T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

Rize ve Çevresindeki Atık Sulardan Patojen Bakterileri Enfekte Eden Bakteriyofaj İzolasyonu

Proje No: TSA-2023-1443

Proje Türü:
Normal Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Öğr. Gör. Dr. Erva RAKICI
Tıp Fakültesi/Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı:
Birimi/Bolumu:
Prof. Dr. ALİ Osman KILIÇ
Karadeniz Teknik Üniversitesi/Tıp Fakültesi/Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Tıp Fakültesi/Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

İsProf. Dr. Ayşegül Çopur Çiçek
İstanbul Medipol Üniversitesi/ Tıp Fakültesi/Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Dr. Öğr. Gör. Ersin KARATAŞ
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi/Patnos Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

Dr. Öğr. Gör. Ülkü Zeynep ÜREYEN ESERTAŞ
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi/Tıp Fakültesi/Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Öğr. Gör. Dr. Nebahat Ejder
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi /Tıp Fakültesi/Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Aralık 2024

RİZE

ÖNSÖZ

“Rize ve Çevresindeki Atık Sulardan Patojen Bakterileri Enfekte Eden Bakteriyofaj İzolasyonu” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’nün TSA-2023-1443 kodlu projesinden sağlanan destekle tamamlanmıştır. Üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne çalışmaya sağladığı desteklerinden dolayı proje ekibi olarak teşekkürlerimizi sunarız.

Öğr. Gör. Dr. Erva RAKICI,
Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ,
Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ,
Prof. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK,
Dr. Öğr. Gör. Ersin KARATAŞ
Dr. Öğr. Gör. Ülkü Zeynep ÜREYEN ESERTAŞ,
Öğr. Gör. Dr. Nebahat EJDER,

Rize 2024,

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	**6**
ABSTRACT	**7**
1.GİRİŞ	**8**
2.GENEL BİLGİLER	**9**
2.1.Bakteriyofajlar	**9**
2.2.Fajların Tıpta Kullanımı ve Faj Terapi	**10**
2.3. Atık Sular ve Faj	**12**
3.GEREÇ ve YÖNTEM	**13**
3.1.Atık Su Örneklerinin Alınması	**13**
3.2. Fajların Atık Sudan Zenginleştirilmesi ve İzolasyonu	**14**
3.3. Bakteri İzolasyonu	**14**
3.4. Fajların Konak Spektrumlarının Belirlenmesi	**14**
3.5. Litik Faj Enfeksiyonun Yapılması	**15**
3.6. Fajların Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Stoklanması	**15**
3.7. Faj Titresinin Belirlenmesi	**15**
3.8. Faj ve Lizat Örneklerinin ATCC Bakterilerinde Konak Spektrumunun Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonun Yapılması	**16**
3.9. Faj ve Lizat Örneklerinin Çeşitli Klinik Bakterilerde Konak Tarama ve Enfeksiyonu	**16**
3.10. Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	**16**
4.BULGULAR	**17**
4.1.Atık Su Örneklerinden Fajların Zenginleştirilmesi ve İzolasyonu	**17**
4.2.Bakteri İzolasyonu	**17**
4.3.Fajların Konak Spektrumunun Belirlenmesi	**17**
4.4.Litik Faj Enfeksiyonun Yapılması ve Fajların Saflaştırılması	**17**
4.5. Faj Titresinin Belirlenmesi	**20**
4.6.Faj ve Lizat Örneklerinin ATCC Bakterilerinde Konak Spektrumlarının Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonun Yapılması	**20**
4.7.Faj Ve Lizat Örneklerinin Çeşitli Klinik Bakterilerde Konak Spektrumlarının Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonun Yapılması	**23**
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	**28**
6.REFERANSLAR	**30**
7.EKLER	**34**

TABLOLAR, ŞEKİLLER ve RESİMLER LİSTESİ

TABLOLAR

	Sayfa No
Tablo 1. Atık su örneklerinin alındığı yer, alındığı tarih ve koordinatları	**13**
Tablo 2. Atık sulardan izole edilen faj lizatlarının konak spektrumunda olan bakteriler	**18**
Tablo 3. Zenginleştirme lizatlarının çevre bakterilerine etkisi	**19**
Tablo 4. Atık sulardan izole edilen konak bakteriler ve konakçı fajları	**19**
Tablo 5: Çevre lizatlarının ATCC bakterilerine etkisi	**20**
Tablo 6. Atık sulardan izole edilen fajların ATCC suş konakları	**23**
Tablo 7. Çevre lizatlarının karbapenem duyarlı *Klebsiella pneumoniae'*lere etkisi	**24**
Tablo 8. Karbapenem duyarlı olmayan *Klebsiella pneumoniae* suşları antibiyogram sonuçları	**25**
Tablo 9. Çevre fajlarının İstanbul Medipol suşlarına etkisi	**26**
Tablo 10. İstanbul Medipol Suşları Antibiyogram Sonuçları	**27**

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1. Bakteriyofajın genel yapısı	**9**
Şekil 2. Bakteriyofajın litik ve lizojenik yaşam döngüsü	**10**
Şekil 3. Faj Titresinin Belirlenmesi	**16**

RESİMLER

	Sayfa No
Resim 1. Atık su örneklerinin alındığı yerler	**13**
Resim 2. Faj lizatlarının konak bakteriler üzerindeki etkisinin gösterilmesi	**15**
Resim 3. Faj Enfeksiyonu sonrasında faj plaklarının görüntüsü	**18**
Resim 4. Faj titrasyon plağı	**20**
Resim 5. Farklı morfolojiye sahip ATCC bakterileri ait enfeksiyon plakları	**21**
Resim 6. Farklı morfolojiye sahip *Klebsiella pneumoniae* klinik örneklerine ait enfeksiyon plakları	**24**
Resim 7. Farklı morfolojiye sahip klinik bakterilere ait enfeksiyon plakları	**26**

ÖZET

Antibiyotik direnci dünyayı tehdit eden önemli bir halk sağlığı sorunudur. Özellikle çoklu antibiyotik dirençli ve hastane enfeksiyonlarından sorumlu patojen bakteriler ile etkin bir mücadele için kullanılacak alternatif yöntemlerin ortaya konması ve etkili yeni moleküllerin keşfedilmesi amacıyla yapılan çalışmalar son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Bu yöntemlerden biri bakterilerin doğal düşmanı olan bakteriyofajların (faj) kullanıldığı faj terapidir. Fajlar etki spektrumu dışında kalan bakterilere etkisiz olduğu için, antibiyotiklerin normal mikrofloraya olan olumsuz etkilerini yoktur, bu nedenle konak spektrumu geniş fajların izole edilmesi ve karakterizasyonu büyük bir önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, Rize ve çevresinden alınan dokuz farklı atık su örneğinden patojen bakteriler (konak) ve bu bakterileri enfekte eden litik fajlar izole edilerek konak spektrumları belirlenmiştir. Standart bakteriyolojik yöntemler kullanılarak izole edilen bakteriler litik faj izolasyonu için konak hücre olarak kullanılmıştır. Bunun için, filtre edilmiş atık su örnekleri faj rezervuarı olarak kullanılmıştır. Atık su örneklerinden toplamda 10 faj lizatı elde edilmiştir. Litik enfeksiyon sonucu plak oluşturan fajlar izole edilerek konak spektrumları taranmıştır. Fajların konak spektrumları çevreden izole edilen çevre bakterilerine (*Acinetobacter baumanii, Escherichia coli, Enterobacter asburiae)*, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi koleksiyonunda yer alan klinik (*Klebsiella pneumoniae)* ve standart ATCC suşları (*E.coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella Typhimurium* ATC14028) suşlarına ve İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundaki klinik orijinli patojen bakteri suşlarına (*E. coli, Kelbsiella, Pseudomas*) karşı litik etki belirlenmiştir. Fajların litik etkili olduğu bu suşlar klinikte sıkça karşılaşılan, patojen ve antibiyotiklerin büyük bir çoğunluğuna karşı dirençlidir. Bu fajların çeşitli patojen bakterilere karşı *in vitro* litik aktiviteleri, özellikle yara gibi yüzeyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerle ile kombine şekilde tedavide kullanılma potansiyelleri olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Atık su, Bakteriyofaj, Faj terapisi, Antibiyotik direnci

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a major public health problem threatening the world. In recent years, studies to identify alternative methods to effectively control pathogenic bacteria, especially those with multiple antibiotic resistance and responsible for nosocomial infections, and to discover new effective molecules have gained great importance. One such method is phage therapy, which uses bacteriophages (phages), the natural enemies of bacteria. Since phages are ineffective against bacteria outside their range of action, they do not have the negative effects of antibiotics on normal microflora, so the isolation and characterisation of phages with a broad host spectrum is of great importance.

In this study, pathogenic bacteria (host) and lytic phages infecting these bacteria were isolated from nine different wastewater samples taken from Rize and its surroundings and their host spectra were determined. Bacteria isolated using standard bacteriological methods were used as host cells for lytic phage isolation. For this, filtered wastewater samples were used as phage reservoirs. A total of 10 phage lysates were obtained from wastewater samples. Phages forming plaques as a result of lytic infection were isolated and their host spectra were screened. Host spectra of the phages were compared to environmental bacteria isolated from the environment (*Acinetobacter baumanii, Escherichia coli, Enterobacter asburiae*), clinical (*Klebsiella pneumoniae*) and standard ATCC strains (*E.coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) in Recep Tayyip Erdoğan University collection and lytic effect against clinically pathogenic bacterial strains (*E. coli, Klebsiella, Pseudomas*) in the culture collection of Istanbul Medipol University Department of Medical Microbiology. These phage lytic strains are resistant to most of the pathogens and antibiotics commonly encountered in the clinic. The in vitro lytic activity of these phages against various pathogenic bacteria suggests that they have the potential to be used in combination with antibiotics, especially in the treatment of superficial infections such as wounds.

Keywords: Wastewater, Bacteriophage, Phage therapy, Antibiotic resistance

1.GİRİŞ

Antibiyotikler, yaklaşık bir asırdır insanlığın çeşitli bulaşıcı hastalıklara karşı kazandığı zaferde önemli bir rol oynamıştır. Ancak, antibiyotiklerin yersiz ve uygunsuz kullanımı, özellikle çoklu ilaca dirençli ve aşırı ilaca dirençli bakteriler arasında bakteriyel direncin hızla çoğalmasına ve yayılmasına yol açmıştır. Antibiyotiklere alternatif olabilecek tedavi yöntemlerinin önem kazanması ile son yıllarda, bakteriyofajlar (faj) enfeksiyon kontrolünde bakterisidal özelliklere sahip antibiyotik olmayan ajanlar olarak büyük ilgi görmüştür (Jamal vd., 2019; Balcão vd., 2022; Weber-Dąbrowska vd., 2023).

Fajlar, bakterileri enfekte etme ve parçalama yeteneğine sahip virüslerdir (Li vd., 2023). Konakçı bakterileri istila ederek hızla çoğalabilir, daha sonra bakteri hücrelerini bozmak için endolizinler (lizinler) salgılayabilir ve böylece antibakteriyel etki gösterebilirler. Antibiyotiklerin keşfinden on yıl önce, 1919 gibi erken bir tarihte, Fransız bilim adamı Félix d'Hérelle dizanteri ve diğer bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için ilk kez fajları kullanmış ve olumlu sonuçlar elde etmiştir (Chanishvili, 2012). Bununla birlikte, o dönemde faj biyolojisinin sınırlı anlaşılması ve verimsiz faj teknikleri nedeniyle, faj tedavisi yavaş yavaş geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumu ve güçlü etkinlik sergileyen antibiyotikler tarafından desteklenmiştir.

Antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı ile bakteriyal ilaç direnci giderek daha ciddi bir endişe haline gelmesiyle, 21. yüzyılda yeni antibiyotik araştırma ve geliştirmenin neredeyse durmasına neden olmuştur. Bakteriyel ilaç direnci gibi kritik bir sorunla karşı karşıya kalan insanlık, etkili antibiyotiklerin yokluğu ile karakterize edilen bir "antibiyotik sonrası dönem" ile karşı karşıya kalması söz konusudur (Luepke vd., 2017). Bu nedenle antibiyotiklere alternatif arayışı önem kazanmıştır. Faj terapisi yeniden gündeme gelmiş ve yenilenen bir ilgiyle gelişim kazanmaktadır (Rahimi-Midani vd., 2021). Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) henüz klinik kullanım için herhangi bir faj ürününe izin vermemiş olsa da, çok sayıda çalışma ve faz I/II klinik deney faj tedavisinin güvenliğini ve etkinliğini göstermiştir (Bao vd., 2020; Mulzer vd., 2020; Petrovic Fabijan vd., 2020; Rubalskii vd., 2020; Dedrick vd., 2021; Johri vd., 2021; Wu vd., 2021).

Hem Avrupa Birliği hem de Amerika Birleşik Devletleri sırasıyla 2013 ve 2016 yıllarında faj tedavisinin ilaca dirençli bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkinliğini ve güvenliğini kanıtlayan klinik çalışmalar başlatmıştır (Jault vd., 2019; Poirel vd., 2020; Uyttebroek vd., 2022).

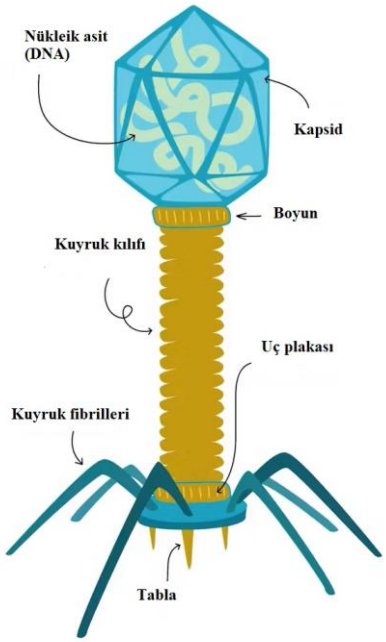
Bu amaç doğrultusunda, bu çalışma ile Rize ve çevresindeki atık sularından bakteri ve bu bakterileri konak olarak kullanan litik fajların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Faj konağı olan bakteriler sadece fajların çoğaltılması amacıyla kullanılarak, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı koleksiyonundaki ve İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundaki çoklu antibiyotik direncine sahip klinik patojen bakteri suşları üzerinde fajların litik etkinliği belirlenmiştir. Çoklu antibiyotik direncine sahip bakterileri konak olarak kullanan, konak spektrumu geniş olan ve faj terapisi potansiyeli gösteren fajların morfolojik ve genetik karakterizasyonu daha sonra gerçekleştirilmek üzere -80ºC'de stoklanarak koleksiyon oluşturulmuştur.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar bakterileri enfekte eden virüslerdir. Bakteri hücrelerinin metabolizmasını bozarak litik faj durumunda hücrenin parçalanmasına neden olurlar. Fajlar yaklaşık 100 yıl önce, ilk kez İngiliz bakteriyolog Ernest Hankin (1896), Rus bakteriyolog Nikolay Gamaleya (1898) ve İngiliz bakteriyolog Frederick Twort (1915) tarafından tanımlanmış ve antibakteriyal etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Ancak fajın bir virüs olduğunu Pastör Enstitüsünden Felix d'Hérelle (1917) tanımlamış ve bu yapıya bakteri yiyen anlamına gelen bakteriyofaj (bacteria ve phagei, Yunanca) adını vermiştir.

Fajlar, diğer virüslerde olduğu gibi DNA veya RNA'dan birini içeren nükleik asit ile bunu çevreleyen protein yapısında kapsidden oluşmuş, infeksiyöz ajanlardır (Shasha ve Inbar, 2004). Fajların farklı morfolojik yapıları olmasına rağmen genel yapıları baş, genetik materyal, kuyruk ve kuyruk fibrillerinden oluşur (Şekil 1) (Hausler, 2006).

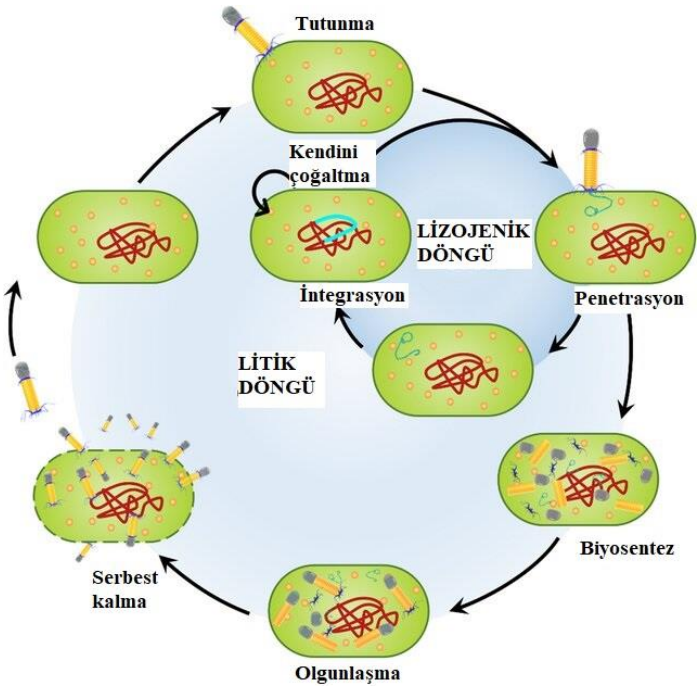


Şekil 1. Bakteriyofajın genel yapısı

Fajların morfolojik ve genetik yapılarına göre Bradley, Ackerman ve International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) olmak üzere üç farklı sınıflandırma mevcuttur (Alpay, 1999).

Fajların iki farklı yaşam döngüsü vardır: i) litik fajlar, ii) lizojenik fajlar. Litik fajlar (Örneğin; T4 fajı) konak sitoplazmasında çoğalır, sonra konağı parçalayarak ölümüne sebep olur. Lizojenik fajlar ise konak içine girer, sonra kendi DNA'sını konağın genomuna entegre ederek konağın devamı haline gelir (profaj). Genomla birlikte replike olan faj DNA'sı kardeş hücrelere transfer olur ve konak hücreye zarar vermez (Örneğin; Lambda fajı). Profajlar, bazı durumlarda (UV maruziyeti gibi) entegre olduğu konak bakteri genomundan bir indüklenme sonucunda ayrılarak virulan (litik enfeksiyon yapabilme) özellikte bir faja dönüşebilir (Arda, 2006, Hermosa vd., 2007). Faj terapisindeki bakteriyofajlar litik döngüdeki fajlardır. Litik

fajlar hızlıca bakterileri enfekte ederek çoğalır ve konağını parçalayarak döngüsüne devam eder (Şekil 2).



Şekil 2. Bakteriyofajın litik ve lizojenik yaşam döngüsü

2.2.Fajların Tıpta Kullanımı ve Faj Terapi

Geçen yüzyılın başlarında bakteriyofajlar, bakteri populasyonlarını kontrol edebilen varlıklar olarak tanımlanmıştır. Bakteriyofajlar, belirli bakterileri diğerlerine zarar vermeden enfekte edebilen virüslerdir. Avrupa'da ve eski Sovyet Cumhuriyetleri'nde bakteriyofaj tedavisi geliştirilip uygulanmasına rağmen, batı dünyası bu kullanımı reddetmiştir. Bunun temel nedeni, o zamanlar (1930'lar), bir bakteriyofajın gerçekte ne olduğu konusunda bilgi eksikliğinin yanı sıra, antibiyotiklerin keşfedilmesidir (Fernebro vd., 2011). Antibiyotiklerin keşfinden sonra faj terapisi batı dünyasında duraklama devrine girmiştir (1940-1980) ve faj ile ilgili çalışmalar azalmıştır (Hermosa vd., 2007). Ancak, eski Sovyetler Birliği'nde çalışmalara devam edilmiştir.

Günümüzde Gürcistan'ın Eliava Enstitüsü faj çalışmaları ve faj terapisi uygulamalarına önderlik etmektedir (Haq vd., 2012). Bakteriyofajlar, 1915'te İngiliz bakteriyolog Frederick Twort (1915), ve Fransız-Kanadalı mikrobiyolog Felix d'Hérelle tarafından 1917'de bildirilmiştir (D'Herelle, 1917; Shasha ve Inbar, 2004). D'Hérelle, fajların her zaman *Shigella* dizanteri hastalarının dışkılarında iyileşmeye başlamadan kısa bir süre önce ortaya çıktığını, bakterilerin geliştiği her yerde (kanalizasyonlarda, borulardan akan atıkların toplandığı nehirlerde ve nekahet dönemindeki hastaların dışkılarında) bulunduğunu belirtmiştir (Häusler, 2006). D'Hérelle (1919) kolera, veba ve şarbon hastalıklarına neden olan bakterilerden fajları izole etmiş ve ilk faj terapisini dizanteri bakterisi üzerine uygulamıştır (Kortright vd., 2019; Sulakvelidze vd., 2001; Jump, 2020). Resmi olarak insan üzerine uygulanan ilk faj terapisi Richard Bruynoghe ve Joseph Maisin (1921) tarafından stafilokokkal deri infeksiyonuna karşı uygulanmıştır.

1950'lerden bu yana antibiyotik direncinin gelişmesinin ve bilimin ilerlemesinin sonucunda, faj tedavisinin bakteriyel enfeksiyonları ve kronik polimikrobiyal biyofilmi yok etme kabiliyetine dünya çapında ilgi yeniden artmıştır (Kera, 2011). Faj terapisinde; yara ve yanık enfeksiyonları başta olmak üzere bunlara neden olan *Acinetobacter, Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* (özellikle metisiline dirençli *S. aureus*-MRSA); gıda kaynaklı patojenler *Campylobacter, E. coli, Klebsiella, Listeria, Proteus, Salmonella, Shigella* ve *Vibrio cholerae* gibi ve biyoterörizm ajanları *Bacillus anthracis* ve *Yersinia pestis* gibi bakteriler hedef durumundadır (Kutter, 2015).

Fajlar, 2016 yılında bir *Pseudomonas* enfeksiyonunu tedavi etmek için Benjamin Chan tarafından Yale Üniversitesi'nde başarıyla kullanılmıştır (Future Microbiology). San Diego'daki Thornton Hastanesinde 2017 yılında çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii*' li bir hastayı tedavi etmek için intravenöz faj damla tedavisi başarıyla kullanılmıştır (Zimmer, 2016). Nebulize faj tedavisi, Yale Üniversitesi'nde kistik fibrozlu ve çoklu ilaca dirençli bakterilere sahip çok sayıda hastayı tedavi etmek için başarıyla kullanılmıştır (Ghorayshi, 2018).

Minnesota, Brownsville' de ikamet eden, dizinde uzun süredir devam eden bir bakteriyel enfeksiyon olan bir hasta 2019' da, Mayo Klinik'te alt bacağının ampütasyonuna gerek olmadan bir faj tedavisi görmüştür(NY Post, 2019). Kişiselleştirilmiş faj tedavisi ayrıca Robert T. Schooley vd. (OregonLive, 2019; Kahn, 2018) diğerleri tarafından 2015 yılında birçok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* vakasını tedavi etmek için başarıyla kullanılmıştır.

Antimikrobiyal direnç tedavisi olarak, 2022 'de bireysel olarak ayarlanmış bir faj-antibiyotik kombinasyonu gösterilmiş ve ayrıntılı olarak tarif edilmiştir (Schooley vd., 2017, New Scientist, 2022). Bilim adamları araştırmayı büyütme ve bu yaklaşımın daha da geliştirilmesi için çağrıda bulunmuştur (Eskenazi, 2022). Fajlar, tedaviye ek olarak bakteri tiplendirme (*Mycobacterium tuberculosis, E. coli, Pseudomonas, Salmonella, Listeria* ve *Campylobacter* türleri), aşı vektörü (Lambda fajı), gen aktarımı (transdüksiyon), biyolojik kontrol (*Xanthomonas pruni, Ralstonia solanacearum* ve *Xanthomonas campestris* türlerine karşı kullanımı) gibi alanlarda da kullanılmaktadır (Twort, 1915). Gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *Listeria monocytogenes* üzerine litik etki gösteren fajlar, 2006 yılında *Food and Drug Administration* (FDA) tarafından onay alarak paketlenmiş et ve peynirlerde kullanılmaktadır (Kutter, 2015).

Terapötik kullanım için litik fajlar atık sulardan, kanalizasyon ve hatta toprak gibi yüksek miktarda bakteri içeren çevresel kaynaklardan toplanabilir (Deutschlandfunk, 2022). Numuneler alınarak hedeflenecek bakteri kültürlerine uygulanabilir. Fajlar sıvı bakteriyel kültürlerde çoğaltılabilir, daha sonra bir filtrelerden geçirilerek faj lizatı elde edilebilir ve hedef bakterilerin büyüme baskılayıcı etkilerini (lizojeni) veya yıkımını (liziz) görmek için test edilebilir (Phage, 1997). Fajlar konaklarına özgüdür ve sadece konak spektrumundaki türleri enfekte ederler. Bu sayede etki spektrumu dışındaki bakterilere karşı zararsız olduğu içini antibiyotiklerde görülen normal flora üzerine olumsuz etkiler bu fajlarla yapılan tedavi yönteminde görülmez. Ayrıca, antibiyotik kullanımına bağlı gelişen sekonder enfeksiyon gelişiminin de önüne geçilmiş olur. Fajlar enfeksiyon bölgesinde yani bakterilerin bulunduğu bölgede çoğalır ve enfeksiyona neden olan bakteriler ile eş zamanlı üreyerek döngüsüne devam eder. Böylece sistemik yan etki görülme olasılığı oldukça düşüktür (Hyman, 2019, Nilssona, 2014). Bruttin ve Brüssow 15 gönüllü üzerine yaptıkları bir çalışmada bir ay boyunca gönüllülerin içme sularına T4 fajını eklemişler ve sadece 5 kişide hafif yan etkiler

gözlemişlerdir (Viertel vd., 2014). Ayrıca, gönüllülerin hiç birinde verilen faja karşı antikor tespit edilmemiştir. Antibiyotikler ise etkisini kan dolaşımıyla sistematik olarak gösterirler ve istenmeyen etkileri tüm organizmada görülebilir. Son verilere göre faj terapisi sırasında veya sonrasında organizma üzerine herhangi bir yan etki bildirilmemiştir. Ayrıca çevre dostu olmaları, izolasyon ve karakterizasyonunun hızlı ve az maliyetli olması da fajların kullanım avantajlarını oluşturmaktadır (Haq, 2012; Wittebole vd., 2014).

2.3. Atık Sular ve Faj

Atık sular bakterilerin yoğun olarak bulunduğu bir ortamdır. Atık su florasında birçok bakteri familyası bulunmaktadır. Bu bakteriler atık sulardaki ekolojik dengeye etkisine göre; asetojenik bakteriler, denitrifikasyon yapan bakteriler, koliformlar, patogen bakteriler şeklinde sınıflandırılır. Patogen bakteriler kanalizasyon sistemlerinde ve çevresel kaynaklardan sulara karışmaktadır. Günlük hayatta kanalizasyonlardan ve çevresel kaynaklardan, patojen bakteriler ve antibiyotik atık sulara karışmaktadır.

Atık sularda yoğun olarak bulunan bakteri familyaları; *Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae* ve *Moraxellaceae'*dir. *Enterobacteriaceae* familyası çok yaygın olarak doğada, sularda, toprakta, insan ve hayvan bağırsak florasında bulunmaktadır. *Enterobacteriacea* familyasındaki hastalık yapan bakteriler ya zorunlu patojen ya da fırsatçı patojendir. Zorunlu patojenlere örnek olarak *Salmonella typhi* (tifo etkeni), fırsatçı patajonlere örnek olarak *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Proteus vulgaris* verilebilir (Murray vd.,2010). *Pseudomonadaceae* familyası daha çevresel yerleşimli gram negatif basillerdir. Bu familyadaki başlıca cinsler *Pseudomonas, Azotobacter* türleridir. Klinik olarak en önemli cins *Pseudomonas'* tır. Bugüne kadar 160 *Pseudomonas* türü tanımlanmıştır. Bunlardan sadece 12 tür insanda fırsatçı patojenidir. *Moraxellaceae* familyasının en önemli cinsi *Acinetobacter*'dir. İnsan derisinde normal flora elemanıdır. Doğada yaygın bir şekilde bulunur. Klinik izolatlarda en önemli türü *Acinetobacter baumannii*'dir.

Fajlar normalde bakteriyel konakların bulunduğu kanalizasyon, tatlı su, toprak ve daha fazlası dahil olmak üzere farklı ortamlardan izole edilir (Hyman, 2019; Ross vd., 2016). Bu kaynaklar yüksek sayıda virüs benzeri partiküller (VLP) içerir (Reche vd., 2018) ve en yükseği kanalizasyon için rapor edilmiştir ~ 10^{10} mL^{-1} (Tamaki vd., 2012). Bu da onları faj izolasyonu için önemli kaynaklar olarak düşündürmektedir. Bununla birlikte, faj-bakteri etkileşimlerini etkileyebilen ve spesifik enfeksiyon özelliklerine sahip fajların seçilmesine neden olan sıcaklık ve besin mevcudiyeti gibi fiziksel koşullar açısından belirgin farklılıklar gösterirler. Son zamanlarda yapılan metagenomik çalışmalar, birden fazla aileye ait çeşitli türleri enfekte eden geniş konak aralığına sahip fajların doğal ortamlarda yaygın olarak dağıldığını göstermiştir (Munson-McGee vd., 2018). Bu nedenler çevreden özellikle atık sulardan izole edilen faj çalışmaları giderek önemli hale gelmektedir.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Atık Su Örneklerinin Alınması: Atık su örnekleri Rize Belediyesinin, Kanalizasyon Daire Başkanlıklarının konu ile ilgili izniyle (Ek-1) Ağustos 2023-Şubat 2024 ayları arasında Rize ilinin çeşitli bölgelerindeki atık su kaynaklarından alındı. Atık su örneklerinin yeri, örneğin alındığı tarih ve koordinatları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Atık su örneklerinin alındığı yer, alındığı tarih ve koordinatları

No	Örnekleme Yeri	Örnekleme Tarihi	Koordinat
1.	Engindere Mah.	04.08.2023	41° 2' 34.7979''K 40° 34' 55.5099''D
2.	Fındıklı	29.11.2023	Sağlanmadı
3.	Derepazarı	19.12.2023	41° 1'37.42643''K 40° 25' 24.9513''D
4.	RTEÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi inşaat alanı	8.12.2023	41 2' 17.8284''K 40 34' 2.9224''D
5.	Boğaz Mah. sanayi bölgesi	19.12.2023	41° 2' 4.0532''K 40° 28' 45.2319''D
6.	Rize merkez deniz dolgu alanı	24.01.2024	41 1'45.3768''K 40 31' 19.8963''D
7.	İslampaşa sahil	06.02.2024	41 2' 20.4264''K 40 33' 54.8388''D
8.	Rize merkez Cumhuriyet Meydanı karşısı (İtfaiye)	06.02.2024	41° 1' 49. 4410''K 40° 31' 3.4803''D
9.	Rize Güneysu Deresi	07.02.2024	40° 59 49.1276''K 40° 35' 55.0316''D

Örnek alınırken atık suların dere ya da denize döküldüğü alanlar tercih edildi. Resim 1'de su örneği alınan iki yer örnek olarak gösterilmektedir.



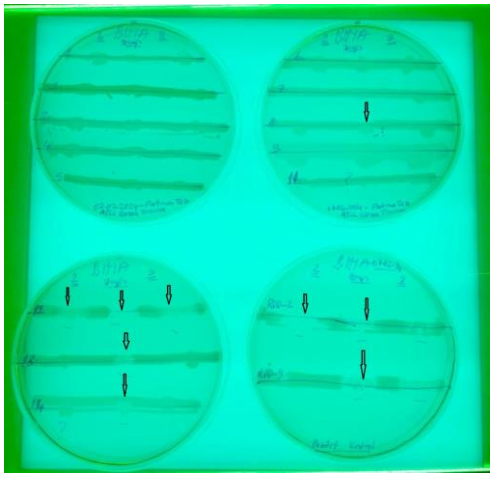
Resim 1. Atık su örneklerinin alındığı yerler **A)** İslampaşa sahili, denize birleşen atık su kanalından su örneği alınması. **B)** Atık su örneği alınan Boğaz mahallesi, Sanayi bölgesi, dere içerisine birleşen atık su kanalı.

Örnekler atık su kaynaklarından alınması için steril şişeler kullanıldı, en az 200 mL olacak şekilde alınan örnekler kapağı sıkıca kapatılarak, %70 alkol ile silindi ve aynı gün içerisinde, içinde buz bataryaları bulunan bir taşıma kabında laboratuvara taşındı. Bir filtre yardımıyla süzüldükten sonra, su örneğinin 40 mL'si falcon tüplere alınarak %20 gliserol içerecek şekilde -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.2. Fajların Atık Sudan Zenginleştirilmesi ve İzolasyonu: Su örneğinin zenginleştirilmesi amacıyla 2X Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri (%1 tripton, %0,5 maya özütü, % 0,5 NaCl, pH 8.0) ile 1:1 oranında (125 mL su örneği+125 mL 2X LB sıvı besiyeri) karıştırılarak erlenmeyer içerisinde, çalkalayıcılı inkübatörde 180 rpm'de 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Elde edilen sıvı bakteri kültürünün 1mL'si %15 gliserollü olarak -80°C'de stoklandı. Faj zenginleştirme kültürleri (250 mL) 50 ml'lik falcon tüplere her biri 45 mL olarak şekilde alınarak 9000 rmp'de 15 dk 4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant kısmı vakuum filtration 500 rapid filtermax (steril) ile hızlıca vakumla filtrelenerek steril edildi. Lizatın 1 mL'si %20 gliserol içerecek şekilde alındığı yer ismi ile kodlanarak "zenginleştirme lizatı" olarak -80°C'de derin dondurucuda saklandı (Beaudoin RN., vd 2007). Elde edilen lizatlarımızı alındığı bölgenin ismine göre Rize Dolgu Deniz örneğini dzØ, İslampaşa örneğini iszØ, itfaiye örneğini itzØ, Güneysu örneğini gzØ, Fındıklı örneği fØ olarak isimlendirildi. Bu sırada, faj izolasyonu için yapılan zenginleştirme kültürlerinden fajlar için potansiyel konak olabilecek bakteriler de eş zamanlı olarak izole edildi.

3.3. Bakteri İzolasyonu: Bakteri izolasyonu için, zenginleştirilen su örnekleri kanlı agar, Mueller hinton agar (MHA), Eozin metilen blue (EMB) agara çizgi ekim yapıldı, ertesi gün morfolojik olarak farklı olarak gözlenen bakteri kolonileri steril kürdan yardımı ile replika ekim yapılarak saf olarak çoğaltıldı. Faj konaklarının belirlenmesi için her bir bakteri kültürü steril öze yardımıyla katı besiyerine (LB agar, Mueller Hinton agar, Triptik soy agar veya Beyin-kalp infüzyon (BHI) agar) çizgi ekim yapıldı. Replika ekim plaklarındaki saf koloniler 5 mL sıvı besiyerine (TSB, LB broth) ekilerek 37°de bir gece inkübasyonu sağlandı. Daha sonraki aşamalarda fajların etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılacak olan deneyler için %20 gliserol içerecek şekilde -80° derin dondurucuda saklandı.

3.4. Fajların Konak Spektrumlarının Belirlenmesi: Faj konak spektrumun belirlenmesi için; katı besiyeri (BHIA veya TSA) plaklarına bakteri sayısı kadar çizgi çizildi. Her bir bakteri çizgi boyunca steril pamuklu çubuk ile ekimi yapıldı. Çizgi boyunca ekim yapılan bölgenin tam ortasına gelecek şekilde 5µl lizat damlatıldı. Lizat besiyeri üzerinde kuruduktan sonra 37°C'de 1 gece etüve kaldırıldı. Bakteri kültürü üzerinde inhibisyon yapan lizatlar potansiyel litik faj olarak kaydedildi (Resim 2) (Lin vd., 2010). Bu işlemi tüm izole edilen lizatların hepsine önce su örneklerinin alındığı kaynaklardan izole edilen bakteriler üzerinde, sonra çaprazlama olarak bütün izole edilen bakteriler üzerinde, laboratuvarımızın koleksiyonunda yer alan ATCC (American Type Culture Collection) suşları ve klinik örnekler üzerinde gerçekleştirilerek konak taraması yapıldı. Ertesi gün inhibisyon bölgeleri değerlendirildi.

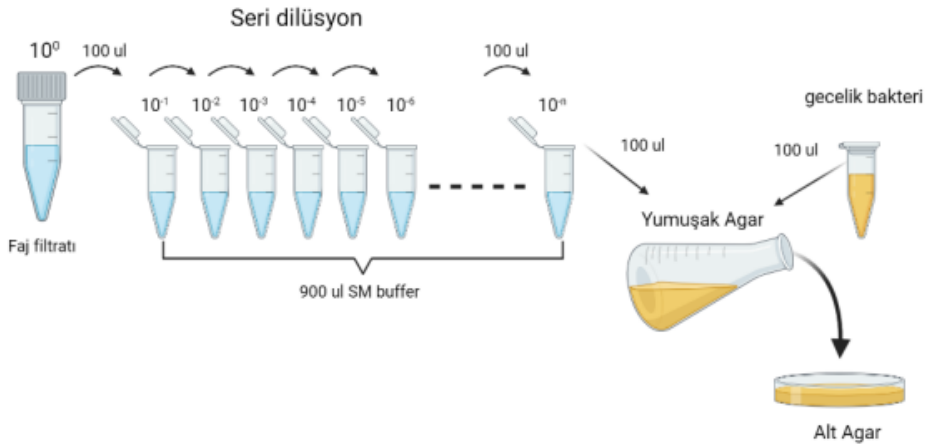


Resim 2. Faj lizatlarının konak bakteriler üzerindeki etkisinin gösterilmesi. *Oklar inhibisyon bölgelerini göstermektedir.

3.5. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması: Konak tarama deneyleri sonucunda inhibisyoın alanları belirlediğimiz bakterilerde litik faj yapan bakteriyofajların görmek için litik faj enfeksiyonu yapıldı. Bunun için konak bakteri katı besiyerinden 5 mL LB sıvı besiyerine ekimleri yapılıp çalkalayıcıda yaklaşık olarak 5-6 saat 37°C'de inkübe edildi. Sıvı besiyerindeki bulanıklığın en az MacFarland 1 olması istendi (bakteri logaritmik fazın başında iken enfeksiyon gerçekleştirildi) LB soft agar (%0,7 agar içeren) 50°C'ye ayarlanan su banyosunda sıvı halde hazır olarak bekletildi. Steril cam vidalı kapaklı tüplerin herbirine 1M MgSO4'tan 20µl eklendi. Bu tüplerin herbirine sıvı haldeki 4 mL LB soft agarı su banyosunun içinde eklendi. Kabin içerisinde hızlı bir şekilde LB soft agarlı cam tüpümüze 300 µl bakteri kültürü, 100 µl lizat eklenip ve kısa bir vorteks yapılarak, daha önceden hazırlanan katı besiyeri plaklarımıza (BHA veya TSA) plağın her yerine eşit dağılacak şekilde dökülerek kuruması beklendi. Kuruduktan sonra ters çevirilen plakları 37°C'de etüv'de 1 gece inkübasyona kaldırıldı (Virapur, 2015). Ertesi gün faj lizatındaki litik fajın bakteriyi konak olarak kullandığını ve enfeksiyon sonucunda faj plakları oluşumu gözlemlendi.

3.6. Fajların Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Stoklanması: Faj saflaştırması için litik faj plaklarına kabin içerisinde 5 mL SM buffer (100 Mm NaCl, 8 mM $MgSO_4.7H_2O$, 50 mM Tris-Cl (1M, pH 7.5), % 0.002 jelatin) eklendi ve 1 saat orbital çalkalayıcıda sallanarak fajların soft agardan ayrılmaları sağlandı. Petrinin üstündeki soft agar steril drigalski spatülü yardımıyla 50 ml'lik falcon tüplerine sıyırıldı, spatülün arka kısmı ile iyice homojenize edildi. Daha sonra falcon tüpler 9000 rpm'de 15 dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonucu falcon tüplerindeki süpernatant kısmı 0,45 ve 022 µm'lik filtrelerden geçirilerek, elde edilen steril fajların 1 mL'si -80°C' de %20 gliserol içerecek şekilde saklandı. İzole edilen fajların geri kalan kısmı daha sonra gerçekleştirilecek deneyler için +4°C'de saklandı (Lin vd., 2010, Fortier ve Moineau, 2009).

3.7. Faj Titresinin Belirlenmesi: Titrasyonu belirlenecek olan fajın konağı olan bakteriler; katı besiyerinden sıvı besiyerine ekimi yaparak 5-6 saat 37°C'de çalkalıyıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Faj titrasyonu için bakterinin logaritmik fazın başında olması istendi. Her bir örnek için 5 steril ependorf hazırlandı ve herbir ependorfa 450 µl SM buffer (ya da d_{H2O}) eklendi. Seri dilüsyonlar hazırlandı (Şekil 3) (Virapur, 2015).



Şekil 3. Faj Titresinin Belirlenmesi

Seri dilüsyonları yapılan herbir dilüsyon için, faj enfeksiyonu yapıldı. Su banyosunda bulunan steril vidalı cam tüplerin herbirine 20 µl $MgSO_4$ ve 4 mL LB soft agar eklendi. Cam tüplere 300 µl bakteri ve 100 µl dilüsyon lizatlarından sırasıyla eklendi, vorteksleyerek donmadan hızlıca katı besiyerine (BHA, TSA) döküldü. Petriye yayıldı ve donması beklendi, 37°C'de 1 gece etüvde inkübasyona bırakıldı. Oluşan faj plakları sayılarak mililitredeki faj partükül sayısı hesaplandı (Virapur, 2015.).

$$\frac{pfu}{ml} = \frac{plak\ sayısı}{dilüsyon\ faktörü\ x\ filtrat\ hacmi\ (\mu l)}\ x \frac{1000\mu l}{ml}$$

3.8. Faj ve Lizat Örneklerinin ATCC Bakterilerinde Konak Spektrumunun Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonun Yapılması: İzole edilen 10 adet çevre kökenli faj ve dört ana lizat, 15 adet ATCC bakterisi ile önce faj konak spektrumu bakıldı. Bu amaçla uygulanan yöntem 3.4. bölümde anlatılan şekilde yapıldı. Daha sonrasında konak olarak belirlediğimiz bakterilere litik faj enfeksiyonu yapıldı. Bu amaçla uygulanan yöntem 3.5. bölümde anlatılan şekilde yapıldı.

3.9. Faj ve Lizat Örneklerinin Çeşitli Klinik Bakterilerde Konak Tarama ve Enfeksiyonu: İzole edilen 10 adet çevre kökenli faj ve dört ana lizat 70 farklı klinik bakteri üzerinde konak spektrumu bakıldı. Bu amaçla uygulanan yöntem daha önceki 3.4. bölümde anlatılan şekilde yapıldı. Konak olarak belirlenen bakterilerde litik faj enfeksiyonu yapan faj varlığına bakılmak için enfeksiyon yapıldı. Bu amaçla uygulanan yöntem 3.5. bölümde anlatılan şekilde yapıldı.

3.10. Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi: Fajların etkili oldukları bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi "Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim Araştırma hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı"ında yapıldı. Bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde otomatize VITEK-2 sistemi kullanıldı.

4.BULGULAR

Bu çalışmanın deneyleri, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbı Mikrobiyoloji Bölümü, Moleküler Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

4.1.Atık Su Örneklerinden Fajların Zenginleştirilmesi ve İzolasyonu

Rize ilinin farklı yerlerinden alınan su örneklerinden elde edilen zenginleştirme faj lizatları alındıkları yerlerin isimlerini belirtecek şekilde kodlanarak isimlendirildi. Toplamda 9 ayrı atık su örneğine ait zenginleştirmefaj lizatı elde edildi, faj lizatlarına izole edildikleri yerleri gösterecek şekilde ØeZ, ØfZ, ØdZ, ØisZ, ØitZ, ØgZ (Ø:faj, e: Engindere zenginleştirme, f: Fındıklı zenginleştirme, dz: Dolgu zenginleştirme, itZ: itfaiye zenginleştime, gZ: Güneysu zenginleştirme) isimleri verildi. Zenginleştirme faj lizatları konak spektrumlarının belirlenmesi ve faj enfeksiyonlarının için gerçekleştirilmesi için +4°C'de muhafaza edildi.

4.2.Bakteri İzolasyonu

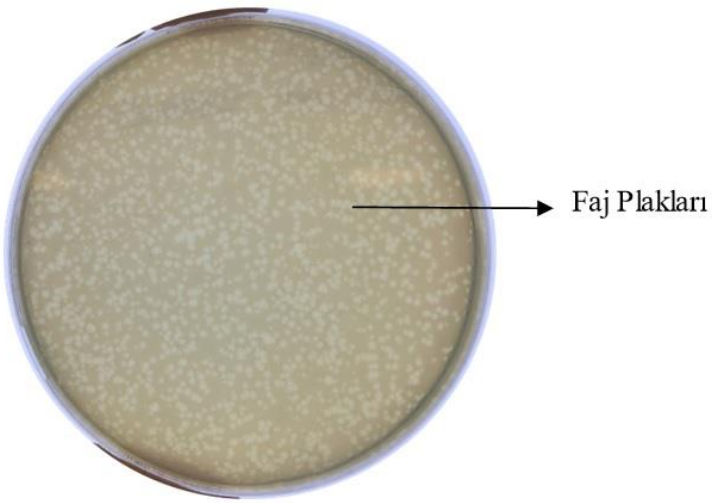
Atık su örneklerinden izole edilen fajların konakları olabilecek bakterilerin izolasyonu replika ekimle tek koloni olarak yapıldı ve izolatlara örneklerin alındıkları yerlerin isimleriyle isim verilerek (Örneğin; dolgu alanı d1, d2, d3… şeklinde) kodlandı, her örnekleme bölgesinden yaklaşık 20-30 adet bakteri izole edildi. Atık sulara ait bakteri izolatları konak spektrumunun belirlenmesi için -80°C'derin dondurucuda muhafaza edildi.

4.3.Fajların Konak Spektrumunun Belirlenmesi

Atık sulardan izole edilen bakteriler ve elde ettiğimiz zenginleştirme lizatları her lizat her bakteriyle çaprazlama yapılarak konak spektrumlarının belirlenmesi amacıyla test edildi ve deney sonucunda konak olarak belirlenen bakterilerde inhibisyonun nedeninin faj enfeksiyonundan kaynaklandığının gösterilmesi için faj lizatı ve konak bakteri ile faj enfeksiyon yapıldı.

4.4.Litik Faj Enfeksiyonun Yapılması ve Fajların Saflaştırılması

Faj enfeksiyonu sonucunda faj plakları gözlemlendi (Resim 4) faja duyarlı olan bakteriler belirlendi.



Resim 3. Faj Enfeksiyonu sonrasında faj plaklarının görüntüsü

Atık sulardan izole edilen fajların konak spektrumunda olmayan bakteriler göz ardı edilerek sadece etkili bakterilerin tanımları gerçekleştirilerek devam edildi. Bu bakterilerin tanımlaması için otomatize sistem olan VITEK2 kullanıldı. Bakteri tanımlama sonuçları Tablo 3'te verildi. Dolgu alanından elde edilen zenginleştirme lizatının konak spektrumunda *Acinetobacter baumanii, E.coli, Enterobacter asburiae* türüne ait bakterilerin olduğu, itfaiye alanından elde edilen zenginleştirme lizatının konak spektrumunda *E. coli* türüne ait bakteri olduğu belirlendi.

Tablo 2. Atık sulardan izole edilen faj lizatlarının konak spektrumunda olan bakteriler

İzolat İsmi	**Bakteri Türü**
d2	*Acinetobacter baumanii*
d5	*E.coli*
d9	*Enterobacter asburiae*
it3	*E.coli*
it6	*E.coli*

(d: dolgu alanından izole edilen 2, 5 ve 9. bakteriler, it: itfaiye alanından izole edilen 3 ve 6. bakteri)

Tanımlaması yapılan bu beş adet bakteri ile zenginleştirme faj lizatlarının enfeksiyonu gerçekleştirildiğinde, ØdZ fajının beş adet faj ile de enfeksiyonu gerçekleşti, ØisZ fajı (it3) *E. coli* türüne ait bakteri ile enfeksiyonu gerçekleşti, ØitZ fajının (d5 ve it3) *E.coli* türüne ait bakteriler ile enfeksiyonu gerçekleşti. Litik faj enfeksiyon sonuçları Tablo 3'te verildi. Toplamda bu faj enfeksiyonlarında plak görüntülenen ve sonrasında izole edilen 10 adet faj izole edildi, bu faj lizatları da izole edildikleri yerin ismi ve enfeksiyon yaptıkları bakterilerin isimleri (Örneğin; ød2d, ød5d, ød9d, ød5t) ile isimlendirildi.

Tablo 3. Zenginleştirme lizatlarının çevre bakterilerine litik etkisi

BAKTERİ / **LİZAT**	**ØdZ**	**ØisZ**	**ØitZ**	**ØgZ**
***Acinetobacter baumanii* d2**	+	-	-	-
***Enterobacter asburiae* d9**	+	-	-	-
***E.coli* d5**	+	-	+	-
***E.coli* it3**	+	+	+	-
***E.coli* it6**	+	-	-	-

Çaprazlama yapılan konak tarama ve litik faj enfeksiyon sonucu elde edilen saflaştırılmış konakçı 10 adet faj ile atık sulardan izole edilen konak bakteriler üzerinde konak spektrumuna bakıldı ve litik faj enfeksiyonu yapıldı. ød2d ve ød9d fajları *Acinetobacter baumaniae* ve *Enterobacter* (D2 ve D9) *asbriae* suşlarını, ød5d fajı *E. coli* (D5) suşunu, øt3d fajı *E. coli* (it3) suşunu ve øt6d fajı ise *E. coli* (it6) suşunu enfekte etti. *E. coli* (it3) suşunu øt3t, øt3s, øt3Bd ve øt3Kd fajları enfekte etti. Sonuçlar Tablo 4'te gösterildi.

Tablo 4. Atık sulardan izole edilen konak bakteriler ve konakçı fajları

Bakteri / **Faj**	**ød2d**	**ød5d**	**ød9d**	**ød5t**	**øt3d**	**øt6d**	**øt3t**	**øt3s**	**øt3Bd**	**t3Kd**
***Acinetobacter baumaniae* D2**	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
***Enterobacter asbriae* D9**	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
***E.coli* D5**	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
***E.coli* İT3**	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+

E.coli **İT6**	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

4.5. Faj Titresinin Belirlenmesi

Faj lizatının titresinin belirlenmesi için damlatma yöntemi uygulandı. Bu amaçla faj lizatlarının SM buffer'de seri dilüsyonları hazırlanarak, faj lizatından 5 µL alındı ve bakteri içeren çift tabakalı besiyerinin yumuşak agar yüzeyine damlatıldı ve kuruması beklenildi. Ardından 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan faj plakları sayılarak mililitredeki faj partikül sayısı hesaplandı. Titrasyon sonucunda; dilisyon oranlarına göre oluşan faj plaklarının sayımı yapıldı. Faj titrasyon plağı Resim 4'de gösterilmiştir. Bu fajların litik enfeksiyon döngüsü incelendiğinde titresi tirelerinin 10^9 ile 10^{10} pfu/ml arasında oldukları belirlendi.



Resim 4. Faj titrasyon plağı

4.6.Faj ve Lizat Örneklerinin ATCC Bakterilerinde Konak Spektrumlarının Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonun Yapılması

İzole ettiğimiz zenginleştirme lizatları ve faj enfeksiyonu gerçekleştirerek faj plaklarının toplanması ile elde ettiğimiz lizatlar ile 15 adet farklı ATCC bakterisi üzerinde konak spektrumuna belirlendi, daha sonrasında etki görülen suşlar ile litik faj enfeksiyonu yapıldı. *E.coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşları ile ØdZ fajının enfeksiyonu gerçekleşti. Yapılan deney sonuçları Tablo 5'te gösterildi.

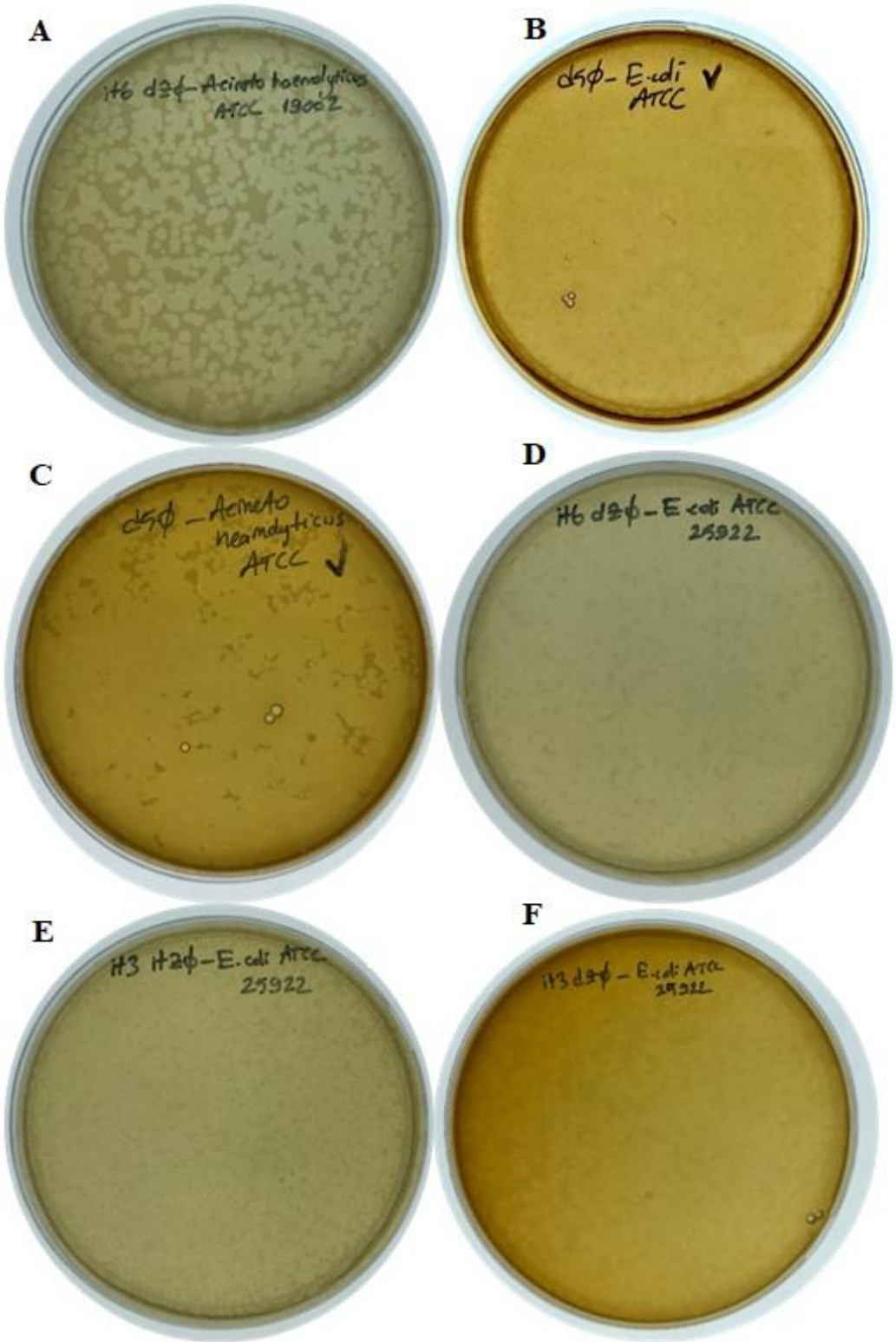
Tablo 5: Çevre lizatlarının ATCC bakterilerine etkisi

Bakteri / **Lizat**	**ØdZ**	**ØisZ**	**ØitZ**	**ØgZ**	**ØfZ**	**ØkZ**
Staphylococcus epidermidis **ATCC 35984**	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus **ATCC 779**	-	-	-	-	-	-

***Staphylococcus haemolyticus* TRSH 1**	-	-	-	-	-	-
***Staphylococcus aureus* NCTL 8329**	-	-	-	-	-	-
***Staphylococcus aureus* ATCC 43300**	-	-	-	-	-	-
***Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002**	-	-	-	-	-	-
***Enteroccus feacalis* *ATCC* 29212**	-	-	-	-	-	-
***Enterobacter aerogenes* ATCC 13048**	-	-	-	-	-	-
***Bacillus subtilis* *ATCC* 6633**	-	-	-	-	-	-
***Pseudomonas aeruginosae* ATCC 27923**	-	-	-	-	-	-
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	-	-	-	-	-	-
***E.coli* ATCC 25922**	+	-	-	-	-	-
***Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883**	+	-	-	-	-	-
***Salmonella typhimurium* ATC14028**	+	-	-	-	-	-
***Staph. epidermidis* ATCC 12228**	-	-	-	-	-	-

(ØfZ lizatı; Fındıklı ilçesinden belirlenen atık su kaynağından izole edildi.)
(ØkZ lizatı; tez çalışması için *Pelophylax* cinsi kurbağaların kloakal sürüntü örneklerden izole edildi) (Rakıcı, 2022)

Atık sulardan izole edilen 10 adet faj ile yapılan konak spektrum ve sonrasında konak olan ATCC bakterilerine yapılan litik faj enfeksiyonu sonrasında faj plakları gözlendi (Resim 5). Atık sulardan izole edilen fajlar ve ATCC bakterileri bir tablo halinde Tablo 6'da verilmiştir.



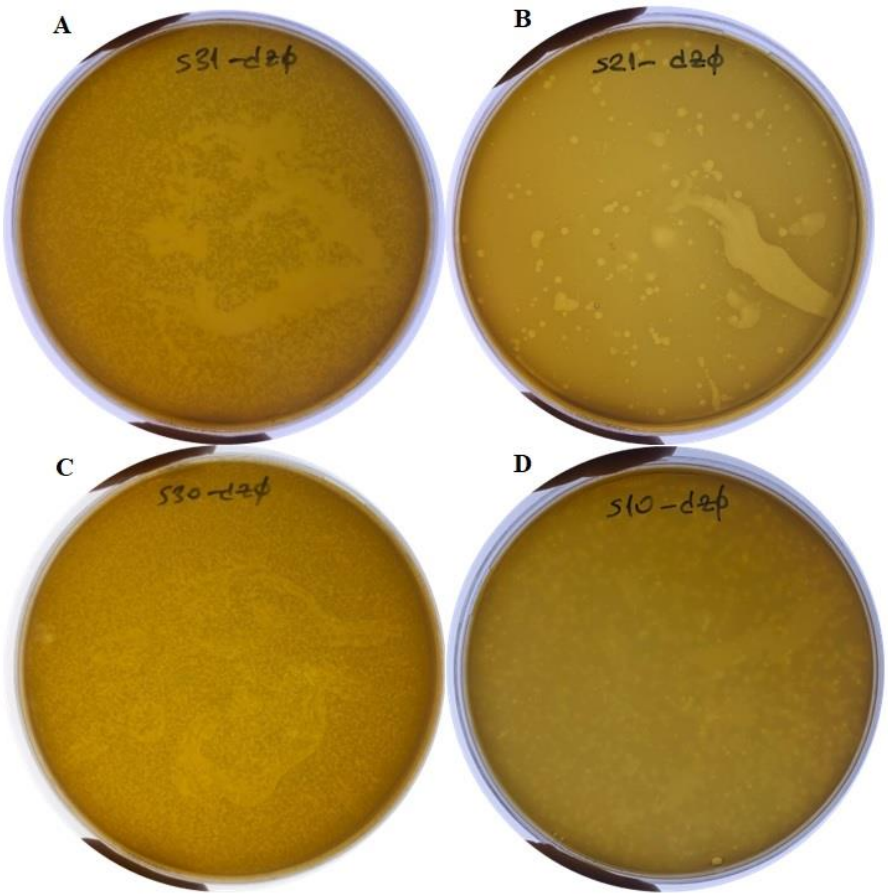
Resim 5. Farklı morfolojiye sahip ATCC bakterileri ait enfeksiyon plakları
(**A**: *Acineto haemolyticus ATCC 19002 suş*-øt6d, **B**: *E. coli* ATCC 25922 suş-ød5d, **C**: *Acineto haemolyticus ATCC 19002 suş*- ød5d, **D**: *E. coli* ATCC 25922 suş- øt6d, **E**: *E. coli* ATCC 25922 suş- øt3t, **F**: *E. coli* ATCC 25922 suş- øt3d, Agar: BHI)

Tablo 6. Atık sulardan izole edilen fajların ATCC suş konakları

Faj Bakteri	***Acineto haemolyticus ATCC 19002***	***Enterobacter aerogenes* ATCC 13048**	***Pseudomanas* aeruginosae ATCC 27853**	***E. coli* ATCC 25922**	***Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883**	***Salmonella typhimurium* ATCC 14028**
ød2d	-	-	-	+	+	-
ød5d	+	-	-	+	-	-
ød9d	-	-	-	+	+	-
ød5t	-	-	-	+	-	-
øt3d	-	-	-	+	-	-
øt6d	+	-	-	+	-	-
øt3t	-	-	-	+	-	-
øt3s	-	-	-	-	-	-
øt3Bd	-	-	-	-	-	-
øt3Kd	-	-	-	-	-	-

4.7.Faj ve Lizat Örneklerinin Çeşitli Klinik Bakterilerde Konak Spektrumlarının Belirlenmesi ve Litik Faj Enfeksiyonun Yapılması

Laboratuvarımızın koleksiyonunda bulunan çeşitli bakteri türlerine ait klinik örnek (İbik, 2022) ile elde ettiğimiz faj lizatlarının etkisi araştırılmış konak spektrumu belirlenerek ve litik faj enfeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Farklı türlerden seçtiğimiz klinik örnekler arasından *Klebsiella pneumoniae* türüne ait 5 bakteri ile ØdZ, ØisZ, ØitZ lizatlarının enfeksiyonu sonucunda faj plakları gözlenmiştir (Resim 6).



Resim 6. Farklı morfolojiye sahip *Klebsiella pneumoniae* klinik örneklerine ait enfeksiyon plakları (A: S31 suş – ØdZ faj: Øs31dZ, B: S21 suş – ØdZ faj: Øs21dZ,C: S30 suş – ØdZ faj: Øs30dZ,D: S10 suş – ØdZ faj: Øs10dZ, Agar: BHA)

Klebsiella pneumoniae örneklerinin faj lizatları ile gerçekleştirilen enfeksiyon deneylerinin sonuçları bir tablo halinde verilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Çevre lizatlarının karbapenem duyarlı *Klebsiella pneumoniae'*lere etkisi

BAKTERİ / **LİZAT**	**ØdZ**	**ØisZ**	**ØitZ**	**ØgZ**
***Klebsiella pneumoniae* S10**	+	-	-	-
***Klebsiella pneumoniae* S21**	+	-	-	-
***Klebsiella pneumoniae* S30**	+	+	+	-
***Klebsiella pneumoniae* S31**	+	-	-	-

***Klebsiella pneumoniae* S34**	-	+	-	-

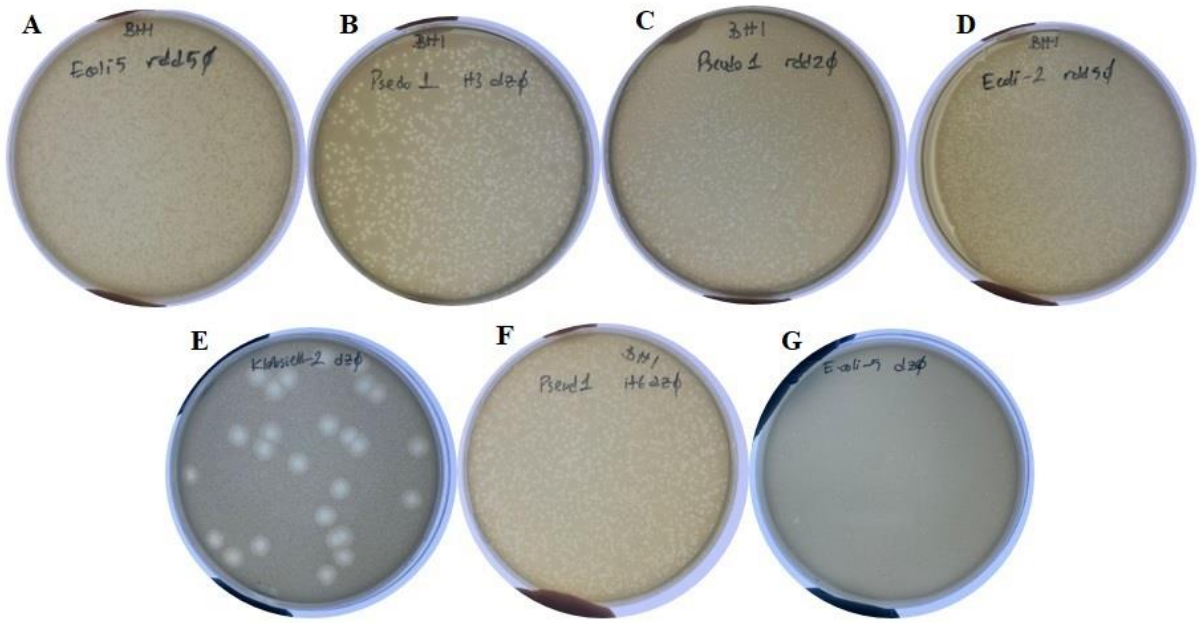
Etki belirlenen klinik *Klebsiella pneumoniae* örneklerinin antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 otomatize sistem ile değerlendirilmiş ve izolatların antibiyotiklerin birçoğuna karşı dirençli olduğu görüldü (Tablo 8).

Tablo 8. Karbapenem duyarlı olmayan *Klebsiella pneumoniae* suşları (İbik, 2022) antibiyogram sonuçları

	Test Edilen Antibiyotikler											
Suş Kodu	**AK**	**GN**	**TOB**	**CIP**	**LEV**	**CAZ**	**IMP**	**MEM**	**FEP**	**TZP**	**SXT**	**COL**
S10	S	S	S	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	S
S21	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	I	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**
S30	**R**	**R**	**R**	S	S	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S
S31	S	S	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S
S34	S	S	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	S

S: Duyarlı I: Orta Duyarlı R: Dirençli
(AK:Amikasin, GN:Gentamisin, TOB:Tobramisin, CİP: Siprofiloksasin, LEV: Levofloksasin, CAZ: Seftazidim, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, FEP: Cefepim, TZP: Piperasilin/tazobactam, SXT: Trimetoprim sulfametaksazol, COL:Kolistin)

Proje kapsamında İstanbul Medipol Hastanesinden sağlanan 38 adet bakteri [*Pseudomonas, E. coli, Acinetobacter*, KES (*Klebsiella, Enterobacter, Serratia*) cinslerine ait örnekler], karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (CRE)) üzerinde, elde edilen faj lizatları ile konak spektrumları tarandı ve litik faj enfeksiyonları gerçekleştirildi, sonuçları Tablo 9'da gösterildi. *E.coli, Kelbsiella, Pseudomas* cinslerine ait bakteriler ile izole ettiğimiz fajların lizatlarının enfeksiyonları sonucunda farklı morfolojide faj plakları gözlemlendi (Şekil 8).



Resim 7. Farklı morfolojiye sahip klinik bakterilere ait enfeksiyon plakları
(**A**: *E.coli* 5 suş - ød5d, **B**:*Pseudomonas* 1 suş - øt3d, **C**:*E.coli* 2 suş - ød5d, **D**:*Pseudomonas* 1 suş - ød2d, **E**: *Klebsiella* 2 suş – ødZ, **F**:*Pseudomonas* 1 suş - øt6d, **G**:*E.coli* 5 suş – ødZ, Agar:BHA)

Tablo 9. Çevre fajlarının İstanbul Medipol suşlarına etkisi

Bakteri Faj	**ødZ**	**øisZ**	**øitZ**	**øgZ**	**ød2d**	**ød5d**	**øt3d**	**øt3t**	**øt6d**	**øt3Bd**
***Pseudomanas* 1**	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
***E.coli* 2**	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
***E.coli* 3**	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
***E.coli* 5**	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
***Klebsiella* 2**	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

İstanbul Medipol Hastanesinden elde edilen ve fajların etkili olduğu bakterilerin VITEK2 otomatize sistem ile antibiyogramları gerçekleştirildi. Bakterilerin test edilen antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençli olduğu tespit edildi (Tablo 10).

Tablo 10. İstanbul Medipol suşları antibiyogram sonuçları

	Test Edilen Antibiyotikler											
Suş Kodu	**AMP**	**TZP**	**AMC**	**CXM**	**CAZ**	**FEP**	**GN**	**CİP**	**MXF**	**IMP**	**MEM**	**SXT**
***Pseudomanas*1**	**R**	S	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**
***Klebsiella* 2**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	S	**R**	**R**	S	S
***E.coli* 2**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	S	R
***E.coli* 3**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	S
***E.coli* 5**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	S	**R**

S: Duyarlı I: Orta Duyarlı R: Dirençli
(AMP:Ampisilin, TZP:Piperasilin/Tazobactam, AMC:Amoksisilin/Klavulonat, CXM:Sefuroksim, CAZ:Seftazidim, FEP:Sefepim, GN:Gentamisin, CİP:Siprofiloksasin, MXF:Moksifiloksasin, IMP:İmipenem, MEM:Meropenem, SXT:Trimetoprim sulfametaksazol)

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Patojen bakteriler arasında antibiyotik direncinin yaygın olarak artması, bilim dünyasını enfeksiyonlarla mücadele için alternatif antimikrobiyal ajan arayışına sokmuştur. Bu arayışlardan biri de bilim dünyasının yaklaşık bir asırdır bildiği faj terapisidir. Antibiyotiklerin keşfinden sonra faj terapisi popülerliğini yitirmiş olsa da mikrobiyolojide yeni yöntem ve teknolojilerin ortaya çıkmasıyla litik fajlar üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda ivme kazanmaya başlamıştır (Gordillo vd., 2019).

Bu çalışma, faj terapisi için kullanılma potansiyeli olan litik fajları atık sulardan izole etmeyi amaçlamıştır. Atık sular, litik fajların ilgili konakçı bakterileriyle birlikte kolayca izole edilebildiği zengin habitatlardır. Atık sular aynı zamanda klinik açıdan önemli bakteriyel patojenler ve bunların litik fajları için iyi birer rezervuardır (Sharma vd., 2020; Mahgoub vd., 2020; Lingga vd., 2020). Günümüzde Gürcistan Eliava Enstitüsü faj terapisi uygulamalarına halen devam etmektedir. George Eliava Bakteriyofaj, Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü dünyanın en kapsamlı ve değerli bakteriyel suş ve bakteriyofaj koleksiyonuna sahiptir. Eliava Faj ve Suş Koleksiyonu şu anda insan, bitki ve hayvan bakteriyel patojenlerine karşı aktif 1000'den fazla faj barındırmaktadır (https://eliava-institute.org/en/phages). Bu çalışmada atık sulardan faj izolasyonu amaçlanmıştır. Bulunan bu fajların klinik kökenli patojen bakterilerde konak varlığı araştırılmıştır. Böylece faj terapisi için yapılacak ileri çalışmalarda temel oluşturmak istenmiştir.

Bu çalışmada, 10 litik faj izole edilmiştir ve aynı atık sudan izole edilen beş (*Acinetobacter baumanii, Enterobacter asburiae* ve 3 farklı *E.coli)* Gram negatif bakteriye karşı konak aralıklarını belirlenmiştir. Ayrıca Recep Tayyip Erdoğan Erdoğan Üniversitesi koleksiyonunda bulunan ATCC suşlarından üçü (*E.coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) ve klinik izolatlardan *Klebsiella pneumoniae* (İbik, 2022) türüne ait beş örnek konak olarak belirlenmiştir. Proje kapsamında yer alan İstanbul Medipol Üniversitesi Hastanesinden sağlanan çeşitli Gram negatif örneklerin yer aldığı bakteriler üzerinde test edilen litik fajlarımızın klinik öneme sahip *Pseudomonas, Klebsiella* ve 3 farklı *E.coli*'de etkili olduğunu belirledik. Bunlardan yedi tanesi iki ve daha fazla konakçı aralığına sahipti, bu da faj terapisinde kısa sürede direnç gelişmeyecek litik fajların arzu edilen bir özelliğidir (Hyman, 2019).

Øt3d fajı, dört farklı türe karşı litik aktivite ile en geniş konak aralığını göstermiştir (Tablo 9). Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen Gram negatif bazı bakterilerde atık sulardan izole edilen bakteriyofajlar etki göstermiştir. Bununla birlikte, Ød2d litik fajı, (*Acinetobacter baumaniae, Enterobacter asbriae, Pseudomanas* 1) üç farklı bakteri türüne karşı litik aktivite göstermiştir (Tablo 4 ve Tablo 9). Daha önce *Acinetobacter* suşlarını enfekte ederek faj terapisinde kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır (Pulkkinen vd., 2021; Cheng vd., 2020). Faj terapi potansiyeline sahip *Pseudomonas* suşlarının litik fajları Jamal ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Jamal vd., 2017). Dar spekturumlu fajlar konak bakterileri fazla olmadığından faj terapisi için uygun değildirler. Aynı türde veya birkaç cins bakteriyi enfekte eden fajlar, faj terapisi için hazırlanan faj kokteyli için daha uygundur (He vd.,1992). Mevcut çalışmada Ød5t, Øt3s ve Øt3Kd dar spektrumlu faj olarak saptanmıştır (Tablo 4). Bu

çalışmada izole edilen litik fajların birden fazla bakteri türü üzerinde etki gösterenlerinin faj terapi için aday olabileceğini düşündürmektedir.

Proje kapsamında yapılan analizlere morfolojik özelliklerin elektron mikroskobu ile belirlenmesi, bu çalışmada izole edilen fajların ait oldukları ailelerin tespiti için önemli olabilir. Örneğin, *Caudovirales* takımından bu yer alan fajların habitatta en bol bulunan dsDNA fajları olduğu ve bu durumun farklı atık sularında içinde yer aldığı çevresel örneklerden elde edildiği çalışmalarda gösterilmiştir (Parmar vd., 2018). Ayrıca, bu aileler doğada yaygındır ve bu durum geniş konakçı aralıkları ve protein kapsidlerinin çevresel koşullara direnci ile açıklanabilir (Jasna vd., 2018). Ayrıca yapılacak moleküler mikrobiyolojik analizlerle elde ettiğimiz fajların toksin genleri veya bakteri virülansına katkı sağlayabilecek diğer genlerin taranmasıyla bu genlere sahip olmayanların kolleksiyonu terapi için aday olma özelliklerine katkı sağlayacaktır.

Litik fajların genetik olarak tanımlanma ve moleküler biyoloji, gıda endüstrisi ve MDR suşları da dahil olmak üzere bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyelini araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6.REFERANSLAR

Alpay Ş (1999). Vajinal kaynaklı laktobasillerde bakteriyofaj ve bakteriyosinlerin araştırılması. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Trabzon.

Arda M (2006). Temel Mikrobiyoloji, Medisan yayınevi, Ankara, 209-213.

Balcão, V. M., Belline, B. G., Silva, E. C., Almeida, P. F. F. B., Baldo, D.Â., Amorim, L. R. P., et al. (2022). Isolation and molecular characterization of two novel lytic bacteriophages for the biocontrol of escherichia coli in uterine infections: in vitro and ex vivo preliminary studies in veterinary medicine. Pharmaceutics 14, 2344. doi: 10.3390/pharmaceutics14112344

Bao, J., Wu, N., Zeng, Y., Chen, L., Li, L., Yang, L., et al. (2020). Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant Klebsiella pneumoniae. Emerging. Microbes Infect. 9, 771–774. doi: 10.1080/22221751.2020.1747950

BBC Horizon: Phage — The Virus that Cures 1997-10-09.

Beaudoin RN, Decesaro DR, Durkee DL, Barbaro SE (2007). Isolation of a bacteriophage from sewage sludge and characterization of ıts bacterial host cell. River Academic Journal, 3(1), 1-8.

Bruttin A. ve Brüssow H. (2005). Human Volunteers Receiving Escherichia coli Phage T4 Orally: a Safety Test of PhageTherapy. Antimicrobial agents and Chemo therapy 49, p 2874–2878.

Chanishvili, N. (2012). “Chapter 1 - phage therapy—History from twort and d'Herelle through soviet experience to current approaches,” in Advances in virüs research. Eds. M. Łobocka and W. Szybalski (United States: Academic Press), 3–40. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3

Cheng M, Luo M, Xi H, et al. The characteristics and genome analysis of vB_ApiP_XC38, a novel phage infecting *Acinetobacter pittii*. *Virus Genes*. 2020;56(4):498-507.

Dedrick, R. M., Freeman, K. G., Nguyen, J. A., Bahadirli-Talbott, A., Smith, B. E., Wu, A. E., et al. (2021). Potent antibody-mediated neutralization limits bacteriophage treatment of a pulmonary Mycobacterium abscessus infection. Nat. Med. 27, 1357– 1361. doi: 10.1038/s41591-021-01403-9

D'Herelle F (1917). "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques" [An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery bacillus]. Comptes Rendus (in French). 165: 373–75.

Eskenazi A, Lood C, Wubbolts J, Hites M, Balarjishvili N, Leshkasheli L, et al. (January 2022). "Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant Klebsiella pneumoniae". Nature Communications. 13 (1): 302. Bibcode:2022NatCo..13..302E. doi:10.1038/s41467-021-27656- z. PMC 8766457. PMID 35042848.

Fernebro, J.“Fighting bacterial infections—future treatment options,” Drug Resistance Updates, vol. 14, no. 2, pp. 125–139, 2011.

Fortier LC, Moineau S (2009) Bacteriophages: Methods and Protocols, Isolation, Characterization, and Interactions. Humana Press, Volume 1: Chapter 19, 203-219.

FutureMicrobiology 10, p 685–688.

Ghorayshi A (12 November 2018). "This Scientist Used Live Viruses To Save A Woman's Life From A Superbug Infection". Buzzfeed News. Retrieved 30 January 2021.

Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev*.

Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. Virology Journal 9:9.

Häusler (2006, ch. 1, at the limits of medicine)

He was going to lose his leg until doctors turned to cure older than dirt". OregonLive.com. Minneapolis Star Tribune. 28 December 2019. Retrieved 28December 2019.
He X, Pan R (1992). Bacteriophage lytic patterns for identification of salmonellae, shigellae, Escherichia coli, Citrobacter freundii, and Enterobacter cloacae. JCM, 30(3), 590-594

Hermoso JA, Garcıa JL, Garcıa P (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. Current Opinion in Microbiology 10, p 1-12.

Hyman P (March 2019). "Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth". Pharmaceuticals. 12 (1):35. doi:10.3390/ph12010035. PMC 6469166. PMID 30862020.

Hyman P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. Pharmaceuticals (Basel). 2019;12:35. https://doi.org/10.3390/ph12010035.

İbik YE. (2022). Karbapenem Duyarlı Olmayan *Klebsiella Pneumoniae* İzolatlarının MLST, MALDI-TOF, PFGE İle Moleküler Epidemiyolojisinin İncelenmesi. Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Rize.

Jamal M, Andleeb S, Jalil F, et al. Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995. *Life Sci*. 2017;190:21-28

Jamal, M., Bukhari, S.M.A.U.S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M. A., et al. (2019). Bacteriophages: An overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. J. Basic. Microbiol. 59, 123–133. doi: 10.1002/ jobm.201800412

Jasna V, Parvathi A, Dash A. Genetic and functional diversity of double-stranded DNA viruses in a tropical monsoonal estuary, India. *Sci Rep*. 2018;8:16036.

Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y.-A., Resch, G., et al. (2019) Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by Pseudomonas aeruginosa (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. Lancet Infect. Dis. 19, 35–45. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30482-1

Johri, A. V., Johri, P., Hoyle, N., Pipia, L., Nadareishvili, L., and Nizharadze, D. (2021). Case report: chronic bacterial prostatitis treated with phage therapy after multiple failed antibiotic treatments. Front. Pharmacol. 12. doi: 10.3389/ fphar.2021.692614

Jump up to:a b c d e "Bacteriophage: A solution to our antibiotics problem? virus to fight bacterial infection". Science in the News. 1 February 2018. Retrieved 28 January 2020.

How we can us a Kahn L (9 October 2018). "Bacteriophages: a promising approach to fighting antibiotic-resistant bacteria". Bulletin of the Atomic Scientists. Keime". Deutschlandfunk (in German). Retrieved 14 February 2022.

KERA Think! Podcast: Viruses are Everywhere!". *16 June 2011*. Retrieved 4 June 2012.

Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE (February 2019). "Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria". Cell Host & Microbe. 25 (2): 219– 232. doi:10.1016/j.chom.2019.01.014. PMID 30763536. S2CID 73439131.

Kutter EM, Kuhl SJ ve Abedon ST (2015). Re-establishing a place for phage therapy in westernmedicine.

Li, L., Zhong, Q., Zhao, Y., Bao, J., Liu, B., Zhong, Z., et al. (2023). First-in-human application of double-stranded RNA bacteriophage in the treatment of pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection. Microbial. Biotechnol. 16, 862–867. doi: 10.1111/ 1751-7915.14217

Lin NT, ChiouPY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ (2010). Isolation and characterization of AB2: A novel bacteriophage of Acineto bacterbaumannii. Research in Microbiology, 308-314.

Lingga R, Budiarti S, Rusmana I, Wahyudi AT. Isolation, characterization and efficacy of lytic bacteriophages against pathogenic *Escherichia coli* from hospital liquid waste. *Biodivers J Biol Divers*. 2020;21(7):3234-3241.

Luepke, K. H., Suda, K. J., Boucher, H., Russo, R. L., Bonney, M. W., Hunt, T. D., et al. (2017). Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. Pharmacotherapy. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther. 37, 71–84. doi: 10.1002/phar.1868

Mahgoub S, Muhammad M, Abd-Elsalam S, Alkhazindar M, Abdel-Shafy HI. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* lytic bacteriophages from wastewater for controlling multidrug resistant bacterial strains. *Plant Arch*. 2020;20:450-464.

Mit Viren gegen Bakterien - Bakteriophagen-Therapie als Hoffnung gegen multiresistente

Mulzer, J., Trampuz, A., and Potapov, E. V. (2020). Treatment of chronic left ventricular assist device infection with local application of bacteriophages. Eur. J. Cardio-Thoracic. Surg. 57, 1003–1004. doi: 10.1093/ejcts/ezz295

Munson-McGee JH, Peng S, Dewerff S, Stepanauskas R, Whitaker RJ, Weitz JS, et al. A virus or more in (nearly) every cell: ubiquitous networks of virus–host interactions in extreme environments. The ISME J. 2018;12:1706–14.

Murray PR.,2010. Murray PR, Rosenthal KS., Pfaller MA (2010). Tıbbi Mikrobiyoloji. Altıncı baskı. Çev. Edit. Başustaoğlu A, Atlas Kitapçılık, Ankara, 649-803.

Nilssona AS (2014). Phage therapy constraints and possibilities. Upsala Journal of Medical Sciences 119:192-198.

Novel Phage Therapy Saves Patient with Multidrug-Resistant Bacterial Infection". UC San Diego Health. 25 April 2017
.
Parmar K, Dafale N, Pal R, Tikariha H, Purohit H. An Insight into phage diversity at environmental habitats using comparative metagenomics approach. *Curr Microbiol*. 2018;75(2):132-141
.
Petrovic Fabijan, A., Lin, R. C. Y., Ho, J.,Maddocks, S., Ben Zakour, N. L., Iredell, J. R., et al. (2020). Publisher correction: Safety of bacteriophage therapy in severe staphylococcus aureus infection. Nat. Microbiol. 5, 652–652. doi: 10.1038/s41564-020-0698-9

Phage therapies for superbug infections are being tested in Belgium". New Scientist. Retrieved 14 February 2022.

Poirel, L., Nordmann, P., de la Rosa, J. M. O., Kutateladze, M., Gatermann, S., and Corbellino, M. (2020). A phage-based decolonisation strategy against pan-resistant enterobacterial strains. Lancet Infect. Dis. 20, 525–526. doi: 10.1016/S1473-3099(20) 30140-7

Pulkkinen E, Wicklund A, Oduor JMO, Skurnik M, Kiljunen S. Characterization of vB_ApiM_fHy- Aci03, a novel lytic bacteriophage that infects clinical *Acinetobacter* strains. *Arch Virol*. 2019;164(8):2197-2199.

Rahimi-Midani, A., Lee, S. W., and Choi, T. J. (2021). Potential solutions using bacteriophages against antimicrobial resistant bacteria. Antibiotics 10, 1496. doi: 10.3390/antibiotics10121496

Rakıcı E. (2022). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Yaşayan *Pelophylax* Sp. Türlerinden İzole edilen Enterik Bakterilerdeki Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi ve Moleküler Analizi. Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Rize.

Reche I, D'Orta G, Mladenov N, Winget DM, Suttle CA. Deposition rates of viruses and bacteria above the atmospheric boundary layer. The ISME J. 2018;12:1154–62.

Ross A, Ward S, Hyman P. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. Front Microbiol. 2016;7:1352. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01352.

Rubalskii, E., Ruemke, S., Salmoukas, C., Boyle, E. C., Warnecke, G., Tudorache, I., et al. (2020). Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery. Antibiotics 9, 232. doi: 10.3390/antibiotics9050232

Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. (October 2017). "Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant Acinetobacter baumannii Infection". Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 61 (10): e00954-17. doi:10.1128/AAC.00954-17.

Sharma S, Datta S, Chatterjee S, et al. Isolation and characterization of lytic bacteriophages from wastewater and its application in pathogen reduction. *Def Life Sc Jl*;5(2):80-86.

Shasha SM, Sharon N, Inbar M (February 2004). "[Bacteriophages as antibacterialagents]". Harefuah (in Hebrew). 143 (2): 121–5, 166. PMID 15143702.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG (March 2001). "Bacteriophage therapy". Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (3): 649–659. doi:10.1128/AAC.45.3.649- 659.2001. PMC 90351. PMID 11181338.

Tamaki H, Zhang R, Angly FE, Nakamura S, Hong P-Y, Yasunaga T, et al. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. Environ Microbiol. 2012;14:441–52.

The 26-year-old who inhaled a virus to fight an antibiotic-resistant superbug. NY Post. 26 February 2019. Retrieved 30 January 2021.

Twort FW (1915). "An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses". The Lancet. 186 (4814): 1241–43. doi:10.1016/S0140-6736(01)20383-3.

Uyttebroek, S., Chen, B., Onsea, J., Ruythooren, F., Debaveye, Y., Devolder, D., et al. (2022). Safety and efficacy of phage therapy in difficult-to-treat infections: a systematic review. Lancet Infect. Dis. 22, e208–e220. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00612-5

Viertel TM, Ritter K, Horz HP (2014). Viruses versus bacteria novel approaches to phage therapy as a tool against multi drug-resistant pathogens. J Antimicrob Chemother 69, p 2326-2336.

Weber-Dąbrowska, B., Żaczek, M., Łobocka, M., Łusiak-Szelachowska, M., Owczarek, B., Orwat, F., et al. (2023). Characteristics of environmental klebsiella pneumoniae and klebsiella oxytoca bacteriophages and their therapeutic applications. Pharmaceutics 15, 434. doi: 10.3390/pharmaceutics15020434

Wittebole X, Roock SD, Opal SM (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Virulence 5p 226-235
.

Wu, N., Dai, J., Guo, M., Li, J., Zhou, X., Li, F., et al. (2021). Pre-optimized phage therapy on secondary Acinetobacter baumannii infection in four critical COVID-19 patients. Emerging. Microbes Infect. 10, 612–618. doi: 10.1080/22221751.2021.1902754

Zimmer C (7 December 2016). "A virus, fished out of a lake, may have saved a man's life — and advanced science". Stat News. Retrieved 30 January 2021.

7.EKLER

EK.6.1. Rize Belediye Başkanlığı, Su ve Kanalizasyon İşleri Müdürlüğü, izin

T.C.
RİZE BELEDİYE BAŞKANLIĞI
Su ve Kanalizasyon Işleri Müdürlüğü

Sayı :E- 74201860-314.07.06-232296
Konu : Bilimsel Proje Hk.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

İlgi : 04.11.2022 tarihli 10136 sayılı yazınız.

İlgi Yazınızda Belirtmiş olduğunuz Rize ve Çevresindeki Atık Sulardan Patojen Bakterileri Enfekte Eden Bakteriyofajların İzolasyonu adlı çalışma kapsamında tarafımızdan ihtiyaç duyulması halinde Belediyemiz atıksularından gözetimimiz altında su örneği alınmasında tarafımızdan herhangi bir sakınca görülmemektedir.Su örneği alacağınız tarihi tarafımıza bildirmeniz halinde konuyla ilgili personel desteği tarafınıza verilecektir.
Bilgilerinize rica ederim.

Muhittin Aydın BİLSEL
Başkan a.
Başkan Yardımcısı

Bu belge 5070 Sayılı Kanun gereğince E-imza ile imzalanmıştır.
Bu belgenin kontrolü 166789586779#1 belge takip no ile http://www.rize.bel.tr e-belediye uygulaması üzerinden sağlanabilir.

Adres: Rize Belediyesi Piriçelebi Mah Menderes Bulv. No:182 Merkez/RIZE
Tel : 444 50 53 Faks: ()
Elektronik Ağ: www.rize.bel.tr, KEP Adresi: rizebelediyesi@hs01.kep.tr
Bilgi İçin : ZEYNEP KASPAROĞLU
Dahili : 3319

EK.6.2.İstanbul Medipol Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Sayı : E-10840098-772.02-7780 26/12/2022
Konu: Etik Kurulu Kararı

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Rize ve Çevresindeki Atık Sulardan Patojen Bakterileri Enfekte Eden Bakteriyofaj İzolasyonu			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☑	ULUSAL ☑	ULUSLARARASI ☐

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrağınızı https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys linkinden CEBB4AEBX3 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Sa

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
Değerlendirilen Belgeler	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
Karar Bilgileri	**Karar No: 1149**	**Tarih: 22/12/2022**		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ	Tıp Tarihi ve Etik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Doç. Dr. Mahmut Kemal ÖZDEMİR	Elektrik ve Elektronik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Dr. Öğr. Üyesi Nesiha HACIHASANOĞLU ÇAKMAK	Biyokimya	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	E imzalıdır
Dr. Öğr. Üyesi Pakize YİĞİT	Sayısal Yöntemler/ Biyoistatistik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı

* Toplantıda Bulunma

Girişimsel Olmayan Etik Kurulu Sekreteri
Bilge KAYA

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrağınızı https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys linkinden CEBB4AEBX3 kodu ile doğrulayabilirsiniz.