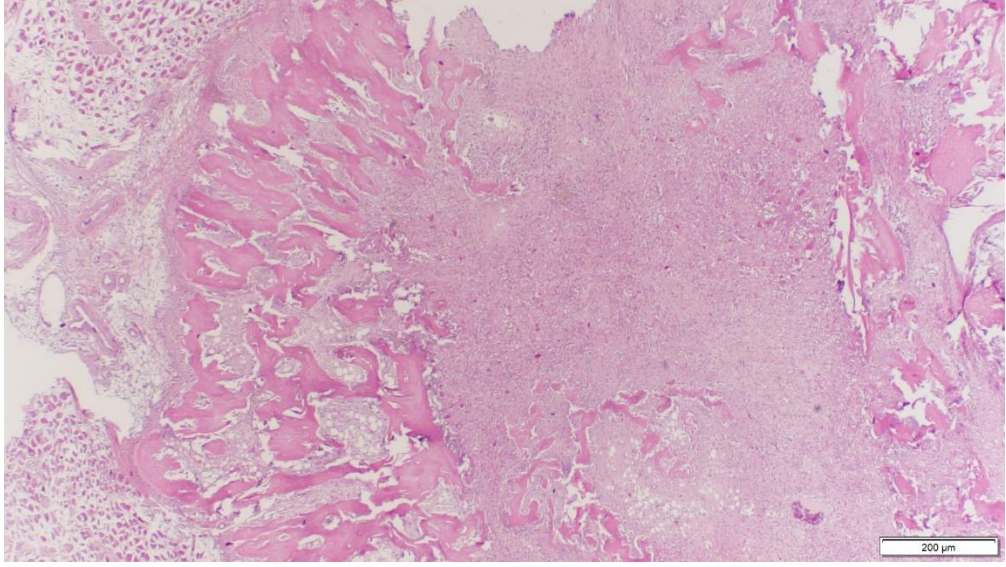
*Grup 1(Kontrol), Grup 2(Vankomisin), Grup 3(Faj), Grup 4(Vankomisin+Faj)

**Kruskal-Wallis testine göre $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

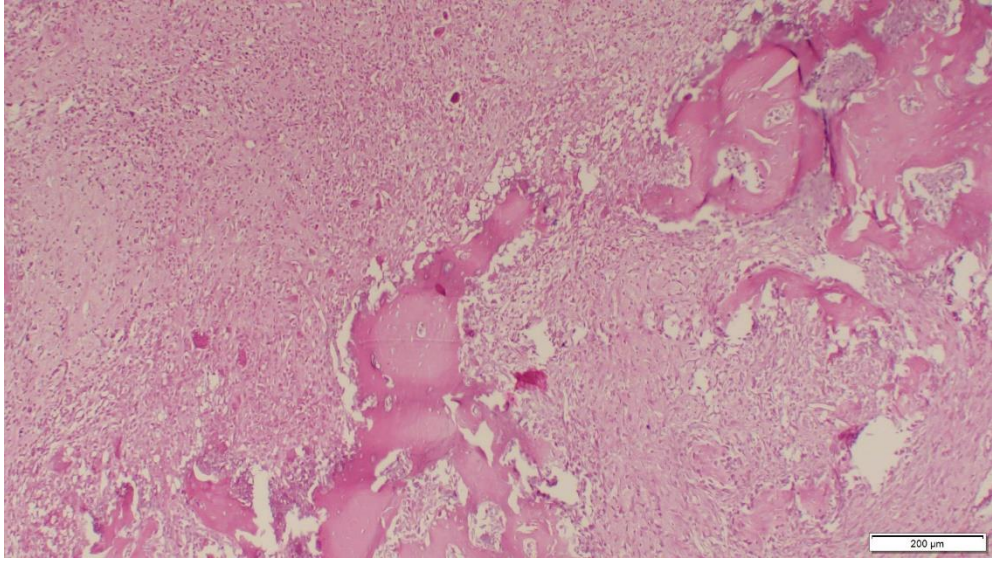
*** Dwass-Steel-Critchlow-Fligner ikili karşılaştırması w(wilcoxon) değeri



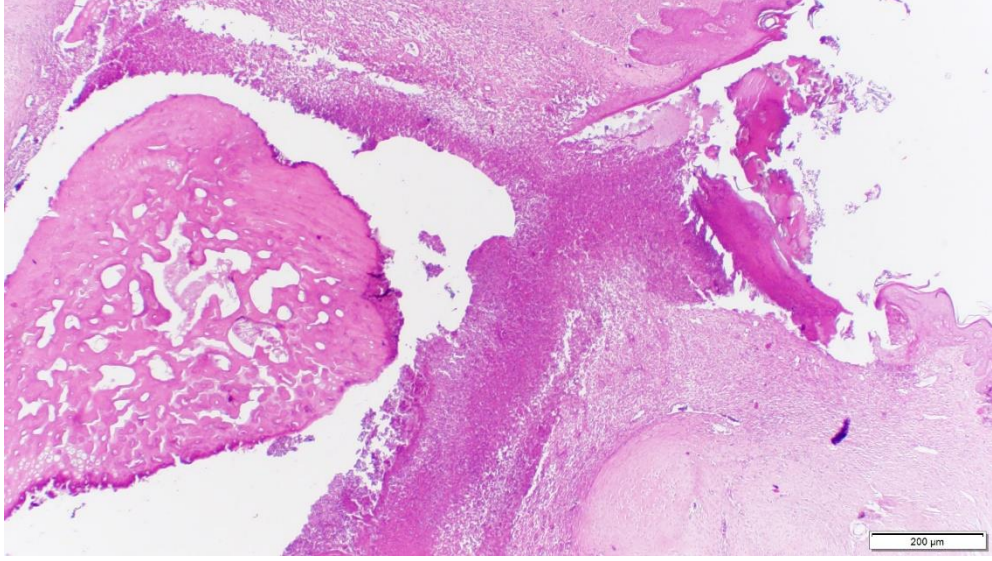
Şekil 6. Grupların arasındaki histopatolojik skorlamalarının karşılaştırılması



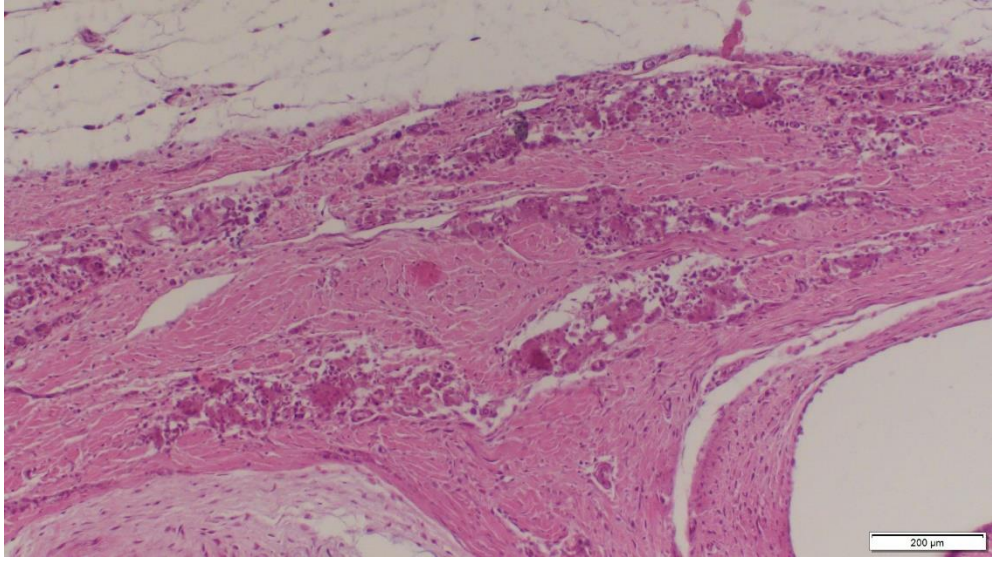
Resim 5. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x40 büyütmede vertebral osteomiyelit



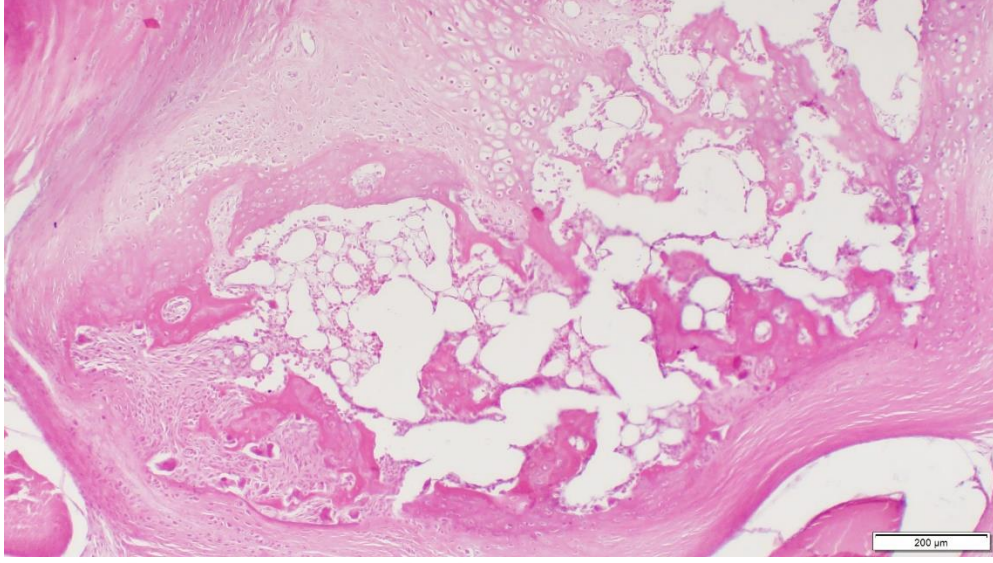
Resim 6. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x100 büyütmede granülasyon dokusu



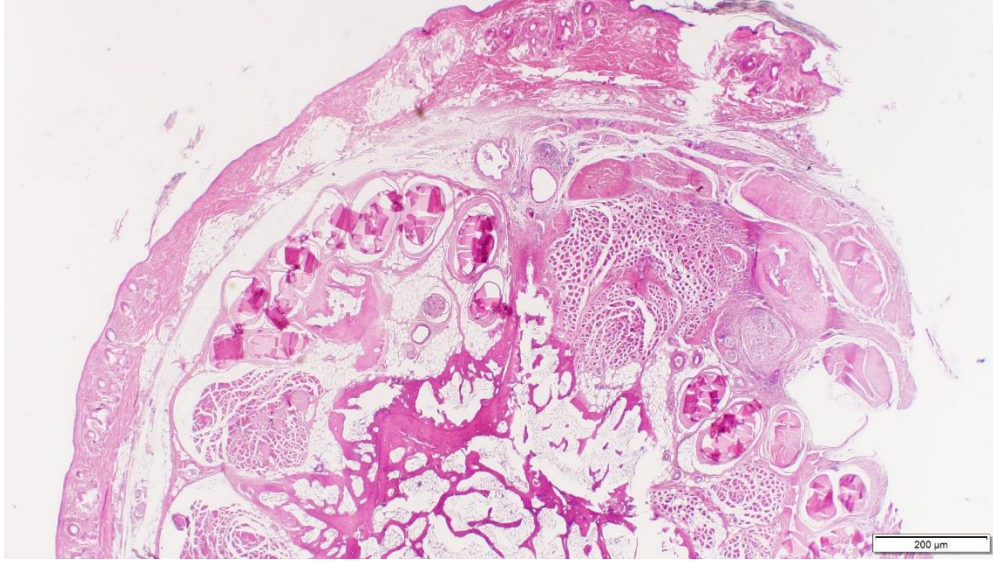
Resim 7. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x40 büyütmede fistül traktı ve yoğun inflamasyon



Resim 8. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x200 büyütmede yumuşak dokular içerisinde dev hücreler



Resim 9. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x100 büyütmede yeni reaktif kemik odağı



Resim 10. Patolojik incelemede H&E ile boyanmış preparatlarda x20 büyütmede yumuşak dokularda hafif inflamasyon

Deneklerin uygulanan tedavi yöntemleri sonrasında yapılan kontrol MRG skorları ile tedavi sonrası elde edilen dokuların histopatolojik skorlamaları arasındaki korelasyon değerlendirildi. Kontrol MRG skorlamaları ve histopatolojik skorlamalar pozitif yönde orta düzeyde korelasyon saptandı. ($r=0.419$; $p=0.007$)

5. TARTIŞMA

Piyojenik spondilitin erken ve doğru tanısı, spinal deformite ve disfonksiyon oluşumunu azaltma ve etkili tedavi için önemlidir. Çoklu ilaç direncine sahip bakterilerin oluşturduğu piyojenik enfeksiyonların tedavisinde bakteriyofaj tedavisi alternatif bir tedavi olarak ele alınmaya başlamıştır. Çalışmamızda, deneysel olarak Metisilin Dirençli *Staphylococcus Aureus*(MRSA) etkeni kullanılarak spondilodiskit modeli oluşturulan ratlarda, bakteriyofaj ve antibiyotik tedavilerinin etkileri incelendi.

Leszczyński ve arkadaşlarının Polonya’da 2006 yılında yayımladığı bir olgu sunumunda gastrointestinal sistemi metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tarafından kolonize edilen ve ardından aynı patojenin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonu olan bir sağlık çalışanı antibiyotik tedavisini reddedip kendisinde bakteriyofaj tedavisinin uygulanmasını istemiş. Anti-MRSA fajları ile oral tedavi uygulanan hastada 4 hafta sonunda kültürlerde negatiflik saptanıp tedavisi tamamlanmış. Hastanın kültürlerinde 6 ay boyunca üreme saptanmaması üzerine taşıyıcı statüsünün ortadan kaldırıldığı raporlanmış (6). Yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere bakteriyofaj tedavisinin mortalitesi yüksek enfeksiyon durumlarında bile kısa sürede ve yüksek düzeyde iyileşme sağladığı bildirilmiş (5, 6).

Rashel ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada MRSA ile intraperitoneal olarak enfekte edilen farelerde rekombinant olarak üretilen faj kaynaklı lizinin(MV-L) MRSA eradikasyonunda başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiş (154). Fajın tamamının kullanımı yerine faj kaynaklı proteinlerin kullanılmasının daha avantajlı olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur (155, 156). Yaptığımız çalışmada bakteriyofaj kaynaklı proteinler yerine fajın tamamını uyguladık.

Smith ve Huggins tarafından deneysel olarak gastroknemius kasları ve intraserebral olarak *Escherichia coli* suşlarıyla fareler enfekte edilmiş. Deneklere, antibiyotik ve faj tedavileri uygulanmış. Yapılan tedavilerde faj tedavisinin antibiyotik tedavisine daha üstün olduğunu gösterilmiş (125). Bizim yaptığımız çalışmada da faj veya faj+vankomisin tedavisinin tek başına tek başına vankomisin tedavisine göre daha anlamlı iyileşme sağladığı görüldü. Bu da faj tedavisinin iyileşme sürecine katkı sağladığını düşündürmektedir.

Biswas ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel fare modelinde, intraperitoneal 10^9 CFU VRE enjeksiyonu ile farelerde bakteriyemi indüklemek için kullanılmış. Bakteriyemi gelişen farelerin 48 saat içinde öldüğü görülmüş. İntraperitoneal 10^9 CFU VRE yüklemesinden 45 dakika sonra uygulanan 3×10^8 PFU faj suşu enjeksiyonu, hayvanların %100'ünü kurtarmak için yeterli olduğu raporlanmıştır. Tedavi, tüm hayvanların vitallerinde ölümcül düzeyde bozulma olduğu noktaya kadar ertelendiğinde bile, deneklerin yaklaşık %50'si bu faj preparatının tek bir enjeksiyonuyla kurtarılmıştır. Bu fajın bakteriyemik fareleri kurtarma kabiliyetinin, spesifik olmayan bir bağışıklık etkisine değil, fajın fonksiyonel yeteneklerine bağlı olduğu gösterilmiştir. (5). Yapılan çalışmalarda antibiyorapinin doz bağımlı olarak ek dozlarla tekrar tekrar uygulanma gerekliliği mevcut ken faj terapinin tek doz uygulamayla bile çok yüksek iyileşme sağlaması faj terapinin en önemli avantajlarının başında gelmektedir (5, 157). Yaptığımız çalışmada deneklere çoklu doz faj terapi uygulayarak başarılı sonuçlar aldık. Tek doz ile başarı gösterilen çalışmalar göz önüne alındığında daha az doz ile tedavi uygulanabileceğini gösterecek şekilde ek gruplar ayarlamamış olmamız çalışmanın kısıtlayıcı yönlerinden biri olarak görünmektedir.

Capparelli ve arkadaşlarının MRSA da dahil olmak üzere *Staphylococcus aureus* inoküle edilen fareler üzerinde yaptıkları deneyde; bakteriyofajların, ölümcül dozda verilen enfeksiyon materyaline karşı %97 kurtarıcı olduğu, ölümcül olmayan düzeyde enfeksiyon verilen denekler üzerinde ise 10 gün içinde enfeksiyonun eradike edildiği raporlanmıştır (157). Etki düzeyinin yüksek olması ve yan etki profilinin düşük olması mortalitesi yüksek olan çoklu organ yetmezliği olan hastalarda bakteriyofaj terapi önemli avantajlar sağlamaktadır (11, 157).

Shivaswamy ve arkadaşlarının (11), *Acinetobacter baumannii* uygulanan diyabetik sıçanların akut eksizyonel yaraların tedavi ettikleri çalışmada, yara debridmanını takip eden bakteri yüklemesinden 48 saat sonra 3×10^9 PFU faj topikal spreyleme yoluyla bir kez uygulandı. Tedavi uygulanmayan hastalarda bakteriyel enfeksiyon gelişimi ve ölümler görülmüşken faj tedavisi uygulanan deneklerde bakteri yükü, bakteri yüklemesini takiben 8. günde sıfıra düşürüldüğü bildirilmiştir. Antibiyoterapilerin büyük çoğunluğunda kısıtlı uygulama yöntemleri olmasının aksine faj terapinin farklı uygulama yöntemlerinin olması çok farklı enfeksiyonda uygulama kolaylığı sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda

antibiyoterapinin doz bağımlı olarak ek dozlarla tekrar tekrar uygulanma gerekliliği mevcut iken faj terapinin tek doz uygulamayla bile çok yüksek iyileşme sağlaması faj terapinin en önemli avantajlarının başında gelmektedir (5, 11).

Bierry ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladıkları deneysel tavşan spondilodiskit modelinde; 12 adet erişkin Yeni Zelanda beyaz tavşanını 3 farklı gruba ayırarak floroskopi altında disk aralıklarına *Staphylococcus aureus* uygulanarak 5-10-15. Günlerde MRG çekilmiş ve değerlendirilmesi yapılmış. Gadolinyum ile kontrast verilen tavşanlarda 5. Günde enfeksiyon tespit edilebilirken kontrast verilmeden yapılan görüntülemelerde 10. Günde enfeksiyon geliştiği gösterilmiş. Ayrıca çalışmalarında MRG ve patoloji korelasyonu olduğunu raporlamışlardır (158). Yaptığımız çalışmada da benzer olarak onuncu günde kontrast uygulanmadan enfeksiyon görüntülenmiştir. Yaptığımız çalışmada paralel olarak kontrol MRG skorları ile histopatolojik skora arasındaki korelasyon analizinde iki grup arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon saptandı.

Kay ve arkadaşlarının 2011 yılında *Pseudomonas Aeruginosa* ve *Escherichia coli* türleri üzerinde yaptığı çalışmada, faja duyarlı bir bakteri türünün, yüksek düzeyde spesifik faj depolimeraza duyarlı olmayan ve kimyasal olarak farklı bir EPS üreten farklı bir türle karışık bir kültür biyofilmi içinde korunabileceğini gözlemlenmiş (159). Bu bilgiler göz önünde bulundurularak biyofilm tabakasının azaltılması ve direnç gelişimine bağlı tedavide başarısızlığı engellemek amacıyla faj kokteyli kullanılması önerilmektedir (160, 161). Daha önceden yapılan çalışmalarla benzer özellikler gösterecek şekilde yaptığımız çalışmada literatürle benzerlik gösterilerek faj kokteyli ile terapötik olarak başarı sağlandı (159-161)

Tanji ve arkadaşlarının 2004 yılında, Gu ve arkadaşlarının 2012 yılında faj kokteyli kullanımının yalnızca daha farklı hedefler üzerinde avantajlar getirmediğini, aynı zamanda popülasyonda faja dirençli klonlar ve terapötik başarısızlıkla sonuçlanabilecek mutasyonları da önleme veya geciktirebilmeyi göstermiş (160, 161). Daha önceden yapılan çalışmalarla benzer özellikler gösterecek şekilde yaptığımız çalışmada literatürle benzerlik gösterilerek faj kokteyli ile terapötik olarak başarı sağlandı (159-161).

Coulter ve arkadaşlarının E. coli üzerinde yaptıkları çalışmada faj ve antibiyotik kombinasyonunun, tek başına antibiyotik kullanımına kıyasla biyofilmlerinin hayatta

kalmasında ~% 99.99 azalmaya yol açtığını bildirmiş (140). *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* biyofilmleri üzerinde faj ile faj+vankomisin bir antibiyotik kullanılarak yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (162, 163). Yaptığımız çalışma da literatürle paralel özellikler gösterilerek faj+vankomisin tedavinin, faj terapiden), antibiyotik tedavisinden ve tedavi uygulanmamasından üstünlüğü görülmüştür.

Wills ve arkadaşlarının (164) yaptığı deneysel tavşan yara enfeksiyonu modelinde, 8×10^7 CFU *Staphylococcus aureus* ve 2×10^9 PFU stafilokokal fajın işaretli subkütan bölgeye aynı anda enjekte edildiğinde tavşanlarda apse oluşumunu önlemiştir. Aynı zamanda doz bağımlı olarak faj miktarı arttıkça üreyen bakteri miktarının azaldığı gösterilmiş. Stafilokok enfeksiyonlarına karşı bakteriyofaj tedavisi değerli bir profilaksi olabileceğini bildirmişler (164). Yaptığımız çalışmada spondilodiskit profilaksisi amacıyla bakteriyofaj ve antibiyotik uygulanan gruplar oluşturulmadı.

Leszczyński ve ark., Bruttin ve arkadaşlarının gönüllü insanlarda faj uygulamalarını güvenle uyguladıklarını bildirmişlerdir.(6, 165). Yaptığımız çalışmada da paralellik gösterilerek faj terapide herhangi bir yan etkiye rastlanılmamıştır. Faj terapisinin insanlarda ve hayvanlarda güvenilir bir şekilde kullanılması gelecek açısından umut vermekte olup daha ileri insan çalışmaları gerekliliği mevcuttur.

Osteomyelit tanısında ve etken ajanın gösterilmesinde altın standart BT eşliğinde biyopsi ve kültürler ile histopatolojik ve mikrobiyolojik incelemeler olup %70-%90 oranında pozitif sonuç bildirilmiştir (74-76). Çalışmamızda, histopatolojik olarak yapılan incelemelerde bakteriyofaj ve antibiyoterapi kombinasyonunun, tek başına faj ve tek başına antibiyoterapi protokollerinden üstün olduğu gösterilmiştir.

Çalışmanın deneysel olması, enfeksiyon oluşumunun kontrolünde sadece MRG kullanılması ve mikrobiyolojik olarak gösterilmemesi çalışmanın kısıtlayıcı yönleri olarak gösterilebilir.

6. SONUÇ

Deneysel spondilodiskit modeli oluşturduğumuz çalışmamızda, bakteriyofaj tedavisinin antibiyoterapi ile kombine edildiğinde histopatolojik ve radyolojik olarak tek başına faj ve tek başına antibiyoterapi protokollerinden üstün olduğu sonucuna varılmıştır.



7. ÖZET

DENEYSEL OLARAK METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) ETKENİ KULLANILARAK SPONDİLODİSKİT MODELİ OLUŞTURULAN RATLARDA BAKTERİYOFAJ VE ANTİBİYOTİK TEDAVİLERİNİN ETKİLERİ

AMAÇ: Çoklu ilaç direncine sahip bakterilerin oluşturduğu piyojenik enfeksiyonların tedavisinde oldukça eski bir tedavi yöntemi olsa da araştırmacılar bakteriyofaj tedavisini “yeni” bir alternatif gibi ele almaya başlamıştır. Çalışmamızda bakteriyofaj tedavisinin etkilerini objektif olarak ortaya koyarak deneysel ve klinik çalışmalara yol gösterici olmasını amaçladık.

YÖNTEM: Çalışmada 40 adet Wistar-Albino cinsi, 12-14 haftalık dişi rat (250-300 g) rastgele 4 gruba ayrıldı. Grup1(Kontrol), Grup 2(Vankomisin), Grup 3(Faj), Grup 4(Faj /Vankomisin) olarak adlandırıldı. Anestezi altında, kuyruk proksimal bölgesindeki vertebral disk aralığına 0,05 ml 10^7 CFU/ml ADÜ26 MRSA etkeni inoküle edildi. Operasyondan 10 gün sonra manyetik rezonans görüntüleme sistemleri kullanılarak T1, T2 ve STIR sekansları ile yapılan görüntüleme ile spondilodiskit gelişimi gösterildi. Enfeksiyon olduğu gözlemlenen ratlara daha önceden planlanan protokollere göre işlemler uygulandı. 28. Gün kontrol MRG çekildi. Görüntüleme sonrasında anestezi altında ratların işaretli diskleri, alt ve üst vertebraları ve diskleri de içerecek şekilde patoloji laboratuvarında incelenmek üzere blok halinde eksize edildi. Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Dwass-Steel-Critchlow-Fligner ikili karşılaştırması, Spearman Korelasyon Analizi testleri ile değerlendirildi.

BULGULAR: Bakteri inokülasyonundan 10 gün sonrasında enfeksiyon gelişimini göstermek amacıyla yapılan ilk MRG’ de grupların enfeksiyon düzeyleri arasında MRG skorlaması açısından anlamlı fark saptanmayarak enfeksiyon gelişimi açısından grupların eşdeğer olduğu gösterildi. ($p=0.552$) Kontrol MRG skorlamaları ve histopatolojik skorlamalar pozitif yönde orta düzeyde korelasyon saptandı. ($r=0.419$; $p=0.007$) Yapılan ikili analizlerde faj+vankomisin tedavi uygulanan grup ve faj terapi uygulanan grup ile kontrol grubu arasında MRG skorlamasında iyileşme açısından anlamlı bir fark görüldü. ($p=0.013$; $p=0.026$) Histopatolojik skorlamalar açısından yapılan ikili analizlerde

faj+vankomisin tedavi uygulanan grup ile kontrol grubu, faj terapi uygulanan grup ve vankomisin uygulanan gruplar arasında iyileşme açısından anlamlı bir fark görüldü. ($p<0.001$; $p=0.049$; $p=0.027$)

SONUÇ: Deneysel spondilodiskit modeli oluşturduğumuz çalışmamızda, bakteriyofaj tedavisinin antibiyoterapi ile kombine edildiğinde histopatolojik ve radyolojik olarak tek başına faj ve tek başına antibiyoterapi protokollerinden üstün olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Spondilodiskit, vertebra, bakteriyofaj, vankomisin

8. ABSTRACT

EFFECTS OF BACTERIOPHAGE AND ANTIBIOTIC TREATMENTS IN RATS WITH EXPERIMENTAL SPONDYLODISCITIS MODEL CREATED BY MRSA

BACKGROUND: Bacteriophage therapy, which is a very old treatment method in the treatment of pyogenic infections caused by multi-drug resistant bacteria, has begun to be considered as a "new" alternative. In our study, we aimed to show the effects of bacteriophage treatment objectively and to guide experimental and clinical studies.

METHODS: In the study, 40 Wistar-Albino 12-14 week old female (250-300 g) rats were randomly divided into 4 groups. Groups were named as Group 1(Control), Group 2(Vancomycin), Group 3(Phage), Group 4(Vancomycin/Phage). Under anesthesia, 0.05 ml of 10^7 CFU/ml ADU26 MRSA agent was inoculated into the vertebral disc space in the proximal tail region. The development of spondylodiscitis was demonstrated 10 days after the operation with imaging performed with T1, T2 and STIR sequences in MRI. The rats with observed infection were treated according to the previously planned protocols. Control MRI was taken on the 28th day. After imaging, under anesthesia, the marked discs of the rats, including the lower and upper vertebrae and discs, were excised as blocks for examination in the pathology laboratory. In statistical analysis, Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Dwass-Steel-Critchlow-Fligner pairwise comparison and Spearman Correlation Analysis tests were used.

RESULTS: In the first MRI performed to show the development of infection 10 days after bacterial inoculation, no significant difference was found between the infection levels of the groups in terms of MRI scoring, and it was observed that they were equivalent to each other in terms of infection development. ($p=0.552$) In the paired analyzes, it was determined that the phage+vancomycin treated group and the phage therapy group showed a significant improvement in MRI scoring compared to the control group. ($p=0.013$; $p=0.026$) In paired analyzes made in terms of histopathological scoring; In the phage+vancomycin treated group; There was a significant difference in

improvement compared to the control group, the phage therapy group and the vancomycin applied groups. ($p<0.001$; $p=0.049$; $p=0.027$) In paired analyzes made in terms of histopathological scoring; A significant improvement was observed in the phage+vancomycin treated group compared to the control group, phage therapy and vancomycin applied groups. ($p<0.001$; $p=0.049$; $p=0.027$). The correlation between the control MRI scores performed after the treatment methods of the subjects and the histopathological scoring of the tissues obtained after the treatment was evaluated. Control MRI scores and histopathological scores showed moderate correlation in a positive direction. ($r=0.419$; $p=0.007$)

CONCLUSIONS: In our experimental spondylodiscitis model, it has been shown that the combination of bacteriophage and antibiotic therapy is superior to phage-only and antibiotherapy-only protocols histopathologically and radiologically.

Keywords: Spondylodiscitis, bacteriophage, phage, vancomycin

9. KAYNAKÇA

1. Carragee EJ. Pyogenic vertebral osteomyelitis. *JBJS*. 1997;79(6):874-80.
2. Chelsom J, Solberg CO. Vertebral osteomyelitis at a Norwegian university hospital 1987-97: clinical features, laboratory findings and outcome. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 1998;30(2):147-51.
3. Fantoni M, Trecarichi EM, Rossi B, Mazzotta V, Di Giacomo G, Nasto L, et al. Epidemiological and clinical features of pyogenic spondylodiscitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16(Suppl 2):2-7.
4. Schnöring M, Brock M. Antibiotikaprophylaxe bei lumbalen Bandscheibenoperationen: Eine Analyse von 1 030 Operationen. *Zentralblatt für Neurochirurgie*. 2003;64(01):24-9.
5. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and immunity*. 2002;70(1):204.
6. Leszczyński P, Weber-Dabrowska B, Kohutnicka M, Łuczak M, Górecki A, Górski A. Successful eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) intestinal carrier status in a healthcare worker—case report. *Folia microbiologica*. 2006;51(3):236-8.
7. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*. 2014;5(1):226-35.
8. Campbell A. The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews Genetics*. 2003;4(6):471-7.
9. Abedon ST. Ecology of anti-biofilm agents II: bacteriophage exploitation and biocontrol of biofilm bacteria. *Pharmaceutics*. 2015;8(3):559-89.
10. Speck P, Smithyman A. Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. *FEMS microbiology letters*. 2016;363(3).
11. Shivaswamy VC, Kalasuramath SB, Sadanand CK, Basavaraju AK, Ginnavaram V, Bille S, et al. Ability of bacteriophage in resolving wound infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in uncontrolled diabetic rats. *Microbial drug resistance*. 2015;21(2):171-7.
12. Ibrahim O, Sarhan S, Salih S. Activity of isolated staphylococcal bacteriophage in treatment of experimentally induced chronic osteomyelitis in rabbits. *Adv Anim Vet Sci*. 2016;4:593-603.
13. Zimmerman MR. Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1979;55(6):604.

14. Herzog H. History of tuberculosis. *Respiration*. 1998;65(1):5.
15. Pott P. The Chirurgical Works of Percivall Pott, FRS Surgeon to St. Bartholomew's Hospital: J. Johnson, GGJ and J. Robinson, T. Cadell, J. Murray, W. Fox, J. Bew, S ...; 1790.
16. Hopkinson N, Stevenson J, Benjamin S. A case ascertainment study of septic discitis: clinical, microbiological and radiological features. *Qjm*. 2001;94(9):465-70.
17. Lam KS, Webb JK. Discitis. *Hospital Medicine*. 2004;65(5):280-6.
18. Butler JS, Shelly MJ, Timlin M, Powderly WG, O'Byrne JM. Nontuberculous pyogenic spinal infection in adults: a 12-year experience from a tertiary referral center. *Spine*. 2006;31(23):2695-700.
19. Sobottke R, Seifert H, Fätkenheuer G, Schmidt M, Goßmann A, Eysel P. Current diagnosis and treatment of spondylodiscitis. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2008;105(10):181.
20. BONFIGLIO M, LANGE TA, YOUNG MK. Pyogenic vertebral osteomyelitis: Disk space infections. *Clinical orthopaedics and related research*. 2006(444):4-8.
21. Tali ET, Oner AY, Koc AM. Pyogenic spinal infections. *Neuroimaging Clinics*. 2015;25(2):193-208.
22. Cottle L, Riordan T. Infectious spondylodiscitis. *Journal of Infection*. 2008;56(6):401-12.
23. Skaf G, Domloj N, Fehlings M, Bouclaous C, Sabbagh A, Kanafani Z, et al. Pyogenic spondylodiscitis: an overview. *Journal of infection and public health*. 2010;3(1):5-16.
24. Zarghooni K, Röllinghoff M, Sobottke R, Eysel P. Treatment of spondylodiscitis. *International orthopaedics*. 2012;36(2):405-11.
25. Calderone RR, Larsen JM. Overview and classification of spinal infections. *Orthopedic Clinics of North America*. 1996;27(1):1-8.
26. Cruse PJ, Foord R. A five-year prospective study of 23,649 surgical wounds. *Archives of surgery*. 1973;107(2):206-10.
27. Gasbarrini A, Bertoldi E, Mazzetti M, Fini L, Terzi S, Gonella F, et al. Clinical features, diagnostic and therapeutic approaches to haematogenous vertebral osteomyelitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2005;9(1):53-66.
28. Hadjipavlou AG, Mader JT, Necessary JT, Muffoletto AJ. Hematogenous pyogenic spinal infections and their surgical management. *Spine*. 2000;25(13):1668-79.
29. Buranapanitkit B, Lim A, Kiriratnikom T. Clinical manifestation of tuberculous and pyogenic spine infection. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet Thangphaet*. 2001;84(11):1522-6.

30. Jiménez-Mejías ME, de Dios Colmenero J, Sánchez-Lora FJ, Palomino-Nicás J, Reguera JM, García de la Heras J, et al. Postoperative spondylodiskitis: etiology, clinical findings, prognosis, and comparison with nonoperative pyogenic spondylodiskitis. *Clinical Infectious Diseases*. 1999;29(2):339-45.
31. Ratcliffe J. An evaluation of the intra-osseous arterial anastomoses in the human vertebral body at different ages. A microarteriographic study. *Journal of anatomy*. 1982;134(Pt 2):373.
32. Rudert M, Tillmann B. Lymph and blood supply of the human intervertebral disc: cadaver study of correlations to discitis. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1993;64(1):37-40.
33. Whalen JL, Parke WW, Mazur JM, Stauffer ES. The intrinsic vasculature of developing vertebral end plates and its nutritive significance to the intervertebral discs. *Journal of pediatric orthopedics*. 1985;5(4):403-10.
34. Yeom JA, Lee IS, Suh HB, Song YS, Song JW. Magnetic resonance imaging findings of early spondylodiscitis: interpretive challenges and atypical findings. *Korean journal of radiology*. 2016;17(5):565.
35. Babinchak TJ, Riley DK, Rotheram Jr EB. Pyogenic vertebral osteomyelitis of the posterior elements. *Clinical infectious diseases*. 1997;25(2):221-4.
36. Govender S. Spinal infections. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2005;87(11):1454-8.
37. Legrand E, Flipo R-M, Guggenbuhl P, Masson C, Maillefert J-F, Soubrier M, et al. Management of nontuberculous infectious discitis. Treatments used in 110 patients admitted to 12 teaching hospitals in France. *Joint Bone Spine*. 2001;68(6):504-9.
38. Beronius M, Bergman B, Andersson R. Vertebral Osteomyelitis in Go" teborg, Sweden: A Retrospective Study of Patients During 1990? 95. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2001;33(7):527-32.
39. GW W. Infection of spine. In: ST C, editor. *Campbell's Operative Orthopaedics*. 10th ed. St. Louis: Mosby Co; 2003. p. 2029-60.
40. Sapico FL, Montgomerie JZ. Pyogenic vertebral osteomyelitis: report of nine cases and review of the literature. *Reviews of infectious diseases*. 1979;1(5):754-76.
41. Gouliouris T, Aliyu SH, Brown NM. Spondylodiscitis: update on diagnosis and management. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(suppl_3):iii11-iii24.
42. Mylona E, Samarkos M, Kakalou E, Fanourgiakis P, Skoutelis A, editors. *Pyogenic vertebral osteomyelitis: a systematic review of clinical characteristics*. *Seminars in arthritis and rheumatism*; 2009: Elsevier.
43. Carragee EJ, Kim D, van der Vlugt T, Vittum D. The clinical use of erythrocyte sedimentation rate in pyogenic vertebral osteomyelitis. *Spine*. 1997;22(18):2089-93.

44. Meyer B, Schaller K, Rohde V, Hassler W. The C-reactive protein for detection of early infections after lumbar microdiscectomy. *Acta neurochirurgica*. 1995;136(3):145-50.
45. Balériaux DL, Neugroschl C. Spinal and spinal cord infection. *European Radiology Supplements*. 2004;14(3):E72-E83.
46. Collert S. Osteomyelitis of the spine. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1977;48(3):283-90.
47. Eismont FJ, Bohlman H, Soni P, Goldberg V, Freehafer A. Pyogenic and fungal vertebral osteomyelitis with paralysis. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1983;65(1):19-29.
48. Mete B, Kurt C, Yilmaz MH, Ertan G, Ozaras R, Mert A, et al. Vertebral osteomyelitis: eight years' experience of 100 cases. *Rheumatology international*. 2012;32(11):3591-7.
49. del Pozo JSG, Soto MV, Alfaro EM, Santos JS. Osteomielitis vertebral: descripción de una serie de 103 casos e identificación de variables predictivas del grupo etiológico. *Revista clinica espanola*. 2007;207(1):16-20.
50. Cone LA, Byrd RG, Potts BE, Wuesthoff M. Diagnosis and treatment of Candida vertebral osteomyelitis: clinical experience with a short course therapy of amphotericin B lipid complex. *Surgical neurology*. 2004;62(3):234-7.
51. Graham SM, Fishlock A, Millner P, Sandoe J. The management gram-negative bacterial haematogenous vertebral osteomyelitis: a case series of diagnosis, treatment and therapeutic outcomes. *European Spine Journal*. 2013;22(8):1845-53.
52. Kim C-J, Kim U-J, Kim HB, Park SW, Oh M-d, Park K-H, et al. Vertebral osteomyelitis caused by non-tuberculous mycobacteria: Predisposing conditions and clinical characteristics of six cases and a review of 63 cases in the literature. *Infectious Diseases*. 2016;48(7):509-16.
53. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed 2015. p. 1244.
54. Berbari EF SJ, Osmon DR. . Principles and Practice of Infectious Diseases. In: Bennett JE DR, Blaser MJ, editor. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed: Elsevier Saunders, Philadelphia 2015. p. 1318-27.
55. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of clinical pathology*. 1961;14(4):385.
56. Benner EJ, Kayser F. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*. 1968;292(7571):741-4.

57. Creech CB, Kernodle DS, Alsentzer A, Wilson C, Edwards KM. Increasing rates of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2005;24(7):617-21.
58. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(7):666-74.
59. Huang SS, Platt R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(3):281-5.
60. Anderson DJ, Sexton DJ, Kanafani ZA, Auten G, Kaye KS. Severe surgical site infection in community hospitals: epidemiology, key procedures, and the changing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection control and hospital epidemiology*. 2007;28(9):1047-53.
61. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29(11):996-1011.
62. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infection control and hospital epidemiology*. 2003;24(5):362-86.
63. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases*. 2003;36(1):53-9.
64. Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archives of internal medicine*. 2002;162(19):2229-35.
65. Abrahamson M, Sexton D. Nosocomial methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremia: at what cost. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999;20:408-11.
66. Mertz D, Frei R, Periat N, Zimmerli M, Battegay M, Flückiger U, et al. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations. *Archives of Internal Medicine*. 2009;169(2):172-8.
67. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 1984;158(2):513-6.

68. Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin-and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1985;28(3):397-403.
69. EUCAST T, Testing ECoAS. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 7.1. Växjö Sweden; 2017.
70. Mann S, Schütze M, Sola S, Piek J. Nonspecific pyogenic spondylodiscitis: clinical manifestations, surgical treatment, and outcome in 24 patients. *Neurosurgical focus*. 2004;17(6):1-7.
71. Christodoulou A, Zidrou C, Savvidou OD, Givissis P, Apotolou T, Mavrogenis AF, et al. Percutaneous Harlow Wood needle biopsy of the spine: a retrospective analysis of 238 spine lesions. SLACK Incorporated Thorofare, NJ; 2005.
72. Thurnher M, Post M, Jenkins J. MRI of infections and neoplasms of the spine and spinal cord in 55 patients with AIDS. *Neuroradiology*. 2000;42(8):551-63.
73. Carragee EJ. The clinical use of magnetic resonance imaging in pyogenic vertebral osteomyelitis. *Spine*. 1997;22(7):780-5.
74. Cheung W, Luk KD. Pyogenic spondylitis. *International orthopaedics*. 2012;36(2):397-404.
75. Yang S-C, Fu T-S, Chen L-H, Chen W-J, Tu Y-K. Identifying pathogens of spondylodiscitis: percutaneous endoscopy or CT-guided biopsy. *Clinical orthopaedics and related research*. 2008;466(12):3086-92.
76. Carek PJ, Dickerson LM, Sackier JM. Diagnosis and management of osteomyelitis. *American family physician*. 2001;63(12):2413.
77. Grados F, Lescure FX, Senneville E, Flipo RM, Schmit JL, Fardellone P. Suggestions for managing pyogenic (non-tuberculous) discitis in adults. *Joint Bone Spine*. 2007;74(2):133-9.
78. Moore SL, Rafii M. Imaging of musculoskeletal and spinal tuberculosis. *Radiologic Clinics of North America*. 2001;39(2):329-42.
79. Gasbarrini A, Boriani L, Salvadori C, Mobarec S, Kreshak J, Nanni C, et al. Biopsy for suspected spondylodiscitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16(Suppl 2):26-34.
80. Schlenzka D, Laine T, Lund T. Computer-assisted spine surgery. *European Spine Journal*. 2000;9(1):S057-S64.
81. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner P. *New England Journal of Medicine*. NEJM. 2010;362(11):1022-9.
82. Ledermann HP, Schweitzer ME, Morrison WB, Carrino JA. MR imaging findings in spinal infections: rules or myths? *Radiology*. 2003;228(2):506-14.

83. Cornett CA, Vincent SA, Crow J, Hewlett A. Bacterial spine infections in adults: evaluation and management. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2016;24(1):11-8.
84. Prodromou ML, Ziakas PD, Poulou LS, Karsaliakos P, Thanos L, Mylonakis E. FDG PET is a robust tool for the diagnosis of spondylodiscitis: a meta-analysis of diagnostic data. *Clinical nuclear medicine*. 2014;39(4):330-5.
85. Kouijzer I, Smids C, Vos F, Sprong T, Hosman A, de Rooy J, et al. A comparison of the diagnostic value of MRI and FDG-PET/CT in suspected spondylodiscitis. *Journal of Nuclear Medicine*. 2014;55(supplement 1):377-.
86. Varma R, Lander P, Assaf A. Imaging of pyogenic infectious spondylodiskitis. *Radiologic clinics of north america*. 2001;39(2):203-13.
87. Rothman S. The diagnosis of infections of the spine by modern imaging techniques. *The Orthopedic clinics of North America*. 1996;27(1):15-31.
88. Rodiek S-O. Bildgebende Verfahren bei spinalen Infektionen. *Der Radiologe*. 2001;41(11):976-86.
89. Dagirmanjian A, Schlis J, McHenry MC. MR imaging of spinal infections. *Magnetic resonance imaging clinics of North America*. 1999;7(3):525-38.
90. Modic M, Feiglin D, Piraino D, Boumpfrey F, Weinstein M, Duchesneau P, et al. Vertebral osteomyelitis: assessment using MR. *Radiology*. 1985;157(1):157-66.
91. Vaccaro AR, Shah SH, Schweitzer ME, Rosenfeld JF, Cotler JM. MRI description of vertebral osteomyelitis, neoplasm, and compression fracture. *Orthopedics*. 1999;22(1):67-73.
92. Ziegelbein J, El-Khoury GY. Early spondylodiscitis presenting with single vertebral body involvement: a report of two cases. *The Iowa orthopaedic journal*. 2011;31:219.
93. Ahmadi J, Bajaj A, Destian S, Segall H, Zee C. Spinal tuberculosis: atypical observations at MR imaging. *Radiology*. 1993;189(2):489-93.
94. Tyrrell P, Cassar-Pullicino V, McCall I. Spinal infection. *European radiology*. 1999;9(6):1066-77.
95. Tali ET, Gültekin S. Spinal infections. *European radiology*. 2005;15(3):599-607.
96. Porter B, Shields A, Olson D. Magnetic resonance imaging of bone marrow disorders. *Radiologic clinics of North America*. 1986;24(2):269-89.
97. Sugimura K, Yamasaki K, Kitagaki H, Tanaka Y, Kono M. Bone marrow diseases of the spine: differentiation with T1 and T2 relaxation times in MR imaging. *Radiology*. 1987;165(2):541-4.

98. Vanel D, Dromain C, Tardivon A. MRI of bone marrow disorders. *European radiology*. 2000;10(2):224-9.
99. Vogler 3rd J. 3rd, Murphy WA. Bone marrow imaging *Radiology*. 1988;168:679-93.
100. Ioannou S, Chatziioannou S, Pneumaticsos SG, Zormpala A, Sipsas NV. Fluorine-18 fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography scan contributes to the diagnosis and management of brucellar spondylodiskitis. *BMC infectious diseases*. 2013;13(1):1-9.
101. Skanjeti A, Penna D, Douroukas A, Cistaro A, Arena V, Leo G, et al. PET in the clinical work-up of patients with spondylodiscitis: a new tool for the clinician? *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging: Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN)[and] the International Association of Radiopharmacology (IAR),[and] Section of the Society of*. 2012;56(6):569-76.
102. Smids C, Kouijzer IJ, Vos FJ, Sprong T, Hosman AJ, de Rooy JW, et al. A comparison of the diagnostic value of MRI and 18 F-FDG-PET/CT in suspected spondylodiscitis. *Infection*. 2017;45(1):41-9.
103. Ohtori S, Suzuki M, Koshi T, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, et al. 18F-fluorodeoxyglucose-PET for patients with suspected spondylitis showing Modic change. *Spine*. 2010;35(26):E1599-E603.
104. Fuster D, Tomás X, Mayoral M, Soriano A, Manchón F, Cardenal C, et al. Prospective comparison of whole-body 18 F-FDG PET/CT and MRI of the spine in the diagnosis of haematogenous spondylodiscitis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2015;42(2):264-71.
105. Hungenbach S, Delank K-S, Dietlein M, Eysel P, Drzezga A, Schmidt MC. 18F-fluorodeoxyglucose uptake pattern in patients with suspected spondylodiscitis. *Nuclear medicine communications*. 2013;34(11):1068-74.
106. Schmitz A, Risse J, Grünwald F, Gassel F, Biersack H, Schmitt O. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography findings in spondylodiscitis: preliminary results. *European Spine Journal*. 2001;10(6):534-9.
107. Zhuang H, Sam JW, Chacko TK, Duarte PS, Hickeson M, Feng Q, et al. Rapid normalization of osseous FDG uptake following traumatic or surgical fractures. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2003;30(8):1096-103.
108. McHenry MC, Easley KA, Locker GA. Vertebral osteomyelitis: long-term outcome for 253 patients from 7 Cleveland-area hospitals. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(10):1342-50.
109. Sato K, Yamada K, Yokosuka K, Yoshida T, Goto M, Matsubara T, et al. Pyogenic spondylitis: clinical features, diagnosis and treatment. *The Kurume medical journal*. 2019;MS653001.

110. Rudert M, Tillmann B. Detection of lymph and blood vessels in the human intervertebral disc by histochemical and immunohistochemical methods. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 1993;175(3):237-42.
111. Holm S, Maroudas A, Urban J, Selstam G, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connective tissue research*. 1981;8(2):101-19.
112. Jaramillo-de la Torre JJ, Bohinski RJ, Kuntz C. Vertebral osteomyelitis. *Neurosurgery Clinics*. 2006;17(3):339-51.
113. Berbari EF, Kanj SS, Kowalski TJ, Darouiche RO, Widmer AF, Schmitt SK, et al. Executive summary: 2015 Infectious Diseases Society of America (IDSA) clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of native vertebral osteomyelitis in adults. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;61(6):859-63.
114. Stengel D, Bauwens K, Sehouli J, Ekkernkamp A, Porzsolt F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *The Lancet infectious diseases*. 2001;1(3):175-88.
115. Vuagnat A, Stern R, Lotthe A, Schuhmacher H, Duong M, Hoffmeyer P, et al. High dose vancomycin for osteomyelitis: continuous vs. intermittent infusion. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2004;29(4):351-7.
116. Rayner CR, Baddour L, Birmingham MC, Norden C, Meagher AK, Schentag JJ. Linezolid in the treatment of osteomyelitis: results of compassionate use experience. *Infection*. 2004;32(1):8-14.
117. Rissing JP. Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones. *Clinical infectious diseases*. 1997;25(6):1327-33.
118. Greenberg RN, Newman MT, Shariaty S, Pectol RW. Ciprofloxacin, lomefloxacin, or levofloxacin as treatment for chronic osteomyelitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(1):164-6.
119. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011;1(2):66-85.
120. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris Jr JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(3):649.
121. Broudy TB, Fischetti VA. In vivo lysogenic conversion of Tox⁻ *Streptococcus pyogenes* to Tox⁺ with lysogenic streptococci or free phage. *Infection and immunity*. 2003;71(7):3782.
122. Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International journal of antimicrobial agents*. 2007;30(2):118-28.
123. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current opinion in microbiology*. 2008;11(5):393-400.

124. Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan C. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of applied microbiology*. 2008;104(1):1-13.
125. Smith HW, Huggins M. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *Microbiology*. 1982;128(2):307-18.
126. Levin BR, Bull J. Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. *The American Naturalist*. 1996;147(6):881-98.
127. Kwiatek M, Mizak L, Parasion S, Gryko R, Olender A, Niemcewicz M. Characterization of five newly isolated bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Folia microbiologica*. 2015;60(1):7-14.
128. Liao KS, Lehman SM, Tweardy DJ, Donlan RM, Trautner BW. Bacteriophages are synergistic with bacterial interference for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. *Journal of applied microbiology*. 2012;113(6):1530-9.
129. Pires D, Sillankorva S, Faustino A, Azeredo J. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Research in microbiology*. 2011;162(8):798-806.
130. Yap ML, Klose T, Arisaka F, Speir JA, Veisler D, Fokine A, et al. Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(10):2654-9.
131. Akhverdyan VZ, Gak ER, Tokmakova IL, Stoyanova NV, Yomantas YA, Mashko SV. Application of the bacteriophage Mu-driven system for the integration/amplification of target genes in the chromosomes of engineered Gram-negative bacteria—mini review. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;91(4):857-71.
132. Simpson AA, Tao Y, Leiman PG, Badasso MO, He Y, Jardine PJ, et al. Structure of the bacteriophage ϕ 29 DNA packaging motor. *Nature*. 2000;408(6813):745-50.
133. Ivanovska I, De Pablo P, Ibarra B, Sgalari G, MacKintosh F, Carrascosa J, et al. Bacteriophage capsids: tough nanoshells with complex elastic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(20):7600-5.
134. Orlova E. Bacteriophages and their structural organisation: InTech; 2012.
135. Leiman P, Kanamaru S, Mesyanzhinov V, Arisaka F, Rossmann M. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2003;60(11):2356-70.
136. Lurz R, Orlova EV, Günther D, Dube P, Dröge A, Weise F, et al. Structural organisation of the head-to-tail interface of a bacterial virus. *Journal of molecular biology*. 2001;310(5):1027-37.

137. São-José C, Lhuillier S, Lurz R, Melki R, Lepault J, Santos MA, et al. The ectodomain of the viral receptor YueB forms a fiber that triggers ejection of bacteriophage SPP1 DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(17):11464-70.
138. Alves DR, Perez-Esteban P, Kot W, Bean J, Arnot T, Hansen L, et al. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. *Microbial biotechnology*. 2016;9(1):61-74.
139. Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):397.
140. Coulter LB, McLean RJ, Rohde RE, Aron GM. Effect of bacteriophage infection in combination with tobramycin on the emergence of resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Viruses*. 2014;6(10):3778-86.
141. Olszak T, Zarnowiec P, Kaca W, Danis-Włodarczyk K, Augustyniak D, Drevinek P, et al. In vitro and in vivo antibacterial activity of environmental bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015;99(14):6021-33.
142. Lima-Mendez G, Toussaint A, Leplae R. A modular view of the bacteriophage genomic space: identification of host and lifestyle marker modules. *Research in microbiology*. 2011;162(8):737-46.
143. Hibbs RA. A further consideration of an operation for Pott's disease of the spine: with report of cases from the service of the New York Orthopaedic Hospital. *Annals of surgery*. 1912;55(5):682.
144. Albee FH. Transplantation of a portion of the tibia into the spine for Pott's disease: a preliminary report. *Journal of the American Medical Association*. 1911;57(11):885-6.
145. Hodgson A, Stock F, Fang H, Ong G. Anterior spinal fusion the operative approach and pathological findings in 412 patients with pott's disease of the spine. *British Journal of Surgery*. 1960;48(208):172-8.
146. Hodgson A, SKINSNES OK, Leong C. The pathogenesis of Pott's paraplegia. *JBJS*. 1967;49(6):1147-56.
147. Tins BJ, Cassar-Pullicino VN, editors. MR imaging of spinal infection. *Seminars in musculoskeletal radiology*; 2004: Copyright © 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New
148. Berbari EF SJ, Osmon DR Osteomyelitis In: Mandell GL BJ, Dolin R (eds), editor. *Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia,2005. p. 1322-32.
149. Carragee EJ. Instrumentation of the infected and unstable spine: a review of 17 cases from the thoracic and lumbar spine with pyogenic infections. *Journal of spinal disorders*. 1997;10(4):317-24.

150. Faraj A, Webb J. Spinal instrumentation for primary pyogenic infection. Report of 31 patients. *Acta orthopaedica belgica*. 2000;66(3):242-7.
151. Krödel A, Krüger A, Lohscheidt K, Pfahler M, Refior H. Anterior debridement, fusion, and extrafocal stabilization in the treatment of osteomyelitis of the spine. *Journal of spinal disorders*. 1999;12(1):17-26.
152. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PloS one*. 2009;4(3):e4944.
153. Fraser RD MR. Iatrogenic discitis. In: Govender S LJ, editor. *Inflammatory Diseases of the Spine*. 1st ed2003.
154. Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage ϕ MR11. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196(8):1237-47.
155. Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*. 2001;294(5549):2170-2.
156. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*. 2002;418(6900):884-9.
157. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(8):2765.
158. Bierry G, Jehl F, Prévost G, Mohr M, Meyer N, Dietemann J-L, et al. Percutaneous inoculated rabbit model of intervertebral disc space infection: magnetic resonance imaging features with pathological correlation. *Joint Bone Spine*. 2008;75(4):465-70.
159. Kay MK, Erwin TC, McLean RJ, Aron GM. Bacteriophage ecology in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* mixed-biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(3):821.
160. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M, Miyanaga K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157: H7 by a phage cocktail. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;64(2):270-4.
161. Gu J, Liu X, Li Y, Han W, Lei L, Yang Y, et al. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PloS one*. 2012;7(3):e31698.
162. Bedi MS, Verma V, Chhibber S. Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;25(7):1145-51.
163. Rahman M, Kim S, Kim SM, Seol SY, Kim J. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling*. 2011;27(10):1087-93.

164. Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(3):1220.
165. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(7):2874.

