

36. OTDK Biológia Szekció

Bakteriofágok izolálása és alkalmazása klinikailag releváns multidrog rezisztens *Acinetobacter baumannii* törzsek ellen

Készítette:

Eszenyi Bálint Dénes, II. évfolyam biológus MSc

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szintetikus- és
Rendszerbiológiai Egység

Transzlációs Mikrobiológia Csoport

Témavezető:

Dr. Kintses Bálint

2023

Szeged

Rövidítések jegyzéke

MDR – Multidrog rezisztens

AMP – antimikrobiális peptid

WHO – Egészségügyi Világszervezet

ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, és *Enterobacter spp.*

DNS – deoxiribonukleinsav

MLST – multilókusz szekvencia tipizálás

ST – szekvencia típus

KL – tok típus

LB – lysogeny broth

MOI – multiplicity of infection

PBS – foszfáttal pufferolt sóoldat

CFU – telepkepző egység

TEM – transzmissziós elektronmikroszkóp

PEG – polietilén-glikol

kb – kilobázis

dsDNS – duplaszálú DNS

ssDNS – egyszálú DNS

ssRNS – egyszálú RNS

PFU – plakk formáló egység

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Célkitűzés.....	7
3. Irodalmi áttekintés.....	8
3.1. Fágok felépítése.....	8
3.2. Fágok fertőzési stratégiái.....	9
3.3. A fágterápia előnyei	10
3.4. A fágterápia hátrányai	11
3.5. Feltételek a fágok használatához.....	12
3.6. Az <i>Acinetobacter baumannii</i> tulajdonságai	12
3.7. A kutatásban használt 38 <i>A. baumannii</i> törzs tulajdonságai	14
4. Anyagok és módszerek.....	16
4.1. Tápoldatok és táptalajok.....	16
4.2. Fág izolációra használt törzsek	16
4.3. A fágok izolálása.....	16
4.4. A fágok felszaporítása.....	17
4.5. Fág genom izolálása	17
4.6. Baktérium genom izoláció	17
4.7. A fágok és baktériumok tárolása	17
4.8. Transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) készült képek	17
4.9. A fágok hatékonyságának mérése és fág-rezisztens törzsek izolálása.....	18
4.10. Fág-1 és Fág-4 <i>in vivo</i> alkalmazása.....	18
5. Eredmények.....	20
5.1. Izolált fágok és jellemzőik	20

5.2. Azonosított bakteriofágok plakk morfológiája és transzmissziós elektronmikroszkópos képei	21
5.3. Fágok fertőzési hatékonysága a kísérletekben alkalmazott 38 <i>A. baumannii</i> törzsön	22
5.4. Fág-1 és fág-2 <i>in vitro</i> kísérleteiből azonosított fág-rezisztens törzsek	23
5.5. Fágok hatékonysága egyedileg és kombinálva a 38 baktérium törzsön.....	24
5.6. Fágoktállal végzett <i>in vitro</i> kísérletekből azonosított fág-rezisztens törzsek.....	26
5.7. <i>In vivo</i> kísérletekből azonosított fág-rezisztens baktérium törzsek.....	27
5.8. Szekvenált baktérium törzsek és fág rezisztenciát okozható mutációk.....	28
5.8. Fág-1 és fág-4 <i>in vivo</i> hatékonysága	29
6. Összefoglalás.....	30
7. Diskusszió.....	31
8. Jövőbeli tervek	32
9. Köszönetnyilvánítás	32
11. Irodalomjegyzék.....	33

1. Bevezetés

Az emberiség a kezdetektől fogva harcot vív a különböző kórokozók által okozott fertőzésekkel. A történelem során ezek a fertőzések rengeteg emberi életet követeltek, mivel nagyon kevés lehetőség volt a gyógyításukra. Különböző antimikrobiális tulajdonságú szerek jelenlétéről már a Bibliában és más történelmi feljegyzésekben is olvashatunk, de ezek működési háttere nem volt ismert (Aminov, 2010). A különböző betegségek gyógyítása sok esetben hatástalannak bizonyult vagy rontott a páciens állapotán. Szifiliszben szenvedő betegeket a testükbe juttatott higannyal próbálták gyógyítani, TBC-s pácienseket pedig a szabad levegőre való kitételrel kezelték (Wong, 2016; Hobday, 2019).

Egészen 1928-ig, mikor Alexander Fleming felfedezte a penicillint nem volt lehetőség a bakteriális fertőzések gyógyítására (Tan és Tatsumura, 2015). Felfedezésüket követően, rendkívüli hatékonyságuk miatt az antibiotikumok használata gyorsan elterjedt az egész világon. Úgy tűnt, hogy sok fertőzés többé nem fog problémát jelenteni az emberiség számára, azonban az elmúlt évtizedekben az újonnan felfedezett antibiotikumok száma csökkenő tendenciát kezdett mutatni (Conly J és mtsai, 2005). Ezzel párhuzamosan, az intenzív, évtizedeken át tartó, sokszor nem megfelelő és túlzott antibiotikum használat pedig olyan patogén baktériumok elterjedéséhez vezetett, melyek ellenállnak az antibiotikumok hatásának (antibiotikum rezisztensek) és ezáltal újból komoly veszélyt jelentenek számunkra. 2019-ben ezen antibiotikum rezisztens mikrobák által okozott halálok száma meghaladta a malária és HIV/AIDS-es halálozások számát (Thompson, 2022). Ma már a modern orvostudomány egyik legnagyobb akadályát képezik ezek a több antibiotikummal szemben is ellenálló, ún. multidrog rezisztens (MDR) baktériumok.

Az antibiotikumok ellen gyorsan kialakuló rezisztencia a baktériumokban és ezen rezisztencia mechanizmusok horizontális géntranszferrel (az élőlények közötti genetikai információáramlással) történő terjedése a baktériumok között megnövelte az igényt új antibiotikumok fejlesztésére (Arnold és mtsai., 2021). Egy-egy új antibiotikum piacra hozatala sok éves kutatásba és több milliárd dollárba kerül (Plackett, 2020). A megnövekedett igény és az egyre lassuló fejlesztéseknek köszönhetően égető szükség lett alternatív megoldásokra, melyek segítségével hatékonyan vehetjük fel a harcot ezekkel az antibiotikum rezisztens kórokozókkal. Ilyenek lehetnek az antimikrobiális peptidek (AMP), bakteriocinek vagy a bakteriofágok (fágok). A fágok terápiás célzatú használata, avagy a fágterápia talán a legígéretesebb ezek közül.

A fágok a világ legelterjedtebb vírusai, melyek baktériumok elpusztításával szaporodnak. A fágok baktériumölő képességét leíró megfigyeléseket tartalmazó feljegyzések már régmúltban is készültek, többek között a lepra elleni jótékony hatásukról is beszámoltak a múltban, bár ekkor még nem tudták milyen magyarázat áll e mögött (Golkar és mtsai., 2013). A fágok tudományos életbe való belépését csak Fredrick Twort és Felix d’Herelle egymástól független felfedezései és kutatási eredményei tették lehetővé (Twort, 1915; d’Herelle 1917). Twort volt, aki először felvetette, hogy a fágok vírusok. Két évvel Twort elmélete után d’Herelle pedig leírta a fágokat miközben a vérhas tüneteit kezelte (Dublanchet és mtsai., 2008). Az első tudományos esettanulmány azonban Richard Bruynoghe és Joseph Maisin kísérletéből született, melyben *Staphylococcus aureus* okozta bőrbetegséget kezeltek fágokkal. Ekkor azonban az Amerikai Orvosi Szövetség Gyógyszerészeti és Kémiai Tanácsa (The Council on Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association) elvetette a vírus elméletet és enzimaktivitásnak tudta be ezeket az eredményeket (Sulakvelidze és mtsai 2001). A nyugati világban további kutatásukat legnagyobb mértékben az antibiotikumok megjelenése és hatékonysága, valamint a fágokkal végzett kísérletek reprodukálhatósága korlátozta. Ezzel szemben keleten a fágterápia nagyobb befolyással bírt (Chanishvili; 2012).

Az elmúlt években azonban az antibiotikum krízis és a fágok több évtizedes vizsgálata újból előtérbe helyezte a fágterápiát. A fágterápia során nagy körültekintéssel összeválogatott fágokból álló koktélt alkalmaznak egy bakteriális fertőzés kezelésére. A közelmúltban a fágterápia több alkalommal is hasznosnak bizonyult MDR baktérium fertőzésekkel szemben (Sulakvelidze és mtsai., 2001; Schooley és mtsai., 2017). A WHO 2017-es nyilatkozatában listába szedte a legnagyobb fenyegetést jelentő patogén baktériumokat. Ezek közé tartozik a kritikus kategóriába sorolt ESKAPE patogén, az *Acinetobacter baumannii*, amely több ismert és nagy mennyiségben használt antibiotikumra, mint például béta-laktámokra, aminoglikozidokra, fluorokinolonokra vagy tertaciklinekre is rezisztens (Kyriakidis és mtsai., 2021). Az *Acinetobacter* terjedése és a közelmúltban alkalmazott sikeres fágterápia ez a patogén mikroba ellen, ösztönözte kutatócsoportunkat egy *Acinetobacter* törzsgyűjtemény és ezen törzseket fertőző fág kollekció létrehozására. A Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Dr. Kintses Bálint vezetésével létrehozott laboratórium által begyűjtött *A. baumannii* izolátumokból meghatároztuk a legnagyobb mértékben terjedő *A. baumannii* szerotípust Magyarországon. A kutatás eredményeit felhasználva a fő célom egy olyan bakteriofágkoktél összeállítása, amely hatékony ez ellen a szerotípus ellen.

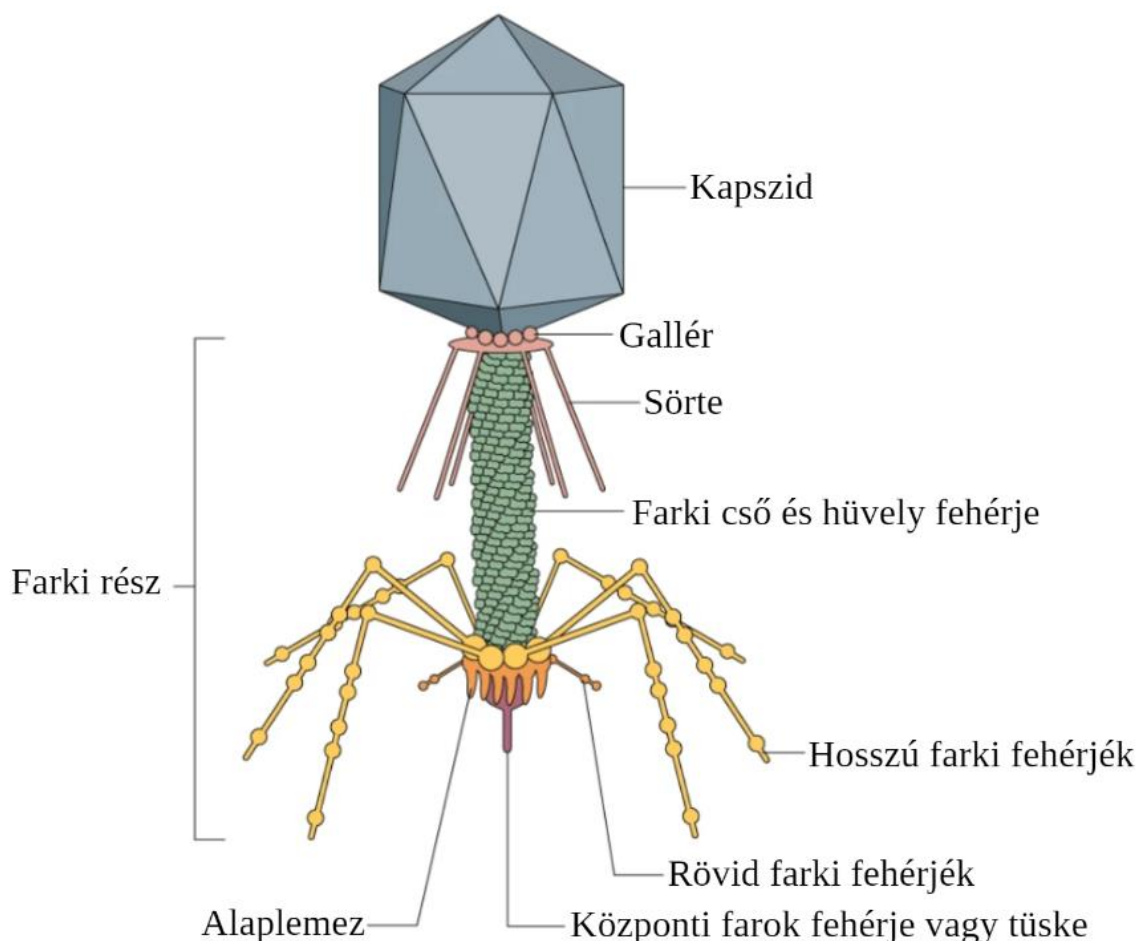
2. Célkitűzés

- *A. baumannii* szerotípusok ellen fágok izolálása szennyvízből és ezen fágok jellemzése
- Fág-rezisztens törzsek *in vitro* előállítása
- Fágok önálló és kombinált módon történő alkalmazásának vizsgálata
- Olyan fágkoktél összeállítása, amely gátolja a fág rezisztencia kialakulását
- Fág-rezisztenciát okozó gének, mutációk azonosítása

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Fágok felépítése

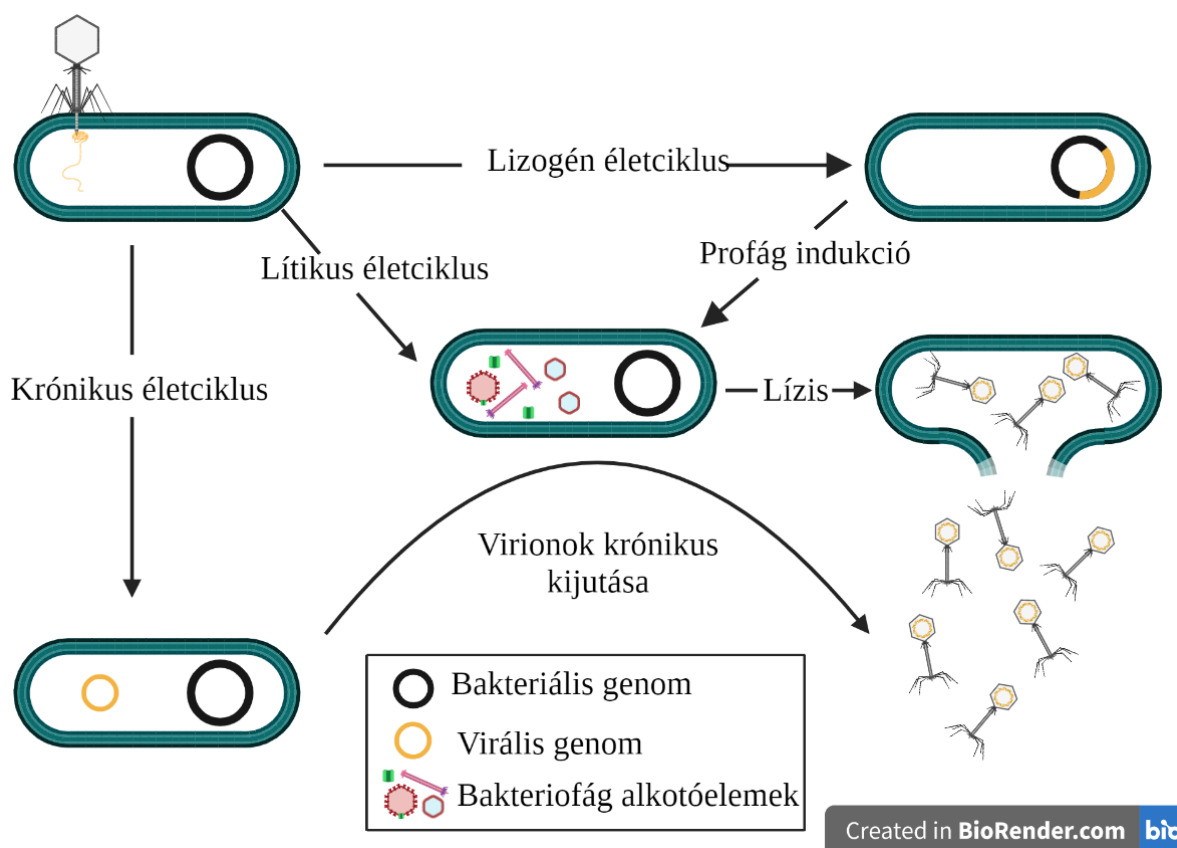
A fágokat genomjuk és morfológiájuk alapján is meg lehet különböztetni. Utóbbi alapján lehetnek farokkal rendelkező, ikozéder szerkezetű vagy fonalas fágok. Genomjuk lehet kettős szálú DNS (dsDNS), egyszálú RNS (ssRNS) vagy egyszálú DNS (ssDNS) (F. Bayat és mtsai, 2021). A ma ismert fágok többsége a *Caudovirales* rendbe tartozik, melyek farki régióval és dsDNS genommal rendelkeznek, mely 15-500 kb között változik (Łobocka és mtsai, 2021). A farki régió fehérjéi döntő szerepet játszanak a gazda baktérium felismerésében mivel ezeken keresztül ismeri fel a fág a baktérium felszínén található különféle molekulákat (Young és Gill, 2015). Az 1. ábrán a *Caudovirales* rendbe és *Myoviridae* családba tartozó fágok általános felépítése látható. A dolgozatom témáját képező négy fág morfológiailag mind ebbe a családba sorolható.



1. ábra *Myoviridae* családba tartozó fágok általános felépítése (Nobrega és mtsai., 2018 nyomán).

3.2. Fágok fertőzési stratégiái

A fágokat lítikus, lizogén vagy krónikus életciklussal lehet jellemezni (2. ábra). A lítikus életciklussal rendelkező fágok a fertőzés első lépéseként, kötődnek a különböző felületi molekulák felismerésével a baktériumhoz. A kötődést követően bejuttatják a genetikai anyagukat a baktériumba és annak erőforrásait kihasználva sokszorozzák DNS-üket és fehérjeiket. Az életciklus végén olyan fehérjék transzlációja megy vége, melyek a baktérium lízisét (halálát) és a fágok környezetbe való kijutását eredményezik (Young R, 1992). A lizogén életciklussal rendelkező, avagy temperált fágok ezzel szemben a behatolás után genomjukat képesek integrálni a gazda örökítő anyagába és annak osztódását kihasználva végzik replikációjukat. Az ekkor már profágoknak nevezett vírusok különböző környezeti hatásokra pedig indukálódhatnak, mely során kivágódnak a genomból és a lítikus ciklushoz hasonlóan a baktérium lízisét eredményezik (Bruce és mtsai., 2021). A krónikus fertőzéskor a vírus fennmarad a gazda baktériumban és folyamatos virion termelődést válthat ki a sejt elpusztítása nélkül (Clokier és mtsai., 2011).



2. ábra A vírusok általános fertőzési stratégiái (saját ábra).

3.3. A fágterápia előnyei

A fágok használata sok szempontból előnyös más terápiás eljárásokkal szemben (Loc-Carrillo és Abedon, 2011). Az antibiotikumok alkalmazása az emberi szervezet számára megterhelő és esetenként komoly, élethosszig tartó mellékhatásokkal jár (Heta és Robo, 2018). A fágok képesek interakcióba lépni az emlős immunrendszerrel, azonban az ellenük kiváltott immunválasz gyenge és sok esetben a nem megfelelően kitisztított minta egyéb komponenseinek tulajdonítható (Belleghem és mtsai, 2019). A legtöbb antibiotikum széles körben, nem szelektív módon gátolja a mikrobák növekedését és ezáltal jelentősen károsítja a bélflóránkat (Hofer, 2022). Mindezen felül az antibiotikumoknak egyéb káros mellékhatásai lehetnek (pl. nefro- vagy neurotoxicitás (Heta és Robo, 2018)). A fágok, köszönhetően magas fokú gazdaspecifitásuknak egy mikrobiális közösségen belül, rendkívül specifikus módon fertőzhetnek és távolíthatnak el egy baktériumokat (Harcombe és Bull, 2005). Az antibiotikumok széles hatásspektruma miatt az ellenük kialakuló rezisztencia esélye is növekszik, valamint a mikrobák horizontális géntranszferrel könnyedén terjeszthetik a védekezési mechanizmusokban szerepet játszó géneket (Silva és mtsai., 2007). Ezzel szemben a fágok ellen kialakuló rezisztencia, azok szűk gazdaspecifitása nyomán csak az adott fág, vagy az ahhoz hasonló fágok ellen fog védelmet biztosítani (Capparelli és mtsai., 2010; Chan, 2016). Emellett a fág rezisztencia kialakulása érzékenységet idézhet elő antimikrobiális szerek, illetve más fágok ellen, csökkentheti a gazdabaktérium virulenciáját és/vagy a fitneszt (Trudelle és mtsai., 2019; Altamirano és mtsai., 2021). Az antibiotikum rezisztencia kialakulása a baktériumot érzékenyebbé teheti fágokkal szemben (Chen és mtsai., 2017) mindezek mellett egy új antibiotikum kifejlesztése sok éves munkába, dollármilliókba kerül, míg új fágok izolálása és a használatukhoz szükséges kísérletek elvégzése jóval kevesebb erőforrást igényel (Loc-Carrillo és Abedon, 2011). A fágok tulajdonságai (nevezetesen, hogy nincs dokumentált, súlyos mellékhatása az alkalmazásuknak) lehetőséget adnak kombinált formában történő használatukra, hogy így hatékonyabban működjenek (Khalifa L és mtsai., 2018). Ezen felül genetikai manipulációval vagy természetes szelekcióval fenotipikus változásokat is előidézhetünk bennük, megváltoztatva a gazdaspecifitásukat (Goodridge, 2010).

A sok baktériumra jellemző biofilm képzés egy komoly kihívást jelent az antimikrobiális szerek fejlesztésekor, mivel ezen képletek gátolják szerek célba jutását (Tasneem és mtsai., 2018). A fágok strukturális fehérjeiken, pl. a farki apparátusukban hordozhatnak különféle enzimatis aktivitással rendelkező régiókat, melyek segítségével képesek lehetnek lebontani ezen biopolimereket és így hozzáférközni a kórokozókhoz (Hughes

és mtsai., 1998). A fágok önszaporító természetéből adódóan egyszeri, alacsony koncentrációban való használatuk is jó eredménnyel szolgálhat (Abedon és Thomas-Abedon, 2010). Terjedhetnek a környezetben és egyének közt, ami elősegítheti azonosításukat és a patogén baktériumok elleni természetes védelmüket (Barrow és Soothill 1997). Kombinált használatunk más terapeutikumokkal növelheti hatékonyságukat mert a fágok vagy antibiotikumok ellen kialakuló rezisztencia érzékennyé teheti az adott baktériumot más fágokkal vagy antibiotikumokkal szemben (Li X és mtsai, 2021).

3.4. A fágterápia hátrányai

Ma már rengeteg fág elérhető különböző fág gyűjteményekből, de továbbra is szükséges az új fágok izolálása az újonnan megjelenő kórokozókkal szemben. Ez az eljárás időigényes és sokszor eredménytelennek is bizonyulhat. Ezen felül a fágok jelentős része nem lítikus fág és ezek nem használhatók terápiára. A fágok szűk gazdaspecifitása hátrány lehet abból a szempontból, hogy nem feltétlenül képesek fertőzni a fertőzést okozó ágenseket, valamint hamar kialakulhat ellenük a rezisztencia. Erre megoldást jelenthet a fágkoktélók összeállítása, amit viszont hasonlóképpen ellenőrizni kell és így szintén hosszú időt vehet igénybe a vizsgálatuk. Egy kezelést megelőzően elengedhetetlen a baktérium előzetes laboratóriumi vizsgálata ahhoz, hogy tudjuk melyik fágot vagy fágokat kell alkalmazni.

A fágok biológiai entitások és képesek kölcsönhatásba lépni az immunrendszerrel vagy használatuk bakteriális toxinok felszabadulásához vezethet (Hurley, 2012). Ez ugyanakkor igaz sok, jelenleg forgalomban lévő gyógyszerre is. Fontos megemlíteni, hogy a múltban az immunrendszerre gyakorolt negatív hatásuk nagy valószínűséggel a nem megfelelő tisztaságú fág oldat használata miatt volt, melybe a bakteriális endotoxinok a fágok felszaporítása során kerültek (Skurnik és mtsai., 2007).

A terápiás kezelés során nagy körültekintéssel kell megválasztani, hogy milyen fágokat alkalmazunk, és alapos ismerettel kell rendelkezni a fertőzési mechanizmusokról, mert ritkán a fág rezisztencia keresztrezisztenciát eredményezhet más terápiás szerekkel szemben (Kortright és mtsai., 2021). A fágok terápiás alkalmazását korlátozza, hogy nem szabadalmaztathatók, valamint személyre szabott terápiaként alkalmazzák, ami a költségét növeli (Verbeken és mtsai., 2019).

3.5. Feltételek a fágok használatához

Fágterápiára jelenleg csak a lítikus életciklussal rendelkező fágok használhatóak, mert ezek a fertőzést követően rövid időn belül a gazdabaktérium lízisét okozzák. A temperált életciklussal rendelkező fágok, amellet, hogy nem ölik el időben a célbaktériumot, lizogén konverziót (adott környezetben fitness előnyt biztosító gén vagy gének beépülése a gazdaszervezet genomjába) idézhetnek elő (Canchaya és mtsai., 2003).

Egy fág terápiás alkalmazásához elengedhetetlen a genomjának a vizsgálata, fertőzési mechanizmusának feltérképezése, transzdukciós (vírus közvetítette genetikai anyag átjutása egyik baktériumból a másikba) képességének felmérése. Emellet elkerülendő olyan fágok használata, melyek hordoznak antimikrobiális rezisztencia géneket, virulencia faktorokat vagy a temperált fágokra jellemző géneket. A fágoldat megfelelő tisztítása is egy kulcsfontosságú lépés, amely során eltávolítják a bakteriális sejttörmeléket, amely immunválaszt válthat ki emberben. Egy adott fág felszaporításakor indukálódhatnak a baktériumtörzsekben természetes módon jelenlévő profágok. A profágot tartalmazó fág oldat használata szintén elkerülendő mert ezek is képesek virulencia faktorokat vagy rezisztencia géneket hordozni (Bruce és mtsai., 2021).

3.6. Az *Acinetobacter baumannii* tulajdonságai

Az *Acinetobacter* nemzetség már több mint 30 éve ismert. Prominens képviselője a Gram-negatív *A. baumannii*, mely az elmúlt 15 évben súlyos problémát okozott a klinikumban (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Főként nozokomiális megbetegedéseket okoz, fertőzést válthat ki csontokban, bőrön, központi idegrendszerben és lágy szövetekben is (Peleg és mtsai., 2008). Magas virulenciáját a benne megtalálható porinoknak, tokképző képességének, lipopoliszacharid és sejtfal szintézisének, biofilm képzésének és motilitásának köszönheti (Moubareck és Halat, 2020).

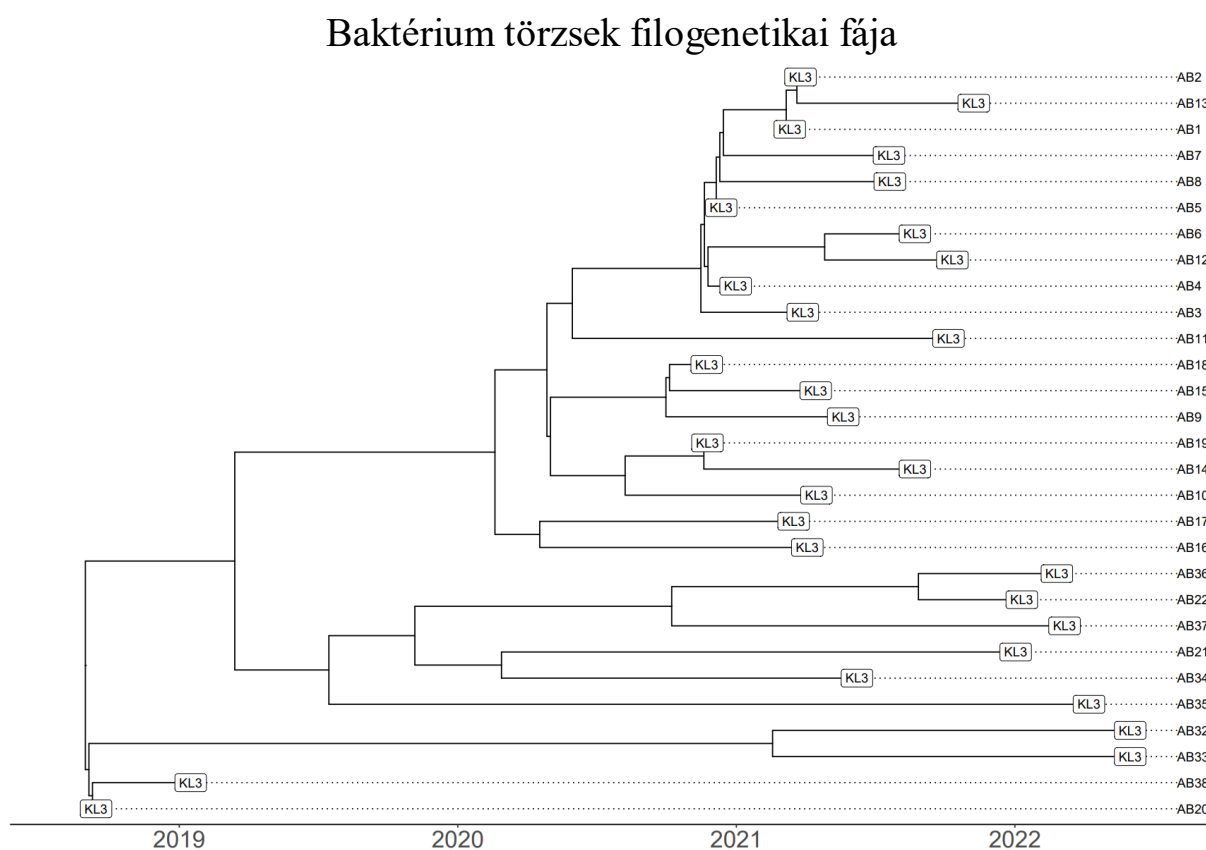
A ma rendelkezésre álló terápiás eljárások elleni kivételesen magas védekező képessége az antibiotikum-hidrolizáló enzimeknek, efflux pumpáknak, a membrán átjárhatatlanságának és genomja plaszticitásának tudható be (Moubareck és Halat, 2020). *Acinetobacter* esetében a motilitást felülethez kötődő motilitás (surface-associated motility) vagy pílus segítségével végzett rángatózó mozgás jellemzi. Ez egyben virulencia faktora is, mert hiányában a baktérium virulenciája lecsökken (Eijkelkamp és mtsai., 2013; Vijayakumar és mtsai., 2016). Jellemző az *Acinetobacter* nemzetségre rájuk a glikokonjugátumok képzése. Ezeknek univerzális képviselői a tok poliszacharidok, glikozilált fehérjék, lipopoliszacharidok és a peptidoglikánok. Ezek a

szénhidrátok képezik az első jelenős védelmi vonalat a baktérium számára, segítik a biofilm képzést, antigén-antitest kölcsönhatások elkerülését, az immunrendszer fehérjei elleni védekezést, a gyógyszerek elleni rezisztenciát és a környezeti stressz toleranciát is növelik (Ophir és Gutnick, 1994; Iwashkiw és mtsai., 2012; Boll és mtsai 2015; Piepenbrink és mtsai., 2016). Mivel *in vivo*, a vas, cink vagy mangán nehezen hozzáférhető mikroelemek, az *Acinetobacter* patogenitásának sikerességében esszenciális a mikrotápanyag felhalmozása, mikroelem transzporterek segítségével. Ilyen például a *znuB*, mely a cink transzportjában játszik fontos szerepet (Wang és mtsai., 2014). A szekretált fehérjei a gazdaszervezet extracelluláris mátrixán és bazális membránján szükséges megtapadásban játszanak szerepet (Bentancor és mtsai., 2012).

Az *Acinetobacter* nemzetség tagjai által okozott fertőzések epidemiológiájának vizsgálatában fontos szerepet játszik a multilókusz szekvencia tipizálás (MLST). Ezen módszer során háztartási gének szekvencia vizsgálata történik, amik alapján szekvencia típusokba (ST) sorolhatók a különböző törzsek (Bartual és mtsai., 2005). Fontos jellemzőjük a kapszuláris poliszacharid szintézis. Ez a folyamat tipikusan a K lókusz génjei által vezérelt és szabályozott. A tok típusokból (KL típusok) ezidáig 217 ismert, és szintézisükben több mint 681 gén vesz részt (Cahill és mtsai., 2022). A tok jelenléte véd az immunrendszertől, antimikrobiális tulajdonsággal bír és a fágok fertőzőképességében is szerepet játszik (Soontarach., 2022).

3.7. A kutatásban használt 38 *A. baumannii* törzs tulajdonságai

A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban a Kintses laboratóriumban végzett kutatás során több száz *A. baumannii* izolátum genomjának és adatbázisokban fellelhető genom szekvenciáknak vizsgálatával filogenetikai fa készült. A legelterjedtebb szerotípus az multilokus szekvencia tipizálás alapján ST2 kategóriába tartozott és KL3-as tok típussal rendelkezett. Dolgozatomban ezek közül 38 törzset választottam ki, amiket az 3. ábrán és 1. táblázatban tüntettem fel. A 38 törzs az elmúlt 4 évben lett izolálva Magyarország, Románia, Bosznia-Hercegovina, Montenegró és Szerbia különböző kórházaiból és genetikailag távol állnak egymástól. A törzsek filogenetikai kapcsolata a genomjukban megtalálható mutációk és az izolációjuk ideje alapján lett meghatározva (3. ábra). Ezen törzsek használatával a fág rezisztencia kialakulásának sokféleségét és a fágoktól hatékonyságát szándékoztam bemutatni. Az általam végzett kísérletek ennek a munkának jelentős részét képezték.



3. ábra A dolgozatomhoz felhasznált *A. baumannii* törzsek filogenetikai fán ábrázolva (saját ábra).

1.táblázat. A kísérletekbe bevont 38 törzs tulajdonságai, antibiotikum és fág szenzitivitása

Törzsek					Bakteriofágok				Antibiotikum rezisztencia					
Név	MLST	Tok	Település	Idő	fág-1	fág-2	fág-3	fág-4	Aminoglikozid	Karbapenem	Makrolid	Fenikol	Szulfonamid	Tetraciklin
AB1	ST2	KL3	Szeged	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB2			Szeged	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB3			Szeged	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
AB4			Szeged	2020	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB5			Szeged	2020	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB6			Szeged	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB7			Szeged	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB8			Szeged	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB9			Budapest	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
AB10			Budapest	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB11			Szeged	2021	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
AB12			Szeged	2021	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
AB13			Szeged	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB14			Győr	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
AB15			Budapest	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB16			Nyíregyháza	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB17			Salgótarján	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB18			Budapest	2020	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB19			Budapest	2020	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB20			Belgrád	2018	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB21			Marosvásárhely	2022	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB22			Marosvásárhely	2022	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB23			Prijedor	2022	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB24			Banja Luka	2017	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB25			Banja Luka	2017	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB26			Podgorica	2017	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
AB27			Podgorica	2019	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB28			Podgorica	2019	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB29			Podgorica	2019	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB30			Belgrád	2022	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB31			Belgrád	2022	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB32			Pozsarevác	2022	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB33			Pozsarevác	2022	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB34			Bukarest	2021	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB35			Bukarest	2022	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
AB36			Kolozsvár	2022	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB37			Kolozsvár	2022	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AB38			Belgrád	2019	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+

Az 1. táblázatban a + jel a fágok általi fertőzést, illetve az antibiotikum rezisztencia jelenlétét mutatja, a – jel ezeknek a hiányát. Mindegyik törzs ST2 típusú volt és KL3-as tokkal rendelkezett. A KL és ST típus becslése a Kaptive 2.0 programot használva történt (Cahill és mtsai., 2022). A törzsek Magyarország, Bosznia-Hercegovina, Románia, Montenegró és Szerbia különböző pontjairól származnak. A törzsek antibiotikum szenzitivitásának meghatározása genom szekvenálás és kísérletes módon történt. Minden törzs rezisztens volt a karbapenem családba tartozó antibiotikumokra, valamint 37 törzs aminoglikozid-, 36 törzs tetraciklin-, 34 törzs szulfonamid, 33 törzs makrolid-, és 18 törzs fenikol rezisztencia géneket is hordozott e mellett. A törzsek mindegyike szenzitív volt a fág-1 és fág-2-vel szemben.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Tápoldatok és táptalajok

A baktériumok növesztését lysogeny broth (LB) (10 g Tripton, 5 g élesztő extraktum, 5 g NaCl / 1 L H₂O) tápoldatban 37 °C-on 180 rpm rázatás mellett végeztem. A fágok keresésénél használt 2x LB tápoldathoz 20 g Tripton, 10 g élesztő extraktum, 10 g NaCl / 1 L H₂O összetevőket használtam. Az LB táptalaj elkészítéséhez 1.5 g / 100 ml, a TOP agar elkészítéséhez 0.7 g / 100 ml arányban agaragart adtam a tápoldathoz és 20 percig kuktában sterilizáltuk.

4.2. Fág izolációra használt törzsek

A fág izolációra használt négy *A. baumannii* törzs a KL3, KL40 és KL12 tokkal rendelkezett. Ezek a törzsek nem tartoznak bele az 1. táblázatban felsorolt törzsekbe, csak a fág izolációhoz használtam őket.

2. táblázat. A fág izolációra kiválasztott törzsek és jellemzőik

Törzsek					Bakteriofágok				Antibiotikum rezisztencia					
Név	MLST	Tok	Település	Idő	fág-1	fág-2	fág-3	fág-4	Aminoglikozid	Karbapenem	Makrolid	Fenikol	Szulfonamid	Tetraciklin
AB_IS1	ST2	KL3	Szeged	2019	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
AB_IS2	ST2	KL3	Salgótarján	2021	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
AB_IS3	ST636	KL40	Budapest	2021	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
AB_IS4	ST2	KL12	Marosvásárhely	2022	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

A 2. táblázatban a + jel a fágok általi fertőzést, illetve az antibiotikum rezisztencia jelenlétét mutatja, a – jel ezeknek a hiányát.

4.3. A fágok izolálása

Az ország több pontjáról gyűjtött szennyvízmintákból azonsítottam a fágokat. A szennyvízmintákat üleptettem (4 °C, 6000 rpm, 30 perc). A felülúszót 0,45 µm (Sarstedt) szűrővel tisztítottam, majd 4 °C hőmérsékleten tároltam. A baktérium kultúrából 10⁸ sejtet adtam az 1:1 arányban összekevert 2xLB tápoldat és szennyvízminta elegyéhez. 12 vagy 24 óra inkubációt követően (37 °C 180 rpm) a mintáról eltávolítottam a sejteket (4 °C, 6000 rpm 30 perc) és 0,45 µm (Sarstedt) szűrővel sejtmentesítettem. Az éjszakán át növesztett baktérium sejtekből 400 µl-t 4 ml folyékony TOP agarral elegyítve LB táptalajt tartalmazó lemezen szélesztettem. A fágokat tartalmazó mintából hígítási sort készítettem és 10 µl-es cseppeket a lemezre helyeztem. A csészéket 37 °C-on egy éjszakát inkubáltam. A megjelenő egyedi

plakkokról pipetta hegygel átoltottam a fágot az $OD_{600}=0,6$ -ra növesztett sejtbe, majd legalább 4 órán keresztül, vagy a minta feltisztulásáig szaporítottam a fágot (37 °C 180 rpm). A fágok egyedi plakkokról történő felszaporítását legalább három alkalommal ismétetekem a több fágot tartalmazó minták elkerülése miatt.

4.4. A fágok felszaporítása

Az éjszakán át növesztett baktérium kultúrából 20 μ l / ml arányban adtam LB tápoldathoz. A sejteket $OD_{600}=0,6$ -ig növesztettem, majd 1 ml 10^8 PFU / ml koncentrációjú fágmintát adtam hozzá. A tenyészetet feltisztulásig vagy legalább 4 órán keresztül inkubáltam (37 °C, 180 rpm), majd ülepttettem (4°C, 6000 rpm, 15 perc) és 0.45 μ m-es (Sarsted) szűrővel sejtmentesítettem.

4.5. Fág genom izolálása

A fágok dúsítása Carroll és mtsai. munkája alapján történt (Carroll és mtsai., 2021). A felszaporított és 0,45 μ m szűrőn (Sarsted) szűrt 20 ml fág oldatot 10% (w/v)-os PEG-8000-el kezeltem és egy éjszakát 4 °C hőmérsékleten tároltam. A fágoldatot ülepttettem (4°C, 6000 rpm, 30 perc) és a felülúszót eltávolítottam. A pelletet 5 ml SM pufferben (100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mM Tris-Cl, pH = 7.5) feloldottam. A genom izolálása pedig 1 ml felszuszpendált fágoldatból a NORGEN BIOTEK CORP. Phage DNA Isolation Kit-jével történt a gyártó utasításai alapján. A genomok szekvenálását a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Mutagenézis és Karcinogenezis Csoportja végezte.

4.6. Baktérium genom izoláció

A genom izolációt a Sigma Alrdich, Gene-EluteTM Bacterial Genomic DNA Kit-el (NA2110) végeztem a gyártó utasításai alapján. A genomok szekvenálását a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Mutagenézis és Karcinogenezis Csoportja végezte.

4.7. A fágok és baktériumok tárolása

A fágokat tartalmazó mintákat 4 °C-on tároltam. A baktérium mintákat 1:1 arányban 50%-os glicerinnel oldatban -80 °C hőmérsékleten tartottam fent. A baktérium kultúrákat 3 ml LB-ben (37 °C 180 rpm) egy éjszakát növesztettem használat előtt.

4.8. Transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) készült képek

Fágok előkészítése TEM-re Valappil és mtsai. alapján történt (Valappil és mtsai., 2021). A felszaporított és 0,45 μ m (Sarsted) szűrt 20 ml fág oldatot 10% (w/v)-os PEG-8000-el

kezelttem és egy éjszakát 4 °C hőmérsékleten tároltam. A fágoldatot ülepitettem (4°C, 6000 rpm, 30 perc) és a felülúszót eltávolítottam. A pelletet fág-szuszpenziós oldatban (10 mM Tris–HCl, pH = 7.6, NaCl 0.4%, zselatin 0.1%, 1 ml fág-szuszpenziós oldat / 100 ml eredeti minta térfogata) feloldottam. 1:1 arányban kloroformmal (0,2%) kezelttem és ülepitettem (4°C, 6000 rpm, 15 perc). A felső vizes fázist pipettával eltávolítottam. Ez tartalmazta a fágokat. A mintákat a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban, Siklós László laboratóriumában, Polgár Tamás segítségével vizsgáltuk.

4.9. A fágok hatékonyságának mérése és fág-rezisztens törzsek izolálása

A rezisztens törzsek előállítására és hatékonyságuk mérésére a 38 darab törzset használtam. Az OD₆₀₀=0,6-ra felnövesztett baktériumból és fágból MOI 1-en végeztem el a kísérleteket mikrotiter lemezben. A sejtből 100 µl-t, fágonként 10⁸ PFU / ml fágot tartalmazó mintából 10 µl-t adtam, amit 60/80/90 µl LB tápoldattal egészítettem ki attól függően, hány fágot használtam egy kísérletben. A lemezeket fóliával lezárva inkubáltam (37 °C, 180 rpm, 24 óra). A 24 óra letelte után a fág-1, fág-2 és mind a négy fágot tartalmazó kísérletekből kacsas széleszttem a mintákat LB táptalajra és egy éjszakán át inkubáltam a sejteket 37 °C-on. Az egyedi telepek szélesztését legalább három alkalommal végeztem el, hogy elkerüljem a baktérium kultúrák fág kontaminációját. A felnőtt telepeket fág-rezisztenciára vizsgáltam. TOP agart készítettem a fág-rezisztens sejtekből és 10 µl-es cseppeket széleszttem rajtuk a négy fágból készült hígítási sorokból, majd egy éjszakán át inkubáltam a lemezeket 37 °C-on. Az adott hígításban számolható mennyiségű plakkból pedig PFU / ml értéket számoltam.

4.10. Fág-1 és Fág-4 *in vivo* alkalmazása

A Kintses laboratórium nem rendelkezik a megfelelő ismeretekkel és engedélyekkel állatkísérletek elvégzéséhez, ezért az egérkísérleteket Dr. Schneider György, a PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet egyetemi adjunktusa végezte. A kísérletek során a fág-1 és fág-4 hatását kívántuk kimutatni. A kísérlet során 60 egeret használtak fel. Az AB2 törzset 50 ml LB tápoldatban növesztették 14 órán keresztül. A sejt kultúrát centrifugálással ülepitették. A pelletet 5ml PBS (10 mM PO₄³, 137 mM NaCl és 2,7 mM KCl) oldattal szuszpendálták fel. Az állatokat 10⁹-, illetve 10¹⁰ CFU/ml sejtszámú baktériummal fertőzték. A fertőzést követően 10 perccel vagy 2 órával később a fág1-et önállóan vagy kombinációban a fág4-gyel adminisztrálták MOI1-es koncentrációban. Az egereket 9 nap után feláldozták. A tüdőből, májból, veséből és lépéből izoláltak vissza baktériumokat, illetve a fágok jelenlétét is vizsgálták. A baktériumokat 2 féle koncentrációban (10⁹ és 10¹⁰ CFU / ml) alkalmazták. A 60 egerből 5-5

egér csak baktériummal lett fertőzve kontrollként, 5-5 egér a fertőzés után 10 perccel kapott fág1 kezelést, 5-5 egér a fertőzés után 2 órával kapott fág1 kezelést, 5-5 egér a fertőzés után 10 perccel kapott kombinált fág1 és fág4 kezelést (1:1 arány), 5-5 egér a fertőzés után 2 órával kapott kombinált fág1 és fág4 kezelést, 5-5 egér pedig csak fág1, illetve kombinált fág1 és fág4 kezelést kapott fág toxicitás kontrollként.

5. Eredmények

5.1. Izolált fágok és jellemzőik

A négy fág izolálására használt *A. baumannii* törzs mindegyikén sikerült fertőzőképes fágot azonosítanom. A fág genom DNS izolálását követően szekvenálással meghatározták a fágok genom szekvenciáját. A szekvenciákat a PhageAI és a Phageleads adatbázisokat használva vizsgáltam és azonosítottam, mely nemzetségbe, rendbe és családba tartoznak. Mindegyik fág a *Caudovirales* rendbe tartozott. A terápiás célra használt fágok jelentős része ebbe a rendbe tartozik (Łobocka és mtsai, 2021). A 4 fág közül kettő a *Myoviridae*, egy *Straboviridae* és egy a *Siphoviridae* családba sorolható be. A genomjaik mérete 45-169 kilobázis (kb) közt mozgott (3. Táblázat).

3. táblázat. A négy izolált fág tulajdonságai

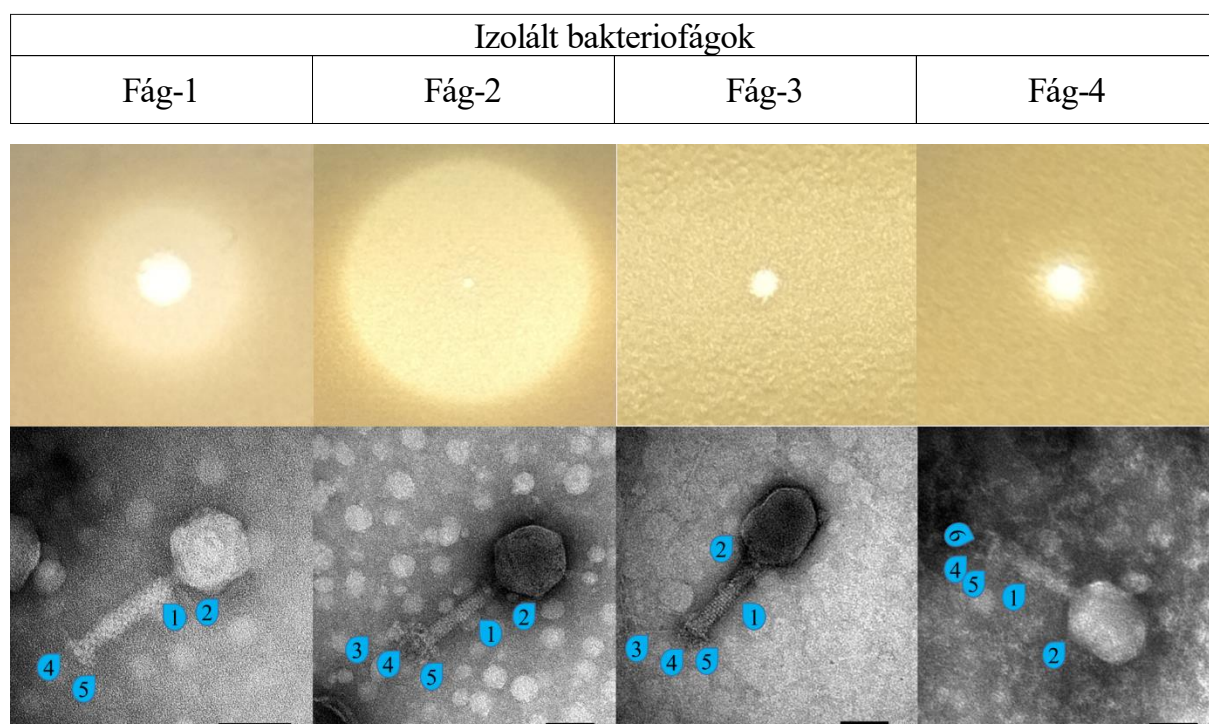
Név	Gazda	Fertőzőtt tok	MLST	Genom (kb)	Család	Rend	Nemzetség	GC tartalom	Típus	Pfu / ml	LOG10
fág-1	AB_IS1	KL2/KL3	ST2	45	<i>Myoviridae</i>	<i>Caudovirales</i>	<i>Obolenskivir</i>	37.95%	Temperált (61.54%)		11
fág-2	AB_IS2	KL3	ST2	46	<i>Siphoviridae</i>	<i>Caudovirales</i>	<i>Jerseyvirus</i>	52.66%	Virulens (70.71%)		
fág-3	AB_IS3	KL40	ST636	169	<i>Straboviridae</i>	<i>Caudovirales</i>	<i>Tegunavirus</i>	36.38%	Virulens (64.45%)		
fág-4	AB_IS4	KL12	ST2	167	<i>Myoviridae</i>	<i>Caudovirales</i>	<i>Tegunavirus</i>	36.32%	Virulens (64.41%)		8

A 3. táblázat a 4 izolált bakteriofág fertőzési hatékonyságát tartalmazza a törzseken, melyeken azonosítottam őket. A PFU / ml értékük log₁₀ transzformált adataként, hőtérképes formában feltüntetve. Minél sötétebb a kék árnyalat, annál magasabb a fág fertőzési hatékonysága. A fágok fertőzési hatékonysága 10⁹ és 10¹⁰ PFU/ml között változott. A fág-1 a KL2 és KL3, a fág-2 a KL3, a fág-3 a KL40 a fág-4 a KL12 tokkal rendelkező törzseket fertőzte. A fágok hatékonysága minden esetben legalább 10⁹ PFU / ml vagy a fölött volt a gazda baktériumukban. A magas fertőzési hatékonyság fontos tényező egy fág, fágterápiában való alkalmazhatóságához. A fág-1, fág-2 és fág-3 hatékonysága PFU / ml-ben átlagosan 10¹⁰ a fág-4-nek 10⁹. A Phageleads adatbázis használata során egyik fágban sem találtam antimikrobiális rezisztencia vagy virulenciát okozó géneket. A PhageAI adatbázis alapján, a fág-1-es kivételével mindegyik fág lítikusként van prediktálva A fág-1 predikciójához a program nem rendelkezik elég hasonló mintával, így a predikció kritikával kell kezelni. A PhageLeads segítségével a fág-4-ben találtam egy integráz gént, ami a temperált fágokra jellemző (Balding és mtsai., 2005). Az NCBI adatbázis alapján a fág-4, közeli rokona a Maestro nevű (ID: 658578)

lítikus fágok, melyet már terápiában is használtak (Mei Liu és mtsai 2022). A gén jelenléte önmagában nem bizonyítja a fág lizogén életciklusát.

5.2. Azonosított bakteriofágok plakk morfológiája és transzmissziós elektronmikroszkópos képei

A fágokról transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) Polgár Tamás készített képeket a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban, Siklós László laboratóriumában. A fágok plakkjáról a képek 37 °C-on 24 óra inkubációt követően készítettem (4. ábra, felső panel). A fág-1 és fág-2 esetében látható egy homályos öv. Ennek a jelenléte a depolimeráz enzim működésére utal és ezáltal a fágok biofilm bontó képességére (Islam és mtsai., 2019). A TEM képek 20.000x-es nagyításban láthatók (4. ábra, alsó panel). A képeken azonosítható a *Caudovirales*-re jellemző farki cső és hüvely fehérje¹, kapszid², hosszú farki fehérje³, rövid farki fehérje⁴, alaplemez⁵ és tüske⁶.



4. ábra. A 4 izolált bakteriofág plakk morfológiája és transzmissziós elektronmikroszkópos képei.

5.3. Fágok fertőzési hatékonysága a kísérletekben alkalmazott 38 *A. baumannii* törzsön

4. táblázat. A négy izolált fág fertőzési hatékonysága a 38 *A. baumannii* törzsön.

Törzsek					Bakteriofágok			
Név	MLST	Tok	Település	Idő	fág-1	fág-2	fág-3	fág-4
AB1	ST2	KL3	Szeged	2021			-	-
AB2			Szeged	2021			-	-
AB3			Szeged	2021			-	-
AB4			Szeged	2020			-	-
AB5			Szeged	2020			-	-
AB6			Szeged	2021			-	-
AB7			Szeged	2021			-	-
AB8			Szeged	2021			-	-
AB9			Budapest	2021			-	-
AB10			Budapest	2021			-	-
AB11			Szeged	2021			-	-
AB12			Szeged	2021			-	-
AB13			Szeged	2021			-	-
AB14			Győr	2021			-	-
AB15			Budapest	2021			-	-
AB16			Nyíregyháza	2021			-	-
AB17			Salgótarján	2021			-	-
AB18			Budapest	2020			-	-
AB19			Budapest	2020			-	-
AB20			Belgrád	2018			-	-
AB21			Marosvásárhely	2022			-	-
AB22			Marosvásárhely	2022			-	-
AB23			Prijedor	2022			-	-
AB24			Banja Luka	2017			-	-
AB25			Banja Luka	2017			-	-
AB26			Podgorica	2017			-	-
AB27			Podgorica	2019			-	-
AB28			Podgorica	2019			-	-
AB29			Podgorica	2019			-	-
AB30			Belgrád	2022			-	-
AB31			Belgrád	2022			-	-
AB32			Pozsarevác	2022			-	-
AB33			Pozsarevác	2022			-	-
AB34			Bukarest	2021			-	-
AB35			Bukarest	2022			-	-
AB36			Kolozsvár	2022			-	-
AB37			Kolozsvár	2022			-	-
AB38			Belgrád	2019			-	-

LOG10
11
7

A 4. táblázatban a 4 izolált bakteriofág fertőzési hatékonyságát tartalmazza 38 *A. baumannii* törzsön a PFU / ml értékük $\log_{10}$ transzformált adataként, hőtérképes formában feltüntetve. Minél sötétebb a kék árnyalat, annál magasabb a fág fertőzési hatékonysága. A fág 1 és fág 2

fertőzési hatékonysága 10^7 és 10^{11} PFU/ml között változott. A fág-3 és fág-4 ezeket a törzseket nem fertőzte, a belőlük evolváló fág-rezisztens törzseket mutattak aktivitást (5. táblázat és 6. táblázat). A fág-2 más tok típuson is mutat aktivitást, melyet dolgozatomban nem részletezek. Ez magyarázatként szolgálhat az kisebb hatékonyságra. Sok esetben a tágabb gazdaspecifitás a hatékonyság csökkenését eredményezheti (Jensen és mtsai., 1998).

5.4. fág-1 és fág-2-vel végzett *in vitro* evolúciós kísérlet során izolált baktériumok

5. táblázat. A fág-1 és fág-2 ellen evolváló fág-rezisztens törzseken mért fághatékonyságok

Név	fág-1	fág-2	fág-3	fág-4
InVr1	-	-		
InVr2		-		
InVr3	-	-		
InVr4	-	-		
InVr5	-	-		
InVr6	-	-		
InVr7	-	-		
InVr8		-		
InVr9	-	-		
InVr10	-	-		
InVr11	-		-	-
InVr12	-		-	-
InVr13	-		-	-
InVr14	-		-	-
InVr15	-		-	-
InVr16	-		-	-
InVr17	-		-	-
InVr18	-		-	-
InVr19	-		-	-
InVr20	-		-	-
InVr21	-		-	-
InVr22	-		-	-
InVr23	-		-	-

LOG10

11

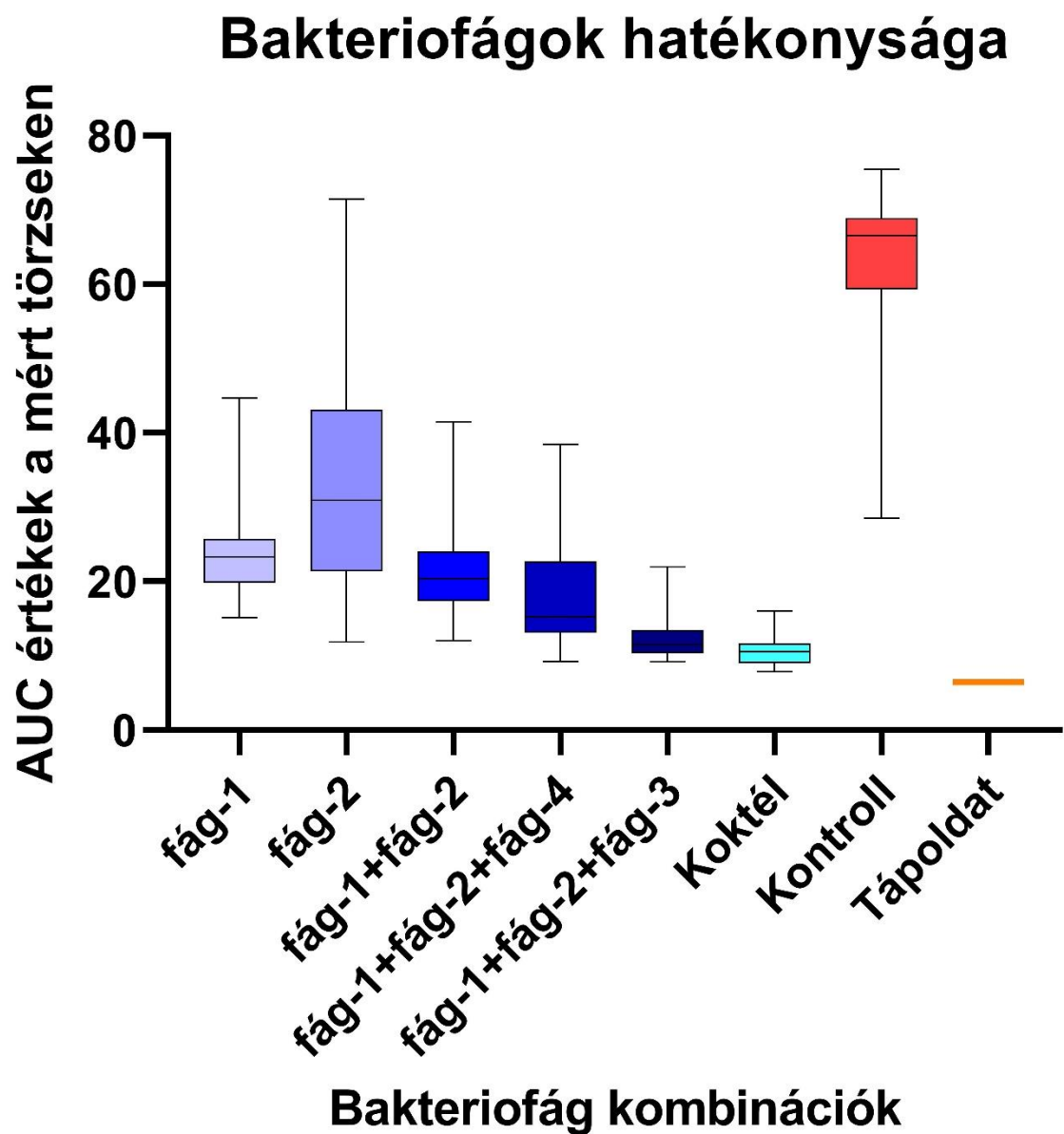
7

Az 5. táblázatban A 38 *A. baumannii* törzsből *in vitro* kísérletek során a fág-1-et és fág-2-t külön-külön használva fág rezisztens törzseket állítottam elő (a kísérlet körülményeit a 4.9 pontban részletezem). Az izolált fág rezisztens törzseken ellenőriztem mind a négy fágnek a hatékonyságát, ezáltal meghatározva, hogy változott-e a fágok fertőzési profilja az eredeti vad típusú törzshöz képest. Ezen fertőzési mintázatok alapján állítottam össze. A fágok hatékonysága a PFU / ml értékük $\log_{10}$ transzformált adataként, hőtérképes formában van

feltüntetve. Minél sötétebb a kék árnyalat, annál magasabb a fág fertőzési hatékonysága. A fágok fertőzési hatékonysága 10^6 és 10^{11} PFU/ml között változott. Az InVr1-10 törzsek a fág-2-vel végzett kísérletekből, míg az InVr11-23 törzsek a fág-1-gyel végzett kísérletekből származnak. A fág-1 ellen megjelenő rezisztencia nem okozott szenzitivitást a fág-3 és fág-4-el szemben, de továbbra is érzékenységet mutattak a fág-2-re. A fág-2-vel végzett kísérletekből azonosított rezisztens törzsek 80%-ban megjelent kereszt-rezisztencia a fág-1 ellen, de fontos kiemelni, hogy ezen törzsek mindegyike szenzitív lett a fág-3 és fág-4-gyel szemben.

5.5. Fágok hatékonysága egyedileg és kombinálva a 38 baktérium törzsön

Az 5-ös ábrán az 1. táblázatban felsorolt törzsek mindegyikén mért fág kombinációkat és fág nélküli baktérium növekedéseket (Kontroll) ábrázoltam. Az értékeket a minimum három alkalommal mért növekedési görbék alatti területből számoltam, melyet a görbe alatti területként (AUC) tüntettem fel. A fág-1-el és fág-2-vel végzett kísérletek során a rezisztencia az esetek többségében megjelent (5. táblázat). A fág-1 és fág-2 elleni rezisztencia kialakulásában látható különbség a fág-2 tágabb specifikásával magyarázható. A fág-2 képes a KL3 tok típus mellett a KL2 tok típussal rendelkező szerotípust is fertőzni. A fág-1 és fág-2 kombinációja nem volt elég a rezisztencia kialakulásának gátlásában sem. Az 5. táblázatban szintén láthatók olyan fág rezisztens baktérium törzsek, melyek mind a két fág ellen képesek voltak rezisztenciát fejleszteni. Ezen törzsek viszont, különböző mértékben érzékennyé váltak a fág-3 és fág-4-el szemben. A fágok hármas kombinációi már majdnem minden esetben képesek voltak visszafogni a törzsek növekedését, azonban mivel nem minden fág rezisztens törzs mutatott ugyanakkora érzékenységet a fág-3-mal vagy fág-4-el szemben csak a négy fág közös működése volt képes a növekedést, mind a 38 törzs esetében, 24 óra elteltével is gátolni. A fágoktól esetében a kiugró értékeket a baktériumok által képzett sejttörmelék okozta optikai törés eredményezte. A fágoktólal végzett kísérletek esetében mindössze 9 törzsnél sikerült azonosítanom 24 óra után életben maradt baktérium sejteket (6. táblázat). Ezen törzsek egyike sem vált teljesen rezisztensé mind a 4 fággal szemben.



5. ábra A fág kombinációk hatékonysága a kiválasztott baktérium törzseken. Minden törzsön mért hatékonyság egy AUC értéként van ábrázolva (saját ábra).

5.6. Fágkoktállal végzett *in vitro* kísérletekből azonosított fág-rezisztens törzsek

6. táblázat. Fágkoktél jelenlétében megjelent fág-rezisztens törzseken mért fág hatékonyság

Név	fág-1	fág-2	fág-3	fág-4
InVrc1	-	-		-
InVrc2	-	-		
InVrc3	-	-		-
InVrc4	-		-	-
InVrc5	-	-		-
InVrc6	-	-		-
InVrc7	-	-		-
InVrc8		-	-	
InVrc9		-		

LOG10

11

7

Az 6. táblázatban a fágok hatékonysága a PFU / ml értékük $\log_{10}$ transzformált adataként, hőtésképes formában van feltüntetve. Minél sötétebb a kék árnyalat, annál magasabb a fág fertőzőési hatékonysága. A fágok fertőzőési hatékonysága 10^6 és 10^{11} PFU/ml között változott. Az izolátumok egyike sem volt képes mind a négy fág ellen rezisztenciát evolválni. Minden esetben legalább egy fág képes volt ezeknek a törzseknek a fertőzésére. Ez az eredmény mutathatja, hogy mindössze négy fág jelenléte elegendő a rezisztencia kialakulásának gátlására. A többsége a sejteknek védekezni tudott a fág-1, fág-2 és fág-4 ellen, de kettő kivételével mind szenzitív volt a fág-3-mal szemben.

5.7. *In vivo* kísérletekből azonosított fág-rezisztens baktérium törzsek

7. táblázat. Az egerekből izolált törzsek négy fág általi fertőzési mintázata.

Név	Szerv	fág-1	fág-2	fág-3	fág-4
InVir1	tüdő			-	-
InVir2	tüdő			-	-
InVir3	tüdő			-	-
InVir4	tüdő			-	-
InVir5	tüdő			-	-
InVir6	tüdő			-	-
InVir7	tüdő			-	-
InVir8	tüdő			-	-
InVir9	lég			-	-
InVir10	lég	-		-	-
InVir11	lég			-	-
InVir12	lég			-	-
InVir13	lég			-	-
InVir14	lég			-	-
InVir15	máj			-	-
InVir16	máj			-	-
InVir17	máj			-	-
InVir18	máj			-	-
InVir19	máj			-	-
InVir20	máj			-	-
AB2				-	-

LOG10

11

7

A 7. táblázatban Az állatkísérletek során a 9. napon életben maradt egerekből izolált baktériumokat vizsgáltam. A táblázatban a fágok hatékonysága látható a AB2-es törzzsel együtt, melyet az *in vivo* kísérletekben használtak az állatok fertőzésére. A fágok hatékonysága a PFU / ml értékük $\log_{10}$ transzformált adataként, hőtésképes formában van feltüntetve. Minél sötétebb a kék árnyalat, annál magasabb a fág fertőzési hatékonysága. A fágok fertőzési hatékonysága 10^8 és 10^{11} PFU/ml között változott. Az egerek fertőzésére AB2-es törzset használták. A fágok hatékonysága a PFU / ml értékük $\log_{10}$ transzformált adataként van

feltüntetve. A feltüntetett törzsek közül mindössze egy vált rezisztensé a fág-1-gyel szemben és mutatta ugyanazt a fertőzési mintázatot, mint amit az *in vitro* kísérletben izolált törzseknél láttunk. A többi fertőzési mintázata az AB2-es törzshöz hasonló volt. Az eredmények alapján több oka is lehet ennek. Az egyik az, hogy az alkalmazott protokollban a fágokat mindössze egy alkalommal juttatták be az egerekbe és 9 nap elteltével az életben maradt egerekből lettek izolálva a baktérium sejtek. A rezisztencia mechanizmusok sokszor fitness költséggel járnak a baktérium számára és így a 9 nap lefolyása során kompetíció vagy az immunrendszer miatt ezek a sejtek nem éltek túl. A fágok viszonylag hamar kiürülnek a szervezetből és a jelenlétük nem volt tapasztalható az életben maradt egerekben a kilencedik napon. A magas sejtszám és az egyszeri fág adminisztráció miatt lehet, hogy sok baktérium nem esett át fágfertőzésen és nem evolválta rezisztenciát. Magyarázatként szolgálhat még, hogy a fitness költsége ezeknek a rezisztencia mechanizmusoknak *in vivo*, túl magas, ez *A. baumannii* esetében már bizonyított jelenség (Schooley 2017).

5.8. Szekvenált baktérium törzsek és fág rezisztenciát okozható mutációk

7. táblázat. Fág rezisztencia gének előfordulása a vizsgált baktérium törzsekben

Név	fág-1	fág-2	fág-3	fág-4	LOG10
InVr20	-		-	-	11
InVr12	-		-	-	
InVr17	-		-	-	8

Az InVr20-,12,17-es törzsek szekvenálásából azonosítottunk egy glikoziltranszferáz fehérjét, mely mind a három törzs esetében deléciót tartalmazott a vad típusú törzshöz képest (NCBI azonosító: WP_001033808.1 MULTISPECIES: glycosyltransferase family 2 protein [*Acinetobacter*]). Az irodalomban más kutatócsoport *A. baumannii*-ban kísérletesen bizonyította, hogy mutáció glikoziltranszferáz génben eredményezhet fág-rezisztenciát, mert ez az enzim szerepet játszik a K antigén szerkezetének felépítésében, mely receptor felületként szolgálhat a fágok számára (Schooley 2017).

5.9. Fág-1 és fág-4 *in vivo* hatékonysága

8. táblázat. A különböző körülmények közt alkalmazott fágok hatása az állatok halálozási arányára.

Baktérium szám	10 ⁹ CFU				10 ¹⁰ CFU			
Fágok	Fág-1		Fág-1 + Fág-4		Fág-1		Fág-1 + Fág-4	
Fágok adminisztrációjának ideje a fertőzést követően	10 perc	2 óra	10 perc	2 óra	10 perc	2 óra	10 perc	2 óra
Túlélő egerek száma	5/5	3/5	5/5	2/5	4/5	0/5	5/5	2/5

Kontroll kísérletek	Egér + fág-1	Egér + fág-1 + fág-4	Egér + 10 ⁹ cfu	Egér + 10 ¹⁰ cfu
	5/5	5/5	0/5	1/5

A 8. táblázatban ábrázolt kísérleteket az következő módon végezték el. A fág-1 és fág-4 hatékonyságát 60 egéren mérték le. A használt baktérium törzset magas 10⁹⁻¹⁰ CFU / ml számban kellett alkalmazni, hogy letális legyen az egerek számára. A fágok nélküli kontroll kísérletben az egerek 90%-a elpusztult. A fágok baktérium nélküli bejuttatása az egerekbe nem okozott semmi negatív reakciót. A fágok alkalmazása az egerek halálozási arányát 90%-ról, fágok adminisztrációjának időpontjaitól függően, 5%-ra vagy 65%-ra csökkentette le. Az egerek nagyrésze elpusztult az első két nap folyamán a magas baktérium szám miatt. A fágok hatékonyságában megfigyelhető eltérést is ez okozza. Amennyiben a fágok a fertőzést követően 10 percen belül lettek adminisztrálva, jelentős mértékben csökkentették az elpusztult egerek számát.

6. Összefoglalás

- A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban a Kintses laboratóriumban végzett kutatás során több száz *A. baumannii* izolátum genomjának és adatbázisokban fellelhető genom szekvenciáknak vizsgálatával filogenetikai fa készítettünk és meghatároztuk a legelterjedtebb szerotípust, ami az ST2-KL3-as kategóriába sorolható. A dolgozatomban 38 ST2 szekvencia típusú KL3 tokkal rendelkező diverz törzseket választottam ki.
- A törzsgyűjteményünkben különböző tokkal rendelkező szerotípusokat használva sikeresen izoláltunk 18 bakteriofágot, melyekből dolgozatomban 4-et karakterizáltam. A fág-1 az ST2-KL3, a fág-2 az ST2-KL3, illetve ST2-KL2, a fág-3 az ST636-KL40, a fág-4 ST2-KL12 típusú törzseken mutatott magas fokú aktivitást.
- A fág1-et és fág-2-öt használva fág rezisztens törzseket állítottam elő, melyekből 23-at mutattam be dolgozatomban. A fág rezisztencia és a négy fág hatékonyságának mérésével a fág-3 és fág-4 jelenlétét is igazoltam a fágoktólban.
- A fágok önálló és kombinált hatékonyságát lemértem a kiválasztott törzseken igazoltam a fágoktól hatékonyságát és a rezisztencia kialakulásának gátlását. A fágoktólal végzett kísérletek során azonosítottam fág rezisztens törzseket, melyek egyike sem mutatott rezisztenciát a fágoktólban szereplő fágok mindegyike ellen.
- Azonosítottam a tok szerkezetének felépítésében szerepet játszó génekben több alkalommal is deléciót, mely a fág rezisztenciát okozhatja.
- *In vivo* kísérletekből származó baktérium izolátumok között azonosítottam olyan klónt, ami ugyan azt a fertőzési mintázatot mutatja, mint az *in vitro* kísérletekben.

7. Diszkusszió

Az elmúlt 2 év során A Kintses labor által begyűjtött több száz, klinikailag releváns MDR *A. baumannii* törzsek kitűnő alapot biztosítanak ezen mikrobák működésének megértésében. A törzsgyűjtemény mérete és diverzitása lehetőséget ad számunkra, hogy a különböző szerotípusok terjedését feltérképezzük és antibiotikum szenzitivitásukat vizsgáljuk. A jelenleg 18 bakteriofágból álló gyűjteményünk alkalmas lehet ezen mikrobák okozta fertőzés kezelésére. Minden izolált bakteriofágunknak a genomját szekvenáltuk és eddigi kísérleteink alapján több közülük sok szempontból megfelel fágterápiában való használatra. Két bakteriofág, melyeket dolgozatomban is karakterizáltam, állatmodellben hatékony volt és nem okozott semmilyen negatív immunreakciót. Kutatásomban bemutatott eredményeim bizonyítékkal szolgálnak arra, hogy a legelterjedtebb szerotípusa az *A. baumannii*-nak kezelhető fágokat használva és nem képes rezisztenciát evolváltni a megfelelően összeválogatott fág kombinációval szemben.

Kutatásunk legnagyobb limitációját a fágok felszaporítására használt törzsek képzik. Ezek mind kórházi izolátumok, nem jól definiált és vizsgált labor törzsek. Több antibiotikum rezisztencia, virulencia géneket és profágokat hordoznak. Ezeket a törzseket használva a fágjaink felszaporítására, szükséges a körültekintő és alapos vizsgálata a mintáknak. A profágok jelenléte a kísérleteket nehezíti, a különböző nemkívánatos gének jelenléte a transzdukció folyamatával átjuthat más baktériumba, ezzel növelve annak virulenciáját vagy antibiotikumokkal szembeni rezisztenciáját. A bakteriofágjaink terápiás célú használata előtt a mintákból el kell távolítani az immunogén anyagokat (bakteriális poliszacharidok, fehérjék, nukleinsav maradványok), ami egy anyagilag megterhelő és időigényes feladat. Magyarországon a fágterápia használata még gyerekcipőben jár. A törvényi és jogi szabályozások képzik a legnagyobb akadályt a bakteriofágok használata ellen.

8. Jövőbeli tervek

A közeljövőben a fág-1-et és fág-2-öt kombinálva, valamint a fágkoktált szeretném alkalmazni *in vivo*, *Galleria mellonella* állatmodellben, illetve a fágok ellen kialakuló rezisztencia útvonalakat szeretném vizsgálni, hogy bizonyítsam az *in vitro* kialakuló fág rezisztencia kutatásának jelentőségét. Az azonosított fágjaimmal szándékomban áll azon kísérletek elvégzése, amikkel megbizonyosodhatok a terápiás használatuk biztonságáról.

A jövőben több terjedő *A. baumannii* szerotípus bakterifágok ellen evolált rezisztenciáját vizsgálva szeretnék több olyan fágkoktált is kifejleszteni, ami hasonló eredménnyel szolgál, mint a dolgozatomban bemutatott.

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Mehi Orsolyának, Koncz Mihálynak és Apjok Gábornak, hogy szakértelmükkel segítették a munkámat. Témavezetőmnek, Dr. Kintses Bálintnak a köszönöm kutatásomban adott iránymutatását és a lehetőséget, hogy a laborjában dolgozhattam. Szeretném megköszönni Dr. Schneider Györgynek az állatkísérletek elvégzését, és Polgár Tamásnak a transzmissziós elektronmikroszkópos képek készítését. Köszönöm Prof. Dr. Gácser Attilának, hogy elvállalta a belső konzulens szerepét.

10. Irodalomjegyzék

Abedon ST, Thomas-Abedon C. Phage therapy pharmacology. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010;11(1):28-47. doi:10.2174/138920110790725410

Acinetobacter in Healthcare Settings. 2019. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP). www.cdc.gov/hai/organisms/acinetobacter.html

Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010;1:134. Published 2010 Dec 8. doi:10.3389/fmicb.2010.00134

Arnold BJ, Huang IT, Hanage WP. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(4):206-218. doi:10.1038/s41579-021-00650-4

Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(3):119. Published 2020 Mar 12. doi:10.3390/antibiotics9030119

Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol*. 1997;5(7):268-271. doi:10.1016/S0966-842X(97)01054-8

Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [published correction appears in *J Clin Microbiol*. 2007. Jun;45(6):2101]. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4382-4390. doi:10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005

Balding C, Bromley SA, Pickup RW, Saunders JR. Diversity of phage integrases in Enterobacteriaceae: development of markers for environmental analysis of temperate phages. *Environ Microbiol*. 2005;7(10):1558-1567. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00845.x

Benjamin Plackett, 2020. "Why big pharma has abandoned antibiotics," *Nature*, *Nature*, vol. 586(7830), pages 50-52, October.

Bentancor LV, Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB, Maira-Litrán T. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2012;194(15):3950-3960. doi:10.1128/JB.06769-11

Boll JM, Tucker AT, Klein DR, et al. Reinforcing Lipid A Acylation on the Cell Surface of *Acinetobacter baumannii* Promotes Cationic Antimicrobial Peptide Resistance and Desiccation Survival. *mBio*. 2015;6(3):e00478-15. Published 2015 May 19. doi:10.1128/mBio.00478-15

Cahill SM, Hall RM, Kenyon JJ. An update to the database for *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharide locus typing extends the extensive and diverse repertoire of genes found at and outside the K locus. *Microb Genom*. 2022;8(10):mgen000878. doi:10.1099/mgen.0.000878

Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Brüssow H. Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6(4):417-424. doi:10.1016/s1369-5274(03)00086-9

Capparelli R, Nocerino N, Iannaccone M, et al. Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy. *J Infect Dis*. 2010;201(1):52-61. doi:10.1086/648478

Carroll-Portillo A, Coffman CN, Varga MG, Alcock J, Singh SB, Lin HC. Standard Bacteriophage Purification Procedures Cause Loss in Numbers and Activity. *Viruses*. 2021;13(2):328. Published 2021 Feb 20. doi:10.3390/v13020328

Conly J, Johnston B. Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(3):159-160. doi:10.1155/2005/892058

Chan, B., Siström, M., Wertz, J. et al. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 6, 26717; 2016. doi.org/10.1038/srep26717

Chen LK, Kuo SC, Chang KC, et al. Clinical Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* Strains with Higher Susceptibility to Environmental Phages than Antibiotic-sensitive Strains. *Sci Rep*. 2017;7(1):6319. Published 2017 Jul 24. doi:10.1038/s41598-017-06688-w

Clokier MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*. 2011;1(1):31-45. doi:10.4161/bact.1.1.14942

Da Silva GJ, Domingues S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*. 2016; 4(3):29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030029>

De Vos D, Verbeken G, Quintens J, Pirnay JP 2019. Phage Therapy in Europe: Regulatory and Intellectual Property Protection Issues. In: Górski, A., Międzybrodzki, R., Borysowski, J. (eds) *Phage Therapy: A Practical Approach*

D'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol.* 2007 Sep;158(7):553-4. doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.005. Epub 2007 Jul 28. PMID: 17855060.

Dublanchet A, Fruciano E. Brève histoire de la phagothérapie [A short history of phage therapy]. *Med Mal Infect.* 2008;38(8):415-420. doi:10.1016/j.medmal.2008.06.016

Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Elbourne LD, Paulsen IT, Brown MH. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun.* 2013;81(7):2574-2583. doi:10.1128/IAI.00065-13

F. Bayat, T. F. Didar, Z. Hosseinidoust. Emerging investigator series: bacteriophages as nano engineering tools for quality monitoring and pathogen detection in water and wastewater. *Environmental Science: Nano.* 2021. doi.org/10.1039/D0EN00962H

Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(2):129-136. Published 2014 Feb 13. doi:10.3855/jidc.3573

Goodridge LD. Designing phage therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11(1):15-27. doi:10.2174/138920110790725348

Gordillo Altamirano F, Forsyth JH, Patwa R, et al. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. *Nat Microbiol.* 2021;6(2):157-161. doi:10.1038/s41564-020-00830-7

Harcombe WR, Bull JJ. Impact of phages on two-species bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(9):5254-5259. doi:10.1128/AEM.71.9.5254-5259.2005

Heta S, Robo I. The Side Effects of the Most Commonly Used Group of Antibiotics in Periodontal Treatments. *Med Sci (Basel).* 2018;6(1):6. Published 2018 Jan 18. doi:10.3390/medsci6010006

Hobday RA. The open-air factor and infection control. *J Hosp Infect.* 2019;103(1):e23-e24. doi:10.1016/j.jhin.2019.04.003

Hofer U. How antibiotics predispose to candidiasis. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(7):382. doi:10.1038/s41579-022-00749-2

Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology (Reading).* 1998;144 (Pt 11):3039-3047. doi:10.1099/00221287-144-11-3039

Hurley, J. Antibiotic-Induced Release of Endotoxin. *Drug-Safety* 12, 183–195 (1995). doi.org/10.2165/00002018-199512030-00004

Islam MS, Raz A, Liu Y, et al. Complete Genome Sequence of *Aeromonas* Phage ZPAH7 with Halo Zones, Isolated in China. *Microbiol Resour Announc.* 2019;8(10):e01678-18. Published 2019 Mar 7. doi:10.1128/MRA.01678-18

Iwashkiw JA, Seper A, Weber BS, et al. Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002758. doi:10.1371/journal.ppat.1002758

Jensen EC, Schrader HS, Rieland B, et al. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(2):575-580. doi:10.1128/AEM.64.2.575-580.1998

John B. Bruce, Sébastien Lion, Angus Buckling, Edze R. Westra, Sylvain Gandon, Regulation of prophage induction and lysogenization by phage communication systems, *Current Biology*, Volume 31, Issue 22, 2021, Pages 5046-5051.e7, ISSN 0960-9822, doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.073.

Kenyon JJ, Hall RM. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. *PLoS One.* 2013;8(4):e62160. Published 2013 Apr 16. doi:10.1371/journal.pone.0062160

Khalifa L, Gelman D, Shlezinger M, et al. Defeating Antibiotic- and Phage-Resistant *Enterococcus faecalis* Using a Phage Cocktail *in Vitro* and in a Clot Model. *Front Microbiol.* 2018;9:326. Published 2018 Feb 28. doi:10.3389/fmicb.2018.00326

Koderi Valappil S, Shetty P, Deim Z, et al. Survival Comes at a Cost: A Coevolution of Phage and Its Host Leads to Phage Resistance and Antibiotic Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Resistant Strains. *Front Microbiol.* 2021;12:783722. Published 2021 Dec 2. doi:10.3389/fmicb.2021.783722

- Kortright KE, Doss-Gollin S, Chan BK, Turner PE. Evolution of Bacterial Cross-Resistance to Lytic Phages and Albicidin Antibiotic. *Front Microbiol.* 2021;12:658374. Published 2021 Jun 17. doi:10.3389/fmicb.2021.658374
- Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens.* 2021;10(3):373. Published 2021 Mar 19. doi:10.3390/pathogens10030373
- Liu M, Hernandez-Morales A, Clark J, et al. Comparative genomics of *Acinetobacter baumannii* and therapeutic bacteriophages from a patient undergoing phage therapy. *Nat Commun.* 2022;13(1):3776. Published 2022 Jun 30. doi:10.1038/s41467-022-31455-5
- Li X, He Y, Wang Z, et al. A combination therapy of Phages and Antibiotics: Two is better than one. *Int J Biol Sci.* 2021;17(13):3573-3582. Published 2021 Aug 18. doi:10.7150/ijbs.60551
- Łobocka M, Dąbrowska K, Górski A. Engineered Bacteriophage Therapeutics: Rationale, Challenges and Future. *BioDrugs.* 2021 May;35(3):255-280. doi: 10.1007/s40259-021-00480-z. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33881767; PMCID: PMC8084836
- Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 2011;1(2):111-114. doi:10.4161/bact.1.2.14590
- Naureen Z, Dautaj A, Anpilogov K, et al. Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Biomed.* 2020;91(13-S):e2020024. Published 2020 Nov 9. doi:10.23750/abm.v91i13-S.10819
- Nina Chanishvili, Phage Therapy—History from Twort and d'Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches; *Advances in Virus Research*, Academic Press, Volume 83, 2012, Pages 3-40, doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.
- Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(12):760-773. doi:10.1038/s41579-018-0070-8
- Ophir T, Gutnick DL. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(2):740-745. doi:10.1128/aem.60.2.740-745.1994
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):538-582. doi:10.1128/CMR.00058-07

Piepenbrink KH, Lillehoj E, Harding CM, et al. Structural Diversity in the Type IV Pili of Multidrug-resistant *Acinetobacter*. *J Biol Chem*. 2016;291(44):22924-22935. doi:10.1074/jbc.M116.751099

Piotr Tynecki, Arkadiusz Guziński, Joanna Kazimierczak, Michał Jadczyk, Jarosław Dastyk, Agnieszka Onisko; PhageAI - Bacteriophage Life Cycle Recognition with Machine Learning and Natural Language Processing; bioRxiv 2020.07.11.198606; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.11.198606>

Sarah M. Cahill, Ruth M. Hall, Johanna J. Kenyon, An update to the database for *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharide locus typing extends the extensive and diverse repertoire of genes found at and outside the K locus, 2022, doi: 10.1101/2022.05.19.492579

Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, et al. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection [published correction appears in *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Nov 26;62(12):]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(10):e00954-17. Published 2017 Sep 22. doi:10.1128/AAC.00954-17

Singh JK, Adams FG, Brown MH. Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. 2019;9:3301. Published 2019 Jan 9. doi:10.3389/fmicb.2018.03301

Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett*. 2007;29(7):995-1003. doi:10.1007/s10529-007-9346-1

Soontarach R, Srimanote P, Enright MC, Blundell-Hunter G, Dorman MJ, Thomson NR, Taylor PW, Voravuthikunchai SP. Isolation and Characterisation of Bacteriophage Selective for Key *Acinetobacter baumannii* Capsule Chemotypes. *Pharmaceuticals*. 2022; 15(4):443. doi.org/10.3390/ph15040443

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(3):649-659. doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001

Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J*. 2015;56(7):366-367. doi:10.11622/smedj.2015105

Tilles G, Wallach D. Le traitement de la syphilis par le mercure: une histoire thérapeutique exemplaire [The treatment of syphilis with mercury: an exemplary therapeutic history]. *Hist Sci Med*. 1996;30(4):501-510.

Tosin Tompson, The staggering death toll of drug-resistant bacteria, 2022; doi.org/10.1038/d41586-022-00228-x

Trudelle DM, Bryan DW, Hudson LK, Denes TG. Cross-resistance to phage infection in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a mutants. *Food Microbiol*. 2019;84:103239. doi:10.1016/j.fm.2019.06.003

Twort, F. (1915). An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* 11:1241.

Umber Tasneem. Biofilm producing bacteria: A serious threat to public health in developing countries. 2018. *Journal of Food Science and Nutrition*. doi:10.35841/food-science.1.2.25-31

Van Belleghem JD, Dąbrowska K, Vaneechoutte M, Barr JJ, Bollyky PL. Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses*. 2019; 11(1):10. <https://doi.org/10.3390/v11010010>

Vijayakumar S, Rajenderan S, Laishram S, Anandan S, Balaji V, Biswas I. Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Front Public Health*. 2016;4:105. Published 2016 May 24. doi:10.3389/fpubh.2016.00105

Wang N, Ozer EA, Mandel MJ, Hauser AR. Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. *mBio*. 2014;5(3):e01163-14. Published 2014 Jun 3. doi:10.1128/mBio.01163-14

Wong Sz S. The Pharmaceutical Journal, Syphilis and the use of mercury; 2016; doi:10.1211/PJ.2016.20201679

Young R, Gill JJ. MICROBIOLOGY. Phage therapy redux--What is to be done?. *Science*. 2015;350(6265):1163-1164. doi:10.1126/science.aad6791

Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev*. 1992;56(3):430-481. doi:10.1128/mr.56.3.430-481.1992

Yukgehnash K, Rajandas H, Parimannan S, et al. PhageLeads: Rapid Assessment of Phage Therapeutic Suitability Using an Ensemble Machine Learning Approach. *Viruses*. 2022;14(2):342. Published 2022 Feb 8. doi:10.3390/v14020342