

Komplike Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonu Etkeni Çoklu Dirençli Patojenlerin Standart Bakteriyofaj Kokteyllerine Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması

Susceptibilities of Multidrug-Resistant Pathogens Responsible for Complicated Skin and Soft Tissue Infections to Standard Bacteriophage Cocktails

Aycan GÜNDOĞDU^{1,2}, Hüseyin KILIÇ¹, Ayşegül ULU KILIÇ³, Mzia KUTATELADZE⁴

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

² Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri.

² Erciyes University, Genome and Stem Cell Center, Kayseri, Turkey.

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

³ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Kayseri, Turkey.

⁴ George Eliava Bakteriyofaj, Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, Tiflis.

⁴ George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology, Laboratory of Molecular Biology, Tbilisi, Georgia.

Geliş Tarihi (Received): 12.01.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.04.2016

ÖZ

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (DYDE), selülitte, yüksek mortaliteyle seyreden nekrotizan fasiyite kadar değişebilen farklı klinik tablolar ile karşımıza çıkmaktadır. Özellikle diyabetik ayak, dekübit ve cerrahi alan enfeksiyonu (CAE) gibi komplike DYDE'nin tedavisinde, çoklu ilaç direnci sebebiyle karşılaşılan zorluklar, morbidite ve mortalite oranlarını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, uygun klinik durumlarda, antibiyotik dışı alternatif yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Oldukça eski bir yöntem olmakla birlikte, Gürcistan ve Rusya gibi ülkelerde standart tedavinin bir parçası olarak kullanılan "bakteriyofaj tedavisi", alternatif bir yaklaşım olarak tüm dünyada tekrar gündeme gelmiştir. Bu çalışmanın amacı, komplike DYDE tanısı alan hastalardan izole edilen çok ilaca dirençli (ÇİD) patojenlerin, standart bakteriyofaj (faj) kokteyllerine karşı in vitro duyarlılıklarının araştırılmasıdır. Çalışmada kullanılan altı farklı faj kokteyli [Pyophage, Intestiphage, ENKO, SES, Fersisi ve Staphylococcal Bacteriophage (Sb)], Gürcistan, G. Eliava Enstitüsü'nden kullanıma hazır olarak sağlanmıştır. Hazır faj preparatlarının bulunmaması nedeniyle, *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları için aynı enstitü tarafından temin edilen kütüphane fajları (sırasıyla, Φ1- Φ7 ve ΦKL1- ΦKL3) kullanılmıştır. DYDE olan hastaların apse ve yara yeri örneklerinden etkenlerin izolasyonu ve tanımlanması, konvansiyonel yöntemler ve otomatize VITEK®.2 (bioMérieux, ABD) sistemi ile yapılmıştır. CLSI standartlarına uygun olarak antimikrobiyal duyarlılıkları

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Aycan Gündoğdu, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 38039 Melikgazi, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 437 9315/13600, **E-posta (E-mail):** agundogdu@erciyes.edu.tr

çalışılan etkenler arasında, iki ya da daha fazla farklı antibiyotik grubuna dirençli olanlar ÇİD olarak kabul edilmiştir. Buna göre çalışmaya, dokuzu *E.coli* (8'i GSBL ve 1'i GSBL + karbapenemaz pozitif); dokuzu ÇİD *P.aeruginosa*; dokuzu ÇİD *A.baumannii*; üçü metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve üçü *K.pneumoniae* (1'i GSBL, 1'i karbapenemaz ve 1'i GSBL + karbapenemaz pozitif) olmak üzere toplam 33 izolat alınmıştır. Patojenlerin fajlara karşı duyarlılıkları spot test yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmamızda 33 ÇİD patojenin 29'u (%87.9), kullanılan faj/faj preparatlarından en az birine karşı duyarlı bulunmuştur. Bütün MRSA suşları (3/3) ENKO, SES, Fersisi ve Sb faj kokteyllerine karşı, bütün *A.baumannii* suşları (9/9) ise $\Phi 5$ ve $\Phi 7$ fajlarına karşı duyarlı olarak saptanmış; iki *E.coli*, bir *K.pneumoniae* ve bir *P.aeruginosa* suşunun kullanılan tüm faj preparatlarına karşı dirençli olduğu görülmüştür. Her ne kadar bazı Doğu Avrupa ülkeleri dışında standart tedavi olarak klinikte kullanımı henüz onaylanmamış olsa da, bu çalışma, ÇİD patojenlerin sebep olduğu diyabetik ayak, dekübit ve CAE gibi tedavi seçenekleri oldukça kısıtlı komplike DYDE tedavisinde, bakteriyofaj preparasyonlarının topikal kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır.

Anahtar sözcükler: Komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonu; bakteriyofaj tedavisi; çoklu ilaç direnci.

ABSTRACT

Skin and soft tissue infections (SSTIs) may represent a wide clinical spectrum from cellulitis to high-mortality associated necrotizing fasciitis. Limitations in therapy due to the multiple drug resistance, leads to increase in the morbidity and mortality rates, especially in complicated SSTIs such as diabetic foot, decubitus, and surgical wound infections. Therefore, alternative treatment strategies other than antibiotics are needed in appropriate clinical conditions. "Bacteriophage therapy", which is an old method and has been used as part of standard treatment in some countries such as Georgia and Russia, has again become popular worldwide. The aim of this study was to investigate the in vitro susceptibilities of multidrug-resistant (MDR) pathogens isolated from patients with complicated SSTIs, against standard bacteriophage (phage) cocktails. Six different ready-made phage preparations [Pyophage, Intestiphage, ENKO, SES, Fersisi and Staphylococcal Bacteriophage (Sb)] used in this study have been provided by G. Eliava Institute, Georgia. Because of the absence of ready-made phage preparations for *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*, $\Phi 1$ - $\Phi 7$ and $\Phi KL1$ - $\Phi KL3$ phages were used provided from the same institute's phage library, respectively. Isolation and identification of the pathogens from abscess and wound samples of patients with SSTIs were performed by conventional methods and automatized VITEK®-2 (bioMerieux, ABD) system. Antimicrobial susceptibility testing was conducted complying CLSI standards' and the bacteria that were resistant to at least two different antibiotic groups were considered as MDR. Accordingly, a total of 33 isolates, nine of them were *E.coli* (8 ESBL and 1 ESBL + carbapenemase positive); nine were MDR *P.aeruginosa*; nine were MDR *A.baumannii*; three were methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and three were *K.pneumoniae* (1 ESBL, 1 carbapenemase and 1 ESBL + carbapenemase positive) were included in the study. The phage susceptibilities of the pathogens were performed by using spot test. In the study, 29 (87.9%) out of 33 MDR pathogens were found to be susceptible to at least one of the tested phage/phage preparations. All MRSA (3/3) strains were susceptible to ENKO, SES, Fersisi and Sb phage cocktails, while all *A.baumannii* isolates (9/9) were susceptible to $\Phi 5$ and $\Phi 7$ phages. However, two *E.coli*, one *K.pneumoniae* and one *P.aeruginosa* strains were resistant to the all phage preparations tested. Although the clinical use of phages has not been approved yet, except a few Eastern European countries, this study exhibits the potential use of the topical bacteriophage therapy in the treatment of complicated SSTIs caused by MDR pathogens with limited treatment options, such as diabetic foot, decubitus, and surgical wound infections.

Keywords: Complicated skin and soft tissue infection; bacteriophage therapy; multidrug resistance.

GİRİŞ

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (DYDE), klinikte ikinci sıklıkta karşılaşılan bakteriyel enfeksiyonlar olarak en fazla antibiyotik tedavisi gerektiren endikasyonlar arasında yer

almaktadır¹. Selülit, yüksek mortaliteyle seyreden nekrotizan fasiyite kadar değişebilen DYDE'lerin klinik spektrumları oldukça geniştir. Diyabetik ayak, dekübit ve cerrahi alan enfeksiyonu (CAE) olan olgular, DYDE'ler arasında en sık karşılaşılan komplike tablolar olarak sayılmaktadır. Komplike DYDE olgularında, patobiyom elemanı olarak genellikle çok ilaca dirençli (ÇİD) etken(ler) izole edilmekte ve bu durum tedavide antibiyotik seçeneklerini kısıtlamaktadır².

Eski bir yöntem olan ve antibiyotik direnç artışına paralel olarak günümüzde tekrar ilgiyi üzerine çeken "bakteriofaj (faj) tedavisi", özellikle dirençli patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar ile mücadelede alternatif ve tamamlayıcı bir seçenek olarak gündeme gelmiştir³. ÇİD patojenlere bağlı gelişen enfeksiyonların tüm dünyada giderek büyüyen bir sorun haline gelmesi, dünya genelinde faj tedavisi üzerinde yapılan çalışmalara hız kazandırmıştır. Fajlar, bakterileri eritme (lisis) özelliğinde olan, yüksek konak özgüllüğü gösteren ve antibakteriyel aktiviteleri antibiyotik hedeflerinden bağımsız olan viruslardır. Fajların bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılması 1920'lere kadar uzanmaktadır⁴. Ancak, antibiyotiklerin kullanıma girmesiyle birlikte, bazı Doğu Avrupa ülkeleri hariç, fajların bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılması terk edilmiştir⁵. Buna karşın, ÇİD patojenlerin dünya genelinde giderek artan oranda raporlanması ve bu durumun antibiyotik öncesi çağa dönüleceğinin sinyallerini vermesi, bugün faj tedavisinin, ülkemiz de dahil olmak üzere hemen tüm dünyada tekrar gündeme gelmesine sebep olmuştur^{6,7}.

Bu çalışmada, üniversitemiz hastanelerinde yatan hastaların komplike DYDE'lerinden izole edilen ÇİD patojenlerin, standart tedavinin bir parçası olarak Gürcistan'da kullanılan faj kokteyllerine karşı in vitro duyarlılıklarının ortaya konulması ve bundan sonraki ilişkili çalışmalar için basamak oluşturulması amaçlanmıştır. Söz konusu çalışmanın, kendi faj kütüphanemizi ve faj preparatlarımızı oluşturma ve uygulama aşamalarına hazırlık olması bakımından, hali hazırda var olan ve uzun tecrübeler sonucu üretilmiş olan faj kokteyllerinin denendiği bir ön çalışma olarak hizmet etmesi beklenmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Kasım 2014-Haziran 2015 tarihleri arasında üniversitemiz hastanelerinde yatan hastalardan diyabetik ayak, dekübit veya CAE etkeni olarak izole edilen ÇİD patojenler dahil edildi. Hastaların yara yeri/apse örnekleri %5 koyun kanlı agar ve EMB agara ekilerek 24-48 saat sonra değerlendirildi. Gram boyamanın ardından gram-pozitif kok morfolojisindeki kolonilerin tanımlanması için katalaz testi; katalaz pozitif koloniler için koagülaz, DNaz ve trehaloz-mannitol (T-M) hidrolizi testleri uygulandı. Koagülaz (+), DNaz (+), T-M (+) olanlar *S.aureus* olarak kabul edildi. Bu suşlarda metisilin direnci önce sefoksitin tarama testi ile belirlendi ve ardından sefoksitine dirençli suşlarda oksasilin E-test ile metisilin direnci doğrulandı. Vankomisin duyarlılığı için de E-test yöntemi kullanıldı. Gram-negatif basillerin tanımlanması, EMB agarda laktoz (+) olarak izlenen kolonilerin konvansiyonel biyokimyasal test sonuçlarına (oksidaz, hareket, üç şekerli demirli besiyerinde üreme özelliği, H₂S, sitrat, indol, lizin deaminasyonu, ornitin deaminasyonu) göre yapıldı. Laktoz (-) olanların tanımlanmasında ise otomatize VITEK®-2 (bioMerieux, ABD) sistemi kullanıldı.

Konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan suşların antimikrobiyal duyarlılık testleri, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)⁸ kriterlerine göre disk difüzyon yöntemiyle; Vitek-2 sistemiyle tiplendirilen suşların duyarlılık testleri ise Vitek AST kartları kullanılarak yapıldı. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi çift disk sinerji testi ile araştırıldı; karbapenem direnci için MİK ile doğrulama yapıldı. CLSI standartlarına uygun olarak gerçekleştirilen antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına göre, iki ya da daha fazla farklı sınıf antibiyotiğe dirençli olan patojenler ÇİD olarak kabul edildi⁸. Saf olarak izole edilen ve tanımlanan her bir ÇİD suş mikrobank saklama tüplerinde -20°C'de saklandı. Buna göre yukarıda belirtilen 8 aylık sürede DYDE etkeni olarak izole edilen 33 ÇİD patojenin 9'u *E.coli*, 9'u *P.aeruginosa*, 3'ü *S.aureus*, 9'u *A.baumannii* ve 3'ü *K.pneumoniae* olarak tanımlandı.

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, gram-negatif bakteriler için Leuria Bertani (LB) agar ve LB sıvı besiyeri, gram-pozitifler için beyin-kalp infüzyon (BHI) agar ve BHI sıvı besiyeri kullanıldı. Suşların canlandırma işlemleri için, her bir mikrobank tüpünden birer boncuk alınarak içinde türe uygun 1 ml'lik sıvı besiyeri bulunan steril ependorf tüplerinin içine atıldı. 37°C'de inkübe edilen ependorflardan, 24 saat sonra %5 koyun kanlı agar besiyerlerine tek koloni ekimi yapıldı ve plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Koyun kanlı agardan alınan tek koloniler türe uygun agar plağına yine tek koloni düşecek şekilde ekildi ve plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Her bir plaktan morfolojisi düzgün tek koloni seçilerek steril 15 ml'lik falkon tüpleri içerisinde bulunan 5 ml sıvı besiyerine ekim yapıldı ve bakteriler logaritmik faza ulaşıncaya kadar 37°C'de 2-4 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bakteri konsantrasyonları ölçüldü ve McFarland standartlarına göre 1×10^7 - 10^8 hücre/ml olarak ayarlandı. Daha sonra Adams⁹ tarafından tanımlandığı gibi spot test yöntemiyle -bazı modifikasyonlar eşliğinde- in vitro bakteriyofaj duyarlılık çalışması yapıldı.

İn vitro bakteriyofaj duyarlılık çalışması için LB ve BSI agardan %0.5'lik yarı katı agarlar hazırlandı. Daha sonra steril 15 ml'lik falkon tüpüne 5 ml yarı katı agar döküldü ve konsantrasyonu 1×10^7 - 10^8 hücre/ml'ye ayarlanmış kültürlerden 100 µl ilave edildi. Yarı katı agar + kültür karışımı, türe uygun agar plaklarına döküldü; plaklar soğuduktan sonra mikropipetle titresi 1×10^5 faj partikülü/ml olan herbir faj kokteylinden 10'ar µl damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Spot test sonuçlarına göre; birleşik (confluent), yarı birleşik, opak lizis ya da birden fazla tekli faj plağının varlığı duyarlılık; görünür bir lizisin olmaması ise direnç olarak kabul edildi.

Çalışmada kullanılan ticari standart bakteriyofaj preparatlarının herbirinin içeriği farklı olup (Tablo I) üretici (George Eliava Enstitüsü) tarafından kullanıma hazır olarak sağlandı ve yalnız likit formdaki faj preparatları kullanıldı¹⁰. *K.pneumoniae* ve *A.baumannii* için hazır bakteriyofaj preparatlarının bulunmaması sebebiyle, Gürcistan G. Eliava Bakteriyofaj, Mikrobiyoloji ve Viroloji Enstitüsü tarafından sağlanan ve Eliava Enstitüsü faj kütüphanesinden seçilen *K.pneumoniae* için 3, *A.baumannii* için 7 farklı faj ile duyarlılık çalışması yapıldı.

Tablo I. Çalışmada kullanılan standart bakteriyofaj preparatları ve içerikleri

Faj preparatı	İçerik
Pyophage	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>E.coli</i> 'nin farklı serotipleri, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> ve <i>Proteus mirabilis</i> için farklı fajlar
İntestiphage	<i>Shigella flexneri</i> 1, 2, 3, 4, <i>Shigella newcastle</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella Paratyphi</i> A ve B, <i>S.typhimurium</i> , <i>S.enteritidis</i> , <i>S.choleraesuis</i> , <i>S.oraneiburg</i> , <i>E.coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>P.mirabilis</i> , <i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> ve <i>Enterococcus faecalis</i> 'e özgü fajlar
ENKO	En yaygın <i>Salmonella</i> spp. serovarları, <i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella sonnei</i> , enteropatojenik <i>E.coli</i> serovarları ve patojenik stafilokoklar için fajlar
SES	<i>S.aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>E.coli</i> 'nin farklı serovarları (011, 055, 026, 0125, 0119, 018, 044, 025 ve 020), <i>S.pyogenes</i> , <i>S.sanguis</i> , <i>S.salivarius</i> ve <i>S.agalactiae</i> 'ye özgü fajlar
Fersisi	Farklı stafilokok (<i>S.aureus</i> ve <i>S.epidermidis</i>) ve streptokok (<i>S.pyogenes</i> , <i>S.sanguis</i> , <i>S.salivarius</i> ve <i>S.agalactiae</i>) türlerine özgü fajlar
Staphylococcal bacteriophage (Sb)	Farklı <i>S.aureus</i> suşlarına karşı fajlar

BULGULAR

Çalışmaya alınan 33 ÇİD patojenin 29'u (%87.9) uygulanan faj/faj kokteyllerine karşı duyarlı bulunmuştur. Patojenlerin antimikrobiyal direnç durumları ve faj duyarlılık sonuçları Tablo II, III ve IV'de gösterilmiştir. Buna göre; 3 metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşu, test edilen 6 farklı faj kokteyllinin en az üçüne karşı duyarlı bulunurken, GSBL üreten 2 *E.coli* suşu ile bir *P.aeruginosa* suşu standart faj kokteyllerine karşı dirençli bulunmuştur. ENKO ve SES faj preparatları diğerlerine göre daha fazla sayıda *E.coli* suşu üzerinde etki göstermiştir (ENKO 7/9, SES 7/9, Phyophage 3/9 ve Intestiphage 2/9). Intestiphage preparatı, bir suş dışındaki bütün *P.aeruginosa* izolatları üzerinde etkili olmuştur. ENKO, Fersisi ve Sb faj kokteylleri, çalışmaya dahil edilen 3 MRSA suşunu da lizise uğratmıştır (Tablo II). Kütüphane fajları $\Phi 5$ ve $\Phi 7$, çalışmaya dahil edilen *A.baumannii* suşlarının hepsine karşı etkili olmuştur (Tablo III). Çalışmaya dahil edilen 3 *K.pneumoniae* suşundan biri denenen üç adet kütüphane fajına da direnç göstermiştir (Tablo IV).

TARTIŞMA

Diyabetik ayak, dekübit ve CAE gibi komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (kDYDE) oldukça sık karşılaşılan ciddi enfeksiyonlar arasında yer almaktadırlar. Diyabetik ayak nedeniyle gerçekleşen amputasyonların %60'ının ÇİD patojenler sebebiyle olduğu rapor edilmiştir¹¹. Buna ek olarak özellikle dirençli patobiyom profiline sahip dekübit ve CAE, mortalite riskini artıran, hastanede kalış süresini uzatan ve tedavi gideri yüksek komplike enfeksiyonlardandır. Bu sebeplerle kDYDE olguları başta olmak üzere ÇİD patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde -uygun klinik durumlarda- antibiyotik dışı alternatif tedavilerin kullanılması gündeme gelmiştir¹². Yaklaşık 100 yıllık geçmişine bakıldığında "faj tedavisi", bu alternatifler içerisinde en umut verici olanlardan biri olarak kabul edilebilir⁴.

Tablo II. Çok ilaca dirençli *E.coli*, *P.aeruginosa* ve *MRSA* suşlarının bakteriyofaj kokteyllerine karşı duyarlılık durumları

		Standart bakteriyofaj kokteylleri						
		Antibiyotik direnç profilleri						
Suş no		Pyophage	Intesti-phage	ENKO	SES	Fersisi	Sb	
<i>E.coli</i>	1	GSBL/AMC/TZP	H	D	H	H	-	
	3	GSBL/AMC/SXT*	D	D	D	D	-	
	4	GSBL-Karbenemaz/AMC/FEP	H	D	H	H	-	
	10	GSBL/AMC/ TZP/FEP/AK/CIP	D	D	H	H	-	
	17	GSBL/AMC/FEP/CIP*	D	D	H	H	-	
	18	GSBL/FEP	H	H	H	H	-	
	19	GSBL/AMC*/FEP/CIP	D	H	H	H	-	
	23	GSBL/TZP/SXT/FEP/CIP/SAM/GN/LEV	D	D	D	D	-	
	26	GSBL/AMC*/TZP*/FEP/CIP	D	D	H	H	-	
	6	CIP/MER/ SCF	H	H	-	-	-	
<i>P.aeruginosa</i>	7	TZP/FEP/MER/SCF/IPM/CAZ	H	H	-	-	-	
	8	SCF/CAZ/MER/TZP	H	H	-	-	-	
	11	TZP/CIP/SCF/MER*/CAZ	D	H	-	-	-	
	12	TZP/FEP*/SCF/MER*/CAZ	D	H	-	-	-	
	15	AMC/TZP/CIP/CAZ	H	H	-	-	-	
	24a	FEP/CIP/LEV/MER/SCF/ PM/CAZ	D	H	-	-	-	
	24b	FEP/CIP/LEV/MER/SCF/IPM/CAZ	D	D	-	-	-	
	2	SAM/GN/CFZ/CLI/ERY/MET/RIF	D	H	H	H	H	
	9	SAM/GN/CLI/ERY/MET	D	D	H	H	H	
	17	SAM/CFZ/MET	D	D	H	H	H	

AK: Amikasin; AMC: Amoksisilin-klavulanat; CAZ: Seftazidim; CFZ: Sefazolin; CIP: Siprofloksasin; CLI: Klindamisin; ERY: Eritromisin; FEP: Sefepim; GN: Gentamisin; GSBL- Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; IPM: İmipenem; LEV: Levofloksasin; MER: Meropenem; MET: Metisilin; RIF: Rifampisin; SAM: Ampisilin-sulbaktam; SCF: Sefoperazon-sulbaktam; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; TZP: Piperasilin-tazobaktam; D: Dirençli; H: Hassas; * Orta duyarlı.

Tablo III. Çok ilaca dirençli *A.baumannii* suşlarının *G. Eliava Enstitüsü* kütüphaneye fajlarına karşı duyarlılık durumları

Suş no.	Antibiyotik direnç profilleri	Fajlar						
		Φ1	Φ2	Φ3	Φ4	Φ5	Φ6	Φ7
13	FEP/SCF/CAZ/CIP/AK/SXT/GN/IPM/LEV/MER/TGC*	D	D	D	D	H	D	H
14	SCF/CAZ/CIP/AK/GEN*/IPM/LEV/MER/TGC*	D	D	D	D	H	D	H
16	FEP/SCF/CAZ/CIP/AK/ SXT/GEN/ IPM /LEV/MER/TGC*	D	H	D	H	H	D	H
21	FEP/SCF/CAZ/CIP/AK/SXT/GN/IPM/LEV/MER	D	H	D	H	H	D	H
22	FEP/SCF/CAZ/CIP/AK/SXT/GN/ IPM /LEV/MER	D	H	D	D	H	D	H
25	FEP/SCF/CAZ/CIP/AK/SXT/GEN/IPM /LEV/MER/TGC*	H	H	D	D	H	D	H
27	FEP/SCF/CAZ/CIP/AK/SXT/GEN/IPM /LEV/MER/TGC*	D	D	H	D	H	D	H
29	FEP/SCF/CAZ/CIP/AK/SXT/GEN/IPM /LEV/MER/TGC	D	D	H	D	H	D	H
32	SCF/CAZ/CIP/AK/SXT/GEN/IPM/LEV/MER	H	H	D	D	H	D	H

AK: Amikasin; CAZ: Sefotazidim; CIP: Siprofloksasin; FEP: Sefepim; GN: Gentamisin; IPM: İmipenem; LEV: Levofloksasin; MER: Meropenem; SCF: Sefoperazon-sulbaktam; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; TGC: Tigesiklin; D: Dirençli; H: Hassas; * Orta duyarlı.

Tablo IV. Çok ilaca dirençli *A.baumannii* suşlarının *G. Eliava Enstitüsü* kütüphaneye fajlarına karşı duyarlılık durumları

Suş no.	Antibiyotik direnç profilleri	Fajlar		
		ΦKL1	ΦKL2	ΦKL3
5	Karbapenemaz/AMC/FEP/CIP/TZP/TGC *	H	D	D
28	GSBL/AK*/SAM/FEP/SCF/CRO/GN/LEV/TZP/CIP	H	D	H
40	GSBL/Karbapenemaz/FEP/GN/LEV/TZP/CIP/TGC	D	D	D

AK: Amikasin; AMC: Amoksisilin-klavulanat; CIP: Siprofloksasin; CRO: Seftriakson; FEP: Sefepim; GN: Gentamisin; GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; LEV: Levofloksasin; SAM: Ampisilin-sulbaktam; SCF: Sefoperazon-sulbaktam; TGC: Tigesiklin; TZP: Piperasilin-tazobaktam; D: Dirençli; H: Hassas; * Orta duyarlı.

1920'lerden bu yana eski Sovyetler Birliği ülkelerinde kullanılan faj tedavisi, bugün antibiyotik çağı krizi sebebiyle Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD) başta olmak üzere tüm dünyada tekrar gündeme gelmiştir¹³. Günümüzde Gürcistan ve Rusya gibi Doğu Avrupa ülkelerinde tablet, krem ve likit preparatlar şeklinde faj tedavisi klinikte başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, standart tedavinin bir parçası olarak, uzun yıllardır Gürcistan'da kullanılan likit faj preparatları ile Eliava Enstitüsü kütüphaneye fajlarının, üniversitemiz hastanelerinde yatan hastalardan izole edilmiş ÇİD patojenlere karşı in vitro aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışma sonucuna göre, patojenlerin %87.9 (29/33)'unun denenen faj/faj preparatlarına karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir. Fitzgerald-Hughes ve arkadaşları¹⁴ tarafından İrlanda'da yapılan benzer bir çalışmada, GSBL üreten 100 *E.coli* suşunun 89'u aynı faj kokteyllerine karşı duyarlı bulunmuştur. Özellikle kDYDE gibi tedavide zorluklar yaşanan enfeksiyonlar açısından bu oranlar oldukça umut vericidir. Çalışmamızda yer alan ÇİD patojenlerin izole edildiği hasta profili, diyabetik ayak gibi uzun süreli kronik enfeksiyonu olanlar ile dekübit ve CAE gibi hassas hastaları içermektedir. Söz konusu klinik tabloların ilerlemesi ya da tedavi edilemeyen olgulara

dönüşmesi, ampütasyon ya da mortalite ile sonuçlanma ihtimalini de beraberinde getirmektedir. Bu sebeple, antibiyotik tedavisinin yetersiz kaldığı ya da tedavide zorluklar yaşanan kDYDE olgularında, alternatif ya da tamamlayıcı olarak, aktivitesi in vitro test edilmiş faj preparatlarının topikal kullanımının uygun olabileceği düşünülmelidir. Her ne kadar Gürcistan, Rusya ve Polonya gibi ülkeler hariç standart tedavi olarak fajın klinikte kullanımına henüz onay verilmemiş olsa da, Avrupa ve ABD’de çeşitli araştırma merkezlerinde faj tedavisi çalışmaları klinik boyuta ulaşmıştır¹⁵⁻¹⁷. Örneğin, Avrupa Birliği Horizon-PF7 programı kapsamında 2013 yılında başlayan, Belçika, Fransa ve İsviçre’nin ortaklaşa gerçekleştirdiği ve yanık enfeksiyonlarının fajlarla tedavisini amaçlayan proje 4.3 milyon Euro bütçeli olup 2015 Temmuz ayında ilk hasta uygulamasını gerçekleştirmiştir (<http://www.phagoburn.eu>).

Çalışmamızda yer alan ÇİD patojenlerden dördü test edilen faj/faj kokteyllerine karşı dirençli bulunmuştur. Bu suşların faj kokteyllerine karşı direnç göstermesi, fajların konak özgüllüğünün oldukça yüksek olması ile izah edilebilir. Fakat bakterinin yaşadığı habitatta fajı ile birlikte var olduğu görüşü, özellikle bakteriyofaj üzerine çalışmalarına devam eden bilim insanları arasında yaygın bir çalışma disiplini olarak kullanılmaktadır. Antimikrobiyal direnç oranları ülkemize nazaran düşük olan Gürcistan’da, çalışmamızda yer alan patojenler ile daha önce karşılaşmamış olması ve dolayısıyla düzenli olarak güncellenen faj kokteyllerinde ilgili fajın yer almaması oldukça yüksek bir ihtimaldir. Gürcistan’da standart faj tedavisi işleyişi olarak; hastalardan izole edilen patojenlere karşı mevcut kokteyllerin duyarlılıkları denenmekte ve bu hazır preparatlara karşı dirençli bakteriler ile karşılaşılması durumunda “kişiyeye özel” olarak yeni fajlar izole edilmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda yer alan iki *E.coli* ve bir *P.aeruginosa* suşuna karşı Gürcistan’da kullanılan standart faj kokteyllerinin etkisiz olması, yukarıda da değinildiği gibi, faj kokteyllerini hazırlayan merkezin söz konusu suşlar ile ya hiç ya da çok sık karşılaşmadığı ve dolayısıyla bu patojenlere özgü litik fajların ya henüz izole edilmemiş olması ya da faj kokteyllerine dahil edilmemiş olması ile açıklanabilir. Bunun yanında, tedavide kullanılacak fajın, patojenin yaygın olduğu coğrafyada aranması, uygun fajlara ulaşmak açısından kolaylık sağlayıcı olabilir. Çalışmamızda yer alan GSBL + karbapenemaz üreten bir *K.pneumoniae* suşuna karşı üç kütüphane fajı da etkisiz kalmıştır. Bu durum, bir önceki durumla izah edilebileceği gibi, kütüphanede yer alan diğer *K.pneumoniae* fajlarının çalışmaya dahil edilmemiş olması ile de açıklanabilir.

Sonuç olarak, ÇİD patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar, dünya genelinde tedavide zorluklara sebep olmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için, unutulmuş bir yöntem olarak faj tedavisi, Doğu Avrupa ülkeleri dışında dünyanın geri kalanının ilgisini tekrar üzerine toplamıştır. Dolayısıyla, özellikle Amerika ve Avrupa’da in vitro faj duyarlılık çalışmalarının yanında in vivo klinik faj uygulamaları üzerine yapılan çalışmalar da hız kazanmıştır. Bu çalışma ile Gürcistan’da enfeksiyonların tedavisinde kullanılan litik formdaki bakteriyofaj kokteyllerinin, ÇİD bakterilere karşı in vitro aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. Hazır kokteylleri bulunmayan *K.pneumoniae* ve *A.baumannii* suşları için, Eliava Enstitüsü’nde kişiyeye özel faj tedavisi amacıyla izole edilmiş ve saklanmış kütüphane fajları ise oldukça yüksek oranda etkili olmuştur. Bu sonuçlara dayanarak,

ÇİD patojenlere karşı uygun fajların izolasyonu ve in vitro duyarlılıklarının doğrulanması, ülkemizde başlanabilecek klinik çalışmalar için ilk basamak olarak üzerinde önemle durulması gereken bir noktadır. Özellikle ÇİD patojenlerin sebep olduğu kDYDE gibi tedavi seçenekleri kısıtlı ve kişisel tedavi gerektiren enfeksiyonlar ile mücadelede topikal kullanımı kolay ve etkili olabilen fajlar göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. White B, Seaton RA. Complicated skin and soft tissue infections: literature review of evidence for and experience with daptomycin. *Infect Drug Resist* 2011; 4: 115-27.
2. Dryden M. Complicated skin and soft tissue infection. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65 Suppl 3: iii35-44.
3. Reardon S. Phage therapy gets revitalized. *Nature* 2014; 510(7503): 15-6.
4. Abedeon ST, Kuhl, SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011; 1(2): 66-85.
5. Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14(5): 524-31.
6. Şahin F, Karasartova D, Özsan TM, Gerçekler D, Kıyan M. Klinik MRSA izolatlarından elde edilen yeni bir litik bakteriyofajın tanımlanması ve antibakteriyel etkisinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 27-34.
7. Yılmaz C, Colak M, Yılmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am* 2013; 95(2): 117-25.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI Document M100-S24, 2014. CLSI, Wayne, PA.
9. Adams MH. Bacteriophages. 1959, Interscience Publishers, New York.
10. Kutateladze M. Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virologia Sin* 2015; 30(1): 80-1.
11. Kanatlı U. Diyabetik ayak enfeksiyonları. *TOTBİD Dergisi* 2011; 10(4): 296-305.
12. Carson CF, Riley TV. Non-antibiotic therapies for infectious diseases. *Commun Dis Intell Q Rep* 2003; 27 Suppl:S143-6.
13. Matsuzaki S, Rashed M, Uchiyama J, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* 2005; 11(5): 211-9.
14. Fitzgerald-Hughes D, Bolkvadze D, Balarjishvili N, et al. Susceptibility of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* to commercially available and laboratory-isolated bacteriophages. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(4): 1148-50.
15. Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One* 2009; 4(3): e4944.
16. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care* 2009; 18(6): 237-8, 240-3.
17. Wright A, Hawkins CH, Anggard EE, Harper DR. 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* 2009; 34(4): 349-57.