

# Klinik MRSA İzolatlarından Elde Edilen Yeni Bir Litik Bakteriyofajın Tanımlanması ve Antibakteriyel Etkisinin Değerlendirilmesi

## Identification of a Novel Lytic Bacteriophage Obtained from Clinical MRSA Isolates and Evaluation of Its Antibacterial Activity

Fikret ŞAHİN, Djursun KARASARTOVA, T. Murat ÖZSAN, Devran GERÇEKER, Mehmet KIYAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.  
Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 24.05.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 13.08.2012

### ÖZET

Dünya Sağlık Örgütü, antibiyotiklerin, özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları olmak üzere, çok ilaca dirençli enfeksiyon etkenleri üzerindeki etkinliklerinin giderek azaldığını bildirmektedir. Son yıllarda, yeni antibiyotik geliştirme çalışmalarının yetersizliği nedeniyle, patojen bakterilere özgül bakteriyofajların (faj) kullanılabileceği alternatif tedavi yöntemleri gündeme gelmiş; faj tedavisi *S.aureus* enfeksiyonları açısından da önem kazanmıştır. Bu çalışmada, 20 klinik MRSA izolatından elde edilen 13 lizojenik fajın, farklı MRSA suşlarını enfekte edebilme özelliklerinin araştırılması sırasında tanımlanan yeni bir litik fajın, antibakteriyel ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.  $\phi$  LizAnk olarak adlandırdığımız bu fajın, farklı MRSA izolatları üzerindeki antibakteriyel etkisi, BHI (Brain Heart Infusion) ve LB (Leuria Bertani) sıvı besiyerlerinde in vitro koşullarda belirlenmiş; ayrıca fajın MRSA'lara in vivo antibakteriyel etkisi ve memeli hücrelerine muhtemel sitotoksik etkisi fibroblast hücre kültürleri (3T3) kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada, hastanede yatan hastalardan izole edilen 20 MRSA suşu kullanılmış; izolatlar konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış; metisilin direnci ise oksasiline disk difüzyon testi ve PCR ile *mecA* geni saptanarak belirlenmiştir. MRSA'lerden faj indüksiyonu ve izolasyonu, Kaneko ve arkadaşları [Biosci Biotechnol Biochem 1997; 61(11): 1960-2] tarafından tanımlanan yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız in vitro deneylerde,  $\phi$  LizAnk fajının,  $10^7$  cfu/ml miktarındaki altı farklı MRSA izolatını sekiz saat içerisinde tamamen ortadan kaldırdığı saptanmış; bu güçlü litik etkisinin her iki sıvı besiyerinde de aynı olduğu belirlenmiştir. In vivo çalışmalarda ise, mikropoplaklarda hazırlanan hücre kültürlerini içeren kuyucuklara; sadece faj, faj + MRSA karışımı ve sadece MRSA eklendikten sonra, 2 ve 24. saatte hem mikroskopik hem de canlı hücreleri kolorimetrik olarak saptayabilen MTT yön-

**İletişim (Correspondence):** Doç. Dr. Fikret Şahin, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbn-i Sina Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06100 Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 595 8277, **E-posta (E-mail):** fsahin29@hotmail.com

temi ile değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızda,  $\phi$  LizAnk fajının fibroblast hücre kültürü üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı görülmüş; aynı zamanda MRSA üzerindeki antibakteriyel etkinin hücre kültürü ortamında da devam ettiği izlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada belirlediğimiz ve  $\phi$  LizAnk olarak adlandırdığımız fajın, fibroblast hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmaması ve güçlü antibakteriyel etkileri nedeniyle, özellikle MRSA'lar tarafından oluşturulan yüzeysel deri enfeksiyonlarının tedavisinde, tek başına veya faj kokteyli içerisinde sorunsuz olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Metisiline dirençli Staphylococcus aureus; bakteriyofaj; litik faj; faj tedavisi.*

## ABSTRACT

Multidrug-resistant bacteria particularly MRSA is well known as a worldwide problem. Since the rate of development of novel antimicrobial agents has been slowed down during the last years, there have been a need for the exploration of alternative solutions for the treatment of resistant bacterial infections. Treatment of infections by bacteriophages (phages) that specifically kill the infecting pathogen, i.e. by the process known as phage therapy, is considered as a possible approach to treat multidrug resistant bacteria. Phage treatment has also been considered to treat *Staphylococcus aureus* infections. This study was aimed to evaluate the antibacterial and cytotoxic activities of a new lytic phage obtained from clinical MRSA strains. This lytic phage named as  $\phi$  LizAnk was obtained during the phage infectivity studies performed with 13 lysogenic phages against MRSA strains. The antibacterial activity of the  $\phi$  LizAnk phage was determined in vitro in BHI (Brain Heart Infusion) and LB (Leuria Bertani) broths and the in vivo antibacterial activity against MRSA strains and possible cytotoxic effect against mammalian cells were tested on fibroblastic cell cultures (3T3). This study was conducted using 20 MRSA strains isolated from hospitalized patients. Identification of the isolates was performed by conventional methods and methicillin resistance was detected with oxacillin disk diffusion test and *mecA* gene detection by PCR. The method described by Kaneko et al. [*Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61(11): 1960-2] was used with some modifications, for induction and isolation of the phages. In vitro studies indicated that this phage killed the six different MRSA strains (in  $10^7$  cfu/ml concentrations) in 8 hours, and this powerful lytic effect was similar in both of the liquid media. In vivo studies were performed by using cell cultures prepared in microplates, and the wells have been inoculated with only phage, phage + MRSA mixture, and only MRSA. The cells were then evaluated microscopically as well as by MTT assay which detected alive cells colorimetrically, at 2<sup>nd</sup> and 24<sup>th</sup> hours. In our study, the  $\phi$  LizAnk phage did not cause any toxic effect on fibroblast cell cultures, in addition it was observed that the antibacterial effect of the phage against MRSA has proceeded in the cell culture. In conclusion, since the  $\phi$ LizAnk phage described in this study exhibited strong antibacterial activity against MRSA strains and no cytotoxic effect was detected against mammalian cells, it might be safely used alone or in a phage cocktail to treat skin infection caused by MRSA.

**Key words:** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus; bacteriophage; lytic phage; phage therapy.*

## GİRİŞ

Çoklu ilaç direncine sahip bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar günümüzde önemli sağlık sorunlarına yol açmaktadır<sup>1</sup>. Son yıllarda yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmaların olumsuz sonuçları, yeni alternatif tedavi yöntemlerine yönelmeye sebep olmuş; enfeksiyon etkenlerinin özgül bakteriyofajlar ile ortadan kaldırılması işlemi ("faj tedavisi") günümüzde yeniden önem kazanmıştır<sup>2-4</sup>.

Fırsatçı bir patojen olan *Staphylococcus aureus*, basit apsedan, pnömoni, mastit, menenjit, endokardit ve sepsise kadar değişen spektrumda çok farklı hastalıklara neden ol-

maktadır. Özellikle etkenin metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) olması halinde, tedavi ile tamamen ortadan kalkmadığı ve enfeksiyonun kronikleşme insidansının arttığı bilinmektedir<sup>1</sup>. Bu nedenle faj tedavisi, başta MRSA olmak üzere *S.aureus* enfeksiyonları için de alternatif tedavi olarak gündeme gelmiştir<sup>5</sup>. *Myoviridae* ailesine ait stafilocokkal bakteriyofajların stafilokok tedavisinde önemli olacağı düşünülmektedir<sup>6</sup>. Bu tedavide fajın sadece enfekte ettiği bakteriye olan özgüllüğünün, tedavide yan etki açısından çok önemli bir avantaj olarak görülmesine karşın, konak seçiciliğinin sınırlı olması dezavantajdır<sup>7</sup>. Dolayısıyla konak spektrumu geniş olan fajların bulunması önem taşımaktadır. Bu çalışmada, MRSA izolatlarından elde edilen lizojenik bakteriyofajların farklı MRSA suşlarını enfekte edebilme özelliklerinin araştırılması sırasında tanımlanan ve “ $\phi$  LizAnk” olarak adlandırılan yeni bir litik fajın antibakteriyel ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, farklı kliniklerde yatarak tedavi görmekte olan hastalardan izole edilen 20 MRSA suşu kullanıldı. İzolatlar, Gram boyama, katalaz, plazma koagülaz ve DNaz testleri ile tanımlandı. *S.aureus* suşlarının metisilin direnci, oksasilin disk difüzyon testi ve *mecA* geninin PCR ile saptanması sonucu belirlendi<sup>8</sup>. Mikrobank saklama tüplerinde -20°C’de saklanan her bir suş için birer boncuk alınarak, içinde 3 ml beyin-kalp infüzyon buyyonu [Brain Heart Infusion Broth (BHIB); Difco Laboratories, ABD] bulunan tüplerin içine atıldı. 37°C’de inkübe edilen tüplerden, 24 saat sonra %5 koyun kanlı agar besiyerlerine, tek koloni düşecek şekilde ekimler yapıldı ve plaklar 37°C’de 24 saat inkübe edildi.

### Bakteriyofaj İzolasyonu

Bu amaçla Kaneko ve arkadaşları<sup>9</sup> tarafından tanımlanan yöntem bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. %5 koyun kanlı agar besiyerinde üreyen bakterilerden tek koloni alındı, cam balon içindeki 50 ml BHIB besiyerine ekildi ve bakteriler logaritmik faza ulaşıncaya kadar 37°C’de 2-3 saat çalkalayıcı inkübatörde bırakıldı. Daha sonra besiyerlerine 20 µl mitomisin C eklenip 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün, indüklenen bakteriler 50 ml’lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 5.000 rpm’de 40 dakika santrifüj edildi; süpernatant 50 ml’lik başka bir santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 10 µl 1/10 oranında sulandırılmış DNaz konulup oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda süpernatant iki kez 0.2 µl’lik filtreden geçirildi ve 40 ml süpernatanta, 10 ml polietilen glikol (PEG) solüsyonu eklenip iyice karıştırıldıktan sonra +4°C’de bir gece bekletildi. Ertesi gün süpernatant ve PEG karışımı 5.000 rpm’de 1 saat santrifüj edilerek fajların tüpün dibine çökmesi sağlandı. Süpernatant atıldıktan sonra tüpün içine 1 ml TE (10 mM Tris-Cl, pH: 7.5, 1 mM EDTA) tamponu eklenerek sediment süspansiyon edildi.

### Fajın Antibakteriyel Etkisinin İn Vitro Olarak Araştırılması

Yeni tanımlanan fajın antibakteriyel etkisinin araştırılmasında iki farklı besiyeri kullanıldı. Klinik örneklerden izole edilip 2 ml BHIB ve Leuria Bertani (LB) sıvı besiyerinde (%1 tripton, %0.5 maya ekstresi, %1 NaCl, pH: 7.0) üretilen (10<sup>7</sup> cfu/ml konsantrasyonun-

da) MRSA suşlarının üzerine, yukarıda tarif edilen yöntemle elde edilen fajdan 50 µl eklendi. Farklı zaman dilimlerinde (2, 4, 6, 8, ve 24. saatler) besiyerlerinden alınan örneklerin 10'ar katlık sulandırılmaları yapıldı ve her dilüsyondan LB agar besiyerine ekimler yapılarak değişik zaman dilimlerindeki bakteri sayıları araştırıldı.

#### **Fibroblast Hücre Kültürü Hazırlanması**

In vivo çalışmalarda kullanılan fibroblast hücre kültürleri (3T3), içinde %10 fetal dana serumu (FCS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 glutaminli DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Biochrom, Almanya) besiyeri bulunan 12 kuyucuklu hücre kültürü petri-lerine 10<sup>5</sup>/kuyucuk miktarında pasajlar yapılarak hazırlandı.

#### **Fajın Antibakteriyel Etkisinin MRSA İçeren Hücre Kültüründe In Vivo Olarak Araştırılması**

Antibakteriyel etkinin in vitro olarak araştırılmasında kullanılan aynı miktar faj ve MRSA, 12 kuyucuklu hücre kültür petri-lerinde çoğalmakta olan fibroblast hücre kültürüne ilave edildi; 2 ve 24. saatlerde bakteri miktarı sayıldı ve fibroblast hücre üremesi mikroskopik olarak incelendi.

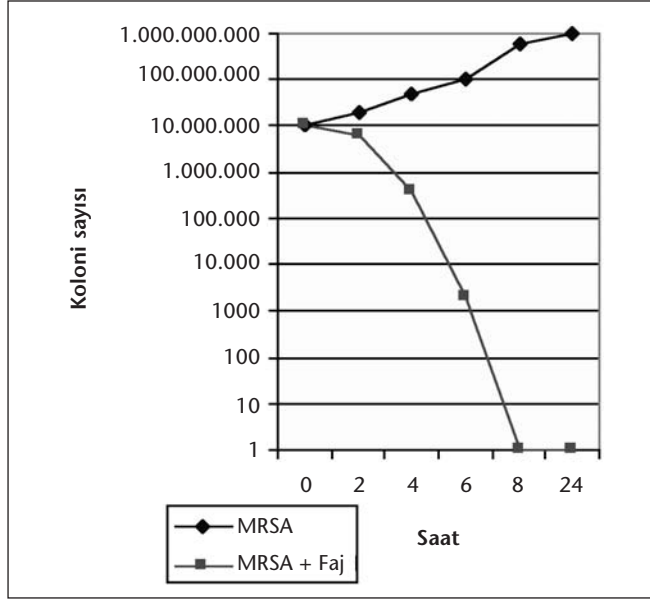
#### **Fajın Sitotoksik Etkisinin Fibroblast Hücre Kültüründe Araştırılması**

Yeni tanımlanan fajın in vivo ortamda memeli hücresine muhtemel sitotoksik etkisinin araştırılması amacıyla fibroblast hücre kültürleri (3T3) kullanıldı. Hücre proliferasyon analizi, 2 ve 24. saatte hücre kuyucukları PBS ile yıkandıktan sonra, canlı hücreleri kolorimetrik olarak saptayabilen MTT yöntemi ile yapıldı. Ölçümler 570-630 nm dalga boylarında gerçekleştirildi ve sonuçlar logaritmik değer olarak grafik olarak değerlendirildi. MTT solüsyonunun hazırlanmasında, 50 mg MTT [3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 10 ml PBS içinde steril koşullarda çözöldü. Faj ve MRSA inkübasyon süresinin sonunda 100 µl MTT solüsyonu 1 ml hücre kültürü besiyeri eklendi. Kültürler 37°C sıcaklıkta 4 saat süreyle tutuldu. Süpernatant atıldı ve 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonundan eklendi. Pipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra eşit miktarlarda ELISA plaklarına konulduktan sonra spektrofotometrede absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda okutuldu<sup>10</sup>.

Tüm çalışmalar en az iki defa tekrarlandıktan sonra değerlendirildi.

#### **BULGULAR**

Çalışmamızda, BHIB ve LB sıvı besiyerlerinde 10<sup>7</sup> cfu/ml olarak eklenen MRSA'lı besiyeri içine φ LizAnk fajı eklenmiş ve farklı zamanlarda besiyerinden alınan örneğin sulandırılmaları LB agar besiyerine ekilerek antibakteriyel etki araştırılmıştır. Fajın antibakteriyel etkisi 2. saatte izlenmeye başlanmış; 4 ve 6. saatlerde dramatik olarak bakteri sayısının azalmasının ardından 8. saatte tüm MRSA'ların öldüğü görölmüştür (Şekil 1). İki besiyerinde de yapılan çalışmada aynı sonuç elde edilmiştir. Fajın eklenmediği kontrol kültürlerinde ise MRSA suşları çoğalmaya devam etmiştir. Farklı kaynaklardan elde edilmiş altı farklı MRSA izolatı ile yapılan çalışmada aynı sonuç elde edilmiştir.

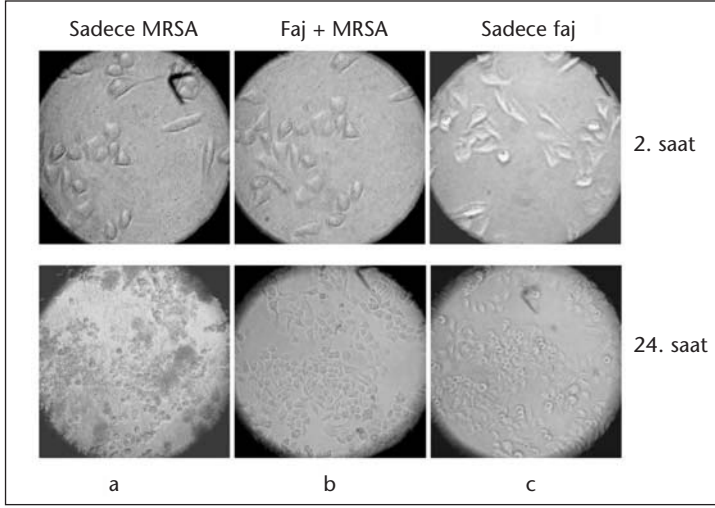


**Şekil 1.**  $\phi$  LizAnk fajının *in vitro* antibakteriyel etkisi (Faj bulunduran ve bulundurmeyen BHI sıvı besiyerinde MRSA'nın 2, 4, 6, 8 ve 24. saatlerdeki üreme miktarları belirlendikten sonra logaritmik olarak değerlendirilmiştir).

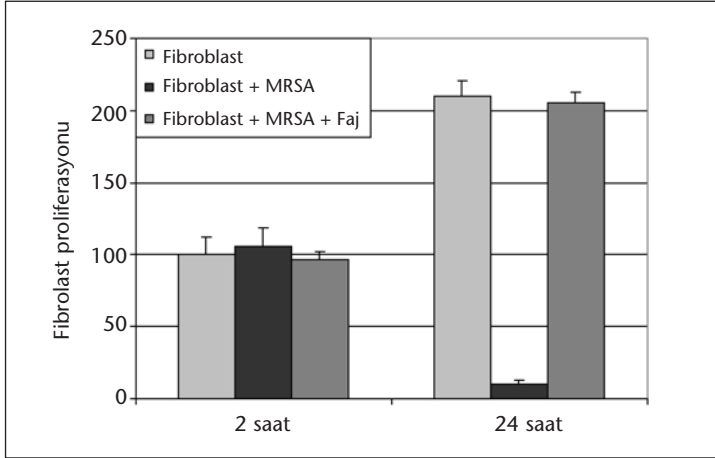
Çalışmamızda ayrıca, fibroblast hücre kültürlerine pasajdan 24 saat sonra farklı kuyucuklara MRSA, MRSA + faj ve sadece faj eklenerek, fajın MRSA üzerindeki *in vivo* antibakteriyel etkisi ile fibroblast morfolojisi üzerindeki etkisi mikroskopik olarak değerlendirilmiş; fajın sitotoksik etkisi ise MTT proliferasyon-sitotoksikite testi ile araştırılmıştır. Bu deneylerde, sadece bakteri bulunan kuyucuklarda, bakteri çoğalmasına bağlı olarak fibroblast hücrelerinin üremesinin durduğu ve yüzeyden koparak canlılıklarını yitirdikleri gözlenirken; faj + MRSA içeren kuyucuklarda, fajın MRSA'ları yok etmesine bağlı olarak hücrelerin sağkalımına imkan verdiği saptanmıştır (Şekil 2a ve 2b). Tek başına faj içeren kuyucuklarda ise, fajın hücre proliferasyonu ve morfolojisi üzerinde herhangi bir etkisi izlenmemiştir (Şekil 2c). MTT testi sonucunda da; faj + MRSA içeren hücre kültürü kuyucuklarındaki proliferasyon düzeyinin kontrol (faj ve MRSA içermeyen) hücreler ile aynı olduğu; buna karşın sadece bakteri içeren hücre kültürlerindeki proliferasyon düzeyinin ilk pasajdaki hücrelerden daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

## TARTIŞMA

Bakterilere özgül viruslar olan bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini enfekte ettikten sonra lizojenik (temperate) fajlarda olduğu gibi bakteri kromozomunda latent olarak kalabildikleri gibi, litik fajlarda olduğu gibi bakterinin ölümüyle sonlanan lizis yapabilmektedirler<sup>11</sup>. 1917 yılında bakteriyofajların keşfinden sonra, bunların bakteriyel enfeksiyonlara karşı antiseptik materyal olarak kullanılması düşünülmüş ve bazı ülkelerde (Gürcistan, Polonya, eski Rusya, ABD) 1940'lı yıllara kadar tedavide kullanılmıştır<sup>12</sup>. Antibiyotiklerin



**Şekil 2.**  $\phi$  LizAnk fajının *in vivo* antibakteriyel etkisinin gösterilmesi (Fibroblast hücre kültürü üzerine *in vitro* deneyde kullanılan miktarda MRSA ve faj eklenmiş ve 2 ve 24. saatlerde bakteri, fibroblast hücre morfolojisi ve proliferasyonu mikroskopi ile incelenmiştir).



**Şekil 3.**  $\phi$  LizAnk fajının fibroblast hücre proliferasyonu üzerine etkisi (Fibroblast hücre kültürü üzerine *in vitro* deneyde kullanılan miktarda MRSA ve faj eklenmiş ve 2 ve 24. saatlerde hücre proliferasyonu MTT testi ile araştırılmıştır).

1941 yılında keşfiyle birlikte bakteriyofaj tedavisi bir şekilde geri planda kalmış ve hatta unutulmuştur<sup>13</sup>. Klinik olarak önemli birçok bakteride birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişmesi ve tedavi başarısızlıkları, gerek bilim adamları gerekse klinisyenlerin litik fajlara karşı ilgisinin dramatik olarak artmasına neden olmuştur<sup>14,15</sup>. Bakteriyofaj tedavisinde en önemli iki etkenden biri fajın güçlü litik etkisinin olması, diğeri ise fajın konak hücreye özgüllüğünün yüksek olması, diğeri bir deyimle fajın tanıdığı grup içerisinde mümkün olan en fazla izolatu tanıyabilme özelliğidir.

Bu çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen MRSA suşlarının taşıdığı lizojenik fajlarla ilgili araştırma yaparken, mitomisin C ile indüklemeye sonucu elde ettiğimiz, teorik olarak lizojenik olan  $\phi$  LizAnk fajının, ilginç olarak diğer *S.aureus* izolatları üzerinde litik etkisinin olduğu saptanmıştır. Litik etki, sekiz saat içerisinde  $10^7$  cfu/ml konsantrasyondaki bakteriyi tamamen ortadan kaldıracak kadar güçlü olarak belirlenmiştir. Bu güçlü litik etki, hem farklı bakteriyolojik sıvı besiyerlerinde (BHIB ve LB) hem de hücre kültürü besiyerinde (%10 FCS içeren DMEM) saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda, fajın doğrudan bakteri lizisinden elde edilmesi nedeniyle, içerikte bulunabilecek bakteriyel toksinlerin ve/veya fajın kendisinin, memeli hücresine karşı göstereceği olası sitotoksik etkiler MTT testi ile araştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre, fajın fibroblast proliferasyonu üzerine bir etkisi bulunmamıştır. Bu çalışma, yeni tanımladığımız ve  $\phi$  LizAnk olarak adlandırdığımız bu fajın sadece altı farklı MRSA izolatı üzerindeki etkisinin araştırılmasıyla sınırlı kalmıştır. Ancak çalışmamız, fajın farklı MRSA suşları ve diğer stafilokoklar üzerindeki etkisinin araştırılmasıyla devam edecektir. Tanımladığımız bu fajın etki spektrumunun sınırlı olması ihtimalinde dahi, kokteyl faj tedavisi içerisinde yer alması mümkün görünmektedir. Nitekim günümüzde, faj kokteyli olarak adlandırılan ve aynı suşun farklı izolatlarına karşı etkili birçok fajın aynı anda tedavide kullanılarak geniş bir etki alanı oluşturulması söz konusudur<sup>16</sup>. Elde ettiğimiz fajın morfolojik ve genomik yapısının araştırılmasıyla ilgili çalışmalarımız devam etmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün de belirttiği gibi, antibiyotiklerin özellikle MRSA'lar olmak üzere çok ilaca dirençli enfeksiyon etkenleri üzerindeki etkinlikleri giderek azalmaktadır<sup>17</sup>. Günümüzde antibakteriyel faj tedavi yöntemi klinik olarak önem kazanmaya başlamıştır<sup>18</sup>. Sonuç olarak, bu çalışmada belirlediğimiz ve  $\phi$  LizAnk olarak adlandırdığımız fajın, fibroblast hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmaması ve güçlü antibakteriyel etkileri nedeniyle, *S.aureus*'lar tarafından oluşturulan özellikle yüzeyel deri enfeksiyonlarının tedavisinde sorunsuz olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Moellering RC Jr. MRSA: the first half century. J Antimicrob Chemother 2012; 67(1): 4-11.
2. Walsh C. Where will new antibiotics come from? Nat Rev Microbiol 2003; 1(1): 65-70.
3. Fischbach MA. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. Curr Opin Microbiol 2011; 14(5): 519-23.
4. Weber-Dabrowska B, Zimecki M, Kruzel M, et al. Alternative therapies in antibiotic-resistant infection. Adv Med Sci 2006; 51: 242-4.
5. Mann NH. The potential of phages to prevent MRSA infections. Res Microbiol 2008; 159(5): 400-5.
6. Kwiatek M, Parasion S, Mizak L, et al. Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains. Arch Virol 2012; 157(2): 225-34.
7. Gorski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, et al. Bacteriophage therapy for the treatment of infections. Curr Opin Investig Drugs 2009; 10(8): 766-74.
8. Tan TY. A comparison of PCR detection of *mecA* with two standard methods of oxacillin disk susceptibility testing for coagulase-negative staphylococci. J Med Microbiol 2002; 51(1): 83-5.
9. Kaneko J, Kimura T, Kawakami Y, et al. Panton-valentine leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). Biosci Biotechnol Biochem 1997; 61(11): 1960-2.

10. Lu ZJ, Ren YQ, Wang GP, et al. Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 16.
11. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68(3): 560-602.
12. Carlton RM. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999; 47(5): 267-74.
13. Stone R. Bacteriophage therapy. Stalin's forgotten cure. *Science* 2002; 298(5594): 728-31.
14. Gorski A, Weber-Dabrowska B. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(5): 511-9.
15. Thacker PD. Set a microbe to kill a microbe: drug resistance renews interest in phage therapy. *JAMA* 2003; 290(24): 3183-5.
16. Gu J, Liu X, Li Y, et al. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One* 2012; 7(3): e31698.
17. World Health Organization. Race against time to develop new antibiotics. *Bulletin of the World Health Organization* 2011; 89: 88-9.
18. Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, et al. Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res* 2012; 83: 73-121.