



Litik *Pseudomonas aeruginosa* Faj İzolasyonu ve Litik Etki Potansiyelinin Araştırılması

Omid ESHAGİ JOGANLO¹ Oktay KESKİN^{1,*}

¹ Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 63200, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi: 16.05.2024

Kabul Tarihi: 15.08.2024

Öz

Pseudomonas aeruginosa çevrede yaygın olarak bulunur. Genellikle çoklu antibiyotik direnci ve sahip olduğu virülans faktörleri nedeniyle insan ve hayvanlarda tedavisi zor enfeksiyonlara neden olan önemli bir fırsatçı patojendir. Çoklu antibiyotik direncine sahip bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde fajlar önem kazanmıştır. Bu çalışmada, *P. aeruginosa* için litik etkiye sahip faj/fajların izolasyonu ve bu fajların farklı *P. aeruginosa* izolatları için litik etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla kanalizasyon örnekleri, gübre örnekleri gibi fajların bulunabileceği kaynaklardan 3 farklı faj izolasyonu yapıldı ve bunların farklı *P. aeruginosa* izolatlarına litik etkileri araştırıldı. Bunun için Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonunda bulunan çeşitli klinik örneklerden ya da çevresel örneklerden izole edilmiş 40 *P. aeruginosa* izolatı kullanıldı. Bu konak bakterilerin çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları belirlendi. Konak bakteriler penisilin, tylosin, oksitetrasiklin ve eritromisin için %100, ampilisin için %90, streptomisin ve amoksisilin/klavulonik asit için %87.5, sefkuinom için %85, doksisklin için %77.5, azithromisin için %1.5 ve gentamisin için %12.5 oranında dirençli olarak saptanırken, izolatların tamamı enrofloksasine duyarlı bulundu. Çalışmada izole edilerek kodlanan 3 fajdan PAFO fajı 25 (%62.5), PAFA fajı 35 (%87.5) ve PAFS fajı ise 30 izolat (%75) üzerinde lizis oluştururken, her üç fajın da litik etki gösterdiği 10 izolat (%25) belirlendi. Sonuç olarak, *P. aeruginosa*'ya karşı litik bakteriyofajlar, özellikle antibiyotik direnci ve enfeksiyon kontrolü gibi zorluklarla başa çıkma potansiyeline sahip, spesifik ve etkili bir tedavi seçeneği olabilir. Bu nedenle çalışmada izole edilen fajların detaylı karakterizasyonlarının yapılması, tedavi ya da çevresel dekontaminasyon uygulamaları için ticari ürün haline dönüştürülme potansiyellerinin belirlenmesinin yararlı olacağı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Çoklu antibiyotik direnci, Litik bakteriyofaj, *Pseudomonas aeruginosa*, Tek Sağlık.

ABSTRACT

Isolation of Lytic *Pseudomonas aeruginosa* Phages and Investigation of Their Lytic Potency

Pseudomonas aeruginosa is commonly found in the environment. It is an important opportunistic pathogen that causes difficult-to-treat infections in humans and animals due to its multiple antibiotic resistance and virulence factors. Treatment with phages has gained importance due to antibiotic resistance. In this study, it was aimed to isolate phage(s) with lytic effect for *P. aeruginosa* and to determine the lytic effects of these phages on different *P. aeruginosa* isolates. For this purpose, 3 different phages were isolated from sources where phages are likely to be found such as sewage samples, manure samples and the lytic effects of these phages on different *P. aeruginosa* isolates were investigated. For this purpose, 40 *P. aeruginosa* isolated from various clinical or environmental samples in the Culture Collection of Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology were used. These host bacteria were considered to have multidrug resistance. The host bacteria were 100% resistant to penicillin, tylosin, oxytetracycline and erythromycin, 90% resistant to ampicillin, 87.5% resistant to streptomycin and amoxicillin/clavulonic acid, 85% resistant to cefquinom, 77.5% resistant to doxycycline, 1.5% resistant to azithromycin and 12.5% resistant to gentamicin, while all isolates were sensitive to enrofloxacin. Among the 3 phages isolated and coded in the study, PAFO phage caused lysis on 25 isolates (62.5%), PAFA phage caused lysis on 35 isolates (87.5%) and PAFS phage caused lysis on 30 isolates (75%), while 10 isolates (25%) in which all three phages showed lytic effect were determined. In conclusion, lytic bacteriophages against *P. aeruginosa* may be a specific and effective therapeutic option with the potential to tackle challenges such as antibiotic resistance and infection control. Therefore, it would be useful to further characterize the phages obtained in this study and determine their potential for commercialization for therapeutic or environmental contamination applications.

Keywords: Lytic bacteriophage, Multidrug resistance, One Health, *Pseudomonas aeruginosa*.



GİRİŞ

Pseudomonas cinsi bakterilerin çoğu doğada toprak ve sularla yoğun olarak bulunmaktadır. *Pseudomonas* cinsinde 200'den fazla tür olmakla birlikte bunlardan bazıları saprofitik olup, bir kısmı da insan, hayvan ya da bitki patojeni olarak bilinmektedir (UKHSA 2024).

P. aeruginosa sağlıklı hayvanların dışkıında ve derisinde hayatta kalabilir ve fırsatçı karakteri nedeniyle hayvanın bağışıklık sistemini baskılayan veya normal florayı bozan tüm predispozan faktörler enfeksiyona neden olabilmektedir. Bu etken birçok hayvan türünde sporadik enfeksiyonlara neden olur ve fırsatçı patojen olarak sığır, koyun, keçi, domuz, köpek, kedi ve sürüngenlerde çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Etken, süt ineklerinde ekonomik kayıplara neden olan mastitis, solunum ve intestinal sistemde oluşan sistemik enfeksiyonlara, atlarda endometrit gibi genital sistem hastalıklarına, koyunlarda yeşil yün hastalığına, köpeklerde otitis ve idrar yolu enfeksiyonlarına yol açarken, vizon veya tilki gibi kürklu hayvanlarda ise hemorajik pnömoni gibi hastalıkların oluşumunda rol oynar (Schauer ve ark. 2021).

İnsanlarda hastane enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalar arasında, büyük bir tehdit oluşturan çoklu ilaç direncine sahip *P. aeruginosa* öne çıkmaktadır (Harada ve ark. 2018). *P. aeruginosa*, yoğun bakım ünitelerine kabul edilen hastalarda şiddetli alt solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkili en baskın tür ve ventilatörle ilişkili pnömoni ile ilişkili ikinci en yaygın patojen olarak kabul edilmektedir (Sievert ve ark. 2013). *P. aeruginosa*, alt ve üst solunum yolu enfeksiyonunda en yaygın bakteriyel patojenlerden biridir, ayrıca kistik fibrozis (KF) hastalarında özellikle önemlidir (Fong ve ark. 2017). *P. aeruginosa* zamanla mevcut antibiyotiklere karşı giderek daha dirençli hale gelmiş ve hastane kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu ESKAPE olarak bilinen en tehlikeli altı (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter species*) patojenden biri olarak kabul edilmektedir (Santajit ve Indrawattana 2016). Son zamanlarda hastane ortamlarında kolay yayılım sağladığı ve dirençli suşların giderek arttığı gözlenmekte ve en sık neden olduğu enfeksiyonlar arasında ise pnömoni, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, cerrahi müdahaleler sonucu oluşan osteomyelit ve septik artrit, gastrointestinal sistem enfeksiyonları, göz ve kulak enfeksiyonları ile üriner sistem enfeksiyonları yer almaktadır (Kerr ve Snelling 2009).

Klinik uygulamadaki en büyük zorluklardan biri de çoklu ilaç direncine sahip izolatlardır. Bunlar, *P. aeruginosa*'nın da ciddi enfeksiyonlar oluşturması sebebiyle yer aldığı ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) olarak bilinen öncelikli patojenlerdir. Çoklu ilaç direnci, küresel halk sağlığına yönelik en büyük üç tehdit arasındadır ve genellikle aşırı ilaç kullanımı veya antimikrobiyallerin reçetesiz ya da uygunsuz kullanımından kaynaklanmaktadır (Sievert ve ark. 2013).

P. aeruginosa izolatlarında pek çok antibiyotiğe karşı direnç geliştiği görülmektedir. Bu nedenle antibiyotiklerin etkisiz kaldığı vakalarda bir tedavi seçeneği olarak bakterileri parçalayan viruslar olan baktariyofajların kullanılmasına dair çalışmalar hızla artmaktadır. Bu çalışmada, *P. aeruginosa* için litik etkiye sahip faj/fajların izolasyonu ve bu fajların farklı *P. aeruginosa* izolatları için litik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu araştırma faaliyetinin etik kurul denetimine tabi olmadığı Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 08/11/2021 tarih ve 2021/008-04 nolu kararında belirtilmiştir.

Bakteri Suşları

Bu çalışmada Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan ve 31'i (10 mastitli süt, 6 Otitis externa ve 15 apse) hayvanlardaki klinik vakalardan, 6'sı sığır gübresinden, 3'ü de atık sularından izole edilen toplam 40 *Pseudomonas aeruginosa* izolatu ve pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 9027, negatif kontrol olarak da *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 referans suşu kullanıldı.

Besiyerleri

Çalışmada kültür koleksiyonunda saklanan konak bakterilerin canlandırılması ve üretilmesi için Tryptic Soy Agar (TSA) ve Triptik Soy Broth (TSB), Faj izolasyonu için yapılan ekimlerde ise Luria Bertani Broth, (LB broth) ve Luria Bertani Agar (LBA), Kirby-Bauer disk difüzyon testi için Mülller Hinton agar kullanıldı (HiMedia, Hindistan).

Faj İzolasyonunda Kullanılan Materyaller

Bu amaçla etkenin bulunabileceği ortamlar olarak değerlendirilen çiftliklerden toprak, atık sular, gübre örnekleri, lağım suları gibi çevresel örnekler 50 ml steril kaplara alınarak kullanıldı.

P. aeruginosa Suşlarının Pasajı ve Bakteriyel DNA İzolasyonu

Derin dondurucuda saklanan izolatları canlandırmak için Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine ekim yapıldı ve 24 saat 37 °C inkübe edildi. Besiyerinde üreyen koloniler Gram boyama ile boyanarak saflık yönünden kontrol edildi. Daha sonra DNA ekstraksiyonu için 1.5 ml'lik ependorfta 250µl distile su içinde bir öze dolusu kültür süspanse edildi. Hücrelerin parçalanması ve DNA'nın açığa çıkması için, örnekler 10 dakika kaynatıldı ve ardından 14.000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant, bakteri DNA kaynağı olarak kullanıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

P. aeruginosa izolatlarının doğrulanması Spilker ve ark. (2004) tarafından bildirilen primerler ve protokol kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 1). PCR reaksiyonu 25 µl total hacimde ve 16.65 µl steril distile su, 3 µl MgCl², 2.5 µl PCR Buffer, herbir primerden 0.4 µl (100 pmol/µl stok), 0.2 µl dNTP miks (10 mM), 0.25 µl Taq polimeraz, 2 µl bakteriyel DNA olacak şekilde hazırlandı. Karışıma 95 °C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben, toplam 40 döngü olacak şekilde 94 °C'de 20 s denatürasyon, 58 °C'de 20 s primer bağlanması, 72 °C'de 40 s zincir uzama aşaması ve 72 °C 1 dk son zincir uzama aşaması uygulandı.

PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi için 10 µl DNA 2 µl 6x yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1.5 agaroz jele yüklenerek elektroforez gerçekleştirildi. Marker olarak 100 bp DNA Ladder (Genaid, İngiltere) kullanıldı. *P. aeruginosa* ATCC 9027 pozitif kontrol ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 referans suşlarının DNA'ları negatif kontrol olarak kullanıldı.

Tablo 1: *P. aeruginosa*'nın moleküler olarak doğrulanması için kullanılan primerler (Spilker ve ark. 2004).

Table 1: Primers used for molecular confirmation of *P. aeruginosa* (Spilker et al. 2004).

Primer	Sequence (5'-3')	Location	Amplikon büyüklüğü size (bp)
PA-SS-F	GGGGGATCTTCGGACCTCA	189-206	956
PA-SS-R	TCCTTAGAGTGCCACCCG	1124-1144	

Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Antimikrobiyal duyarlılık testi, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine (CLSI 2022) uygun olarak disk difüzyon yöntemiyle yapıldı. Fajlar için konak olarak kullanılacak 40 adet *P. aeruginosa* izolatının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için penisilin G (P, 10 µg), streptomisin (S, 10 µg), azitromisin (AZM, 15 µg), amoksisilin/klavulonik asit (AMC, 20/10 µg), doksisisiklin (DO, 30 µg), tilosin (TY, 15 µg), oksitetrasiklin (T, 30 µg), sefkuinom (CEQ, 30 µg), eritromisin (E, 15 µg), ampisilin (AM, 10 µg), enrofloksasin (ENR, 5 µg) ve gentamisin (CN, 10 µg) içeren ticari (Oxoid, İngiltere) diskler kullanıldı.

Bakteriyofaj İzolasyonu

Çevresel örneklerden (lağım suları, gübre) alınan örnek süspansiyonlar 10.000×g devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant 0,22 µm por çapına sahip filtreden süzülerek, başka steril bir tüpe akatıldı. Bu filtrattan daha sonra 100 µl 2 mM CaCl₂ içeren 10 ml LB broth içine konularak ve üzerine log fazındaki konakçı bakterinin kültüründen 100 µl eklenerek karışım 50 rpm devirde 37 °C de 24-48 saat çalkalanarak inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kültür 10.000×g devirde 10 dakika santrifüj edilerek üstteki süpernatant ayrı bir steril tüpe alınarak üzerine 0.5 ml kloroform eklendi ve daha sonra test bakterilerinin duyarlılığının belirlenmesinde (spot testinde) kullanıldı. Bu amaçla konak olarak kullanılan izolatların logaritmik fazdaki sıvı kültüründen TSA'a 100 µl yayma ekim metodu ile ekim yapılarak üzerine 10 µl faj filtratı damlatılarak 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Litik faj aktivitesine sahip filtratlar 4 °C de saklandı.

İzole Edilen Bakteriyofajların Çift Tabaka Agar Yöntemi ile Saflaştırılması

Elde edilen steril bakteriyofaj solüsyonunda bulunması muhtemel farklı fajların saflaştırılması amacı ile solüsyonun 10⁻¹⁰'a kadar 10 katlı dilüsyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla çift tabakalı agar yöntemi kullanıldı. Dilüsyon tüplerinden alınan 0,1 ml bakteriyofaj solüsyonu, 100 µl log fazındaki konakçı bakteri süspansiyonu ile 4 ml yumuşak (%0.7) LBA (ortalama 48 °C de bulunan) karıştırılarak alttaki LBA yüzeyinin üzerine eşit oranda döküldü. Steril pastör pipeti ile tek plak oluşumu görülen petriyelerden bakteriyofaj plakları kesilerek TSB içerisine aktarıldı. Kesilen bakteriyofaj plakları sıvı besiyerinde karıştırılarak bakteriyofajların besiyerine geçmesi sağlandı. Elde edilen bakteriyofaj süspansiyonu yine on katlı olarak dilüye edilerek çift tabaka agar yöntemi uygulanarak 18 saat 37 °C de inkübe edildi. Bu işlem üç kez tekrar edilerek saf bakteriyofaj eldesi yapıldı. Bu solüsyon pürifiye olmuş saf bakteriyofaj stoku olarak -80 °C de kullanılmaya kadar küçük taksimatlar halinde saklandı.

Bakteriyofajların Çoğaltılması

Litik olan ve saflaştırılan fajların çalışmada kullanılan 40 izolat üzerine olan litik etkilerini belirlemek için üç farklı faj çoğaltılarak titreleri yükseltildi. Bu amaçla konak logaritmik fazdaki sıvı kültüründen TSA'ya 100 µl ekilerek petrinin tüm yüzeyine yayıldı. Yüzey kuruduktan sonra steril faj filtratından 200 µl agar yüzeyine yayıldı. 37 °C de 24 saat inkübasyonun ardından üzerinde litik alanlar

bulunan petriyeler steril FTS ile toplanıp, aynı işlem en az 3 pasaj devam ederek fajların çoğaltılması sağlandı. Son olarak FTS içinde toplanan faj ve bakteri karışımları santrifüj edildikten sonra 0.22 µm filtreden geçirilerek elde edilen steril bakteriyofaj solüsyonlarının titreleri belirlendi.

Bakteriyofaj Titresinin Belirlenmesi

Sıvı kültürlerdeki bakteriyofaj titrelerinin belirlenmesi, çift katmanlı agar yöntemi ile belirlendi. İlk olarak bakteriyofaj suşları sterile saline-magnesium-gelatine buffer (SGM) solüsyonunda 10⁻¹'den 10⁻¹⁰ oranına kadar dilüe edildi. Sonra 100 µl faj dilüsyonu ve konak bakteri süspansiyonundan (~10⁸ cfu/ml) 100 µl alındı ve 4 ml soft agar (%0.4) ile karıştırılarak LBA (CaCl₂ ilave edilmiş) içeren petriyeler üzerine döküldü. Besiyeri katılaştıktan sonra 37 °C de gece boyunca inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyonun ardından bakteriyofaj plak oluşturma birimi (PFU/mL) belirlendi.

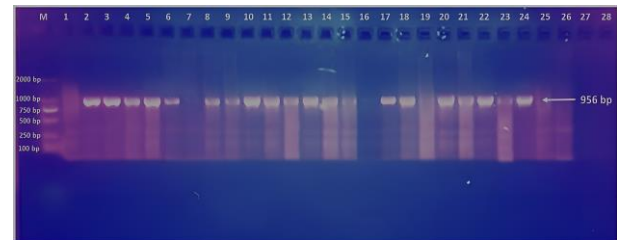
Bakteriyofajların Farklı İzolatlarda Litik Etkilerinin Belirlenmesi

İzole edilmiş bakteriyofajların litik aktivitesi, bakteriyofaj süspansiyonundan 10-20 µl "spot test" yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Bakteriyofajların litik aktiviteleri, faj damlası uygulamasından sonra LB agar üzerinde oluşan plakların şeffaflığına göre belirlendi.

BULGULAR

PCR Bulguları

İncelenen izolatlardan PCR ile *P. aeruginosa* olduğu doğrulanmış 40 izolat çalışmada kullanıldı (Şekil 1).



Şekil 1: PCR sonucu elde edilen bantların agaroz jel elektroferezde görüntüsü.

Figure 1: Agarose gel electrophoresis of PCR products.

M: DNA ladder, 1: Negatif Kontrol, 2: Pozitif Kontrol, 3-6, 8-15, 17, 18, 20-24 *P. aeruginosa*; 7, 16, 19, 25 ve 26 *Pseudomonas* spp. İzolatları.

İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzole edilen bakteriyofajların litik etkilerinin araştırılmasında konak bakteri olarak kullanılacak 40 adet *P. aeruginosa* izolatının antibiyotik duyarlılıkları (Tablo 2) ve duyarlılık/dirençlilik oranları (Tablo 3) tabloları verildi. On iki antibiyotiğe karşı duyarlılıkları test edilen konak bakterilerin tamamı 6-10 etken maddeye dirençli bulunduğu için konak bakteri olarak kullanılan izolatların tamamı (40/40) çoklu antibiyotik direncine sahip (MDR) izolatlar olarak değerlendirildi (Şekil 2).

Bakteriyofajların İzolasyonu

Bakteriyofaj izolasyon çalışmaları sonucunda spot testinde pozitif reaksiyon veren litik fajlar izole edildi. Elde edilen steril bakteriyofaj solüsyonunda bulunması muhtemel farklı fajların saflaştırılması amacı ile 10 katlı dilüsyonları gerçekleştirilen fajların 10^{-7} dilüsyonunda sayılabilecek faj plakları oluştu (Şekil 3). Buradan farklı görünümdeki plaklardan seçilerek saflaştırıldıktan sonra PAFA, PAFO ve PAFS olarak adlandırılan 3 farklı bakteriyofaj elde edildi (Şekil 4).

Bakteriyofajların Çoğaltılması ve Titrelelerinin Belirlenmesi

Saflaştırılan her üç fajın da çoğaltıldığında 3×10^{10} PFU/ml aralığında faj titresine sahip olduğu belirlendi. Sulandırılan

faj stoklarının her bir sulandırmasından yapılan ekimler sonucunda her bir agar tabakası üzerindeki plaklar sayılarak ve faj titresi hesaplandı.

Bakteriyofajların Farklı *Pseudomonas* Suşlarına Olan Litik Etkilerinin Belirlenmesi

P. aeruginosa olduğu doğrulanan toplam 40 adet izolat, elde edilen PAFA, PAFO ve PAFS kodlu bakteriyofajlarla test edilerek bu suşlara olan litik etkileri belirlenmiştir (Tablo 2; Şekil 5).

Elde edilen sonuçlara göre PAFO fajı 25 izolat (%62.5), PAFA fajı 35 izolat (% 87.5) ve PAFS fajı 30 izolat (%75) için litik etki oluştururken, her üç fajın da litik etki gösterdiği 10 izolat (%25) belirlendi.

Tablo 2: *P. aeruginosa* izolatlarının test edilen antibiyotiklere ve izole edilem bakteriyofajlara duyarlılıkları.

Table 2: Susceptibility of *P. aeruginosa* isolates to tested antibiotics and isolated bacteriophages.

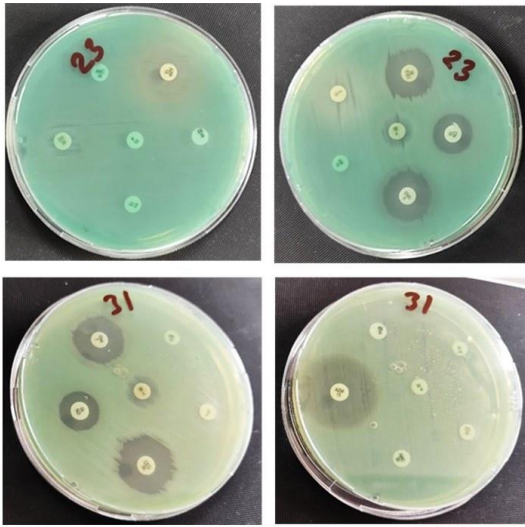
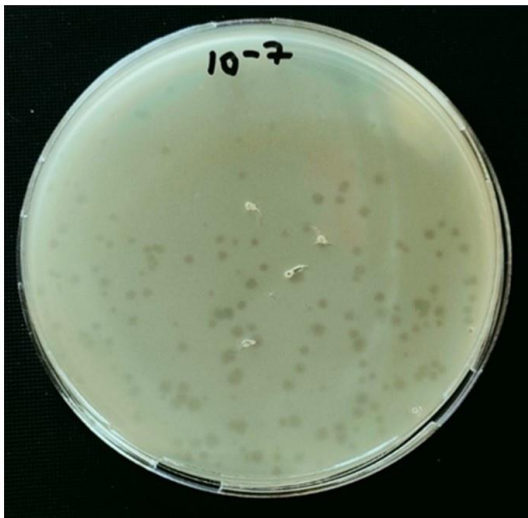
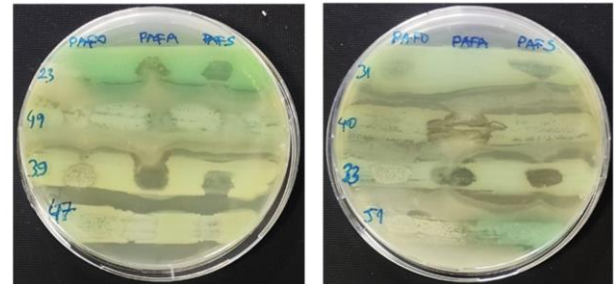
Suş No	Antibiyotikler												Litik etki			
	P	S	AZM	AMC	DO	TY	T	CEQ	E	AM	ENR	CN	PAFO	PAFA	PAFS	
1												S	S	+	+	
2			S									S	S	+	+	+
3			S					S				S	S	+		+
4			S									S	S	+	+	
5		S	S		S					S		S	S		+	+
6			S									S	S	+	+	+
7		S			S					S		S	S	+	+	+
8			S	S	S							S	S		+	+
9			S									S	S		+	+
10			S									S	S	+	+	
11			S									S	S	+	+	+
12		S	S		S			S				S	S	+	+	
13		S			S			S				S	S		+	+
14		S	S									S	S		+	+
15			S	S	S			S				S	S	+	+	
16			S									S	S	+	+	
17			S									S	S	+	+	
18										S		S	S	+	+	+
19			S									S	S	+	+	
20		S	S					S		S		S	S		+	+
21			S									S	S	+		+
22		S	S									S	S		+	+
23			S									S	S		+	+
24			S									S	S	+	+	+
25			S					S				S	S	+	+	
26			S									S	S	+	+	+
27			S									S	S	+	+	
28			S	S	S							S	S		+	+
29			S									S	S	+		+
30												S	S	+		+
31			S									S	S		+	+
32			S									S	S	+	+	
33			S									S	S		+	+
34			S	S	S							S	S	+	+	+
35			S									S	S	+	+	+
36												S	S	+	+	+
37			S	S	S							S	S		+	+
38												S	S		+	+
39			S									S	S	+		+
40			S									S	S		+	+
Toplam	0	5	33	5	9	0	0	6	0	4	40	35				

Antibiyotik duyarlılıkları açısından S: Duyarlı, Boşluk: Dirençli P: penisilin G, S: streptomisin, AZM: azitromisin, AMC: amoksisilin/klavulonik asit, DO: doksisiklin, TY: tilosin, T: oksitetrasiklin, CEQ: sefkuinom, E: eritromisin, AM: ampisilin, ENR: enrofloksasin, CN: gentamisin. Faj litik etkisi açısından + : Lizis var Boşluk: Lizis yok.

Tablo 3: *P. aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon tekniği ile belirlenen duyarlılık/dirençlilik oranları.**Table 3:** Susceptibility/resistance rates of *P. aeruginosa* isolates determined by disk diffusion technique.

Antibiyotik*	Duyarlı izolat n (%)	Dirençli izolat n (%)
P	0 (0)	40 (100)
S	5 (12.5)	35 (87.5)
AZM	33 (82.5)	7 (17.5)
AMC	5 (12.5)	35 (87.5)
DO	9 (22.5)	31 (77.5)
TY	0 (0)	40 (100)
T	0 (0)	40 (100)
CEQ	6 (15)	34 (85)
E	0 (0)	40 (100)
AM	4 (10)	36 (90)
ENR	40 (100)	0 (0)
CN	35 (87.5)	5 (12.5)

*P: penisilin G, S: streptomisin, AZM: azitromisin, AMC: amoksisilin/klavulonik asit, DO: doksisisiklin, TY: tilosin, T: oksitetrasiklin, CEQ: sefkuinom, E: eritromisin, AM: ampisilin, ENR: enrofloksasin, CN: gentamisin.

**Şekil 2:** Disk difüzyon tekniği ile yapılan antibiyogram testi sonuçları.**Figure 2:** Antibigram test results by disk diffusion technique.**Şekil 4:** İzole edilen üç fajın litik etkisi (Konak bakteri 29 numaralı *P. aeruginosa* izolati).**Figure 4:** Lytic effect of three isolated phages (Host bacterium *P. aeruginosa* isolate 29).**Şekil 3:** Çift tabaka agar yöntemindeki faj plaklarının görünümü (PAFS).**Figure 3:** View of phage plaques in the double layer agar method.**Şekil 5:** Test edilen her üç fajın bazı konak *P. aeruginosa* izolatlarına litik etkileri.**Figure 5:** Lytic effects of all three phages tested on some host *P. aeruginosa* isolates.

TARTIŞMA VE SONUÇ

P. aeruginosa farklı hayvan türlerinde çeşitli enfeksiyonlara neden fırsatçı bir patojendir. *P. aeruginosa* hayvanların deri ve sindirim sisteminde yaygın olarak bulunduğu için bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır.

P. aeruginosa'ya bağlı olarak köpeklerde otitis eksterna, sığırlarda mastitis ve abortus, korneal ülser, atlarda metritis, koyunlarda yapağı çürüklüğü ve kanatlı hayvanlarda embriyonal ölümleri ortaya çıkmaktadır (Arda ve ark. 1997).

P. aeruginosa, birden fazla mekanizma yoluyla, genellikle aynı anda direnç oluşturma konusunda olağanüstü bir yeteneğe sahiptir ve bu da neredeyse mevcut tüm antibiyotiklere karşı dirençle sonuçlanmaktadır (Harada ve ark. 2012). Abbas ve ark. (2022) yaptıkları çalışmada 24 *P. aeruginosa* izolatının 22'sini (%91.66) MDR olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu 22 MDR izolatının 19'unda (%86.36) biyofilm üretimini pozitif olarak saptarken hepsinde biyofilm kodlayan gen (*pslA*) varlığını da göstermişlerdir. Pseudomonaslarda görülen çoklu antibiyotik direnci gerek insanlarda (Gül ve ark. 2004; Çufalı 2011; Deredjian ve ark. 2011; Gomes ve ark. 2011; Örüklü 2011; Öner ve ark. 2022) gerekse hayvanlarda (Aslantaş ve ark. 2022; Ünal 2005; Keskin ve ark. 2012; Şahin 2015; Zeyrek 2019; Eliasi ve ark. 2020; Abdou ve ark. 2021) pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir.

Gül ve ark. (2004) klinik örneklerde elde edilen 71 *P. aeruginosa* izolatında seftazidime duyarlılığını araştırdıkları çalışmada disk difüzyon tekniği ile %42,3, E-test yöntemi ile de %50.7 oranında direnç tespit etmişlerdir. Çufalı (2011) klinik örneklerden elde edilen 128 *P. aeruginosa* izolatın 13 antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını değerlendirdiği çalışmasında bu antibiyotiklere %10.1-95.9 arasına değişen dirençlilik saptamıştır. Deredjian ve ark. (2011) yapmış oldukları çalışmada hastane suşlarının %60'nın 3'ten 16'ya kadar antibiyotik olacak şekilde çoklu direnç fenotipi gösterdiini rapor etmişlerdir. Öner ve ark. (2022) Ocak 2017-Aralık 2021 tarihleri arasında beş yıllık süreçte *P. aeruginosa* izolatlarında saptanan direnç durumun değerlendirmişlerdir. Bu süreçte klinik örneklerden izole edilen 2876 *P. aeruginosa* izolatı incelenmiştir. İzolatlarda en düşük direnç oranları amikasine %3, gentamisine %6, en yüksek direnç oranları ise seftazidime %21 ve imipeneme %19 olarak belirlenmiş ve direnç durumu yıllara göre anlamlı bir farklılık olduğunu bildirmişlerdir.

Ünal (2005) farklı kaynaklarda elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının tamamını (%100) enrofloksasin ve gentamisine duyarlı, karbenisiline orta derecede duyarlı bulurken ampisilin, aztronam, piperasilin, sefatoksim, tetrasiklin, eritromisin, streptomisin, kanamisin ve trimethoprim/sülfamethaksosol içi %100 direnç saptamışlardır. Keskin ve ark. (2012) bir süt çiftliğinde buzağılarda görülen yüksek ölümler nedeniyle incelenen örnekten izole edilen *P. aeruginosa* suşunda ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefoksitin, siprofloksasin, eritromisin, gentamisin, norfloksasin, oksasillin, penisilin, rifampin, streptomisin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol ve vankomisine direnç belirlerken sadece imipenem duyarlı bulunmuştur. Şahin (2015) klinik mastitisli inek sütlerinden elde edilen *P. aeruginosa* izolatları için danofloksasin, linkomisin/neomisin, sefaperazon ve kolistin sülfat için duyarlılık oranı %100 olarak bildirirken pensilin/novobiosin, amoksisilin/klavulanik asit, kanamsinin/sefaloksin ve eritromisine %100 direnç belirlemişler. Araştırmacılar florfenikol için %29, trimethoprim/sülfamethaksosol için %29 ve oksitetrasiklin için de %71 oranında direnç belirlediklerini rapor etmişlerdir. Zeyrek (2019) köpeklerin burun boşluğundan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin/sulbaktam, imipenem, kloksasilin ve penisilin/novobiosin için %100

direnç oranı bildirirken kanamisin/sefaleksinin %64 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar oksitetrasiklin için %55, enrofloksasin ve gentamisin içinse %100 duyarlılık belirlemişlerdir. Eliasi ve ark. (2020) Güney Afrika'da bir veteriner hastanesinden temin edilen *P. aeruginosa* izolatlarında 19 antibiyotik için disk difüzyon tekniği ile duyarlılıkları araştırmışlar ve linkomisin için %98, penisilin-G için %96, amoksisilin/klavulanik asit için %93, amoksisilin/ampisilin, karbenisilin ve tylosin için %92, linkomisin/spektinomisin, orbifloksasin ve sefalotin için %90, kloramfenikol ve kanamisin için %89, doksisklin için %87, piperasilin için %86, seftisidim için %77, enrofloksasin için %73, gentamisin için %18, amikasin için %16, tobramisin için %12 ve imipenem için %6 dirençlilik saptamışlardır. Abdou ve ark. (2021) ördeklerden izole edilen 20 adet *P. aeruginosa* suşunda eritromisin, oksitetrasiklin, ampisilin ve amoksisilin için %95, tylosin için %90, doksisklin ve sefotaksim için %85, norfloksasin için %55, enrofloksasin için %50, siprofloksasin için %45 ve florfenikol için %20 oranında direnç saptamışlardır. Aslantaş ve ark. (2022) klinik mastitisli sığır sütlerinden izole 44 suşun disk difüzyon tekniği ile gentamisin, tobramisin, amikasin, piperasilin/tazobaktam, aztreonam, meropenem, imipenem, siprofloksasin, sefipim, piperasilin ve seftazidim duyarlılıklarını araştırmışlardır. Çalışmacılar izolatların çoğunu (%72.7) incelenen tüm antimikrobiallere duyarlı bulduklarını, 8 izolatı siprofloksasine, bir izolatı gentamisin ve siprofloksasine, bir izolatı meropenem ve imipeneme, bir izolatı meropenem, imipenem ve siprofloksasine, bir izolatın da gentamisin, tobramisin, amikasin, siprofloksasin ve seftazidime dirençli bulunduğunu, bu sonuçlara göre siprofloksasin için direnç oranının %25, karbepenemler için %4.5 olarak hesaplandığını rapor etmişlerdir. Verilen bu araştırmaların tamamında sonuçlar MDR olarak değerlendirilmiştir. Sunulan bu çalışmada da konak olarak kullanılan *P. aeruginosa* izolatlarının tamamı üç ve üçten fazla antibiyotiğe dirençli olduğundan çoklu direnç (MDR) sahip oldukları değerlendirilmiş olup araştırmacıların sonuçları ile uyumludur. Bu çalışmada test edilen 12 antibiyotik için dirençlilik oranları penisilin, tylosin, oksitetrasiklin ve eritromisin için %100, ampisilin için %90, streptomisin ve amoksisilin/klavulanik asit için %87.5, sefkuinom için %85, doksisklin için %77.5, azithromisin için %1.5 ve gentamisin için %12.5 olarak saptanırken, izolatların tamamı enrofloksasine duyarlı bulunmuştur. Elde edilen bu direnç oranları araştırmacıların bulguları ile genel olarak benzer bulunsa da bazı antibiyotikler için bildirilen direnç oranlarıyla uyumsuzluğun farklı coğrafik alanlardan izole edilen etkenlerin test edilmesi ya da zamana bağlı olarak kazanılmış direnç oranlarının artması ile ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir.

Antibiyotiklerin yaygın kullanımı ve antibiyotik direncinin sürekli artması nedeniyle bakteriyofajlar, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde etkili alternatifler gibi görünmektedir (Pires ve ark. 2015; Litwin ve ark. 2021). Veteriner hekimlikte, evcil hayvanlarda deri enfeksiyonlarıyla savaşmak için bakteriyofaj tedavisine ilişkin çalışmalar sınırlıdır, ancak bakteriyofajların *P. aeruginosa*'nın antibiyotiğe dirençli enfeksiyonunun tedavisinde potansiyele sahip olduğu kanıtlanmıştır (Furusawa ve ark. 2016).

Günümüzde fajlar insan ve veteriner hekimliğinde yeniden kullanım alanına kavuşmakta ve fajlara dayalı yeni ilaçlar geliştirilmektedir. Her ikisi de bakteriyel hastalıklara karşı ana tedavi ajanları olduğundan genellikle antibiyotiklerle karşılaştırılırlar. Verimlilikleri, diğer farmasötiklerle

uyumluluğu, doğal kökenleri ve alerjiye veya bağımlılığa neden olduğunun bilinmemesi gibi çeşitli yönlerden ifade edilmektedir (Sulakvelidze ve ark. 2001).

Bazı klinik çalışmalar, hasta insan (Wright ve ark. 2009) ve köpeklerde (Hawkins ve ark. 2010) enfeksiyöz otitis tedavisinde bakteriyofajların kullanımına yönelik cesaret verici sonuçlar sağlamıştır. Diğer çalışmalar, hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan sistemik enfeksiyonların tedavisinde, özellikle biyofilmlere karşı bakteriyofajların faydalarını bildirmiştir (Ferriol-González ve Domingo-Calap 2020).

P. aeruginosa enfeksiyonlarını kontrol etmek için β -laktamlar (penisilinler, karbapenemler, sefalosporinler, monobaktamlar), aminoglikozitler ve fluorokinolonlar dahil olmak üzere geleneksel olarak kullanılan antibiyotiklere karşı oldukça fazla dirençli suşlar bulunmaktadır. Bu bulgular izole fajın etkinliğini ve faj tedavisinde uygulamaya uygunluğunu desteklemektedir. Geniş konakçı aralığına sahip fajların etkili biyokontrol olarak kabul edildiği ve faj tedavisinde terapötik uygulama için daha çok tercih edildiği iyi bilinmektedir (Fernández ve ark. 2019).

Faj tedavisi, yaygın olarak kullanılan antimikrobiallere yanıt vermeyen hastalar için umut verici bir tedavi seçeneğidir. Belirli salgın suşları hedef alabilen yeni fajların izolasyonu, fajların klinik uygulaması için esastır. *P. aeruginosa*, hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedenidir ve antibiyotiklere karşı güçlü bir doğal direnç gösterir. Bu nedenle faj tedavisi, hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedeni olan ve antibiyotiklere karşı güçlü doğal direnç gösteren kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde geçerli bir alternatiftir (Berube ve ark. 2016).

Bir bakteriyofajın litik spektrumu, potansiyel uygulamalarını belirleyen en önemli biyolojik özelliklerden biri olarak kabul edilmektedir. Bir fajın litik spektrumu, enfekte edebileceği bakteri cinsleri, türleri ve suşlarının aralığı ile tanımlanmaktadır. Bu biyolojik özellik faj biyokontrol uygulamalarında kritik öneme sahiptir çünkü fajın belirli bakteri türlerini hedefleme yeteneğini belirler (Kutter 2009).

Sharma ve ark. (2021) atık suların *P. aeruginosa* için pek çok alanda uygulama potansiyeline sahip litik bakteriyofaj izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ghaffar ve ark. (2023) atık suların *P. aeruginosa*'ya karşı izole ettikleri yüksek litik etkiye sahip bir fajla yaptıkları çalışmada fajın konakta *P. aeruginosa* kolonizasyonunu ve patogenezi azalttığını, bu fajın *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonları sınırlamak için faj kokteyli tedavisi olarak diğer litik fajlarla veya antibiyotiklerle kombine olarak uygulanabileceğini belirtmişlerdir. Elgawish ve ark. (2023) yapmış oldukları çalışmada hastane atık sularından izole ettikleri 3 farklı fajın antibiyotik tedavisine alternatif olabilecek faj tedavisi için potansiyeli olan litik etkiye sahip olduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada litik etki gösteren 3 faj elde edildi 31'i klinik örneklerden (10 apse, 6 otitis externa, 15 mastitisli süt), 6'sı çevresel kaynaktan (gübre) ve 3'ü de atık suların izole edilmiş toplam 40 *P. aeruginosa* izolatı için litik etkileri araştırmacıların bulguları ile uyumlu olarak değerlendirildi. Sahada özellikle lokalize enfeksiyonların tedavisinde *P. aeruginosa* litik fajlarının başarıyla kullanıldığı yönünde pek çok araştırma bulunmaktadır (Hawkins ve ark., 2010; Santos ve ark., 2011; Khairnar ve ark., 2013; Fujiki ve ark., 2020; Grecu ve ark., 2023). Bu çalışmada elde edilen fajların litik etki oranları da klinik kullanım açısından umut verici olmakla beraber, tedavi amacıyla kullanım potansiyellerinin

belirlenmesi için adsorbsiyon süresi, latent süre, çoğalma oranı, adsorbsiyon oranı gibi bakteriyofaj dinamiklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca bu fajların virülens ya da antibiyotik direnç genleri taşıyıp taşımadıklarının saptanması da kullanım potansiyellerini belirleyici olacaktır.

P. aeruginosa'nın zoonotik potansiyeli, bu bakterinin kontrolünde ve insan sağlığını etkileme riskini azaltmada, veteriner sağlık, halk sağlığı ve çevre sağlığı alanları arasında iş birliği yapılmasını gerektiren bir konu olarak değerlendirilmelidir. Tek Sağlık Konsepti yaklaşımı, bu tür karmaşık sorunlara bütünsel ve etkili çözümler geliştirmek adına önemli bir çerçeve sunar.

Sonuç olarak, *P. aeruginosa*'ya karşı litik bakteriyofajlar, özellikle antibiyotik direnci ve enfeksiyon kontrolü gibi zorluklarla başa çıkma potansiyeline sahip, spesifik ve etkili bir tedavi seçeneği sunabilir. Bundan sonraki çalışmalarda, çalışmada elde edilen fajların daha detaylı karakterizasyonlarının yapılması, tedavi amacıyla ya da çevresel dekontaminasyon uygulamaları için ticari ürün haline dönüştürülme potansiyellerinin belirlenmesinin gerektiği kanısına varılmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu araştırma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21283 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu çalışma Omid ESHAGI JOGANLO isimli yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: OK
Denetleme/Danışmanlık: OK
Veri Toplama ve/veya İşleme: OEJ, OK
Analiz ve/veya Yorum: OEJ, OK
Makalenin Yazımı: OEJ, OK
Eleştirel İnceleme: OK

KAYNAKLAR

- Abbas R, Nawaz Z, Siddique AB et al. (2022). Molecular detection of biofilm production among multidrug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from meat samples. *Pak Vet J*, 42 (4), 505-510.
- Abdou MS, Salim AA, El-Dakrouy MF (2021). Virulence of isolated *Pseudomonas aeruginosa* infecting duckling and antibiotic resistance with an experimental treatment trial. *Assiut Vet Med J*, 67 (169), 74-90.
- Arda M, Aydın N, Ilgaz A ve ark. (1997). Özel mikrobiyoloji. 4. Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Aslantaş Ö, Türkyılmaz S, Keskin O, Yücepepe AG, Büyükkaltay K (2022). Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical bovine mastitis cases. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 28 (6), 747-759.
- Berube BJ, Rangel SM, Hauser AR (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: Breaking down barriers. *Curr Genet*, 62 (1), 109-113.
- CLSI (2022): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document: M100-32, Wayne, PA.
- Çufalı D (2011). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal ajanlara direnci. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, Türkiye.
- Deredjian A, Colinon C, Brothier E et al. (2011). Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol*, 162, 689e700.

- Elgawish AM, Alkhouder TK, Abu-Elsaoud AM, El Kazzaz WE (2023).** Isolation and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lytic bacteriophages as a potential therapeutic alternative to traditional antibiotics. *J Adv Vet Res*, 1 (4), 568-576.
- Eliasi UL, Sebola D, Oguttu JW, Qekwana DN (2020).** Antimicrobial resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine clinical cases at a veterinary academic hospital in South Africa. *JSAVA*, 91 (0), a2052.
- Fernández L, Gutiérrez D, García P, Rodríguez A (2019).** The perfect bacteriophage for therapeutic applications a quick guide. *Antibiotics*, 8 (3), 126.
- Ferriol-González C, Domingo-Calap P (2020).** Phages for biofilm removal. *Antibiotics*, 9 (5), 268.
- Fong SA, Drilling A, Morales S et al. (2017).** Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 418.
- Fujiki J, Furusawa T, Munby M (2020).** Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* veterinary isolates to Pbnavirus PB1 like phages. *Microbiol Immunol*, 64 (11), 778-782.
- Furusawa T, Iwano H, Higuchi H et al. (2016).** Bacteriophage can lyse antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine diseases. *J Vet Med Sci*, 78 (6), 1035-1038.
- Ghaffar A, Salman M, Yameen M et al. (2023).** Sustainable biomedical applications of cellulose. Shabbir M (Ed). Regenerated Cellulose and Composites: Morphology-Property Relationship (pp. 347-379). Springer Nature, Singapore.
- Gomes MZR, Machado CR, Conceição MS et al (2011).** Outbreaks, persistence, and high mortality rates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in a hospital with AIDS-Predominant admissions. *Braz J Infect Dis*, 15 (4), 312-322.
- Greco M, Henea ME, Rimbu CM (2023).** The bacteriophages therapy of interdigital pyoderma complicated by cellulitis with antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a dog case report. *Vet Sci*, 10 (11), 642.
- Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber B (2004).** Hastane enfeksiyonu *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığının e-test ve disk difüzyon yöntemleri ile araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 34, 33-36.
- Harada K, Arima S, Niina A, Kataoka Y, Takahashi T (2012).** Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs and cats in Japan: Current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *Microbiol Immunol*, 56 (2), 123-127.
- Harada LK, Silva EC, Campos WF et al. (2018).** Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol Res*, 212-213, 38-58.
- Hawkins C, Harper D, Burch D, Anggård E, Soothill J (2010).** Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: A before/after clinical trial. *Vet Microbiol*, 146 (3-4), 309-313.
- Kerr KG, Snelling AM (2009).** *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and everpresent adversary. *J Hospital Infect*, 73 (4), 338-344.
- Keskin O, Tel OY, Arserim NB (2012).** Bir sığırcılık işletmesinde çoklu antibiyotik dirençli *Pseudomonas aeruginosa* epidemisi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1 (5), 30-33.
- Khairnar K, Raut MP, Chandekar RH, Sanmukh SG, Paunikar WN (2013).** Novel bacteriophage therapy for controlling metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* infection in catfish. *BMC Vet Res*, 9, 264.
- Kutter E (2009).** Phage host range and efficiency of plating. Clokie MRJ, Kropinski AM (Eds). Bacteriophages, methods in molecular biology (pp.141-149). Humana Press, New York.
- Litwin A, Rojek S, Gozdziak W, Duszynska W (2021).** *Pseudomonas aeruginosa* device associated healthcare associated infections and its multidrug resistance at intensive care unit of university hospital: Polish, 8.5-year, prospective, single-centre study. *BMC Infect Dis*, 21 (1), 1-8.
- Öner SZ, Kaleli İ, Demir M ve ark. (2022).** *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik direnci ve yıllar içindeki değişimi. *ANKEM Derg*, 36 (1), 9-15.
- Örüklü N (2011).** Kistik fibrozis hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında hipermutasyonun saptanması ve antibiyotik direnci ile ilişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J (2015).** Phage therapy: a step forward in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Virol*, 89 (15), 7449-7456.
- Santajit S, Indrawattana N (2016).** Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Res Int*, 2016, 2475067.
- Santos AP, Watanabe E, Andrade D (2011).** Biofilm on artificial pacemaker: Fiction or reality? *Arq Bras Cardiol*, 97 (5), e113-20.
- Schauer B, Wald R, Urbantke V, Loncaric I, Baumgartner M (2021).** Tracing mastitis pathogens-epidemiological investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* mastitis outbreak in an Austrian dairy herd. *Animals*, 11 (2), 279.
- Sharma S (2021).** Isolation and characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*, 11, 19393.
- Sievert DM, Ricks P, Edwards JR et al. (2013).** Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 34 (1), 1-14.
- Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ (2004).** PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *JCM*, 42 (5), 2074-2079.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG (2001).** Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 45 (3), 649-659.
- Şahin C (2015).** Sığırların klinik mastitlerinden *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
- UKHSA 2024.** (UK Standards for Microbiology Investigations). Identification of *Pseudomonas* species and other nonglucose fermenters issued by the standards unit, specialised microbiology and laboratories, UK Health Security Agency. 17, 1-26.
- Ünal B (2005).** Değişik kaynaklardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının tespiti ve biofilm oluşumunun araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
- Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR (2009).** A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol*, 34 (4), 349-357.
- Zeyrek S (2019).** Köpeklerde burun boşluğundan *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.