



36. ORSZÁGOS
TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI
KONFERENCIA 2023



Biológia Szekció

K64-es toktípusú *Klebsiella pneumoniae* ellen izolált bakteriofágok jellemzése

Készítette:

Hampuch Péter

biológiai tanár (egészségtan)
(természettudományi gyakorlatok) -
német nyelv és kultúra egységes,
osztatlan tanárképzés;
Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi Kar

Témavezető:

Dr. Schneider György,

egyetemi adjunktus
Pécsi Tudományegyetem Általános
Orvostudományi Kar,
Mikrobiológiai és Immunitástani
Intézet



2023, Pécs

Tartalomjegyzék

I. Bevezető	3
1. Multidrog-rezisztens baktériumok.....	3
2. A <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
3. A <i>K. pneumoniae</i> fontosabb virulencia faktorai	4
4. A tok.....	4
5. A K64-es tok típus.....	5
6. Bakteriofág-terápia, mint potenciális megoldás az MDR baktériumok által kiváltott fertőzések kezelésére	7
7. A tok-depolimeráz enzim hatékonysága Gram-negatív baktériumokkal szemben	8
II. Célkitűzések	10
III. Anyag és módszer	11
1. A célbaktérium	11
2. Bakteriofágok izolálása szennyvízmintákból	11
3. Bakteriofágok jelenlétének detektálása, PFU meghatározás, fág-törzsek több lépcsős tisztítása 12	
4. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat.....	14
5. Teljes fág-genom izolálás.....	14
6. Bakteriofág genomok szekvenálása és genomikai elemzése.....	16
IV. Eredmények és értékelésük	17
1. Bakteriofágok izolálása szennyvízmintákból	17
2. Bakteriofágok jelenlétének detektálása, PFU meghatározás,	17
3. Fágklónok több lépcsős tisztítása	18
4. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat.....	18
5. Bakteriofágok genomikai analízise	19
V. Diskusszió	23
VI. Jövőbeni tervek	24
VII. Köszönetnyilvánítás.....	25
VIII. Irodalomjegyzék.....	26

I. Bevezető

1. Multidrog-rezisztens baktériumok

A multidrog-rezisztens (MDR) baktériumok, azaz azok a baktériumtörzsek, melyek egyszerre számos antibiotikummal szemben rezisztensek, napjainkban egyre nagyobb problémát jelentenek a modern orvostudomány számára. Ezen a baktériumok által okozott fertőzések terápiája jóval nagyobb kihívást jelent és kórházi előfordulásuk kockázatosabbá teheti az egyszerű sebészeti beavatkozásokat is. Ezenkívül a fertőzések kezelése jelentős gazdasági többlet terhet is jelent (*van Duin és Paterson, 2016*).

Napjainkban a nosokomiális (kórházi) fertőzések okozói az esetek nagy százalékában MDR baktériumok. Terápiás lehetőségeink ezekkel a kórokozókkal szemben oly mértékben korlátozottak, hogy a klinikusok sok esetben kénytelenek visszanyúlni korábban már elvetett gyógyszerek használatához, mint például a kolisztin, amelyek azonban jelentős toxicitással rendelkeznek. Adagolásuk amiatt is kockázatos, mert esetükben gyakran hiányoznak a megbízható adatok, amelyek alapján meg lehetne határozni az adagolási sémát és a kezelés időtartamát (*Boucher és mtsai., 2009*). A sebészeti beavatkozásokon áteső idős betegek növekvő száma, illetve az egyre több újszülött az intenzív osztályokon azt prediktálja, hogy az idő előre haladtával nő az egészségügyi intézményekben kezelt immunhiányos páciensek száma, akik az előbb említett fertőzésekre jóval fogékonyabbak, ezért jóval veszélyeztetettebbek (*Chopra és mtsai., 2008*). Egy 2014-es tanulmány azt előrejelzi, hogy az antibiotikum rezisztens kórokozók általi fertőzések 2050-re évente 10 millió halálesetet fognak okozni (*O'Neill, 2014*).

2. A *Klebsiella pneumoniae*

Az egyik legnagyobb fenyegetést jelentő MDR baktérium a *Klebsiella pneumoniae*, amely *Enterobacteriaceae* család tagja, Gram-negatív, pálca formájú, fakultatív aerob baktérium. Spórát nem képez, de tokanyagot termel, amely nyálkás burokként fedi a sejtet. Bontja a laktózt és az ureát. A legfontosabb antigénjei a sejtfalat alkotó lipopoliszacharid vagy LPS (O-antigén), a már említett tok poliszacharid (K-antigén). Az utóbbi években csillóval rendelkező izolátumokat is kimutattak (H-antigén).

A *K. pneumoniae* a környezetben és a béltraktusunkban eredendően ártalmatlan kommenzalistaként van jelen, azonban bizonyos körülmények (sebzés, fiziológiás változások, gyenge immunállapot) hatására opportunistá patogénként kezdhethet viselkedni a szervezetben.

Névadója az általa kiváltott, és sok esetben tályogos lobáris tüdőgyulladás (Friendländer pneumonia), de nagyon gyakran megfigyelhető nem megfelelően tisztított katéterek használata miatt kialakuló húgyúti fertőzésekben, vagy pedig tályogos májgyulladásban, súlyosabb esetekben vérmérgezést (szepszist) is képes előidézni (Brisse és mtsai., 2009).

Túlélő-, és adaptációs képessége, valamint az izolátumok körében előforduló és könnyen felvehető antibiotikumrezisztencia miatt a kórházi környezetben megjelenve izolátumai nozokomiális infekciókat képesek okozni. Ezek napjainkra egyre nagyobb problémát jelentenek világszerte. Ennek is tulajdonítható, hogy ezek a baktériumok az ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Enterobacter spp.*) pánrezisztens mikroorganizmusok csoport tagjai. Az ESKAPE-baktériumok antibiotikum-rezisztens mivoltuk révén világszerte a legnagyobb fenyegetést jelentik a gyógyászatban (Pertics és mtsai., 2021).

3. A *K. pneumoniae* fontosabb virulencia faktorai

A *K. pneumoniae* szervezetben történő megtelepedését számos bakteriális faktor segíti elő, melyek egy része fontos szerepet játszik súlyosabb fertőzések létrejötténél. Ezek közül a virulencia faktorok közül a szervezeten való megkötődést biztosítják a tok, a lipopoliszacharidok és a fimbriák. Invazív folyamatokban van szerepük a vasmegkötést elősegítő sziderofóroknak. Az immunrendszerrel szembeni védekezésben jutnak szerephez az LPS-ok, melyek az O-antigénjük segítségével a komplement rendszer védelmi funkcióival szemben. Végül, de nem utolsó sorban az egyik legfontosabb virulencia faktor a *K. pneumoniae* esetében a poliszacharidokból felépülő nagyon ellenálló tok, illetve ennek egy szélsőséges megjelenési formája hipermukozitás. A tok alapanyaga nagymértékben hozzájárul a biofilm-képzéshez és a gazda immunrendszerével szembeni hatékony védelemhez. Korábban úgy vélték, hogy a hipermukózus tokanyagot termelni képes törzsek esetében jelentősen megnő a virulencia. Ezzel kapcsolatban azonban a meglévő érvek mellett, ellenérvek is szólnak (El Fertas-Aissani és mtsai., 2013).

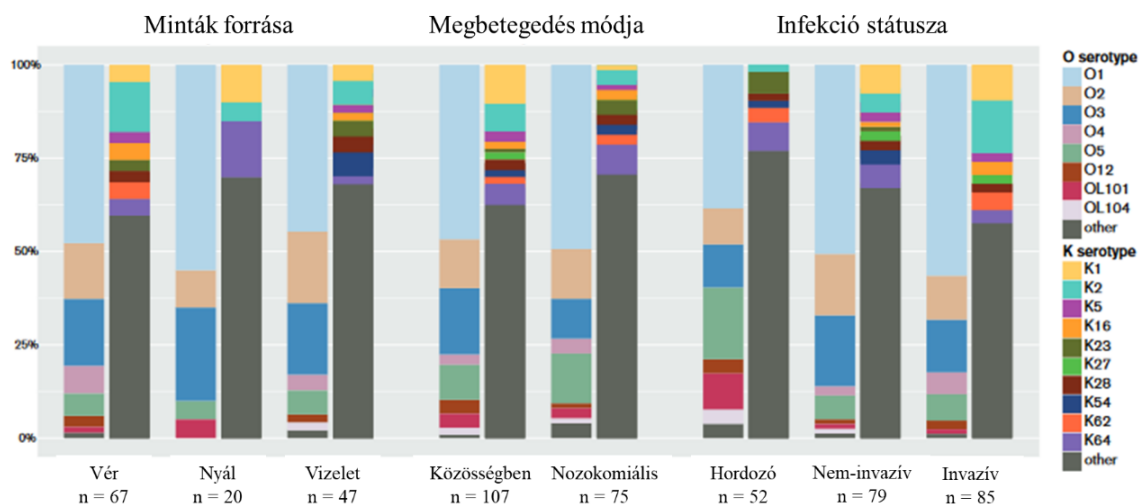
4. A tok

A különböző *K. pneumoniae* toktípusokat a szakirodalomban K-szerotípusoknak nevezik. Ezek identifikálását már az előző században megkezdték különböző szerológiai tesztekkel. Napjainkra több, mint 80 különböző K-szerotípust különböztetünk meg. A biokémiai vizsgálatokat mostanra a molekuláris tipizálások váltották fel. A molekuláris azonosítással

megkülönböztetett toktípusokat KN-jelzéssel különböztetik meg (KN1-KN4) (Pan és mtsai., 2017). Egy ilyen molekuláris módszer például a wzi-szekvenálás, amely a *K. pneumoniae* törzsek egy igen konzervált génszakaszát veszi alapul a vizsgálathoz. A K-szerotípusokban mutató eltéréseket a *cps* (capsule polysaccharide synthesis) lókuszon jelen lévő, illetve hiányzó géneknek tulajdonítják (Follador és mtsai., 2016).

Korábbi kutatások igazolták, hogy a *K. pneumoniae* K1 toktípusának fő építőanyaga az N-acetil-neuraminsav (polisziálsav), azonban a többi toktípus kapszulája biokémiaiilag eltér ettől. A molekuláris biológiai tipizálási módszerek segítségével történő összehasonlító vizsgálatok eredményei arra engednek következtetni, hogy a gének szintjén mutató különbségek a baktériumok szerotípusaiban is megmutatkoznak (Knecht és mtsai., 2020).

Egy 2016-os kutatás eredménye szerint a három leggyakoribb *K. pneumoniae* K-szerotípus a K1, K2 és K57, melyek 82,1%-ban tehetők felelőssé a noszokomiális *K. pneumoniae* fertőzésekért. Ezeket követik a sorban a K54 és K64 szerotípusok (Zhang és mtsai., 2018) habár az utóbbi időben más szerotípusok jelentőségét is kiemelik, mint kórházi kórokozó (Horváth és mtsai., 2020). Az 1. ábra igazolja, hogy mind az 5 fő K-szerotípus jelen van a vér-, nyál- és vizeletmintákban is (Follador és mtsai., 2016).



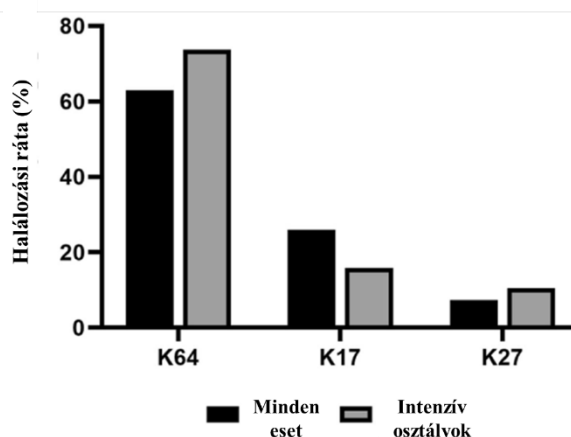
1. Ábra: A klinikai esetek legnagyobb százalékában előforduló *K. pneumoniae* O- és K-szerotípusok előfordulási aránya három különböző mintacsoportban. (Forrás: Follador és mtsai., 2016)

5. A K64-es toktípus

Follador és mtsai. munkája jól mutatja, hogy a K64-es toktípus a szerológiai minták több válfajában is nagy számban képviselteti magát (vér, nyál vizelet). A kutatás arról is beszámol,

hogy az említett toktípus világszerte széleskörben elterjedt. Leírták már az Egyesült Államokban, az Egyesült Királyságban és Ázsia több pontján. Az eddigi publikációk tanúbizonysága alapján azonban a legnagyobb gondot Észak-Afrika és Délkelet-Ázsia fejlődő országaiban jelenti, ahol az átlagnál több esetet regisztráltak.

Egy tunéziai kutatás során, ahol a wzi-szekvenálás segítségével 163 karbapenem-rezisztens mintából különítettek el különböző K-szerotípusokat, arra az eredményre jutottak, hogy az esetek 50,3 %-ában a K64-es toktípus volt jelen. A tanulmány során leírták azt is, hogy a K64-es toktípus Észak-Afrika legnagyobb mértékben elterjedt *K. pneumoniae* változata. A 163 minta nagy része intenzív osztályokról származott, ahol a K64-es toktípus a másik két változattal szemben (K17 és K27) jelentősen virulensebbnek mutatkozott (halálozási ráta: 70,3 %) (2. ábra) (Eckstein és mtsai., 2021). Ez tovább erősíti azt a tényt, hogy az antibiotikum-rezisztens baktériumok legnagyobb esetben az immunkompromittált betegeket támadják.



2. Ábra: A *K. pneumoniae* K64-es; K17-es és K27-es tok szerotípusainak összevetése azok halálozási rátája alapján, a teljes mintapopulációra, illetve az intenzív osztályokról származó mintákra vonatkoztatva. (Forrás: Eckstein és mtsai., 2021)

Az irodalmi adatok szerint a K64-es toktípus nagy számban izolálható ázsiai mintákból is, ahol komoly nozokomiális fertőzések kialakulását indukálja, mint például a tályogos májgyulladást, vagy súlyosabb esetekben szepszist (Vu Thi Ngoc és mtsai., 2021). Ázsián belül Vietnámban és Szingapúrban mutatkoztak kiugró értékek a K64-es toktípus által okozott fertőzések körében. A kutatások itt is azt igazolták, hogy a K64-es tok szerotípus a legnagyobb fenyegetést az immunhiányos betegekre jelenti, mivel a kutatás során molekuláris módszerekkel azonosított minták nagy része intenzív osztályon lévő, szepszisben szenvedő páciensektől származott (Vu

Thi Ngoc és mtsai., 2021). Ez természetesen nem zárja ki, hogy ez a szerotípus hosszabb vagy rövidebb ideig ne perzisztálna egészségesebb emberekben is.

6. Bakteriofág-terápia, mint potenciális megoldás az MDR baktériumok által kiváltott fertőzések kezelésére

A bakteriofágok baktériumokat fertőzni képes vírusok, amelyek, ha a lítikus életutat választják, képesek a baktériumsejtek elpusztítására és közben a reprodukált víruspartikulumok tovább terjesztésére. A fágok a Földön mindenütt megtalálhatóak, nem csoda tehát, hogy a legnagyobb mennyiségben előforduló biológiai entitásként vannak számon tartva. Méretük, morfológiájuk és genomikai szerveződésük alapján rendkívül sokfélék lehetnek. Ez a változatosság az, ami az evolúció során biztosította számukra, hogy a legkülönbélebb gazdasejtekhez is alkalmazkodni tudjanak (Doore & Fane, 2016).

A napjainkban egyre nagyobb fenyegetést jelentő MDR-baktériumok a „preantibiotikus” korszak felé sodorják az orvoslást, azaz előrevetítik azt a problémát, hogy nem lesz effektív gyógymódunk az antibiotikum rezisztens kórokozókkal szemben. Sok esetben erre nyújthatnak egy lehetséges megoldást a baktériumok természetes ellenségei, a bakteriofágok. Az evolúció során hatalmas változatosságra szert tett fágok potenciális „fegyverként” szolgálhatnak a különböző pánrezisztens baktérium törzsekkel szemben. Ezt a tényt a fágok számos, terápiás szempontból előnyös tulajdonsága igazolja: (i) gazdaspecifitásuk nagy, ami alkalmassá teszi őket arra, hogy csak a „célbaktériumot” pusztítsák el; (ii) nagy biztonsággal alkalmazhatóak, mert nem lépnek reakcióba a beteg immunrendszerével. (iii) Szükség esetén nagy gyorsasággal izolálható új bakteriofág-törzs egy újonnan kialakult baktérium szerotípussal szemben (Sulakvelidze és mtsai., 2001)

Számos kísérletes munka támasztja alá, hogy a *K. pneumoniae* különböző toktípusaival szemben is izolálható lítikus fág. Példaként említhetők azok a közelmúltban végzett tanulmányok, amelyek a bakteriofágok hatékonyságát vizsgálták a *Klebsiella ozaenae*, a *Klebsiella rhinoscleromatis scleromatis* és a *Klebsiella pneumoniae* által okozott fertőzések kezelésében. Az izolált fágkészítményről azt jelentették, hogy (i) hatékony volt egerek kísérleti fertőzéseinek kezelésében, és (ii) nem váltott ki károsodásra utaló jeleket egerekben és tengerimalacokban még akkor sem, ha különböző módon adagolták azokat, intravénás (i.v.), intranazális és intraperitoneális módon. A beadást követően nem észleltek jelentősebb szövettani elváltozásokat, még azután sem, hogy az egereknek az akut toxicitási vizsgálatok során az emberi szervezetre megállapított, testtömegre becsült dózis 3500-szorosát adták. A

szerzők továbbá meghatározták az optimális fágkoncentrációt és beadási módot, valamint beszámoltak egyéb olyan lényeges körülményekről, amelyek fontosak lehetnek a későbbi humán önkéntes kísérletek megtervezéséhez. Ezt követően a preklinikai vizsgálatok eredményeit felhasználva értékelték a fágok biztonságosságát és hatékonyságát 109 *Klebsiella*-fertőzésben szenvedő beteg kezelésében. Azt találták, hogy a *Klebsiella*-fertőzések kezelésében a fágkészítmények hatékony voltak és nem rendelkeztek volt toxikus hatásokkal a betegek számára (*Bogovazova és mtsai., 1992*).

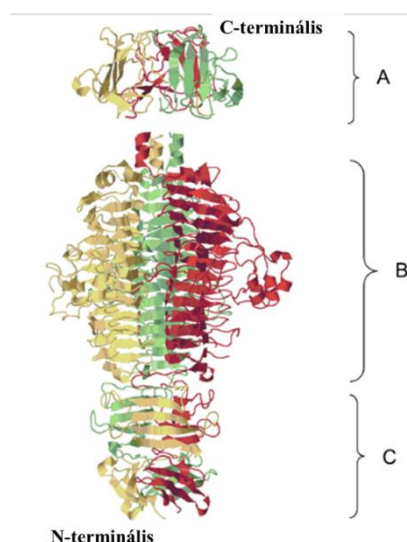
7. A tok-depolimeráz enzim hatékonysága Gram-negatív baktériumokkal szemben

A fággenom bejuttatása a gazdasejtbe elengedhetetlen a fertőzés sikerességéhez. Ehhez azonban szükség van arra, hogy a fág megfelelő doménje kapcsolatba lépjen a baktérium sejtfelszínén elhelyezkedő célreceptorral, amely történés irreverzibilis konformáció változást indukál a bakteriofág farki és/vagy feji doménjében. Ezt követően az örökítőanyag beinjektálódik a baktérium citoplazmájába (*Knecht és mtsai., 2020*). Ahhoz, hogy a virális genom bejuthasson a bakteriális citoplazmába, a fágnek át kell törnie a tok poliszacharid (capsule polysaccharide, CPS) (K-antigén) által kialakított akadályon. Az evolúciós során a bakteriofágok a poliszacharid réteg elbontása céljából számos enzimet alakítottak ki, amelyeket ma tok depolimeráz enzimeknek nevezünk. A fágok tokanyag elbontása révén férhetnek hozzá sejtfelszíni receptorokhoz (*Latka és mtsai., 2017*). Ezek a receptorok lehetnek ion-csatornák, szekretáló fehérjék és egyéb funkciókat betöltő sejtfalba ágyazott fehérjék. A ko-receptorhoz való kötődést követően a virion-asszociált lizin enzim egy kis rést vág a bakteriális sejtfal peptidoglikán rétegbe, ami elősegíti a DNS bejuttatását a citoszolba (*Briers és mtsai., 2007*). A poliszacharid depolimeráz enzimek létezésére először 1953-ban figyeltek fel, amikor a virális feltisztulási zónák körül halo („glória”) alakú homályos gyűrűket vettek észre. Erős a gyanú arra vonatkozóan, hogy ez a jelenség a diffuzibilis depolimerázoknak tudható be, amelyek fágpartikulumoktól eldiffundálva a környező baktériumok CPS-ját képesek lebontani (*Eklund & Wyss, 1962*).

A tok depolimeráz enzimeket két nagy csoportra oszthatjuk: hidrolázokra (szialidázok, ramnozidázok, levanázok, xilanázok és dextranázok) és liázokra. Mindkét csoport a poliszacharid réteg oligoszacharidokká történő bontását katalizálja, más-más megoldásokkal.

A depolimerázok közös tulajdonsága, hogy általában a fág kötődését elősegítő fehérjeszálakon vagy az alaplemezen lokalizálódnak.

A depolimerázok általában homotrimerek, három fehérjealegységből épülnek fel (3. ábra): egy kis flexibilis N-terminális szakaszból, amit a középső, megnyúlt, katalitikus domén követ és végül a harmadik szakasz, a C-terminális, ami valószínűleg az enzim trimerizációjáért felelős és chaperon fehérjeként funkcionál. Az N- és C-terminálisok konzervált régiók, míg a középső szakasz hatalmas változatosságot mutat (Schwarzer és mtsai., 2012)



3. Ábra: Tok depolimeráz enzim homotrimer felépítése: (A): kis C-terminális alegység; (B): nagy katalitikus alegység; (C): N-terminális chaperon. (Forrás: Latka és mtsai., 2017; PDB ID 1LKT és 1TYV; JavaScript Protein Viewer)

Szerkezeti adottságaiknál fogva ezek az enzimek nagyon stabilak. Képesek extrém magas hőmérsékleten (80 fok) és alacsony pH (pH 5) értéken is megőrizni stabilitásukat, valamint számos proteáz enzimnek és az nátrium-dodecil-szulfát (sodium-dodecyl-sulfate; SDS) molekulának is képesek ellenállni. Ezek a karakterjegyek azt sugallják, hogy a fágok remekül használhatóak lennének biotechnológiai, illetve orvosi célokra (Yan és mtsai., 2014)

A leginkább kutatott depolimeráz enzimek a *Podoviridae* családból származnak. Ezt kutatók arra alapozzák, hogy a fágok a rövid farki régiójuk miatt másként nem tudnának bekötni a baktérium sejtfelszínéhez (Knecht és mtsai., 2020).

Egyedi tulajdonságok ellenére a tokdepolimerázokról alkotott képünk meglehetősen hiányos. Ez tulajdonítható annak is, hogy szerkezetük egy két kivételtől eltekintve nem igazán ismert és a kódoló szekvenciájuk is cukorkötő motifokhoz történő hasonlóságuk alapján lehetséges. Mindeddig nagyon kevés a funkcionális analízisükkel foglalkozó tanulmányok száma (Squeglia és mtsai., 2020).

II. Célkitűzések

Kutatásunk során megkíséreltünk olyan lítikus életciklusú bakteriofágokat izolálni, amelyek képesek lizálni a K64-es tokot kifejező CIP80.47 referencia törzset.

Célunk volt egy halo-zónát képző, illetve azt nem képző fágtörzs izolálása és ezek összehasonlító elemzése. Ennek során morfológiai és genetikailag analízisnek kívántuk a fágokat alávetni, mely során a strukturális különbségek analízise mellett a tok depolimerázt kódoló szekvencia azonosítása is célunk volt.

III. Anyag és módszer

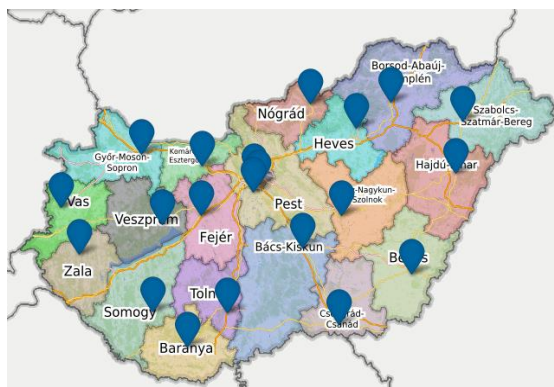
1. A célbaktérium

Munkánk során végig egy K64-es toktípust termelő *Klebsiella pneumoniae* kórházi izolátum referencia törzzsel (CIP80.47, Pasteur Intézet (Franciaország)) dolgoztunk.

A baktériumot napi szintű tenyésztéséhez, illetve fenntartásához Luria-Bertani agart (LBA) használtunk (15 g agar, 10 g pepton, 5 g élesztő extraktum, 5 g NaCl, 1000 ml desztillál vízben feloldva, sterilizálva 121°C-on, 15 percen keresztül). A leoltást mindig LB-tápfolyadékban végeztük el. A tápfolyadékos növesztést 12-14 órán keresztül, 37°C-on, rázó-termosztátban (Brunswick Incubator Shaker Series, Innova 40; 120 RPM fordulatszámon), aerob körülmények között, éjszakán át (O/N) végeztük.

2. Bakteriofágok izolálása szennyvízmintákból

A bakteriofágok izolálását szennyvízmintákból végeztük. Huszonhét szennyvízmintát használtunk fel az izoláláshoz, ezek az ország 19 megyésékhelyéről származtak (4. ábra). A mintákat a Nemzeti Népegészségügyi Központ biztosította számunkra.



4. Ábra: Az izoláláshoz felhasznált szennyvízminták származási helyei. (saját szerkesztés)

A bakteriofágok izolálását a következő módon végeztük: 50ml O/N célbaktériumtenyészetet 150 ml LB tápfolyadékhoz adtunk. Az így kapott szuszpenzióból 5-5 ml-t mértünk ki 27 vérszállító csőbe. Ezt követően minden egyes vérszállító csőbe egy városból származó 1 ml szennyvízmintát pipettáztunk. A baktérium szuszpenziót és immáron szennyvízmintákat tartalmazó csöveket 37 °C-on, 120 RPM-en, 24 órán keresztül inkubáltuk.

Másnap szuszpenziók mindegyikéből 1,5 ml-t átpipettáztunk 2 ml-es eppendorf csövekbe, majd ezeket centrifugáltuk (*Centrifuga típusa és neve*; 4800 RPM (6800 xG); 10 perc). A

célbaktériumunk ellen vélhetően felszaporodott fágokat tartalmazó felülúszókból 980 µl-eket átpipettáztunk egy új 1,5 ml-es Eppendrof csőbe, majd a felülúszóban még jelen- és életben lévő baktériumok eliminálása végett, 1:50 v/v arányban, azaz 20µl kloroformot (Molar Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország) adtunk a mintákhoz. Az így kezelt mintákat összeráztuk, majd legalább 4 órára hűtőszekrényben (4-8 °C) inkubáltuk.

3. Bakteriofágok jelenlétének detektálása, PFU meghatározás, fág-törzsek több lépcsős tisztítása

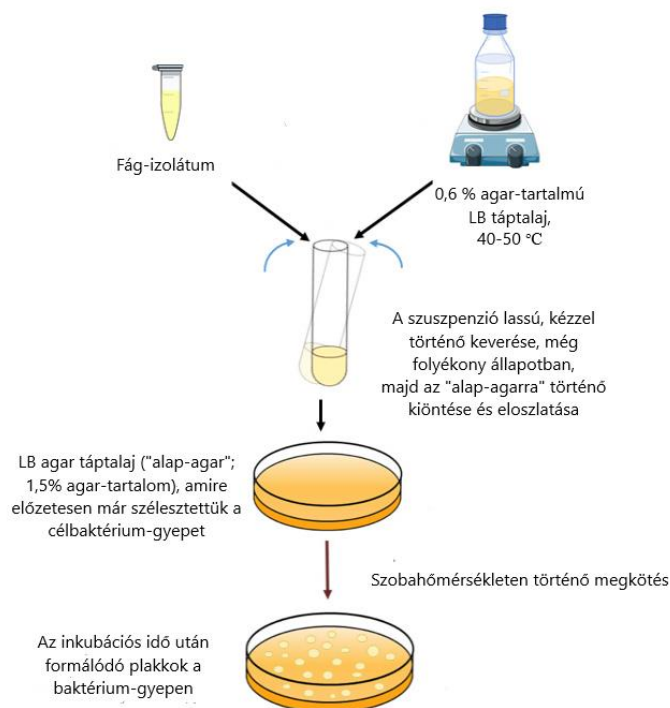
A kloroformozott, szennyvízpropagált mintáinkat centrifugáltuk (VWR MicroStar 12; 4800 RPM (6800 xG); 2 perc), a kloroform és a megmaradt sejttörmelék ülepitése végett. A szuszpenziókban lévő lítikus bakteriofágokat *Kropinski és Twest* nyomán spot-teszteléssel tettük láthatóvá. Ehhez, a leoltott CIP80.47 törzsből 100 µl-t szélesztettünk LB agaron. Minden egyes kloroformmal tisztított szennyvízmintából 10 µl-t cseppentettünk a baktériumgyep kitüntetett helyeire, majd ezeket O/N 37 °C-on inkubáltuk. Másnap a kialakult feltisztulási zónákat (plakkokat) vizsgáltuk.

Ezt követően került sor a fáguszuszpenziók töménységének, másként plakk-formáló egyégeinek (plaque forming unit, PFU) meghatározására. Ehhez az előző lépés pozitív mintáiból 100-as léptékű hígítási sorokat készítettünk steril foszfát-pufferes sóoldatban (PBS) (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,16 g Na₂HPO₄; 0,2 g; desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve). Inkubálás után (O/N 37 °C) meghatároztuk a PFU számát és milliliterre viszonyítva fejeztük ki (PFU/ml).

Abból a célból, hogy a későbbiekben egyedi fág-törzsekkel dolgozhassunk tovább, a szennyvízpropagált és kloroformmal kezelt mintáinknak egyéb tisztítási lépéseken is át kellett esniük. Kiválasztottuk azt a két legígéretesebb fágot, melyeknek 10⁻⁶-szoros hígításon a legtöbb plakk-formáló egységét számlálhattuk (átlagosan 8 plakk).

Egyedi törzseket *Kropinski és mtsai.* nyomán a top-agar módszer (5. ábra) segítségével nyertünk. Ennek a módszernek a lényege, hogy a már előzetesen kiszélesztett baktérium-gyepet tartalmazó 1,5 % agar-tartalmú LB táptalajra („alap-agar”) egy újabb réteg LB táptalajt öntünk. Ez utóbbi azonban csak 0,4 %-ban tartalmaz agart (top-agar). így lehetővé téve, hogy alacsonyabb hőmérsékleten (50-55 °C) lágy maradjon. Ezt a hőmérsékletet még a bakteriofágok is tolerálják. A 4 ml top-agart tartalmazó csövekhez hozzáadtuk a megfelelő fághígítások mennyiségeit. Ezt követően gyorsan felvortexeltük és a baktérium gyepet tartalmazó alap-agar felszínére kiöntéssel elterítettük. A fáguszuszpenzió megfelelő hígításából akkora térfogatot

pipettáztunk a top-agarba, amely előzetes számítások alapján megfelelően elkülönült. A Petri-csészéket ezek után 24 óráig 37 °C-on inkubáltuk.



5. *Ábra*: A top-agar módszer szemléltetése. (Forrás: *Stachurska és mtsai., 2021*)

Az inkubálást követően jól elkülöníthető és karakteres feltisztulási zónákat kerestünk a baktérium-gyepen. Mindkét különböző fág esetén egy fém spatulával egy jól körülhatárolt plakk körüli régiót kivágtunk a táptalajból majd ezeket 5 ml LB tápoldatot tartalmazó vérszállító csövekbe helyeztük, végül ezekhez 1-1 ml-t helyeztünk a célbaktérium szuszpenziójából. A szuszpenziókat 24 óráig, 120 RPM-en, 37 °C inkubáltuk. Megfelelő mennyiségű időt adva a bakteriofágoknak, hogy elszaporodjanak a szuszpenzióban.

A fenti top-agaros tisztítási módszert összesen háromszor ismételtük meg annak érdekében, hogy teljesen elkülönült fág-törzset kapjunk. A tisztítási folyamatok végén ismét meghatároztuk a fág-titert, amely értéket a kiindulási térfogatnak, a hígítás mértékének és a baktérium-gyepen megjelent plakkok számának összeszorzásával kaphatunk meg.

A tisztítási folyamat végeztével a fág-szuszenzió egy része későbbi felhasználás céljából konzerválásra került (25 % glicerinnel; -80 °C)

4. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat

A tisztított törzseket morfológiai vizsgálatnak vetettük alá. Ehhez a mintákat 1,5 w/v%-os foszfo-wolfram-savval festettük, majd transzmissziós elektronmikroszkópot (TEM) (JEM-1400 Flash TEM (JEOL, USA)) használtunk. Vizsgálatainkat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának, Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában végezhetjük el.

A kísérlet előkészítését egy korábban leírt protokoll alapján végeztük (Horváth és mtsai., 2020). Ennek során 10 µl-t cseppentettünk az előzetesen tisztított magas titerű (10^9 PFU/ml) fág-szuszpenziókból formvar-hártyával bevont réz gridekre (Pelco Grids, Kanada). 15 perces szobahőmérsékleten történő inkubálást követően a felesleges folyadékot szűrőpapír segítségével szívattuk le a grid felszínéről. Ezt követte a 40-45 másodpercig tartó 10 µl-es 1,5 w/v%-os foszfo-wolfram-savas negatív festés (6. ábra). A felesleges festéket szűrőpapír csíkkal távolítottuk el majd szobahőn száradni hagytuk.

A vákuumba helyezett mintáinkat 80 kV gyorsító feszültség mellett vizsgáltuk. A bakteriofágok feji átmérőjét és farki régiójának hosszát lemértük, és ezeknek a karakterjegyeknek az alapján elhelyeztük őket valamely víruscsaládba.



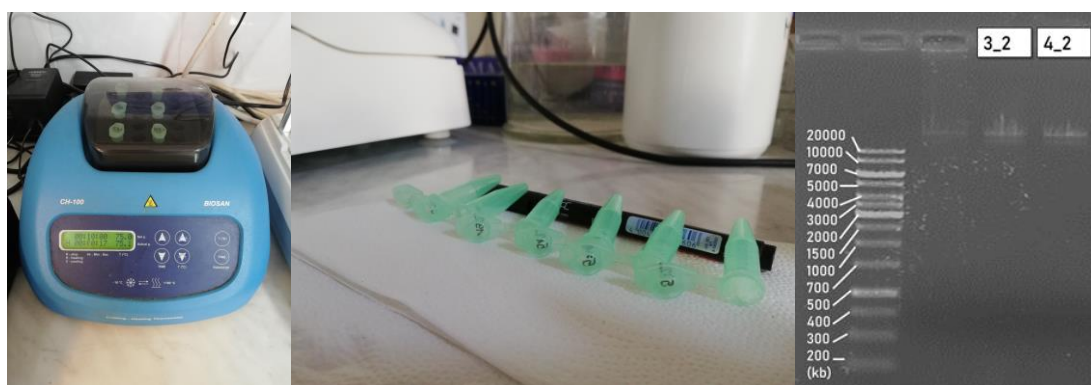
6. Ábra: A foszfo-wolfram-savas negatív festés menete. (saját fotó)

5. Teljes fág-genom izolálás

Morfológiai vizsgálatok mellett genomikai analízist végeztünk a két fág-izolátumon. Ehhez a bakteriofágok teljes genomjának extrakciójára volt szükség. A DNS-izolálását a Texas A & M University, Fág Technológiai Centruma által leírt módon végeztük el (Gill, 2011). A fág DNS izolálás lépéseit a következő módon és sorrendben hajtottuk végre: minden fág-szuszpenzióból 1,2-1,2 ml-t Eppendorf csövekbe pipettáztunk, melyekhez 10 µl, 1 mg/ml-es DN-ázt (Thermo Fischer Scientific, USA) és 10 µl, 1 mg/ml-es RN-ázt (Sigma-Aldrich, USA) adtunk, majd 30 percig inkubáltuk 37°C-on. A DN-áz és RN-áz aktivitás leállítása végett 100 µl 0,5 M-os, pH 8-as EDTA (Thermo Fischer Scientific, USA) oldatot adtunk, amelyet 10 perc, 75°C-os inkubálás követett (Biosan, Heatng/Cooling dry block, CH-100, USA). A szabad DNS vagy

RNS molekula eliminálási lépést követően felbontottuk a rendszerben lévő intakt fágokat 20 μ l, 20 mg/ml-es proteináz K (Sigma-Aldrich, USA) oldat adásával és egy óras inkubációval (37 $^{\circ}$ C). Ezek után az eppendorf cső tartalmát ketté osztottuk (600-600 μ l) és a két keletkezett mintához 60-60 μ l, 7,5 M-os ammónium-acetát oldatot adtunk, amely a DNS-molekulák aggregátumait hozza létre a szuszpenzióban, ezzel megkönnyítve a pellet precipitáció folyamatát. A bennmaradó fehérjét 600 μ l fenol-kloroformos (Sigma-Aldrich, USA) kicsapás segítségével távolítottuk el, 10 perces 13 000 RPM-os centrifugálás során. A centrifugálást követően mindegyik csőről 500 μ l felülúszókat (DNS tartalmú fázis) átpipettáztunk steril Eppendorf csövekbe, és ezekhez 1 ml 96%-os etanolt (Molar Chemicals, Magyarország) adtunk. Annak érdekében, hogy a DNS megfelelően lecsapódjon a cső falán, 2 órán keresztül, -20 $^{\circ}$ C-on inkubáltuk azokat. A kicsapódott DNS-t 15 perces, 12 000 RPM-es centrifugálással ülepítettük, majd a tömény etanolt leöntöttük és 1 ml 70%-os etanolban (Molar Chemicals, Magyarország) kétszer mostuk a pelleteket (5 perc, 12 000 RPM). A mosás végeztével az etanolt leöntöttük és 2-3 órán keresztül, szobahőmérsékleten (20-25 $^{\circ}$ C) szárítottuk (7. ábra). Végül 20 μ l nukleáz mentes vízben (Thermo Fischer Scientific, USA) visszaoldottuk az izolált fág DNS-eket és felhasználásig -20 $^{\circ}$ C-on tároltuk azokat (Horváth és mtsai., 2020).

Az izolált fág DNS-eket agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá. Ehhez 1% agaróz (Invitrogen, UK) gélét öntöttünk 1x TAE pufferben. A futtatáshoz Bio-Rad Power Pac 300 (Bio-Rad, USA) tápegységet használtunk 140V-on, 45 percen keresztül. A futtatás végeztével a gélét 5 mg/ml-es etídium-bromiddal (Acros Organics, USA) festettük meg, majd UV fény alatt tettük láthatóvá az izolált fág DNS-t.



7. **Ábra:** EDTA-val történő inkubálás 70 $^{\circ}$ C-on (balra); DNS-pelletek szárítása szobahőmérsékleten (középen); EtBr-dal festett DNS-extraktumok UV-fény alatt (jobbra). (saját fotók)

6. Bakteriofág genomok szekvenálása és genomikai elemzése

A DNS-izolátumokat a PTE SzKK Bioinformatikai Kutatócsoportjához küldtük szekvenálásra, ahol az előkészítésére Nextera XT Library Preparation Kittet (Illumina, San Diego, CA, USA) alkalmaztak. A szekvenáláshoz a MiSeq Reagents Kittet v.2 (2x150 bp) (Illumina San Diego, CA, USA), valamint az Illumina MiSeq szekvenálót (Illumina, San Diego, CA, USA) használták fel. A nyers szekvenciák összeillesztése MyPro szoftver segítségével történt. Az ebből kapott nyers FASTA fájlokat a RAST szerveren (<https://rast.nmpdr.org/>, 2022.10.04.) annotáltuk. A megszekvenált fágok genomtérképét a CLC Sequence Viewer v.8 (CLC bio, Aarhus, Denmark) segítségével ábrázoltuk. A nyitott leolvasási kereteket (open reading frames, ORF) a GeneMarkS program segítségével erősítettük meg (Besemer, 2001). Bizonyos fehérjekódoló szekvenciák felkutatását a teljes fág-genomban és a homológia-elemzéseket az NCBI adatbázis BLASTn és BLASTx eszközeivel (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; 2022.10.07.) hajtottuk végre.

IV. Eredmények és értékelésük

1. Bakteriofágok izolálása szennyvízmintákból

A Nemzeti Népegészségügyi Központ (NNK) által biztosított 27 szennyvízminta közül mindegyik tartalmazott lítikus aktivitással rendelkező bakteriofágokat az általunk vizsgált *K. pneumoniae* K64-es tokítpusa ellen (8. ábra).



8. Ábra: A Petri-csészéken jól látható, hogy a szennyvízminta izolátumok mindegyike tartalmazott lítikus fágot a célbaktériummal szemben. A szennyvízminták (1-27) balról jobbra sorba rendezve lettek kicseppentve a baktériumgyep felületére. (saját fotók)

Némely minta esetében a feltisztulási zónák (plakkok) körül halo-zónák is kialakultak. A halo-zónák körbeveszik a náluk jobban áttetsző feltisztulási zónákat. Ebben a régióban a dekapuszulált baktériumok találhatóak meg, melyek a bakteriofágok szolúbilis tok-depolimeráz enzimkészletének estek áldozatul. A 37 °C-on, 12 óráig inkubált tenyészetekben a feltisztulási zónák átmérője mindegyik minta esetében nagyjából 10 mm volt. A halo-zónák ugyanilyen körülmények között eltérő méretűek voltak: szélességük 2-4 mm között változott a baktériumgyepen. Céljaink között szerepelt egy diffuzibilis és egy nem diffuzibilis depolimerázzal rendelkező fág izolálása és karakterizálása, ezért a 3-as és 4-es mintákat tisztítottuk tovább elkülönült fág törzs nyerése végett.

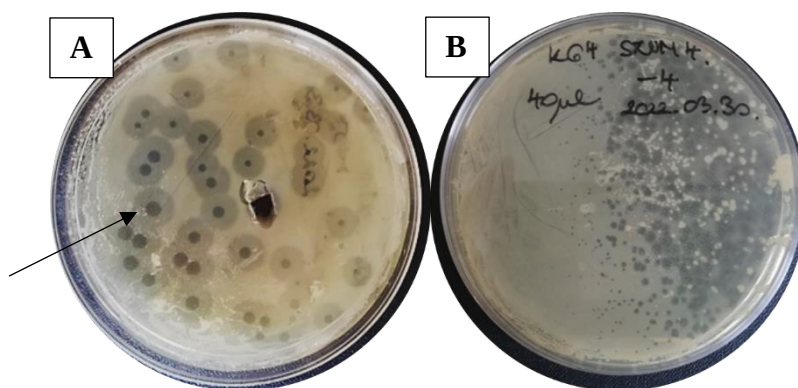
2. Bakteriofágok jelenlétének detektálása, PFU meghatározás,

Annak érdekében, hogy egyéni fágklónokhoz jussunk szükség volt a kapott bakteriofág-szuszpenziók tisztítására. Ehhez első körben fáguszuszenziók titerének meghatározására volt szükségünk. A fágok titerét 1 ml térfogatra határoztuk meg. Több minta esetében is mutatkozott

magas fág-titer, azonban a legmagasabb értékeket (10^9 PFU/ml) a 3-as, illetve 4-es szuszpenzió esetében kaptuk. Ezért ebből a két mintából végeztük a további tisztításokat top agaros módszerrel.

3. Fágklónok több lépcsős tisztítása

Miután végig vittük a 3-as illetve a 4-es mintából a 3 körös tisztítási folyamatot két karakteresen elkülönülő fágtörzset kaptunk, melyeket „Kp_K64_3_2”-nek és „Kp_K64_4_2”-nek neveztünk el. A „Kp_K64_3_2” diffuzibilis tok depolimerázzal rendelkezik (9. ábra), amely a feltisztulási zóna körül egy homályos kört alkot. A „Kp_K64_4_2” plakkjai körül ilyen feltisztulási zóna nem figyelhető meg. A tisztítási folyamat végén a két törzs szuszpenziója stabilan tartotta a 10^9 PFU/ml értéket, ami stabilitásukra utal, másrészt könnyíti a velük végzett későbbi munkákat.

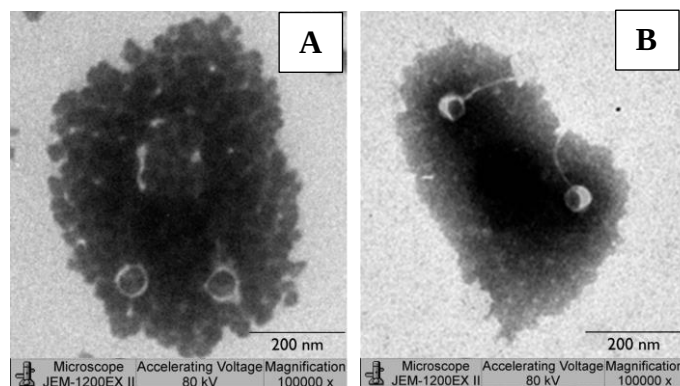


9.Ábra: (A): Kp_K64_3_2 plakkok a top-agaron. Jól látható a feltisztulási zónákat körülvevő vastag halo-zóna (nyíl); (B): Kp_K64_4_2 plakkok top-agaron. Jellemző a kisebb feltisztulási zóna, halo-zóna nem mutatkozik. (saját fotók)

4. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat

A bakteriofágok morfológiai jellemzését transzmissziós elektronmikroszkóppal valósítottuk meg. A kapott képek alapján a fágok legtöbbször jó eséllyel besorolható. Az elektronmikroszkópos vizsgálat eredményeként a Kp_K64_3_2 a *Podoviridae* víruscsaládba, illetve a *Caudovirales* rendbe, vagyis a farkos bakteriofágok közé tartozik. A megközelítőleg 60 nm átmérőjű feji régió mellett ez a fág egy nagyon rövid farki régióval is rendelkezik (ICTV, 2023). A másik fág ezzel ellentétben hosszú, flexibilis farki régióval és szintén egy megközelítőleg 60 nm-es átmérőjű feji résszel rendelkezik, ennek alapján szintén a

Caudovirales rendbe tartozóként azonosítottuk, a hosszú farki régió pedig a renden belül a *Siphoviridae* fágok jellemzője (10. ábra).



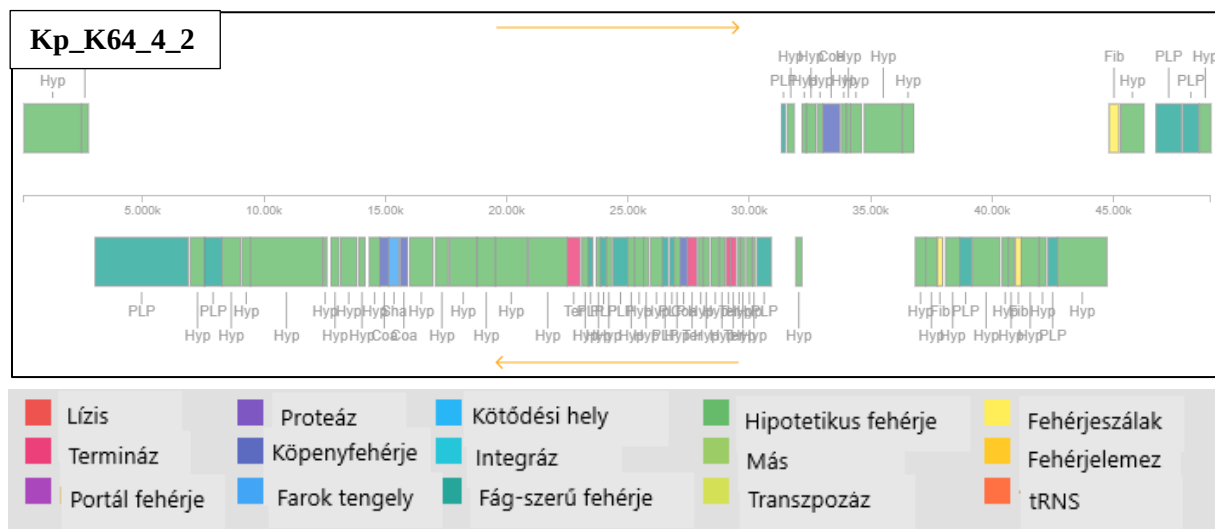
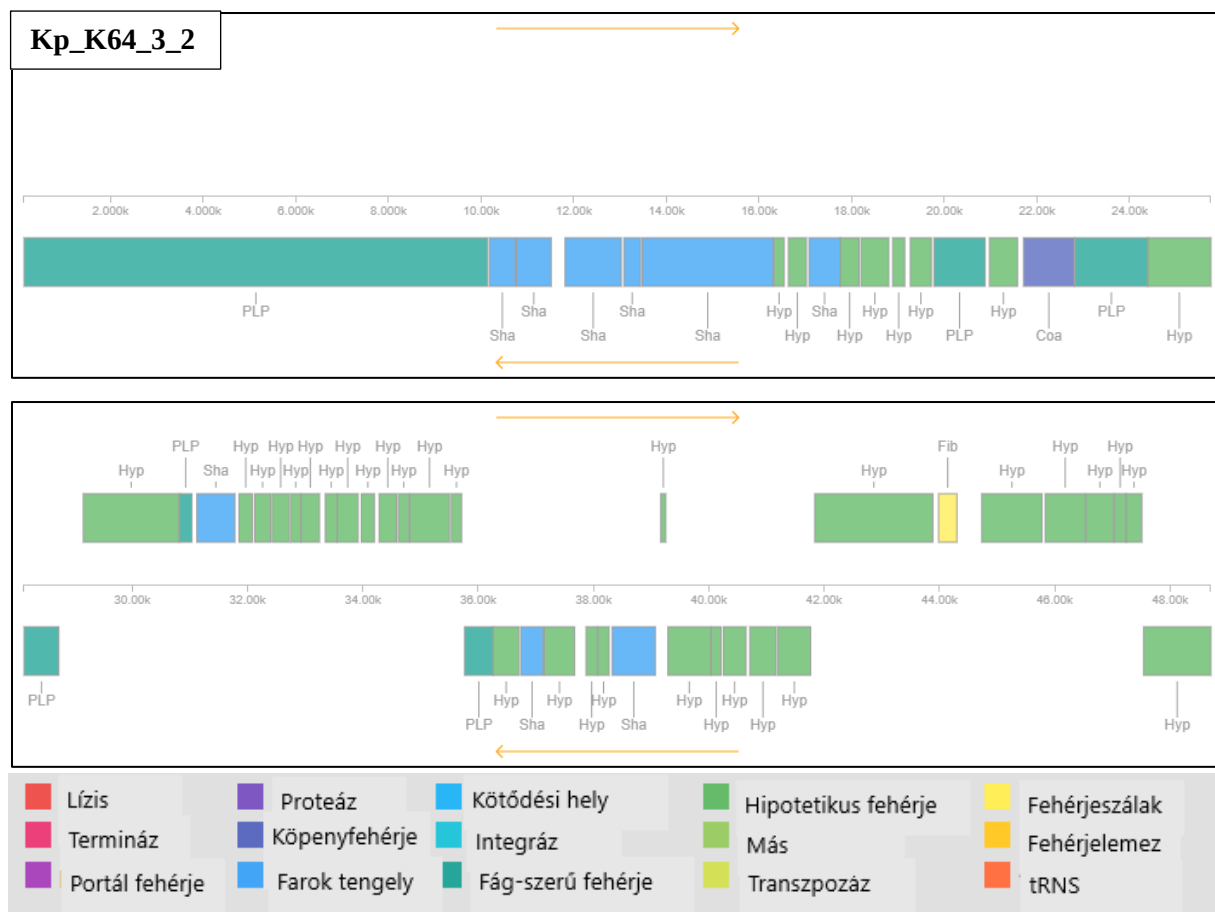
10. Ábra: (A): A *Podoviridae* családba tartozó Kp_K64_3_2-es és (B): a *Siphoviridae*-hez tartozó Kp_K64_4_2-es bakteriofág virionok. (saját felvétel)

5. Bakteriofágok genomikai analízise

A fágokból történt DNS kivonást követően a genetikai anyagukat megszekvenáltuk, majd elemeztük. A Kp_K64_3_2-es genom 48709 bázispárból áll és G+C tartalma 57,97%. Míg a Kp_K64_4_2-es esetében 49717 bp méretű míg G+C tartalma 50,31%. A CLC Sequence Viewer v.8 (CLC bio, Aarhus, Denmark) lehetővé tette számunkra a RAST szerveren történt annotált a genomok alaposabb gén szintű analízisét. A Kp_K64_3_2 esetében 80, míg a 4_2 esetében 59 open reading frame-t (ORF) különíthetünk el. Ezekből a 3_2-nél 20 a pozitív szálon, míg 60 a negatív szálon íródik át. A 4_2-nél 23 íródik át a pozitív szálon és 36 a negatívra.

A genommal kapcsolatos alapvető ismeretek megszerzését követően az NCBI adatbázisában homológia-elemzést végeztünk, hasonló fággenomokkal. A homológia-elemzés során olyan ORF régiók által kódolt fehérjék funkcióira is fény derült, amelyek azelőtt ismeretlenek voltak. Az ORF-eket ezután funkció szerint klaszterekbe rendeztük, majd ezeket színnel jelöltük (11.-12. ábrák).

Mindkét vírus esetében azt tapasztaltuk, hogy a genom első néhány ORF régiója kódolja a fágok struktúrfehérjéit, illetve azok „összeszereléséért” felelős enzimeket. A struktúrfehérjék között sikeresen azonosítottuk a feji régiót burkoló kapszid-fehérjéket, illetve a farki régiót felépítő elemeket, melyek végéhez kapcsolódó fehérjeszálak a fág gazdasejtbe való bejutását teszik lehetővé. Szakirodalmi adatok szerint ezen fehérjeszálak tartalmazzák az esetek többségében a tok depolimeráz enzimeket (Knecht és mtsai., 2020).



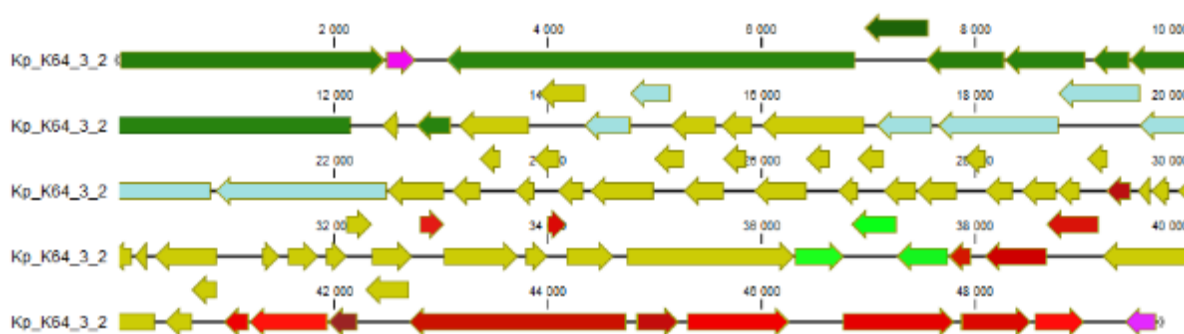
A struktúrfehérjéket, összeszerelő fehérjéket és chaperonokat mindkét fágban a kiszabadulásért felelős fehérjék követték. Mindkét fág esetében jelen volt a holin, endolizin és spanin enzim is.

Az utóbbiak szerepe nem a baktériumsejt lízisében, és ezzel az újonnan termelődött fágpartikulumok kijutásában van, ahol is a holin egy pórusformáló enzim, az endolizin a peptidoglukán sejtfalet bontó enzim, míg a spanin membránrétegeket emésztő enzim (Young, 2014). Mindkét genomban azonosításra kerültek továbbá DNS-replikációért, valamint annak modifikálásáért felelős enzimek (pl. primáz, helikáz, egyszálú DNS-t kötő fehérjék (SBP)). A különböző funkciójú fehérjékre és az azokat kódoló ORF-régiókra hivatott egy-két példát bemutatni a következő táblázat:

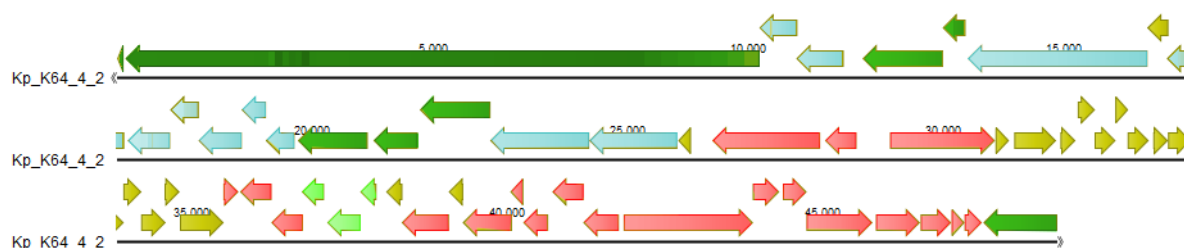
1. Táblázat: A két fág-genom összehasonlítása egy-egy ORF régión és az általa kódolt fehérjén keresztül. Késsel kiemelten egy-két struktúrfehérje, illetve azok összeszerelő elemei vannak feltüntetve. Narancssárgával a kiszabadulásért felelős fehérjék, pirossal a DNS-replikációért felelős fehérjék, valamint zölddel a potenciális tok depolimeráz enzimek vannak feltüntetve. (saját szerkesztés)

Kp_K64_3_2		Kp_K64_4_2	
Pozíció	Kódolt fehérje	Pozíció	Kódolt fehérje
ORF4	Farki régió összeszereléséért felelős fehérje (tail assembly protein)	ORF	Farki régió összeszereléséért felelős fehérje (tail assembly protein)
ORF5	kis farki régió	ORF5	kis farki régió
ORF22	Termináz nagy alegysége	ORF19	Termináz -nagy alegység
ORF23	Termináz kis alegysége	ORF22	Termináz – kis alegység
ORF62	potenciális spanin	ORF38	potenciális endolizin
ORF63	potenciális endolizin	ORF39	potenciális Rz-szerű spanin
ORF64	potenciális holin	ORF40	potenciális holin
ORF74	DNS helikáz	ORF51	DNS helikáz
ORF76	Primáz	ORF49	Primáz
ORF80	Potenciális tok depolimeráz	ORF59	Potenciális tok depolimeráz

További kutatásaink szempontjából érdekes a gyaníthatóan tok depolimerázt kódoló enzimeket kódoló gének szerepe, mivel azoknak kulcsfontosságú szerepe van a fertőzés sikerességében. Ezek az enzimek a különböző fág-törzsek között nagyban eltérnek egymástól (*Pertics és mtsai.*, 2021). Ezért azonosításuk a rendelkezésre álló adatok limitáltsága miatt nehézkes. A véletlen úgy hozta, hogy a mindkét fág esetében szekvenciáik végén, illetve elején voltak megszakadva ezen gének. A fággenom két végén megtalálható hipotetikus fehérjékre szintén homológia elemzést végeztünk az NCBI adatbázisban (BLASTn). Az NCBI honlapján végzett homológia elemzés során valószínűsíthettük, hogy ezek a potenciális depolimerázokat kódoló szekvenciák, melyek közül a potenciális profág endo-N-neuraminidáz (*Klebsiella michigensis*) 54%-os egyezést mutatott a Kp_K64_3_2 második ORF régiójával. Ugyanennek a fágnek a genomjában utolsóként elhelyezkedő 80. ORF régió 61,54%-os egyezést mutatott a *Klebsiella* fág BMac depolimeráz enzimével (13. ábra). A Kp_K64_4_2 esetében a genom első és utolsó génszakaszai 100%-os egyezést mutattak egy endoszialidáz enzimkomplex chaperon alegységével. Ugyanennél a fág nál a genom második ORF régiójával 88%-os egyezést fedeztünk fel egy szénhidrátkötő-domént tartalmazó fehérjével, ami feltehetően depolimeráz aktivitású (13. ábra).



13. Ábra: A Kp_K64_3_2 bakteriofág genomtérképe, melyen sötétzölddel a fág struktúrféhérjéket, sárgával az ismeretlen funkciójú fehérjéket; világos kékkel a fág összeszerelésért felelős fehérjéit; pirossal a DNS-replikáció, illetve fehérjeszintézisért felelős fehérjéit; világos zölddel a kiszabadulásért felelős fehérjéit és végül rózsaszínnel a potenciális depolimeráz enzimeket kódoló szekvenciákat tüntettük fel. (v.8 CLC Sequence Viewer)



14. Ábra: A Kp_K64_4_2 bakteriofág genomtérképe, melyen sötétzölddel a fág struktúrfehérjéket, sárgával az ismeretlen funkciójú fehérjéket; világos kékkel a fág összeszerelésért felelős fehérjéit; pirossal a DNS-replikáció, illetve fehérjeszintézisért felelős fehérjéit; világos zölddel a kiszabadulásért felelős fehérjéit és végül rózsaszínnel a potenciális depolimeráz enzimeket kódoló szekvenciákat tüntettük fel. (v.8 CLC Sequence Viewer)

V. Diszkusszió

A dolgozatomban jellemzett két bakteriofágot a K64-es toktípussal rendelkező *K. pneumoniae* referencia törzs (CIP80.47) ellen izoláltuk. Ennek jelentősége, hogy az ezzel a toktípussal rendelkező *K. pneumoniae* izolátumok epidemiológiai jelentőséggel bírnak. (Eckstein és mtsai., 2021) Az előbb említett szerotípus által okozott fertőzések az eddigi irodalmi adatok alapján főleg Észak-Afrikára, illetve Ázsia egyes pontjaira koncentrálódnak. Viszont az a tény, hogy minden egyes általunk vizsgált szennyvízminta tartalmazott lítikus bakteriofágot a K64-es toktípusú *K. pneumoniae*-vel szemben, alátámasztja ennek a toktípusnak a széles elterjedtségét a hazai környezetben is. Ennek jelentősége abban áll, hogy (i) lévén a *K. pneumoniae* izolátumok közt az antibiotikum rezisztencia géntranszfer révén hatékonyan képes megvalósulni; (ii) továbbá a K64-es toktípussal rendelkező *K. pneumoniae* izolátumok potenciális kórokozók az irodalmi adatok alapján; és (iii) a *K. pneumoniae* esetében felettébb hatékony a géntranszfer révén történő antibiotikum rezisztencia felvétel. Ezen tények azt sugallják, hogy a közel jövőben hazai viszonylatban is várható a rezisztensebb K64-es toktípussal rendelkező MDR *K pneumoniae* izolátumok megjelenése, amelyet tovább fokoz a pánrezisztens afrikai és ázsiai törzsek behurcolásának várható végbemenetele is.

A fentiek tudatában célunk volt olyan hatékony bakteriofágok izolálása, melyek ezen toktípust hatékonyan képesek felismerni és a kórokozót eliminálni.

A két vizsgált fág (Kp_K64_3_2 és Kp_K64_4_2) már plakk morfológia alapján eltér egymástól. A Kp_K64_3_2 esetében a plakk körül egy karakteres halo-zóna volt

megfigyelhető, míg a Kp_K64_4_2 ez nem volt látható. Ennek magyarázata a diffuzibilis tok depolimeráz termelésének képessége vagy éppen annak hiánya.

Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálataink határozott morfológiai különbségeket tártak fel a két izolált törzs fágjai között. Ennek alapján nagy valószínűséggel a Kp_K64_3_2 a *Podoviridae*, míg a Kp_K64_4_2 a *Siphoviridae* családba tartozik. A két fenti eredményünk megerősíti azt a korábbi megfigyelést, hogy a diffuzibilis depolimeráz enzim termelés és így a halo-zóna kialakulása a *Podoviridae* család karakterjegye (Knecht és mtsai., 2020).

A két újonnan izolált fágon végzett genetikai elemzésekkel kimutattuk, hogy habár a fontos fág struktúrgének mindkét esetben megvannak, de az egyes funkciókat kódoló szekvenciák jellege és sorrendje eltér. Mindkét bakteripofágban sikerült azonosítani azon génszakaszt, mely a poliszacharid depolimeráz enzim teremtéséért tehető felelőssé.

Korábbi szakirodalomban leírták, hogy a tok depolimeráz enzimek sikeresen alkalmazhatók biofilmek gyengítésére és ezzel a baktériumok sebezhetővé tehető az immunrendszer vagy egyéb detergenszek számára és potenciális alapjai lehetnek új típusú antimikrobás szereknek.

A közeljövőben tervezzük a két azonosított depolimeráz enzim expresszióját és alaposabb funkcionális analízisét. A depolimerázok biotechnológiai módosítása alkalmassá teheti őket egy komplettebb, de még hatékony molekulaszervezet eléréséhez, vagy esetleg több tok típus bontására képes hibridmolekulák létrehozására. Emellett nem elhanyagolható az esetleges diagnosztikai felhasználásuk sem, hiszen a jelenlegi *K. pneumoniae* tok sztereotipizálása felettébb költséges.

VI. Jövőbeni tervek

A jövőben folytatni kívánjuk a két fág törzs jellemzését, amely egyrészt más szekvenált fágokkal való rokonsági fok kiderítésére koncentrálni, valamint hatásspektrum vizsgálatokat tervezünk végezni eltérő tok típusal rendelkező *K. pneumoniae* izolátumokon. Meg kívánjuk továbbá vizsgálni annak lehetőségét is, hogy állatkísérletes modellben alkalmazhatók-e a fágok terápiás vagy prevenciós célzattal.

Emellett a tok depolimerázok funkcionális analízisét is tervezzük elvégezni.

VII. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet nyilvánítani témavezetőmnek, Dr. Schneider Györgynek, aki rengeteg útmutatással és hasznos tanáccsal látott el a pályamunka megírása során, nélküle nem születhetett volna meg ez a dolgozat. Továbbá szeretném megköszönni belső konzulensemnek, Dr. Pollák Editnek, aki szintén sok hasznos tanáccsal látott el. Köszönet illeti a Nemzeti Népegészségügyi Központ Közegészségügyi Laboratóriumi Főosztály, Környezetegészségügyi Laboratóriumi Osztály, Vízhigiénés szakmai terület kedves munkatársait: Dr. Varga Mártát, Dr. Khayer Bernadettet és Dr. Róka Esztert, hogy biztosították számunkra a szennyvízmintákat, melyekből a bakteriofágokat izoláltuk. Köszönöm a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai- és Immunitástani Intézetének kedves munkatársainak, akik szintén hozzájárultak munkám elkészüléséhez. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni páromnak, barátaimnak és családomnak a támogatásukat. A projekt az Európai Bizottság támogatásával valósulhatott meg (Projektazonosító: 060701/2021/864479/SUB/ENV.C2)

VIII. Irodalomjegyzék

- Batinovic, Wassef, Knowler, Rice, Stanton, Rose, Tucci, Nittami, Vinh, Drummond, Sobey, Chan, Seviour, Petrovski, & Franks. (2019). Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. *Pathogens*, 8(3), 100. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>
- Besemer, J. (2001). GeneMarkS: A self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research*, 29(12), 2607–2618. <https://doi.org/10.1093/nar/29.12.2607>
- Bogovazova, G. G., Voroshilova, N. N., & Bondarenko, V. M. (1992). *Immunobiological properties and therapeutic effectiveness of preparations from Klebsiella bacteriophages. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. <https://europepmc.org/article/med/1380753>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (é. n.). *Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America*.
- Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C. W., Hertveldt, K., & Lavigne, R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages ?KZ and EL. *Molecular Microbiology*, 65(5), 1334–1344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05870.x>
- Chopra, I., Schofield, C., Everett, M., O'Neill, A., Miller, K., Wilcox, M., Frère, J.-M., Dawson, M., Czaplewski, L., Urleb, U., & Courvalin, P. (2008). Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: A consensus statement. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(2), 133–139. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70018-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70018-5)
- Doore, S. M., & Fane, B. A. (2016). The microviridae: Diversity, assembly, and experimental evolution. *Virology*, 491, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.01.020>

- Eckstein, S., Stender, J., Mzoughi, S., Vogele, K., Kühn, J., Frieze, D., Bugert, C., Handrick, S., Ferjani, M., Wölfel, R., Millard, A., Ben Moussa, M., & Bugert, J. J. (2021). Isolation and characterization of lytic phage TUN1 specific for *Klebsiella pneumoniae* K64 clinical isolates from Tunisia. *BMC Microbiology*, 21(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02251-w>
- Eklund, C., & Wyss, O. (1962). ENZYME ASSOCIATED WITH BACTERIOPHAGE INFECTION. *Journal of Bacteriology*, 84(6), 1209–1215. <https://doi.org/10.1128/jb.84.6.1209-1215.1962>
- El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., & Bakour, R. (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 61(5), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.10.004>
- Follador, R., Heinz, E., Wyres, K. L., Ellington, M. J., Kowarik, M., Holt, K. E., & Thomson, N. R. (2016). The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microbial Genomics*, 2(8). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073>
- Gill, J. J. (2011, december 7). *Phage genomic DNA extraction*. https://openwetware.org/wiki/Gill:Phage_genomic_DNA_extraction
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>
- Horváth, M., Kovács, T., Koderivalappil, S., Ábrahám, H., Rákhely, G., & Schneider, G. (2020). Identification of a newly isolated lytic bacteriophage against K24 capsular type, carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Scientific Reports*, 10(1), 5891. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62691-8>

- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2023, január 17). *Current ICTV Taxonomy Release*. <https://ictv.global/taxonomy>
- Knecht, L. E., Veljkovic, M., & Fieseler, L. (2020). Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2949. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02949>
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Szerk.), *Bacteriophages* (Köt. 501, o. 69–76). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7
- Kropinski, A., & Twest, R. (2009). *Bacteriophage Enrichment from Water and Soil*. 501, 15-21.
- Latka, A., Maciejewska, B., Majkowska-Skrobek, G., Briers, Y., & Drulis-Kawa, Z. (2017). Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3103–3119. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8224-6>
- Oechslin, F. (2018). Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses*, 10(7), 351. <https://doi.org/10.3390/v10070351>
- Pan, Y.-J., Lin, T.-L., Chen, C.-C., Tsai, Y.-T., Cheng, Y.-H., Chen, Y.-Y., Hsieh, P.-F., Lin, Y.-T., & Wang, J.-T. (2017). Klebsiella Phage ΦK64-1 Encodes Multiple Depolymerases for Multiple Host Capsular Types. *Journal of Virology*, 91(6), e02457-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02457-16>
- Penziner, S., Schooley, R. T., & Pride, D. T. (2021). Animal Models of Phage Therapy. *Frontiers in Microbiology*, 12, 631794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631794>
- Pertics, B. Z., Cox, A., Nyúl, A., Szamek, N., Kovács, T., & Schneider, G. (2021). Isolation and Characterization of a Novel Lytic Bacteriophage against the K2 Capsule-

- Expressing Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain 52145, and Identification of Its Functional Depolymerase. *Microorganisms*, 9(3), 650.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030650>
- Schwarzer, D., Buettner, F. F. R., Browning, C., Nazarov, S., Rabsch, W., Bethe, A., Oberbeck, A., Bowman, V. D., Stummeyer, K., Mühlenhoff, M., Leiman, P. G., & Gerardy-Schahn, R. (2012). A Multivalent Adsorption Apparatus Explains the Broad Host Range of Phage phi92: A Comprehensive Genomic and Structural Analysis. *Journal of Virology*, 86(19), 10384–10398. <https://doi.org/10.1128/JVI.00801-12>
- Squeglia, F., Maciejewska, B., Łątka, A., Ruggiero, A., Briers, Y., Drulis-Kawa, Z., & Berisio, R. (2020). Structural and Functional Studies of a *Klebsiella* Phage Capsule Depolymerase Tailspike: Mechanistic Insights into Capsular Degradation. *Structure*, 28(6), 613-624.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.04.015>
- Stachurska, X., Roszak, M., Jabłońska, J., Mizieleńska, M., & Nawrotek, P. (2021). Double-Layer Agar (DLA) Modifications for the First Step of the Phage-Antibiotic Synergy (PAS) Identification. *Antibiotics*, 10(11), 1306.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10111306>
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage Therapy. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.*, 45.
- van Duin, D., & Paterson, D. L. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria in the Community. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 377–390.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>
- Vu Thi Ngoc, B., Brisse, S., Dao Tuyet, T., Vu Tien Viet, D., Holt, K. E., Nguyen Vu, T., Tran Thi Kieu, H., Nguyen Thi Ngoc, D., van Doorn, H. R., & Wertheim, H. F. L. (2021). *Klebsiella pneumoniae* with capsule type K64 is overrepresented among

invasive disease in Vietnam. *F1000Research*, 10, 454.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.52799.1>

Yan, J., Mao, J., & Xie, J. (2014). Bacteriophage Polysaccharide Depolymerases and Biomedical Applications. *BioDrugs*, 28(3), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s40259-013-0081-y>

Young, R. (2014). Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *Journal of Microbiology*, 52(3), 243–258. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>

Zhang, S., Yang, G., Ye, Q., Wu, Q., Zhang, J., & Huang, Y. (2018). Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Retail Foods in China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00289>