

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'dan Elde Edilen Fajın Karakterizasyonu

Characterization of Phage Obtained from Methicillin -Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Özlem Ulusan Bağcı[®], Fikret Şahin[®], Mehmet Kıyan[®]

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Atf/Cite as: Ulusan Bağcı Ö, Şahin F, Kıyan M. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'dan elde edilen fajın karakterizasyonu, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):156-62.

Öz

Amaç: Mevcut olan bütün antimikrobiyallere dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının ortaya çıkması ve yeni antibiyotik bulunamaması araştırmacıları antibiyotiklerin keşfi ile popülerliğini kaybetmiş olan faj tedavisine yönlendirmiştir. Rekombinant teknolojinin gelişimi bakteri ölümünü kontrollü olarak sağlayan lizojenik rekombinant fajların oluşturulması düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Bunun için manipülasyonu kolay küçük boyutlu fajlara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız, tedavide güvenle kullanılabilir küçük boyutta lizojenik bir bakteriyofajın tanımlanmasıdır.

Yöntem: Bu çalışmada, küçük bir faj içerdiği bilinen MRSA suşundan faj ekstrakte edilerek sekans analizi sonucunda gen ve protein haritası çıkarılmıştır.

Bulgular: Faj; kuyruk proteinlerini kodlayan genler içermesi nedeniyle Caudoviralese; genom büyüklüğü ve dizilimi göz önünde bulundurularak Podoviridae sınıfına dâhil edilmiştir.

Sonuç: Bugüne kadar NCBI veritabanına yüklenmiş yalnızca 16 adet Podoviridae ailesinden faj bulunmakta olup, bu çalışmada tanımlanan faj ise on yedincidir. Genomdaki AOÇ'lerin (Açık Okuma Çerçevesi) yalnızca %41.4'ü NCBI BLAST programı kullanılarak proteinlerle eşleştirilebilmiştir. Yapılan son araştırmalarda, çalışmamızla uyumlu olarak bakteriyofaj genomundan olduğu tahmin edilen AOÇ'lerin %50-75'inin GenBank'ta karşılığı olmadığı belirtilmiştir. Bakteriyofajları daha iyi anlayabilmek ve faj terapisinde fajlardan daha iyi yararlanabilmek için daha fazla fajın dizilenmesi, genomlarının ve karşılık geldiği proteinlerin bulunması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızın, rekombinant faj terapilerinde güvenle kullanılabilir lizojenik bir fajın gen ve proteinlerinin tanımlanmış olması nedeniyle literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Bakteriyofaj, faj tedavisi, *Staphylococcus*

ABSTRACT

Objective: The emergence of *Staphylococcus aureus* strains resistant to all antimicrobials and failure to discover new antibiotics have led researchers to phage therapy, which lost popularity after the discovery of antibiotics. The development of recombinant technology introduced the idea of creating lysogenic recombinant phages that provide controlled bacterial death and this required small- sized phages that were easy to manipulate. Our aim is to identify small-sized lysogenic bacteriophages that can be used safely in therapy.

Method: The gene and protein map of the phage was created by analysis of sequencing after extracting a phage from the MRSA strain that is known to contain a small phage.

Results: The phage was classified in Caudovirales spp. as it contains genes encoding tail proteins, and in Podoviridae spp. due to its genomic size and arrangement.

Conclusion: To date, there are only sixteen phages from Podoviridae family uploaded on NCBI, and the phage described in this study is the seventeenth one. Only 41.4% of the ORFs (Open Reading Frames) in the genome could be matched with proteins using the NCBI BLAST. Recent studies suggest that 50-75% of bacteriophage ORFs do not correspond to any organism in GenBank. For better understanding of bacteriophages and their utilization in phage therapy, it is essential to sequence greater number of phages, and to discover their genomes and corresponding proteins. Since the genes and proteins of a lysogenic phage that can be used safely in recombinant phage therapies have been identified in our study, it will contribute to the relevant literature.

Keywords: Bacteriophage, phage therapy, *Staphylococcus*

Alındığı tarih / Received:

13.10.2020 / 13.October.2020

Kabul tarihi / Accepted:

15.02.2021 / 15.February.2021

Yayın tarihi / Publication date:

01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

Ö. Ulusan Bağcı 0000-0002-9695-5703

F. Şahin 0000-0002-1283-8025

M. Kıyan 0000-0002-6748-2070

✉ drozlemulusan@gmail.com

GİRİŞ

Staphylococcus aureus hastane veya toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen ve oldukça ciddi sonuçlar doğurabilen önemli bir patojen mikroorganizmadır⁽¹⁾. Ayrıca antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştirebilme potansiyeli yüksek olan bir mikroorganizmadır. En eski antibiyotiklerden olan penisilinden, en yeni antibiyotiklerden olan linezolid kadar kazanılmış direnci mevcuttur^(2,3). Metisilin 1960 yılında keşfedilmiştir ve bundan yalnızca bir yıl sonra Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) salgınlar yapmaya başlamış, hem hastanelerde hem toplumda hızla yayılmıştır⁽⁴⁾. Antibiyotik direncinin giderek yayılması ve mevcut olan bütün antimikrobiyallere dirençli *S. aureus* suşlarının ortaya çıkma olasılığına karşılık yeni antibiyotiklerin geliştirilememesi araştırmacıları antibiyotiklerin keşfedilmesi ile popülerliğini kaybetmiş olan faj tedavisine tekrardan yönlendirmiştir⁽⁵⁾.

Bakterileri enfekte eden ve bakteri kaynaklarını kullanan virüsler, bakteriyofaj olarak tanımlanırlar. Bakteriyofajlar litik (virülan) ve lizojenik (ılımlı) olmak üzere ikiye ayrılırlar⁽⁶⁾. *Caudovirales* olarak adlandırılan kuyruklu fajlar, bilinen tüm fajların %96'sını oluşturur ve sıklıkla çevresel kaynaklardan izole edilebilir. Fizikokimyasal profil, genom ve morfolojilerine göre üç aileye ayrılırlar⁽⁷⁾. Kuyruk kısmı kasılabilen *Myoviridae* ailesi fajların %25'ini, uzun, kasılmayan kuyruğa sahip olan *Siphoviridae* ailesi fajların %61'ini ve kısa kuyruğa sahip olan *Podoviridae* ailesi %14'ünü oluşturmaktadır⁽⁸⁾. Morfolojik yapıların ötesinde, fajların genomik özellikleri diğerlerinden oldukça farklıdır. *Podoviridae* ailesindeki virüsler en küçük genoma (20 kbç) sahipken, *Siphoviridae* ailesindeki virüsler orta büyüklükte bir genoma (40 kbç), *Myoviridae* ailesindeki virüsler ise en büyük genoma (125 kbç) sahiptir⁽⁹⁾.

Podoviridae ailesindeki bakteriyofaj genomlarının *Siphoviridae* ailesinden farklı olduğu bulunmuştur⁽⁹⁻¹¹⁾. DNA paketlenmesi, kapsid yapısı, kuyruk yapısı ve lizojeniye ilişkin genlere ek olarak, fonksiyonel olmayan genler de içerirler. *Siphoviridae* ailesinden farklı olarak, gen kategorileri birbirinden belirgin bir şekilde ayrılmış değildir, genellikle

kuyruk ve lizisle ilişkili genler üst üste gelmektedir. *Myoviridae* ailesindeki fajların genomik incelemesi sonucunda *Escherichia coli* T4 fajıyla büyük benzerlik gösterdikleri bulunmuştur⁽¹²⁾.

1950'lere kadar faj tedavisi için kullanılan fajlar, temel olarak bakterilerin doğrudan ölmesine neden olan litik özellikteki fajlardır. Bu tedavi yönteminin, bakterilerin ani ölümü nedeniyle endotoksik şok gibi istenmeyen sonuçlara yol açtığı bilinmektedir. Rekombinant teknolojinin geliştirilmesi, bakteri ölümünü kontrol edebilen gen içeren lizojenik rekombinant fajların oluşturulması düşüncesini akla getirmiştir. Ancak, bu amaçla manipülasyonu ve tedavide kullanımı kolay küçük lizojenik fajlara gereksinim vardır. Bu çalışmada amacımız, bu kriterleri karşılayacak bir faj tanımlamak, bu fajın gen haritasını ve proteinlerini saptayarak faj veri bankasına katkıda bulunmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma suşu: Şahin ve ark.⁽¹³⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, 2004-2005 yıllarında Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran hastalardan toplanan örneklerde 27 *S. aureus* suşu izole edilmiş ve bu bakterilerin 23 tanesinde bakteriyofaj saptanmıştır. Faj DNA'ları *Hinfi* enzimi ile kesilmiş ve "Restriction Fragment Length Polimorfizm" (RFLP) analizi yapılmıştır. Bu analizle fajlardan birinin diğerlerinden çok daha küçük genoma sahip olduğu ve rekombinant lizojenik fajların hazırlanması için uygun olacağı düşünülmüştür.

Faj izolasyonu: İçinde faj olduğu bilinen MRSA suşunun kanlı agara ekimi yapılmıştır. Faj ekstraksiyonu için Kaneko ve ark.⁽¹⁴⁾ bulduğu, Şahin ve ark.⁽¹³⁾ tarafından modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Üreyen kolonilerden bir tane alınarak beyin kalp infüzyon ekstraktına atılmış, üç saat boyunca 37°C'de bir çalkalayıcı üzerinde inkübe edildikten sonra 1 g/ml'lik son konsantrasyonda mitomisin C ilave edilmiş ve beş saat daha inkübe edilmiştir. Bakteriler 10.000 g'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatana, 0.2 µm'lik bir filtreden iki kere geçirilmiştir. Faj içeren süpernatana, oda sıcaklığında DNaz I ve RNaz A eklendikten sonra bir saat bekletilmiş ve daha

sonra %10'luk son konsantrasyonda polietilen glikol 6.000 ilave edilmiştir. +4°C'de 12 saat süreyle inkübasyondan sonra 10 dakika boyunca 11.000 g'de santrifüj edilmiş ve çökelti 1 mL Tris EDTA tamponu ile süspansiyon edilmiştir ve devamında DNA ekstraksiyonuna geçilmiştir.

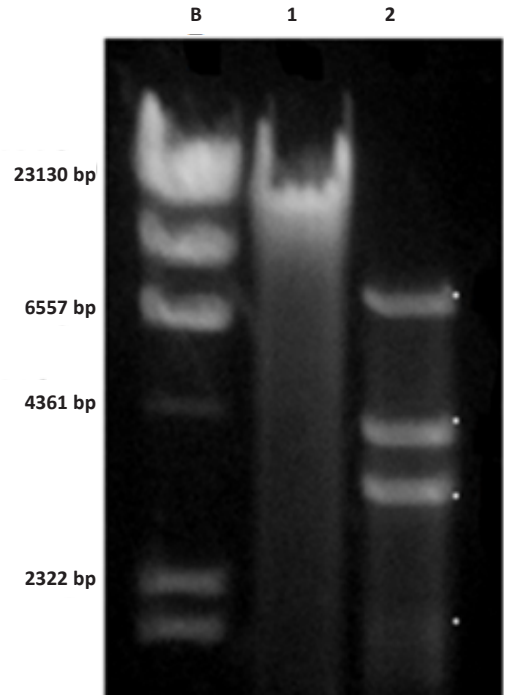
Faj DNA ekstraksiyonu: DNA ekstraksiyonuna 1 mL lizis tamponu (0.1 mol/L NaCl; 0.21 mol/L Tris-HCl; 0.05 mol/L EDTA, pH=8; %0.5 SDS) içerisine Proteinaz K (100 g/ml) eklenerek başlanmıştır. DNA ekstraksiyonu daha sonra guanidium tiyosiyanat yöntemiyle gerçekleştirilmiş olup, lizis tamponu üzerine 6M guanidium tiyosiyanat (SERVA, 593840) ilave edilmiştir. Silika 20-50 µl eklenerek çalkalayıcı üzerinde on dakika inkübe edilmiş ve devamında 6.000 rpm'de bir dakika santrifüjlenmiştir. Son olarak DNA, %95'lik etanol ile çöktürülmüş ve 100 µl ddH₂O içerisinde süspansiyon edilmiştir.

Faj DNA'sının pBluescript SK (pBSK) vektörüne klonlanması: Faj DNA'sı *HindIII* enzimi ile kesildikten sonra %1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve faj genomu dört parçaya (insert) ayrılmıştır. Gen parçaları dört ayrı pBSK vektörüne klonladıktan sonra, sekans analizi için dış merkeze gönderilmiştir. Sekans analizi sonuçları NCBI BLAST programında ayrıntılı olarak analiz edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada tanımlanan faj *Staphylococcus phage sml* olarak adlandırılmıştır. Fajın *HindIII* restriksiyon enzimi ile kesilmesiyle zaman Şekil 1'de gösterilen şekilde boyutları büyükten küçüğe 6.500, 4.000, 3.000 ve 2.000 bç olan dört insertten oluştuğu görülmektedir. Sonrasında dört insert, dört boş pBSK vektörüne klonlanarak sekans analizi elde edilmiştir. Insert klonlanmış dört plazmid Şekil 2'de gösterilmiştir. Dizi sonuçları NCBI BLAST programı (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) kullanılarak değerlendirilmiş, fajın genomundaki genler tarafından kodlanan proteinler saptanmıştır (Şekil 3). Fajın tüm genom sekans analizi FASTA formatında GitHub depo alanında [https://gist.github.com/ulusanozlem/132f889c398dfe9bf44053d52d9414bd] sunulmaktadır.

Sekanslamadan sonra, NCBI Açık Okuma Çerçevesi (AOÇ) bulucu program genom boyutunu ve fajdaki AOÇ'leri bulmak için kullanılmıştır. Fajın genom büyüklüğü 20.227 bç'dir ve sadece ATG kodonuyla başlayan 41 AOÇ içerir. En uzun AOÇ 1911 bç ve en kısa olanı 78 bç'dir. Kırk bir AOÇ'den 17 tanesinin (%41.4) protein karşılığı saptanabilmiştir. Bunlardan 18 tanesi (%43.9) herhangi bir protein ile eşleştirilememiş ve 6'sı (%14.6) fonksiyonu bilinmeyen hipotetik protein olarak değerlendirilmiştir. Fajın genomik özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir. AOÇ'lerin başlangıç ve bitiş nükleotitleri ve uzunluğu, AOÇ'lerin buldukları iplikçik, genlerin karşılık geldiği protein ve proteinlerin fonksiyonları Tablo 2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 1. *HindIII* ile kesilmiş faj genomunun agaroz jel görüntüsü [(B) Lambda DNA/*HindIII* belirteç (Bantlar bç olarak büyüklükleri ile birlikte verilmiştir).

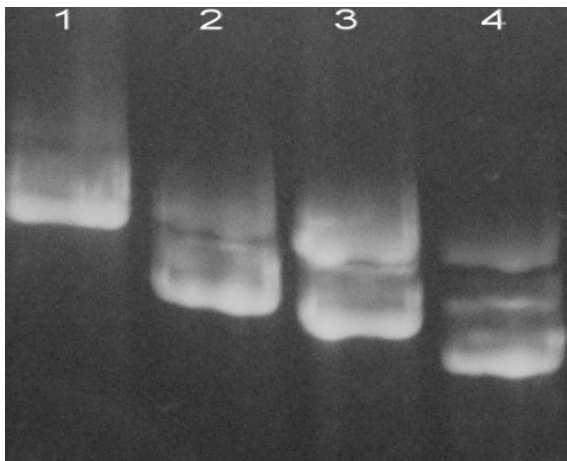
(1) Faj DNA'sı; (2) *HindIII* ile kesilmiş faj DNA'sı]

Tablo 1. *Staphylococcus phage sml* lizojenik bakteriyofajına ait genom özellikleri.

Faj Genomunun Özellikleri	
Özellik	Değer
Genom büyüklüğü (bç)	20227
AOÇ sayısı	41
En uzun AOÇ (bç)	1911
Ortalama AOÇ uzunluğu (bç)	503
En kısa AOÇ (bç)	78
Guanin+Sitozin içeriği (%)	33.96

Tablo 2. AOÇ'lerin özellikleri (başlangıç nükleotidi, bitiş nükleotidi, uzunluk, iplikçik, proteinin adı, fonksiyonu).

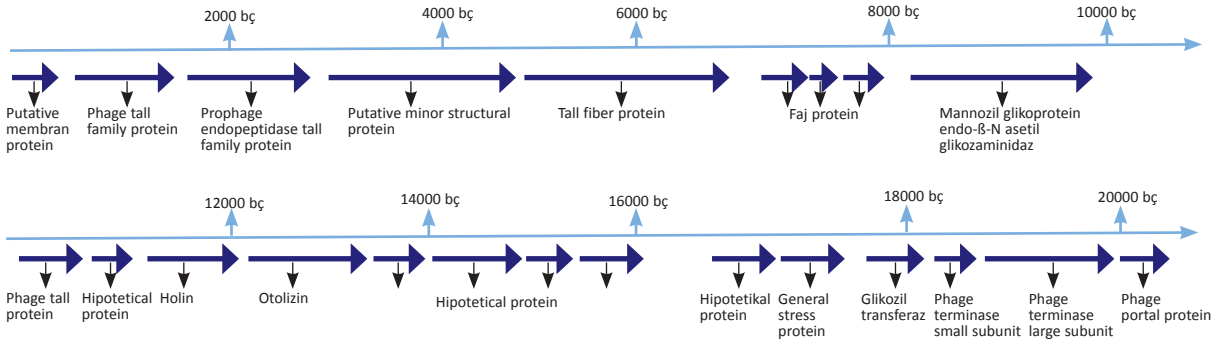
AOÇ	Başlangıç (bç)	Bitiş (bç)	Uzunluk (bç)	İplikçik (pozitif/negatif)	Proteinin adı	Fonksiyonu
AOÇ 1	55	378	324	Pozitif	"Putative membran protein"	Baş yapısı
AOÇ 2	305	400	96	Pozitif	-	-
AOÇ 3	479	369	111	Negatif	-	-
AOÇ 4	391	1338	948	Pozitif	"Phage tail family protein"	Kuyruk yapısı
AOÇ 5	1347	3248	1902	Pozitif	"Prophage endopeptidase tail family protein"	Kuyruk yapısı
AOÇ 6	3055	3270	216	Pozitif	-	-
AOÇ 7	3263	5173	1911	Pozitif	"Putative minör structural protein"	Baş yapısı
AOÇ 8	5238	5109	150	Negatif	-	-
AOÇ 9	5173	6699	1824	Pozitif	"Tail fiber protein"	Kuyruk yapısı
AOÇ 10	6996	7373	378	Pozitif	Faj proteini	-
AOÇ 11	7377	7550	174	Pozitif	Faj proteini	-
AOÇ 12	7588	7433	156	Negatif	-	-
AOÇ 13	7589	7888	300	Pozitif	Faj proteini	-
AOÇ 14	8026	9924	1899	Pozitif	Mannozil glikoprotein endo-β-N asetil glikozaminidaz	Lizis
AOÇ 15	9998	9897	102	Negatif	-	-
AOÇ 16	10036	9902	135	Negatif	-	-
AOÇ 17	9936	11069	1134	Pozitif	"Phage tail protein"	Kuyruk yapısı
AOÇ 18	11176	11581	396	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 19	11064	11597	438	Pozitif	"Holin"	Lizis
AOÇ 20	12018	13490	1473	Pozitif	Otolizin	Lizis
AOÇ 21	13686	13868	183	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 22	13846	13965	120	Pozitif	-	-
AOÇ 23	13943	13830	114	Negatif	-	-
AOÇ 24	13971	13861	111	Negatif	-	-
AOÇ 25	14107	15156	1050	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 26	15071	15436	366	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 27	15433	15948	516	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 28	15999	16115	117	Pozitif	-	-
AOÇ 29	16084	16164	81	Pozitif	-	-
AOÇ 30	16261	16139	123	Negatif	-	-
AOÇ 31	16189	16293	105	Pozitif	-	-
AOÇ 32	16397	16290	108	Negatif	-	-
AOÇ 33	16330	16407	78	Pozitif	-	-
AOÇ 34	16588	16749	162	Pozitif	Hipotetikal	-
AOÇ 35	16852	17049	198	Pozitif	-	-
AOÇ 36	16870	17395	516	Pozitif	"General stress protein"	-
AOÇ 37	17614	17718	105	Pozitif	-	-
AOÇ 38	17735	18260	525	Pozitif	Glikoziltransferaz	DNA metabolizması
AOÇ 39	18340	18417	78	Pozitif	"Phage terminase small subunit"	DNA paketlenmesi
AOÇ 40	18424	18767	1344	Pozitif	"Phage terminase large subunit"	DNA paketlenmesi
AOÇ 41	19778	20227	447	Pozitif	"Phage portal protein"	DNA paketlenmesi



Şekil 2. Sırasıyla insert 1-4 klonlanmış plazmidlerin agaroz jeldeki görüntüleri.

Staphylococcus phage sml kuyruk, DNA paketlenmesi ve baş yapısı, lizis ve DNA metabolizması ile ilgili genler içermektedir. Faj kuyruk genleri içerdiği için, kuyruklu faj grubu olan *Caudovirales* sınıfındandır. *Caudovirales* sınıfı fajları faj popülasyonunun çoğunluğunu oluşturur, ancak viryon yapısı, genom organizasyonu ve replikasyon özellikleri hakkında çok az çalışma vardır. Genom boyutu 18-500 kb arasında değişir. Guanin+Sitozin içeriği, genom yapısının %27-72'sini oluşturur. Çalışmada fajımızın büyüklüğü 20227 bç ve Guanin + Sitozin içeriği %33.96'dır. Bu iki özellik *Caudovirales* için uygundur.

Önceki çalışmalar *Caudovirales* sınıfındaki fajların



Şekil 3. *Staphylococcus phage sml* lizojenik bakteriyofajındaki NCBI programıyla protein karşılığı bulunabilmiş AOC'leri ve kodladıkları proteinleri gösteren gen haritası.

genomlarının kodladığı proteinlerin altı gruba ayrıldığını göstermiştir: lizojeni, DNA metabolizması, DNA paketlenmesi, baş-kuyruk yapısı, lizis ve son olarak virülansla ilişkili genler⁽¹⁵⁾. Fajımızda DNA paketlenmesi ile ilgili üç gen, yani “phage terminase small subunit”, “phage terminase large subunit”, “phage portal protein” belirlenmiştir. Ayrıca “putative membran protein” ve “putative minor structural protein”, baş yapısı ile ilişkili iki proteindir. “Phage tail family protein”, “prophage endopeptidase tail family protein”, “tail fiber protein” ve “phage tail protein” olmak üzere dört tane kuyruk yapısı ile ilişkili gen bulunmuştur. Ayrıca, lizis ile ilişkili olduğu bilinen mannozil-glikoprotein endo-β-N asetilglukozaminidaz, otolizin, “holin” genleri saptanmıştır. Glikoziltransferaz, DNA metabolizmasına bağlı nükleotit biyosentezinde rol oynayan tek proteindir.

TARTIŞMA

Bakteriyofajlar, 1920’lerde Frederick Twort ve Felix d’Herelle tarafından keşfedildikten sonra tedavide kullanılmaya başlanmıştır^(16,17). Önceki çalışmalar, fajların birçok enfeksiyonun tedavisinde kullanıldığını ve başarılı sonuçların alındığını gösterir. Payne ve ark.⁽¹⁸⁾ *S. aureus* enfeksiyonlarını tedavi etmek için bakteriyofajları kullanmışlardır. Wright ve ark.⁽¹⁹⁾ *Pseudomonas aeruginosa*’nın etken olduğu orta kulak iltihabı enfeksiyonlarını tedavi etmek için faj tedavisini uygulamışlardır. Ayrıca, polimikrobiyal enfeksiyonlarla başa çıkmak için, en yaygın bulaşıcı ajanlara karşı faj karışımları hazırlanmış, ancak faj tedavisi 1930’larda antibiyotiklerin keşfiyle popülaritesini kaybetmiştir.

Son yıllarda, antibiyotiklere direnç gelişimi, bulaşıcı hastalıkların tedavisini zorlaştıran önemli bir sağlık sorununa neden olur. Bilinen tüm antimikrobiyallere dirençli bakteriler ortaya çıktığı için faj tedavisi yeniden gündeme gelmiştir^(20,21). Faj tedavisinde şimdiye kadar litik fajlar kullanılmıştır. Bununla birlikte, litik fajların bakterileri aniden parçalanması sonucunda endotoksinlerin aniden kan dolaşımına salınması istenmeyen sonuçlara yol açabilir. Bu nedenle, faj tedavisinde, bakterilerin kontrollü olarak parçalanmasını sağlayan lizojenik fajlar tercih edilmelidir. Küçük boyutlu genomu olan lizojenik fajlar, rekombinant fajların hazırlanmasında yarar sağlayacaktır. Tanımladığımız faj 20227 bç büyüklüğünde en küçük fajlardandır. Küçük olması rekombinant olarak fajdan yararlanmada avantaj sağlayacaktır. Fajımızın genomik ve morfolojik özellikleri değerlendirildiğinde genomunun küçük olması, kuyruklu yapıda olması ve genom dizilimi nedeniyle *Caudovirales* sınıfının *Podoviridae* ailesine ait olduğu belirlenmiştir. *Podoviridae* ailesine ait fajlarda kuyruk ve lizis proteinlerini kodlayan genler üst üste gelmekte ve bunları DNA paketlenmesi ile ilgili genler izlemektedir. *Podoviridae* ailesine ait genlerin sıralaması Şekil 4’te verilmiştir. *Caudovirales* fajları, fajların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Fajların evrende oldukça fazla miktarlarda bulunmasına karşılık NCBI veritabanı araştırıldığında şimdiye kadar veritabanına yüklenmiş yalnızca 3601 faj sekansı olduğu görülmüştür. Bunlardan 146’sı stafilokok fajı olup, bu fajların sadece 16 tanesi *Podoviridae* ailesine aittir⁽²²⁾. Fajların çoğunluğu orta büyüklükte genomu olan *Siphoviridae* ailesine aitken, küçük genoma sahip *Podoviridae* ailesi fajların oldukça küçük bir kısmını

oluşturur ve veritabanında şu ana kadar tanımlanmış 16 faj bulunmaktadır. *Staphylococcus* phage sml, şimdiki kadar tanımlanan *Podoviridae* ailesinden 17. faj olmuştur.

Fajda dört adet kuyruk yapısı ile ilgili ("phage tail family protein", "prophage endopeptidase tail family protein", "tail fiber protein" ve "phage tail protein"), üç adet lizis ile ilgili (mannozil-glikoprotein endo- β -N asetilglikozaminidaz, otolizin, "holin"), üç adet DNA paketlenmesi ile ilgili ("phage terminase large subunit", "phage terminase small subunit", "phage portal protein") ve iki adet kapsit yapısı ile ilgili ("putative membran protein" ve "putative minor structural protein") gen tanımlanmıştır. DNA metabolizması ile ilgili yalnızca nükleotit biyosentezinden sorumlu olan glikoziltransferaz proteinine rastlanmıştır. *Staphylococcus* phage sml, sadece mitomisin C ile indüklenerek MRSA'dan ekstrakte edilebildiği için lizojenik bir fajdır. Bununla birlikte, lizojeniye ilişkin genler fajda bulunamamıştır. Bu, veritabanındaki proteinlerle eşleşmeyen AOÇ'lerin ve işlevi bilinmeyen proteinlerin lizojeniye bağlı proteinleri kodlayabildiği ile açıklanabilir. Fajın 41 AOÇ'sinden hiçbirinin veri tabanındaki virülans faktörleriyle eşleşmemiş olması nedeniyle terapide kullanılmasının güvenli olduğu ileri sürülebilir.

AOÇ'lerden 18 tanesi, NCBI BLAST programındaki proteinlerle (%43.9) eşleştiremezken, 6'sı hipotetik protein (%14.6) olarak değerlendirilmiştir. Kwan ve ark.⁽¹⁰⁾ 27 stafilkok fajına ait genomları ve proteinleri inceledikleri araştırmalarında, 2170 AOÇ'den %35'ini proteinlerle eşleştirebilmiş ve %44'ünü ise veritabanındaki herhangi bir genle eşleştirememişlerdir. Ek olarak, *Mycobacterium* ve diğer bakterilerin bakteriyofajları üzerine yapılan başka bir çalışma, faj genomundaki AOÇ'lerin %50-75'ini veritabanındaki proteinlerle eşleştirememiştir⁽¹⁰⁾. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde AOÇ'lerin %43.9'u veri bankasındaki proteinlerle eşleştirememiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, *Podoviridae* ailesine ait yeni bir faj bulunmuş olup, gen ve protein haritası gösterilmiştir. Bu faj, küçük boyutu ve lizojenik özelliği nedeniyle, tedavide kullanılacak rekombinant

faj hazırlanması için uygun olabilecektir. 41 AOÇ'den yalnızca 17'si veri tabanındaki proteinlerle eşleştirebilmiştir. Genlerin rolünü anlamak için daha fazla çalışma yapılmalı ve veri tabanına yüklenmelidir. Faj tedavisi çok umut vericidir, ancak fajların güvenilirliğini araştırarak çalışmalara gereksinim vardır. Genlerin rolleri daha iyi anlaşıldığında, faj terapisi daha güvenli, daha başarılı olabilecek ve daha iyi yönetilebilecektir.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Ankara Üniversitesi, Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu, 25.07.2016 ve 13-621-16 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Ankara University Ethics Committee (07.25.2016 / 13-621-16).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

KAYNAKLAR

1. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(4):203-18. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
2. Hirai Y, Maebashi K, Yamada K, et al. Characterization of compound A, a novel lincomycin derivative active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antibiot (Tokyo).* 2021;74(2):124-32. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00375-1>
3. Kaur K, Kaur M, Gill AK. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: An emerging problem. *Int J Sci Res.* 2020;8(12):50-2.
4. Harkins CP, Pichon B, Doumith M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol.* 2017;18(1):130. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1252-9>
5. Leitner L, Sybesma W, Chanishvili N, et al. Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *BMC Urol.* 2017;17(1):90. <https://doi.org/10.1186/s12894-017-0283-6>
6. Domingo-Calap P, Mora-Quilis L, Sanjuán R. Social

- bacteriophages. *Microorganisms*. 2020;8(4):533. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040533>
7. King A, Lefkowitz E, Adams M, Carstens E. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Waltham: Academic Press MA; 2012.
 8. Kurtboke I. *Bacteriophage*. InTechOpen, Australia. 2012. <https://doi.org/10.5772/1065>
 9. Son JS, Lee SJ, Jun SY, et al. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;86(5):1439-49. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2386-9>
 10. Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(14):5174-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501140102>
 11. Vybiral D, Takác M, Loessner M, Witte A, Ahsen U, Bläsi U. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of two lytic *Staphylococcus aureus* phages: 44AHJD and P68. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 219(2):275-83. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00028-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00028-4)
 12. Mohan Raj JR, Vittal R, Huilgol P, Bhat U, Karunasagar I. T4-like *Escherichia coli* phages from the environment carry bla CTX-M. *Lett Appl Microbiol*. 2018;67(1):9-14. <https://doi.org/10.1111/lam.12994>
 13. Sahin F, Karasartova D, Özsan TM, Kiyan M, Karahan CZ, Tekeli A. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying an exfoliative toxin A gene encoding phage isolated from a hospitalized patient in Turkey. *Can J Microbiol*. 2013;59(4):260-5. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0721>
 14. Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage ϕ PVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene*. 1998; 215(1):57-67. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00278-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00278-9)
 15. Hatfull GF. Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(5):447-53. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.004>
 16. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2): e00066-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
 17. Chanishvili N. Phage therapy-history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res*. 2012; 83:3-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>
 18. Payne RJ, Phil D, Jansen VA. Phage therapy. The peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;68(3):225-30. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.109520>
 19. Wright A, Hawkins CH, Anggård 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. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>
 20. Oliveira H, Sillankorva S, Merabishvili M, Kluskens LD, Azeredo J. Unexploited opportunities for phage therapy. *Front Pharmacol*. 2015;6:180. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00180>
 21. Abedon ST. Commentary: Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. *Front Microbiol*. 2016;7:1251. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01251>
 22. National Center for Biotechnology Information. Complete genomes: Viruses.2020. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?opt=virus&taxid=10239&host=bacteria>]. (Erişim tarihi: 26.12.2020).
 23. Deghorain M, Melderer VL. The staphylococci phage family: An overview. *Viruses*. 2012;4(12):3316-35. <https://doi.org/10.3390/v4123316>