

XXXII. OTDK Biológia Szekció

***Staphylococcus aureus* lítikus fágjának kötődését befolyásoló környezeti tényezők és genomjának összehasonlítása más fág genomokkal**

készítette: DUNAI DÁNIEL IMRE

biológia MSc hallgató 2. évfolyam

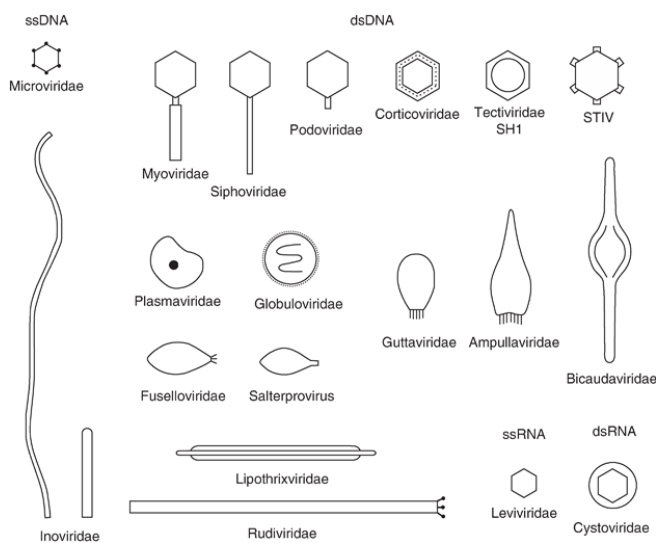
PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

2015.

1. Irodalmi bevezetés

1.1 A bakteriofágok általános jellemzése

A bakteriofágok baktériumokban szaporodni képes vírusok. Felfedezésük a 20-dik század elején Frederick W. Twort és Felix d' Herelle nevéhez fűződik (d'Hérelles, 1917). A bakteriofág (fág) egy külső fehérjékből felépülő kapszidburokból és az abban lévő örökítőanyagból áll. A genom lehet DNS és RNS is és lehet egy vagy kétszálú. A fehérjeburkuk alapján lehetnek kubikális, helikális és binális (farkos bakteriofágok) vírusok. A leggyakoribbak a binális kettős szálú DNS-sel rendelkező fágok ezek adják a leírt fajok 95%-át. (Gergely, 2003; Mc Grath és Sinderen, 2007; Duckworth, 1976; Mann, 2005; Filée et al, 2005). Bakteriofágok morfológiai felosztásánál jelenleg az Ackermann besorolást alkalmazzuk. (Ackermann, 1999)



1. Ábra. A bakteriofágok morfológián alapuló főbb rendszertani egységei.

A bakteriofágok valószínűleg a legnagyobb egyedszámban előforduló szervezetek a Földön. Mindenütt jelen vannak, ahol megtalálhatók a gazdául szolgáló baktériumok is. Mivel a baktériumok bolygónk összes élőhelyét benépesítik így a fágok is mindenütt megtalálhatók a talajban, minden típusú vizes élőhelyen fejlettebb élőlények külső és belső felszínein. (Mann, 2005; Wommack és Colwell, 2000)

A szaporodásuk módja szerint a fágok lehetnek lítikus és temperált fágok. A lítikus fágok előlik, feloldják a gazdabaktériumot közben nagyszámú új fágpartikulum keletkezik. Ezzel szemben a temperált fág nukleinsava integrálódik a gazdabaktérium nukleinsavába. Ezen állapotban az ún. profág nem öli el a gazdabaktériumot, hanem vele együtt szaporodik. A temperált fág nukleinsava nem csak gazda nukleinsavába integrálódva létezhet tovább, hanem ritkább esetben, a citoplazmában szabadon vagy plazmidként van jelen. Ez a jelenség a lizogénia, és azokat a baktériumokat, amelyek bakteriofág nukleinsavat hordoznak lizogén baktériumoknak nevezzük. Ez a jelenség úgy jön létre, hogy a lítikus replikációhoz szükséges gének represszált állapotba kerülnek egy represszálo protein által, mely úgyszintén fág genomjában kódolódik. Ez a protein oly mértékben termelődhet, hogy egy újabb már lítikus fág fertőzését is kivédheti. A profág szaporodása során idővel megjelenhet a lítikus forma is, ami a gazdabaktérium feloldódásával és nagyszámú fertőző képes fág keletkezésével jár. Ez a jelenség a spontán fágindukció, mutagén ágensekkel és UV-sugárzással növelhető a gyakorisága. (Gergely, 2003; Pesti, 2001)

A fág kiszabadulásakor magával vihet DNS darabokat a baktérium genomjából, egy másik baktériumot fertőzve ez a DNS szakasz beépülhet ebbe a baktériumba. Ez a transzdukciónak vagyis a bakteriofágok által közvetített nukleinsav átvitel. (Gergely, 2003; Pesti, 2001)

Ahhoz, hogy bakteriofág a nukleinsavát a gazdabaktériumba juttassa mindenekelőtt a baktérium felszínén található specifikus receptorokhoz kell kötődnie. Ezek a receptorok sejtfelszíni struktúrák, melyek lehetnek lipopoliszacharidok, lipoteichoinsavak, tisztán fehérjék vagy fehérjekomplexek. A fágok csak azokat a baktériumokat képesek megfertőzni, amelyek hordozzák az adott fág kötődését lehetővé tevő receptorokat. Amennyiben a baktériumban a receptort érintő mutáció következik be az az adott fággal szembeni rezisztenciához vezethet. Mivel a fágok önálló mozgásra nem képesek ezért csak passzív mozgással a környezetül szolgáló vizes oldat mozgásával véletlenszerűen találkoznak a megfelelő baktériumon a receptormal. (Mc Grath és Sinderen, 2007; Mann, 2005; Wommack és Colwell, 2000)

A fágoknak általában szigorú a gazdaspecifitása. Általában csak egy baktériumot képesek fertőzni, sőt egy fajon belül is különbség tehető, hogy az adott baktérium hordozza-e az adott fágna megfelelő receptort vagy sem, így egy baktérium faj különböző törzsei is elkülöníthetők a fágok által, gyakran semmilyen más módszerrel el nem különíthető törzsek is. Sokkal

ritkábbak a széles gazdaspecifitású fágok ezeket polivalens vagy WHR (Wild Host Range) bakteriofágoknak is nevezik, fágterápiás célokra ezek lennének a legmegfelelőbbek, mert olyan rögzültebb felszíni struktúrákhoz kötődnek, amelyek ritkábban mutálódnak és sok baktériumtörzsön vagy akár a célzott faj minden egyes egyedén is megtalálható. Mert így ritkábban alakul ki ellenük rezisztencia és több fajta baktérium ellen is használhatók. (Gergely, 2003; Mann, 2005)

1.2 Fágterápia

A fágok terápiás felhasználásának lehetősége már a felfedezésükkor felvetődött. Egyik első felfedezőjük d'Herelle rendszeres vizsgálatokat végzett a bakteriofágokkal, főleg terápiás alkalmazásukkal kapcsolatban. A fágterápia első sikeres alkalmazására 1919-ben a párizsi Hopital des Enfants-Maladesben került sor ahol d'Herelle és Hutinel egy 12 éves súlyos vérhasban szenvedő fiút kezelt fágokkal. A fiú pár napon belül teljesen felépült. Később még három vérhasban szenvedő betegen végeztek sikeres kezelést. A bakteriofágokkal való kutatások ezekben az években széles körben elterjedtek pl. Franciaországban (L'REAL), az USA-ban (Eli Lilly Co.) és a Szovjetunióban (Eliava intézet) is. A fágterápiás kutatások azonban az antibiotikumok felfedezése és széles körben való elterjedése után háttérbe szorultak. Az antibiotikumok több szempontból előnyösebbek voltak: könnyű tömeggyártás, széles hatásspektrum, könnyebb kezelhetőség és tárolás. A nyugati országokban 1940-es évektől felhagytak a fágterápiás kutatásokkal és csak az ezredforduló környékén kezdtek újra foglalkozni a fágok terápiás célú felhasználásával az egyre több megjelenő antibiotikum rezisztens bakteriális kórokozó miatt. A bakteriofágok kutatása az 1940-es évektől csak a Szovjetunióban folyt tovább, a legjelentősebb kutatóintézmény az 1920-években Grúziában alapított Eliava Institue volt. Kutatási eredményeik hosszú ideig elérhetetlenek voltak a nyugati kutatók számára. Grúziában most is az Állami Kórház keretein belül végeznek fág terápiás kezeléseket és a világ minden tájáról érkeznek ide betegek kezelésre, akiket az antibiotikum rezisztencia miatt reménytelennek könyveltek el. A baktériumok közt fellépő egyre gyakoribb rezisztencia miatt fontossá vált az alternatív megoldások kutatása is, így kerültek újra előtérbe a világon többfelé is a fágok terápiás alkalmazásának kutatása. A terápiás célokra a lítikus faj vagy törzs specifikusan nagy hatékonyságú fágok a legmegfelelőbbek. (Sulakvelidze, 2001)

1.3 A *Staphylococcus aureus* általános jellemzése

A *Staphylococcus aureus* törzsei a normál flóra tagjai, melyek elsősorban melegvérű állatok és az ember bőrén, orrában és nyálkahártyákon előforduló baktérium. Alakjuk szabályos gömb, 0,8- 1 μm átmérővel. Szilárd táptalajon szőlőfürtűhöz hasonló csoportokat képeznek. Folyékony tápoldatban egyesével, párosával és rövid láncokban fordulnak elő. Fakultatív anaerob baktérium, mind aerob mind anaerob környezetben jól szaporodik. Könnyen tenyésztethető, egyszerű táptalajokon is jól szaporodik. 10 és 42 °C között szaporodik. A szaporodási optimuma 37 °C van. Jól tűri a hiperozmózist akár 7,5% NaCl koncentrációnál is szaporodik. Tápagaron telepei aranysárgák véres agaron szürkésárgák és béta-hemolitikus udvar van körülöttük. Exokoaguláz enzimet termel valamit választ ki a környezetébe ezzel a tulajdonságával erősen elkülönül a többi *Staphylococcus* fajtól. A koaguláz pozitivitás jelentős taxonómiai és patogenitási tulajdonság. Ez az enzim a fibrinogént fibrinné alakítja, vagyis a vérplazmát megalvasztja. A humán bakteriális fertőzések számát tekintve a *Staphylococcus* genusz áll az első helyen. Köztük is a legkifejezettebb kórokozó képességekkel a *S. aureus* törzsek rendelkeznek. A *S. aureus* az immunológiailag nem deficiens szervezetre is pathogen, ha a passzív behatolás feltételei megvannak tehát a bőr és nyálkahártya sérülések. Leggyakrabban a bőrön okoznak gennyesedéssel járó elváltozásokat. Elsősorban sebgennyesedések. Ritkábbak a mélyebb folyamatok, amik általában felszíni folyamatokból indulnak ki. A fertőzés típusa nagyban függ attól, hogy az adott *S. aureus* törzs milyen patogenitási faktorokkal rendelkezik. Mint például toxinok és maszkírozó fehérjék. A pathogén törzsek mindegyike termel lipoteikolsavat.(Gergely, 2003)

1.4 Antibiotikum rezisztencia

A bakteriális antibiotikum rezisztencia a baktériumok antibiotikumokkal szembeni ellenálló képessége. Ez lehet teljes vagy részleges. Egyes baktériumok sosem voltak érzékenyek bizonyos antibiotikumokkal szemben, mivel hiányzik belőlük az adott antibiotikum célmolekulája, vagy az anyagcsere folyamat, amire hat. Ezt hívják természetes rezisztenciának. (Pesti, 2001; Courvalin, 1994).

Másrészt létezik szerzett rezisztencia, amely a természetes kiválasztódás útján jön létre. Ennek több típusa van attól függően milyen mechanizmuson alapszik.

A rezisztens baktériumok megjelenésének legfőbb oka az antibiotikumok mérlegelés nélküli használata és az ennek hatására létrehozott szelekciós nyomás növeli a rezisztenciagének horizontális géntranszferrel történő terjedését. Nem meglepő, hogy a legtöbb rezisztens törzs kórházakban alakul ki, gyakori kórokozókban mint *Staphylococcus*okban. (Forbes et al, 2007; Wegener, 2003; Heuer és Smalla, 2007)

1.5 A *Staphylococcus aureus* antibiotikum rezisztenciája

A *Staphylococcus*ok természetes rezisztenciával rendelkeznek a polymyxinokkal, nitroimidazolokkal, bacitracinnal, nalidixinsav és oxolinsav származékokkal valamint a polién antibiotikumokkal. A *Staphylococcus*ok törzsek között gyakran alakul ki rezisztencia, bizonyos antibiotikumokkal szemben. Erre egyik legkorábbi példa a penicillinekkal szembeni rezisztencia kialakulása, melyet már röviddel a penicillin (Sir Alexander Fleming 1928) 1940-es évek második felében történt terápiás bevezetése után jeleztek. Penicillinnel szembeni rezisztencia a penicillináz nevű enzimnek köszönhető és nagyfokú elterjedése a szelekcióval magyarázható különösen kórházi körülmények közt. A kórházi fertőzésekből izolált törzsek legnagyobb része már penicillin rezisztens. Erre megoldást jelentettek a penicillináz stabil penicillinek megjelenése ilyen a methicillin, oxacillin, nafcillin amik a hétköznapi fertőzéseknél még mindig 95% hatékonysággal rendelkeznek, de a kórházi nosokomiális fertőzésekből izolált *S. aureus* törzsek 25-60%-ban rezisztensek a methicillinnel szemben. A *S. aureus* methicillin rezisztenciáját a transpozon *mecA* génen kódolt. A methicillin rezisztens *S. aureus* (MRSA) és a methicillin rezisztens koaguláz negatív *S. aureus* (MRKNS) törzsek keresztrezisztensek az összes penicillin, carbapenem és cephalosporin készítménnyel szemben, vagyis az összes β -laktám típusú antibiotikummal. A methicillin rezisztencia gyakran társul más típusú antibakteriális szerekkel szembeni rezisztenciával, mint az aminoglikozid rezisztencia. Tehát a multirezisztens törzsek kialakulása is gyakran előfordul. (Gergely, 2003)

2. Célkitűzések

- 1., Elsődleges célunk a rendelkezésünkre álló MRSA törzseket hatékonyan lízálni képes bakteriofágok izolálása környezeti mintákból.
- 2., Az izolált fág törzsek hatékonyságának illetve spektrumának ellenőrzése a rendelkezésünkre álló MRSA törzseken, valamint a fágok és gazdatörzseik közti stabil gazda parazita kapcsolat ellenőrzése.
- 3., Egy hatékony lítikus fág izolálása, amely modellként szolgálhat a fágpropagálást meghatározó környezeti tényezők vizsgálatánál. Az izolált fág jellemzése morfológiai és genetikai módszerekkel.
- 4., Egy ideális kiinduló baktérium-fág arány megállapítása mely jótékony hatással van a fág szaporodás hatékonyságára.
- 5., Annak vizsgálata, hogy egy a gazdabaktériumával szemben stabil hatékonyságot mutató lítikus fág gazdabaktériumhoz való kapcsolódását/propagálását milyen mértékben befolyásolják az egyes környezeti tényezők. Ennek keretében a szakdolgozati munka céljai közé tarozott megvizsgálni, hogy a tápoldatban jelenlevő kétértékű ionok, mint a Mg^{2+} és Ca^{2+} - koncentrációi, valamint a tápközeg minősége mennyiben befolyásolja a fágpropagálás hatékonyságát.
- 6., A $\Phi 4R$ lítikus fág gazdaspektrumának vizsgálata.
- 7., A $\Phi 4R$ lítikus fág megszekvenált genomjának analízise és összehasonlító vizsgálata.

3. Anyagok és módszerek3.1 Anyagok

3.1.1 Felhasznált MRSA törzsek

Kísérleteinkhez tizennégy humán izolátum MRSA törzset használtunk. A kísérletek leírásánál az általunk adott sorszámokat használtuk a törzsek megnevezésére nem a hivatalos kódjelüket.

1. Táblázat. Az MRSA törzsek kódjelei és az általunk adott sorszámok.

Az MRSA törzsek kódjelei:	Az általunk adott sorszámok:
haMRSA törzsek:	
06-01388 ST247	1
93-01000 ST254	2
06-01597 ST239	3
06-02182 ST22	4
06-01019 ST45	5
06-01750 ST228	6
06-00219 ST5	7
06-00409 ST225	8
caMRSA törzsek:	
03-02773 ST1	9
06-00631 ST5	10
06-00373 ST8	11
05-01089 ST22	12
06-02000 ST80	13
06-00467 ST152	14

3.1.2 LB (Luria Bertani Broth) tápoldat, táptalaj:

NaCl	5	g
Bacto pepton	10	g (Oxoid)
Yeast extract	5	g (Scharlau)

Agar	15	g (csak táptalajnál) (Prolabo)
Desztillált víz	1000	ml-re kiegészíteni

3.1.3 Müller Hinton I (MH I.) tápoldat, táptalaj:

MH I. táptalajpor	21	g (Scharlau)
Agar	15	g (csak táptalajnál) (Prolabo)
Desztillált víz	1000	ml-re kiegészíteni

3.1.4 Müller Hinton II (MH II.) táptalaj, tápoldat:

MH II. táptalajpor	22	g (Becton dickinson)
Agar	15	g (csak táptalajnál) (Prolabo)
Desztillált víz	1000	ml-re kiegészíteni

3.1.5 TSB (Tryptic Soy Broth) táptalaj, tápoldat:

TSB táptalajpor	30	g (Scharlau)
Agar	15	g (csak táptalajnál) (Prolabo)
Desztillált víz	1000	ml-re kiegészíteni

3.1.6 BHI (Brain Heart Infusion) táptalaj, tápoldat:

BHI táptalajpor	37	g (Scharlau)
-----------------	----	--------------

Agar	15	g (csak táptalajnál) (Prolabo)
Desztillált víz	1000	ml-re kiegészíteni

3.1.7 CF táptalaj, tápoldat:

Casamino acid	10	g (Difco)
Yeast extract	1.5	g (Scharlau)
1% MgSO ₄	5	ml
1% MnCl ₂	0.5	ml
Agar	15	g (csak táptalajnál) (Prolabo)
Desztillált víz	1000	ml-re kiegészíteni

3.1.8 Tripton táptalaj, tápoldat:

Trypton por	10	g (Oxoid)
Agar	15	g (csak táptalajnál) (Prolabo)
Desztillált víz	1000	ml-re kiegészíteni

3.1.9 PBS (Phosphate Buffered Saline):

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
Desztillált víz	1000	ml-re kiegészíteni

3.1.10 Foszfovolfrámsav festőoldat:

foszfovolfrámsav 0.3 g

Desztillált víz 10 ml

0.1 N NaOH adagolása a pH 7.2-7.4 beállításáig

3.1.11 Elektronmikroszkópos vizsgálat

Foszfo-Wolfrámsav 1,5 %

Réz grid mintánként 1 db

3.1.12 DNS munkákhoz oldatok

Restrikciós endonukleázos DNS kezelés

10x puffer 2 µl

Enzim 1 unit (0,5-2µl)

DNS 1-10 µl

Desztillált víz 20 µl-re kiegészítve

1x TAE-futtató puffer agaróz gélhez:

Tris-HCl 4.84 g

Ecetsav cc. 1,1 ml

EDTA (pH8) 2ml

Víz 1 literre

Loading puffer:

30% glicerín 0,01 g bromfenolkék 70% desztillált víz

Molekulasúly marker: Kaleidoscope festett marker (Biorad)

3.2 Módszerek**3.2.1 Baktériumtörzsek és fáguszuspenziók konzerválása**

25-30% glicerint tartalmazó tápoldatban történt a baktériumok és fágok szuszpenziójának -80 °C-on történő konzerválása. Ennek során 600 µl over night baktérium szuszpenzióhoz adtunk 300 µl 85% steril glicerín oldatot. Majd az így nyert szuszpenziót fagyasztócsőben lefagyasztottuk. Hasonlóan jártunk el a durva környezeti minták szuszpenziói és a már tisztított fáguszuspenziók konzerválása esetén is.

3.2.2 Baktérium over night (O/N) kultúra készítése

Steril vérszállító csőbe 5 ml LB tápoldatot mértünk, és ebbe oltottunk oltókacs használatával a fagyasztott glicerines fagyasztócsőből vagy előzőleg szélesztett és izolált kolóniát tartalmazó táptalajról. Az így nyert beoltott kultúrát egy napig 37 °C-os rázótermosztátban inkubáltuk.

3.2.3 Mintavétel és fág izolálás

A fág izoláláshoz szükséges környezeti mintákat állati almokból, valamint állatok testfelszínéről tuferral gyűjtöttük. Ezen kívül még a Pellérdi Szennyvíztisztító Telepről is volt alkalmunk szennyvízmintákat beszerezni. Az alommintákat valamint a tuferral vett mintákat Baranya Megye területén belüli gazdaságoknál és a Pécsi Állatkertből gyűjtöttük. Az alommintákat és a szennyvízmintákat 50 ml centrifugacsövekbe helyeztük el és tároltuk. A tuferral vett mintákat 5 ml LB tápoldatot tartalmazó kémcsőbe helyeztük.

A mintagyűjtést követően megkíséreltük a birtokunkban levő MRSA törzsek segítségével a mintában esetlegesen jelenlevő és rájuk specifikus fágok felszaporítását. Ehhez először a

gazdabaktériumokból kellett kultúrát előállítani, tehát mind a 14 fagyasztott glicerines MRSA törzset leoltottuk kacs segítségével 5 ml LB tápoldatba majd azokat egy napra 37 °C-os rázótermosztátba tettük inkubálni. A következő nap a 14 MRSA O/N kultúrából kevert kultúrát (MRSA mixet) készítettünk, úgy hogy összeöntöttük őket egy 100 ml-es lombikba. Ezek után a 40ml LB médiumot tartalmazó 100 ml-es lombikokba a mintákból adott mennyiségeket tettünk. Az alommintákból 2-3 g-nyit. A tuferral vett mintából 5 ml-t, a szennyvízmintákból pedig 5 ml-t. Az így kapott lombikokat beoltottuk a fenti 500 µl O/N MRSA kevert kultúrával. A lombikokat ezek után rázótermosztátba helyeztük 24 órára 37 °C-os hőmérsékleten. Ezt követően minden egyes lombik tartalmát külön külön 50 ml-es centrifugacsövekbe mértük és 4500 rpm-en 10 percig centrifugáltuk, annak érdekében, hogy leüleptsük a szuszpenzióban levő baktériumok nagyrészét, valamint a mintában esetlegesen meglévő és kiülepíthető szennyeződések. A fágokat tartalmazó felülúszót ezután átmértük egy másik 50 ml centrifugacsőbe és 1:50 arányban kloroformot adtunk hozzá, hogy a felülúszóban esetlegesen megmaradt baktériumokat is elölje. A kloroform tartalmú szuszpenziót kézzel összeráztuk, majd másnapig hűtőszekrényben tároltuk. A tárolást követően 4500 rpm-en ismét lefugáltuk annak érdekében, hogy megszabaduljunk a kloroformtól és az esetleges további baktériumtörmelékektől. Az így keletkezett felülúszót tárolás céljából steril centrifugacsőbe öntöttük. Ezen csövekből történt az egyes MRSA törzsekre specifikus fágok izolálása. Ehhez leoltottuk mind a 14 MRSA törzset 5 ml LB tápoldatot tartalmazó vérszállító csövekbe, majd másnapig 37 °C-on rázótermosztátban inkubáltuk őket. Ezt követően mind a 14 O/N MRSA kultúrából ötszörös hígítást készítettünk PBS-ben és mindegyikből 500 µl-eket szélesztettünk LB agar tartalmú táptalajokra. A baktérium szuszpenziót tartalmazó táptalajokat szobahőn, félnyitott tető alatt megszáritottuk, majd a táptalajokra 4-4ml 55°C-os topagart (0,4%) öntöttünk, melynek mindegyike tartalmazott 100µl kloroformozott szuszpenziót (lehetséges fáguszuszpenziót). A topagaros táptalajokat ezután 37 °C-os termosztátba tettük 24 órára. A következő nap a plakkok megjelenése jelezte, hogy az adott mintában volt-e az adott MRSA törzsre lítikus fág.

3.2.4 Fágok tisztítása, felszaporítása és a stabil fág gazdabaktérium kapcsolat ellenőrzése

Annak érdekében, hogy a durva fáguszuszpenziókból kisselektáljunk egy tiszta fágtörzset, a fág izolálásból származó és pozitív eredményt adó topagaros táptalajokból kisméretű steril

spatulával kivágtunk egy-egy nagyobb plakkot és 5 ml LB tápoldatba helyeztük, egy napra 37 °C-os rázótermosztátban inkubáltuk. A kivágott agaron a plakkal együtt kivágott MRSA gyepe elég a tápoldat bakteriális beoltására. A pakkban lévő fágok ezen gazdabaktériumon szaporodnak fel. Egy plakk nagy valószínűséggel egy fágból indult ki, így egy izolált törzsnek tekinthető. De ezt egyértelműen akkor állíthatjuk, ha a most leírt tisztítási lépést legalább kétszer megismételjük és mindig izolált plakkot vágunk ki. A következő nap mindegyik kultúrából 2 ml-eket mértünk 2 ml-es Eppendorf csövekbe 5000 rpm-en lecentrifugáltuk, hogy leülepítsük a baktériumokat. A felülúszókból 1.4 ml-eket mértünk 1.5 ml Eppendorf csövekbe és 1:50 arányban kloroformot adtunk hozzá, hogy a centrifugálás után még a megmaradt baktériumokat elöljük. A kloroformozott fáguszuspenziókat ezután 1 napra 4 °C-os hűtőbe raktuk. Még ezen a napon mind a tizennégy MRSA törzset leoltottuk 5 ml LB tápoldatba a fagyasztott glicerines kultúrából kacs használatával. Így a következő napra mind a tizennégy MRSA törzsből lett over night kultúránk amelyekből ötszörös hígítást készítettünk és Petricsészés LB táptalajokra felvittük 500 µl-eket, ahol üvegbottal szélesztettük és Bunsen égő lángja mellett szárítottuk. Ekkor a kloroformozott fáguszuspenziókat lecentrifugáltuk 5000 rpm-en, hogy a kloroformot és a megmaradt baktérium üledéket eltávolítsuk. A felülúszókból 1 ml-eket újabb 1.5 Eppendorf csövekbe mértünk. Ezek lettek a kísérlethez használt fáguszuspenziók, amelyekből 10µl-eket lecseppentettünk mind a tizennégy törzsből készült baktériumgyepre. A táptalajokat ezután egy napra 37 °C-os termosztátba tettük. A következő nap a baktériumgyepeken megjelenő feltisztulási zónák jelezték, hogy az adott fág törzs mely MRSA törzseken szaporodott. A feltisztulás mértéke pedig jellemezte a fágnek az adott MRSA törzs elleni hatékonyságát. A feltisztulás lehet teljes vagy részleges, részleges esetén, ha sok kis pakk látszik, az azt jelzi, hogy a fág csak lassan szaporodik az adott törzsen, ha pedig a feltisztulási zónában a baktérium kisebb telepeket alkot vagy zavarossá teszi a feltisztulási zónát, az azt jelenti, hogy könnyen válik rezisztensé az adott MRSA törzs, az adott fág törzs ellen. A következőkben plakk kivágásos felnövesztést, valamint a fág tömény fáguszuspenzióból való leoltását tápoldatban növény MRSA kultúrába és azon felnövesztését többször ismételtük, hogy megállapíthassuk mely fágtörzsek, mely MRSA törzseken képesek stabilan nagy hatékonysággal szaporodni rezisztencia megjelenése nélkül. Az ezek után megfelelőnek látszó fágtörzsekből hígítási sort készítettünk és az egyes hígításokat ellenőriztük a felszaporításra használt MRSA törzseken, hogy megállapítsuk a fág szaporodó képességét, illetve megállapíthassuk az elért titerszámot.

3.2.5 Baktériumszuszpenziók csíraszámának meghatározása

Annak érdekében, hogy meghatározzuk az 5 MRSA baktérium csíraszám értékeit O/N kultúrában, O/N kultúrából képzett OD₆₀₀ 1 kultúrában és logaritmikus fázisban, a következő kísérletet végeztük. 2 vérszállító csőbe 5-5 ml LB tápoldatot mértünk és oltókacs használatával táptalajról beoltottuk a vizsgálandó baktériumot. Az így beoltott tápoldatokat 37 °C-os rázótermosztátba helyeztük és egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap, az egyik vérszállítócsőből 50 µl-t szuszpenziót 5 ml friss LB médiumba oltottunk, majd rázótermosztátba helyeztünk. Logaritmikus növekedési fázisba (OD₆₀₀ 0,6-0,8) kerülvén kivettük azt a rázótermosztátból. A fenti kultúrákból 100 szoros léptékű hígítási sort készítettünk a -8 hígítási fokig. Minden egyes hígítási fokból 500 µl-eket szélesztettünk üveg szélesztőbot segítségével. A megszáradt táptalajokat végül 37 °C-os termosztátba helyeztük egy napra. A következő nap az erre megfelelő hígításoknál meg tudtuk számolni az egyes baktériumtelepeket és mivel egy telep egy baktériumból indult ki, így a hígítási fokokból visszaszámolva megkaptuk a 3 tömény szuszpenzió csíraszámát (Colony forming unit: CFU/ml).

3.2.6 Az 5 MRSA szuszpenzió töménységének hatása a Φ4R fág felszaporodására

Kísérletünkben 3 vérszállító csőbe 5-5 ml LB tápoldatot mértünk és kacs használatával beoltottuk fagyasztott glicerines 5 MRSA-val. Az így nyert szuszpenziókat 37 °C-os rázótermosztátba helyeztük és egy napig inkubáltuk. A következő nap a három over night kultúrából hígítással három 5 ml-es OD1 szuszpenziót állítottunk elő. Közülük egyből 10-szeres hígítási sort készítettünk a -2 hígításig, egy másikat pedig lecentrifugáltunk, hogy a baktériumok leülepedjenek majd 500 µl PBS-be felszuszpendáltuk így 10-szeres töménységű szuszpenziót nyertünk. Így négy különböző töménységű szuszpenziót kaptunk egy 10xOD1, OD1, 0.1xOD1 és egy 0.01xOD1-set. A négy szuszpenzióból 500 µl-eket négy Petricsészés LB táptalajra vittünk fel és üvegbottal szélesztettük, majd szárítottuk. Miután megszáradtak mindegyikre 10 µl tömény Φ4R fáguszuszpenziót cseppentettünk és végül a táptalajokat 37 °C-os termosztátba helyeztük egy napra. A következő nap ellenőrizhettük, hogy a lecseppentések helyén tapasztalható-e feltisztulás a baktériumgyepen.

3.2.7 A Mg^{2+} és Ca^{2+} sók koncentrációjának hatása a bakteriofág felszaporodására

Kísérletünkben 3 só ($MgSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$) koncentrációjának hatását vizsgáltuk a $\Phi 4R$ fág felszaporodásának mértékére az 5 MRSA gazda baktériumon. Mivel közismert, hogy a kétértékű sók (Ca^{2+} , Mg^{2+}) szükségesek a fág baktérium receptorkötéshez ezért kívántuk megállapítani azt, hogy kísérleti összeállításunkban egy *Staphylococcus aureus* törzs és annak lítikus fágja kapcsolódását, hogyan befolyásolják az eltérő Ca^{2+} és Mg^{2+} koncentrációk. Kísérletünkhöz először over night kultúrát készítünk az 5 MRSA törzsből. Ezután 13 vérszállító csőből 12-be 4,5-4,5 ml LB tápoldatot mértünk és 500-500 μ l sóoldatot adtunk hozzá. Az első négyhez $MgSO_4$ oldatot adtunk a következő sorrendben 1 mólosat, 0.1 mólosat 0.01 mólosat és 0.001 mólosat. A következő négyhez $MgCl_2$ oldatot adtunk megint 1, 0.1, 0.01, 0.001 mólosakat. Az utolsó négyhez $CaCl_2$ oldatot adtunk ismét 1, 0.1, 0.01 és 0.001 mólosakat. Ennek megfelelően a csövekben 0.1, 0.01, 0.001 és 0.0001 mólos sóoldatok voltak jelen. Valamint plusz egybe csak 5 ml LB tápoldatot tettünk ez lett a kontroll kultúra tápoldata. Majd mindegyik tápoldatot beoltottuk 50 μ l 5 MRSA-val és 10 μ l $\Phi 4R$ fáguszuspenzióval. Majd az így nyert kultúrákat 37 °C-os rázótermosztátba tettük 24 órára. A következő nap mindegyik kultúrából 2 ml-eket mértünk 2 ml-es Eppendorf csövekbe 5000 rpm-en lecentrifugáltuk, hogy leülepítsük a baktériumokat. A felülúszókból 1,4 ml-eket mértünk 1.5 ml Eppendorf csövekbe és 1:50 arányban kloroformot adtunk hozzájuk, hogy a centrifugálás után még esetlegesen megmaradt baktériumokat elöljük. A kloroformozott fáguszuspenziókat ezután 1 napra 4 °C-os hűtőbe raktuk. Még ezen a napon leoltottunk egy újabb over night kultúrát 5 MRSA-ból az előzőekben leírtak alapján. A következő nap a kloroformozott fáguszuspenziókat lecentrifugáltuk 5000 rpm-en, hogy a kloroformot és a megmaradt baktérium üledéket eltávolítsuk. A felülúszókból 1 ml-eket újabb 1,5 Eppendorf csövekbe mértünk, ezek lettek a kísérlethez használt tömény fáguszuspenziók, melyekből 10-szeres hígítási sort készítettünk a -6-ig. Az 5 MRSA over night kultúrából pedig PBS-el 5-szörös hígítást készítettünk, amiből 500 μ l-eket vittünk fel és üvegbottal terítettünk szét az egyes Petricsészés LB táptalajokon. A táptalajokat ezután Bunsen égő lángja mellett szárítottuk. Miután a táptalajok megszáradtak a fáguszuspenziókból készült hígítási sorok minden eleméből 5 μ l cseppentettünk az előre megjelölt helyeken. Ezután a táptalajokat 37 °C-os termosztátba helyeztük 24 órára. Majd a következő nap a megfelelő hígításoknál (ahol számolhatóak a plakkok) megszámoltuk a plakkokat így meghatározhattuk az adott fáguszuspenzió titerét.

3.2.8 Különböző tápközegek hatása a Φ 4R bakteriofág felszaporodásának mértékére

Kísérletünkben 7 különböző tápoldatban növesztett 5 MRSA baktériumon tenyésztett Φ 4R fág hatékonyságát vizsgáltuk 7 különböző táptalajon növesztett 5 MRSA baktériumon. Kísérletünkhöz először over night kultúrát készítettünk az 5 MRSA törzsből. Ezután 7 különböző tápoldatból (LB, MH1, MH2, TSB, BHI, CF, Tripton) vérszállító csövekbe mértünk ki 5-5 ml-eket, ezekbe oltottuk az 50 μ l 5 MRSA over night kultúrát és a 10 μ l tömény Φ 4R fáguszuspenziót. Az így nyert kultúrákat 1 napig 37 °C-os rázótermosztátban inkubáltuk. A következő nap mind a hét kultúrából 2 ml-eket mértünk 2 ml-es Eppendorf csövekbe 5000 rpm-en lecentrifugáltuk, hogy leüleptsük a baktériumokat. A felülúszókból 1.4 ml-eket mértünk 1.5 ml Eppendorf csövekbe és 1:50 arányban kloroformot adtunk hozzájuk, hogy a centrifugálás után az esetlegesen még megmaradt baktériumokat előljük. A kloroformozott fáguszuspenziókat ezután 1 napra 4 °C-os hűtőbe raktuk. Még ezen a napon leoltottunk egy újabb over night kultúrát 5 MRSA-ból. A következő nap a kloroformozott fáguszuspenziókat lecentrifugáltuk 5000 rpm-en, hogy a kloroformot és a megmaradt baktérium üledéket eltávolítsuk. A felülúszókból 1 ml-eket újabb 1.5 Eppendorf csövekbe mértünk, ezek voltak a kísérlethez használt tömény fáguszuspenziók, melyekből 10-szeres hígítási sort készítettünk a -6-ig. Az 5 MRSA over night kultúrából pedig PBS-el 5-szörös hígítást készítettünk, amiből 500 μ l-eket vittünk fel és üvegbottal terítettünk szét az egyes Petricsészés táptalajokon. Miután a táptalajok megszáradtak a fáguszuspenziókból készült hét hígítási sor minden eleméből, mind a hét táptalajtípusra felvitt baktérium gyepré cseppentettünk 5-5 μ l-eket az előzőleg megjelölt helyekre. Ezután a táptalajokat 37 °C-os termosztátba helyeztük 24 órára. Majd a következő nap a megfelelő hígításoknál megszámoltuk a plakkokat így kiszámolhattuk, hogy az adott tömény fáguszuspenzióban hány hatóképes 4R fág van az adott táptalajon nőtt 5 MRSA baktériumra.

3.2.9 A Φ 4R fág kivont DNS-ének agaroz gélen való megfuttatása

A fág DNS izoláláshoz 1.5 ml nagy töménységű fáguszuspenziót lefugáltunk 10 percig 10000 rpm-en (11.000 g). A felülúszóból 1.2 ml-t átszívtunk egy újabb 1.5 ml Eppendorf csőbe. Ezen 30 perces DN-áz és RN-áz kezelést végeztünk szobahőmérsékleten. Az enzimkezelést követően az enzimeket 100 μ l 0,5 Mólos EDTA (pH 8) oldat hozzáadásával, majd ezt követő 10 perces 75°C-os hőkezeléssel inaktívtuk. A szuszpenzióban levő fágpartikulumok fehérjeburkát 1 órás 65°C-os 10 μ l Proteinkináz K (20 mg/ml) kezeléssel elemésztettük. Az

egy óra lejárta után a mintát kétfelé osztottuk két Eppendorf csőbe 600-600 µl-t. A következő lépéseket parallel elvégeztük mindkét mintával. A mintákhoz 60 µl 7.5 mólos ammónium acetátot adtunk, majd még 600 µl fenol kloroformot. Ezután alaposan felráztuk őket, majd 10 percig fugáltuk 13000 rpm-en. Ezután a felülúszókból 500 µl mennyiséget átpipettáztunk két újabb Eppendorf csőbe és 1 ml 96% etanol (2x térfogat) adtunk hozzájuk. A lecsapás elősegítése végett 1 órára mélyhűtőbe -20°C-ra raktuk őket. Az inkubációt követően a kicsapódott DNS-eket 15 percig maximális fordulatszámon fugáltuk, majd egyszer mostuk 70% etanollal. A mintákat szobahőmérsékleten 30-60 percig szárítottuk. Szárítást követően a fág DNS-eket 30 µl steril desztillált vízben felszuszpenzáltuk. A DNS minták minőségének és mennyiségének leellenőrzése végett a DNS szuszpenzióból 2 µl-eket 1%-os agaroz gélben megfuttattuk (140 V-on).

3.2.10 A Φ4R fág morfológiai vizsgálata

Az izolált Φ4R fág morfológiai analízisét elektronmikroszkópos vizsgálattal végeztük melyhez a mintákat a következőkép készítettük elő. Egy 100 ml lombikba bemértünk 50 ml LB tápoldatot majd beoltottuk 500 µl over night 5 MRSA szuszpenzióval és 100 µl Φ4R fáguszuszpenzióval majd egy napra 37 °C-os rázótermosztátba helyeztük. A következő nap a mintát 4500 rpm-en 40 percig fugáltuk majd 0.2 µm-es baktériumszűrőn átszűrtük. Az így kapott fáguszuszpenzióból 10µl-t membránnal fedett rézgridre cseppentettünk majd 15 perc elteltével a felesleg leszívását követően 10µl 1,5%-os foszfovolftrámsavval festettük 40 másodpercig. Az így kapott mintát transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

3.2.11 A Φ4R fág spektrumának vizsgálata

Annak érdekében, hogy megismerjük az Φ4R fág esetleges szélesebb gazdaspektrumát teszteltük további *Staphylococcus aureus* és más fajba tartozó baktériumok törzsein. Összesen 84 baktériumtörzsen. Első lépésben mindegyik törzsből over night kultúrát készítettünk. Ehhez 5ml LB tápoldatba oltottuk le és egy kivételével 37 °C rázótermosztátba helyeztük. Az *Erwinia amylovora* alacsonyabb hőmérsékleti optima miatt 30 °C rázótermosztátban növesztettük. Az over night kultúrákból pedig PBS-ben 5-szörös hígítást készítettünk, amiből 300 µl-eket vittünk fel és üvegbottal szélesztettünk az LB táptalajokra. A táptalajokat ezután

Bunsen égő lángja mellett szárítottuk. Majd mindegyik táptalajra 20 µl tömény Φ4R fáguszuspenziót cseppentettünk, a cseppek felszáradása után az egyes törzseket és a Φ4R fágot tartalmazó táptalajokat 37 °C termosztátba helyeztük. Majd a következő nap megfigyeltük, hogy rácseppentés helyén keletkeztek-e feltisztulási zónák a Φ4R fág hatására. Kivétel itt is az *Erwinia amylovora* volt, amelyet 30 °C-os termosztátba helyeztünk.

3.2.12 A genom összehasonlító vizsgálata

A vizsgálatainkhoz először szükségünk volt a fág szekvenciájának ismeretére. A Φ4R fág szekvenálását a Seqomics Kft. (Mórahalom) végezte el számunkra. A kész szekvenciát ezután az ncbi (www.ncbi.nlm.nih.gov) adatbázisával összehasonlítottuk, valamint a Vector NTI program 7-es verziójával azonosítottuk a genom feltételezhetően kódoló szakaszait (open reading frame – ORF). Ezután a feltételezet fehérje kódoló szekvenciákat egyesével összehasonlítottuk az ncbi adatbázisban lévő már ismert funkciójú szekvenciákkal és ezek alapján valószínűsítettük az általunk izolált fág genomjának egyes szakaszai milyen funkcióval rendelkeznek, vagyis milyen típusú fehérjét kódolnak. További vizsgálatainkban a Mauve genom összehasonlító programmal húsz másik fág genomját hasonlítottuk össze az Φ4R fágéval. 11 magas 80% fölötti homológiát mutató fágot 2 közepes 66 és 59% homológiájú és 7 alacsony 10-20% közti homológiájú fágot. Valamint elvégeztük az ezen fágok szekvenciáinak egymással történő összehasonlítását a Mauve program segítségével. Ehhez a következő -adatbankban elérhető- fágokat használtuk és hasonlóságukat a Φ4R-hez jelöltük (JQ779023.1 98%, EU861005.1 89%, EF462198.1 89%, JX174275.1 82%, AP009363.1 86%, AF424782.1 88%, AY954956.1 82%, JQ957932.1 82%, AY954957.1 85%, KF598856.1 86%, AP012341.1 86%, AB045978.2 66%, AY954955.1 59%, AY954961.1 18%, DQ530362.1 18%, AY954960.1 15%, FJ713816.1 14%, AP011956.1 13%, AP011955.1 13%, DQ517338.1 13%):

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1 Környezeti mintákból történő fág izolálás eredményei

A környezeti mintákból történt fágizolálás eredményeit táblázatos formában foglalom össze. Ennek során 6 különböző mintavételi túra keretében minták kerültek vételezésre állattartó telepek alom mintáiból és állatok bőrfelületéről és a Pellérdi Szennyvíztisztító egyes tisztítóműi egységeiből.

2. Táblázat. Összesített táblázat a + eredményt adó mintákról, melyek az eltérő mintagyűjtésekből származnak, és amelyek az általunk vizsgált MRSA törzsek ellen bizonyultak hatékonnak.

mintagyűjtés száma	minta sorszáma	minta típusa	mintavételi objektum	MRSA törzsszámok
1	14	alom	sertés	3, 6
1	15	alom	ló	5
3	4	alom	ló	6, 14
3	5	alom	juh	6, 14
3	11	alom	szarvasmarha	14
3	13	alom	ló	14
4	3	alom	ló	5, 6
5	15	alom	mosómedve	12

Az eredményekből kitűnik, hogy egyik szennyvíz minta sem adott pozitív eredményt. Ennek magyarázata lehet, hogy a *Staphylococcus aureus* akárcsak a *Staphylococcus* nemzetség többi faja elsősorban állatok és az ember bőrfelületén élő baktérium, így az elsősorban bélbaktériumokat tartalmazó szennyvízben ezekhez képest elenyésző mennyiségben található meg és ennél fogva azon bakteriofágok is melyeknek a gazdaszervezete.

Az állatoktól vett minták közül csak az alommintákból sikerült fágot izolálnunk a bőrfelületi mintákból nem. A bőrfelületi mintákban valószínűleg a kicsi merítés miatt nem találtunk fágot. Az alom minták közül is csak az emlősök alommintáiból volt sikeres izolálás a madarakéból egy sem. Az emlősök közül is főként a haszonállatokról vett mintákban találtunk az MRSA lízisét okozó fágot. E mellett elmondható, hogy a nagyszámú minta közül is csak

kevés adott pozitív eredményt, valamint egy-egy mintából készült szuszpenzió csak egy, vagy két MRSA törzzsel szemben volt hatékony. Tehát az általunk izolált fágok magas gazdaspecifitása miatt eleve kizárható esetleges terápiás használatuk lehetősége.

4.2 A fágok felszaporítása és a stabil fág gazdabaktérium kapcsolat ellenőrzése

Mintagyűjtések során izolált fágokat az első körben pozitív baktériumokon viszontpropagáltattuk és ennek során nem minden esetben bizonyultak a fágok a tesztbaktériumaikkal szemben hatékonyaknak. (9. táblázat)

3. Táblázat. Az izolált fágtörzsek felszaporításának eredményei

mintagyűjtés száma	minta sorszáma amiből izoláltuk	felszaporításra használt MRSA törzs	felszaporítás eredménye
1	14	3	-
1	14	6	-
1	15	5	+
3	4	6	-
3	4	14	+
3	5	6	-
3	5	14	-
3	11	14	-
3	13	14	-
4	3	5	+
4	3	6	+
5	15	12	-

4. Táblázat. A pozitív eredményt adó fágtörzsek eredményei.

mintagyűjtés száma	minta sorszáma amiből izoláltuk	felszaporításra használt MRSA törzs	ellenőrzésre használt MRSA törzs	eredmény, a plakk képződés típusa
1	15	5	5	teljes feltisztulás
3	4	14	14	részleges feltisztulás, rezisztencia szigetek
4	3	5	5	teljes feltisztulás
4	3	5	6	teljes feltisztulás
4	3	6	5	teljes feltisztulás
4	3	6	6	teljes feltisztulás

A felszaporítást még háromszor megismételtük a pozitív eredményt adókkal. A pozitív eredményt adók közül 3 mintagyűjtés 4 mintájából származó az egyedüli, ami nem adott teljes feltisztulást, két esetben részleges feltisztulást rezisztencia szigetekkel, és két esetben nem mutatott plakk képződést.

A stabilan jó eredményeket adó 3 törzsnek a megnevezésére kódjelet adtunk és a későbbi kísérleteknél ezt a megnevezésüket használtuk.

5. Táblázat. A pozitív eredményt adó izolátumok kódjelei.

mintagyűjtés száma	minta sorszáma	felszaporításhoz használt MRSA törzs	kódjel
1	15	5	Φ4R
4	3	5	Φ3M2
4	3	6	Φ3M5

A fentiek értelmében az izolált törzsek közül csak 3 bizonyult hatékonynak egy vagy két MRSA törzs ellen a Φ4R és a Φ3M2 és a Φ3M5. Ezeknél a törzseknél fennáll a stabil gazda parazita viszony.

4.3 A stabil gazda parazita viszonyt mutató fág törzsek felszaporodási hatékonyságának ellenőrzése

A fág szuszpenziók hozzávetőleges csíraszámát az 5 és 6 MRSA törzseken vizsgáltuk. A T a táblázatban a tömény fág szuszpenziót jelenti. A pozitív eredmény a plakkképződést, a negatív a plakkok hiányát.

6. Táblázat. A szuszpenziók töménységének ellenőrzése az 5 (a.) és 6 (b.) MRSA gazdabaktériumokon.

a.,

szuszpenzió hígítása / fág törzs	Φ4R	Φ3M2	Φ3M5
T	+	+	+
-1	+	+	+
-2	+	+	-
-3	+	+	-
-4	+	-	-
-5	+	-	-
-6	-	-	-

b.,

szuszpenzió hígítása / fág törzs	Φ3M2	Φ3M5
T	+	+
-1	+	+
-2	-	+
-3	-	-
-4	-	-
-5	-	-
-6	-	-

Az adatokból kitűnik, hogy a Φ3M fágok ugyanazon a baktériumtörzsen ellenőrizve, mint amin eredetileg propagálva voltak jobb eredményeket adnak. Az eredményekből jól látható az is, hogy a Φ4R fág sokkal nagyobb mértékben szaporodott fel, mint a Φ3M fágok. A 4R fág a fenti kísérletekben elérte a 10^8 titert is, míg a Φ3M fágok csak 10^3 - 10^5 titer értéket értek el. A kísérletekből megállapítható, hogy a Φ4R fág felszaporodó képessége sokkal jobb és így a baktérium ellen is sokkal hatásosabb, ezért a további vizsgálatokban már csak a Φ4R fágot és gazdabaktériumát az 5 MRSA-t használtuk.

Mivel több tucat minta ellenőrzése után is csak egy nagy hatékonyságú fágot sikerült izolálnunk, ami csak egy MRSA törzs ellen hat ezért megállapítható, hogy a terápiás célokra legmegfelelőbb széles spektrumú és mindegyik gazdatörzsével szemben nagy hatékonyságú MRSA lízist okozó fág izolálásához ennél nagyobb számú minta vizsgálatára vagy nagy szerencsére lenne szükség.

4.4 Csíraszám meghatározás

Összehasonlítva az over night szuszpenzió az over night kultúrából képzett OD1 szuszpenzió illetve a logaritmikus növekedési fázisú szuszpenzió csíraszám értékeit a következő eredményeket kaptuk. (15. Táblázat)

7. Táblázat. Az egyes MRSA szuszpenziók hígításainak csíraszámai 1 ml-ben. Az „nm” rövidítés a nem megszámlálható értéket jelöli.

MRSA szuszpenzió típusai / MRSA szuszpenzió hígítása	tömény	-2	-4	-6	-8
over night szuszpenzió	nm	nm	nm	106	1
OD1 szuszpenzió	nm	nm	nm	21	0
logaritmus növekedési fázisú szuszpenzió	nm	nm	338	5	0

A megfelelő hígításokból visszszámolva megkaptuk a tömény szuszpenziók csíraszámát. Ennek megfelelően a következő csíraszámokat éri el az 5-ös MRSA 1ml tenyészetekre vetítve (CFU/ml):

8. Táblázat. A tömény MRSA szuszpenziók csíraszám 1 ml térfogatban.

MRSA szuszpenzió típusai	csíraszám/ml
over night szuszpenzió	212000000
OD1 szuszpenzió	42000000
logaritmus növekedési fázisú szuszpenzió	6760000

Az eredményekből látszik, hogy az OD1 szuszpenzió csíraszám sűrűsége majdnem pontosan ötöde az over night szuszpenzió sűrűségének. Tehát az általunk a Petricsészés táptalajok beoltásához használt ötszöröse hígított over night MRSA szuszpenzió csíraszám sűrűsége megfeleltethető az OD1 szuszpenzióénak. A logaritmus növekedési fázisban lévő szuszpenzió pedig lényegesen kisebb csíraszámokkal rendelkezik.

4.5 Az 5 MRSA szuszpenzió töménységének hatása a Φ 4R fág felszaporodására

Az eredmények alapján a 10xOD1 töménységű MRSA szuszpenzióból készült baktériumgyepen a tömény Φ 4R fág szuszpenzió nem tud plakkot létrehozni, vagyis nem képes az összes baktériumot lizálni. Az OD1 és annál kisebb töménységű szuszpenzióknál viszont minden esetben nagy tiszta plakkok képződtek. Tehát nagy töménységű baktérium szuszpenziókat alkalmazni a fág vizsgálatához nem érdemes. A kis töménységű szuszpenziók

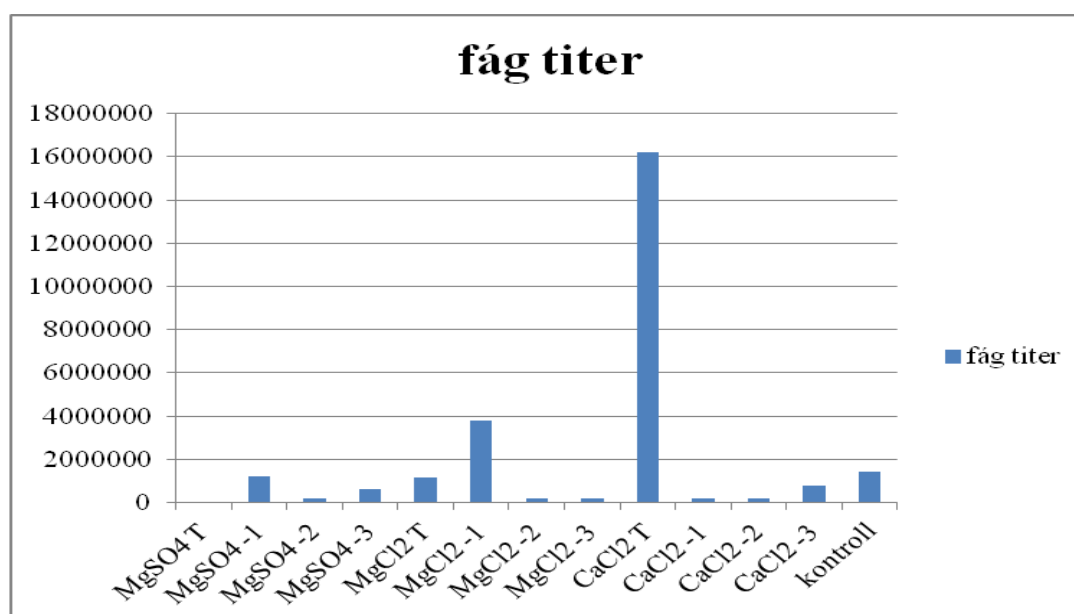
is jó eredményeket adtak viszont technikai okok miatt kevésbé praktikusak, mint az OD1 töménységű kultúra.

9. Táblázat. Mely töménységű baktérium szuszpenzióknál volt tapasztalható feltisztulás 10 µl Φ4R fág lecseppentésénél. A – jel a feltisztulás hiányát a + jel a feltisztulás meglétét jelzi.

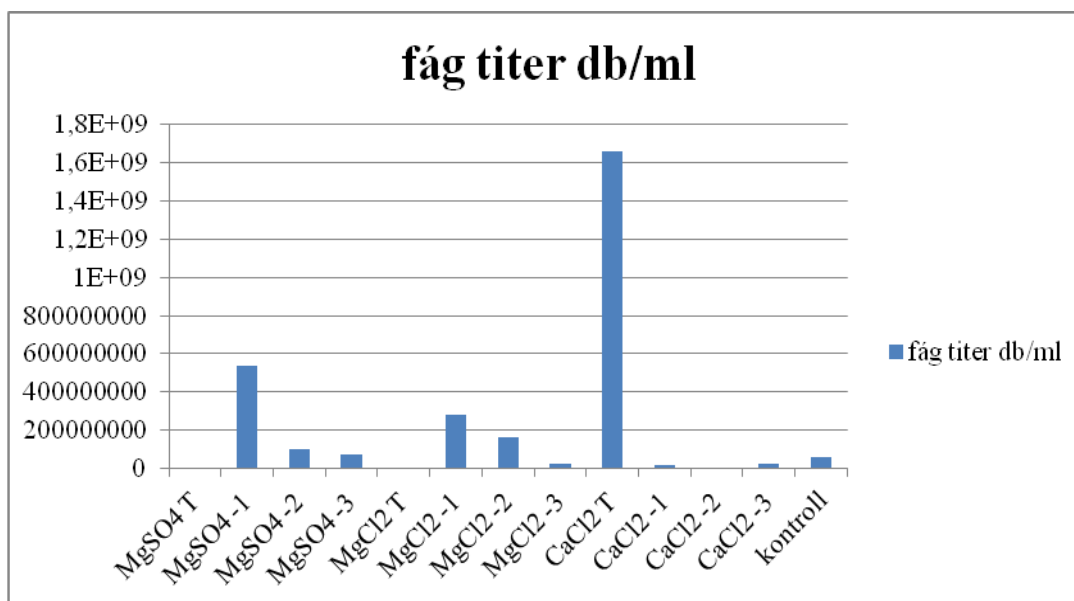
kísérlet száma/ MRSA szuszpenzió töménysége	10xOD1	OD1	0.1xOD1	0.01xOD1
1	-	+	+	+
2	-	+	+	+
3	-	+	+	+
4	-	+	+	+
5	-	+	+	+

4.6 A Mg^{2+} és Ca^{2+} sók koncentrációjának hatása az Φ4R bakteriofág felszaporodására

Annak érdekében, hogy kiderítsük az Φ4R fág 5-ös MRSA-n történő felszaporodását milyen mértékben befolyásolják a jelenlevő kétértékű kationok eltérő koncentrációi, a fágok propagálását $MgSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ sók jelenlétében azok 0.1M, 0.01M, 0.001M, és 0.0001M végkoncentrációiban LB médiumban végeztük.



2. Ábra. Az 1. kísérlet grafikonja.



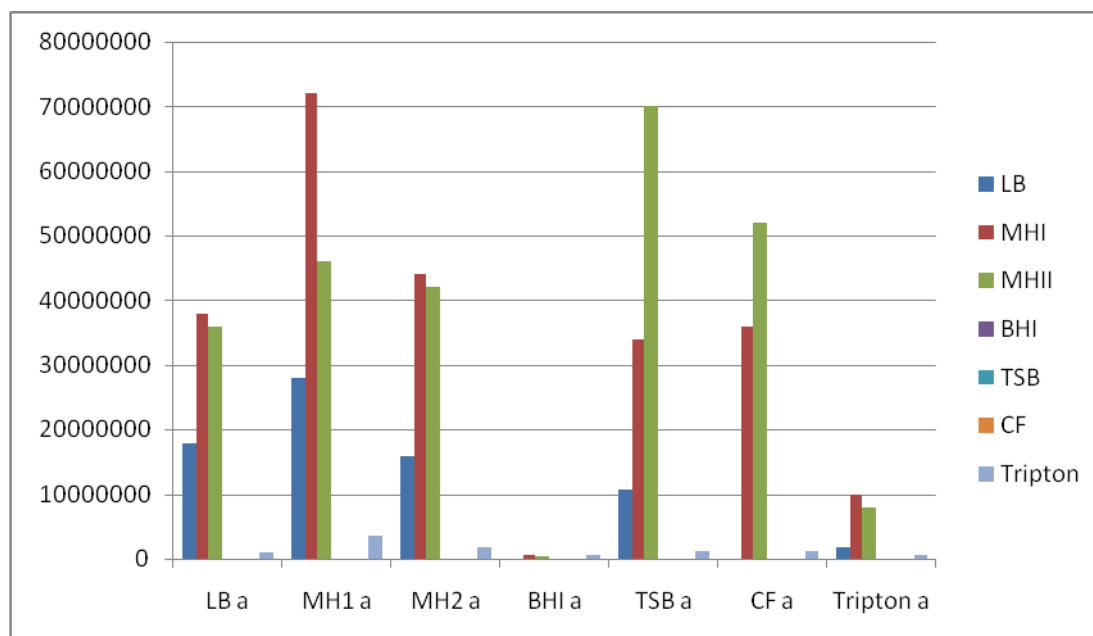
3. Ábra. A 2. kísérlet grafikonja.

Habár a kísérletek elvégzése során tapasztaltunk eltéréseket a felszaporodott fágok titerére vonatkozóan a következő megállapításokat tehetjük. A Mg^{2+} 0,1 M-os végkoncentrációban történő alkalmazása negatívan befolyásolja a fágok felszaporodást, olyan mértékben, hogy mind MgSO_4 , mind MgCl_2 esetén a fágok propagálása teljesen illetve részlegesen megakadályozottá vált. Drasztikus változás következett be abban az esetben amennyiben 10x-ére kihígult a Mg sók koncentrációja. Ekkor a fágpropagálás mértéke jóval meghaladta a kontrollét.

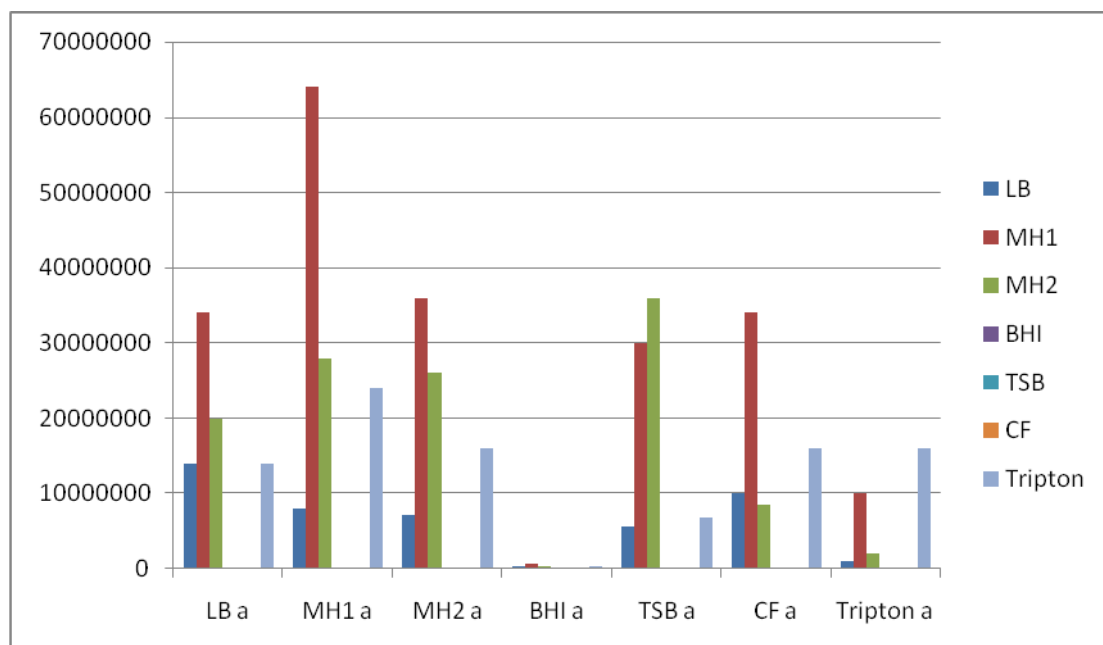
Ezzel ellentétben a CaCl_2 tömény oldata (szuszpenzióbeli végkoncentráció 0,1M) esetén mindig jelentősen nőtt a titer a kontrollhoz képest. Ellenben a kisebb koncentrációjú CaCl_2 oldatok esetén a fágtiter mindig alulmúlta a kontrollt. Ennek ellenére elmondható, hogy az alacsony (<0,1M) CaCl_2 koncentráció nem befolyásolja előnyösen a fág felszaporodását. A MgCl_2 oldatok esetén a 0.01 M végkoncentráció alkalmazása volt a legcélravezetőbb. A MgSO_4 kisebb koncentrációjú oldatainak esetén a -1-es hígítás (0,01M végkoncentráció) alkalmazása tűnt célravezetőnek. A tézis, amely szerint a kétértékű sók előnyösen befolyásolhatják a fág felnevelését, az adataink alapján az általunk izolált $\Phi 4R$ fagra is igaz.

4.7 Eltérő tápközegek hatása az $\Phi 4R$ bakteriofág propagálására

Kísérletünkben különböző táptalajokon nőtt MRSA baktériumokon felszaporított fágok titerét határoztuk meg fág/ml-ben plakk módszerrel különböző táptalajokon.



4. Ábra. A 2. kísérlet grafikonja.

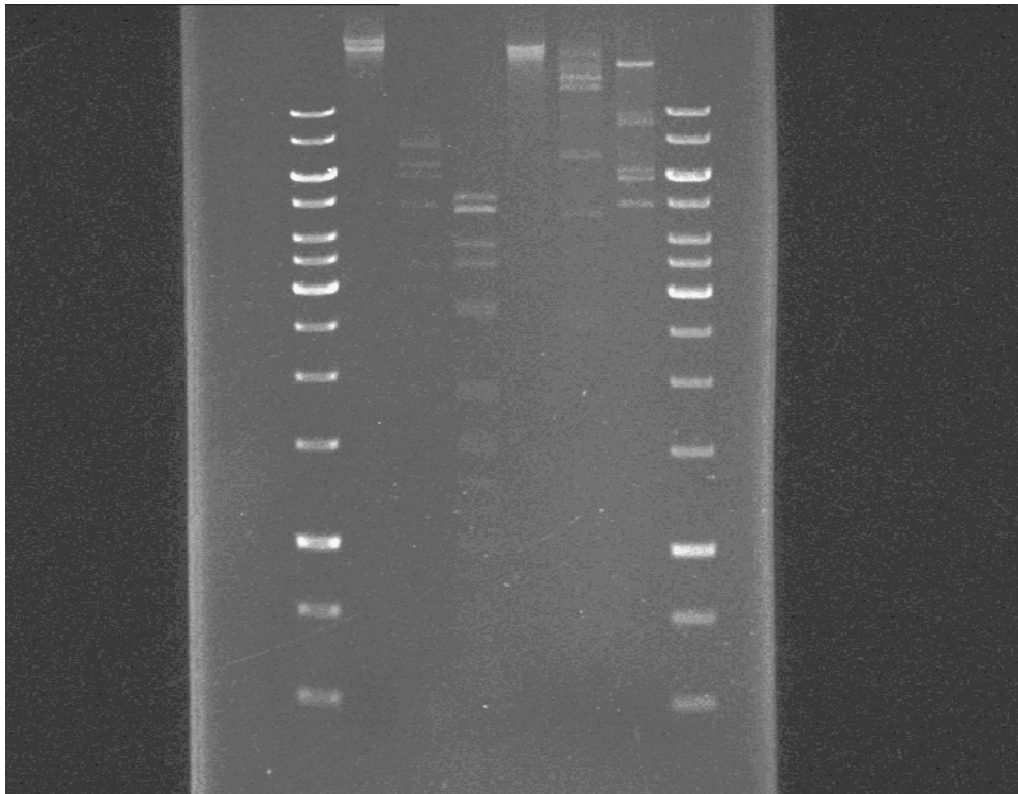


5. Ábra. A 3. kísérlet grafikonja.

Az eredmények alapján az általunk vizsgált MRSA 5 - Φ R4 rendszerben a fág felszaporításhoz a legmegfelelőbb táptalajok a gazdabaktériumnak az LB, MH1, és a MH2. Az ezen tenyészetekből készített fág szuszpenziók a különböző táptalajok baktériumgyepén magas 10^7 - 10^9 titert adtak. A Tripton is még viszonylag jó és megbízható eredményeket adott 10^5 - 10^8 fág/ml titer számokat adott az egyes táptalajokon. Kísérleti eredményeink alapján a vizsgált fág és gazdabaktériuma számára a TSB, BHI és a CF nem adott jó eredményeket. A BHI és a TSB egy gazdag táptalaj különösen a BHI ennek következtében a baktériumok erősebben növekszenek benne. Az MRSA fág kapcsolatban, mint gazda parazita kapcsolat a BHI mint tápközeg egyértelműen a gazdaszervezetet segíti. A feltevés hogy a különböző táptalajokban tenyésző MRSA baktériumokon a fágok eltérő mértékben képesek felszaporodni, ezen kísérletek alapján igaznak bizonyult. Valamint megállapítható hogy a Φ 4R fágnek még azonos körülmények között felszaporítva is tág határok közt változott a titere. Ez arra utal, hogy a fág főbb jellemzőit ugyan megtartva, de gyorsan változik még egy felszaporítás alatt is. A Φ 4R fágnek ezen kísérletek alapján is nagy lehet a mutációs rátája.

4.8 A Φ 4R fág kivont DNS-ének restrikciós enzimes hasítási analízise

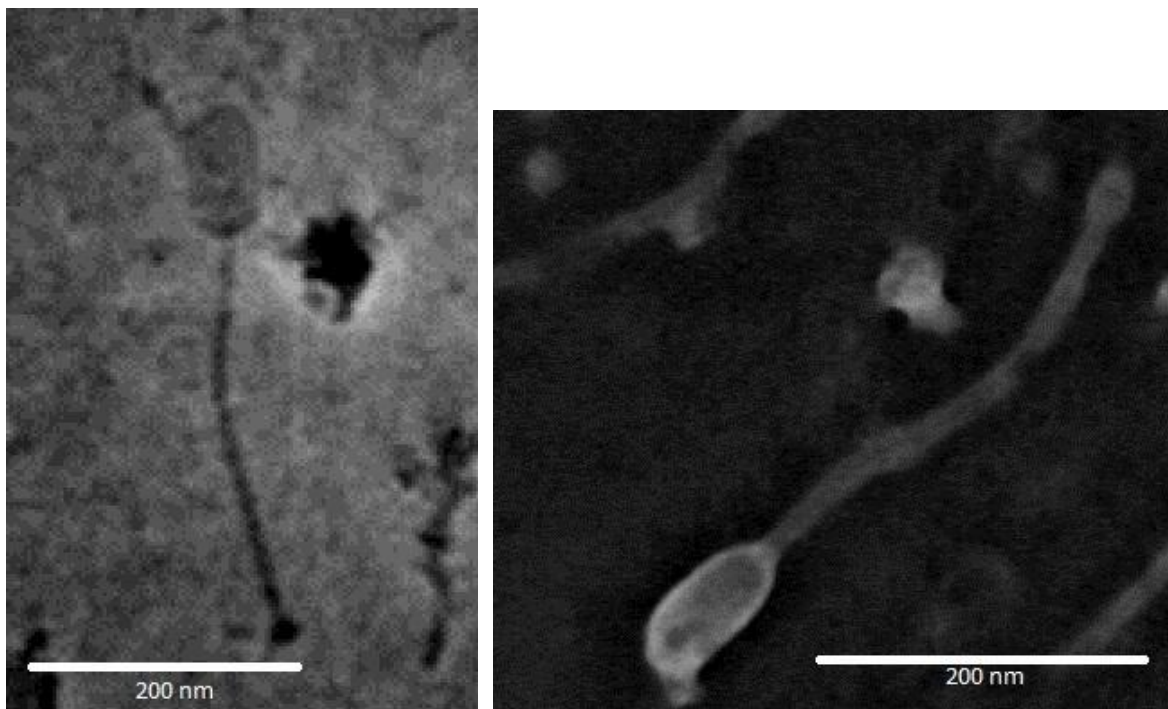
Az agaróz gélfuttatás alapján a DNS kivonás sikeres volt. A Φ 4R fágból kivont DNS mennyisége és minősége is megfelelőnek bizonyult restrikciós mintázat vizsgálatára. Ennek során öt különböző enzimmel hasítottuk a tisztított DNS-t. Ennek ismerete a későbbiekben alkalmas lesz más helyről származó, de hasonló morfológiával rendelkező fágtörzsekkel való rokonság összehasonlító vizsgálatára.



6. Ábra: A Φ 4R Fág DNS restrikciós enzimes hasítási mintázata. Az oszlopokban a következő enzimeket használtuk: 1. Molekulasúly marker, 2. Kontroll (emésztetlen DNS), 3. *EcoRI*, 4. *HindIII*, 5. *KpnI*, 6. *PstI*, 7. *SacI*, 8. Molekulasúly marker.

4.9 A Φ 4R fág morfológiai vizsgálata

A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat alapján a fágméret 300 nm körülire adódott, a fág feje pedig nagyjából 60 nm-re. Jól megfigyelhető volt a megnyúlt hengeres alakú fej és a hosszú flexibilis farki struktúra. A farki végen látható a csatlakozó struktúra, habár filamenteket nem tudtunk azonosítani. A morfológiai bélyegek alapján a Φ 4R fág az Akkerman féle felosztás alapján a *Siphoviridae* családba tartozik.



7, 8 Ábra: A Φ4R fág elektronmikroszkópos képe.

4.10 A Φ4R fág spektrumának vizsgálata

Ezen kísérlet során a Φ4R fág esetleges szélesebb gazdaspecificitásának lehetőségét ellenőriztük, összesen 84 baktériumtörzsen, legnagyobb részben eddig általunk nem vizsgált MRSA törzseken. Eredményeinket táblázatos formában foglaltam össze.

10. Táblázat. A Φ4R fág spektrumának vizsgálata. Csak a pozitív teljes vagy részleges feltisztulású plakkot adó mintákat tüntettük fel.

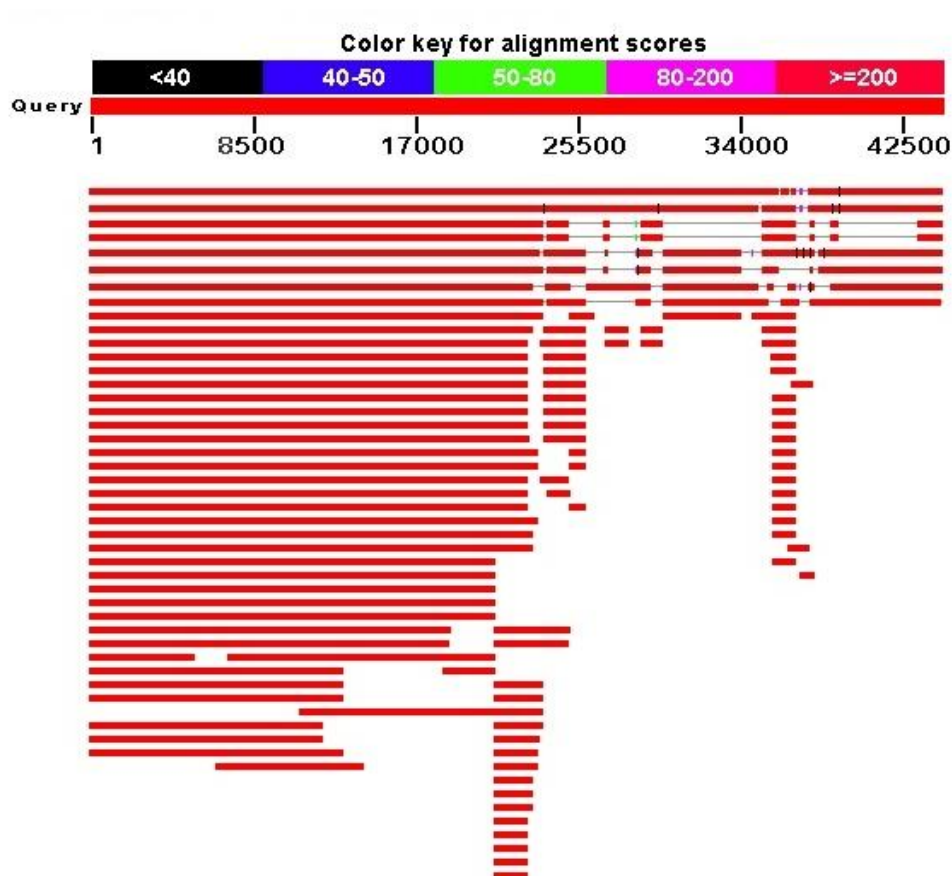
kód, származás	baktérium törzs	Φ4R fág plakk képzése
OEK47001	<i>Citrobacter freundii</i>	részleges, gyenge
ATCC 27026	<i>Citrobacter coseri</i>	részleges, gyenge
ATCC 15309	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	részleges, gyenge
Prof. Dr. Witte 93-01000	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
Prof. Dr. Witte 06-01019	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
Prof. Dr. Witte 03-02773	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
Prof. Dr. Witte 06-00631	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	részleges
Prof. Dr. Witte 06-00373	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	részleges
Prof. Dr. Witte 05-01089	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	részleges

ÁNTSZ Dél-dunántúli Reg. Int (16)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Reg Int (17)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Reg Int (20)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Reg Int (21)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Reg Int (22)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Reg Int (24)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Reg Int (25)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Reg Int (30)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes

Az eredményekből kitűnik, hogy a $\Phi 4R$ fág lítikus hatással rendelkezik egyes más MRSA törzsek esetében is. Összesen 10 újabb MRSA törzsön képzett teljesen feltisztult plakkot tehát ezekkel szemben hatékony. Még további 3 MRSA törzsön képzett részlegesen feltisztult plakkot. Érdekes eredmény, hogy a teljesen feltisztult plakkot mutató törzsek közül 2 valamint a 3 részleges feltisztult plakkot mutató törzs azok közé tartozik, amelyeket a vizsgálatok kezdetén a környezeti mintákból való fág izolálásnál is használtunk és akkor még nem volt kimutatható, hogy a $\Phi 4R$ fág gazdatörzsei lennének. Lehetséges, hogy többszörös MRSA törzsön történő szaporítás közben az általunk izolált fág virulenciája megnőtt más MRSA törzsekkel szemben. Másfajta baktériumok közül mindössze 3-nál a *Citrobacter freundii*-nél a *Citrobacter coseri*-nél és az *Acinetobacter lwoffii*-nél volt tapasztalható kicsi alig látható pontszerű plakkok képződése. A többi törzs semmilyen fogékonyságot nem mutatott. De ezen 3 törzs is bizonyítja, hogy a $\Phi 4R$ fág lítikus hatással rendelkezik másfajta baktériumok törzsei ellen is.

4.11 A genom összehasonlító vizsgálata

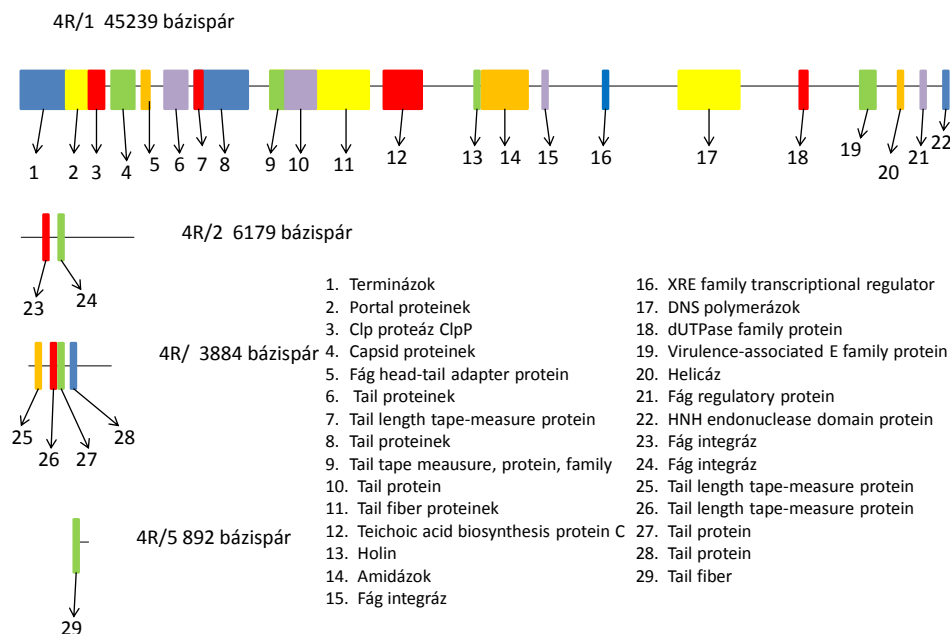
A genom 59487 bázisnak adódott és több szegmensből állt egy fő szegmensből (4R/1) 45239 bázis és 5 rövid szegmensből (4R/2, 4R/3, 4R/4, 4R/5, 4R/6) 6179, 3884, 2382, 892, 911 bázis hosszúak. Ezen utóbbi szekvenciákat a genom összeillesztése során a használt illesztő program nem tudta kezelni és így csatolni a szekvenciához.



9. Ábra: Φ 4R fág szekvenciájának adatbanki összehasonlítása

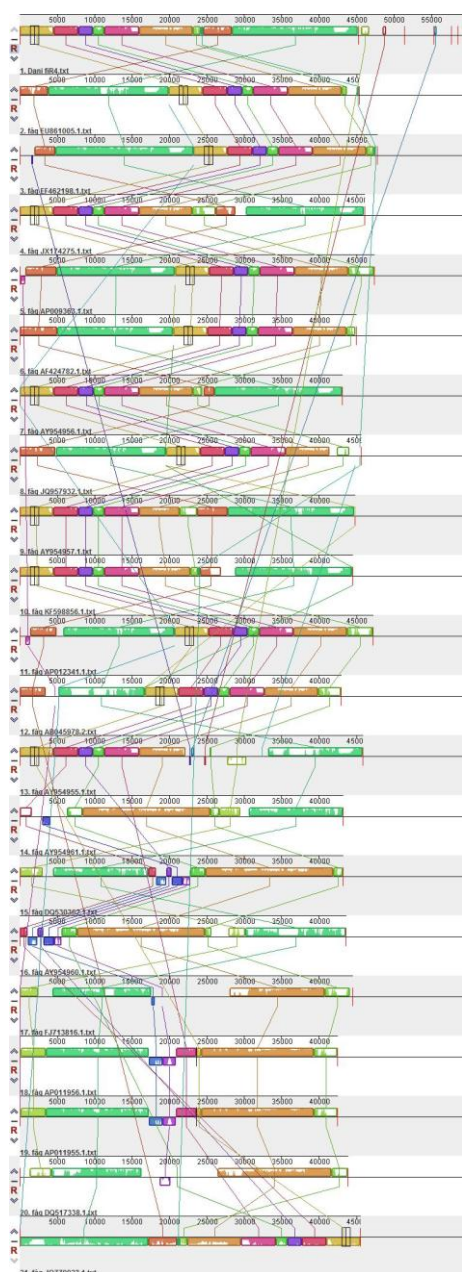
Az ncbi adatbázisban nagy számú nagy mértékben homológ szekvenciát találtunk legnagyobb részük *Staphylococcus* genomba beépült fág genom(részlet). A legnagyobb homológiát a JQ779023.1 fág mutatta 98%-ban volt homológ a Φ 4R fággal. Ezzel majdnem egyező 98% homológiájú szekvencia van jelen a CP007499.1 *Staphylococcus aureus* genomban.

A Vector NTI programmal megállapítottuk a lehetséges fehérjekódoló szekvenciák határait és ezen szekvenciák ncbi adatbázisával való összehasonlítása során a soknak a funkcióját is meg tudtuk állapítani.



10. Ábra. A fág sematikus genetikai térképe. A 3, 12, 16, 18, 19, 22-es szegmensek bakteriális eredetűek.

A vizsgálat során a kódoló szekvenciák jelentős része még ismeretlen funkciójúnak adódott, de nagy számban voltak azonosíthatóak már ismert vagy részben ismert funkciójú fehérjék is. Valamint több bakteriális eredetű fehérjekódoló szekvenciát is azonosítottunk, mint a Clp proteáz ClpP, teichoic acid biosynthesis protein C, XRE family transcriptional regulator, dUTPase family protein, virulence-associated E family protein, HNH endonuclease domain protein. Ezek alapján ábrázoltuk a fágot felépítő szerkezeti fehérjék szekvenciáinak elhelyezkedését a genomban. Majd egy részletesebb ábrán a többi ismert funkciójú szakaszt is, vagyis a fág genetikai térképét.



11. Ábra: A Φ 4R fág genomjának összehasonlítása más fág genomokkal a Mauve DNS összehasonlító program segítségével.

A Mauve program összehasonlítása alapján az Φ 4R fágban és az 2-11 sorszámozott 80% fölötti homológiájú fágban 9 hasonló szakasz ismétlődik azonos sorrendben. A 12 sorszámúban csak 8, valamint plussz egy szakasz ami Φ 4R-ben nem található meg, viszont az 5, 11, 17, 18, 19-es fág szekvenciákban igen. A 13 fágban még megvan azonos sorrendben a 9 szakasz, de egy nagyméretű nem homológ szakasz választja ketté. A 14-es sorszámúaktól az eltérések már jelentősek.

7. Összefoglalás

A lítikus fágok izolálása egyedül emlősök alommintáiból volt sikeres.

A mintákból izolált fágok közül egy volt csak mely gazdabaktériumával szemben stabilan nagy hatékonyságú volt (4R fág).

Az 5 MRSA over night kultúra (2×10^8 /ml) ötszörös hígítása megfeleltethető az OD1 kultúrának.

Nagy töménységű baktérium szuszpenzióból készült baktériumgyep nem alkalmas az alkalmazott 10^8 /ml titerű fág vizsgálatára az OD1 vagy annál kisebb töménységűek igen.

A tézis mely szerint a kétértékű sók előnyösen befolyásolhatják a fág felnövesztését, az adataink alapján az általunk izolált és a kísérletekben szerepelt 4R fagra is igaz

Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a gazdabaktérium tápközegének összetétele is hatással van a fág felszaporodásának mértékére.

Elvégeztük az újonnan izolált fág genetikai vizsgálatát is restrikciós endonukleázos emésztéssel. Ez később lehetővé teszi az 4R fág más fágtörzsekkel való összehasonlítását.

Elvégeztük továbbá a megszekvenált fág genom fehérjekódoló régióinak azonosítását és más fág genomokkal való összehasonlítását.

A fág spektrumának vizsgálata során bebizonyosodott, hogy több más MRSA törzssel szemben is hatásos valamint kis hatékonyságot mutatott *Citrobacter freundii*-nél a *Citrobacter coseri*-nél és az *Acinetobacter lwoffii*-nél.

A morfológiai jegyek alapján megállapítottuk, hogy a 4R fág a Siphonoviridae csoportba tartozik.

Kísérletek segítségével szolgálhatnak a nagymennyiségű fágpropagálás ideális körülményeinek beállításához.