

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SU KAYNAKLARINDAN KARBAPENEM DİRENÇLİ
ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINA ETKİLİ
BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

HAZIRLAYAN

SEZİN ÜNLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA - 2022

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SU KAYNAKLARINDAN KARBAPENEM DİRENÇLİ
ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINA ETKİLİ
BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

HAZIRLAYAN

SEZİN ÜNLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. AYLİN ÜSKÜDAR GÜÇLÜ

ANKARA - 2019

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Sezin Ünlü tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/07/2022

Tez Adı: Su Kaynaklarından Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarına Etkili Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

ONAY

Enstitü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 05 / 07 / 2022

Öğrencinin Adı, Soyadı: Sezin Ünlü

Öğrencinin Numarası: 21920069

Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Programı: Yüksek Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Doç. Dr. Aylin Üsküdar Güçlü

Tez Başlığı: Su Kaynaklarından Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarına Etkili Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümünden oluşan, toplam 43 sayfalık kısmına ilişkin, 05/07/2022 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %5'dir. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç

2. Alıntılar hariç

3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Tarih: 05/07/22

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan büyük gurur ve ayrıcalık duyduğum, hem manevi hem akademik desteğini her zaman arkamda hissettiğim, her zaman sabır ve anlayışla yanımda olan, yol gösteren, çözüm üreten, iyi bir araştırmacı olabilmem için elinden geleni yapan, akademik hayatımın kurucusu çok değerli tez danışmanım Doç. Dr. Aylin Üsküdar Güçlü'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım, desteğini hiç esirgemeyen, sonsuz güvendiğim, her zaman tecrübeleri ile yanımda olduğunu bildiğim, birlikte zevkle çalıştığım ve çalışmaktan çok onur duyduğum kıymetli Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet Celal Başustaoglu'na sonsuz teşekkür ederim.

Başkent Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarım, Prof. Dr. Seyyal Rota'ya, Dr. Öğr. Üyesi Hasan Cenk Mirza'ya gerek derslerde gerek derslerin dışında bilgi ve birikimlerini paylaştıkları ve akademik gelişimim için ellerinden geleni tereddütsüz yaptıkları için ayrıca çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tezimde kullandığım suşların temininde yardımcı olan Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Özlem Kurt Azap'a, tez dönemim boyunca laboratuvarında hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen çok sevgili arkadaşlarım, Gizem İnce Ceviz'e, Ilgın Ata Vural'a, Salih Danyıldız'a ve Süleyman Yalçın'a, sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi, manevi bütün desteğini hep üzerimde hissettiğim, bugünlere gelmemde en büyük emek sahibi olan ve onun kızı olmaktan her zaman gurur duyduğum çok kıymetli canım annem Hülya Saraycıklı'ya sevgi ve saygılarımı sunmayı borç bilirim. Son olarak üniversite hayatımın başından yüksek lisans eğitimimin sonuna kadar yanımda olan, her türlü endişemi paylaşan, mutluluğuma ortak olan Güneri Bartu Çelebi'ye desteği için çok teşekkür ederim.

ÖZET

ÜNLÜ S. Su Kaynaklarından Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarına Etkili Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı, Ankara, 2022.

Acinetobacter baumannii, birçok hastane enfeksiyonundan sorumlu Gram-negatif non-fermenter bir bakteriyel patojendir. *A. baumannii* keşfinden itibaren hem intrinsik mekanizmaları hemde kazanılmış direnç geliştirebilme yetenekleri nedeniyle birçok antibiyotiğe dirençli hale gelmiştir. Karbapenem dirençli *A. baumannii* (KDAB) suşlarının dünya çapında artan prevalansı, alternatif bir antimikrobiyal tedavi arayışına ve yeni terapötik stratejilerin gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bakteriyofajlar (faj) da çoklu ilaç dirençli (ÇİD) bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için umut verici adaylardır. Bu çalışmada atık su ve göl gibi çeşitli su kaynaklarından, KDAB izolatlarını enfekte eden faj izole etmek, bu fajların klinik izolatlardaki litik aktivitesini araştırmak ve izole edilen fajları karakterize etmek amaçlanmıştır. *A. baumannii*, Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik numunelerden izole edilmiştir. İzolatların karbapenem direnci disk difüzyon yöntemi ile saptanmıştır. Çalışmamızda, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} ve *bla*_{OXA} ve kromozomal *bla*_{OXA-51} karbapenem direnç genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile saptanmıştır. Klinik *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişki Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE) ile belirlenmiştir. Faj izolasyonu için çeşitli su kaynaklarından periyodik olarak su örneği alınmıştır. İzole edilen fajlar zenginleştirilip saflaştırıldıktan sonra litik aktiviteleri “spot test” ile belirlenmiştir. Fajların, “One-step growth” eğrileri “multiplicity of infection” (MOI) değerleri, ısı ve pH stabiliteleri değerlendirilmiştir. Fajların morfolojilerini ve taksonomik ailelerini belirlemek üzere transmisyon elektron mikroskop (TEM) görüntüleri alınmıştır. Fajların moleküler karakterizasyonu ve proteom analizleri için restriksiyon profilleri karşılaştırılmış ve Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-Page) uygulanmıştır. Klinik KDAB izolatlarının hepsinde kromozomal *bla*_{OXA-51} geni saptanırken, 73’ünde (n=73/96, %70) *bla*_{OXA-23}, 12’sinde (n=12/96, %12.5) *bla*_{OXA-24} geni olduğu bulunmuştur. İzolatların hiçbirinde *bla*_{OXA-58} genine rastlanmamıştır. PFGE analizine göre izolatlar 1 major olmak üzere 5 pulsotipe ayrılmıştır. Klinik KDAB izolatlarına karşı litik aktivite gösteren dört *A. baumannii* fajı Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi atık suyu,

Kütahya atık suyu, Kızılırmak ve Kırıkkale at harası atık suyundan izole edilmiştir. ϕ Ab65'nin latent periyodu 5 dk, ϕ Ab31 ve ϕ Ab69'nin 10 dk, ϕ Ab59'nin ise 15 dk olarak bulunmuştur. ϕ Ab31, ϕ Ab59, ϕ Ab65 ve ϕ Ab69'larının patlama boyutları ise sırasıyla, 3500, 1699, 2600 ve 118 PFU/CFU olarak hesaplanmıştır. Bütün fajların termal olarak stabil oldukları ve farklı pH aralıklarına toleranslı oldukları belirlenmiştir. TEM analizi sonucunda, fajlar, *Myoviridae* ailesine ait olarak teşhis edilmiştir. Restriksiyon analizi, bütün fajların birbirinden farklı restriksiyon profilinin olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada değerlendirilen fajların, daha ileri *in vivo* çalışmalar ve ÇİD bakterilerin tedavisinde terapötik bir ajan olarak kullanılmaya uygun olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, Bakteriyofajlar, Karbapenem Direnci, Moleküler Karakterizasyon

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA21/488) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

ÜNLÜ S. Isolation and Characterization of Bacteriophages from Water Sources Effective Against Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. Baskent University, Institute of Health Sciences, Department Of Medical Microbiology, Medical Microbiology Master's Program with Thesis, Ankara, 2022.

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative non-fermentative bacterial pathogen responsible for many hospital infections. Since its discovery, *A. baumannii* has become resistant to several antibiotics due to its intrinsic and acquired resistance mechanisms. The increasing prevalence of carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) has led to a search for alternative antimicrobial therapy and to the development of new therapeutic strategies. Bacteriophage (phage) therapy is a potential candidate for the treatment of multidrug-resistant (MDR) bacterial infections. In this study, it is aimed to isolate and characterize phages effective against CRAB from various water sources such as wastewater and lake and to investigate the lytic activity of these phages in clinical isolates. *A. baumannii* isolates were collected from different clinical specimens in Baskent University Ankara Hospital Infectious Diseases and Clinical Microbiology Laboratory. Carbapenem susceptibility was determined by disc diffusion method and Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to detect *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} and *bla*_{OXA-58} ve chromosomal *bla*_{OXA-51} carbapenem-resistance genes. The genetic relation between clinical *A. baumannii* isolates was determined by Pulsed-Field gel electrophoresis (PFGE). Water samples were taken periodically from various water sources for phage isolation. After the isolated phages were enriched and purified, their lytic activity was determined by a spot test. One-step growth curve, the multiplicity of infection (MOI), and thermal and pH stability of phages were evaluated. Transmission electron microscopy (TEM) was used to determine the morphologies and taxonomic families of phages. Restriction digestion and Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-Page) were applied for the molecular characterization and proteome analysis of phages. Chromosomal *bla*_{OXA-51} gene was detected in all of the clinical CRAB isolates, while *bla*_{OXA-23} was found in 73 of the isolates (n=73/96, 70%) and *bla*_{OXA-24} gene in 12 (=12/96, 12.5%). The *bla*_{OXA-58} gene was not detected in any of the isolates. PFGE revealed that the bacterial isolates were divided into 5 pulsotypes, including one major pulsotype. Four phages having lytic activity against CRAB *A. baumannii* were isolated from Baskent University

Ankara Hospital wastewater, Kütahya wastewater, Kızılırmak and Kırıkkale horse stud wastewater. For ϕ Ab65, the latent period was 5 min, while for ϕ Ab31 and ϕ Ab69, it was 10 min. The latent period of ϕ Ab59 was 15 min. The burst size of ϕ Ab31, ϕ Ab59, ϕ Ab65 and ϕ Ab69 was 3500, 1699, 2600 and 118 PFU/CFU, respectively. All phages were thermally stable and tolerant to a wide pH range. TEM analysis revealed that phages belonged to *Myoviridae* family. Restriction analysis demonstrated that isolated phages had distinct digestion profiles. Evaluated phages in this study were found to be promising for further *in vivo* experiments and for usage as therapeutic agents to treat MDR bacterial infections.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Bacteriophages, Carbapenem Resistance, Molecular Characterization

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project no: KA21/488) and supported by Baskent University Research Fund.

ÖNSÖZ

Acinetobacter baumannii, hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan Gram-negatif bir bakteridir. Hem intrinsik hemde kazanılmış direnç mekanizmaları sayesinde ilaçlara kolayca direnç geliştirebilen *A. baumannii*'nin ÇİD ve pan-drug resistant suşları dünya genelinde bildirilmektedir. Karbapenem dirençli *A. baumannii*'nin artan insidansı ve kolistin dirençli suşların bildirilmesi, alternatif tedavi arayışlarına sebep olmuştur. Antibiyotiklerin keşfi ile bakteriyofaj çalışmaları yavaşlamıştır. Fajlar, spesifik olarak bakterileri enfekte eder ve alternatif tedavi arayışı için umut verici ajanlar olmuştur. Çalışmamızda, karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarına karşı litik aktivite gösteren fajları izole ve karakterize etmek; böylece bu fajların terapötik ajan olarak uygun olup olmadıklarını araştırmak amaçlanmıştır. Bu çalışmada, karbapenem dirençli klinik *A. baumannii* izolatlarına karşı litik aktivite gösteren dört faj izole edilmiş ve bu fajların biyofiziksel stabiliteleri ve moleküler karakterizasyonları belirlenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	2
2.1.1. Patogenez ve klinik hastalıklar.....	2
2.1.2. Laboratuvar tanısı.....	4
2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> ve Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç.....	4
2.2.1. Karbapenemazlar.....	5
2.3. KDAB için Yeni Antimikrobiyal İhtiyacı.....	6
2.4. Bakteriyofajlar.....	7
2.4.1. Bakteriyofaj tarihçesi.....	7
2.4.2. Faj terapisi.....	7
2.4.3. Ticari faj üretimi.....	8
2.4.4. Fajların sınıflandırılması.....	8
2.4.5. “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV) sınıflandırması.....	10
2.4.6. Kuyruklu fajlar.....	10
2.4.7. Yapısal özellikleri.....	11
2.4.8. Yaşam döngüsü.....	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
3.1. Laboratuvarda Kullanılan Gereç ve Malzemeler.....	15
3.1.1. Gereçler.....	15
3.1.2. Besiyerleri, kimyasallar ve kitler.....	16
3.2. İzolat Profili.....	16
3.2.1. Antibiyotik duyarlılık testleri.....	16

3.2.2. <i>A. baumannii</i> genotiplendirmesi.....	17
3.2.3. Pulsed-Field jel elektroforezi.....	17
3.2.4. Karbapenem direnç genlerinin saptanması.....	18
3.2.4.1. Karbapenemaz genlerinin PZR ile saptanması.....	18
3.2.5. DNA izolasyonu.....	18
3.2.6. Primerler.....	18
3.2.6.1. PZR reaksiyon miksi.....	19
3.2.6.2. Amplifikasyon.....	19
3.2.6.3. PZR ürünlerinin jel elektroforezinde analizi.....	19
3.3. Bakteriyofajlar.....	20
3.3.1. Bakteriyofaj izolasyonu.....	20
3.3.2. “Spot test”.....	20
3.3.3. Faj pürifikasyonu.....	20
3.3.4. Faj solüsyonu hazırlanması ve titre sayımı.....	20
3.3.5. Fajların ısı ve pH stabiliteleri.....	21
3.4. Bakteriyofajların Karakterizasyonu.....	21
3.4.1. Transmisyon elektron mikroskopisi.....	21
3.4.2. Konak aralığının belirlenmesi.....	22
3.4.3. “ <i>Multiplicity of Infection</i> ” belirlenmesi.....	22
3.4.4. “ <i>One-step growth curve</i> ” deneyi.....	22
3.4.5. Bakteriyofaj proteom analizi.....	23
3.4.6. Bakteriyofaj nükleik asit izolasyonu.....	23
3.4.7. Bakteriyofaj genotiplendirme ve restriksiyon analizi.....	24
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	48

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Beta-laktamazların sınıflandırılması.....	5
Tablo 2. Bradley sınıflandırması.	9
Tablo 3. Faj ailelerinin sınıflandırılması ve özellikleri.....	10
Tablo 4. Karbapenem dirençli <i>A. baumannii</i> izolatlarının oksasilineaz genlerinin dağılımı.....	25
Tablo 5. Kolistin dirençli izolatların MİK değerleri.....	26
Tablo 6. Çalışmaya dahil edilen <i>A. baumannii</i> izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerin dağılımı.....	27
Tablo 7. <i>A. baumannii</i> izolatlarının pulsotiplerine göre dağılımı.....	27
Tablo 8. A pulsotipi <i>A. baumannii</i> izolatlarının oksasilineaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.....	29
Tablo 9. B pulsotipi <i>A. baumannii</i> izolatlarının oksasilineaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.	29
Tablo 10. C pulsotipi <i>A. baumannii</i> izolatlarının oksasilineaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.....	30
Tablo 11. D pulsotipi <i>A. baumannii</i> izolatlarının oksasilineaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.	32
Tablo 12. E pulsotipi <i>A. baumannii</i> izolatlarının oksasilineaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.....	32
Tablo 13. İzole edilen bakteriyofajların klinik <i>A. baumannii</i> izolatlarına karşı etkinlik yüzdeleri ve MOI değerleri.....	34
Tablo 14. Faj etkinliklerinin pulsotiplere göre dağılımı.....	35
Tablo 15. İzole edilen fajların restriksiyon profilleri.	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. <i>Myoviridae</i> (a), <i>Siphoviridae</i> (b) ve <i>Podoviridae</i> (c) fajlarının temsili yapıları.....	11
Şekil 2. Fonksiyonel bir fajın oluşum aşamaları.....	12
Şekil 3. Fajların yaşam döngüsü.....	14
Şekil 4. <i>A. baumannii</i> izolatlarının PFGE dendogramı.....	28
Şekil 5. İzole edilen a) ϕ Ab31, b) ϕ Ab59, c) ϕ Ab65 ve d) ϕ Ab69'un plak görünümüleri.....	33
Şekil 6. MOI'si 1 PFU/CFU olarak belirlenen fajın MOI plaklarının görünümü....	34
Şekil 7. Fajların “ <i>One-step growth curve</i> ” görüntüleri.....	35
Şekil 8. Farklı pH aralıklarında a) ϕ Ab31, b) ϕ Ab59, c) ϕ Ab65 ve d) ϕ Ab69'un stabiliteleri.....	36
Şekil 9. pH 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 değerlerindeki faj plaklarının besiyerlerinde görünümü.....	37
Şekil 10. Farklı ısı aralıklarında a) ϕ Ab31, b) ϕ Ab59, c) ϕ Ab65 ve d) ϕ Ab69'un stabiliteleri.....	37
Şekil 11. a) ϕ Ab31 ve b) ϕ Ab59 c) ϕ Ab65 ve d) ϕ Ab69 tranmisyon elektron mikroskopi görüntüleri.....	38
Şekil 12. EcoRV restriksiyon enziminin jel elektroforez analizi ve fajların restriksiyon profilleri.....	39
Şekil 13. Sırasıyla, HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleriyle kesilmiş ϕ Ab69, ϕ Ab31, ϕ Ab65 ve ϕ Ab59'un restriksiyon profilleri.....	40
Şekil 14. ϕ Ab69, ϕ Ab59, ϕ Ab31 ve ϕ Ab65'in SDS-Page analizi.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BAVS	Bacterial and Archaeal Subcommittee
CDC	Centers for Disease Control
CFU	colony-forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇİD	çoklu ilaç dirençli
DL	çift katmanlı
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EDTA	etilendiamin tetra asetik asit
EHEC	enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIBMV	Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology, and Virology
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EtBr	etidyum bromür
Faj	bakteriyofaj
GSBL	genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
HIET	Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy
HST	hücre süspansiyon tamponu
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IMP	imipenemaz
KDAB	karbapenem dirençli <i>A. baumannii</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemazları
KVC	kardiyovasküler cerrahi
LB	Luria broth
LPS	lipopolisakkaritler
MBL	metallo- β -laktamazlar
MİK	minimum inhibisyon konsantrasyonları
MOI	multiplicity of infection
NDM	New-Delhi-metallo-beta-laktamaz
OMP	dış membran porinleri
OMV	dış membran vezikülleri
OXA	oksasilinazlar
PBP _s	penisilin bağlayan proteinler

PDR	pan-drug resistant
PFGE	pulsed-field jel elektroforezi
PZR	polimeraz zincir reaksiyonu
SDS-Page	sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SIM	Seoul imipenemase
TBE	tris-borat EDTA
VIM	Verona integron-encoded-metallo-beta-laktamaz



1. GİRİŞ

Taksonomik sınıflandırmaya göre *Moraxellaceae* familyasında bulunan *Acinetobacter* cinsi üyeleri içerisinde, *A. baumannii* dünya çapında hastane kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkili en önemli patojendir [1]. *A. baumannii*'nin antibiyotiklere hızla direnç geliştirdiği ve çoklu ilaca dirençli (ÇİD) suşlarının izole edildiği bildirilmektedir [2]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), *A. baumannii*'yi antibakteriyel ilaçlardan etkili bir şekilde kaçabilen en önemli ESKAPE mikroorganizmalarından (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) biri olarak bildirmiştir [3]. ÇİD *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonların ve salgınların yaygınlığı nedeniyle, bu patojenin neden olduğu hastalıkların tedavisinde etkin kullanılan antibiyotik sayısı azalmaktadır [4]. *A. baumannii*'nin aminoglikozidler, sefalosporinler, karbapenemler, tigesiklin ve kolistin dahil olmak üzere çeşitli antibiyotik sınıflarına karşı direnç geliştirdiği gösterilmiştir [5].

Dünya genelinde artan antibiyotik direnci insidansı, alternatif bir antimikrobiyal tedavi arayışına yol açmıştır. Bakteriyofajlar (faj), bakterileri enfekte eden virüslerdir ve biyosferdeki en yaygın ve çeşitli türler arasındadır. Bakterilerin bulunduğu her yerde bulunan fajlar, dünyada, bakteriler de dahil olmak üzere diğer tüm organizmalardan daha çok sayıda (10^{31} 'den fazla) bulunmaktadır [6]. Keşiflerinden itibaren bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde, fajların potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak görülmesinin nedeni, hızlı hücre lizisi ile sonuçlanan bir bakteriyel konağı tanıyabilmeleri, bağlanabilmeleri ve içinde çoğalabilmeleridir [7]. Faj terapi, son yıllarda antimikrobiyal direnç oranlarındaki artışla yeniden gündeme gelmiştir ve *A. baumannii* de dahil olmak üzere Gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için fajların kullanımına artan bir ilgi vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii, *Moraxellaceae* ailesine mensup *Acinetobacter* cinsi içerisinde yer alan bir bakteri türüdür [8]. *A. baumannii*, *Acinetobacter* cinsinin en önemli ve en yaygın üyesi olup insan sindirim sisteminde bulunabilen Gram-negatif, oksidaz-negatif, katalaz-pozitif, non-fermenter, hareketsiz, aerobik bir kokobasildir. *Acinetobacter* türleri arasında *A. baumannii* dünya çapında hastane kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkili en önemli üyedir [1].

2.1.1. Patogenez ve klinik hastalıklar

A. baumannii, hastane kaynaklı pnömoni, cilt ve idrar yolu enfeksiyonları dahil olmak üzere dünya çapında hastane enfeksiyonlarının önde gelen nedenlerinden biri haline gelmiştir [8, 9]. *A. baumannii*, düşük dereceli bir patojen olarak kabul edilmesine rağmen ventilatör ilişkili pnömoni, deri, kan dolaşımı, idrar yolu ve diğer yumuşak dokuların fırsatçı enfeksiyonlarından sorumlu önemli bir patojendir [10].

Genomik ve fenotipik analizler ile *A. baumannii*'nin, patojenitesinden sorumlu birçok virülans faktörü tanımlanmış olmasına rağmen diğer Gram-negatif patojenlerle karşılaştırıldığında *A. baumannii*'de nispeten daha az virülans faktörü bulunmaktadır [2]. Bunlar arasında, dış membran porinleri (OMP), fosfolipazlar, proteazlar, lipopolisakkaritler (LPS), kapsüler polisakkaritler, protein salgılama ve demir şelatlama sistemleri bulunmaktadır [2,4,11].

A. baumannii'nin çok çeşitli antibiyotik direnç mekanizmaları ve virülans faktörleri arasında, OMP olarak adlandırılan, hücresel geçirgenliği modüle etmekte görevli dış zar proteinleri, dağılımları ve önemli fonksiyonları nedeniyle en önemli virülans faktörlerinden biridir [12]. *A. baumannii* dış zarı, OmpA, CarO, OprD-benzeri OMP'ler, OMP33-36 kDa, AbuO, TolB vb. dahil olmak üzere çok sayıda OMP'ye sahiptir [13,14].

Bu OMP'leri arasında, OmpA, *A. baumannii*'nin adezyonunda, biyofilm oluşumunda ve konağın immün yanıtını regüle etmede kilit rol oynayan önemli bir virülans faktörüdür [15]. OmpA, epitel hücreler üzerinde biyofilm oluşumuna katkı sağlayarak ve hücre yüzeyindeki fibronektin ile etkileşime girerek *A. baumannii*'nin akciğer epitel hücrelerine yapışmasına aracılık eder [16,17]. OmpA'nın aşırı üretimi, hastane kaynaklı pnömoni, bakteriyemi ve *A. baumannii*'ye bağlı ölüm ile ilişkilendirilir [18]. Buna ek olarak, OmpA'nın antimikrobiyal dirençte de rol oynadığı bilinmektedir ve *ompA* genindeki bir

bozulma sonucunda kloramfenikol, aztreonam ve nalidiksik asit ilaçlarının minimum inhibisyon konsantrasyonlarında (MİK) azalma saptanmıştır [19].

Ekstraselüler polisakaritler, bakteri hücre zarfının başlıca immünojenik bileşenleridir. *A. baumannii*'nin zarf yapısı da patojenitesine katkıda bulunan faktörlerle ilişkilidir. Bunlar arasında kapsüler ekzopolisakkaritler ve LPS bulunmaktadır [4]. 2015 yılında yapılan bir çalışmada incelenen tüm klinik *A. baumannii* izolatlarının, ekzopolisakkarit kapsül gibi kompleks polisakkaritlerin üretiminden sorumlu korunmuş bir gen kümesi olan "K lokusu" içerdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda bu ekzopolisakkarit kapsülün konak serumuna karşı bakteriye koruma sağladığı ve hayvan enfeksiyon modellerinde *A. baumannii*'nin virülansını arttırdığı da bilinmektedir [20].

Fosfolipid metabolizması için gerekli olan ve birçok bakteri için virülans faktörü olan lipolitik enzim fosfolipazlar üç sınıfa ayrılmaktadır; fosfolipaz A, fosfolipaz C (PLC) ve fosfolipaz D (PLD). PLC ve PLD, *A. baumannii*'de virülans faktörleri olarak tanımlanmıştır [4].

Bakterilerin dış zarından oluşan dış membran vezikülleri (OMV), fosfolipidler, LPS'ler, OMP'ler ve periplazmik proteinler içermektedir [21]. Gram-negatif bakterilerin salgıladığı OMV'ler, bakteriyel efektörleri konak hücrelere taşıyan dağıtım araçlarıdır. OMV'ler, konak hücre içine çeşitli virülans faktörleri iletmektedir. Böylece, bakteri ve konak hücreler arasında yakın temas olmaksızın, patojenlerin konak ile etkileşime girmesine izin vermektedir [22]. *A. baumannii*'nin salgıladığı OMV'ler arasında OmpA, proteazlar ve fosfolipazlar gibi virülans faktörleri bulunmaktadır [23].

A. baumannii ayrıca demir bağlayan sideroforlara sahiptir. Bunlar içince asinetobaktin, en iyi karakterize edilmiş siderofor virülans faktörüdür. Bir *in vivo* çalışma, *A. baumannii* ATCC 19606 suşunda asinetobaktin biyosentezi ve taşıma işlevinin bozulması sonucunda bakterilerin epitel hücreler içinde kaldığını ve böylece hücre hasarında ve enfekte farelerin ölümünde önemli ölçüde bir azalma olduğunu bildirmiştir [24].

A. baumannii için çeşitli protein salgılama sistemleri tanımlanmıştır. Tip II ve tip VI salgılama sistemleri, sırasıyla, T2SS, ve T6SS, bunlardan bazılarıdır [4]. T2SS'nin, farelerde *A. baumannii* kolonizasyonu ve enfeksiyonunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Birçok *A. baumannii* suşu, çevredeki bakteri hücrelerine toksik efektör proteinler vermek için T6SS kullanmaktadır [25,26].

2.1.2. Laboratuvar tanısı

A. baumannii, koyun kanlı agar, triptik soy agar, eozin metilen blue agar ve MacConkey agarda kolaylıkla üreyebilen bir bakteridir. Kanlı agarda, 0.5-2mm çapında şeffaf ve opak koloniler oluşturlar [27]. *A. baumannii*'nin laboratuvar tanısı için kullanılan biyokimyasal reaksiyonlardan; indol, gaz, H₂S, Voges-Proskauer, oksidaz, üreaz, testleri negatif, katalaz ve sitrat testleri pozitif reaksiyon verir.

2.2. *Acinetobacter baumannii* ve Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç

Beta-laktam grubu antibiyotikler, çok sayıda klinik endikasyonla en sık reçete edilen ilaç sınıflarından biridir. 1930'lu yıllardan itibaren kullanılmaya başlanmasıyla, bakteriyel hastalıklara karşı mücadeleyi büyük ölçüde değiştiren beta-laktam grubu antibiyotikler, toplam antibiyotik pazarının %65'ini oluşturlar [28]. Beta-laktam grubu antibiyotiklerin moleküler yapısında ortak olarak bir azot ve üç karbon içeren beta-laktam halkası bulunur. Beta-laktam grubu antibiyotikler arasında penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler vardır. Monobaktamlar dışındaki beta-laktam antibiyotiklerinde beta-laktam halkası beş ya da altı üyeli başka bir halka ile birleşmiştir [29, 30]. Bu antibiyotikler, bakteri hücre duvarı sentezinden sorumlu olan ve penisilin bağlayan proteinlere (PBP) etki ederler. Beta-laktam antibiyotikler PBP'lere kovalent ve geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve böylece hücre duvarı sentezini bozup transpeptidasyonu inhibe ederler [30].

Antibiyotik direnç mekanizmaları; antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonu ya da modifikasyonu, antibiyotiğin bakteride hedef aldığı bölgede değişiklik, dış membran geçirgenliğinin azalması sonucu bakteri hücreğine antibiyotik girişinin engellenmesi ya da azalması ve eflüks pompasıyla bakteri hücreğine giren antibiyotiğin dışarı atılması ve bu mekanizmaların kombinasyonları şeklinde olagelir. Gram-negatif bakterilerde beta-laktamlara karşı en yaygın direnç mekanizması, beta-laktam halkasının beta-laktamaz enzimleriyle hidrolize olmasıdır [31].

Beta-laktamaz enzimleri iki ana sınıfa ayrılır; Ambler ve Bush–Jacoby sınıflandırması. Ambler sınıflandırması, amino asit dizi homolojisinden yararlanarak beta-laktamazları Sınıf A, B, C ve D olarak sınıflarken Bush–Jacoby sınıflandırması substrat hidroliz profillerine (penisilin, sefalosporin, geniş spektrumlu sefalosporin, karbapenem) ve inhibitör profiline (β -laktamaz inhibitörleri, klavulanat ve tazobaktam, tarafından inhibisyon) göre Grupları 1, 2, 3 ve 4 olarak sınıflandırmaktadır (Tablo 1) [32,33].

Tablo 1. Beta-laktamazların sınıflandırılması.

Bush-Jacoby Grupları	Ambler Sınıflaması	Ayırt Edici Substratlar	Klavulanik asit, veya tazobaktam ile inhibisyon	Örnek Enzimler
1	C	Sefalosporinler	Hayır	AmpC, ACC
1e	C	Sefalosporinler	Hayır	CMY-10
2a	A	Penisilinler	Evet	BlaZ(PCI)
2b	A	Penisilinler, dar spektrumlu sefalosporinler	Evet	TEM-1,TEM-2
2be	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	Evet	TEM-3, SHV-2
2br	A	Penisilinler, dar spektrumlu sefalosporinler	Hayır	TEM-30,SHV-10
2ber	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	Hayır	TEM-50
2c	A	Karbenisilin	Evet	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Karbenisilin, sefepim	Evet	RTG-4
2d	D	Oksasilin	Evet	OXA-1
2de	D	Geniş spektrumlu sefalosporinler	Evet	OXA-11
2df	D	Karbapenemler	Evet	OXA-23, OXA-48
2f	A	Karbapenemler	Hayır	KPC-2, IMI-1
3a	B	Karbapenemler	Hayır	NDM-1, VIM-1

* 32 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır.

2.2.1. Karbapenemazlar

2014 Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi verilerine göre Türkiye’de *Acinetobacter* spp’de %66 olan ÇİD ve %89 olan karbapenem direnci, 2019 yılında sırasıyla %80 ve %90 olarak bildirilmiştir [34]. Karbapenemler, dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu aktiviteye sahip beta-laktam antibiyotiklerdir [35]. Ancak karbapenemin artan klinik kullanımı, yüksek direnç oranının ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Karbapenem dirençli *A. baumannii*’de (KDAB) en yaygın direnç mekanizması, başta oksasilinaz (OXA) tipi enzimler (D Sınıfı) ve metallo- β -laktamazlar (MBL’ler) (Sınıf B) olmak üzere karbapenemaz üretimidir. KDAB’de en yaygın olarak tanımlanan dört OXA tipi karbapenemaz kodlayan gen; *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-24}* ve *bla_{OXA-58}*’dir. *bla_{OXA-51}* ise *A. baumannii*’de kromozomal olarak kodlanan intrinsik karbapenemazdır [36].

Ambler sınıflamasına göre karbapenemazlar A, B ve D sınıflarında yer almaktadır. Ambler sınıf A karbapenemazlar, penisilinlere ve aztreonam'a direnç gösterebilen kromozomal SME ve IMI ailelerini ve ayrıca tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç gösteren plazmit ile kodlanan *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazlarını (KPC) içermektedir [37]. Bu enzim grubu, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardan (GSBL), TEM, SHV ve CTX-M enzim ailelerini kapsamaktadır. A sınıfı beta-laktamazların *A. baumannii*'de oldukça yaygın olduğu görülmektedir [38]. KDAB'de, yakın zamanda plazmit ve/veya integron ile kodlanan Ambler sınıf A serin karbapenemazlar olan KPC-2, KPC-3, KPC-4, KPC-10 ve GES-14 saptanmıştır [39].

A. baumannii'de dört tip metallo-beta-laktamaz olarak adlandırılan Sınıf B beta-laktamaz tanımlanmıştır ve bunlar; IMP (imipenemaz), VIM (Verona integron-encoded-metallo-beta-laktamaz), NDM (New-Delhi-metallo-beta-laktamaz) ve SIM'dir (Seoul imipenemaz) [40]. Metallo-beta-laktamazların aktif bölgelerinde serin yerine çinko iyonu (Zn^{+2}) bulunmaktadır. Diğer karbapenemazların aksine, metallo-beta laktamazlar, beta-laktam inhibitörleriyle inhibe olmazlar, fakat EDTA gibi katyon şelatları ile inhibe olmaktadır [41]. IMP ilk kez 1991 yılında Japonya'da *Serratia marcescens*'te saptanmıştır. Üç farklı filogruptan toplamda altı IMP varyantı *A. baumannii*'de tanımlanmıştır ve bunlar IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6 ve IMP-11'dir [42, 43].

C sınıfı beta-laktamazlar ise bütün *A. baumannii*'lerde bulunan kromozomal olarak kodlanmış intrinsik sefalosporinazlardır (*Acinetobacter* türevli sefalosporinaz).

Oksisilinazlar veya karbapenem hidrolize edici sınıf D β -laktamazlar olarak da adlandırılan D sınıfı beta-laktamazlar, tüm beta-laktamları (esas olarak OXA-10 ailesi) inaktive edebilmektedir ve karbapenem direncinin ana mekanizmasını oluşturmaktadır. Hem kromozomda hem de plazmitlerde bulunabilen bu *bla*_{OXA} genleri arasında *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143} ve *bla*_{OXA-235} genleri bulunmaktadır [44].

2.3. KDAB için Yeni Antimikrobiyal İhtiyacı

Antibiyotik direnci küresel bir sorun haline gelmiştir. Antibiyotiklerin fazla ve yanlış kullanılması, kolistin gibi son çare antibiyotiklerin tarım ve hayvancılıkta da kullanıma girmesi bakterilerde antibiyotik direncinin artmasına sebep olmuştur. KDAB suşlarının artan insidansı, alternatif bir antimikrobiyal tedavi arayışına yol açmıştır. *A. baumannii*, bakteriyofaj tedavisi gibi yeni terapötik stratejilerin acil olarak araştırılmasını ve geliştirilmesini gerektiren en öncelikli patojenlerdendir.

2.4. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar; okyanuslar, denizler, topraklar, içtiğimiz sular ve yediğimiz yemekler dahil olmak üzere her yerde yaygın olarak bulunurlar. Yeryüzünde 10^{30} ila 10^{32} arasında faj olduğu tahmin edilmektedir; bakteriler de dahil olmak üzere dünyadaki bütün organizmaların toplamından fazladır. Fajlar, ekosistemde mikrobiyal dengenin korunmasında kilit rol oynarlar [45, 46]. Fajlar, spesifik olarak bakterileri enfekte eden ve bakterilerde replike olan ve ökaryot hücrelere zararsız olan virüslerdir [46].

2.4.1. Bakteriyofaj tarihçesi

Ernest Hanbury Hankin 1896 yılında, Hindistanda bulunan Ganj ve Yamuna Nehirlerinin birçok bakteri türüne karşı özellikle de *Vibrio cholerae*'ya karşı antiseptik özelliği olduğunu bildirmiştir. Modern faj çalışmalarının, Frederick W. Twort'un 1915 yılında gerçekleştirdiği bir gözlem ile başladığı bilinmektedir. Fakat, Félix d'Herelle'in öncü çalışmasından sonra, Twort'un raporunun bakteriyofajlarla ilgili olduğu kabul edilmiştir [45]. Bakteriyofajlar, bağımsız olarak 1915 yılında Twort ve 1917 yılında Félix d'Hérelle tarafından keşfedilmiştir [47,48]. Twort, mikrokok kolonilerinin "camsı dönüşümünü" tanımlarken, d'Hérelle *Shigella*'ya karşı bir "anti-mikrop" izole etmiştir. Hemorajik dizanteri salgınını araştırmak üzere Paris Pasteur Enstitüsü'nde çalışan d'Hérelle, hasta insanların dışkılarını filtrelemiş ve bakterisiz filtratlar elde etmiştir. Filtrelenen dışkıları *Shigella* izolatları ile inkübe etmiş ve besiyeri üzerine yaymıştır. Bu "anti-mikrobun" bakterilere antagonist olduğunu ve agar üzerinde bakterilerin lizisine sebep olduğunu belirtmiş ve bunlara plak adını vermiştir. "bakteri yiyen" anlamına gelen "bakteriyofaj" terimini ilk kez tanımlamıştır [45, 49, 50].

2.4.2. Faj terapisi

Bakteriyofajların keşfinden kısa bir süre sonra, d'Herelle, 1919 yılında Hôpital des Enfants-Malades Paris'te dizanteriyi tedavi etmek için fajları terapötik olarak kullanmaya yönelik ilk girişiminde bulunmuştur. Faj preparatı 12 yaşında şiddetli dizantesi olan çocuğun tedavisi için hazırlanmış ve güvenli olduğunu teyit etmek üzere, d'Herelle, Hutinel ve hastane stayjerleri tarafından çocuğa verilmeden önce yutulmuştur. Tek doz anti-dizanteri faj uygulamasının hemen ardından hastanın semptomları kaybolmuş ve birkaç gün içerisinde tamamiyle iyileşmiştir. 1921 yılında Richard Bruynoghe ve Joseph Maisin, cerrahi olarak açılan lezyonların üzerine faj enjekte ederek enfeksiyonda 24 ila 48 saat içerisinde gerileme olduğunu raporlayarak stafilokokal deri sendromunu tedavi etmiştir [51].

2.4.3. Ticari faj üretimi

D'Herelle, Fransa'daki laboratuvarında çeşitli bakterilere karşı etkinliğini saptadığı en az beş adet faj preparatı hazırlamıştır ve Bacté-rhino-phage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage, ve Bacté-staphy-phage olarak isimlendirilen bu faj preparatlarını daha sonradan L'Oréal olarak bilinen Fransız bir şirkete pazarlamıştır [52]. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1940 yıllarında *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* ve diğer bakteriyel patojenlere karşı aktivite gösteren terapötik fajlar üretilmeye başlanmıştır. Ticari amaçla üretilen bu faj preparatları, apseler, yaralar, vajinit, akut ve kronik üst solunum yolu enfeksiyonları ve mastoid enfeksiyonların tedavisi amacıyla kullanılmıştır, fakat antibiyotiklerin keşfi ve kullanıma girmesiyle terapötik faj üretimi birçok batı ülkesinde durmuştur [51]. Buna rağmen, Doğu Avrupa'da ve Sovyet Rusya'da fajlar, antibiyotiklerle ya da antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmaya devam etmiştir. 1923 yılında Giorgi Eliava ve D'Herelle tarafından kurulan “*Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology, and Virology*” (EIBMV) ve 1952 yılında kurulan “*Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy*” (HIET) enstitüleri, sırasıyla, Gürcistan ve Polonya'da aktivitelerine devam etmiştir [51].

2.4.4. Fajların sınıflandırılması

Tarihsel olarak fajlar PCR, dizileme veya bugün bildiğimiz birçok moleküler yöntemin olmadığı zamanlarda morfolojilerine göre sınıflandırılmıştır [53]. Kuyruklu fajların taksonomik olarak sınıflandırılması, elektron mikroskopi görünümüne göre, A (kasılabilen kuyruklu), B (uzun, kasılamayan kuyruklu) ve C (kısa, kasılamayan kuyruklu) olmak üzere 3 morfolipte sınıflandıran David Bradley'in öncü sınıflandırma çalışmasına dayanmaktadır. 1967 yılında Bradley fajları, morfolojik yapılarına ve nükleik asit çeşitlerine göre 6 gruba ayırarak sınıflandırmıştır. Nükleik asit çeşitlerine göre ise çift sarmallı DNA içeren fajlar A, B ve C grubunda yer alırken tek sarmallı DNA içeren fajlar D ve F grubunda, RNA içerenler ise E grubunda yer almıştır (Tablo 2) [54].

Bradley sınıflandırmasına göre, T4, λ , PM2, Φ X174, MS2 ve fd fajları olmak üzere toplamda altı faj cinsinin olduğu kabul edilmiştir [54]. Bu sınıflandırmanın yapıldığı tarihte, yalnızca 111 tane faj varlığı bilinmekteydi [55].

Tablo 2. Bradley sınıflandırması.

Bradley Grupları	Özellikleri	Nükleik Asit
A	Kasılabilen, kuyruklu fajlar	DNA
B	Kasılamayan, uzun kuyruklu fajlar	DNA
C	Kasılamayan, kısa kuyruklu fajlar	DNA
D	Kuyruksuz, büyük kapsomerli fajlar	DNA
E	Kuyruksuz, küçük kapsomerli fajlar	RNA
F	Filamentöz fajlar	DNA

* 54 no'lu referanstan uyarlanmıştır.

Bradley'in ardından, Hans W. Ackermann ve Abraham Eisenstark 1974 yılında, 672 kuyruklu ve yapısı isometrik veya filamentöz olan 33 fajı dahil ederek bir sınıflandırma yapmıştır. Bu sınıflandırmaya göre fajları dört ana grupta incelemiş, 17 morfolojik gruba ayırmıştır [56];

- 1- Kuyruklu Bakteriyofajlar
- 2- Kübik Simetrili Bakteriyofajlar
- 3- Filamentöz Bakteriyofajlar
- 4- Nükleik Asiti Bilinmeyen Bakteriyofajlar

Kuyruklu fajlar grubunda, çift-sarmallı DNA içeren, zarfları bulunmayan fajlar yer almış ve bu fajlar da kuyruk boyları baz alınarak, Bradley sınıflandırmasına göre, kısa, uzun ya da kasılabilen kuyruklu fajlar olarak üçe ayrılmıştır. Her bir grup yine fajların baş şekillerine göre üçer alt gruba daha ayrılmıştır [56].

Kübik simetrili fajlar ise, a) tek sarmallı DNA içeren, zarfsız ve 30 nm çapındaki fajlar, b) DNA taşıyan, zarfsız ve 60 nm çapındaki fajlar, c) çift sarmallı DNA içeren ve lipid zarflı fajlar, d) tek sarmallı RNA içeren, zarfsız fajlar ve e) çift sarmallı RNA içeren, lipid zarflı fajlar olarak beş gruba ayrılmıştır [56].

Filamentöz fajlar grubunda bulunan fajların ise hepsi tek sarmallı DNA içeren zarfsız fajlardır. Bu fajlar da kısa ya da uzun filamentöz yapılı olarak iki alt gruba ayrılmıştır [56].

Nükleik asiti bilinmeyen fajlar ise, a) 33 nm çapında, kübik partiküllü *Clostridium* fajı, b) 31-35 nm çapında, kübik partiküllü *Mycoplasma* fajı ve c) oval şekilli, zarflı, 50-120 nm çapında, *Arholeplasma* fajı olarak üç alt gruba ayrılmıştır [56].

Ackermann'ın 2000 yılında güncellediği sınıflandırmasına göre fajlar 13 aile içerisinde sınıflanmış ve 140'tan fazla bakteriye etkili bulunmuştur (Tablo 3) [57].

Tablo 3. Faj ailelerinin sınıflandırılması ve özellikleri.

Morfolojik Gruplar	Nükleik Asit	Aileler	Özellikleri
Kuyruklu Fajlar	dsDNA	<i>Myoviridae</i>	Kasılabilir kuyruk
		<i>Siphoviridae</i>	Uzun, kasılamayan kuyruk
		<i>Podoviridae</i>	Kısa kuyruk
Polihedral Fajlar	ssDNA	<i>Microviridae</i>	Polihedral kapsid
	dsDNA	<i>Corticoviridae</i>	Polihedral kapsid
	dsDNA, L	<i>Tectiviridae</i>	Lipid vesiküller
	ssRNA	<i>Leviviridae</i>	-
	dsRNA	<i>Cystoviridae</i>	Lipid zarf
Filamentöz Fajlar	ssDNA	<i>Inoviridae</i>	Uzun filamenter
	dsDNA	<i>Lipothrixviridae</i>	Lipid zarf
	dsDNA	<i>Rudoviridae</i>	TMV-benzeri
Pleomorfik Fajlar	dsDNA	<i>Plasmaviridae</i>	Lipid zarf
		<i>Fuselloviridae</i>	Limona benzer şekil

* 57 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır.

ds: Çift zincirli, ss: Tek zincirli, L: lineer.

2.4.5. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) sınıflandırması

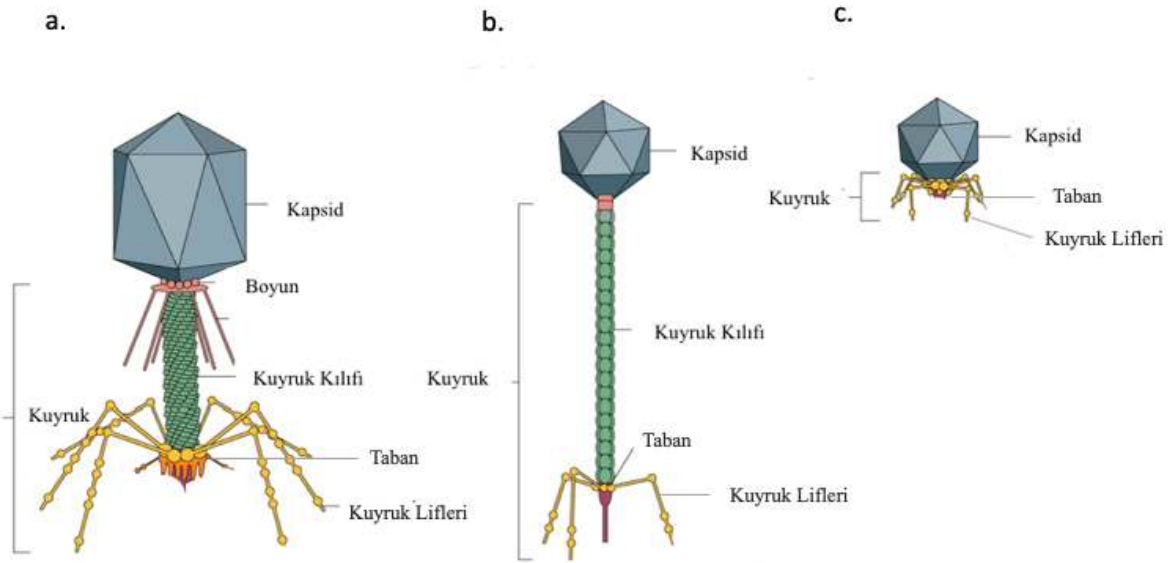
Virüslerin taksonomik sınıflandırması ve virüs taksonlarının adlandırılması, “*International Committee on Taxonomy of Viruses*” (ICTV) ve ICTV'nin fajlara odaklanan “*Bacterial and Archaeal Subcommittee*” (BAVS) tarafından sürdürülmektedir. Bu sınıflandırma, faj genomunun moleküler yapısı (tek sarmallı/çift sarmallı DNA/RNA), viral kapsid yapısı, zarflı/zarfsız oluşu, konak aralığı, patojenitesi ve dizi benzerliğine dayanmaktadır [58].

2.4.6. Kuyruklu fajlar

Bütün kuyruklu fajları kapsayan *Caudovirales* takımı, Ackermann tarafından 1998 yılında teklif edilip kabul edilmiştir. 2000'li yılların başında genomik çağın doğuşuyla birlikte, faj genom dizi analizleri, özellikle *Caudovirales* takımına ait bakteriyofajlarda, yüksek bir genomik çeşitlilik olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmalar, üç morfolojik aile içinde (*Podoviridae*, *Myoviridae* ve *Siphoviridae*) ilk alt ailelerin oluşmasına sebep olmuştur [59]. 2008 yılında, üç caudoviral familya *Myoviridae*, *Podoviridae* ve *Siphoviridae* sadece 18 cins ve 36 tür içermektedir. Veritabanlarındaki faj genomlarının sayısı arttıkça, bu üç ailenin monofiletik olmadığı anlaşılmıştır. İlk faj genom tabanlı ağ gösterimi olan “*The*

Phage Proteomic Tree” ve diğer birçok araç ve yayın ile parafiletik gruplar gösterilmiştir. Bu kanıtlara dayanarak, BAVS, yeni, genom temelli aileler tanımlayarak, daha önce örtüşen kuyruklu faj gruplarını ayırmaya başlamıştır [59]. 2016 yılında ise *Caudovirales* takımı altı alt aile, 80 cins ve 441 tür içermekteydi [60]. Ağ tabanlı yaklaşımlar ve meta-analizler sonucunda *Myoviridae* ailesine üç yeni alt aile; *Ackermannviridae*, *Chaseviridae* ve *Herelleviridae*, *Siphoviridae* ailesine iki yeni alt aile; *Demerecviridae* ve *Drexelviriidae* ve *Podoviridae* ailesine bir yeni alt aile *Autographiviridae* ailesi resmi olarak eklenmiştir [59].

Kuyruklu fajlar, tüm fajların %96’sını oluşturur [61]. Uzun, kasılamayan kuyruklu faj ailesi *Siphoviridae* (örneğin, λ , HK97, SPP1, p2, TP901-1) kuyruklu fajların %61’ini oluşturmaktadır. Uzun, düz, kasılabilen kuyrukları ile karakterize *Myoviridae* fajları (örneğin, T4, ϕ 92, ϕ KZ) %25, kısa, kasılamayan kuyruklu *Podoviridae* fajları (örneğin, ϕ 29, T7, P22) ise kuyruklu fajların %14’ünü oluşturmaktadır (Şekil 1) [62, 63].



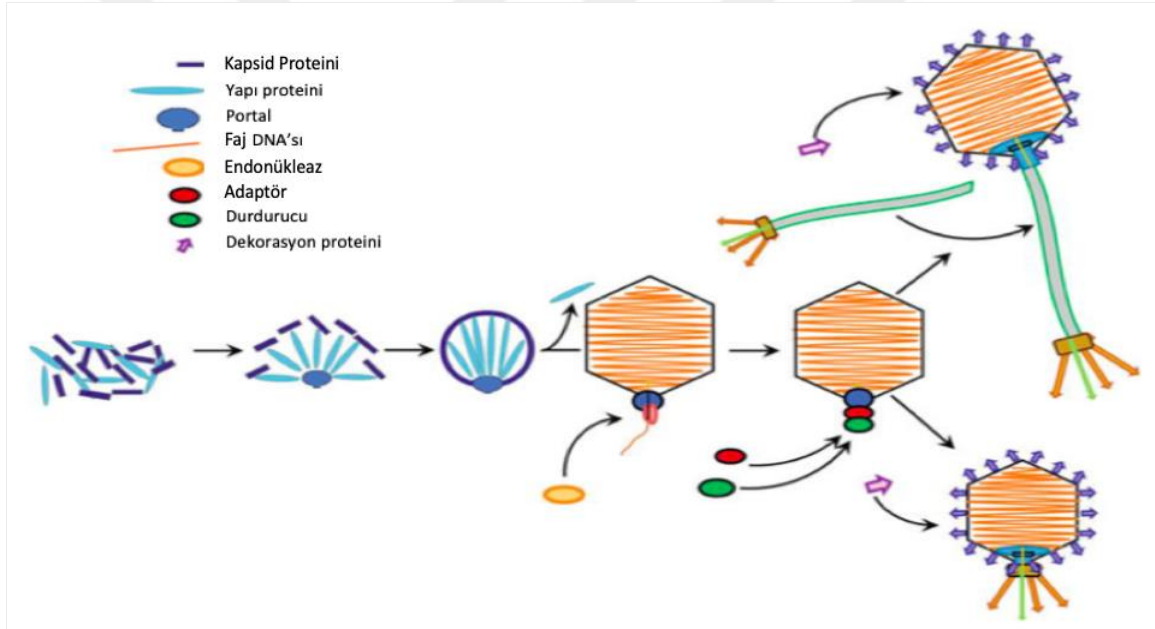
Şekil 1. *Myoviridae* (a), *Siphoviridae* (b) ve *Podoviridae* (c) fajlarının temsili yapıları (63 no’lu kaynaktan uyarlanmıştır).

2.4.7. Yapısal özellikleri

Faj genomu tek sarmallı/çift sarmallı, DNA ya da RNA’dan oluşmaktadır. Bu genetik materyal, kapsid içerisine paketlenmiştir. *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* ve *Cystoviridae* ailelerinde polihedral kapsid bulunurken *Inoviridae* ailesinde filamentli, *Plasmaviridae* ailesinde pleomorfik ve *Caudovirales* ailesinde ise kapsid, bir

kuyruğa bağlıdır [64]. Bugüne kadar izole edilmiş fajların büyük bir çoğunluğu kuyrukludur ve çift sarmallı DNA genomuna sahiptir. *Caudovirales* üyeleri arasında kapsid çapları genom boyutuna bağlı olarak 45 ile 185 nm arasında değişmektedir. Kuyruklu fajların çoğu (~%75) ikosahedral kapsid yapısına sahiptir ve yaklaşık %15'i kuyruk eksenine hizalanmış uzun bir kapside sahiptir [65, 66].

Fonksiyonel bir fajın oluşması, bakteriyi enfekte ettikten sonra konak hücre tarafından üretilen gerekli tüm proteinlerle başlayan çok aşamalı bir sürecin sonucudur. Faj DNA'sı, olgun bir kapsidin boyutuna genişleyen prokapsidin içine paketlenir. Adaptör ve durdurucu proteinler, DNA sızıntısını önlemek amacıyla portal komplekse bağlanır. Daha sonra, dekorasyon proteinleri kapside bağlanır ve kuyruk eklenir; böylece nihai enfektif faj oluşur (Şekil 2) [67].



Şekil 2. Fonksiyonel bir fajın oluşum aşamaları (67 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

Fajlar, enfeksiyon oluşturmak için genomlarını konak hücrelere enjekte etmek zorundadır. Çoğu faj bunun için kuyruk kullanır. Kuyruk, bakteriyel hücre duvarına bağlanmaya, penetrasyonuna ve faj genomunun enjeksiyonuna aracılık eden kompleks, çok proteinli bir yapıdır. Kuyruğun, konak hücre sitoplazmasını nasıl aştığı hakkında çok az şey bilinmektedir [68]. Zarflı ökaryotik virüslerin çoğu, konak hücre membranına bir hidrofobik füzyon peptidi ilâştirilerek füzyonu gerçekleştirir. Zarfsız ökaryotik virüsler ise, konak hücre zarı üzerinde por oluşturarak veya bir hücre zarı parçalama mekanizması yoluyla füzyonu sağlamak için bir transmembran peptidi kullanır. Prokaryotik virüslerin ise muhtemelen

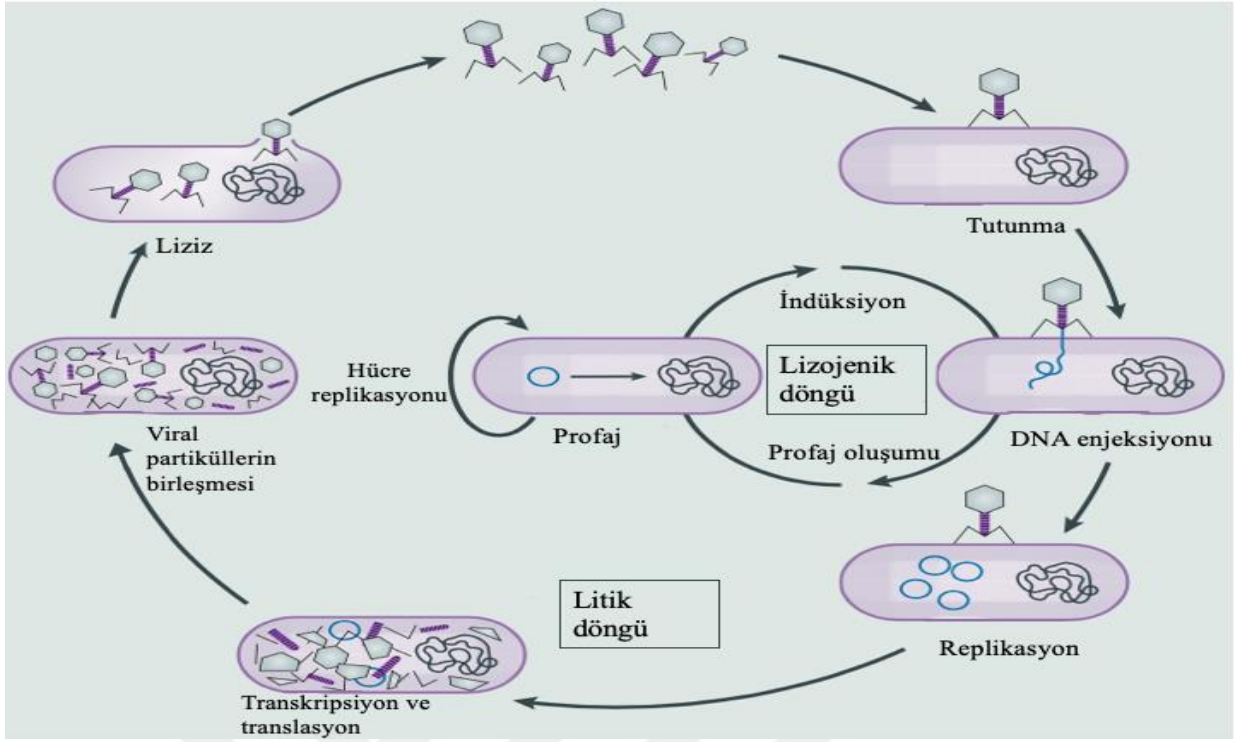
yakınsak evrimin bir sonucu olarak hidrofobik, por oluşturan ve membranda aktif bir peptidi kullanarak zar penetrasyonu gerçekleştirmesi ökaryotik virüslerle ortak mekanizmaları paylaştığını göstermektedir [69].

2.4.8. Yaşam döngüsü

Fajlar, bakterilerde litik ve lizojenik döngü olmak üzere iki farklı yaşam döngüsü sergilemektedir. Yaşam döngüleri en az beş aşama içerir; adsorpsiyon, penetrasyon, bakteri genomunun bozulması, yeni fajların partiküllerinin biyosentezi, bakteri lizisi ve virion salınımı. Faj yaşam döngüsündeki en önemli adımlardan biri adsorpsiyondur. Fajın bakteriye adsorbe olabilmesi için bakteri membranı üzerindeki bazı spesifik proteinleri, lipopolisakkaritleri veya diğer molekülleri (teikoik asitler, fimbria, flagella) tanınması gerekir. Bakteri yüzey reseptörlerinin faj tarafından başarılı bir şekilde tanınması, fajın bakteri yüzeyine penetre olmasını ve viral genomunu enjekte etmesini sağlar. Faj penetrasyonu, fajın kuyruğunda bulunan bazı lizozim enzimlerinin hücre duvarının N-asetilmuramik asit ve N-asetil-D-glukozaminler arasındaki 1,4- β -bağlarını hidrolize etmesi ile gerçekleşmektedir. [70].

Litik döngüde faj virionu bakteri yüzeyine adsorbe olur ve genomunu konak hücre içine enjekte eder. Faj enfeksiyonu ile konak hücrenin genetik fonksiyonlarının yeniden programlanması indüklenir. Böylece, faj kendi genomunu kopyalar ve kendi yapısal ve fonksiyonel proteinlerini ifade eder. Daha sonra, faj virion partikülleri birleştirilir ve viral nükleik asit ile yüklenir. Konak hücre dakikalar veya saatler sonra parçalanır ve birçok yeni faj, hücre dışına serbest bırakılır [45]. Bakteriyel membranın ve hücre duvarının bozulması, peptidoglikan hidrolizini sağlayan endolisinler, plazma zarını bozan holinler ve Gram-negatif bakterilerin dış zarını destabilize eden spaninler gibi spesifik lizis proteinlerince sağlanır [70].

Fajlar, alternatif olarak bir lizojenik döngü başlatabilir; Faj genomunun replikasyonu yerine, profaj adı verilen, genellikle konak genoma entegre olan, ancak bazen bir plazmid olarak korunan hareketsiz bir formda kalabilmektedirler. Fajlar, bu durumda süresiz olarak kalabilir. Konak hücre içindeki profajla çoğalır ve her biri profaj içeren hücrelerin oluşturduğu bir popülasyon ortaya çıkar. Bu profajlar, lizojenik döngüden çıkarak, litik döngüye girebilirler (Şekil 3) [45, 49].



Şekil 3. Fajların yaşam döngüsü (49 no’lu kaynaktan uyarlanmıştır).

Lizojenik veya litik döngü seçimini etkileyen bazı faktörler vardır. Örneğin, lizojenik fajlarda litik veya lizojenik döngünün başlatılmasının faj genomunda kodlanmış spesifik sinyal peptitleri ile yönetildiği gösterilmiştir. *Bacillus* üyelerini enfekte eden fajların, *6aa* olarak adlandırılan bir iletişim peptidi ürettiği bildirilmiş ve bu iletişim peptidlerinin yeterli miktardaki varlığında fajların lizojenik döngüye karar verdiği gösterilmiştir. Bu döngüde ayrıca bu iletişim peptidleri yeni üretilen fajların önceki fajlarla iletişim kurmasını, yani yakın geçmişteki enfeksiyonların miktarını tahmin etmesini ve dolayısıyla litik veya lizojenik döngüye karar vermesini sağlar ve bu sistem “Arbitrium” sistemi olarak adlandırılır [71].

ÇİD bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde alternatif olarak kullanılabilecek fajların litik fajlar olması gerekmektedir. Buna ek olarak kısa bir latent periyot, yüksek patlama boyutu, geniş ısı ve pH aralıklarında stabil olmaları da fajların teröpatik ajan olarak uygunluğunu belirleyen faktörlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Laboratuvarda Kullanılan Gereç ve Malzemeler

3.1.1. Gereçler

- CHEF-DR III System Cihazı (Bio-RAD, ABD)
- Pulsed-Field Jel Elektroforez Görüntüleme Cihazı (Bio-RAD, ABD)
- Transmisyon Elektron Mikroskopu (FEI/Techani, ABD)
- SDS-PAGE cihazı
- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Pastör fırını (Nüve, Türkiye)
- Isı bloğu (Biosan, Türkiye)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Mini Santrifüj (Isolab, Almanya)
- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Biyogüvenlik kabini (Heraeus, Almanya)
- Vorteks (Daihan, Güney Kore)
- Derin dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- ThermalCycler (Labnet, Finlandiya)
- Qubit 4 Florometre (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Epoch Mikroplak Spektrofotometre (Biotek, ABD)
- Hassas terazi (Scaltec, ABD)
- Su Banyosu (Mettler, Almanya)
- Mini Çalkalayıcı (shaker) (Stuart, Çin)
- Otomatik pipet seti 0,5-10; 20-200; 100-1000µl (Eppendorf, Almanya)
- 10; 200; 1000; 10000 µl steril filtreli pipet ucu (Eppendorf, Almanya)
- Balon joje
- Petri kabı (Firatmed, Türkiye)
- Steril plastik öze (LP Italiana SPA, İtalya)
- Steril pamuk uçlu eküvyon çubuk
- 0.22µl filtre (Frisenette ApS, Danimarka)
- Karbon kaplı grid (Agar Scientific Ltd., İngiltere)
- 1,5 mL mikrosantrifüj tüp (Isolab, Almanya)

- 15; 50 ml falkon tüpü (Isolab, Almanya)
- 8'li 0,2 mL PZR tüpü (Isolab, Almanya)
- 16x100 mm cam deney tüpü

3.1.2. Besiyerleri, kimyasal ve kitler

- Eozin Metilen Blue Agar
- %5 Koyun Kanlı Agar (Or-Bak, Türkiye)
- %5 Skim-milk besiyeri (BD Difco, ABD)
- Triptik Soy Agar (CondaLab, İspanya)
- Triptik Soy Broth (CondaLab, İspanya)
- Luria Broth (CondaLab, İspanya)
- SeaKem Gold Low Melting Agaroz (Lonza, İsviçre)
- TrisBase (Sigma Aldrich, Almanya)
- EDTA (SRL, İtalya)
- EtBR (AppliChem, Almanya)
- PCR Master mix (Qiagen, Almanya)
- Jel yükleme solüsyonu/ Bromofenol (SNP Biyoteknoloji, Türkiye)
- Primerler (Sentebiolab, Türkiye)
- Viral DNA izolasyon kiti (Zip Prime, Türkiye)
- ApaI enzimi (Takara, Japonya)
- EcoRV, HindIII Restriksiyon Enzimleri (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- BamHI (New England Biolabs, UK)

3.2. İzolat Profili

Çalışmamızda Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* izolatları kullanılmıştır. İzolatlar, 01.01.2020 – 30.12.2020 tarihleri arasında toplanmıştır. İzolatlar deney yapılana kadar %5 skim-milk besiyerinde stoklanmış ve -20°C'de saklanmıştır.

3.2.1. Antibiyotik duyarlılık testleri

Amikasin, gentamisin, imipenem, kolistin, levofloksasin, meropenem, siprofloksasin, tigesiklin ve trimetoprim sulfametoksazol duyarlılık testleri rutin çalışmalarda yapılmıştır. Kolistinin MİK değeri, EUCAST standartlarına uygun olarak

broth mikrodilüsyon yöntemini temel alan Sensititer ile belirlenmiştir [72]. Imipenem ve/veya meropeneme direnç saptanan izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2.2. *A. baumannii* genotiplendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen klinik *A. baumannii* izolatların genetik benzerlikleri Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE) ile belirlenmiştir.

3.2.3. Pulsed-Field jel elektroforezi

Bakteri izolatlarının genotiplendirilmesi ve kromozomlarının fiziksel ve genetik haritasını oluşturmak için PFGE uygulanmıştır. Yöntem “Centers for Disease Control” (CDC) protokolünde ufak modifikasyonlarla yapılmıştır [73]. TSA’ya ekilen bakteriler bir gece 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Çalışılacak örnek sayısı kadar cam tüpe 2 ml “Hücre Süspansiyon Tamponu” (HST) eklenmiş ve saf bakteri kolonileri plastik öze ile alınıp HST içinde süspanse edilip vortekslenmiştir. Bakteri yoğunluğu 4 McFarland’a ayarlanmıştır. 200 µl bakteri süspansiyonu 25 µl Proteinaz K (20mg/ml) ile karıştırıldı. 400 µl eritilmiş %1 SeaKem Gold agaroz eklendi ve pipetaj yapıldı. Bu karışımdan 200µl plug kuyucuklarına aktararak 4°C’de 10 dk jelin donması beklendi ve jel blokları oluşturuldu. Her bir bakteri için ikişer jel bloğu kullanılmıştır. Örnek sayısı kadar falkona 5 ml liziz buffer ve 25 µl Proteinaz K eklenmiş ve donan jeller bu falkonlara aktarılmıştır. 2 saat 55°C su banyosunda inkübasyonun ardından liziz tamponu aspire edilmiş ve 2 kez 5 ml su ve 4 kez de TE tamponuyla yıkanmıştır. Her bir yıkama aşamasının aralarında 10’ar dakika 55°C’ye ayarlanmış su banyosunda inkübe edilmiştir. İşlemlerin ardında her bir jel bloğu 5 ml TE içerisinde 4°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından tekrar yıkanmış ve jel blokları bistüri ile kesilmiştir. ApaI enzimi ve buffer ile kesilen jel blokları 10 dk süspanse edilerek jel içerisine gömülü olan DNA molekülü ApaI restriksiyon enzimiyle kesilmiştir. Sonrasında jel blokları elektroforez targaına yerleştirilerek %2’lik Agaroz jel hazırlanmıştır. Jel donduktan sonra Chef Dr III PFGE cihazına yerleştirilmiş ve 16 saat, 6 volt/cm’de, 14°C’de yürütülmüştür. Ardından etidyum bromür (EtBr) ve su ile yıkanmış ve görüntülenmiştir. Jel, BioNumerics 7.5 programında analiz edilmiş ve dendogram oluşturulmuştur.

3.2.4. Karbapenem direnç genlerinin saptanması

CDC; karbapenem direnç genlerinden en az birini bulunduran *A. baumannii* izolatlarını 'karbapenem dirençli *A. baumannii*' olarak tanımlamaktadır [74]. *A. baumannii*'deki karbapenem direnci, oksasilinaz (OXA) grubuna atfedilmektedir.

3.2.4.1. Karbapenemaz genlerinin PZR ile saptanması

Çalışmamızda, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} ve *bla*_{OXA-58} ve kromozomal *bla*_{OXA-51} karbapenem direnç genlerinin saptanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılmıştır.

3.2.4.2. DNA izolasyonu

A. baumannii izolatlarının DNA izolasyonu gecelik taze kültürleri kullanılarak biyogüvenlik kabini içerisinde yapılmıştır. İlk olarak -20°C'de skimmed-milk içerisinde stoklanan bakteriler çözündürülerek TSA'ya tek koloni ekimi yapılmıştır. 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından, steril tek kullanımlık iğne öze ile tek koloni alınmış ve 1 ml distile deionize su içerisinde süspanse edilmiştir. Ardından, 95°C'de 10 dakika boyunca kaynatılmış ve 10 dakikanın sonunda buz içerisine aktarılmıştır. Soğuyan tüpler, hücre atıklarının uzaklaştırılması amacıyla 14.000g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir [75]. Süpernatant temiz tüpe aktararak PZR çalışmasına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.3. Primerler

*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} ve *bla*_{OXA-58} ve kromozomal *bla*_{OXA-51} karbapenem direnç genleri sırasıyla, 501, 1024, 507 ve 353 bp olup hedefleyen primer baz dizileri aşağıdaki gibidir;

*bla*_{OXA-51}

- OXA-51-Forward; 5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3'
- OXA-51-Reverse; 5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'

*bla*_{OXA-23}

- OXA-23-Forward; 5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3'
- OXA-23-Reverse; 5'-ATTTCTGACCGCATTTCCAT-3'

*bla*_{OXA-24}

- OXA-24-Forward; 5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA-3'
- OXA-24-Reverse; 5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'

*bla*_{OXA-58}

- OXA-58-Forward; 5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3'
- OXA-58-Reverse; 5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'

3.2.4.4. PZR reaksiyon miksi

25 µl Qiagen PCR Master Mix 1 µl reverse, 1 µl forward primer ve 18 µl su eklenerek PZR reaksiyon miksi hazırlanmış ve hazırlanan mikse bakteri DNA'sı eklenmiştir.

3.2.4.5. Amplifikasyon

Amplifikasyon koşulları termal döngü cihazında aşağıdaki gibi programlanmıştır:

1. Ön Denatürasyon: 94°C'de 5 dakika
2. 30 döngü:
 - Denatürasyon: 94°C'de 25 saniye
 - Bağlanma: 52°C'de 40 saniye
 - Uzama: 72°C'de 50 saniye
3. Final: 72°C'de 6 dakika

3.2.4.6. PZR ürünlerinin jel elektroforezinde analizi

0.5X TBE (pH 8.4), agaroz ve EtBr kullanılarak %2'lik agaroz jel hazırlanmış ve PZR ürünleri jel elektroforezinde değerlendirilmiştir. Elektroforez tankına dökülen jel donduktan sonra PZR ürünleri jel yükleme solüsyonu ile karıştırılmış ve 12 µl kuyucuklara eklenmiştir. 2 saat boyunca 100 voltta yürütülen PZR ürünleri UV ışık altında değerlendirilmiştir. *A. baumannii bla*_{OXA} doğrulanmış şuslar pozitif kontrol olarak 100 bp size marker kullanılarak gösterilmiş [76] ve *A. baumannii* ATCC 19606 negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.3. Bakteriyofajlar

3.3.1. Bakteriyofaj izolasyonu

Bakteriyofaj izolasyonu için su örnekleri Kızılırmak, Eymir, Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi atık suyu, Kırıkkale Üniversitesi Hastanesi atık suyu, Kütahya atık suyu ve Kırıkkale at harası atık suyundan 27.10.2021-23.03.22 tarihleri arasında düzenli periyotlarla toplanmıştır. Bakteriyofaj izolasyonu Lin ve ark. tarafından belirtilen yöntemde ufak değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir [77]. Toplanan su örnekleri 5000g devirde 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatanttan 20 ml temiz falkona alınmıştır. Ardından 10 tane *A. baumannii* suşu 1 McFarland yoğunluğa ayarlanarak 100'er µl her birinden alınıp su örneğinin üzerine eklenerek 20-24 saatlik inkübasyona kaldırılmıştır. Inkübasyonun ardından solüsyon 8000g'de 5 dk santrifüjlenip 0.22 µl'lik filtre ile filtrelenmiştir. Faj izole edilip edilemediği spot test ile test edilmiştir.

3.3.2. Spot test

Spot test yapmak üzere, her bir TSA'ya taze pasajlanan bakteri kolonileri seçilmiş ve 10 µl'lik tek kullanımlık öze ile tek çizgi şeklinde ekim yapılmıştır. Hazırlanan faj solüsyonlarından 10 µl ekim çizgisi üzerine damlatılmış ve 24 saatlik inkübasyona kaldırılmıştır. Inkübasyonun ardından faj damlatılan yerde bakteri üremesinin baskılandığı bir liziz zonun görülmesi o bakteriye etkili faj olduğunu göstermektedir [78].

3.3.3. Faj pürifikasyonu

Fajların pürifikasyonu ve zenginleştirilmesi için spot test ile oluşan zonlardan 200 µl'lik pipet ucu ile agar kesilmiş, TSB içerisinde dilüe edilmiş ve “Double-Layer” (DL) metodu; 4 ml Luria Broth (LB) soft agara (55°C) 100 µl faj solüsyonu (her bir dilüsyondan ayrı ayrı) ve 100 µl bakteri solüsyonu eklenerek TSA üzerine dökülüp donmaya bırakılarak yapılmıştır [79]. Saf faj plakları görülene kadar pürifikasyon aşaması devam etmiştir.

3.3.4. Faj solüsyonu hazırlanması ve titre sayımı

DL agar metoduyla elde edilen saf faj plaklarını solüsyon haline getirmek için plak sayısı en çok olan besiyeri üzerindeki soft agar ile birlikte kazınarak 15 ml'lik steril falkon tüplere aktarılmıştır. Üzerine 5 ml TSB ve 2 ml 1 McFarland faja spesifik bakteri eklenerek 24

saatlik inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyonun ardından 8000g’de 5 dk santrifüj edilerek 0.22 µl’lik filtre ile fitrelenmiştir. Filtrelenen solüsyon spot testi yapılarak +4°C’de saklanmıştır.

Hazırlanan solüsyondaki faj titresini hesaplamak için iki yöntemden yararlanılmıştır. İlk yöntemde TSA üzerine 3 ml soft agar, 100 µl 1 McFarland faja spesifik bakteri ve 100 µl farklı dilüsyonlardaki faj solüsyonu ayrı ayrı eklenerek 24 saatlik inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyonun ardından her bir dilüsyondaki faj titreleri;

$$\text{Faj titresini (PFU/ml)} = \text{Plak sayısı} \times 10 \times 10^{\text{dilüsyon faktörü}}$$

formülü ile hesaplanmıştır.

İkinci yöntemde ise TSA 8 eşit parçaya bölünmüş ve 3 ml soft agara 200 µl 1 McFarland faja spesifik bakteri eklenerek donmaya bırakılmıştır. Donduktan sonra 8 dilüsyonu hazırlanan faj solüsyonlarından 10 µl her bir bölmeye ayrı ayrı damlatılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından her bir bölmedeki plaklar sayılarak faj titresini aşağıdaki gibi hesaplanmıştır [80];

$$\text{Faj titresini (PFU/ml)} = \text{Plak sayısı} \times 100 \times 10^{\text{dilüsyon faktörü}}$$

3.3.5. Fajların ısı ve pH stabiliteleri

Fajların ısı ve pH stabiliteleri farklı ısı ve pH aralıklarında test edilmiştir. Fajlar, farklı sıcaklıklarda ve çeşitli pH seviyelerinde 30 dakika boyunca inkübe edilmiş ve ardından titreleri DL agar metodu ile hesaplanmıştır.

3.4. Bakteriyofajların Karakterizasyonu

Fajlar, boyut, morfoloji ve genomik organizasyon açısından incelenmiştir.

3.4.1. Transmisyon elektron mikroskopisi

Pürifiye edilen ve titresini belirlenen fajların morfolojilerinin belirlenmesi için 10 µl faj solüsyonu karbon kaplı bakır gridlerin üzerine damlatılmış ve %2’lik üranil asetat ile 1 dakika boyunca boyanmıştır. Boyamanın ardından, boyanın fazlası Wattman kağıdı ile alınmış ve gridler 120 kV transmisyon elektron mikroskopunda incelenmiştir [81].

Numunelerin hazırlanmasının ardından transmisyon elektron mikroskopisi Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında hizmet alımıyla yapılmıştır.

3.4.2. Konak aralığının belirlenmesi

İzole edilen fajların konak aralığının belirlenmesi için *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* bakterileri kullanılmış ve bu bakterilere izole edilen faj süspansiyonları ile spot test uygulanmıştır.

3.4.3. “Multiplicity of Infection” belirlenmesi

“Multiplicity of Infection” (MOI), enfeksiyon boyunca faj partiküllerinin konak bakteri sayısına olan oranı olarak tanımlanmaktadır. MOI hesaplamak için, konak bakteri, 10^8 koloni-oluşturan birim (CFU)/ml hazırlanmıştır. Ardından faj titreleri 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 ve 10^5 'e ayarlanmıştır. 200 µl dilüe faj solüsyonları (MOI= 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 PFU/CFU), 200 µl konak bakteri ile (10^8 CFU/ml) karıştırılıp 37°C'de 3.5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 10000g'de 4 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant titre sayım protokolü için kullanılmıştır [82]. Hazırlanan MOI'ler arasında 3.5 saatlik inkübasyonun ardından en yüksek faj titresini veren MOI, optimal olarak belirlenmiştir.

3.4.4. “One-step growth curve” deneyi

Her bakteriyofajın büyüme eğrisi, Hong ve ark. [83] tarafından bildirilen protokolda bazı ufak değişiklikler yapılarak incelenmiştir. Kısaca, 1 ml bakteri (1 McFarland yoğunluk) süspansiyonu, 10000g'de 4 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelete, optimal MOI oranında 1 ml faj süspansiyonu eklenmiş ve 37°C'de ve 150 rpm'de 10 dakika süreyle bakteriyofajların konak hücrelere adsorpsiyonunu sağlamak için inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 10.000g'de 4 dakika boyunca santrifüj uygulanmış ve süpernatant atılmıştır. Pelet, 10 ml TSB içinde süspanse edilmiş ve süspansiyon, 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Toplam 65 dakikalık bir süreye kadar 5 dakikalık aralıklarla 100 µl alınmış ve DL metodu uygulanarak ertesi gün her dakikaya karşılık gelen faj titreleri sayılmıştır. Bakteriyofajın latent periyodu ve patlama boyutu, bu büyüme eğrisinden hesaplanmıştır.

Patlama boyutunu hesaplamak üzere iki formül bulunmaktadır. İlki;

inkübasyon sonundaki (T65) en yüksek faj titresi – adsorbe olmayan faj titresini (T0)

Konak bakteri sayısı

İkincisi;

inkübasyon sonundaki (T65) en yüksek faj titresi
adsorbe olmayan faj titresi (T0)

formülü ile hesaplanmaktadır [84].

3.4.5. Bakteriyofaj proteom analizi

A. baumannii fajlarının yapısal proteinleri, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-Page) ile tespit edilmiştir. Konsantre faj preparasyonu (yaklaşık 10^{10} PFU/ml), eşit hacimde 2X Laemmli tamponu ile karıştırılmış ve 10 dakika boyunca kaynatılmıştır. 25 µl faj-tampon karışımı ve 6 µl protein işaretleyici ile birlikte her bir kuyucuğa yüklenmiştir. Jel, boya jelin dibine ulaşana kadar yaklaşık 1 saat boyunca 20 mA sabit akımda çalıştırılmıştır. Son olarak jel, 4 saat boyunca %0.25 Coomassie mavi R-250 ile boyanarak tarayıcıda taranmıştır [85]. Numunelerin hazırlanmasının ardından SDS-Page çalışmaları Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında hizmet alımıyla yapılmıştır.

3.4.6. Bakteriyofaj nükleik asit izolasyonu

Faj süspansiyonlarının titresi 10^{11} PFU/ml'ye ayarlanmış ve viral DNA, viral DNA izolasyon kiti kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Kısaca, 200 µl faj süspansiyonu 250 µl liziz tamponu ile karıştırılmış ve yaklaşık 10-12 dakika beklenmiştir. Ardında spinlenerek 320 µl yıkama solüsyonu I eklenmiştir. 5 dk'lık inkübasyonun ardından 7 µl beat-bağlama solüsyonu tüplere eklenmiş ve tüpler manyetik portüpe yerleştirilip 2 dk boyunca beklenmiştir. Süpernatant atılmış ve tüpler yıkama solüsyonu I ile yıkanıp vortekslenmiştir. Tekrar manyetik partüpe yerleştirilen tüplerin süpernatantı atılmış ve pelet yıkama solüsyonu II ile yıkanmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra tüpler 5 dakika boyunca kurutulmaya bırakılmış ve ardından 70 µl elüsyon tamponu eklenerek 75°C'de 4 dk boyunca inkübe edilmiştir. Ardından vortekslenmiş ve tekrar 75°C'de 8 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, tüpler manyetik portüpe yerleştirilmiş ve süpernant yeni tüplere aktarılmıştır.

Ekstrakte edilen viral DNA, Qubit 4 florometre ve Epoch cihazı kullanılarak kuantifiye edilmiştir.

3.4.7. Bakteriyofaj genotiplendirme ve restriksiyon analizi

İzole edilen fajların genotiplendirilmesi için restriksiyon profillerine bakılmıştır. EcoRV, HindIII ve BamHI restriksiyon endonükleazları, viral faj DNA'sını kesmek için kullanılmıştır. DNA fragmanları, EtBr içeren %0.8'lik agaroz jel kullanılarak ayrılmıştır. Elektroforez 100Volta 50 dakika boyunca devam etmiştir [86].



4. BULGULAR

Çalışmamıza EUCAST standartlarına göre en az bir karbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem) dirençli olan 96 *A. baumannii* izolatı dahil edilmiştir. Tamamında kromozomal olarak kodlanan intrinsik *bla*_{OXA-51} geni saptanmış ve 73 tanesinde (n=73/96, %70) *bla*_{OXA-23} geni pozitif bulunurken, izolatların hiçbirinde *bla*_{OXA-58} genine rastlanmamıştır. İzolatların 12'sinde (n=12/96, %12.5) *bla*_{OXA-24} pozitif bulunmuştur. İzolatların 13'ünde yalnızca *bla*_{OXA-51} geni bulunmuştur. *bla*_{OXA-51} geni ayrı tutulduğunda, izolatların 71'inde sadece *bla*_{OXA-23} geni, 2'sinde ise *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-24} beraber saptanmıştır (Tablo 4). İzolatların %20.8'inin (n=20) kolistine dirençli olduğu bulunmuştur. Kolistin dirençli izolatların MİK değerleri 4 ile 128 mg/L arasındadır (Tablo 5).

Tablo 4. Karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının oksasilinaz genlerinin dağılımı.

Karbapenemaz geni	<i>A. baumannii</i> n (%)
<i>bla</i> _{OXA-51}	96 (100)
<i>bla</i> _{OXA-23}	73 (70)
<i>bla</i> _{OXA-24}	12 (12.5)
<i>bla</i> _{OXA-58}	0 (0)
Yalnız <i>bla</i> _{OXA-51}	13 (13.5)
Yalnız <i>bla</i> _{OXA-51} ve <i>bla</i> _{OXA-23}	71 (73.9)
<i>bla</i> _{OXA-51} ve <i>bla</i> _{OXA-24}	10 (10.4)
<i>bla</i> _{OXA-23} ve <i>bla</i> _{OXA-24}	2 (2.1)

Tablo 5. Kolistin dirençli izolatların MİK değerleri.

İzolat No.	Klinik	Kolistin MİK (mg/L)
Ab001	Anestezi	4
Ab004	Romatoloji	4
Ab012	Anestezi	128
Ab014	Geriatric	8
Ab016	Anestezi	4
Ab024	Kadın Doğum	128
Ab033	Göğüs Hastalıkları	64
Ab039	Fizik Tedavi	16
Ab044	Nöroşirurji	32
Ab050	Hematoloji	4
Ab051	Anestezi	4
Ab052	Anestezi	4
Ab056	Anestezi	128
Ab062	Kardiyoloji	4
Ab071	Plastik Cerrahi	128
Ab074	Enfeksiyon Hastalıkları	16
Ab076	Anestezi	64
Ab078	Nöroşirurji	128
Ab082	Yanık Tedavi	64
Ab096	Genel Cerrahi	128

Çalışmaya dahil edilen 96 izolatın 24 tanesi (%25) kan kültüründen, 19'ar tanesi (%19.8) derin trakeal aspirat ve idrar kültürlerinden izole edilmiştir. İzolatların 11'i (%11.4) yara ve püy örneklerinden, 7 tanesi (%7.3) balgam kültüründen, 5 tanesi (%5.2) doku biyopsi kültüründen, 4'er tanesi (%4.2) dren sıvısı ve solunum sekresyonlarının kantitatif

kültüründen, 2'si (%2.1) sürüntü kültüründen ve 1 tanesi de (%1.04) kateter kültüründen izole edilmiştir. (Tablo 6). Örneklerin 41'i (%42.7) anestezi, 7'si (%7.3) genel cerrahi ve 6'sı (%6.2) kadın doğum kliniğinden izole edilmiştir.

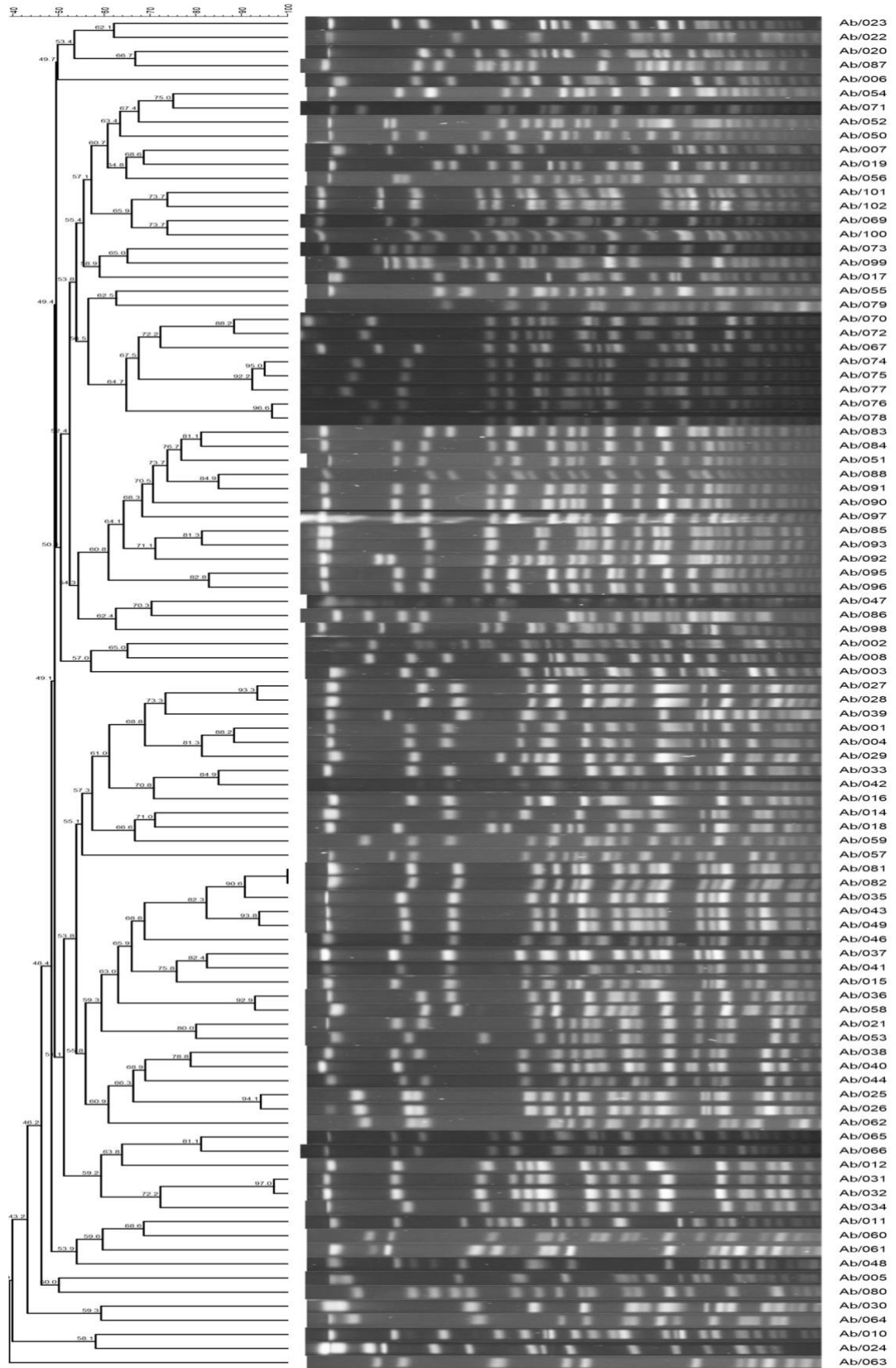
Tablo 6. Çalışmaya dahil edilen *A. baumannii* izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerin dağılımı.

Klinik Örnekler	<i>A. baumannii</i> n (%)
Kan	24 (25)
İdrar	19 (19.8)
Derin Trakeal Aspirat	19 (19.8)
Yara	11 (11.4)
Balgam	7 (7.3)
Doku	5 (5.2)
Dren Sıvısı	4 (4.2)
Solunum Sekresyonları	4 (4.2)
Sürüntü	2 (2.1)
Kateter	1 (1.04)

İzolatlar, PFGE'ne göre 5 farklı pulsotipte sınıflandırılmıştır; A, B, C, D ve E (Şekil 4). Bir major pulsotip, iki orta düzey pulsotip ve iki minör pulsotip bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 7. *A. baumannii* izolatlarının pulsotiplerine göre dağılımı.

Pulsotipler	İzolat Sayısı (%)	Pulsotip Düzeyi
A	16 (16.7)	Orta Düzey Pulsotip
B	2 (2.1)	Minor Pulsotip
C	63 (65.6)	Major Pulsotip
D	10 (10.4)	Orta Düzey Pulsotip
E	5 (5.2)	Minor Pulsotip



Şekil 4. *A. baumannii* izolatlarının PFGE dendrogramı.

A pulsotipinde bulunan 16 *A. baumannii* izolatının %75'i (n=12) *bla*_{OXA-23} genini, %18.7'si (n=3) *bla*_{OXA-24} genini taşımaktadır (Tablo 8).

Minor pulsotip B'de iki *A. baumannii* üyesi bulunmaktadır; Ab/073 ve Ab/099. İzolatların ikisinde de *bla*_{OXA-24} genine rastlanmazken, Ab/099 izolatında *bla*_{OXA-23} genine rastlanmıştır fakat Ab/073 izolatında saptanmamıştır (Tablo 9).

Tablo 8. A pulsotipi *A. baumannii* izolatlarının oksasilinaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.

A Pulsotipi İzolatları	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-51}	İzolat Kültürü	Klinik
6	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
7	-	+	+	İdrar	Fizik Tedavi
19	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
20	+	-	+	Sürüntü	KVC
22	+	+	+	Sürüntü	Anestezi
23	+	-	+	İdrar	Gastroenteroloji
50	+	-	+	İdrar	Hematoloji
52	+	-	+	Kan	Anestezi
54	+	-	+	İdrar	Fizik Tedavi
56	-	-	+	Yara ve Püy	Anestezi
69	-	-	+	Yara ve Püy	Anestezi
71	+	-	+	Doku	Plastik Cerrahi
87	-	+	+	Kan	Nöroloji
100	+	-	+	Kan	Anestezi
101	+	-	+	Yara ve Püy	Yanık Tedavi
102	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi

Tablo 9. B pulsotipi *A. baumannii* izolatlarının oksasilinaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.

B Pulsotipi İzolatları	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-51}	Klinik Örnekler	Klinik
Ab/073	-	-	+	Balgam	Hematoloji
Ab/099	+	-	+	Doku Biyopsi	Plastik Cerrahi

Klinik izolatlarının çoğunluğunun yer aldığı C pulsotipinde 63 *A. baumannii* üyesi bulunmaktadır. C pulsotipi izolatların %84.1'i (n=53) *bla*_{OXA-23} genini ve yalnızca %7.9'u (n=5) *bla*_{OXA-24} genini taşımaktadır. Klinik örneklerin %28.6'sı (n=18) kan kültüründen, %22.2'si (n=14) derin trakeal aspirat kültüründen izole edilmiştir. Bunu, %17.5 (n=11) ile idrar kültürü takip etmektedir (Tablo 10).

Tablo 10. C pulsotipi *A. baumannii* izolatlarının oksasilinaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.

C Pulsotipi İzolatları	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-51}	Klinik Örnekler	Klinik
Ab/001	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/002	-	-	+	Dren Sıvısı	Anestezi
Ab/003	+	-	+	İdrar	Anestezi
Ab/004	+	-	+	İdrar	Romatoloji
Ab/008	+	-	+	Solunum Sekresyonları	Anestezi
Ab/014	-	+	+	Balgam	Geriatrid
Ab/015	+	-	+	Kan	Yanık Tedavi
Ab/016	-	-	+	İdrar	Anestezi
Ab/017	+	+	+	Solunum Sekresyonları	Genel Dahiliye
Ab/018	+	-	+	Balgam	Onkoloji
Ab/021	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/025	+	-	+	Balgam	Kardiyoloji
Ab/026	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/027	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/028	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/029	+	-	+	Kan	Kadın Doğum
Ab/033	+	-	+	İdrar	Göğüs Hastalıkları
Ab/035	+	-	+	Doku Biyopsisi	KVC
Ab/036	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/037	+	-	+	Yara ve Püy	Anestezi
Ab/038	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/039	-	+	+	İdrar	Fizik Tedavi

*tablonun devamı bir sonraki sayfadadır.

C Pulsotipi İzolatları	bla_{OXA-23}	bla_{OXA-24}	bla_{OXA-51}	Klinik Örnekler	Klinik
Ab/040	+	-	+	İdrar	Acil
Ab/041	+	-	+	Kan	Göğüs Hastalıkları
Ab/042	+	-	+	İdrar	Geriatrid
Ab/043	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/044	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Nöroşirurji
Ab/046	+	-	+	Kan	Romatoloji
Ab/047	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/049	+	-	+	Kan	Genel Cerrahi
Ab/051	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/053	+	-	+	Yara ve Püy	Kadın Doğum
Ab/055	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/057	+	-	+	Solunum Sekresyonları	Anestezi
Ab/058	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	KVC
Ab/059	+	-	+	Kan	Nefroloji
Ab/062	+	-	+	Kan	Kardiyoloji
Ab/065	+	-	+	Doku Biyopsisi	Plastik Cerrahi
Ab/066	-	-	+	Dren Sıvısı	Kadın Doğum
Ab/067	-	-	+	Yara ve Püy	Genel Cerrahi
Ab/070	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/072	+	-	+	İdrar	Genel Cerrahi
Ab/074	+	-	+	Balgam	Enfeksiyon Hastalıkları
Ab/075	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/076	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/077	+	-	+	Solunum Sekresyonları	Anestezi
Ab/078	+	-	+	Kan	Nöroşirurji
Ab/079	-	-	+	İdrar	Hematoloji
Ab/081	+	-	+	Yara ve Püy	Yara Tedavi
Ab/082	+	-	+	Kateter	Yanık Tedavi
Ab/083	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/084	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/085	-	+	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/086	-	-	+	İdrar	Gastroenteroloji
Ab/088	+	-	+	Yara ve Püy	Yanık Tedavi
Ab/090	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	KVC
Ab/091	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi
Ab/092	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/093	-	+	+	İdrar	Anestezi
Ab/095	+	-	+	Balgam	Genel Cerrahi
Ab/096	+	-	+	Kan	Genel Cerrahi
Ab/097	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/098	+	-	+	Doku Biyopsisi	Nefroloji

D pulsotipi 10 *A. baumannii* üyesi bulunmaktadır. İzolatların %40'ında (n=4) *bla_{OXA-23}*, %20'sinde (n=2) *bla_{OXA-24}* geni saptanmıştır (Tablo 11).

Tablo 11. D pulsotipi *A. baumannii* izolatlarının oksasilineaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.

D Pulsotipi İzolatları	<i>bla_{OXA-23}</i>	<i>bla_{OXA-24}</i>	<i>bla_{OXA-51}</i>	Klinik Örnekler	Klinik
Ab/005	-	+	+	Kan	Anestezi
Ab/011	+	-	+	Dren Sıvısı	Anestezi
Ab/012	-	-	+	Dren Sıvısı	Anestezi
Ab/031	+	-	+	İdrar	Kadın Doğum
Ab/032	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Göğüs Cerrahisi
Ab/034	-	-	+	Yara ve Püy	Kadın Doğum
Ab/048	-	-	+	Kan	Genel Cerrahi
Ab/060	-	-	+	Balgam	Üroloji
Ab/061	-	+	+	Yara ve Püy	Geriatri
Ab/080	+	-	+	Derin Trakeal Aspirat	Anestezi

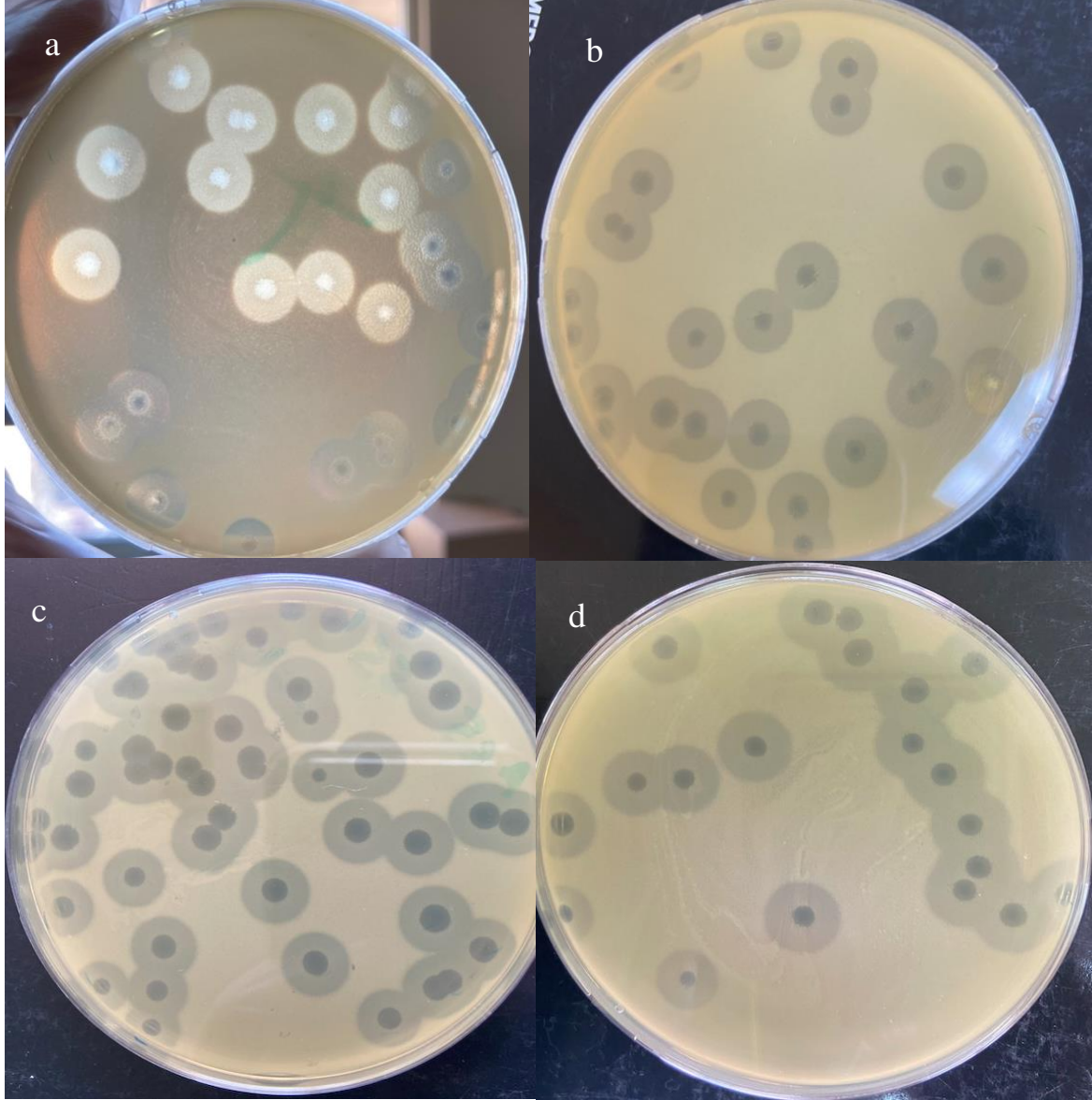
A. baumannii izolatlarının 5'i E pulsotipi üyesi olarak belirlenmiştir. İzolatların üçü idrardan izole edilmiştir. İkisinde *bla_{OXA-24}* geni saptanırken, üçünde de *bla_{OXA-23}* geni bulunmuştur (Tablo 12).

Tablo 12. E pulsotipi *A. baumannii* izolatlarının oksasilineaz genlerinin ve izole edildikleri kliniklerin dağılımı.

E Pulsotipi İzolatları	<i>bla_{OXA-23}</i>	<i>bla_{OXA-24}</i>	<i>bla_{OXA-51}</i>	Klinik Örnekler	Klinik
Ab/010	+	-	+	Kan	Anestezi
Ab/024	+	-	+	Yara ve Püy	Kadın Doğum
Ab/030	-	+	+	İdrar	Genel Cerrahi
Ab/063	-	+	+	İdrar	Fizik Tedavi
Ab/064	+	-	+	İdrar	Nefroloji

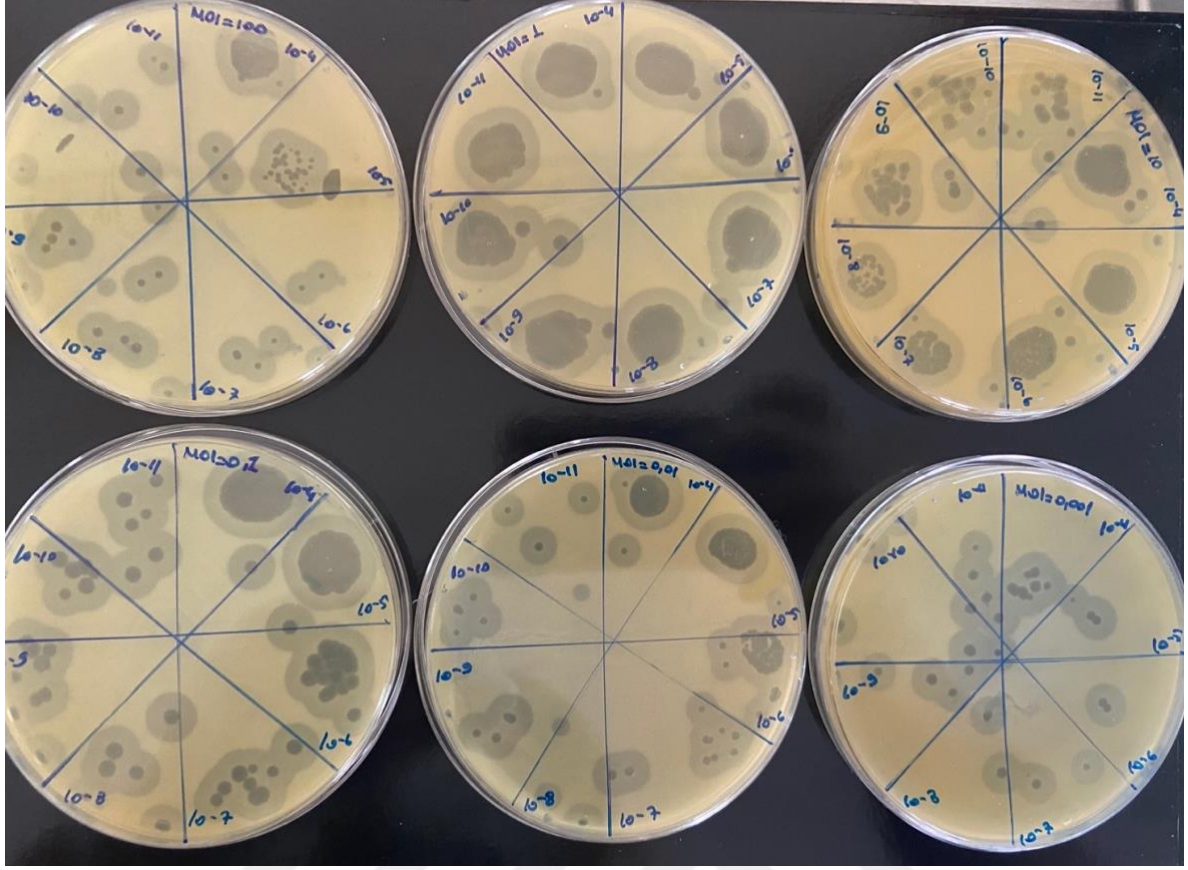
Klinik *A. baumannii* izolatlarına karşı aktivite gösteren 10 *A. baumannii* fajı izole edilmiştir. Birbirinden farklı olduğu belirlenen dört *A. baumannii* faj çalışmaya dahil edilmiştir (Şekil 5). Fajlar, ϕ Ab31, ϕ Ab59, ϕ Ab69 ve ϕ Ab65 olarak adlandırılmıştır. ϕ Ab31, izolatların %34.4'üne (n=33), ϕ Ab59, %32.3'üne (n=31), ϕ Ab69, %34.4'üne (n=33) ve ϕ Ab65 fajı ise klinik *A. baumannii* izolatlarının %35.4'üne (n=34) karşı etkili bulunmuştur

(Tablo 13). MOI değerleri 1 ile 100 PFU/CFU arasında değişmektedir. MOI şekil 6’da görüldüğü üzere, en düşük dilüsyonda en yüksek titreyi veren MOI değeri, fajın MOI’si olarak belirlenmiştir (Tablo 13, şekil 6).



şekil 5. İzole edilen a) ϕAb31, b) ϕAb59, c) ϕAb65 ve d) ϕAb69’un plak görünümleri.

Fajların konak aralığını belirlemek üzere *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* bakterileri kullanılmış ve izole edilen fajlar hiçbirine karşı aktivite göstermemiştir.



Şekil 6. MOI'si 1 PFU/CFU olarak belirlenen fajın MOI plaklarının görünümü.

Tablo 13. İzole edilen bakteriyofajların klinik *A. baumannii* izolatlarına karşı etkinlik yüzdeleri ve MOI değerleri

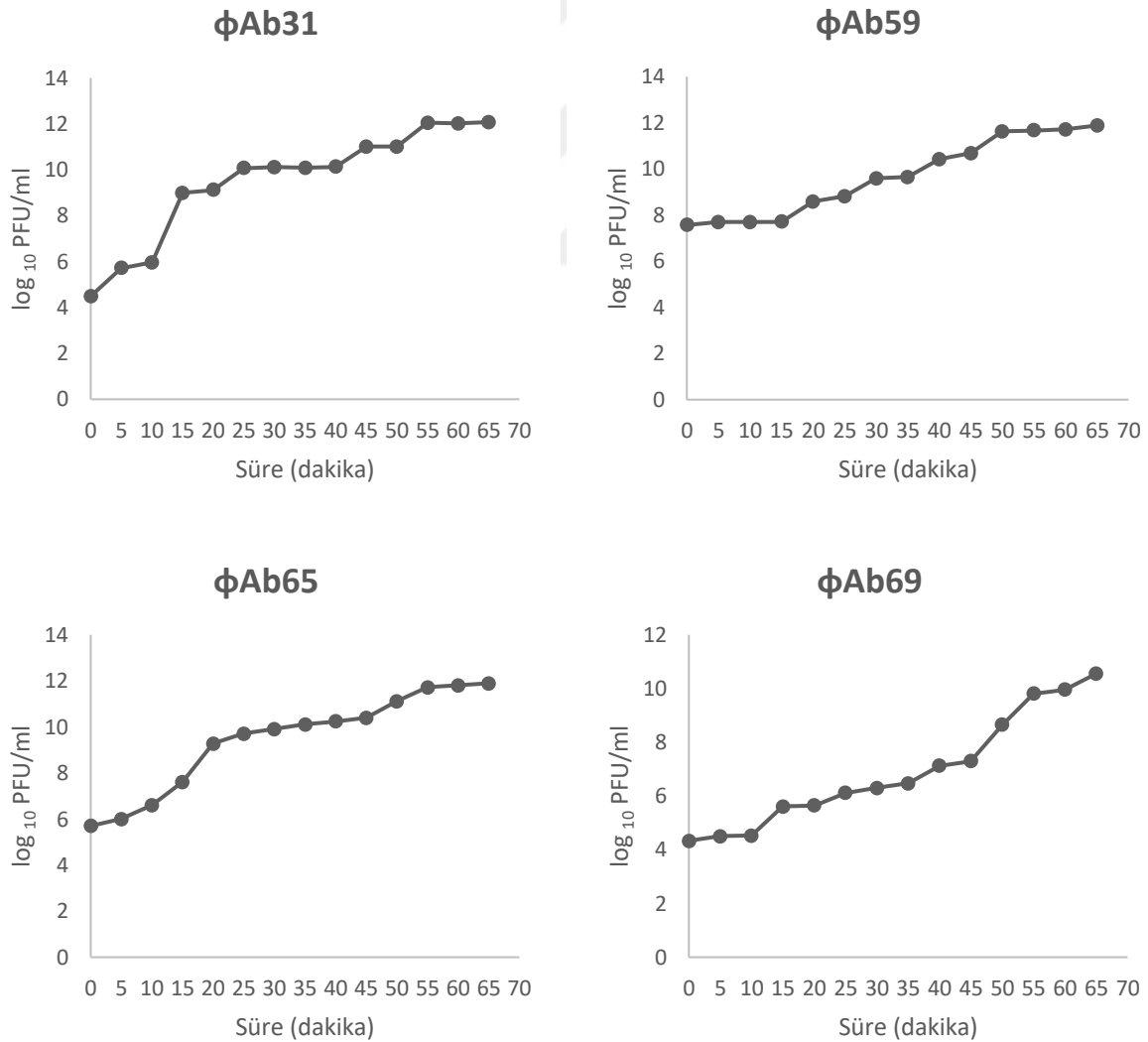
Bakteriyofajlar	Etkinlikleri (%)	MOI (PFU/CFU)
φAb31	34.4	1
φAb59	32.3	100
φAb69	34.4	10
φAb65	35.4	10

Fajların etkinlik yüzdelerinin pulsotiplere göre dağılımı Tablo 14'de gösterilmiştir. En çok C pulsotipindeki *A. baumannii* üyelerine karşı aktivite gösteriren φAb65, en az A pulsotipinde etkin bulunmuştur.

Tablo 14. Faj etkinliklerinin pulsotiplere göre dağılımı.

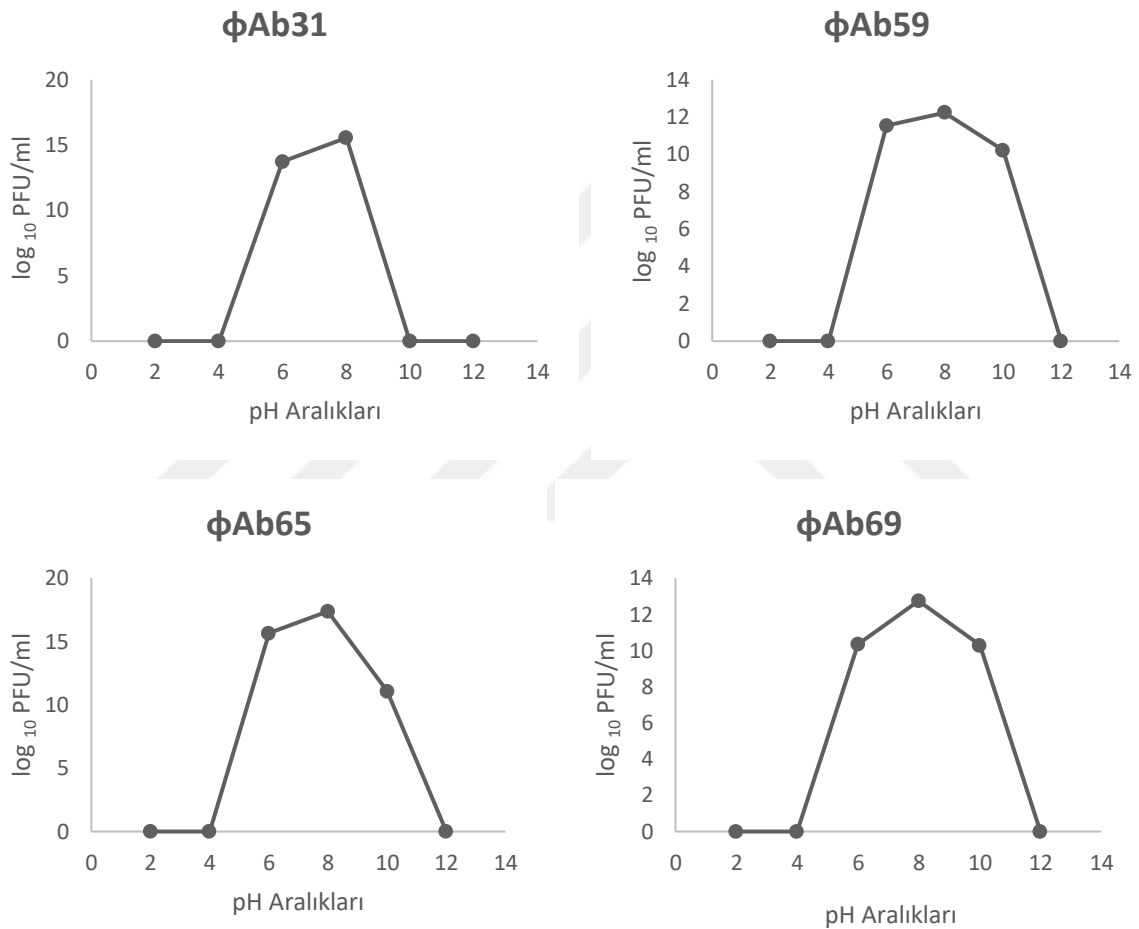
Pulsotipler	ϕ Ab31 etkinlik n (%)	ϕ Ab59 etkinlik n (%)	ϕ Ab69 etkinlik n (%)	ϕ Ab65 etkinlik n (%)
A (n=16)	5 (31.2)	5 (31.2)	5 (31.2)	3 (18.7)
B (n=2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
C (n=63)	22 (34.9)	21 (33.3)	22 (34.9)	26 (41.3)
D (n=10)	5 (50.0)	5 (50.0)	4 (40.0)	4 (40.0)
E (n=5)	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (20.0)

“One-step growth curve” deneyi ile fajların latent periyodu ve patlama boyutu belirlenmiştir. ϕ Ab65’nin latent periyodu 5 dk, ϕ Ab31 ve ϕ Ab69’nin 10 dk, ϕ Ab59’nin ise 15 dk olarak bulunmuştur. ϕ Ab31, ϕ Ab59, ϕ Ab65 ve ϕ Ab69’larının patlama boyutları ise sırasıyla, 3500, 1699, 2600 ve 118 PFU/CFU olarak hesaplanmıştır. Fajların “one-step growth curve” analizleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 7).

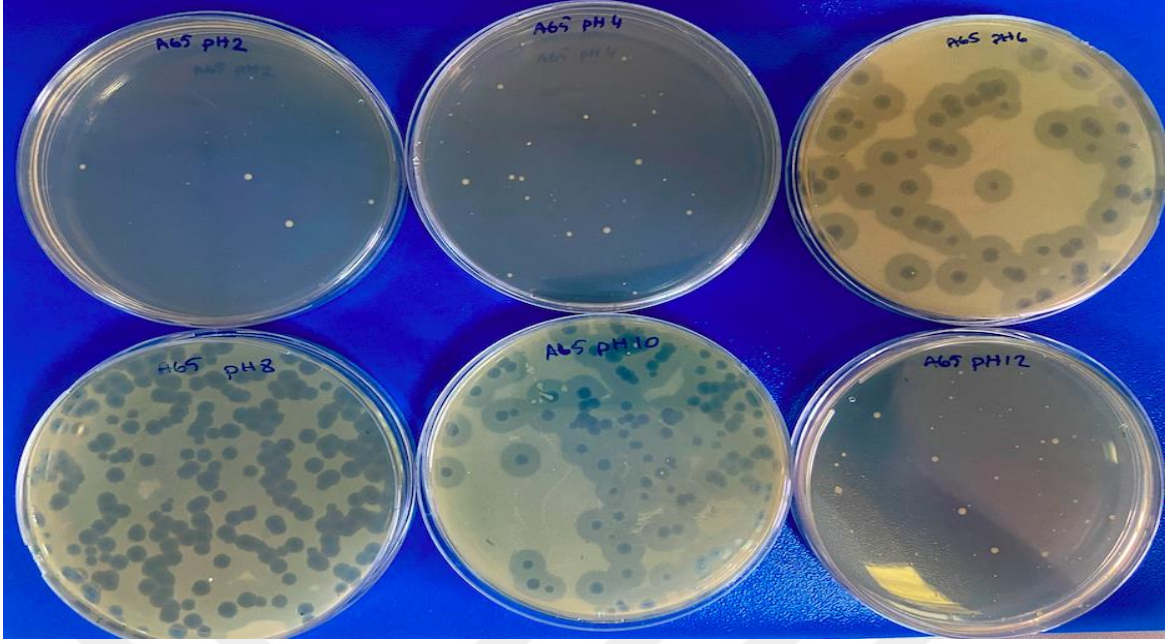


Şekil 7. Fajların “One-step growth curve” görüntüleri.

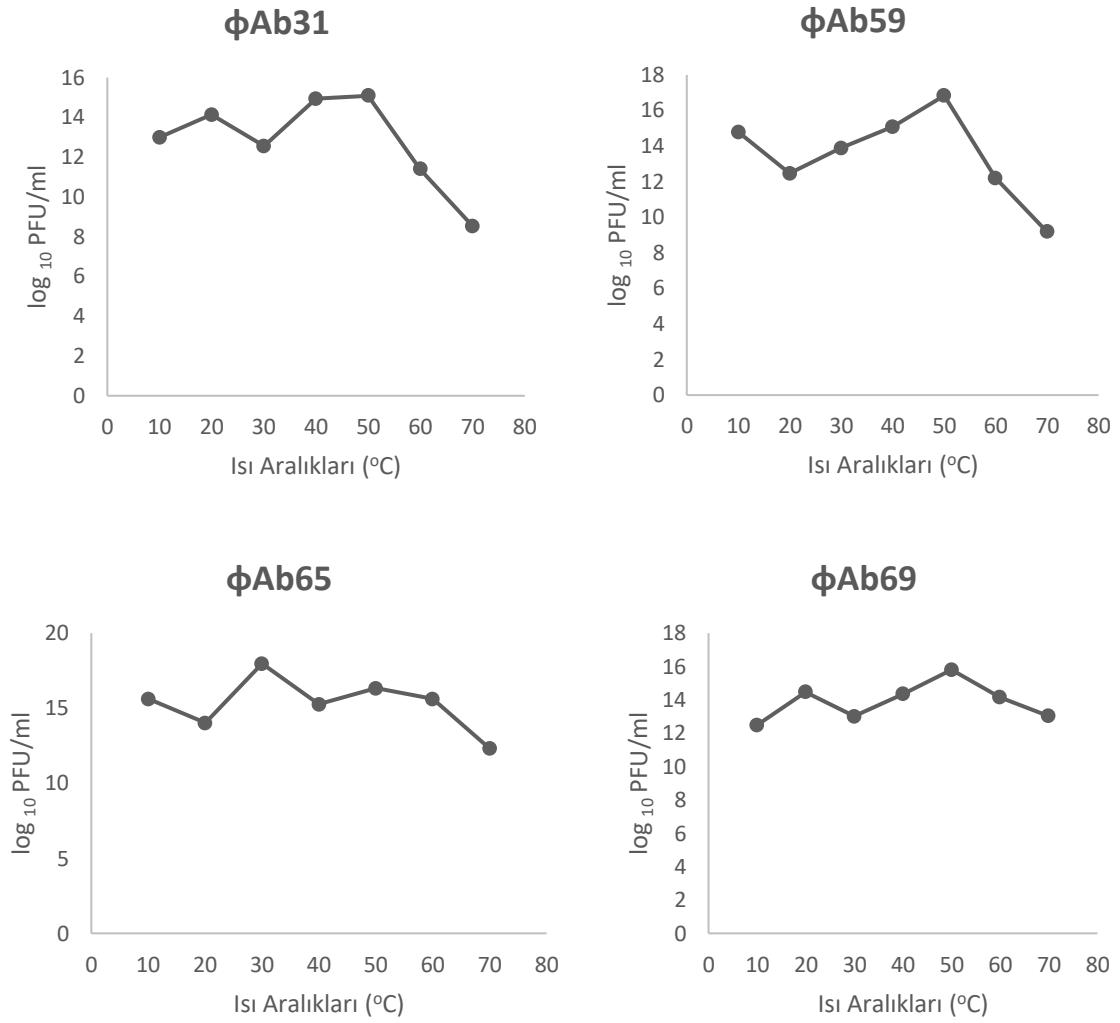
Fajların ısı ve pH stabiliteleri farklı pH ve ısı aralıkları test edilerek belirlenmiştir. İzole edilen fajların hiçbiri pH 2, 4 ve 12’de üreme göstermemiş ve hepsi de en yüksek titreyi pH 8 olduğunda vermiştir. ϕ Ab31, pH 10 olduğunda da üreme gösterememiştir (Şekil 8, Şekil 9). Fajların ısı stabiliteleri 10°C’den 70°C’ye karar test edilmiştir. Bu ısı aralıklarında bütün fajlar termal olarak stabil bulunmuş ve titrelerinde önemli ölçüde bir azalma saptanmamıştır. ϕ Ab69 hariç, bütün fajların en düşük titresi 70°C’de hesaplanmıştır (Şekil 10).



Şekil 8. Farklı pH aralıklarında a) ϕ Ab31, b) ϕ Ab59, c) ϕ Ab65 ve d) ϕ Ab69’un stabiliteleri.

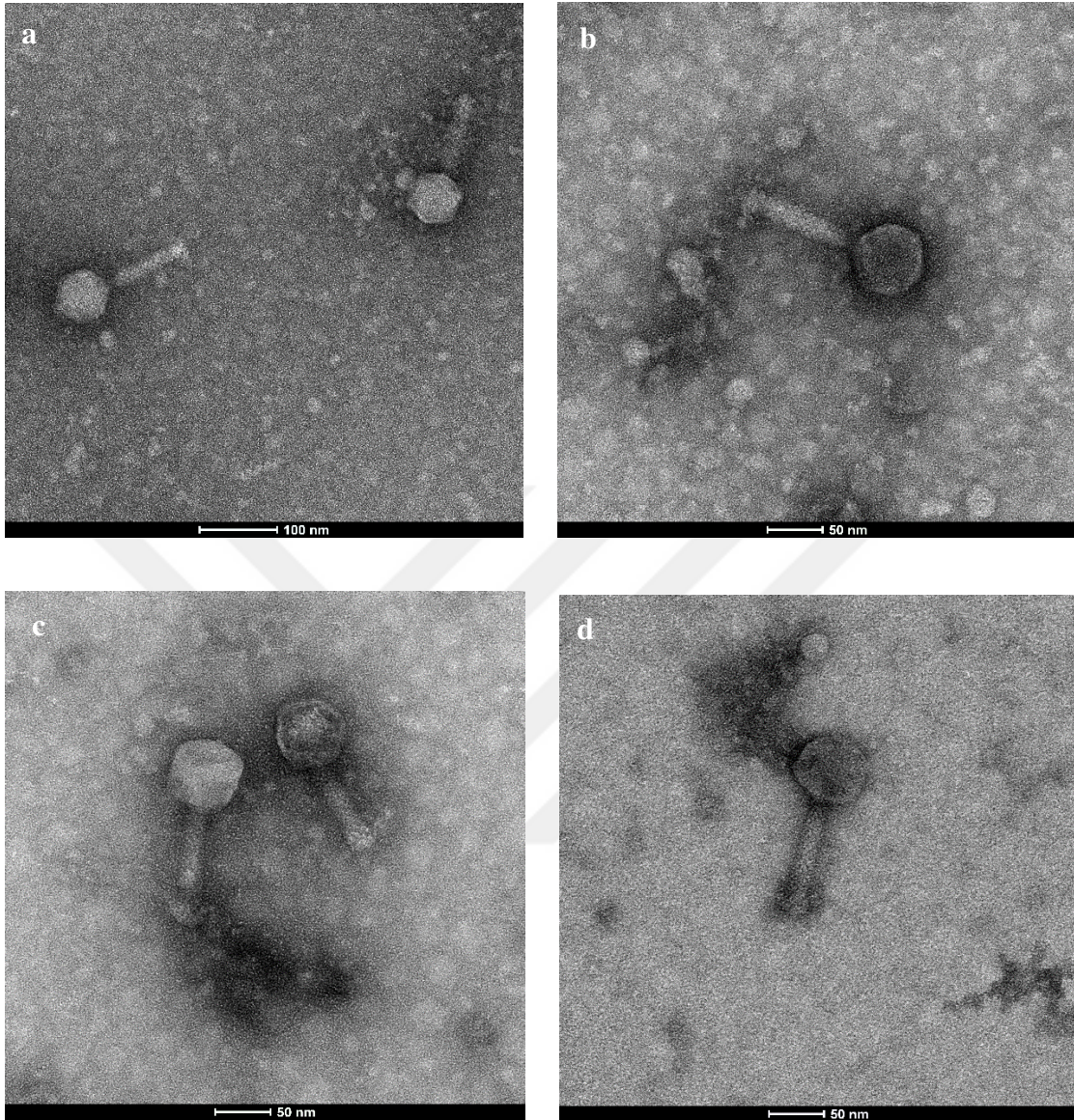


Şekil 9. pH 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 değerlerindeki faj plaklarının besiyerlerinde görünümü.



Şekil 10. Farklı ısı aralıklarında a) φAb31, b) φAb59, c) φAb65 ve d) φAb69'un stabiliteleeri.

TEM analizi sonucunda, fajların hepsinin kuyruklu ve *Myoviridae* ailesine ait olduğu belirlenmiştir. (Şekil 11).

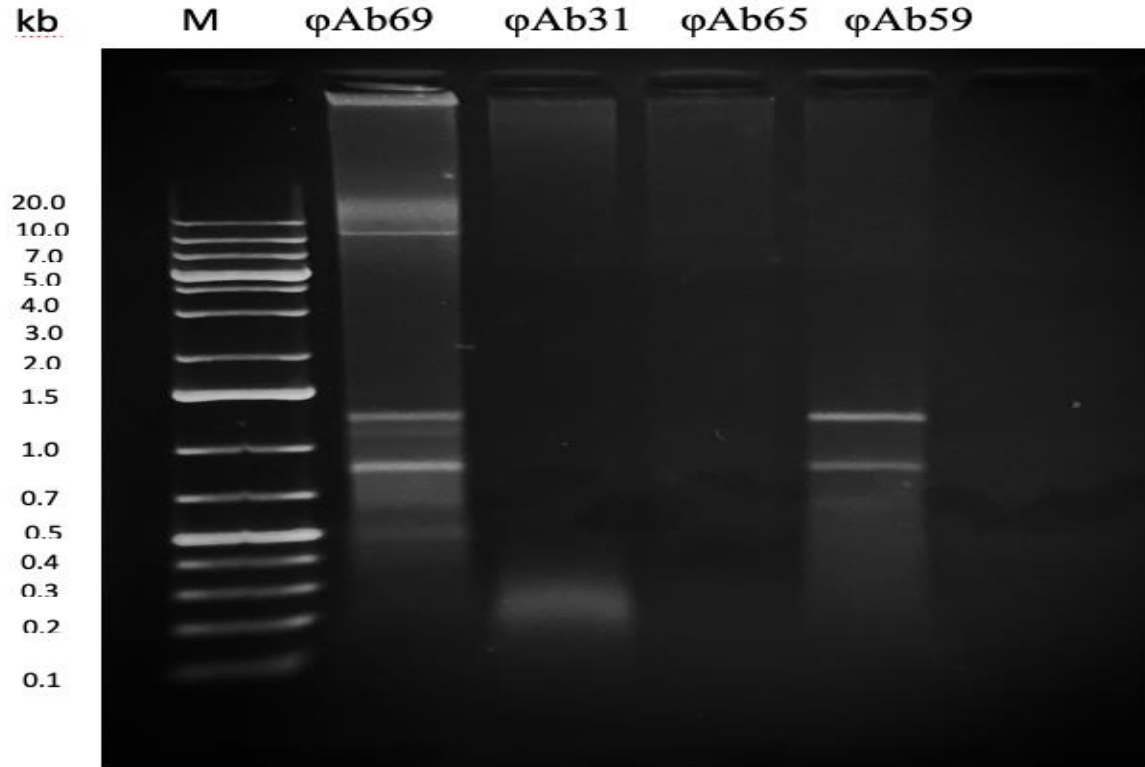


Şekil 11. a) ϕ Ab31 ve b) ϕ Ab59 c) ϕ Ab65 ve d) ϕ Ab69 tranmisyon elektron mikroskopi görüntüleri.

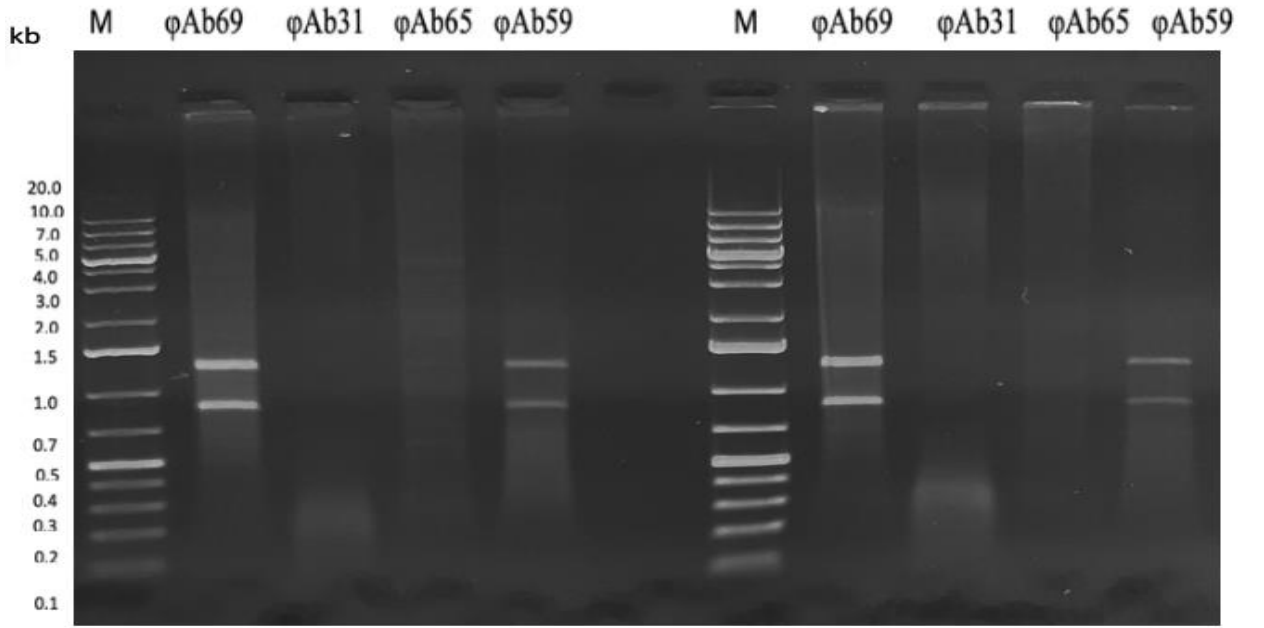
Faj DNA'ları, EcoRV ile kesildiğinde ϕ Ab69 sekiz ayrı bant vermiştir. ϕ Ab31, tek bir bant ϕ Ab59 ise üç bant verirken ϕ Ab65 DNA'sı EcoRV kesilememiştir. ϕ Ab69, HindIII ve BamHI ile kesildiğinde üçer bant göstermiştir. ϕ Ab65, kesildiğinde 8 bant, BamHI ile kesildiğinde 1 bant gösterirken ϕ Ab59, ϕ Ab31 HindII ile kesilememiş, BamHI ile kesildiğinde ise 2 bant göstermiştir. ϕ Ab59, HindIII ile kesildiğinde 2 bant gösterirken BamHI ile kesildiğinde 3 bant göstermiştir. (Tablo 15, Şekil 12, Şekil 13)

Tablo 15. İzole edilen fajların restriksiyon profilleri.

Fajlar	EcoRV profili	HindIII profili	BamHI profili
φAb69	6 bant + 2 zayıf bant	3 bant	3 bant
φAb31	1 zayıf bant	kesilmemiş	1 bant + 1 zayıf bant
φAb65	kesilmemiş	8 zayıf bant	1 bant
φAb59	2 bant + 1 zayıf bant	2 bant	3 bant

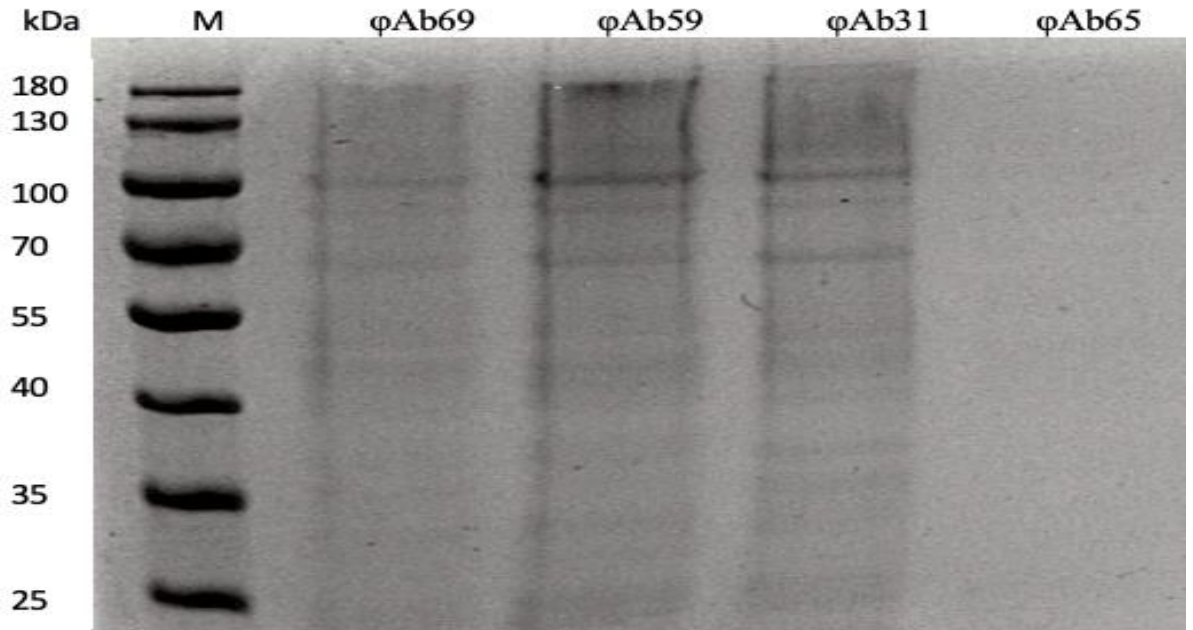


Şekil 12. EcoRV restriksiyon enziminin jel elektroforez analizi ve fajların restriksiyon profilleri. *M: 0.1-20 kb DNA marker.



Şekil 13. Sırasıyla, HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleriyle kesilmiş ϕ Ab69, ϕ Ab31, ϕ Ab65 ve ϕ Ab59'un restriksiyon profilleri. *M: 0.1-20 kb DNA marker.

ϕ Ab69'da moleküler ağırlığı 180 kDa ila 40 kDa arasında değişen yaklaşık 5 bant protein tespit edilmiştir. ϕ Ab59 ve ϕ Ab31'de 180 kDa ila 35 KDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahip sırasıyla yaklaşık 8 ve 10 bant tespit edilmiştir. ϕ Ab65 için hiçbir protein bandına rastlanamamıştır (Şekil 14).



Şekil 14. ϕ Ab69, ϕ Ab59, ϕ Ab31 ve ϕ Ab65'in SDS-Page analizi.

5. TARTIŞMA

ÇİD bakteri suşlarının dünya genelinde hızlı artışı ve antibiyotik tedavisinin bu izolatlar için yetersiz kalması alternatif terapi ihtiyaçlarını gündeme getirmiştir. Antibiyotik direnç mekanizmaları taşıyan bakteriler, özellikle klinik ortamlar gibi kendileri için özellikle yararlı olduğu habitatlarda seçici bir avantaja sahiptir. Yaygın fırsatçı patojenler, ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) grubunda toplanır. ESKAPE grubu mikroorganizmalar, doğal çevre ile insan mikrobiyomumuz arasında gidip gelirler ve büyük tehdit oluştururlar çünkü plazmidler, lizojenik fajlar ve transpozonlar gibi mobil genetik elementleri taşırlar [87]. Dünya genelinde önemli bir nozokomiyal ajan olan *A. baumannii*'nin de ÇİD şusları her geçen gün hızla rapor edilmektedir. İntrinsik ve kazanılmış antibiyotik dirençli, çok ilaca ve her ilaca (pandrug) dirençli *A. baumannii* klonları hastane ortamlarından sıklıkla izole edilebilmektedir. *A. baumannii*'nin, aminoglikozidler, sefalosporinler, karbapenemler, tigesiklin ve kolistin gibi birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir. Bu yüksek direnç oranlarının temel sebepleri β -laktamazların varlığı, düşük dış membran geçirgenliği ve yüksek aktiviteli atım pompaları olarak sayılabilir ve bu mekanizmalarla birçok antibiyotiğe karşı intrinsik direnç gösterirler [88]. *A. baumannii* intrinsik olarak AmpC-tipi sefalosporinaz üretmektedir ve *bla_{AmpC}* genin yakınında bulunan *ISAbal* sekansının insersiyonu, ekspresyonu arttırarak geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç geliştirmesine sebep olmaktadır [89]. Kromozomal olarak kodlanan *bla_{OXA-51}* geni de *A. baumannii* izolatlarının karbapenemlere olan duyarlılığını etkilemektedir. Ayrıca, *A. baumannii* tıbbi cihazlar da dahil olmak üzere katı yüzeylerde biyofilm oluşturmaya eğilimlidir. Bu nedenle, *A. baumannii* sadece tedavi edilmesi zor olan bir ajan değil, aynı zamanda da hastane ortamından eradike edilmesi gittikçe zorlaşan bir patojendir.

A. baumannii'de karbapenem direncinin gelişmesi için baskın iki mekanizma bulunmaktadır ve bunlar iki β -laktamaz alt grubunun üretilmesidir: karbapenem hidrolize eden sınıf D β -laktamazlar, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-58}* ve *bla_{OXA-24}*, ve MBL'lardır [90]. Kromozomal olarak kodlanan *bla_{OXA-51}* geni bütün izolatlarda (%100) saptanmıştır. Brezilya'da dört hastanenin katıldığı bir çalışmada *bla_{OXA-23}* geni için daha düşük bir göreceli prevalans bildirilmiş olsa da, çalışmamızda *bla_{OXA-51}* genini %70 oranla *bla_{OXA-23}* geni takip etmiştir [91]. İzolatların 12'sinde (%12.5) sadece *bla_{OXA-51}* geni bulunmuştur.

bla_{OXA-51} geni dahil edilmediğinde, izolatların 71'inde sadece *bla_{OXA-23}* geni, 2'sinde ise *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-24}* beraber saptanmıştır. Benzer olarak Wang ve ark.'nın 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada da KDAB izolatlarının hepsinde *bla_{OXA-51}* geni bulunurken, *bla_{OXA-58}* genine rastlanmamıştır. Benzer bir şekilde izolatların sadece %7.81'inin yalnızca *bla_{OXA-51}* taşıdığı bildirilmiş ve en yüksek prevalansın *bla_{OXA-23}* geni ile *bla_{OXA-51}* geninin kombinasyonu olduğu belirtilmiştir [92]. Çalışmamızda *bla_{OXA-23}* geni ikinci en yaygın karbapenemaz geni olarak saptanmıştır ve KDAB izolatları arasındaki prevalansı Türkiye'de 2016 yılında bildirilen rapora göre daha yüksektir. Raporda, *bla_{OXA-23}* geninin izolatların %32'sinde saptandığı bildirilmiştir [93]. Dolayısıyla verilerimiz, Türkiye'de KDAB izolatları arasında *bla_{OXA-23}* geninin prevalansının arttığını göstermektedir. Bulgularımızla uyumlu olarak, İtalya'dan bir rapor, *bla_{OXA-23}* geninin %81.7 ile en yaygın karbapenemaz olduğunu göstermiştir [94]. Klinik A. *baumannii* izolatlarının %12.5'inde (n=12) *bla_{OXA-24}* geni saptanmıştır. 2017 yılında ülkemizde yayınlanan ve 76 A. *baumannii* izolatının dahil edildiği çalışmada ise *bla_{OXA-24}* genine rastlanmamıştır [95]. Benzer bir şekilde, ülkemizde yoğun bakımda yatan hastalardan izole edilen 61 A. *baumannii* izolatında da *bla_{OXA-24}* geni saptanmamıştır [76]. Bulgularımız, ülkemizde *bla_{OXA-24}* prevalansında bir artış olduğunu göstermektedir.

KDAB enfeksiyonları dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur ve polimiksin B ve E (kolistin) gibi eski antibiyotiklerin kullanılmasını gerektirir. Son zamanlarda KDAB ülkemiz hastanelerinde endemik bir patojen haline gelmiş ve kolistinin yaygın kullanımı, kolistin direncinin ortaya çıkmasıyla sonuçlanmıştır [96]. Kolistin, ÇİD A. *baumannii* kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için son çare seçeneklerinden biri olarak kabul edilmektedir. Ancak kolistin dirençli izolatların dünya çapında bildirilmeye başlanması endişe yaratmaktadır. Karbapenem dirençli 96 klinik A. *baumannii* izolatının dahil edildiği çalışmamızda, 20 (%20.8) izolatın kolistine dirençli olduğu bulunmuştur. Kolistin dirençli suşların MİK değerleri 4 mg/L ila 128 mg/L arasında saptanmıştır. 2008-2011 yılları arasında Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde yatan 229 hastanın dahil edildiği çalışmada, 4 hastada (%1.7) kolistin direncine rastlanmıştır [97]. Çalışmamız, kolistin dirençli A. *baumannii* izolatlarının Türkiye'de prevalansının artışta olduğunu göstermektedir. Kolistin dirençli 20 izolatın hepsinde *bla_{OXA-51}* geni, 15'inde (%75.0) *bla_{OXA-23}* geni, 2'sinde (%9.5) *bla_{OXA-24}* geni bulunmaktadır. Kolistin dirençli izolatların %35'inin (n=7/20) anestezi, %10'nunun (n=2/20) nöroşirurji kliniğinden izole edilmiştir.

Salgınların takibi ve değerlendirilmesi için izolatların arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek ve bir suşu ilgili klonal soy ile ilişkilendirmek önemlidir. Bu nedenle çeşitli moleküler tiplendirme teknikleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında ayırım gücü, tekrarlanabilirliği ve duyarlılığı nedeniyle PFGE altın standart olarak kabul edilmektedir [98]. PFGE, sıklıkla hastane salgınlarının paternini ve hastaneler içinde ve arasında patojenlerin prevalansını belirlemek için kullanılmaktadır. Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesinde tedavi gören hastalardan izole edilen karbapenem dirençli 96 *A. baumannii* izolatı arasındaki moleküler ilişkiyi göstermek üzere PFGE uygulanmıştır. PFGE, klinik *A. baumannii* izolatlarının biri major (C pulstotipi, n=63, %65.6), ikisi orta (A ve D pulstotipleri, sırasıyla, n=16 ve n=10, %16.7 ve %10.4) olmak üzere toplamda 5 farklı pulstotipte (A, B, C, D, E) olduğunu göstermiştir. Karbapenemazların dağılımının pulstotiplere göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. A pulstotipinde izolatların %18.7'si *bla_{OXA-24}* genini taşıırken C pulstotipinde *bla_{OXA-24}* geni, izolatların %7.9'unda saptanmıştır. Hastaneden izole edilen *A. baumannii* izolatlarının farklı klonal tiplerde olduğunu klonal çeşitliliği göstermektedir. Klonal çeşitlilik, izole edilen örneklerin farklı kliniklerden alınan örnekler olmasıyla da ilişkilidir. Çalışmamızda, başlıca kan, idrar ve derin trakeal aspirat örneklerinden izole edilen KDAB izolatları bulunmakla birlikte örnekler toplamda 10 farklı klinik örnek türünden toplanmıştır. Bununla beraber, izolatlar, %42.7'si (n=41/96) anestezi, %7.3'ü (n=7/96) genel cerrahi ve %6.2'si (n=6/96) kadın doğum kliniğinden olmak üzere toplamda 21 farklı klinikten izole edilmiştir. *A. baumannii* izolatlarında klonal çeşitliliğin fazla olması, antibiyotik direncinin yaygın olması ve bilhassa yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar için tedavi seçeneklerinin neredeyse tükenmiş olması alternatif tedavi seçeneklerine yönelmeyi gerektirmektedir. Bu bağlamda, spesifik olarak bakterileri enfekte eden fajlar, bu patojenler için alternatif bir terapötik ajandır.

Bakteriyofajlar, antibiyotiklere dirençli bakterilerin tedavisi için umut verici bir seçenektir. Dirençli bakterilerin reseptör bağlanma bölgesine bir fajın bağlanması, reseptör ekspresyonunun değişmesine veya regülasyonunun durdurmasına sebep olur, böylece bakteriler faj enfeksiyonundan kaçabilir [99]. Faj saldırısı sonucu bakteriler kaçınılmaz olarak bu terapötik ajana karşı direnç geliştirmek için evrimleşir. Evrimleşen bakterinin, atım pompası aktivitesini değiştirdiği ve böylece antibiyotiklere karşı tekrar duyarlı hale geldiği bildirilmiştir [100]. Fajlar, sadece antibiyotik dirençli bakterilerle savaşta değil aynı zamanda antibiyotikle beraber kullanımında da uygulanacak antibiyotiğin dozunu düşürmek için kullanılabilecek bir seçenektir. Polisakkaritler bakterilerin büyüme ve fizyoloji gibi yapı ve fonksiyonlarında önemli roller oynamaktadır. Çoğu bakterilerde kalın makromoleküler

polisakkarit tabakaları bulunabilmektedir. Bu polisakkaritler bakteri patogeneğinde, biyofilm oluşumunda ve bakterilerin öldürme ve fagositoza karşı korunmasında rol oynamaktadırlar. Bakteriyofajların bakterisidal aktivitesi büyük ölçüde endolizinler, lizozimler ve bazı polisakkarit depolimerazlar gibi hidrolitik enzim özelliklerine dayanmaktadır [101]. Bakteriyel polisakkaritlerin parçalanmasında bakteriyofaj depolimerazları rol oynamaktadır. Bakteriyofajların bu polisakkarit depolimeraz aktivitesi, plak dışında "halo" olarak adlandırılan dairesel bir boğa gözü oluşturmaları ile karakterizedir. Faj polisakkarit depolimerazları bakterilerin biyofilm tabakasını degrade edebilmektedir ve bu sayede de antibiyotiklerin hücre içine iletimini kolaylaştırmaktadır [102, 103]. Dolayısıyla, fajların antibiyotiklerle beraber kullanımı, antibiyotik dozunu düşürdüğü gibi bakterilerin antibiyotiklere karşı tekrar duyarlı hale gelmesini de sağlamaktadır.

Çalışmamızda dört *A. baumannii* fajı çeşitli su kaynaklarından izole edilip karakterize edilmiştir. Fajların etkinlik spektrumları spot test ile belirlenmiş ve ϕ Ab31, izolatların %34.4'üne (n=33), ϕ Ab59, %32.3'üne (n=31), ϕ Ab69, %34.4'üne (n=33) ve ϕ Ab65 fajı ise klinik *A. baumannii* izolatlarının %35.4'üne (n=34) karşı etkili bulunmuştur (Tablo 13). Fajların oluşturduğu litik zonlar, tam liziz, yarı liziz ve opak liziz zon olarak belirlenmiştir. Tam litik zonda fajın damlatıldığı bölgede bakteri üremesi tamamen baskılanırken, opak zonda, zonun içerisindeki bakterilerin tamamı lizize uğramamıştır. İzole edilen fajların aktivitelerinin pulstotiplere göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır; ϕ Ab65, baskın olarak C pulstotipine etki ederken A pulstotipindeki etkinliği diğer fajlara kıyasla düşük bulunmuştur. Benzer şekilde, A pulstotipinde %31.2 etkinlik gösteren ϕ Ab31, ϕ Ab59 ve ϕ Ab69 fajlarının C pulstotipindeki etkinliği ϕ Ab65'e kıyasla düşük bulunmuştur.

Fajların alternatif bir ajan olarak kullanılması ve faj tedavisinin etkin olabilmesi için faj farmokokinetiğinin anlaşılması gereklidir. Fajların, MOI'lerinin, yaşam eğrilerinin, ısı ve pH stabilitelerinin belirlenmesi terapötik amaçlı faj uygulanabilirliğini belirleyen faktörlerden bazılarıdır.

MOI, fajın her bir bakteriye olan oranı olarak tanımlanmaktadır. Faj tedavisi için, tedavi süresince gereken faj yoğunluğunu belirlemek önemlidir. Ancak enfeksiyon döneminde fajların titreleri değişebilmektedir ve uygulanması gereken faj yoğunluğunun belirlenmesi zorlaşmaktadır. Çalışmamızda, izole edilem fajların MOI'lerinin, 1 ila 100 PFU/CFU arasında değiştiği belirlenmiştir. ϕ Ab69 ve ϕ Ab65'in MOI'sinin 10 PFU/CFU olduğu bulunmuştur. MOI'nin 10 olduğu durumda her bakteri hücresinin en az bir faj tarafından bağlanma ve enfekte olma şansının %99.9'dan fazla olduğu bildirilmiştir [104]. MOI'nin 10 olduğu durumda bakteri canlılığında 10.000 kattan fazla azalma olması

beklenmektedir. Buna karşılık MOI'nin 1 olduğunda ise bakterilerin %37'sinin hayatta kalmasının bekleneceği belirtilmiştir [105]. *A. baumannii* pnömonisi üzerine yapılan bir araştırmada, bakteriyel enfeksiyondan sonra, fare gruplarının, MOI 10 oranında faj ile tedavi edildiğinde hepsinin, MOI 1 oranında faj ile tedavi edildiğinde ise %50'sinin hayatta kaldığı gösterilmiştir [106].

Bakteriyofajların “*One-step growth*” eğrisi, duyarlı bakterilere fajların adsorpsiyonu, bakteri içindeki fajların latent periyodu ve fajların salınımı (patlama) olmak üzere üç aşamaya ayrılır [107]. Tek bir bakterinin birçok faj ile enfekte olabileceği bilinmektedir. Çalışmamızda fajların patlama boyutunun 118 PFU/CFU ile 3500 PFU/CFU arasında değiştiği belirlenmiştir. Fajların latent periyodları ise 5 dk ile 15 dk arasında değişmektedir. Kısa bir latent dönem ve yüksek patlama boyutu, fajların replikasyon etkinliğini göstermektedir (Şekil 7) [108].

Bakteriyofajlar genellikle aside duyarlı olarak kabul edilirler, ancak fajların asiditeye verdikleri tepki büyük farklılıklar gösterebilir. Neredeyse nötr bir pH ortamına bile duyarlı fajlar bulunabilirken çok düşük pH'lara direnç gösterebilen fajların varlığı da bilinmektedir. Genellikle, pH 5 ile 8 aralığında stabil oldukları bildirilen fajların geniş pH aralıklarını tolere etme yeteneği, oral yoldan uygulama için uygun olabileceklerini göstermektedir [109, 110]. ϕ Ab31'in farklı pH değerlerine duyarlılığı diğer izole edilen fajlardan daha fazla bulunmuştur. ϕ Ab31, pH 2, 4, 10 ve 12 seviyelerine duyarlı bulunmuş ve bu değerlerde plaklarda faja rastlanmamıştır. ϕ Ab31 dışındaki fajların pH 10 olduğunda son derece stabil ve faj titrelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. İzole edilen bütün fajların en yüksek titresine pH değeri 8 olduğunda ulaşılmıştır (Şekil 8).

Isı, fajların hayatta kalması için en önemli faktörlerden biridir. Fajların hücreye bağlanması, penetrasyonu, çoğalması ve latent periyodunun uzunluğunda temel bir rol oynadığı bilinmektedir [111]. Yüksek sıcaklığın nükleik asit ve protein denatürasyonu nedeniyle fajları inaktive ettiği bildirilmiştir. Yamaki ve ark. [112], izole ettikleri fajın titresinin, 60°C'de 60 dakikalık inkübasyondan sonra 3.5 log PFU mL⁻¹ azaldığını gözlemlemiştir. Çalışmamızda da ϕ Ab31 ve ϕ Ab59 titrelerinde 60°C'ye maruziyetten sonra sırasıyla, 3.68 ve 4.63 log PFU mL⁻¹ düşüş olduğu belirlenmiştir. ϕ Ab69 ve ϕ Ab65 titrelerinde önemli bir logaritmik düşüş saptanmamıştır. ϕ Ab31, ϕ Ab59 ve ϕ Ab65 titreleri 70°C'ye maruz kaldıklarında, önemli ölçüde düşmüş ϕ Ab69 ise bu sıcaklıkta dahi stabil bulunmuştur. Genel olarak izole edilen dört fajın da, 10°C ile 70°C arasında stabil oldukları belirlenmiştir (Şekil 10).

Bakteriyofajların çeşitliliği, elektron mikroskobu kullanılarak morfolojik olarak veya konak aralığı, boyutu, plakların morfolojisi, farklı sıcaklıklar ve pH aralığındaki stabilitesi gibi fajların biyolojik özelliklerinden yararlanılarak analiz edilmektedir. Bunlara ek olarak, fajların çeşitliliğini incelemek için faj genomlarının nükleotid dizilerinin *in silico* analizleri, genlerin PCR ile tanımlanması, restriksiyon enzim analizi, tam genom dizi analizi, PFGE gibi çeşitli moleküler yöntemlerden de yararlanılmaktadır.

Elektron mikroskobu görüntüleri, faj ailelerinin tanınması ve oluşturulması için temel sağlamış olmakla birlikte yeni keşfedilen fajların sınıflandırılması için de önemli kriterlerden biridir [113]. İzole edilen bütün fajlar *Myoviridae* ailesi üyesi olarak belirlenmiştir. *Myoviridae* ailesinde baş yapısı diğer kuyruklu fajlara göre daha büyüktür [114]. ϕ Ab31, ϕ Ab59 ve ϕ Ab69'un kuyruk boyları yaklaşık 100 nm, ϕ Ab65'in ise 75 nm olarak belirlenmiştir. ϕ Ab59 ve ϕ Ab31'in baş yapısı 50 nm, ϕ Ab65 ve ϕ Ab69'un 75 nm'dir.

Fajların konak aralığını belirlemek üzere *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* bakterileri kullanılmış ve izole edilen fajlar hiçbirine karşı aktivite göstermemiştir.

Restriksiyon analizi ve proteom analizi, çeşitli fajları karakterize etmek ve ayırt etmek için değerli bir yöntemdir. Fajların viral DNA'sı EcoRV, HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiştir. Restriksiyon profilleri, dört fajın hepsinin birbirinden farklı olduğunu göstermiş ve BamHI, ϕ Ab59 ve ϕ Ab31 fajlarını ek bir bölgeden daha keserek EcoRV ve HindIII'den farklı bir restriksiyon profili vermiştir. EcoRV enziminin tanıdığı kısa dizi ϕ Ab65'te yoktur. Ancak HindIII ve BamHI, ϕ Ab65 viral DNA'sını kesebilmiştir. Proteom analizi, fajların birbirinden farklı protein bantlarını göstermiş ve fajları birbirinden ayırmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karbapenem dirençli 96 klinik *A. baumannii* izolatının dahil edildiği ve bu izolatların klonal ilişkisi ve oksasilinaz genlerinin dağılımının araştırıldığı çalışmamızda bu izolatlarla karşı aktivite gösteren dört faj, ülkemizdeki çeşitli su kaynaklarından izole edilmiştir. İntrinsik olarak kodlanan *bla_{OXA-51}* geninin bütün izolatlarda bulunduğu saptanmıştır. Buna ek olarak *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-24}* genlerinin prevalansının da ülkemizde artışta olduğu kanısına varılmıştır. İzolatların 20'sinin (%20.8) kolistin dirençli suşlar olduğu belirlenmiş ve ülkemizdeki kolistin dirençli suşlardaki artış dikkat çekmiştir. *A. baumannii* izolatlarındaki yüksek klonal çeşitlilik, artan antibiyotik direnci ve tedavi seçeneklerinin her geçen gün daralması, alternatif bir terapötik ajan ihtiyacını gündeme getirmiştir. Bu bağlamda, ökaryot hücrelere zararsız ve spesifik olarak bakterileri enfekte eden bakteriyofajların, bu patojenlere karşı umut verici bir alternatif olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda izole edilen fajların, klinik *A. baumannii* izolatlarına karşı etkinliği %32.3 ile %35.4 arasında bulunmuştur. Proteom analizi ve restriksiyon profilleri ile izole edilen fajların birbirlerinden farklı oldukları belirlenmiştir. TEM ile morfolojileri belirlenen fajların, alternatif bir ajan olarak kullanılabilmesi ve faj tedavisinin etkin olabilmesi için faj farmokinetiği araştırılmıştır. Bu bağlamda, fajların MOI'leri, yaşam eğrileri, ısı ve pH stabilitesi terapötik amaçlı kullanıma uygunluklarını test etmek üzere belirlenmiştir.

Bu çalışmada izole edilen fajlar, kısa latent periyodu, yüksek patlama boyutu ve çok çeşitli pH ve sıcaklıkları tolere etme konusunda üstün özellikler göstermiştir. Geniş bir pH ve sıcaklık aralığına tolerans, fajların antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilmesi için önemlidir. Bu nedenle, faj tedavisi ile maksimum etkinlik elde etmek için fajların ısı ve pH stabilitesini, yüksek litik aktivitelerini, kısa latent periyodlarını, yüksek patlama boyutlarını ve her bir bakteriyel ajana özgü MOI'lerini göstermek önemlidir. Bu çalışmada izole edilen fajlar, olası uygulamalar için umut verici adaylardır. Gelecekte, litik aktivite spektrumlarını arttırmak ve bakterilerin fajlara direnç kazanmasını önlemek için faj kokteyli preparasyonları hazırlanmalıdır. Bunun için daha fazla fajın izole edilip karakterize edilmesi gerekmektedir. Fajların genetik çeşitliliği çok yüksektir. Gelecekte, izole edilen faj genomlarının dizilenmesi ile biyoteknolojik ve tıbbi araçlar olarak potansiyel kullanımları olan yeni faj proteinleri tespit edilebilir ve viral enfeksiyon sırasında fajlar tarafından kullanılan biyolojik mekanizmaların çeşitliliği hakkında bilgi sahibi olunabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. World J Clin Cases. 2014;2(12):787-814. DOI:10.12998/wjcc.v2.i12.787
2. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev. 2013;37(2):130-155. DOI:10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x
3. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009 Jan 1;48(1):1-12. DOI: 10.1086/595011. PMID: 19035777
4. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Mar 13;7:55. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00055
5. Thandar M, Lood R, Winer BY, Deutsch DR, Euler CW, Fischetti VA. Novel Engineered Peptides of a Phage Lysin as Effective Antimicrobials against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Apr 22;60(5):2671-9. DOI: 10.1128/AAC.02972-15
6. Principi N, Silvestri E, Esposito S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. Front Pharmacol. 2019;10:513. DOI:10.3389/fphar.2019.00513
7. Gundogdu A, Bolkvadze D, Kilic H. *In vitro* Effectiveness of Commercial Bacteriophage Cocktails on Diverse Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* Strains. Front Microbiol. 2016 Nov 3;7:1761. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01761
8. İlktaç M, Eser Ö, Güran M, Cömert F, Yurdakul P, Cevahir N, et al. Nonfermenter Gram-Negatif Basiller. Başustaoğlu AC, Us AD, ed. Koneman renkli atlas ve tanısal mikrobiyoloji kitabı. 7. basım Ankara: Hipokrat Yayıncılık; 2017. s. 385-388.
9. Tikun V. *Acinetobacter baumannii*: Virulence Strategies and Host Defense Mechanisms. DNA Cell Biol. 2022;41(1):43-48. DOI:10.1089/dna.2021.0588

10. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):538-582. doi:10.1128/CMR.00058-07
11. Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PLoS One. 2011;6(8):e22674. DOI:10.1371/journal.pone.0022674
12. Uppalapati SR, Sett A, Pathania R. The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. Front Microbiol. 2020;11:589234. DOI:10.3389/fmicb.2020.589234
13. Borneleit P, ve Kleber HP. The outer membrane of acinetobacter: structure-function relationships. In: Towner KJ, Bergogne-Bérézin E, Fewson CA, editors. The biology of *Acinetobacter*. Boston, MA: Springer. p. 259-271. DOI: 10.1007/978-1-4899-3553-3_18
14. Srinivasan VB, Vaidyanathan V, Rajamohan G. AbuO, a TolC-like outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*, is involved in antimicrobial and oxidative stress resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(2):1236-1245. DOI:10.1128/AAC.03626-14
15. Nie D, Hu Y, Chen Z, Li M, Hou Z, Luo X, et al. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. J Biomed Sci. 2020 Jan 18;27. DOI: 10.1186/s12929-020-0617-7
16. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect Immun. 2009; 77:3150-3160
17. Smani Y, Mcconnell MJ, Pachon J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. PLoS One. 2012;7:e33073
18. Sanchez-Encinales V, Alvarez-Marin R, Pachon-Ibanez ME, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Garnacho-Montero J, et al. Overproduction of outer membrane protein a by *Acinetobacter baumannii* as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. J Infect Dis. 2017;215:966–74.
19. Smani Y, Fabrega A, Roca I, Sanchez-Encinales V, Vila J, Pachon, J. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:1806–1808. DOI: 10.1128/AAC.02101-13

20. Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Pathog. 2015;11(2):e1004691. DOI:10.1371/journal.ppat.1004691
21. Jan AT. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. Front Microbiol. 2017;8:1053. DOI:10.3389/fmicb.2017.01053
22. Ellis TN, Leiman SA, Kuehn MJ. Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both LPS and protein components. Infect Immun. 2010;78:3822–3831.
23. Kwon SO, Gho YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. FEMS Microbiol Lett. 2009;297:150–156. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01669.x.
24. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. Infect Immun. 2012;80(3):1015-1024. DOI:10.1128/IAI.06279-11.
25. Weber BS, Kinsella RL, Harding CM, Feldman MF. The Secrets of *Acinetobacter* Secretion. Trends Microbiol. 2017;25(7):532-545. DOI:10.1016/j.tim.2017.01.005.
26. Lewis JM, Deveson Lucas D, Harper M, Boyce JD. Systematic Identification and Analysis of *Acinetobacter baumannii* Type VI Secretion System Effector and Immunity Components. Front Microbiol. 2019;10:2440. DOI:10.3389/fmicb.2019.02440.
27. Dal T, Dal MS, Ağır İ. *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnci ve AdeABC Aktif Pompa Sistemleri: Literatürün Gözden Geçirilmesi. Van Tıp Dergisi. 2012;19(3):137-148.
28. Thakuria B, Lahon K. The Beta Lactam Antibiotics as an Empirical Therapy in a Developing Country: An Update on Their Current Status and Recommendations to Counter the Resistance against Them. J Clin Diagn Res. 2013 Jun;7(6):1207-14
29. Şadan G. Beta-laktam antibiyotikler. Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics. 2003;1(2):194-202.
30. Davis JL. Pharmacologic Principles. In: Equine Internal Medicine. 4th ed. Elsevier; 2018:79-137.

31. Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). *Expert Op Pharmacother*. 2013;14(2):199-210.
32. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:969–976.
33. Bonomo RA. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(1):a025239. DOI:10.1101/cshperspect.a025239
34. Ministry of Health. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/uamdss>
35. Ramadan RA, Gebriel MG, Kadry HM, Mosallem A. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of carbapenemase genes and E-test evaluation of colistin-based combinations. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1261-1269.
36. Agoba EE, Govinden U, Peer AKC, Osei Sekyere J, Essack SY. ISAbal Regulated OXA-23 Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strains in Durban, South Africa. *Microb Drug Resist*. 2018 Nov;24(9):1289-1295. DOI: 10.1089/mdr.2017.0172.
37. Livermore DM, Woodford N. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*. 2006;14:413–420. DOI:10.1016/j.tim.2006.07.008.
38. Evans BA, Hamouda A, Amyes SG. The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Curr Pharm Des*. 2013;19(2):223-238.
39. Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and beta-lactamases to multidrug-resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:5247–5257. DOI:10.1128/AAC.00730-13.
40. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: A last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011;11:381–393. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70056-1.
41. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1277:91–104. DOI:10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x.
42. Potter RF, D'Souza AW, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resist Updat*. 2016;29:30-46.

43. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006;12(9):826-836. DOI:10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x
44. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. Pathogens. 2021;10(3):373. DOI:10.3390/pathogens10030373
45. Kutter E, Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005.
46. Łobocka M, Dąbrowska K, Górski A. Engineered Bacteriophage Therapeutics: Rationale, Challenges and Future. BioDrugs. 2021;35(3):255-280. DOI:10.1007/s40259-021-00480-z
47. Twort FW. An investigation on the nature of ultra- microscopic viruses. Bacteriophage 2011;1:127–129.
48. D’Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D’Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. Res Microbiol. 2007;158:553–554.
49. Salmond GP, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. Nat Rev Microbiol. 2015;13(12):777-786. DOI:10.1038/nrmicro3564
50. Dublanchet A, Bourne S. The epic of phage therapy. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2007;18(1):15-18. DOI:10.1155/2007/365761
51. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(3):649-659. DOI:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001
52. Summers W C. Felix d’Herelle and the origins of molecular biology. New Haven, Conn: Yale University Press; 1999.
53. Ackermann HW. Phage Classification and Characterization. In: Clokie M.R., Kropinski A.M. (eds) Bacteriophages. Methods in Molecular Biology™, 2009;501. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13
54. Bradley DE. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. Bacteriol Rev. 1967;31(4):230-314.
55. Ackermann HW. Bacteriophage taxonomy. Microbiology Australia. 2011;32(2):90. DOI:10.1071/ma11090
56. Ackermann HW, Eisenstark A. The present state of phage taxonomy. Intervirology. 1974;3(4):201-219. DOI:10.1159/000149758

57. Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch ViroL*. 2001;146(5):843-857. DOI:10.1007/s007050170120
58. Chibani CM, Farr A, Klama S, Dietrich S, Liesegang H. Classifying the Unclassified: A Phage Classification Method. *Viruses*. 2019;11(2):195. DOI:10.3390/v11020195
59. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses*. 2021;13(3):506. DOI:10.3390/v13030506
60. Krupovic M, Dutilh BE, Adriaenssens EM, Wittmann J, Vogensen FK, Sullivan MB, et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Arch Virol*. 2016 Apr;161(4):1095-9. DOI: 10.1007/s00705-015-2728-0.
61. Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol*. 2003 May;154(4):245-51. DOI: 10.1016/S0923-2508(03)00067-6
62. Fokine A, Rossmann MG. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*. 2014;4(1):e28281. DOI:10.4161/bact.28281
63. Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, Dreesens LL, Beaumont HJE, Lavigne R, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Dec;16(12):760-773. DOI: 10.1038/s41579-018-0070-8.
64. Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and Phylogeny. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(3):125-138. DOI:10.1038/s41579-019-0311-5
65. Hua J, Huet A, Lopez CA, Toropova K, Pope WH, Duda RL, et al. Capsids and Genomes of Jumbo-Sized Bacteriophages Reveal the Evolutionary Reach of the HK97 Fold. *mBio*. 2017 Oct 17;8(5):e01579-17. DOI: 10.1128/mBio.01579-17.
66. Ackermann, HW. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol*. 2007;152:227–243
67. White HE, Orlova EV. Bacteriophages: Their Structural Organisation and Function. In: *Bacteriophages: Perspectives and Future*. IntechOpen; 2020.
68. Hofer U. The sting is in the phage's tail. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(8):477-477. DOI:10.1038/nrmicro.2016.97
69. Xu J, Gui M, Wang D, Xiang Y. The bacteriophage Φ 29 tail possesses a pore-forming loop for cell membrane penetration. *Nature*. 2016;534(7608):544-547. DOI:10.1038/nature18017
70. Olszak T, Latka A, Roszniowski B, Valvano MA, Drulis-Kawa Z. Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Curr Med Chem*. 2017;24(36):3987-4001. DOI:10.2174/0929867324666170413100136

71. Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, Doron S, Stokar-Avihail A, Peleg Y, et al. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature*. 2017 Jan 26;541(7638):488-493. DOI: 10.1038/nature21049.
72. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [(accessed on 1 June 2017)]; Available online: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints
73. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>. Published February 16, 2016. Accessed June 7, 2022.
74. Centers for Disease Control and Prevention. <https://arpsp.cdc.gov/profile/arln/cra>. Accessed June 7, 2022.
75. Uskudar-Guclu A, Guney M, Sig AK, Kilic S, Baysallar M. Arising prevalence of oxa-48 producer *Escherichia coli* and OXA-48 with NDM co-producer *Klebsiella pneumoniae* strains. *Revista Romana de Medicina de Laborator*. 2019;27(3):319-326. DOI:10.2478/rrlm-2019-0030
76. Guclu A, Gozen A. Genetic diversity of oxa-like genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from icus. *Clinical Laboratory*. 2020;66(10/2020). DOI:10.7754/clin.lab.2020.200135
77. Lin N-T, Chiou P-Y, Chang K-C, Chen L-K, Lai M-J. Isolation and characterization of ΦAB2: A novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Research in Microbiology*. 2010;161(4):308-314. DOI:10.1016/j.resmic.2010.03.007
78. Kasman LM, Porter LD. Bacteriophages. In: Statpearls. ; 2021.
79. Santos SB, Carvalho CM, Sillankorva S, Nicolau A, Ferreira EC, Azeredo J. The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiol*. 2009;9:148. DOI:10.1186/1471-2180-9-148
80. Titering - phagesdb. <https://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PDF-Tbox-4titering.pdf>. Accessed June 10, 2022.
81. Yang Z, Liu X, Shi Y, Yin S, Shen W, Chen J, et al. Characterization and genome annotation of a newly detected bacteriophage infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Arch Virol*. 2019 Jun;164(6):1527-1533. DOI: 10.1007/s00705-019-04213-0.
82. Tan CW, Rukayadi Y, Hasan H, Abdul-Mutalib NA, Jambari NN, Hara H, et al. Isolation and Characterization of Six *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Bacteriophages From Seafood Samples. *Front Microbiol*. 2021 Mar 10;12:616548. DOI: 10.3389/fmicb.2021.616548.

83. Hong Y, Pan Y, Ebner PD. Meat science and muscle biology symposium: development of bacteriophage treatments to reduce *Escherichia coli* O157: H7 contamination of beef products and produce. J Anim Sci. 2014 Apr 1;92(4):1366-77.
84. Bolger-Munro M, Cheung K, Fang A, Wang L. T4 Bacteriophage Average Burst Size Varies with *Escherichia coli* B23 Cell Culture Age. J Exper Microbiol and Immunol. 2013;17:115-119.
85. Sangha KK, Kumar BV, Agrawal RK, Deka D, Verma R. Proteomic characterization of lytic bacteriophages of *Staphylococcus aureus* isolated from sewage affluent of India. Int Sch Res Notices. 2014;2014:1-6. DOI:10.1155/2014/265298
86. Kaliniene L, Klaus V, Truncaite L. Low-temperature T4-like coliphages vB_EcoM-VR5, vb_ecom-VR7 and vB_EcoM-VR20. Arch Virol. 2010;155(6):871-880. DOI:10.1007/s00705-010-0656-6
87. Rohde C, Wittmann J, Kutter E. Bacteriophages: A therapy concept against multi-drug-resistant bacteria. Surgical Infections. 2018;19(8):737-744. DOI:10.1089/sur.2018.184
88. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. IUBMB Life. 2011;63(12):1061-1067. DOI:10.1002/iub.532
89. H  ritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2006;12(2):123-130. DOI:10.1111/j.1469-0691.2005.01320.x
90. Sharma M, Singhal L, Gautam V, Ray P. Distribution of carbapenemase genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* & a comparison of MALDI-TOF mass spectrometry-based detection of carbapenemase production with other phenotypic methods. Indian J Med Res. 2020;151(6):585-591. DOI:10.4103/ijmr.IJMR_1383_18
91. Mostachio AK, van der Heidjen I, Rossi F, Levin AS, Costa SF. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. J Med Microbiol. 2009;58(Pt 11):1522-1524. DOI:10.1099/jmm.0.011080-0
92. Wang TH, Leu YS, Wang NY, Liu CP, Yan TR. Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood isolates in Taiwan. Antimicrob Resist Infect Control. 2018;7:123. DOI:10.1186/s13756-018-0410-5

93. Altun Ş, Koçak Tufan Z, Altun B, Önde U, Kınıklı S, Demiröz AP. Growing OXA-23 type strains among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and tigecycline as an alternate combination therapy. Turk J Med Sci. 2016;46(6):1894-1899. DOI:10.3906/sag-1508-20
94. Principe L, Piazza A, Giani T, Bracco S, Caltagirone MS, Arena F, et al. Epidemic diffusion of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. J Clin Microbiol. 2014;52:3004-10.
95. Davandeh I, Eraç B, Aydemir SŞ. Investigation of class-d beta-lactamases causing carbapenem resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. Turk J Med Sci. 2017;47(5):1661-1666. DOI:10.3906/sag-1607-91
96. Metan G, Zarakolu P, Otlı B, Tekin İ, Aytaç H, Bölek EÇ, et al. Emergence of colistin and carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (CCR-Acb) complex in a neurological intensive care unit followed by successful control of the outbreak. J Infect Public Health. 2020;13(4):564-570. DOI:10.1016/j.jiph.2019.09.013
97. Güven T, Yılmaz G, Güner HR, Kaya Kalem A, Eser F, Taşyaran MA. Increasing resistance of nosocomial *Acinetobacter baumannii*: are we going to be defeated? Turk J Med Sci. 2014;44(1):73-78. DOI:10.3906/sag-1211-21
98. Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. Infect Genet Evol. 2019;74:103935. doi:10.1016/j.meegid.2019.103935
99. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol. 2010;8(5):317-327. DOI:10.1038/nrmicro2315
100. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. Sci Rep. 2016;6(1). DOI:10.1038/srep26717
101. Yan J, Mao J, Xie J. Bacteriophage polysaccharide Depolymerases and biomedical applications. BioDrugs. 2013;28(3):265-274. DOI:10.1007/s40259-013-0081-y
102. Criscuolo E, Spadini S, Lamanna J, Ferro M, Burioni R. Bacteriophages and Their Immunological Applications against Infectious Threats. J Immunol Res. 2017;2017:3780697. DOI:10.1155/2017/3780697
103. Zurabov F, Zhilenkov E. Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation. Virol J. 2021;18(1). DOI:10.1186/s12985-020-01485-w

104. Kasman LM, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt MG, Norris JS. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol.* 2002;76(11):5557-5564. DOI:10.1128/jvi.76.11.5557-5564.2002
105. Abedon ST. Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). *Bacteriophage.* 2016;6(3):e1220348. DOI:10.1080/21597081.2016.1220348
106. Jeon J, Ryu CM, Lee JY, Park JH, Yong D, Lee K. In Vivo Application of Bacteriophage as a Potential Therapeutic Agent To Control OXA-66-Like Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* Strains Belonging to Sequence Type 357. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(14):4200-4208. DOI:10.1128/AEM.00526-16
107. Ellis EL, Delbrück M. The Growth Of Bacteriophage. *J Gen Physiol.* 1939;22(3):365-384. DOI:10.1085/jgp.22.3.365
108. Sofy AR, El-Dougdoug NK, Refaey EE, Dawoud RA, Hmed AA. Characterization and Full Genome Sequence of Novel KPP-5 Lytic Phage against *Klebsiella pneumoniae* Responsible for Recalcitrant Infection. *Biomedicines.* 2021 Mar 28;9(4):342. DOI:10.3390/biomedicines9040342.
109. Chow MS, Rouf MA. Isolation and Partial Characterization of Two *Aeromonas hydrophila* Bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 1983;45(5):1670-1676. DOI:10.1128/aem.45.5.1670-1676.1983
110. Khawaja K, Abbas Z, Rehman S. Isolation and characterization of lytic phages TSE1-3 against *Enterobacter cloacae*. *Open Life Sci.* 2016;11(1): 287-292. DOI:[10.1515/biol-2016-0038](https://doi.org/10.1515/biol-2016-0038).
111. Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages--review. *Folia Microbiol (Praha).* 2011 May;56(3):191-200. DOI:10.1007/s12223-011-0039-8.
112. Yamaki S, Omachi T, Kawai Y, Yamazaki K. Characterization of a novel *Morganella morganii* bacteriophage FSP1 isolated from river water. *FEMS Microbiol Lett.* 2014 Oct;359(2):166-72. DOI: 10.1111/1574-6968.12560.
113. Ackermann HW. Bacteriophage electron microscopy. *Adv Virus Res.* 2012;82:1-32. DOI:10.1016/B978-0-12-394621-8.00017-0.
114. Ackermann HW. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv Virus Res.* 1998;51:135–201.