

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi bevezetés.....	4
1.1 A bakteriofágok általános jellemzése.....	4
1.2 Fágterápia.....	7
1.3 A <i>Staphylococcus aureus</i> általános jellemzése.....	8
1.4 Antibiotikum rezisztencia	10
1.5 A <i>Staphylococcus aureus</i> antibiotikum rezisztenciája	14
2. Célkitűzések	16
3. Anyagok és módszerek.....	17
3.1 Anyagok.....	17
3.1.1 Felhasznált MRSA törzsek.....	17
3.1.2 LB (Luria Bertani Broth) tápoldat, táptalaj:	18
3.1.3 Müller Hinton I (MH I.) tápoldat, táptalaj:	18
3.1.4 Müller Hinton I (MH I.) táptalaj, tápoldat:	18
3.1.5 TSB (Tryptic Soy Broth) táptalaj, tápoldat:	18
3.1.6 BHI (Brain Heart Infusion) táptalaj, tápoldat:.....	19
3.1.7 CF táptalaj, tápoldat:	19
3.1.8 Trypton táptalaj, tápoldat:	19
3.1.9 PBS (Phosphate Buffered Saline):	20
3.1.10 Foszfovolftrámsav festőoldat:	20
3.1.11 Elektronmikroszkópos vizsgálat.....	20
3.1.12 DNS munkákhoz oldatok	20

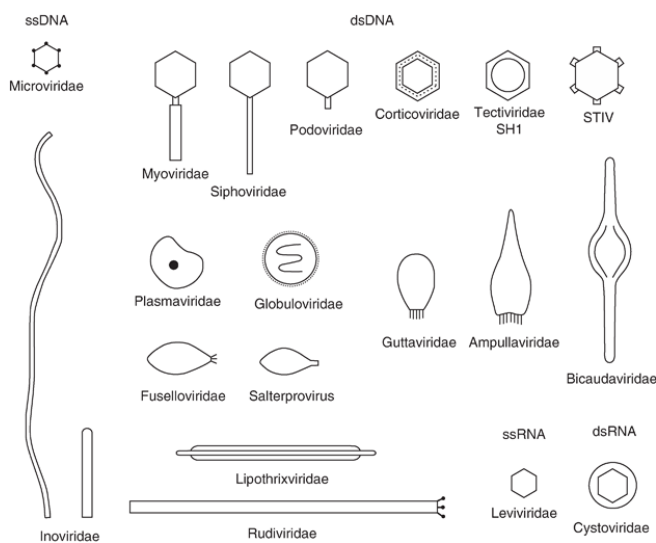
3.2 Módszerek	21
3.2.1 Baktériumtörzsek és fáguszuspenziók konzerválása	21
3.2.2 Baktérium over night (O/N) kultúra készítése	21
3.2.3 Mintavétel és fág izolálás.....	22
3.2.4 Fágok tisztítása, felszaporítása és a stabil fág gazdabaktérium kapcsolat ellenőrzése	23
3.2.5 Baktériumszuszenziók csíraszámának meghatározása	24
3.2.6 Az 5 MRSA szuszenzió töménységének hatása a Φ4R fág felszaporodására 24	
3.2.7 A Mg²⁺ és Ca²⁺ sók koncentrációjának hatása a bakteriofág felszaporodására	25
3.2.8 Különböző tápközegek hatása a Φ4R bakteriofág felszaporodásának mértékére	26
3.2.9 A Φ4R fág kivont DNS-ének agaroz gélen való megfuttatása	27
3.2.10 A Φ4R fág morfológiai vizsgálata	28
3.2.11 A Φ4R fág spektrumának vizsgálata	28
3.2.12 A genom összehasonlító vizsgálata	28
4. Eredmények és megvitatásuk.....	30
4.1 Környezeti mintákból történő fág izolálás eredményei.....	30
4.2 A fágok felszaporítása és a stabil fág gazdabaktérium kapcsolat ellenőrzése	32
4.3 A stabil gazda parazita viszonyt mutató fág törzsek felszaporodási hatékonyságának ellenőrzése.....	33
4.4 Csíraszám meghatározás	35
4.5 Az 5 MRSA szuszenzió töménységének hatása a Φ4R fág felszaporodására	36

4.6 A Mg^{2+} és Ca^{2+} sók koncentrációjának hatása az $\Phi 4R$ bakteriofág felszaporodására	37
4.7 Eltérő tápközegek hatása az $\Phi 4R$ bakteriofág propagálásra.....	39
4.8 A $\Phi 4R$ fág kivont DNS-ének restrikciós enzimes hasítási analízise.....	46
4.9 A $\Phi 4R$ fág morfológiai vizsgálata	47
4.10 A $\Phi 4R$ fág spektrumának vizsgálata	47
4.11 A genom összehasonlító vizsgálata	51
5. Rövidítések jegyzéke	60
6. Irodalomjegyzék.....	61
7. Összefoglalás	64

1. Irodalmi bevezetés

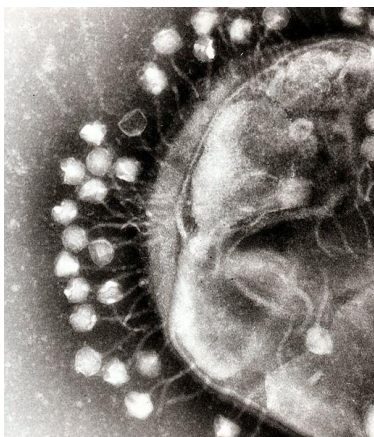
1.1 A bakteriofágok általános jellemzése

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 fehérjéből 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)



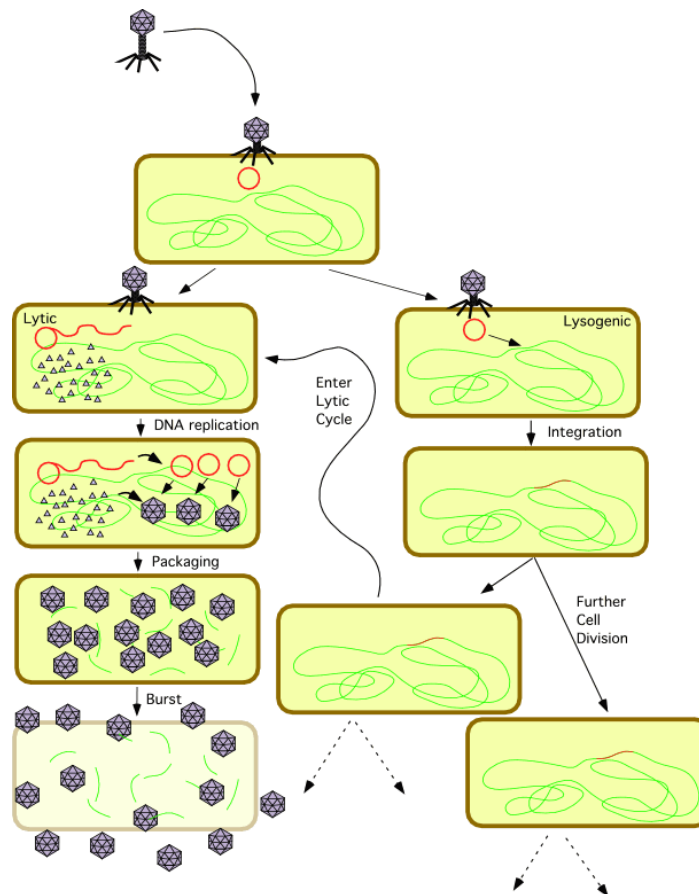
1. Ábra. A bakteriofágok morfológián alapuló főbb rendszertani egységei.

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)



2. Ábra. A fágok megtapadása egy baktériumon.

A bakteriofágok szaporodásához elengedhetetlen egy arra megfelelő baktérium jelenléte. Amennyiben ez teljesül akkor megindulhat a bakteriofágok életsiklusa. 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 és a gazdabaktérium nukleinsavába való beépülés után aktivizálódik. 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)



3. Ábra. A bakteriofágok életciklusa.

A fág DNS beépülése a baktérium genomjába megváltoztathatja a baktérium egyes tulajdonságait is. Valamint a fág kiszabadulásakor magával vihet DNS darabokat a baktérium genomjából, egy másik baktériumot fertőzve ez a DNS szakasz beépülhet ebbe a baktériumba. Ez a transzdukció vagyis a bakteriofágok által közvetített nukleinsav átvitel. (Gergely, 2003; Pesti, 2001)

Ahhoz, hogy a fent leírt folyamat lejátszódjon és a bakteriofág a nukleinsavát a gazdabaktériumba juttassa mindenképp 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 receptorral. (Mc Grath és Sinderen, 2007; Mann, 2005; Wommack és Colwell, 2000)

A fágoknak általában szigorú a gazdaspecificitása. Általában csak egy baktériumot képesek fertőzni, sőt egy fajon belül is különbség tehető, hogy az adott baktérium hordozza-e az adott fágnak 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 gazdaspecificitású 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-es 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 szőlőfürtökhöz 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 szürkés-sárgák 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 *Staphylococcus aureus* törzsek rendelkeznek. A *Staphylococcus aureus* az immunológiai 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. Ilyen fertőzések lehetnek például a posztraumatikus mélyszöveti és koponyaüregi fertőzések, a húgyúti fertőzések, az intravascularis katéterfertőzések, a bacteriaemia és infektív endocarditis, a toxicus shock szindróma. A *S. aureus* törzsek jelentős részére jellemző a toxintermelés. Ezen törzsek által okozott toxinmediált staphylococcalis betegségek: ételmérgezés, leforrázott bőr szindróma, septicus shockszerű betegség. Emellett a törzseknek szerepe van légúti, csont, mozgásszervi és gastrointestinális fertőzések létrehozásában. Napjainkban egyre nagyobb jelentőséggel

bírnak a *S. aureus* törzsek által okozott nosocomiális fertőzések. A fertőzés típusa nagyban függ attól, hogy az adott *Staphylococcus aureus* törzs milyen patogenitási faktorokkal rendelkezik.

A sejthez kötött virulencia faktorok között megemlíthetők: a *Staphylococcus aureus* törzsek kb. 5%-a poliszacharidot, 40%-a mikrokapszulát, 70%-uk pedig nyákot termel, ami különböző uronsavakból áll. A felszínükre teikolsavat vagy teikuronsavat excretálnak. Minden pathológiás folyamatból kitenyészített törzs termel lipoteikolsavat. Jelentős maszkírozó virulenciafaktor a protein A, mely 95%-ban a koagulázzal együtt termelődik és az Fc részénél köti meg az IgG molekulákat, ezzel gátolva az immunválasz effektor részét. Specifikus adhézión proteinek a fibrinogén, fibrin, fibronectin, trombospodin, trombin, vitronectin, kollagén és lamininkötő proteinek, melyek receptoraikkal biztosítják az adhéziót, a bekötött gazdaszervezeti proteinekkel pedig a maszkírozást végzik. A sejtfelszíni adszorptív hidrofobicitás a tapadást, az aggregatív hidrofobicitás a maszkírozást szolgálja.

Extracellularis nem toxikus patogenitási faktorok közé a *S. aureus* esetében a következő faktorok tartoznak: a koaguláz, amely a vérplazmát megalvasztja és csak a patogén törzsekre jellemző. Az enzim hatására kiváló fibrin gátolja a phagocytosist, a fibrinszálak védőburkot képeznek a baktérium körül. A fibrinolizin az előzővel ellentétes hatású enzim a fibrin feloldásával a baktériumok invázióját segíti elő. A hialuronidáz a sejtek közötti hialuronsav és más mukopoliszacharidok feloldásával segíti a baktériumok terjedését a szövetekben. A foszfátáz a foszfát vegyületeit bontja, és a patogén törzsek sajátja a termelése. A DNázok intra és extracellularisan is bontják a DNS-t. A lipolitikus enzimek minden struktúrájú lipidet képesek bontani ezért a baktérium tud szaporodni és terjedni a zsírszövetekben is.

A *S. aureus* törzsei által termelt toxinok közt többfélét különböztetünk meg, amelyek a patogenitás sajátosságát és mértékét meghatározzák. A törzsek nagy része termel egy exotoxint az alfa-toxint mely hemolizáló hatású, bőrbe oltva necrosist okoz, vénásan adva pedig megöli a kísérleti állatot, összetevői mind citotoxinok. A toxin legalább négyféle hemolizint tartalmaz α , β , γ , és δ -hemolizint valamint még leukocidint, ami a leukocytákra mérgező. Az α -hemolizin a *Staphylococcus aureus* törzsek többsége termeli, a legtöbb állati és emberi sejtre mérgező. A humán patogén törzsek főleg ezt a hemolizint termelik. A sejtmembránba épülve pórust alakít ki, amin K^+ leadás és Na^+ és Ca^{2+} valamint más 1000 molekulatömegnél kisebb molekulák felvételét okozza. Ezzel ozmotikus duzzadást, hemoglobin leadást és végül lízist

okoz. A β -hemolizin hasítja a szfingomielint N-acil-szfingozinre és foszforilkolinra. Nem dermonekrotikus és nem letális. A γ -hemolizin egy kétkomponensű toxin. A komponensek csak együttesen tudják kifejteni hatásukat. Hemolitikus hatású több emlősfaj erythrocytáira. A macrophagokra, monocytákra és a polimorfonukleáris leukocytákra szinergisztikusan toxikus. A δ -hemolizin amphiphil peptid, α -hélix szerkezetű. Az α -hélixének egyik vége hidrofil a másik vége hidrofób. Felszínaktív anyagként kötődik a sejtmembránhoz. Sokfajta emlőssejtre toxikus. A leukocidin a fehérvérsejtekre toxikus, a pathogén törzsek nagy része termeli.

A *S. aureus* esetén kiemelkedő jelentőséggel bírnak a pirogén toxikus szuperantigének (PTSA), amelyek olyan szuperantigén hatású exotoxinok, amelyek túlfokozott immunreakciót váltanak ki a T-helper sejtek specifikus, de a szokásosnál jóval nagyobb mértékű aktiválásával. Az egymást indukáló nagymennyiségben termelődő cytokinek szeptikus shock állapotot idézhetnek elő, ez hypotensiot, sok szervi elégtelenséget és cardiovascularis insufficienciát okoznak. A PTSA-k (pirogén toxikus szuperantigének) közös tulajdonsága a lázkeltés a kiütések, fokozzák a gazdaszervezet érzékenységét a letális endotoxin shock iránt, kapilláriskárosodást, hypotensiót, shockot és halált okoznak. Hatásukra a macrophagok nagy mennyiségben α -tumor nekrotizáló faktort (TNF- α) és interleukin 1 (IL-1) cytokineket választanak ki toxikus shock szindrómát (TSS) okozva. A B-sejteket immunszuppresszálják és masszív T-sejt proliferációt indukálnak, így nagy mennyiségű TNF- β , IL-2 és IFN- γ (γ -interferon) kiválasztás jön létre. A *S. aureus* protein természetű exotoxinjai közül, ilyen a toxikus shock szindróma toxin-1 (TSST-1), a Staphylococcus enterotoxin (SE) A, B, Cn, D, E, G, és H-típus. Vitatott, hogy ide tartozik-e az epidermolitikus exfoliatin toxin A és B típusa, melyek a leforrázott bőr szindrómát okozzák. Az enterotoxin-B termelés a leggyakoribb, mely genetikailag gyakran kapcsolódik a DNáz termeléssel és a methicillin-rezisztenciával. (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),

Klinikai szempontból akkor beszélünk rezisztenciáról, ha az adott törzs a terápiás hatású hatóanyag-koncentráció mellett is szaporodik, míg ugyanazon faj más törzsei nem. A rezisztens törzs 10-1000-szeres hatóanyag koncentrációt is elvisel, ha ennél kevesebbet, 2-10-szerest akkor toleranciának hívják. Ezek már a szerzett rezisztenciák, melyek a természetes kiválasztódás útján jönnek létre ilyen a mutációs és az átviteli rezisztencia. A jelenség alapja a bakteriális genom mutációja. A megváltozott gén megváltozott fehérjét kódol, ami a baktérium tulajdonságainak megváltozásához vezethet, ami pedig az antibiotikummal szembeni érzékenység csökkenéséhez vagy annak teljes hatástalanságához vezethet. A mutálódott gént pedig a baktérium osztódáskor továbbadja az utódsejteknek. Az átviteli rezisztencia esetén genetikai információ átadás történik a baktériumok között, így jut be a rezisztens gén az addig fogékony baktériumba. Ez leggyakrabban konjugációval történik a rezisztenciát hordozó plazmid átadásával, de bakteriális kromoszómarészlet átadással is. Még ritkábban transzdukcióval vagy transzformációval. (Pesti, 2001; Courvalin, 1994)

A hatóanyag jelenlétében a szelekciós nyomás kedvez a mutálódott gént hordozó baktériumoknak akár a sejtvonalukon belül történt a mutáció, akár genetikai anyag átadással jutottak hozzá. Vagyis a rezisztens baktériumoknak jó esélyük van az elszaporodásra és tartós fennmaradásra, valamint minél nagyobb számban vannak jelen és minél elterjedtebbek annál nagyobb az esélye annak, hogy a rezisztenciájukat átadják más baktériumoknak is fajon belül vagy akár más fajoknak is. A rezisztenciát hordozó plazmidok átadása fajon belül általános a törzsek közt, de létrejöhet fajok közt is, ha megvannak a megfelelő felismerési helyek a sejtmembrán felszínén a pilusnak. A transzdukciónak pedig nincsenek faji korlátjai a baktériumok között, így még ha sokkal ritkább is, ez is egy átadási módja a fajok közt a rezisztenciának. Így megfelelő szelekciós körülmények közt meg van az esélye polirezisztens törzsek kialakulásának. (Pesti, 2001; Courvalin, 1994; internetes hivatkozás 1.)

A mutáció lehet egylépcsős magas fokú, ekkor egyetlen pontmutáció elég az antibiotikum célmolekulájának olyan mértékű megváltoztatásához, ami megakadályozza annak kötődését vagyis, hogy a hatását kifejtse. A többlépcsős mutáció esetén a rezisztencia több mutáció eredménye, gyakran az egyes mutációkkal fokozatosan nő a rezisztencia mértéke. Az ilyen rezisztenciáknak több fajtája van az alapján, hogy a baktérium milyen módon védekezik a hatóanyag ellen. (Pesti, 2001)

A célmutációk esetén a célfehérjék módosulnak, így akadályozzák meg az antibiotikumot a kötődésben és hatásának kifejtésében. A célmutációk lehetnek egylépcsősek is, mivel egyetlen pontmutáció is kiválthatja. (Forbes et al, 2007)

A felvételi rezisztenciánál a mutáció nem a célmolekulát érinti az továbbra is érzékeny marad, hanem a membrán összetételét és a transzport fehérjét oly módon, hogy a baktérium többé nem veszi fel az antibiotikumot vagy csak nagyon kis mértékben így az már nem tudja kifejteni hatását. (Forbes et al, 2007)

Gyakori az is hogy a baktérium a hatóanyagot inaktíváló enzimet termel, ezek általában a plazmidokon kódoltak. Ez az inaktíváló fehérjével (enzimekkel) való védekezés. (Forbes et al, 2007)

Az alternatív fehérjék olyan védekezési módot tesznek lehetővé, ami megkerüli a hatóanyagot, mivel képesek a blokkolt fehérjének a feladatát ellátni, így azok hatástalanítása nincs komoly hatással a baktériumra. (Forbes et al, 2007)

Egy másik lehetőség az Efflux-pumpák: ezek speciális membrán transzportfehérjék, amik kipumpálják a baktériumba bejutott antibiotikumot. Ezzel elég alacsonyan tartják a citoplazmában lévő hatóanyag koncentrációt ahhoz, hogy az ne tudjon lényeges hatást kifejteni. (Forbes et al, 2007)

Az alternatív anyagcsere utak általi rezisztencia lényegében hasonló az alternatív fehérjék hatásához, csak itt egy egész anyagcsere út helyettesítődik egy másikkal a blokkolt anyagcsere út helyet. (Forbes et al, 2007)

További lehetőség még a rezisztenciára a túltermelés. Ebben az esetben a célmolekulát oly mértékben kezdi termelni a baktérium, hogy az adott antibiotikum koncentráció mellett nem válik annyira működésképtelenné, hogy a baktérium elpusztuljon, vagy egyáltalán csökkenjen az aktivitása. (Forbes et al, 2007)

Rezisztenciát okozhatnak, még ha a transzláció és transzkripció utáni apróbb módosulások is, amelyek annyira meggyengítik az antibiotikum kötődését, hogy az meg is szűnik. Ez akkor fordulhat elő, ha a hatóanyag a célfehérje egy bizonyos régiójához kötődik. (Forbes et al, 2007)

Léznnek olyan mutációk is, amik a további mutációk gyakoriságát növelik. Ilyen mutációk, például amik a DNS-polimeráz javítómechanizmusának hatékonyságát csökkentik, így a további mutációk esélye lényegesen megnőhet. (Forbes et al, 2007)

Lehetségesek olyan rezisztenciák vagy toleranciák, amelynél a baktérium azzal védekezik, hogy elkerüli a hatóanyaggal való találkozást nem pedig ellenállóvá válik a hatásával szemben. Ezek lehetnek egy egész fajra jellemző természetes rezisztenciák vagy csak egyes törzsekre jellemző genotípusos rezisztenciák. Ilyen a biofilm képzés, amikor sok baktérium együttesen nyálkamátrixot, alakít ki maga körül. A nyálka elszigeteli a baktériumokat a külvilágtól és kisebb vagy nagyobb mértékben a környezetben lévő hatóanyagoktól is. Habár kellően nagy egyedszámnál szinte bármely baktériumfaj kialakíthat biofilmet egyes fajok, vagy egyes törzsek egy fajon belül sokkal jobban hajlamosak erre. Másik lehetőség hogy a baktériumok behatolnak a szervezet egyes sejtjeibe így kerülnek el a hatóanyagot. A *Staphylococcus aureus* például képes a tüdő nyálkahártyájának sejtjeibe behatolni, ezzel a képességükkel krónikus tüdőgyulladást is okozhatnak. (Garzoni, 2007)

Mindazokat a tényezőket, amik egy faj kvantitatív rezisztenciaviszonyait befolyásolják fenotípusos rezisztenciának vagy toleranciának hívják. Ilyen tényező, hogy a baktérium a sejtciklus mely fázisában van, a tenyészet kora, aktívan szaporodó baktériumról van e szó vagy kitartó képletről, a külső környezet összetétele, laboratóriumban a tápközeg összetétele. (Pesti, 2001)

A rezisztens baktériumok megjelenésének legfőbb oka az antibiotikumok mérlegelés nélküli használata. Gyakorta nincs ellenőrizve, hogy a fertőzést valóban baktérium okozza-e vagy, hogy a fertőzést okozó faj érzékeny-e az adott antibiotikumra. A feleslegesen adott antibiotikum alkalmat teremt a rezisztencia kialakulására így később, ha szükséges lenne már nem hat. A rövid ideig szedett vagy túl kis dózisban alkalmazott antibiotikumok is alkalmat teremtenek a rezisztencia kialakulására. A mérlegelés nélküli használat egy másik válfaja, amikor az antibiotikumokat megelőző jelleggel adják. Ezt legtöbbször az állattenyésztésben alkalmazták, néha még növekedésserkentőként is. Az 1990-es évektől sok európai ország betiltotta az antibiotikumok ilyen jellegű használatát. A rezisztens törzsek leginkább kórházakban alakulnak ki, ahol sok különböző baktériumtörzs találkozhat, fokozott lehetőség van a patogén és nem patogén törzsek közti rezisztencia átadásra. Ennek során egy adott baktérium több rezisztencia gént is felvehet, így multi rezisztens törzsek alakulnak ki, mint az

MRSA (methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus*). Rezisztens törzsek a szennyvízbe került antibiotikumok enyhe szelekciós nyomására is kialakulhatnak, nem megfelelő szennyvíztisztítás esetén pedig ezen rezisztens törzsek a környezetbe legfőképp a folyókba kerülhetnek. Az állattenyésztésben folyamatosan, kis dózisban használt antibiotikumok hatására kialakult rezisztens törzsek pedig a szerves trágyával jutnak a talajba így megnő a talajban lévő rezisztens törzsek száma. (Wegener, 2003; Heuer és Smalla, 2007)

1.5 A *Staphylococcus aureus* antibiotikum rezisztenciája

A *Staphylococcusok* természetes rezisztenciával rendelkeznek a polymyxinokkal, nitroimidazolokkal, bacitracinnal, nalidixinsav és oxolinsav származékokkal valamint a polién antibiotikumokkal. A *Staphylococcusok* törzsek között gyakran alakul ki rezisztencia, bizonyos antibiotikumokkal szemben. Erre egyik legkorábbi példa a penicillinek szembeni rezisztencia kialakulása. Sir Alexander Flemming 1928-ban felfedezte a penicillint. Az 1940-es évek második felében elindult ennek, és más korai antibiotikumnak széleskörű alkalmazása. A penicillin alkalmazásának megkezdésétől számítva még nem telt el 5 év, és a *Staphylococcus aureus* izolátumok kb. 50 %-a penicillin-rezisztens volt. Emiatt vezették be 1959-ben a methicillint, de már 1961-ben találtak methicillin- rezisztens *S. aureus* törzseket. Ez a folyamat jól példázza az antibiotikumrezisztencia terjedését, mely különösen igaz a *S. aureus* izolátumokra, mivel ezek mutációkra igen hajlamosak és nagymértékű adaptációs készséggel rendelkeznek, és könnyen vesznek fel rezisztencia mechanizmusokat hordozó plazmidokat. Penicillin rezisztencia mellett jelentős a szulfonamid és methicilin rezisztencia előfordulása. A *Staphylococcusok* eleve kevésbé érzékenyek a szulfonamidok iránt, mint más gennykeltő coccusok. Viszont a methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsek többsége érzékeny a szulfonamid és trimethoprim kombinációjára. 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 nozokomiális fertőzésekből izolált törzsek 25-60%-ban rezisztensek a methicillinnel szemben. A *Staphylococcus aureus* methicillin rezisztenciáját a transpozon *mecA* génen kódolt. A methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) és a methicillin rezisztens koaguláz

negatív *Staphylococcus 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 módszerek

3.1 Anyagok

3.1.1 Felhasznált MRSA törzsek

Az általunk használt tizennégy MRSA törzset megszámoztuk. A kísérletek leírásánál az általunk adott sorszámoikat használtuk a törzsek megnevezésére nem a hivatalos kódjelüket.

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

Az MRSA törzsek kódjelei:	Az általunk adott sorszámoik:
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 I (MH I.) táptalaj, tápoldat:

MH2 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 beállásáig

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 leülepítsük 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 leüleptsük 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 fáguszuszpenziókat 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 fáguszuszpenziókat 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 fáguszuszpenziók, 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 törzsön, 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 növe 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 Baktériumszuspenziók csíraszámának meghatározása

Annak érdekében, hogy meghatározzuk az 5 MRSA baktérium csíraszám értékeit O/N kultúrában, O/N kultúrából képzett OD₆₀₀ 1 kultúrában és logaritmus 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. Logaritmus növekedési fázisba (OD₆₀₀ 0,6-0,8) kerülve 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. Minden ilyen munkánál a szélesztések között az üvegbotot alkoholba merítve, majd azt követően leégetéssel sterilizáltuk. 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 Φ4R 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 készítettünk az 5 MRSA törzsből. Ezután 13 vérszállító csőből 12-be 4,5-4,5 ml LB tápoldatot mértünk és 500-500 µl 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 µl 5 MRSA-val és 10 µl Φ4R fáguszuszpenzióval. 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 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 még esetlegesen megmaradt baktériumokat előljük. A kloroformozott fáguszuszpenziókat 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 µl-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 µl 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 Φ4R bakteriofág felszaporodásának mértékére

Kísérletünkben 7 különböző tápoldatban növesztet 5 MRSA baktériumon tenyésztett Φ4R fág hatékonyságát vizsgáltuk 7 különböző táptalajon növesztett 5 MRSA baktériumon. Mivel a különböző táptalajokon vagy tápoldatokban való tenyésztés befolyásolhatja a baktériumok fehérje összetételét, a felszíni fehérje összetétel megváltozása befolyásolhatja a fág kapcsolódását a gazdabaktériumhoz, különösen a nagy gazdaspecifitású fágoknál így a tenyésztés hatékonysága is különböző lehet. Valamint ez a jelenség szelekciós nyomást gyakorol a fágra, így egy új tápoldaton tenyésztő baktériumon való felszaporítás, egy esetleges visszaoltásnál az eredeti táptalajon tenyésztő baktériumon való felszaporítást befolyásolhatja, általában negatívan. 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 µl 5 MRSA over night kultúrát és a 10 µl tömény Φ4R 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 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 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 µl-eket vittünk fel és üvegbotlall 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 µl-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 felülúszókból 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 µl 0,5 Mólus EDTA (pH 8) oldat hozzáadásával, majd ezt követő 10 perces 75°C-os hőkezeléssel inaktiváltuk. A szuszpenzióban levő fágpartikulumok fehérjeburkát 1 órás 65°C-os 10 µl 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 mólus 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 felszuspenzáltuk. 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 következőképp 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 fáguszuszpenziót 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 feltételezett 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 Φ 4R fágéval. 11 magas 80% fölötti homológiát mutató fágot 2 közepes 66 és 59% homológiájú és 7 alacsony 10-20% közötti homológiájú fágot. Valamint elvégeztük az ezen fágok szekvenciáinak egymással történő összehasonlítását a Mauve program segítségével majd ezt követően a MEGA program segítségével a fágok közt fennálló rokonsági kapcsolatokat tártuk fel.

2. Táblázat. A Mauve programban összehasonlított fágok listája

sorszám	fág	hasonlóság
1	Φ 4R	100%
2	JQ779023.1	98%
3	EU861005.1	89%
4	EF462198.1	89%
5	JX174275.1	82%
6	AP009363.1	86%
7	AF424782.1	88%
8	AY954956.1	82%
9	JQ957932.1	82%
10	AY954957.1	85%
11	KF598856.1	86%
12	AP012341.1	86%
13	AB045978.2	66%
14	AY954955.1	59%
15	AY954961.1	18%
16	DQ530362.1	18%
17	AY954960.1	15%
18	FJ713816.1	14%
19	AP011956.1	13%
20	AP011955.1	13%
21	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.

3.Táblázat. A mintagyűjtések helye

mintagyűjtés száma	mintagyűjtés helye
1	haszonállat tartó gazdaságok
2	Pellérdi Szennyvíztisztító
3	haszonállat tartó gazdaságok
4	Misina Állatmenhely
5	Pécsi állatkert
6	csirkenevelő telep

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

mintagyűjtés száma	minta sorszáma	minta típusa	mintavételi objektum	MRSA törzsszámok melyekre a minta pozitív eredményt adott
1	14	alom minta	sertés	3, 6
1	15	alom minta	ló	5
3	4	alom minta	ló	6, 14
3	5	alom minta	juh	6, 14
3	11	alom minta	szarvasmarha	14
3	13	alom minta	ló	14
4	3	alom minta	ló	5, 6
5	15	alom minta	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 bőrfelszínén 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 bőrfelszíni mintákból nem. A bőrfelszíni 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 törzsszel 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)

5. 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	-

6. 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.

7.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.

8. 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	-	-

9. 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	-	-

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

11. 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
logaritmikus növekedési fázisú szuszpenzió	nm	nm	338	5	0

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

12. Táblázat. A tömény MRSA szuszpenziók csíraszama 1 ml térfogatban.

MRSA szuszpenzió típusai	csíraszám/ml
over night szuszpenzió	212000000
OD1 szuszpenzió	42000000
logaritmikus 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 logaritmikus növekedési fázisban lévő szuszpenzió pedig lényegesen kisebb csíraszámmal 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.

13. Táblázat. Mely töménységű baktérium szuszpenzióknál volt tapasztalható feltisztulás 10 μ l Φ 4R fág lecseppentésénél. A – jel a feltisztulás hiányát a + jel a feltisztulás meglétét jelzi.

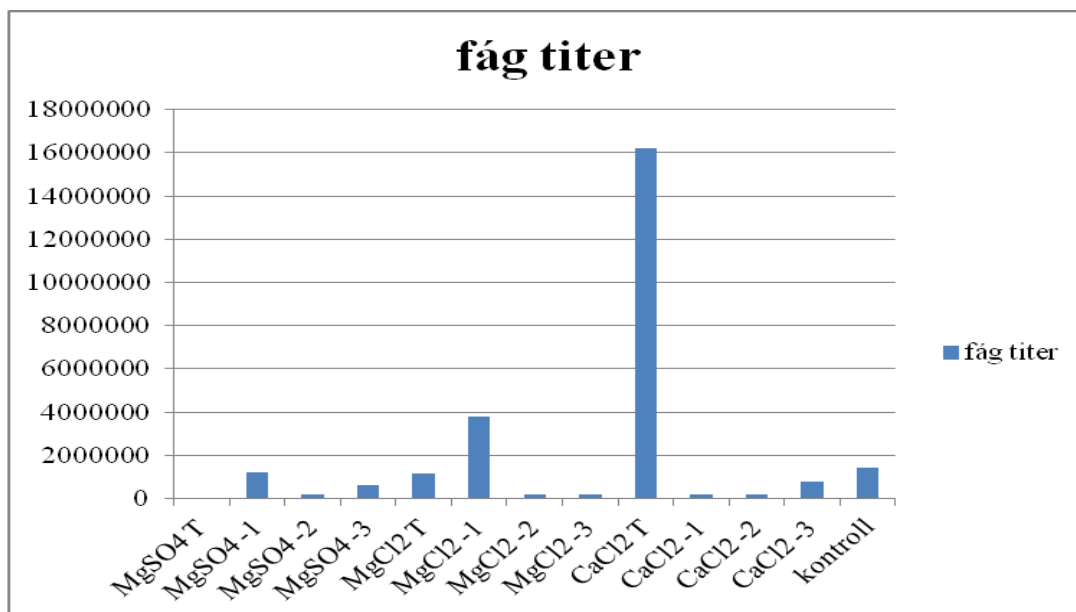
kísérlet száma/ MRSA szuszpenzió töménysége	10xOD1	OD1	0.1xOD1	0.01xOD1
1	-	+	+	+
2	-	+	+	+
3	-	+	+	+
4	-	+	+	+
5	-	+	+	+

4.6 A Mg^{2+} és Ca^{2+} sók koncentrációjának hatása az $\Phi 4R$ bakteriofág felszaporodására

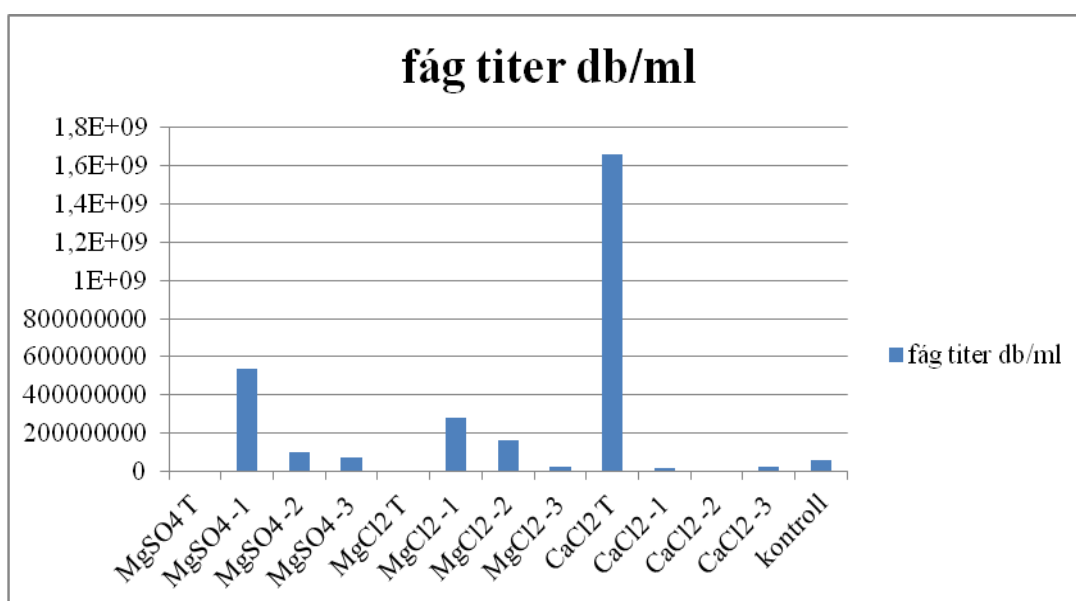
Annak érdekében, hogy kiderítsük az $\Phi 4R$ fág 5-ös MRSA-n történő felszaporodását milyen mértékben befolyásolják a jelenlevő kétértékű kationok eltérő koncentrációi, a fágok propagálását $MgSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ sók jelenlétében azok 0.1M, 0.01M, 0.001M, és 0.0001M végkoncentrációiban LB médiumban végeztük.

14. Táblázat. Az vizsgált sók eltérő koncentrációinak hatása az $\Phi 4R$ fág propagálásának hatékonyságára. Alkalmazott sók: $MgSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$; Alkalmazott végkoncentrációk: T=0.1M, -1=0.01M, -2=0.001M, -3=0.0001M.

só hígítás/kísérletek fág titerei	1. kísérlet	2. kísérlet
$MgSO_4$ T	0	0
$MgSO_4$ -1	1200000	540000000
$MgSO_4$ -2	200000	100000000
$MgSO_4$ -3	600000	70000000
$MgCl_2$ T	1180000	0
$MgCl_2$ -1	3800000	280000000
$MgCl_2$ -2	200000	160000000
$MgCl_2$ -3	200000	22400000
$CaCl_2$ T	16200000	1660000000
$CaCl_2$ -1	200000	18400000
$CaCl_2$ -2	200000	6200000
$CaCl_2$ -3	800000	22000000
kontroll	1400000	60000000



4. Ábra. Az 1. kísérlet grafikonja.



5. 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 a fágok propagálása mind $MgSO_4$, mind $MgCl_2$ esetén teljesen illetve részlegesen

megakadályozta a felszaporodást. Drasztikus változás következett be abban az esetben amennyiben 10x-ére kihígult a Mg sók koncentrációja. Ekkor a fágpropagálás mértéke jóval meghaladta a kontrollét.

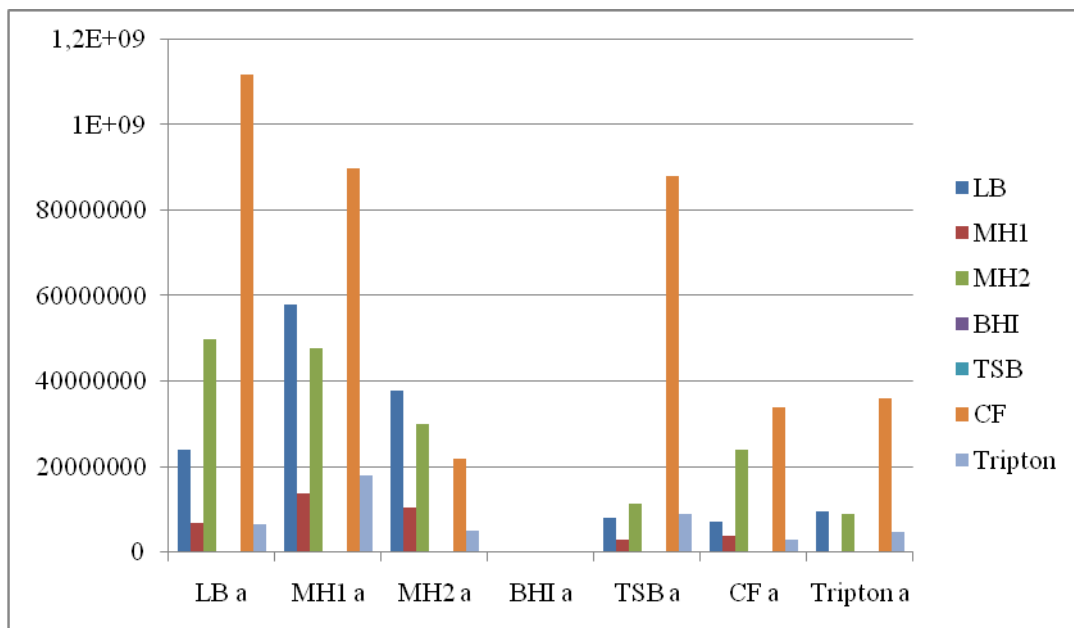
Ezzel ellentétben a CaCl_2 tömény oldata (szuszpenzióbeli végkoncentráció 0,1M) esetén mindig jelentősen nőtt a titer a kontrollhoz képest. Ellenben a kisebb koncentrációjú CaCl_2 oldatok esetén a fág titer mindig alulmúlta a kontrollt. Ennek ellenére elmondható, hogy az alacsony (<0,1M) CaCl_2 koncentráció nem befolyásolja előnyösen a fág felszaporodását. A MgCl_2 -nél a -2 hígítású (0.001 M végkoncentráció) sóoldat az 1. kísérlet kivételével a titer növekedését okozta a kontrollhoz képest, a -1 hígításoknál titer növekedés volt tapasztalható a kontrollhoz képest. Tehát a MgCl_2 oldatok esetén a 0.01 M végkoncentráció alkalmazása volt a legcélravezetőbb. A MgSO_4 kisebb koncentrációjú oldatai esetén a -1-es hígítás (0,01M végkoncentráció) alkalmazása tűnt célravezetőnek. A tézis, amely szerint a kétértékű sók előnyösen befolyásolhatják a fág felnevesztését, az adataink alapján az általunk izolált és a kísérletben szerepelt $\Phi 4\text{R}$ fagra is igaz, mivel a CaCl_2 -nél és a MgCl_2 -nél találtunk olyan koncentrációt, amelynél a fág a kísérletek többségében nagyobb titert ért el. MgSO_4 esetében az eredmények nem voltak olyan meggyőzőek.

4.7 Eltérő tápközegek hatása az $\Phi 4\text{R}$ bakteriofág propagálásra

Kísérletünkben különböző táptalajokon nőtt MRSA baktériumokon felszaporított fágok titerét határoztuk meg fág/ml-ben plakk módszerrel különböző táptalajokon. Az „a” az agart vagyis a táptalajt jelöli.

15. Táblázat. Az 1. kísérlet eredményei.

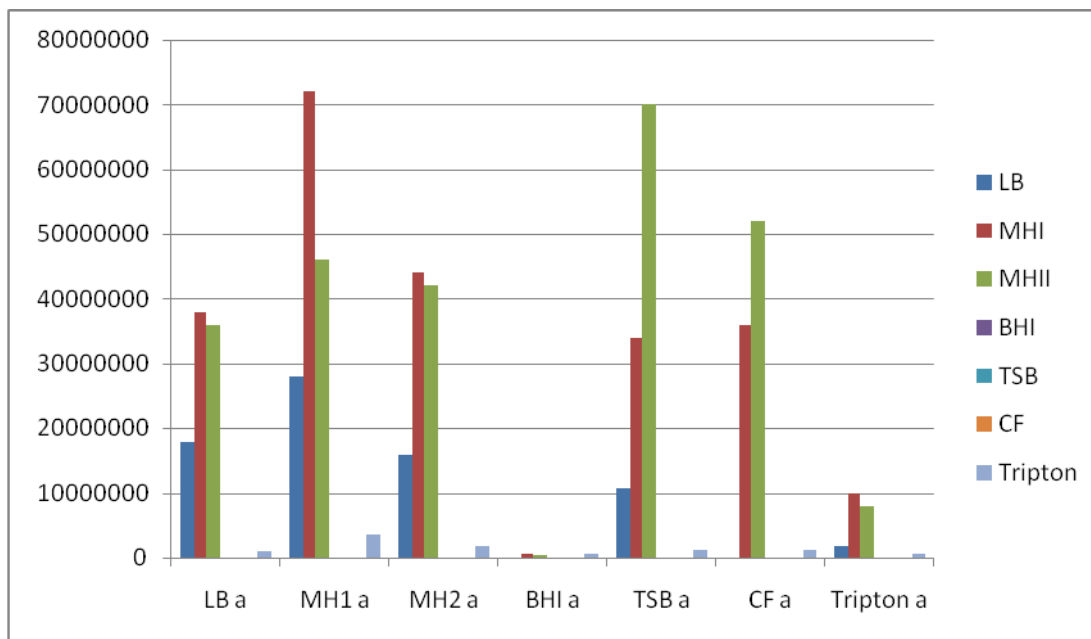
táptalaj / tápoldat	LB a	MH1 a	MH2 a	BHI a	TSB a	CF a	Trypton a
LB	240000000	580000000	380000000	200000	82000000	72000000	96000000
MHI	68000000	140000000	104000000	200000	30000000	40000000	3400000
MHII	500000000	480000000	300000000	620000	116000000	240000000	90000000
BHI	400	6000	400	0	400	0	400
TSB	20000	2000	4000000	0	1400	0	200
CF	1120000000	900000000	220000000	200000	880000000	340000000	360000000
Trypton	660000000	180000000	520000000	200000	90000000	30000000	48000000



6. Ábra. Az 1. kísérlet grafikonja.

16. Táblázat. A 2. kísérlet eredményei.

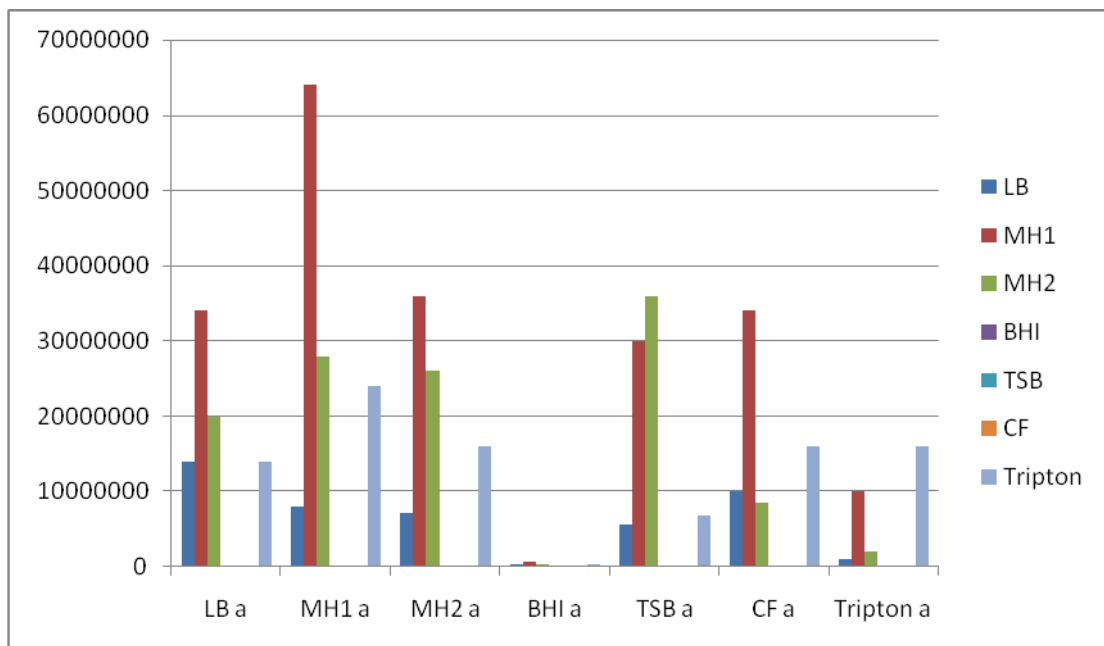
táptalaj / tápoldat	LB	MH1	MH2	BHI	TSB	CF	Trypton
LB a	180000000	280000000	160000000	820000	108000000	1400000	18400000
MH1 a	380000000	720000000	440000000	5600000	340000000	360000000	100000000
MH2 a	360000000	460000000	420000000	4200000	700000000	520000000	80000000
BHI a	4000	0	0	2000	0	0	0
TSB a	0	0	2000	0	2000	0	0
CF a	0	0	0	0	0	2000	0
Trypton a	1000000	3600000	1800000	600000	1200000	1140000	640000



7. Ábra. A 2. kísérlet grafikonja.

17. Táblázat. A 3. kísérlet eredményei.

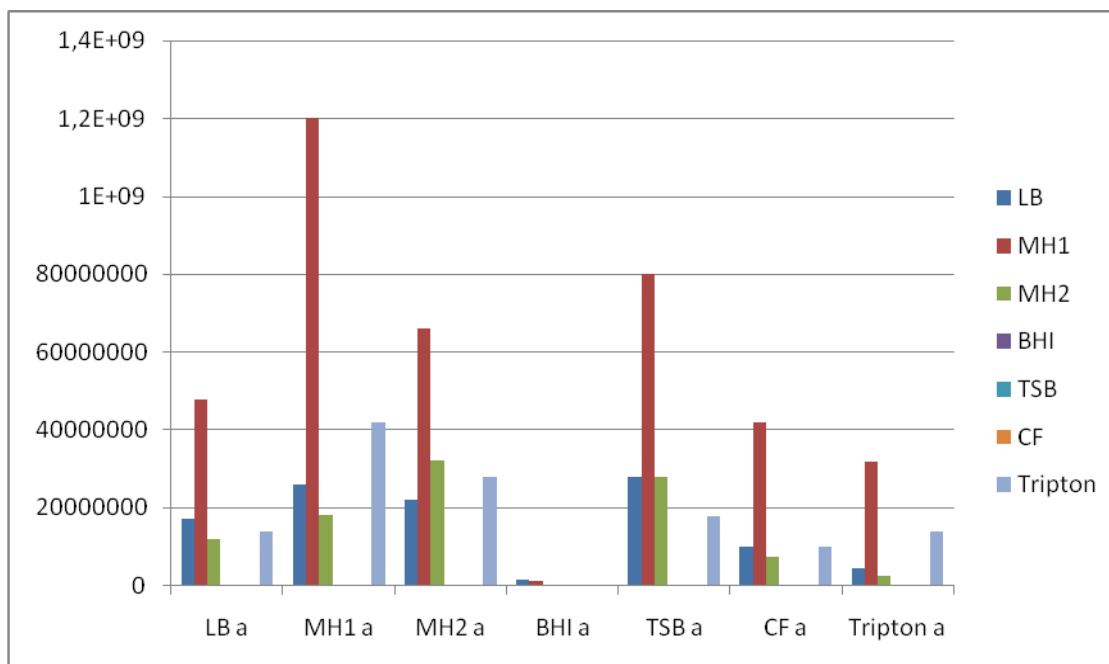
táptalaj / tápoldat	LB a	MH1 a	MH2 a	BHI a	TSB a	CF a	Tripton a
LB	1400000000	800000000	720000000	3800000	560000000	1000000000	10000000
MH1	3400000000	6400000000	3600000000	6400000	3000000000	3400000000	1000000000
MH2	2000000000	2800000000	2600000000	3400000	3600000000	860000000	200000000
BHI	0	0	0	0	0	0	200000
TSB	0	2000000	0	0	4000	0	0
CF	0	0	0	0	0	0	0
Tripton	1400000000	2400000000	1600000000	3200000	680000000	1600000000	1600000000



8. Ábra. A 3. kísérlet grafikonja.

18. Táblázat. A 4. kísérlet eredményei.

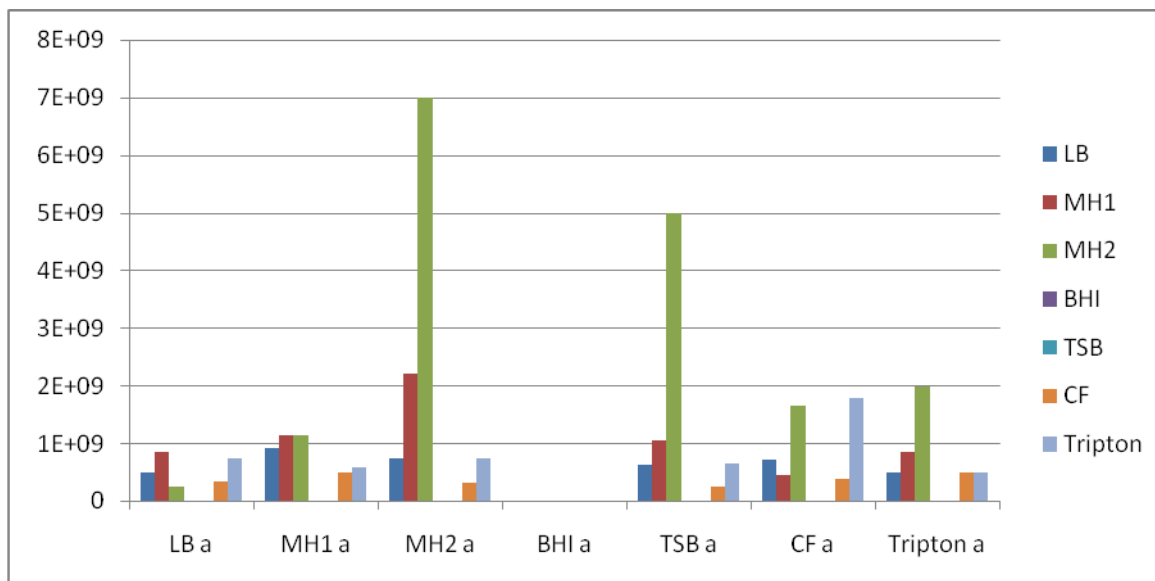
tápoldat / táptalaj	LB a	MH1 a	MH2 a	BHI a	TSB a	CF a	Trypton a
LB	1720000000	2600000000	2200000000	16000000	2800000000	1000000000	440000000
MHI	4800000000	12000000000	6600000000	12000000	8000000000	4200000000	3200000000
MHII	1200000000	1800000000	3200000000	2200000	2800000000	740000000	240000000
BHI	4000	0	2000	300000	0	2000	0
TSB	0	0	0	0	0	0	0
CF	0	0	0	0	0	0	0
Trypton	1400000000	4200000000	2800000000	3800000	1800000000	1000000000	1400000000



9. Ábra. A 4. kísérlet grafikonja.

19. Táblázat. Az 5. kísérlet eredményei.

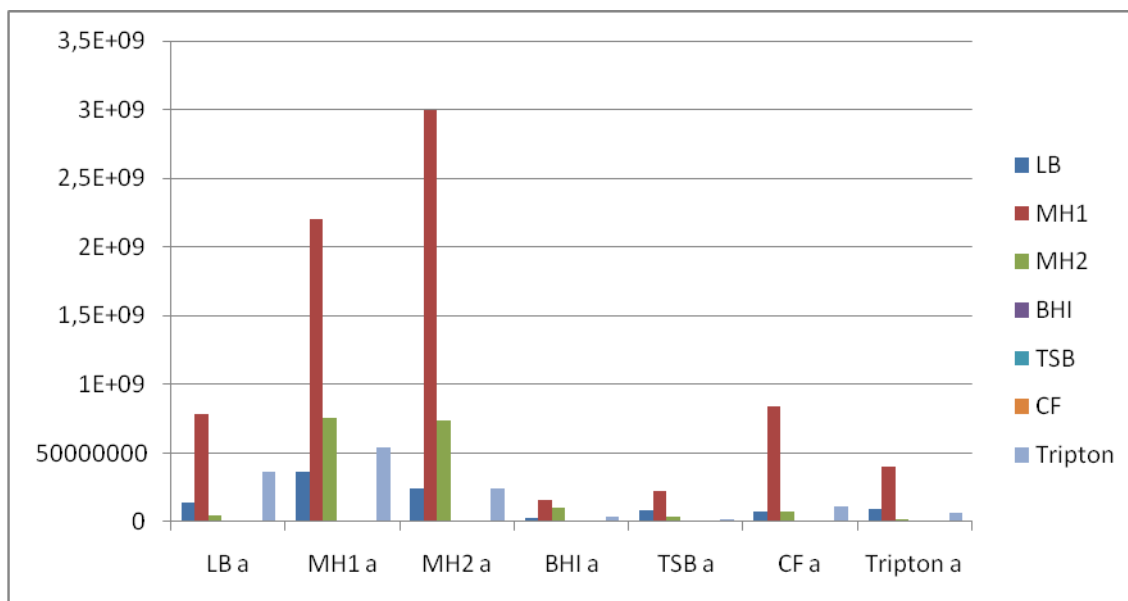
tápoldat / táptalaj	LB a	MH1 a	MH2 a	BHI a	TSB a	CF a	Trypton a
LB	500000000	920000000	740000000	640000	620000000	720000000	500000000
MH1	860000000	1140000000	2200000000	340000	1060000000	440000000	860000000
MH2	260000000	1140000000	7000000000	1600000	5000000000	1660000000	2000000000
BHI	1000	0	600	0	0	0	0
TSB	600	200	2400	0	1200	2000	600
CF	340000000	500000000	320000000	400000	240000000	380000000	480000000
Trypton	740000000	580000000	740000000	1000000	660000000	1800000000	500000000



10. Ábra. Az 5. kísérlet grafikonja.

20. Táblázat. A 6. kísérlet eredményei.

tápoldat / táptalaj	LB a	MH1 a	MH2 a	BHI a	TSB a	CF a	Trypton a
LB	1400000000	3600000000	2400000000	300000000	800000000	700000000	920000000
MH1	7800000000	22000000000	30000000000	1580000000	2200000000	8400000000	4000000000
MH2	4400000000	7600000000	7400000000	1040000000	400000000	7800000000	1800000000
BHI	1200	3800	7000	5200	30000	0	0
TSB	0	0	22000	0	0	200	0
CF	0	0	2000	0	0	0	0
Trypton	3600000000	5400000000	2400000000	420000000	220000000	1080000000	660000000



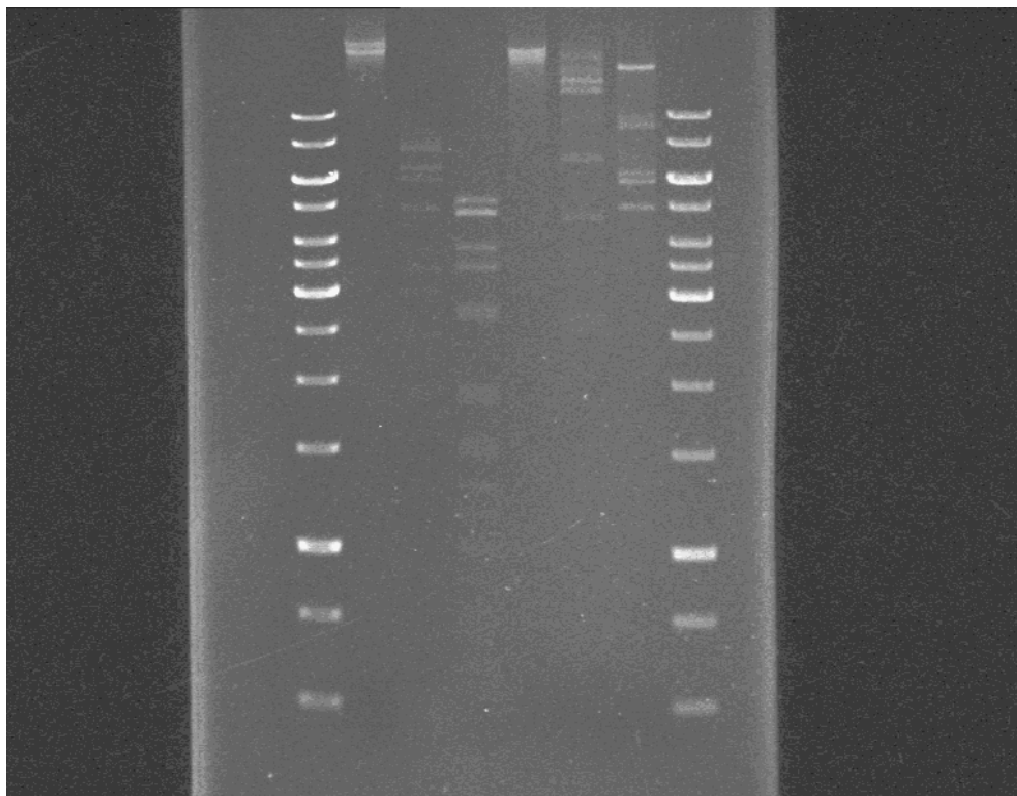
11. Ábra. A 6. kísérlet grafikonja.

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 MH I, MH II.-nél 1-1 esetben ennél magasabb értéket is kaptunk, a BHI táptalaj esetében közepes 10^5 - 10^7 fág/ml titert adtak, bár volt kivétel magasabb értékkel itt is. 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 TSB és a BHI 0 - 10^5 fág/ml adott a CF pedig egy kísérletben magas 10^8 - 10^9 egyben pedig közepes 10^5 - 10^8 értéket adott a többiben alacsonyat 0 - 10^4 . Érdekes, hogy a TSB és a CF baktériumgyepén, a más baktériumgyepeken magas értéket adó fág szuszpenziók itt is magas értéket adtak, míg a tápoldatukban tenyésző baktériumon növesztett fág majdnem mindenhol alacsony fágtitert mutatott. A BHI táptalajon ellenben minden fág szuszpenzió alacsonyabb értéket adott, mint más táptalaj baktériumgyepén és a BHI-s tápoldatból készült fág szuszpenzió is minden táptalaj baktériumgyepén alacsony értéket adott. Ebből következően a fág felszaporításhoz a BHI egyértelműen nem megfelelő. 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. Az eredmények fág titeréről az egyes kísérletekben elég diverzek lettek még akkor is, ha nagy vonalakban kategóriákba sorolhatók voltak. A feltevés hogy a különböző táptalajokban tenyésztő MRSA baktériumokon a fágok eltérő mértékben képesek felszaporodni, ezen kísérletek alapján igaznak bizonyult. Valamint megállapítható hogy a $\Phi 4R$ 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 $\Phi 4R$ fágnek ezen kísérletek alapján is nagy lehet a mutációs rátája.

4.8 A $\Phi 4R$ fág kivont DNS-ének restrikciós enzimes hasítási analízise

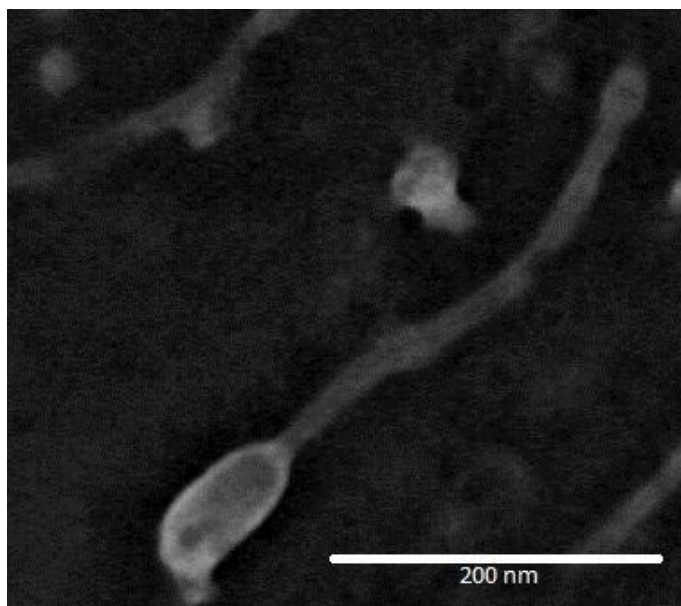
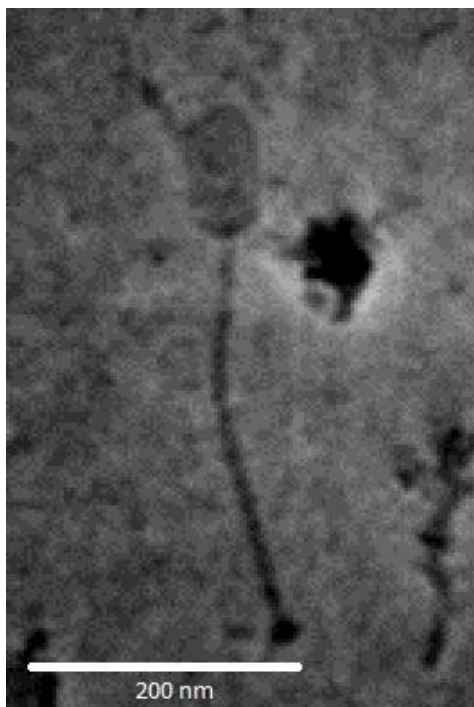
Az agaróz gélfuttatás alapján a DNS kivonás sikeres volt. A $\Phi 4R$ fágból kivont DNS mennyisége és minősége is megfelelőnek bizonyult restrikciós mintázat vizsgálatára. Ennek során öt különböző enzimmal hasítottuk a tisztított DNS-t. Ennek ismerete a későbbiekben alkalmas lesz más helyről származó,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



12. Ábra: A $\Phi 4R$ 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 fág méret 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.



13, 14 Ábra: A Φ 4R fág elektronmikroszkópos képe.

4.10 A Φ 4R fág spektrumának vizsgálata

Ezen kísérlet során a Φ 4R fág esetleges szélesebb gazdaspecifitásának lehetőségét ellenőriztük, összesen 84 baktériumtörzsön, legnagyobb részben eddig általunk nem vizsgált MRSA törzseken. Eredményeinket táblázatos formában foglaltam össze.

21. Táblázat. A Φ 4R fág spektrumának vizsgálata. A zöld kijelölésnél mutatja azokat a törzseket melyeken az Φ 4R fág nem adott teljesen feltisztult (részleges feltisztulású) plakkot. A sárga kijelölésű törzseknél teljesen feltisztult plakkot kaptunk. Piros kijelölés mutatja az ezen munkában legtöbbször 5 MRSA ként emlegetett törzset melyről már az előzetes kísérletekből tudtuk, hogy a Φ 4R fág gazdatörzse.

kód, származás	baktérium törzs	Φ 4R fág plakk képzése
659	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negatív
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negatív
NR 67	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negatív
UW786	<i>Enterococcus Sp.</i>	negatív
ATCC19433	<i>Enterococcus faecalis</i>	negatív
ATCC 10541	<i>Enterococcus hirae</i>	negatív
ATCC 51299	<i>Enterococcus faecalis</i>	negatív
ATCC 29212	<i>Enterococcus faecalis</i>	negatív
KP-0787	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negatív
ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negatív
OEK47001	<i>Citrobacter freundii</i>	részleges, gyenge
ATCC 27026	<i>Citrobacter coseri</i>	részleges, gyenge
OEK 64001	<i>Proteus morgani</i>	negatív
OEK 60007	<i>Proteus mirabilis</i>	negatív
ATCC 8427	<i>Proteus vulgaris</i>	negatív
J1E 273	<i>Proteus mirabilis</i>	negatív
ATCC 15308	<i>Acinetobacter baumannii</i>	negatív
ATCC 15309	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	részleges, gyenge
ATCC 15308	<i>Acinetobacter baumannii</i>	negatív
ATCC 35152	<i>Listeria monocytogenes</i>	negatív
ATCC 12386	<i>Streptococcus agalactidae</i>	negatív
ATCC 51559	<i>Streptococcus faecium</i>	negatív
ATCC 13047	<i>Enterobacter cloaceae</i>	negatív
ATCC 13048	<i>Enterobacter aerogenes</i>	negatív
OEK 140001	<i>Alcaligenes faecalis</i>	negatív
ATCC13637	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	negatív
OEK 56502	<i>Serratia marcescens</i>	negatív
ATCC 10240	<i>Micrococcus luteus</i>	negatív
ATCC 7966	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	negatív
ATCC 15947	<i>Edwardsiella tarda</i>	negatív
Bm 2195	<i>Escherichia coli</i>	negatív

Bm. 2688	<i>Escherichia aerogenes</i>	negatív
ATCC 25922	<i>Eserichia coli</i>	negatív
24575	<i>Shigella flexneri 2a</i>	negatív
Nagy Gábor	<i>Yersinia enterocolitica</i>	negatív
Nagy Gábor	<i>Salmonella Typhimurium</i>	negatív
ATCC 49946	<i>Erwinia amylovora</i>	negatív
N4315	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
MW2	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
MU3	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
MU50	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ATCC 12228	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negatív
S30	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
CI6005	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
Ci5734	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
116539	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
116550	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
OEC 112016	<i>Staphylococcus aureus</i>	negatív
OEK 112017	<i>Staphylococcus aureus</i>	negatív
ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i>	negatív
Prof. Dr. Witte 06-01388	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
Prof. Dr. Witte 93-01000	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
Prof. Dr. Witte 06-01597	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
Prof. Dr. Witte 06-02182	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
Prof. Dr. Witte 06-01019	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
Prof. Dr. Witte 06-01750	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
Prof. Dr. Witte 06-00219	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
Prof. Dr. Witte 06-00409	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
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
Prof. Dr. Witte 06-02000	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
Prof. Dr. Witte 06-00467	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (16)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (17)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (18)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (19)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív

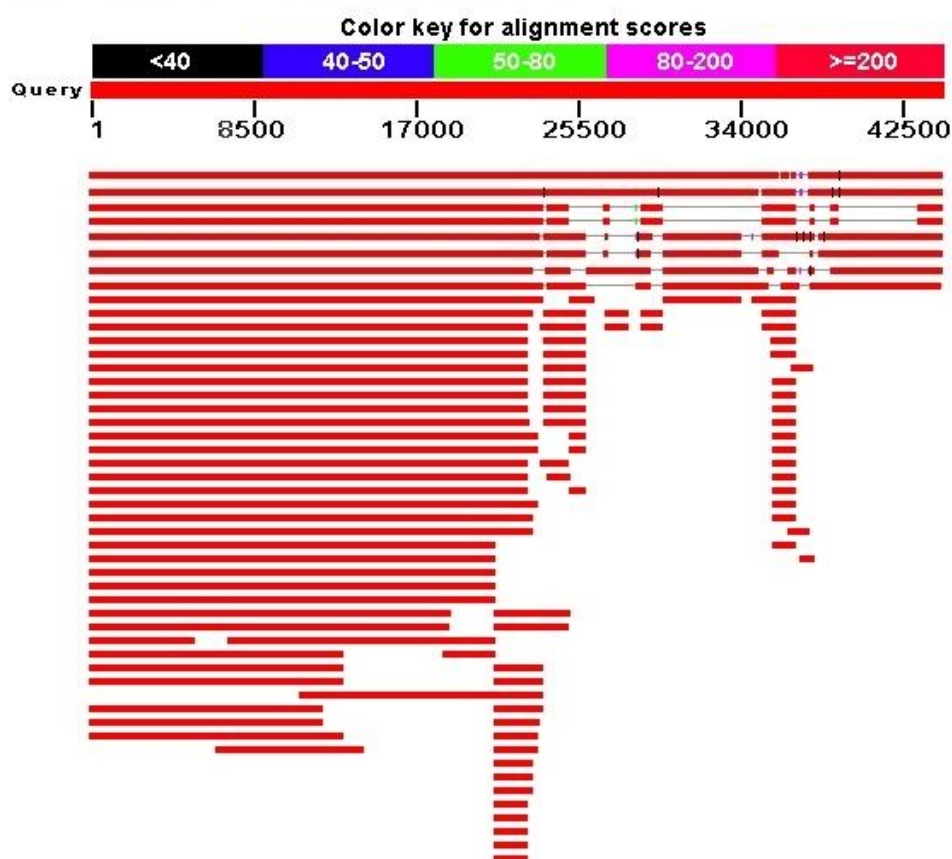
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (20)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (21)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (22)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (23)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (24)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (25)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (26)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (27)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (28)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (29)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (30)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	teljes
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (31)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (32)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (33)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (34)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív
ÁNTSZ Dél-dunántúli Regionális Intézet (35)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	negatív

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 Φ 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 Φ 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.



15. 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.

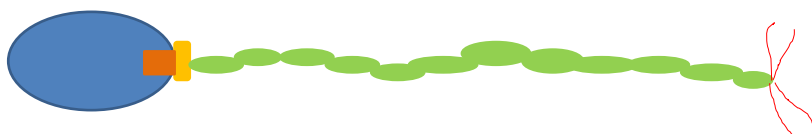
A Vector NTI programmal megállapítottuk a lehetséges fehérjekódoló szekvenciák határait és ezen szekvenciák ncbi adatbázisával való összehasonlítása során a következő eredményeket kaptuk.

22. Táblázat: A Φ 4R fág fehérjekódoló régióinak azonosítása

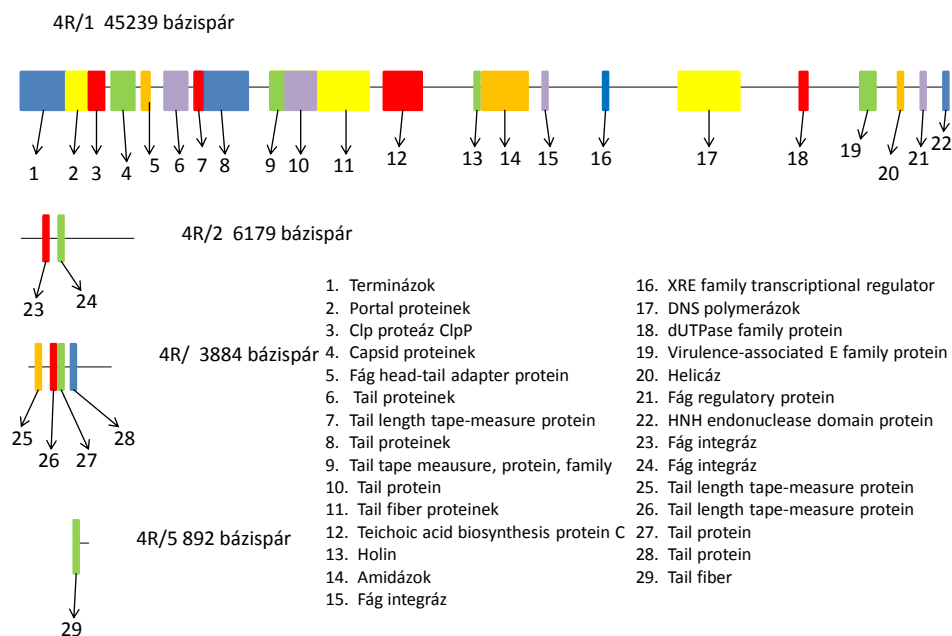
genom rész	ORF határ	méret (bp)	hasonlóság	funkció / hipotetikus funkció
4R/1				
	184-351	168	CP007499.1	termináz
	335-1087	753	CP007499.1	termináz
	1092-1562	471	CP007499.1	termináz
	1486-1734	249	CP009554.1	fág termináz large subunit
	1799-2035	237	CP007499.1	termináz
	2236-2751	516	CP007499.1	portal protein
	2751-3281	531	CP007499.1	portal protein
	3256-3918	663	CP007499.1	Clp protease ClpP
	4057-5217	1161	CP007499.1	fág capsid protein
	4301-4516	216	CP007499.1	fág capsid protein
	5289-5564	276	CP007499.1	fág head-tail adapter protein
	5392-5541	150	CP009554.1	hypothetical protein
	5579-5908	330	CP007499.1	hypothetical protein
	5908-6348	441	CP009681.1	putative fág protein
	6311-6703	393	CP007499.1	hypothetical protein
	6741-7379	639	CP007499.1	tail protein
	7240-7437	198	CP009554.1	fág major tail protein
	7474-7926	453	CP009554.1	fág major tail protein
	8138-8335	198	CP009554.1	hypothetical protein
	8380-8535	156	CP009554.1	hypothetical protein
	8552-8944	393	CP009554.1	fág tail length tape-measure protein
	9159-10355	1197	CP007499.1	tail protein
	10318-11244	927	CP007690.1	tail protein
	12024-12365	342	CP003808.1	putative fág protein
	12286-13314	1029	AM990992.1	profág L54a, tail tape measure, protein, family
	13356-14762	1407	CP007499.1	tail protein
	14765-15586	822	CP009554.1	fág tail fiber

	15141-15299	159	CP009554.1	fág tail fiber
	15598-17178	1581	CP009554.1	fág tail fiber
	15794-15961	168	JX174275.1	minor structural protein
	17181-17468	288	CP009554.1	hypothetical protein
	17487-19394	1908	CP009554.1	putative major teichoic acid biosynthesis protein C
	19364-20860	1497	JX174275.1	hypothetical protein
	20415-20582	168	KF598856.1	hypothetical protein
	20863-21228	366	CP009554.1	fág protein
	21246-21407	162	CP009554.1	hypothetical protein
	21444-21641	198	CP009554.1	fág protein
	21682-21831	150	CP007499.1	hypothetical protein
	21848-22192	345	CP007499.1	holin
	22206-22772	567	CP007499.1	amidase
	22750-23658	909	CP007499.1	amidase
	23865-24083	219	CP009554.1	ismeretlen
	24023-24328	306	CP009554.1	ismeretlen
	25012-25164	153	CP009554.1	fág integrase
	25928-26456	528	LN626917.1	FIG081523: hypothetical protein within a profág
	27525-27683	159	CP007499.1	hypothetical protein
	28535-28732	198	CP007499.1	XRE family transcriptional regulator
	28819-28992	174	LN626917.1	FIG01109505: hypothetical protein
	29580-29780	201	CP009681.1	putative phi PLV-like protein
	29795-29953	159	CP007499.1	ismeretlen
	30050-30301	252	JQ779023.1	hypothetical protein
	30301-30618	318	JQ779023.1	hypothetical protein
	30635-30994	360	CP007690.1	hypothetical protein
	30994-32157	1164	CP007690.1	hypothetical protein
	32244-32741	498	CP009554.1	fág protein
	32812-33663	852	CP009554.1	DNS polymerase I, Fág-associated complement
	33653-34762	1110	JQ779023.1	DNS polymeráz
	34778-34960	183	CP009554.1	fág protein
	35091-35240	150	CP007499.1	hypothetical protein
	35164-35364	201	CP009554.1	fág protein
	35367-35621	255	CP007690.1	hypothetical protein
	35612-35824	213	CP009554.1	fág protein
	35833-36081	249	CP007659.1	hypothetical protein
	36098-36301	204	JQ973847.1	hypothetical protein
	36332-36709	378	CP007499.1	hypothetical protein
	36709-37053	345	CP009681.1	putative fág protein
	37053-37358	306	CP007499.1	hypothetical protein
	37345-37632	288	CP003194.1	hypothetical protein

	37759-38292	534	CP003194.1	dUTPase family protein
	38332-38535	204	EF462198.1	hypothetical protein
	38526-38735	210	EF462198.1	hypothetical protein
	38659-38964	306	EF462198.1	hypothetical protein
	38982-39338	357	CP006044.1	hypothetical protein
	39533-39763	231	CP009554.1	fág protein
	39919-41472	1554	CP007659.1	ismeretlen
	41534-42262	729	CP006044.1	virulence-associated E family protein
	42607-42894	288	JX174275.1	hypothetical protein
	42878-43072	195	JX174275.1	helicáz
	43044-43253	210	JX174275.1	helicáz
	43225-44244	1020	CP007499.1	ismeretlen
	44260-44695	435	JX779023.1	fág regulatory protein
	44854-45165	312	CP002110.1	HNH endonuclease domain protein
4R/2				
	11-325	315	AB370205.1	hypothetical protein
	925-1392	468	CP006630.1	fág integrase
	1563-1784	222	CP006630.1	fág integrase
	3247-3423	177	KC595279.1	ismeretlen
	5808-5978	171	CP009554.1	fág protein
4R/3				
	297-509	213	CP009554.1	fág tail length tape-measure protein
	795-1118	324	CP009554.1	fág tail length tape-measure protein
	1172-1675	504	CP007690.1	tail protein
	1861-2022	162	CP009681.1	putative tail protein
4R/4				
	16-615	600	CP009554.1	putative major teichoic acid biosynthesis protein C
	585-1001	417	CP007499.1	hypothetical protein
	1070-1357	288	CP007499.1	hypothetical protein
	1397-2083	687	CP007499.1	hypothetical protein
	1638-1793	156	CP009554.1	fág protein
4R/5				
	12-182	171	CP009554.1	fág tail fiber
	185-472	288	JQ957931.1	hypothetical protein
4R/6				
	632-808	177	CP009554.1	putative major teichoic acid biosynthesis protein C

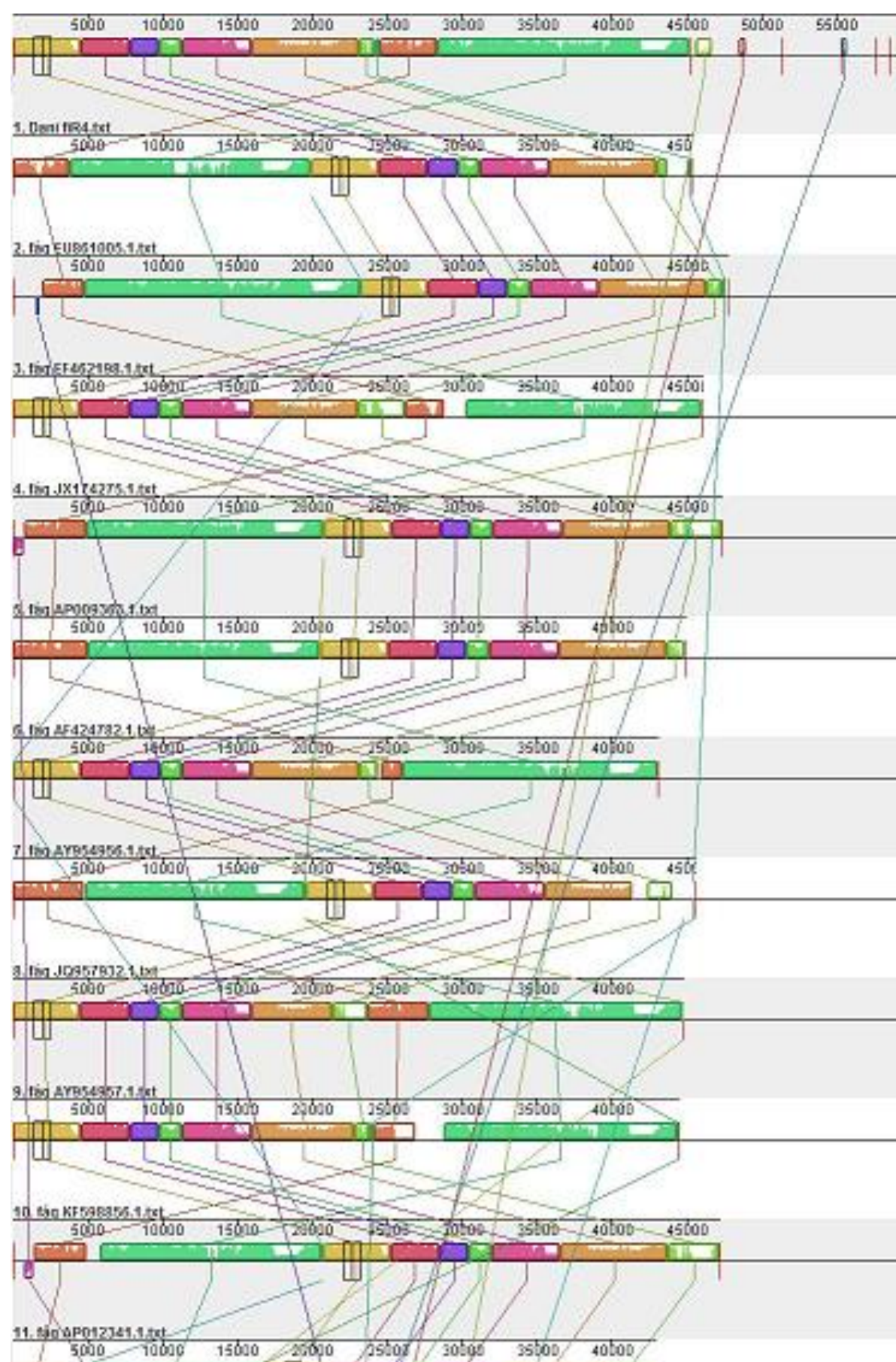


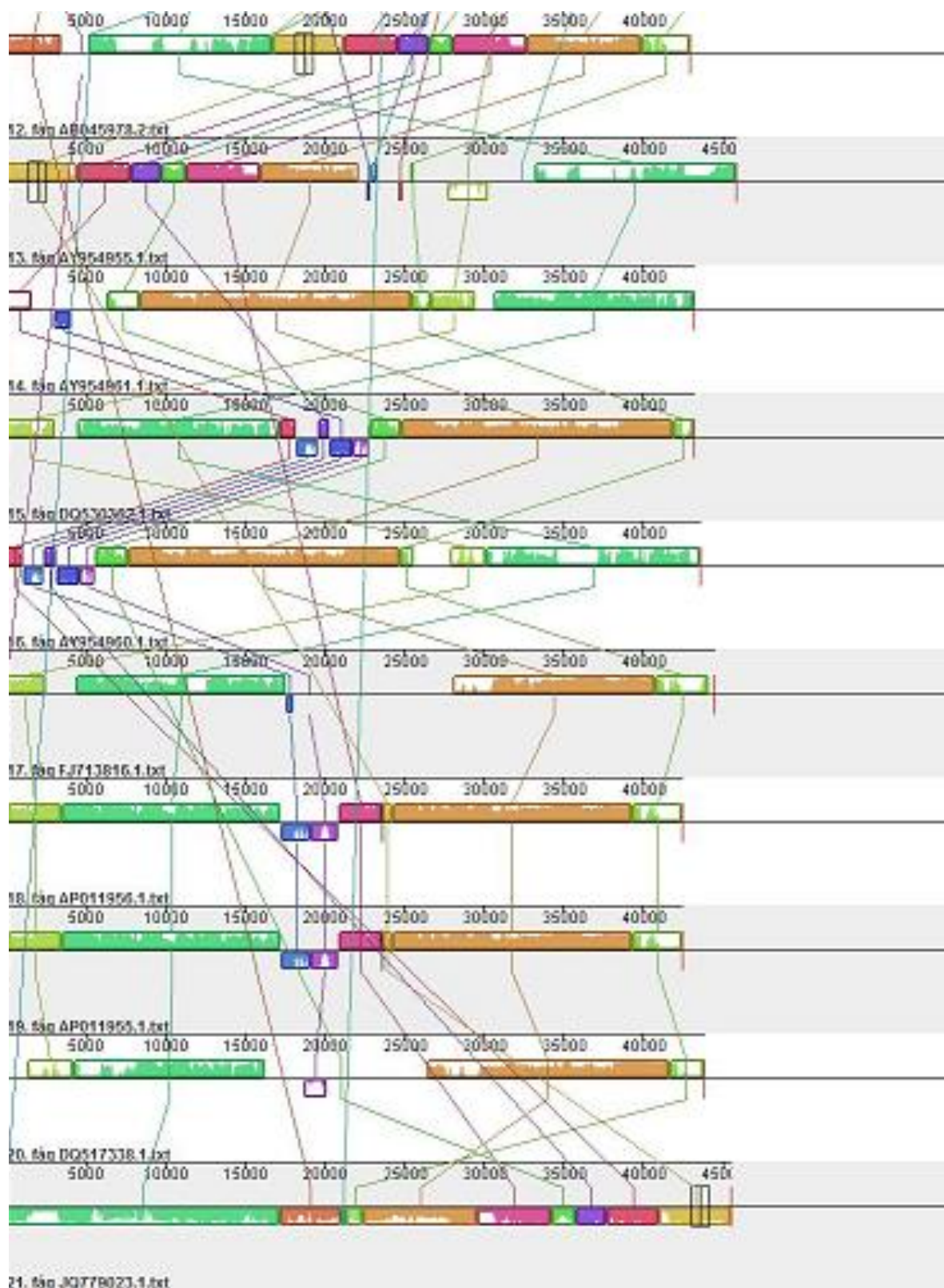
16. Ábra. A fágot felépítő fehérjék szekvenciáinak elhelyezkedése a genomban



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

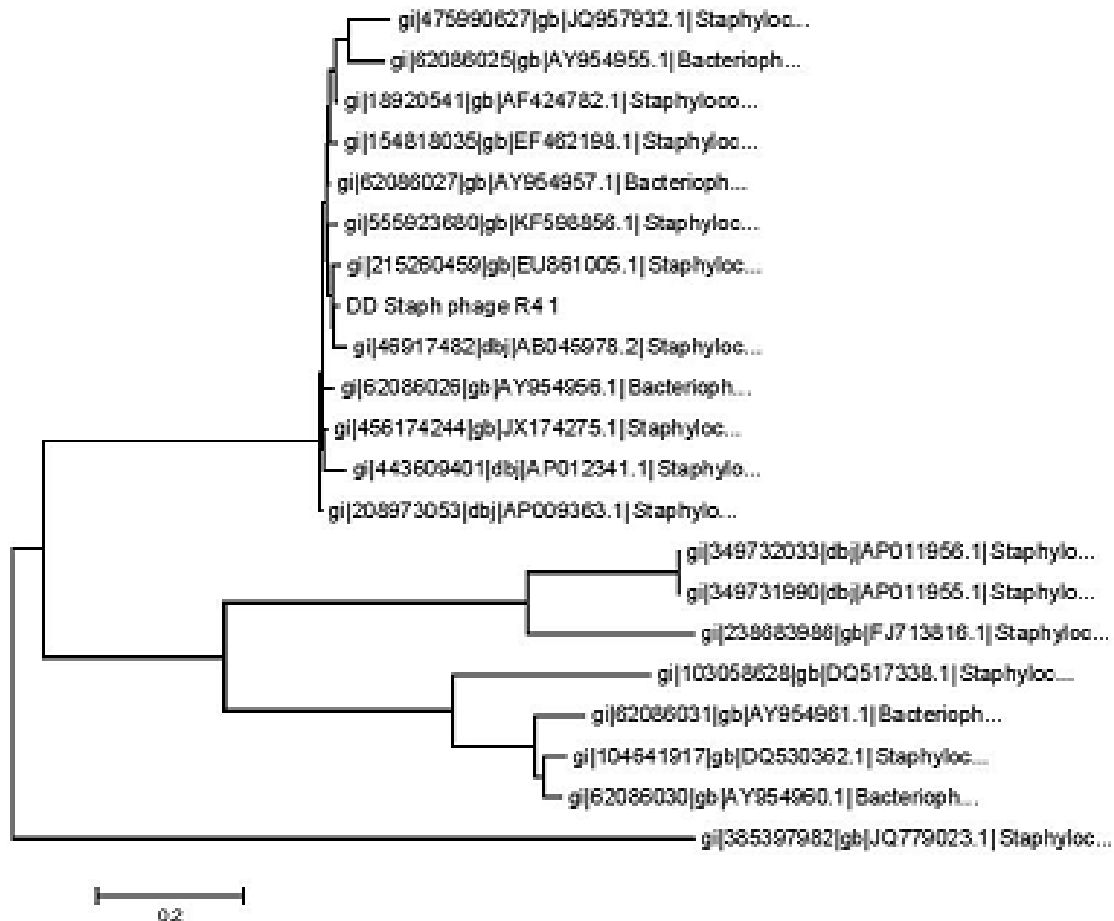
A vizsgálat során a kódoló szekvenciák jelentős része még ismeretlen funkciójúnak adódott, de nagy számban voltak azonosíthatóak már ismert vagy részben ismert funkciójú fehérjék is. Valamint több bakteriális eredetű fehérjekódoló szekvenciát is azonosítottunk, mint a Clp proteáz ClpP, teichoic acid 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.





18. Ábra: A Φ4R 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.



19. Ábra. A Φ 4R fág és vizsgálatainkban használt többi fág filogenetikai analízise dendogrammon ábrázolva

Az interneten elérhető és szabadon letölthető MEGA programmal elvégeztük a Φ 4R és genetikai vizsgálatokban előzőleg használt fágok filogenetikai analízisét. Meglepő eredményeket kaptunk a legnagyobb 98% homológiát mutató JQ779023.1 fág az ábra szerint a legtávolabbi rokona, a legközelebbi pedig a 66% homológiát mutató AB045978.2 fág. A többi 80% fölötti homológiájú fág az AB045978.2-höz hasonlóan közelebbi rokona a Φ 4R fágoknak. A többi alacsonyabb homológiájú fág távolabbi rokona, de nem annyira, mint a JQ779023.1 fág.

5. Rövidítések jegyzéke

AMPS	ammónium perszulfát
ca MRSA	community acquired methicillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
ha MRSA	hospitally acquired methicillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i> kórházi törzsek
MRKNSA	methicillin rezisztens koaguláz negatív <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	methicillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
O/N	over night kultúra (egy éjszakás felnövesztésű kultúra)
PTSA	pirogén toxikus szuperantigének
rpm	round per minute (percenkénti fordulatszám)
SE	<i>Staphylococcus enterotoxin</i>
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylenediamine
TSST-1	toxikus shock szindróma toxin 1
WHR	wild host range (széles gazdaspecificitás)

6. Irodalomjegyzék

Aaron C.E. Darling, Bob Mau, Frederick R. Blatter, and Nicole T. Perna. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*. 14(7):1394-1403.

Ackermann H. W. 1999. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Adv. Virus Res.* 51:135-201.

Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G.: Minireview Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. p 649-659.

Forbes B. A., Sahm D. F., Weissfeld A. S. 2007. *Diagnostic Microbiology*. Bailey and Scott's. 178-186.

Garzoni C., Francois P., Huyghe A., Couzinet S., Tapparel C., Charbonnier Y., Renzoni A., Lucchini S., Lew D. P., Vaudaux P., Kelley W. L., Jacques Schrenzel J. 2007. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics*. 8:171.

Courvalin P. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 38 (7): 1447-51.

Duckworth D. H. 1976. Who discovered bacteriophage. *Bacteriological Reviews*. p. 793-802

d'Hérelles F. 1917. "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques" (PDF). *Comptes rendus Acad Sci Paris*. 165: 373–5. Archived from the original on 4 December 2010. Retrieved 5 September 2010.

Gergely L. 2003. Orvosi mikrobiológia. Alliter. p. 133-146, 286-288

Jonathan File'e, Francoise Te'tart, Curtis A. Suttle, and H. M. Krisch. 2005. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. vol. 102. p.12471–12476.

Wommack K. E. és Colwell R. R. 2000. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiology and Molecular. Biology Reviews* March. vol. 64 no. 1 69-114.

Mann N. H. 2005. The Third Age of Phage. *PLoS Biol* 3(5): e182.
doi:10.1371/journal.pbio.0030182.

Pesti M. 2001. Általános mikrobiológia. *Dialóg Campus*. 55-56, 262-263.

McGrath S. and Sinderen D. v. 2007. Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology. Caister Academic Press. 1-42.

Internetes hivatkozások:

1. <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/04/080423181124.htm>

Bioinformatikai alkalmazások:

1. www.ncbi.nlm.nih.gov
2. <http://asap.genetics.wisc.edu/software/mauve/>
3. <http://www.megasoftware.net/>

7. Összefoglalás

A kísérleteinkhez először az MRSA-t lizálni képes bakteriofágokat kellett izolálnunk. Az izolálás egyedül emlősök alommintáiból volt sikeres, főképp haszonállatokéból. Az izolált törzsek hatékonyságának ellenőrzésekor csak három fág törzsnél tudtunk stabil gazda parazita kapcsolatot kimutatni a fág és gazdabaktériuma között. Ezeket a következő kódjelekkel neveztük el $\Phi 3M2$, $\Phi 3M5$ és a $\Phi 4R$ fágok. A fágok felszaporodási hatékonyságának vizsgálatánál a $\Phi 4R$ fág bizonyult magas titerűnek és a gazdabaktériuma ellen a leghatékonyabbnak a $\Phi 3M$ fágok csak kisebb titert értek el ezért a további vizsgálatokhoz a $\Phi 4R$ 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 lizist okozó fág izolálásához igen nagyszámú minta vizsgálatára lenne szükség. A $\Phi 4R$ fág gazdabaktériumán az 5 MRSA-n csíraszám meghatározást végeztünk különböző típusú szuszpenziókban. Megállapítottuk, hogy az over night kultúra (2×10^8 /ml) ötszörös hígítása megfeleltethető az OD1 kultúrának. Az MRSA töménységének hatása a fág felszaporodására vizsgálatnál megállapítottuk, hogy a nagy töménységű baktérium szuszpenzióból készült baktériumgyep nem alkalmas az alkalmazott 10^8 /ml titerű fág vizsgálatára, mert a $\Phi 4R$ fág nem tud plakkot kialakítani. A kisebb töménységű szuszpenziók megfelelőek, de gyakorlati okok miatt az OD1 a legpraktikusabb. A kétértékű sók hatásának vizsgálatánál a tézis mely szerint a kétértékű sók előnyösen befolyásolhatják a fág felnövesztését, az adataink alapján az általunk izolált és a kísérletben szerepelt $\Phi 4R$ fagra is igaz. Az adatokból kitűnik, hogy a kétértékű sók bizonyos koncentrációkban jelentős mértékben elősegítik a fág propagálást. Ez az érték a mi rendszerünkben Mg^{2+} ionok esetében 0.01 M-os míg Ca^{2+} ionok esetében 0.1 M-nak adódott. A kontrolléhoz viszonyítva a fágpropagálás mértéke 2.5-5 illetve 11-28-szorosára nőtt. Mindemellett Fágpropagálás a kontroll LB oldatban is mindig tapasztalható, ami természetesen inkább arra utal, hogy az LB oldatban levő kétértékű ionok már bizonyos mértékű propagálásra lehetőséget adnak. További vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a gazdabaktérium tápközegének összetétele is hatással van a fág felszaporodásának mértékére. Feltevésünk szerint az eltérő tápközegekben eltérő az adott baktérium fehérjeösszetétele, amely érintheti a fág receptorként szolgáló fehérje kifejeződését is. A kétértékű sók

vizsgálatánál és a tápközeg összetétel vizsgálatánál tapasztalható volt, hogy azonos körülmények között felszaporítva is a $\Phi 4R$ fág jelentősen különböző titereket adott, ez a jelenség feltételezhetően a fág nagy mutációs rátájára vezethető vissza.

A dolgozat eredménye továbbá, hogy elvégeztük az újonnan izolált fág morfológiai vizsgálatát is transzmissziós elektronmikroszkópot használva. A vizsgálat során megállapítottuk a fág méretét és egyéb morfológiai sajátosságait melyek alapján a *Siphoviridae* családba soroltuk. Illetve a fág genetikai vizsgálatát restrikciós endonukleázos emésztéssel. Ezek később lehetővé teszik az $\Phi 4R$ fág más fág törzsekkel való összehasonlítását. Elvégeztük továbbá a megszekvenált fág genom fehérjekódoló régióinak azonosítását és más fág genomokkal való összehasonlítását, valamint megállapítottuk ezen fágokkal való rokonsági fokát, amit dendogrammon ábrázoltunk.

Munkánk során bebizonyosodott, hogy az általunk izolált $\Phi 4R$ fág ugyan szűk gazdaspecifitással rendelkezik, tehát nem alkalmas fágterápiás gyakorlati alkalmazásokhoz, de a vele végzett funkcionális kísérletek útmutatóként szolgálhatnak a nagymennyiségű fágpropagálás ideális körülményeinek beállításához, gondolván itt elsősorban a sókoncentrációra és a táptalaj minőségére. További vizsgálatokat tartunk célszerűnek elvégezni azon receptor azonosítására, melynek kifejeződése az 5MRSA-ban táptalajfüggő és mindamellett az $\Phi 4R$ fág bejutását teszi lehetővé.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Schneider Györgynek a sokévi segítségért és kitartásért, a szakmai tanácsokért és útmutatásért.

Köszönettel tartozom konzulensemnek Dr. Putnoky Péternek a segítségével, hasznos szakmai tanácsokért és az oktatásért.

Továbbá köszönetet mondok Dr. Maróti Gergelynek (Seqomics kft., Mórahalom), Dr. Kovács Tamásnak (Enviroinvest Zrt., Pécs) és Rákhely Gábornak (Szegedi Tudományegyetem, Biotechnológiai Tanszék) a szekvenálásban és bioinformatikai analízisben nyújtott segítségért, valamint minden segítségért és hasznos tanácsért a PTE, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet laboratóriuma munkatársainak, Lajkó Rózsának, Kovács Juditnak, Dorn Ágnesnek és Felső Péternek.

Szeretném megköszönni a lehetőséget, hogy a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetének laborjában dolgozhattam munkám során.