

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Bojana STEVOVIĆ

IZOLACIJA IN OPIS BAKTERIOFAGOV BAKTERIJE
Staphylococcus epidermidis

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Bojana STEVOVIĆ

IZOLACIJA IN OPIS BAKTERIOFAGOV BAKTERIJE *Staphylococcus epidermidis*

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Staphylococcus epidermidis* BACTERIOPHAGES

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Centru odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo, v Laboratoriju za bioanalitiko.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Tomaža Accetta, za somentorja dr. Matjaža Peterko in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Tomaž Accetto
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Matjaž Peterka
 Center odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo, Center za biotehnologijo

Članica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Bojana Stevović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 602.3:578.347:578.825(043.2)
KG	<i>Staphylococcus epidermidis</i> /odpornost proti antibiotikom/fagna terapija/bakteriofagi/Siphoviridae/Myoviridae/Podoviridae/izolacija
AV	STEVOVIĆ, Bojana
SA	ACCETTO, Tomaž (mentor)/PETERKA, Matjaž (somentor)
KZ	SI – 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2015
IN	IZOLACIJA IN OPIS BAKTERIOFAGOV BAKTERIJE <i>Staphylococcus epidermidis</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XI, 75, [6] str., 17 preg., 26 sl., 6 pril., 102 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p><i>Staphylococcus epidermidis</i> je oportunistični patogen, ki zaradi naraščajoče odpornosti proti antibiotikom povzroča težave v zdravstvu. Eno od alternativnih metod obvladovanja okužb s to bakterijo predstavlja tudi fagna terapija, pri kateri gre za uporabo naravnih sovražnikov bakterij – bakteriofagov oziroma fagov. Cilj te magistrske naloge je bil izolirati za <i>S. epidermidis</i> specifične fage in te opisati z različnimi metodami. Iz različnih vzorcev smo uspešno izolirali 21 fagov, katerim smo določili lastnosti, kot je morfologija virionov, nabor gostiteljev, način razmnoževanja in ocenili velikosti njihovega genoma. Glede na njihove lastnosti smo jih lahko razvrstili v nekaj skupin in določili v katero filogenetsko družino spadajo. Enega izmed njih smo namnožili, izolirali njegovo DNK in jo poslali na sekvenciranje. S pomočjo celotnega nukleotidnega zaporedja DNK našega faga smo pridobili veliko zanesljivih informacij o njegovi filogeniji, dobili smo vpogled v organiziranost njegovega genoma in ga lahko primerjali z drugimi poznanimi bakteriofagi stafilokokov. Z eksperimentalnim delom smo potrdili delovne hipoteze in dosegli cilje, ki smo si jih zastavili. Zaključimo lahko, da nam je uspelo izolirati bakteriofage, specifične za seve <i>S. epidermidis</i>, ki smo jih imeli na voljo. Metoda izolacije fagov je bila očitno uspešna in bi potencialno lahko pripomogla k pridobivanju fagov, zanimivih za fagno terapijo in druge tipe aplikacij.</p>

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 602.3:578.347:578.825(043.2)
CX *Staphylococcus epidermidis*/antibiotic resistance/phage therapy/
bacteriophages/ Siphoviridae/Myoviridae/Podoviridae/isolation
AU STEVOVIĆ, Bojana
AA ACCETTO, Tomaž (supervisor)/PETERKA, Matjaž (co-advisor)
PP SI – 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Study of Biotechnology
PY 2015
TI ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Staphylococcus*
epidermidis BACTERIOPHAGES
DT M. Sc Thesis (Master Study Programmes)
NO XI, 75, [6] p., 17 tab., 26 fig., 6 ann., 102 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Staphylococcus epidermidis* is an opportunistic pathogen known for causing nosocomial infections, which are particularly challenging because of antibiotic resistant strains. One of the most promising alternatives in a fight with antibiotic-resistant bacteria such as *S. epidermidis* is phage therapy, where bacteriophages (or phages) are used to treat and prevent bacterial infections. The aim of this Master's thesis was the isolation and characterization of *S. epidermidis* specific bacteriophages. We successfully isolated 21 phages and determined their virion morphology, host range, type of reproduction and assessed their genome sizes. Based on newly found characteristics we were able to determine to which phylogenetic family our phages fall under. One of the phages' DNA was isolated and sequenced. Its nucleotide sequence gave us reliable information about phylogeny, genome organization and similarity with other known bacteriophages. We confirmed our hypotheses by experimental work and a conclusion is we successfully isolated bacteriophages specific for our *S. epidermidis* strains. Our methods for phage isolation were efficient and could potentially contribute to the production of phages for phage therapy as well as for other types of applications.

KAZALO VSEBINE

Str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN IN CILJI DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	3
2.1.1 Lastnosti <i>S. epidermidis</i>	3
2.1.2 Epidemiologija in patogeneza <i>S. epidermidis</i>	4
2.1.3 Virulentni faktorji <i>S. epidermidis</i>	4
2.1.4 Odpornost <i>S. epidermidis</i> proti antibiotikom.....	5
2.1.5 Inovativne metode obvladovanja okužb z bakterijo <i>S. epidermidis</i>	6
2.2 BAKTERIOFAGI	6
2.2.1 Klasifikacija bakteriofagov.....	7
2.2.2 Bakteriofagi bakterij rodu <i>Staphylococcus</i>	7
2.2.2.1 Morfologija	7
2.2.2.2 Življenjski cikel bakteriofagov	8
2.2.2.3 Genetika.....	10
2.2.2.4 Drugi pristopi klasifikacije za stafilokoke specifičnih bakteriofagov	12
2.2.3 Izolacija bakteriofagov, specifičnih za <i>S. epidermidis</i>	13
2.3 FAGNA TERAPIJA.....	14
2.4 UPORABA BAKTERIOFAGOV V DRUGIH TIPIH APLIKACIJ	15
2.4.1 Fagna tipizacija.....	15
2.4.2 Bakteriofagi kot senzorji za prepoznavanje patogenih bakterij	16
2.4.3 Uporaba bakteriofagov za odstranjevanje in preprečevanje nastanka biofilmov	16

2.4.4 Uporaba fagnih encimov	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Bakterijski sevi	17
3.1.2 Komercialni pripravki bakteriofagov	17
3.1.3 Gojišča, pufri in reagenti	17
3.1.4 Seznam ostalih kemikalij, dodatkov in pripomočkov	19
3.1.5 Seznam laboratorijskih pripomočkov	20
3.1.6 Seznam laboratorijske opreme	20
3.2 METODE DELA	20
3.2.1 Revitalizacija bakterij in priprava delovne banke <i>S. epidermidis</i>	21
3.2.2 Ugotavljanje rastne krivulje štirih sevov <i>S. epidermidis</i>	21
3.2.3 Izolacija bakterij <i>S. epidermidis</i>	22
3.2.4 Opis izoliranih sevov	22
3.2.4.1 Izolacija bakterijske DNK	22
3.2.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase Chain Reaction, PCR</i>) za gen 16S rRNK in sekvenciranje gena	22
3.2.4.3 Potrditveni test API STAPH	23
3.2.5 Priprava plošč s konfluentno rastjo bakterij (angl. <i>bacterial lawn</i>) za delo z bakteriofagi	23
3.2.6 Preverjanje prisotnosti profagnih sekvenc	24
3.2.6.1 PCR za intergazo in druge bakteriofagne gene	24
3.2.7 Izolacija bakteriofagov	26
3.2.7.1 Spot assay	26
3.2.7.2 Indukcija profagov z mitomicinom C – izolacija lizogenih bakterofagov	26
3.2.7.3 Izolacija bakteriofagov iz vzorca odpadnih voda in obogatitev (angl. <i>enrichment</i>)	27
3.2.7.4 Izolacija za <i>S. epidermidis</i> specifičnih fagov iz komercialnega pripravka	27
3.2.7.5 Izolacija bakteriofagov s pomočjo sterilnih vatiranih palčk	27
3.2.7.6 Spiranje nosne votline s fiziološko raztopino in vzorčenje človeškega znoja	28
3.2.8 Postopek čiščenja bakteriofagov	28
3.2.9 Namnoževanje fagov, ugotavljanje titra in priprava delovne banke izoliranih bakteriofagov	28
3.2.10 Fiziološka in morfološka karakterizacija bakteriofagov	29

3.2.10.1	Priprava mrežic za presevno elektronsko mikroskopijo (TEM)	29
3.2.10.2	Ugotavljanje nabora gostiteljev	29
3.2.10.3	Ugotavljanje litičnosti/lizogenosti bakteriofagov	29
3.2.11	Genetska karakterizacija bakteriofagov	30
3.2.11.1	Izolacija bakteriofagne DNK v agaroznih blokcih	30
3.2.11.2	Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju ter ocena velikosti genomov.....	30
3.2.11.3	Cepitev fagne DNK z restrikcijskimi endonuklazami v agaroznih blokcih	31
3.2.11.4	Izolacija bakteriofagne DNK s fenol-kloroformno ekstrakcijo	31
3.2.11.5	Pomnoževanje gena za integrizo in druge bakteriofagne gene	32
3.2.12	Pregled vseh ugotovljenih lastnosti izoliranih fagov	32
3.2.13	Sekvenciranje genoma bakterofaga v in bioinformacijska analiza sekvence .	32
4	REZULTATI	34
4.1	RASTNA KRIVULJA ŠTIRIH SEVOV <i>S. epidermidis</i>	34
4.2	IZOLACIJA BAKTERIJ <i>S. epidermidis</i>	35
4.2.1	Barvanje po Gramu	36
4.3	DOLOČANJE IN POTRJEVANJE IDENTITETE SEVOV	37
4.3.1	Izolacija bakterijske genomske DNK in sekvenciranje pomnožkov PCR gena 16S rRNK	37
4.3.2	Izris filogenetskega drevesa	38
4.3.3	Potrditveni test API STAPH	39
4.4	PRIPRAVA PLOŠČ S KONFLUENTNO RASTJO SEVOV ZA DELO S FAGI	39
4.5	PREVERJANJE PRISOTNOSTI PROFAGOV	40
4.6	IZOLACIJA, ČIŠČENJE BAKTERIOFAGOV TER OPIS MORFOLOGIJE NJIHOVIH PLAKOV	42
4.6.1	Izolacija bakteriofagov iz odpadnih voda po obogatitvi na kliničnih izolatih .	42
4.6.2	Izolacija bakteriofagov iz komercialnih pripravkov bakteriofagov Enkophage in Intestiphage	42
4.6.3	Poskus izolacije bakteriofagov iz kože in nosne votline pomočjo sterilnih vatiranih palčk	43
4.6.4	Izolacija bakteriofagov iz vzorca spiranja nosne votline s fiziološko raztopino in vzorca znoja - z in brez obogatitve vzorcev na sevih SeC1 in SeV1	43

4.7	TITER NAMNOŽENIH BAKTERIOFAGOV IN PRIPRAVA DELOVNE BANKE IZOLIRANIH BAKTERIOFAGOV	44
4.8	FIZIOLOŠKA IN MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGOV.....	44
4.8.1	Velikost plakov.....	44
4.8.2	Presevna elektronska mikroskopija (TEM)	45
4.8.3	Nabor gostiteljev	46
4.8.4	Lizogenost oziroma litičnost bakteriofagov	47
4.9	GENETSKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGOV	47
4.9.1	Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE</i>) in ocena velikosti genomov	48
4.9.2	Cepitev bakteriofagne DNK v agaroznih blokcih z restriktionskimi endonukleazami	50
4.9.3	PCR za integrizo in druge bakteriofagne gene	51
4.9.4	Zbrani podatki za vse izolirane bakteriofage.....	54
4.10	DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA BAKTERIOFAGA V IN BIOINFORMACIJSKA ANALIZA SEKVENCE	56
5	RAZPRAVA	60
5.1	DELO Z BAKTERIJAMI <i>S. epidermidis</i>	60
5.2	IZOLACIJA BAKTERIOFAGOV, SPECIFIČNIH ZA SEVE <i>S. epidermidis</i>	61
5.3	FIZIOLOŠKA IN MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGOV	62
5.4	GENETSKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGOV	63
5.4.1	Cepitev genomske DNK bakteriofagov v agaroznih blokcih.....	64
5.4.2	Verižna reakcija s polimerazo za integrizo in druge bakteriofagne gene	64
5.4.3	Pregled lastnosti izoliranih bakteriofagov.....	65
5.5	DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA BAKTERIOFAGA V	65
6	SKLEPI	67
7	POVZETEK	68
8	VIRI	69
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz morfologije bakteriofagov reda Caudovirales; levo – Siphoviridae, sredina – Myoviridae, desno – Podoviridae (ViralZone, 2012)	8
Slika 2: Prikaz modularne organizacije genoma po družinah bakteriofagov (Deghorain in Van Melderden, 2012).	11
Slika 3: Predstavitev mrežnih sorodstvenih odnosov med bakteriofagi devetih skupin glede na njihov proteom (Deghorain in Van Melderden, 2012).....	13
Slika 4: Rastna krivulja 4 sevov <i>S. epidermidis</i> v paralelkah (CFU/ml).....	34
Slika 5: Rastna krivulja 4 sevov <i>S. epidermidis</i> v paralelkah (OD 600 nm)	35
Slika 6: Slike po Gramu pobarvanih sevov	36
Slika 7: Izolirana DNK sevov, ki smo jih izolirali in kliničnih sevov.....	37
Slika 8: Očiščen PCR pomnožek za gen 16S rRNK bakterij	37
Slika 9: Del filogenetskega drevesa rodu <i>Staphylococcus</i> z izoliranimi sevi (13).....	38
Slika 10: Primer rezultata biokemijskega testa API STAPH, kot ga izpiše program Apiweb	39
Slika 11: Pomnoževanje gena za integrazo z začetnima oligonukleotidoma Intphi5-1 in Intphi 5-2 (660 bp).....	40
Slika 12: Pomnoževanje gena za integrazo z začetnima oligonukleotidoma Intphi7-1 in Intphi 7-2 (470 bp).....	41
Slika 13: Pomnoževanje za bakteriofage specifičnih sekvenc z začetnimi oligonukleotidi (od zgoraj navzdol) SGA 1 in 2 (744 bp), SGB 1 in 2 (405 bp) in SGF 1 in 2 (155 bp)	41
Slika 14: Razlike v velikosti plakov	45
Slika 15: Fag a – izolacija fagov iz odpadnih voda, fag b – izolacija fagov iz komercialnega pripravka, fag m – izolacija fagov iz spiranja nosne votiline.....	45
Slika 16: Primerjava plošč po obeh metodah plakov - kulturi na desni strani sta bili pripravljeni iz plakov plošč na levi strani.....	47
Slika 17: Izolacija bakteriofagne DNK v agaroznih blokcih.....	48
Slika 18: PFGE z DNK izoliranih bakteriofagov	49
Slika 19: Razdalja prepotovanih fragmentov v odvisnosti od njihovih velikosti z izračunano enačbo funkcije, s pomočjo katere smo določili velikost genomov izoliranih fagov	49
Slika 20: Cepitev fagne DNK z encimom <i>HindIII</i>	50
Slika 21: Cepitev fagne DNK z encimom <i>HindIII</i> (ponovitev).....	51
Slika 22: Analiza obeh slik restrikcije fagne DNK z encimom <i>HindIII</i> – za vsako elektroforezno liso je pobarvana določena celica preglednice.....	51
Slika 23: DNK bakteriofagov, izolirana s pomočjo fenol-kloroformne ekstrakcije in redčitve Lambde DNK za oceno koncentracij DNK izoliranih fagov	52
Slika 24: Pomnoževanje gena za integrazo z začetnima oligonukleotidoma Intphi5-1 in Intphi5-2 (660 bp)	52
Slika 25: Pomnoževanje gena za integrazo z začetnima oligonukleotidoma Intphi7-1 in Intphi7-2 (470 bp)	53
Slika 26: Pomnoževanje 4 bakteriofagnih genov	54

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Začetni nabor sevov <i>S. epidermidis</i>	17
Preglednica 2: Reakcijska mešanica PCR za odsek 16S rRNA	23
Preglednica 3: Reakcijska mešanica PCR	25
Preglednica 4: Reakcijska mešanica PCR za 3 bakteriofagne gene	26
Preglednica 5: Nabor izoliranih bakterij z opisom morfologije kolonij	35
Preglednica 6: CFU/ml kultur, pripravljenih po 3. protokolu za plošče s konfluentno rastjo sevov	39
Preglednica 7: Bakteriofagi, izolirani iz vzorcev odpadnih voda po obogatitvi	42
Preglednica 8: Bakteriofagi, izolirani iz vzorcev komercialnih pripravkov bakteriofagov	43
Preglednica 9: Bakteriofagi, izolirani iz vzorcev spiranja nosne votline in znoja	44
Preglednica 10: Opis morfologije bakteriofagov	46
Preglednica 11: Nabor gostiteljev izoliranih bakteriofagov	47
Preglednica 12: Podatki o standardu za izračun enačbe funkcije (levo) ter izračunane velikosti genomov (desno) s pomočjo enačbe iz slike 19	50
Preglednica 13: Preglednica lastnosti izoliranih bakteriofagov	55
Preglednica 14: Splošne lastnosti genoma bakteriofaga v	56
Preglednica 15: Seznam genov in proteinov faga v z njihovo predvideno funkcijo	57
Preglednica 16: Primerjava bakteriofaga v z drugimi <i>Staphylococcus</i> bakteriofagi v obliki preglednice za nukleotidna zaporedja	58
Preglednica 17: Primerjava bakteriofaga v z drugimi <i>Staphylococcus</i> bakteriofagi v obliki preglednice za aminokislinska zaporedja	59

SEZNAM PRILOG

- Priloga A: Protokol za ekstrakcijo DNK bakteriofagov
- Priloga B: Podatki merjenj optične gostote (OD 600nm) in CFU/ml bakterij (povprečja triplikatov)
- Priloga C: Slika biokemijskih testov API STAPH
- Priloga D: Podatki o številu plakov in izračun titra (PFU/ml) bakteriofagov ter formula za izračun PFU/ml
- Priloga E: Seznam izoliranih bakteriofagov z določenim titrom in volumnu po namnoževanju
- Priloga F: Fotografije vseh izoliranih bakteriofagov (TEM)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMP	protimikrobní peptidi (angl. <i>antimicrobial peptide</i>)
BHI	tekoče gojišče možgansko-srčni infuzijski bujon (angl. <i>Brain Heart Infusion</i>)
CFU	število kolonijskih enot (angl. <i>Colony Forming Units</i>)
CoNS	koagulaza-negativni stafilocoki (angl. <i>Coagulase-Negative Staphylococci</i>)
dH ₂ O	destilirana voda
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	Deoksinukleotidtrifosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FDA	Zvezni urad za živila in zdravila (angl. <i>Food and Drug Administration</i>)
gDNA	genomska deoksiribonukleinska kislina
LBA	Laboratorij za bioanalitiko
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>)
NCBI	Nacionalni center za biotehnoško informacijo (angl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NIB	Nacionalni inštitut za biologijo
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
PFU	plakotvorne enote (angl. <i>Plaque Forming Units</i>)
RNaza	Ribonukleaza
SDS	natrijev lavrilsulfat
SM	solno-magnezijev pufer
TBE	pufer Tris-borova kislina-EDTA
TE	pufer Tris-EDTA
TEM	presevna elektronska mikroskopija (angl. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TSA	trdno gojišče (angl. <i>Tryptone-Soya Agar</i>)
TSB	tekoče gojišče (angl. <i>Tryptone-Soya Broth</i>)
TTC	2,3,5 trifenil-tetrazolijev klorid
% GC	odstotek baz, ki ga predstavljajo gvanini in citozini

1 UVOD

Antibiotiki so v široki uporabi že več kot pol stoletja in predstavljajo eno najučinkovitejših orožij v boju s patogenimi bakterijami. Vendar postaja obvladovanje nevarnih patogenih bakterij iz desetletja v desetletje večji izziv zaradi naraščajoče odpornosti proti antibiotikom. Ugotovili so, da je več kot 70 % patogenov odpornih proti vsaj enemu izmed antibiotikov, ki so v splošni uporabi. Pojav odpornosti so opazili pravzaprav že nekaj let po odkritju penicilina v štiridesetih letih prejšnjega stoletja, saj so odkrili seve bakterije *Staphylococcus aureus*, ki so bili sposobne rasti v prisotnosti antibiotika. Prav patogeni stafilokoki predstavljajo v medicini vse resnejšo težavo zaradi pojave odpornosti proti antibiotikom ozkega spektra, kot je meticilin, v zadnjem času pa so opazili tudi seve, odporne proti vankomicinu (Drugs - FDA, 2011).

Ena izmed težavnih stafilokokov je tudi *Staphylococcus epidermidis*, na katero smo se osredotočili v okviru magistrske naloge. *S. epidermidis* je sicer del naravne mikrobiote na človeški koži in sluznici, vendar je tudi oportunistični patogen, znan po težavah, ki jih povzroča v medicini (Vos in sod., 2009). Poglavitni virulentni faktor teh bakterij je proizvodnja biofilma, saj bakterijam omogoča trdno pritrditev na tkiva gostitelja ali umetne materiale. Zaradi svoje sestave pa prispeva tudi k odpornosti na protimikrobna sredstva, saj ovira njihovo difuzijo do celic (Otto, 2008).

Naraščajoča odpornost bakterij proti antibiotikom, ki se je razvila kot posledica prepogoste uporabe le-teh, je razlog za razvoj novih protibakterijskih učinkovin in pristopov. Bakteriofagi so virusi, ki specifično prepoznajo in okužijo bakterije ter predstavljajo obetavno alternativo antibiotikom (t.i. fagna terapija). Bakteriofagi ali kraje fagi imajo zelo učinkovito bakteriocidno delovanje in številne prednosti pred drugimi antimikrobnimi sredstvi. Sposobni so razmnoževanja znotraj infektivnih bakterij, pri čemer uporabljajo njihov metabolism. Njihova pomembna prednost pa je relativno preprosta izolacija in prisotnost v okoljih, kjer se nahaja njihov gostitelj. Raziskave na tem področju zaenkrat niso pokazale nobenega resnega stranskega učinka fagne terapije, zato bakteriofagi ostajajo iz aplikativnega vidika zelo zanimivi (Sulakvelidze in Kutter, 2005).

Prvi korak k uporabi bakteriofagov kot antimikrobnih učinkovin je podrobno poznavanje in razumevanje njihove fiziologije, genetike in morfologije. S tem ciljem smo tudi mi izolirali nove bakteriofage, specifične za bakterijo *S. epidermidis*, in jih z različnimi metodami poskusili opisati, razlikovati med seboj in jih primerjati z že znanimi fagi.

1.1 NAMEN IN CILJI DELA

Prvi cilj magistrskega dela je bil uspešna izolacija za *Staphylococcus epidermidis* specifičnih bakteriofagov iz različnih okolij. S tem namenom smo vzorčili v okoljih, kjer smo pričakovali to bakterijo, saj smo predvidevali, da se tam nahajajo tudi zanke specifični bakteriofagi. Drugi cilj je bil opis pridobljenih fagov na morfološkem, fiziološkem in genetskem nivoju. Namen je bil ugotoviti raznolikost med pridobljenimi fagi in njihova uvrstitev med že znane fage, specifične za rod *Staphylococcus*. Pred karakterizacijo je bil namen bakteriofage namnožiti do kar se da visokega titra in si pripraviti delovno banko za delo z njimi.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo postavili naslednje hipoteze:

- Bakteriofagi, specifični za *S. epidermidis* se nahajajo v okoljih, kjer se njihov gostitelj lahko podvojuje
- Izolirani bakteriofagi bodo morfološko podobni že poznam
- Izolirani bakteriofagi se bodo med seboj razlikovali na genetskem nivoju in litičnem spektru

2 PREGLED OBJAV

V tem poglavju je zbran pregled literature v obsegu, ki je potreben za razumevanje eksperimentalnega dela.

2.1 BAKTERIJE RODU *Staphylococcus*

Stafilocoki so rod po Gramu pozitivnih bakterij, znotraj katerega ločimo več kot 30 vrst. Njihovo ime nakazuje, da gre za kroglaste bakterije oziroma koke, ki se združujejo v skupke; rastejo pa tudi posamezno, v parih ali v kratkih verižicah. V naravi so razširjeni in jih lahko najdemo v različnih okoljih, med drugim predstavlajo del naravne mikrobne združbe epitelija ljudi in toplokrvnih živali ter njihovih sluznic. Za človeka so pomembni predvsem zato, ker so nekatere vrste patogene in povzročajo vnetja, težavo pa predstavlajo tudi zastrupitve s hrano zaradi stafilokoknih toksinov (Madigan in sod., 2010; Vos in sod., 2009).

Vrste znotraj rodu *Staphylococcus* v grobem ločujemo v dve skupini, in sicer v koagulaza-pozitivne (angl. *Coagulase-Positive Staphylococci*) in koagulaza-negativni stafilokoki (angl. *Coagulase-Negative Staphylococci*, CoNS), torej glede na sposobnost proizvodnje encima koagulaza, ki zaradi reakcije s protrombinom povzroča strjevanje krvi. V prvo skupino spada najbolj znan predstavnik rodu - *S. aureus*, pomemben človeški in živalski patogen, ki zaradi svoje naraščajoče odpornosti proti antibiotikom predstavlja velik problem v zdravstvu (Greenwood in sod., 1998).

Najbolj znan predstavnik koagulaza-negativnih stafilokokov je *S. epidermidis*, oportunistični patogen, na katerega sem se osredotočila v okviru svoje magistrske naloge. Podobno kot *S. aureus* je tudi *S. epidermidis* znan predvsem po tem, da povzroča težko obvladljive bolnišnične okužbe zaradi specifičnih virulentnih faktorjev.

2.1.1 Lastnosti *S. epidermidis*

S. epidermidis so negiblji in nesporogeni koki, velikosti 0,8 – 1 µm. Tako kot ostale vrste tega rodu rastejo posamično, v parih, verižicah ali skupkih. Njihove kolonije so sive, krem ali bele barve, gladke in svetleče. Lahko izločajo sluz in postanejo lepljive s staranjem kulture. So fakultativni anaerobi, vendar najbolje rastejo v aerobnih pogojih. Rastejo v širokem temperaturnem območju, in sicer od 15 do 45 °C, z optimumom od 30 do 37 °C. So odporni proti visokim koncentracijam soli, saj preživijo tudi pri 10 % NaCl in nizki vrednosti vodne aktivnosti (Vos in sod., 2009; Greenwood in sod., 1998).

Glavna ekološka niša *S. epidermidis* so človeška koža, žleze lojnica in sluznica, najbolje raste na delih telesa, kjer je več vode in hranilnih snovi, npr. nosna votlina, pazduhe, dimlje in prostor med nožnimi prsti (Vos in sod., 2009). Ugotovili so, da je prisotnost *S. epidermidis* v človeški nosni votlini hospitaliziranih oseb odvisna od *S. aureus*; med njima velja antagonistična povezava – *S. aureus* zavira rast *S. epidermidis* in obratno. V nosnih votlinah zdravih oseb pa močno prevladuje *S. epidermidis* v primerjavi z *S. aureus*. Kaj preprečuje *S. aureus* poselitev nosnih votlin zdravih oseb še ni popolnoma jasno (Frank in sod., 2010; Lina in sod., 2003). *S. epidermidis* najdemo tudi na koži domačih živalih ter recimo na vimenih krav, kjer lahko povzroči mastitis (Thorberg in sod., 2009).

2.1.2 Epidemiologija in patogeneza *S. epidermidis*

Do okužb z *S. epidermidis* prihaja preko medicinskih delavcev oziroma bolnikov samih ali pa preko okuženih katetrov in medicinskih vsadkov. Ta bakterija povzroča različne vrste vnetij, na primer vnetje kardiovaskularnega tkiva, vnetje oči po operacijah, lokalna vnetja na mestu medicinskega vsadka, vnetja pri opeklinah in večjih ranah ter mastitis pri ženskah. V hujših primerih lahko pride tudi do meningitisa in sepse. Simptomi okužbe z bakterijo *S. epidermidis* so povišana telesna temperatura, glavobol, bolečina na mestu vnetja in nastanek gnojne tekočine (Vuong in Otto, 2002; Delagado in sod., 2009). Ogroža predvsem ljudi z oslabljenim imunskim sistemom, majhne otroke in starostnike ter ljudi z vstavljenimi implantati (Greenwood in sod., 1998).

Največjo težavo predstavlja v ortopediji, kjer se soočajo z relativno visoko stopnjo okužb s to bakterijo, predvsem preko medicinskih vsadkov (Greenwood in sod., 1998). Ugotovili so, da več kot 75 % vseh kliničnih izolatov iz področja ortopedije predstavljajo stafilokoki, od teh 35,1 % pripada *S. aureus*, *S. epidermidis* pa je na drugem mestu z 29,9 %, vendar število okužb s *S. epidermidis* v primerjavi s *S. aureus* narašča (von Eiff in sod., 2006; Montanaro in sod., 2011). Raziskave so pokazale tudi, da pride do okužbe s *S. epidermidis* veliko pogosteje v primerih, kjer je bil v bolnika vstavljen implantat. Te bakterije namreč tvorijo specifične vezi z vstavljenim materialom, nastali biofilm pa je zaradi svoje narave odporen proti antibiotičnim preparatom (Montanaro in sod., 2011).

Okužbe z *S. epidermidis* zdravijo z antibiotiki, vendar je to zaradi naraščajoče odpornosti velikokrat neuspešno. V primeru ko gre za medicinski vsadek, je potrebno le-tega odstraniti in obrezati vneto tkivo ali kost, kar seveda občutno podaljša zdravljenje pacienta (Toms in sod., 2006). V medicini je uporaba implantatov vse pogostejša, zaradi česar je tudi vse več po-operativnih zapletov – v svetu več milijonov letno, ki so posledica okužbe z *S. epidermidis* ali *S. aureus* (Mack in sod., 2004).

2.1.3 Virulentni faktorji *S. epidermidis*

S. epidermidis pogosto najdemo na človeškem telesu, vendar je v večini primerov saprofit in povzroči bolezenska stanja le v redkih primerih. Za razliko od *S. aureus* *S. epidermidis* ne proizvaja množice toksinov, prav tako ne proizvaja encima koagulaze, ki je navadno povezan s patogenezo (Madigan in sod., 2010). Pravzaprav proizvaja *S. epidermidis* le en toksin – delta toksin, poznan tudi kot PSM γ , ki je močno hidrofobni polipeptid s sposobnostjo tvorbe por v celicah gostitelja, zaradi katerih pride do lize. Ta toksin aktivira človeški prirojeni in pridobljeni imunski sistem, povezujejo pa ga tudi z boleznijsko nekrotizirajočega enterokolitisa pri novorojenčkih (Cogen in sod., 2010; Mehlin in sod., 1999; Otto, 2009).

Med virulentne faktorje *S. epidermidis* spadajo tudi njegovi zunajcelični encimi, na primer lipaze, cisteinske proteaze, metaloproteaze, na primer proteaza SepA, ki sodeluje pri razgradnji gostiteljevih protimikrobnih peptidov (angl. *antimicrobial peptide*, AMP) (Otto, 2009). Najpomembnejši virulentni faktor *S. epidermidis* pa je vsekakor tvorba biofilma, ki je kompleksen in dobro reguliran proces. Poglavitni sestavnici del biofilma so proteini,

zunajcelična DNK (angl. *extracellular DNA*, eDNA¹) in eksopolimeri, kot sta teihonska kislina in poli-N-acetylglukozamin (PNSG), ki zamrežijo in zaščitijo bakterijske celice. Bakterije pa poleg sestavnih delov služi izločajo še vrsto encimov (avtolizini in adhezini) in druge biološke molekule, ki z vezavo na fibronektin, elastin in proteine matriksa pripomorejo k vzpostavitvi biofilma. Sestava in struktura zunajceličnega matriksa oziroma služi je tista, ki celice trdno pritrdi na podlago (gostiteljeve celice ali hidrofobni umetni material) in jih ščiti pred zunanjimi vplivi, kot so gostiteljev imunski sistem, antibiotiki in dezinfekcijska sredstva. Prav zaradi te sposobnosti je *S. epidermidis* tako uspešen patogen (Vuong in Otto, 2002; Montanaro in sod., 2011).

2.1.4 Odpornost *S. epidermidis* proti antibiotikom

Proti meticilinu odporni *S. aureus* (angl. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) je verjetno najbolj znan bolnišnični patogen, ki ima razvito odpornost proti večini znanih antibiotikov in je hkrati odporen tudi proti antibiotiku meticilinu, ki je včasih predstavljal učinkovito orožje proti *S. aureus* (MRSA, 2014). Odpornost proti antibiotikom pa je pogosta tudi pri *S. epidermidis*. Ugotovili, da je več kot 80 % kliničnih sevov, izoliranih iz vnetij pacientov z implantati, odpornih proti meticilinu in tudi proti drugim antibiotikom. Za razliko od kliničnih so ne-klinični sevi navadno občutljivi na antibiotike (Ziebuhr in sod., 2006, Kozitskaya in sod., 2004). Arciola in sodelavci so preverjali občutljivost 342 kliničnih sevov proti 16 različnim antibiotikom. Rezultati so pokazali, da je približno 10 % vseh sevov občutljivih za vse testirane antibiotike, veliko sevov pa je bilo odpornih proti večjem številu antibiotikov. Proti beta-laktamskim antibiotikom, kot sta penicilin in ampicilin, je bilo odpornih več kot 80 % testiranih, medtem kot je bilo pri antibiotikih, kot je eritromicin, odpornih 41 % sevov. Odpornosti proti vankomicinu – ki se največkrat uporablja za zdravljenje okužb z *S. epidermidis* – pa niso zaznali (Arciola in sod., 2005).

Odpornost proti antibiotikom je sicer v veliki meri posledica mutacij in izmenjave genetskega materiala med sevi, vendar do neučinkovitosti antibiotikov prihaja tudi zaradi povsem fizične ovire, ki jo predstavlja biofilm. V odvisnosti od sestave biofilma, ta omejuje difuzijo protimikrobnih učinkovin do celic. Drugi razlog tega, da so celice znotraj biofilma bolj odporne, je njihova organiziranost. Vsaj nekatere izmed celic so izpostavljene pomankanju hranil, zato rastejo zelo počasi ali pa sploh ne. Celice z nizko metabolno aktivnostjo pa so veliko manj občutljive za antibiotike, zato je heterogenost celic v biofilmu pomembna strategija preživetja (Costerton in sod., 1999; Gilbert in sod., 1990).

Neučinkovitost antibiotikov predstavlja resen problem, ki ga zaenkrat obvladujejo predvsem z uporabo vankomicina in nekaterih novejših antibiotikov, bakterije pa sčasoma postajajo vse teže obvladljive in vse bolj odporne (Greenwood in sod., 1998).

¹ Zunajcelična DNK prispeva k tvorbi biofilma in je podobna genomski DNK, vendar izvira iz lize majhne subpopulacije bakterij. Do lize celic pride zaradi avtolizina AtlE. Zunajcelična DNK ima pomembno vlogo tudi pri širivju virulentnih genov in genov za odpornost proti antibiotikom (Molin in Tolker-Nielsen, 2003)

2.1.5 Inovativne metode obvladovanja okužb z bakterijo *S. epidermidis*

Staphylococcus epidermidis povzroča največ težav v primerih, ko je v bolnika vstavljen medicinski vsadek, torej nek tuj, umeten material, kot je na primer osrednji venski kateter, srčni spodbujevalnik ali ortopedski vsadek. Z namenom preprečevanja okužb morajo biti vsi vstavljeni materiali sterilni, kar je relativno lahko doseči z uporabo vodikovega peroksida. To je eden od najučinkovitejših načinov za uničenje celic na površini materialov, prav tako se je z njim mogoče uspešno znebiti že nastalega biofilma. Težava je pa v tem, da je peroksid toksičen in draži kožo (Presterl in sod., 2007).

Ena od možnosti preprečevanja okužb je razvoj materialov, ki bakterijam preprečuje tvorbo biofilma, kot so na primer vsadki, prevlečeni z antimikrobnim sredstvom ali pa materiali, ki bakterijam preprečujejo vezavo nanje (Montanaro in sod., 2011). Takšne materiale razvija tudi nanotehnologija; razvili so na primer implantate iz titanovega dioksida, pri katerih so na nanocevke vezali nanodelce srebra, in takšen implantat omogoča dolgotrajno protibakterijsko delovanje. V raziskavi so ugotovili, da tovrstne nanocevke preprečujejo nastanek biofilma vsaj 30 dni po vstavitvi². Poleg tega takšna sestava uniči tudi bakterijsko suspenzijo okoli vsadka (Zhao in sod., 2011). Biomateriali, prevelečeni z antibiotiki, so v medicini sicer že dolgo del standardne opreme in imajo pomembno vlogo pri preprečevanju in zdravljenju bakterijskih okužb, vendar se pojavlja vprašanje, kakšen je njihov doprinos k širjenju antibiotične odpornosti (Campoccia in sod., 2010).

Na voljo so še drugačne možnosti preprečevanja okužb z *S. epidermidis*. Tvorbo biofilma bi lahko ti bakteriji preprečili s predhodnim cepljenjem; idealno cepivo bi že v začetnih fazah okužbe induciralo tvorbo pacientovih specifičnih protiteles, ki bi prepoznavala značilne bakterijske molekule, kot so recimo bakterijski adhezini ali pa zunajcelični polisaharidi. Vendar je prav iskanje primernega antigena zaradi raznolikosti sevov zelo težavno, zato cepiva proti stafilokoknim zaenkrat še ni voljo (Montanaro in sod., 2011). Omenila bi še metodo, pri kateri bi utišali virulentne gene bakterij s pomočjo protismiselnih molekul, ki bi jih uvedli s pomočjo peptidnih nukleinskih kislin (angl. *peptide nucleic acids*, PNAs). Takšen princip ima sicer kar nekaj omejitev, glavna težava pa je omejen dostop teh molekul do patogena zaradi njegove zunanje membrane (Arciola, 2009; Good in sod., 2001; Montanaro in sod., 2011).

Ena od metod, ki veliko obeta na tem področju, je vsekakor uporaba bakteriofagov – naravnih sovražnikov bakterij. Prav tako bi bilo mogoče uporabiti le nekatere njihove dele oziroma encime, ki – tako kot bakteriofagi sami – delujejo zelo specifično in imajo veliko prednosti. Več o bakteriofagih in njihovih encimih bom opisala v nadaljevanju magistrske naloge.

2.2 BAKTERIOFAGI

Bakteriofagi so virusi, ki napadajo bakterije in so iz vidika delovanja ekosistema in kroženja ogljika zelo pomembni, saj dnevno uničijo ogromno število bakterij. So najštevilčnejša entiteta na Zemlji (Haq in sod., 2012). Njihovo število je ocenjeno na

² Za srebrove nanodelce je znano, da se kopijo v bakterijski membrani in s tem povečajo na njeno prepustnost, hkrati pa tudi sprožijo nastanek hidroksilnih radikalov v bakterijskih celicah, kar vodi do celične smrti (Hwang in sod., 2012)

desetkratnik števila bakterij (10^{30}), torej okrog 10^{31} . Najdemo jih lahko v najrazličnejših ekoloških nišah, oziroma povsod tam, kjer se nahajajo njihovi gostitelji - v vodi, v tleh, v zraku, na rastlinah in živalih (Travis, 2003; Cuervo in Carrascosa, 2012). Bakteriofagi oziroma krajše fagi igrajo tudi ključno vlogo pri bakterijski evoluciji in adaptaciji (Deghorain in Van Melderen, 2012).

Odkrili so jih v začetku dvajsetega stoletja in že takrat so se raziskovalcem zaradi njihovih lastnosti zdeli zanimivi kot možno orožje proti patogenim bakterijam. Po odkritju antibiotikov je zanimanje zanje, oziroma za njihovo uporabo kot protimikrobnne učinkovine, upadlo. Bakteriofage so ponovno začeli proučevati z razvojem molekularne genetike v petdesetih letih prejšnjega stoletja. Raziskave na bakteriofagih so na tem področju veliko doprinesle, fagi pa še vedno predstavljajo pomembno raziskovalno orodje. Vse od pojava odpornosti patogenih bakterij proti antibiotikom so fagi postali ponovno zanimivi kot protimikroben sredstvo (t.i. fagna terapija), pa tudi za uporabo v drugačnih aplikacijah, ki so opisane v nadaljevanju (Clark in March, 2006).

Bakteriofagi so - kot vsi ostali virusi - popolni paraziti. Nimajo lastnega metabolizma in ribosomov za izdelavo proteinov, zato pa njihov genski material vsebuje zapis za usmerjanje lastnega metabolizma, za kar izkoriščajo svojega gostitelja. Navadno so zelo specifični, saj je njihovo razmnoževanje lahko omejeno le na nekaj sevov. V primeru, da ni prisotnega primernega gostitelja, lahko bakteriofagi ohranijo sposobnost razmnoževanja desetletja, razen če so poškodovani zaradi zunanjih dejavnikov (Calendar, 1988).

2.2.1 Klasifikacija bakteriofagov

Mednarodni komite za taksonomijo virusov (angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) je bakteriofage razdelil v en red (Caudovirales) in trinajst družin glede na njihove morfološke in genetske lastnosti. Večina bakteriofagov (več kot 96 %) ima rep in spada v eno izmed treh družin reda Caudovirales: Siphoviridae, Myoviridae in Podoviridae, v ostale družine pa spadajo filamentozni, pleiomorfni in polihedralni fagi (Ackermann, 2003).

2.2.2 Bakteriofagi bakterij rodu *Staphylococcus*

Bakteriofagi, ki okužujejo bakterije rodu *Staphylococcus* so relativno dobro raziskani zaradi problematičnega patogena tega rodu – *S. aureus*. Proučevali so jih ne le z namenom razvoja protimikrobnega sredstva, ampak tudi zato, ker fagi zaradi prenosa genetskega materiala močno vplivajo na bakterijsko virulenco in patogenezo. Za fage koagulaza-negativnih vrst tega rodu, še posebej *S. epidermidis*, pa zanimanje šele narašča (Deghorain in Van Melderen, 2012). Čeprav gre za fage, ki okužujejo bakterije različnih vrst, so fagi *S. aureus* in *S. epidermidis* velikokrat opisani skupaj. Razlog tega je v visoki stopnji sorodnosti med vrstama, posledično pa si njihovi fagi delijo veliko lastnosti.

2.2.2.1 Morfologija

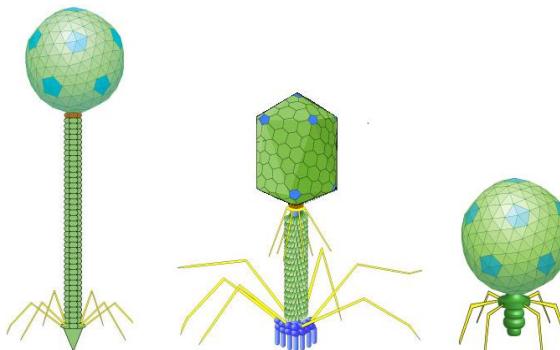
Vsi znani bakteriofagi, ki okužujejo *S. epidermidis*, se uvrščajo v red Caudovirales: Za te je značilno, da imajo na glavo pritrjeno specializirano proteinsko strukturo – rep, ki je odgovoren za prepoznavo in infekcijo gostiteljeve celice. Nekateri bakteriofagi imajo na koncu repa še nogice ali pa druge fiksacijske strukture, ki sodelujejo pri prvem stiku z

gostiteljem. Svoj genetski material – dvojno vijačno linearno DNK – imajo obdan s proteinskim plaščem, ki je navadno ikozaedrične oblike. Ta proteinski plašč se imenuje kapsida, kar predstavlja glavo bakteriofaga (Curevo in Carrascosa, 2012; Ackermann, 2009).

Večina opisanih fagov, ki okužujejo stafilokoke, se uvršča v družino Siphoviridae. Za te je značilen dolg, tanek in nekontraktilen rep (130 – 400 nm), ki je najbolj preprost med vsemi. Navadno je fleksibilen in sestavljen iz diskov iz šestih podenot, na koncu repa se nahaja kratka filamentozna struktura ter štiri daljše nogice, ki izraščajo subterminalno. Njihove glave so v povprečju premera 60 nm, ikozaedrične oblike iz 72 kapsomer, lahko pa so tudi podolgovate oblike. Najbolj znan predstavnik te družine je bakteriofag Lambda, ki okužuje bakterijo *Escherichia coli* (Ackermann, 2009; Virus taxonomy, 2013; ViralZone, 2012; Ackermann, 1998).

Za fage družine Myoviridae je značilen rep, ki se lahko krči – je kontraktilen. Začne se z vratom in nadaljuje s strukturo, sestavljenou iz centralne cevi in plašča - več obročastih proteinskih podenot v vijačni obliki. Njihov rep je relativno širok in dolg (140 – 220 nm v dolžino pri T4-podobnih fagih), ob krčenju pa rep postane krajiš in debelejši, saj podenote plašča zdrsnejo ena preko druge. Ta mehanizem omogoča, da pride centralna cev bakteriofaga v stik bakterijsko membrano, torej sodeluje pri infekciji gostitelja. Na koncu repa se navadno nahaja 6 terminalnih struktur – nogic in struktura imenovana 'base plate'. V primerjavi z drugimi družinami imajo miovirusi večje glave (50 – 110 nm v premeru) in naj bi bili bolj občutljivi za osmotski in temperaturni šok. Znotraj poddružin in rodov se ti fagi razlikujejo, najbolj značilna in raziskana predstavnika pa sta faga T4 in Twort (Ackermann, 2009; Virus taxonomy, 2013; ViralZone, 2012).

Podoviridae imajo kratek rep, ki je nekontraktilen. Velikost njihovega repa je le približno 20 nm, glava pa premera 60 nm. Imajo tudi šest terminalnih filamentov. Ti fagi naj bi bili bolj podobni sifovirusom kot miovirusom (Ackermann, 2009; Virus taxonomy, 2013; ViralZone, 2012).



Slika 1: Prikaz morfologije bakteriofagov reda Caudovirales; levo – Siphoviridae, sredina – Myoviridae, desno – Podoviridae (ViralZone, 2012)

2.2.2.2 Življenski cikel bakteriofagov

Bakteriofagi, tako kot ostali virusi, nimajo lastnega metabolizma, zato za razmnoževanje uporabljajo gostitelja. Življenski cikel bakteriofaga se prične z adsorpcijo virusnega delca na gostitelja. Začetna vezava bakteriofaga na celično steno gostiteljske celice je visoko

specifičen proces, ki je odvisen od prepozname receptorjev na površini celic, na vezavo pa vplivajo tudi različni okoljski dejavniki (pH, temperatura, prisotnost kofaktorjev,...) in fiziološko stanje gostitelja (prisotnost celičnih receptorjev) (Shojaie in Dehestani, 2010).

Sledi vnos virusnega genetskega materiala v celico. V tem koraku fagni genom preko repa (pri družini Myoviridae se ta skrči) prečka bakterijsko celično steno in membrano ter vstopi v citoplazmo. Ta proces poteče v le nekaj sekundah po adsorpciji faga in v veliki večini primerov kapsida in ostale strukture ostanejo zunaj celice (Shojaie in Dehestani, 2010).

Potek dogajanja po vstopu fagne DNK v celico, je odvisen od tipa bakteriofaga oziroma od njegovega načina razmnoževanja. Lahko poteče litični ali lizogeni cikel.

a) Litični cikel

Pri tem ciklu se najprej sintetizirajo vsi fagni proteini, med drugim tudi encimi, ki jih fagi uporabijo za lizo in razgradnjo celične stene gostiteljske celice. Ko so sintetizirane vse strukturne podenote faga, sledi proces sestavitve fagnih podenot v popolne virione. Na ta način se sestavi na stotine fagov, nato pa encimi od znotraj razgradijo peptidoglikan v celičnih stenah, kar privede do lize celic in sprostitev virionov v okolico. Če so prisotne gostiteljske celice, jih bodo ti delci inficirali in s tem je cikel sklenjen. Fage, ki se na razmnožujejo na tak način imenujejo litični oziroma virulentni bakteriofagi (Kenneth, 2012).

b) Lizogeni cikel

Bakteriofage, ki se lahko razmnožujejo tudi preko lizogenega cikla, imenujemo lizogeni ali latentni bakteriofagi. Ti lahko sprožijo tako lizogeni kot litični cikel. Pri lizogenem ciklu gre za to, da se fagna DNA vgradi na specifično mesto gostiteljevega kromosoma, tam ostane dormantna in se podvojuje skupaj z bakterijsko DNA med procesom celične delitve. Obnaša se kot preostali del genoma in se z razmnoževanjem bakterij prenaša iz generacije v generacijo. Takšno fagno DNA imenujemo profag, za gostiteljsko celico pa pravimo, da je lizogenizirana. Edini gen profaga, ki se izraža, kodira repressorsko molekulo, ta pa preprečuje sintezo ostalih fagnih proteinov in s tem zavira vstop profaga v litični cikel. V določenem trenutku, v odvisnosti od okoljskih dejavnikov ali stanja celic, se sinteza fagnega represorja ustavi ali ta postane inaktiviran in sintetizira se encim, ki izreže virusno DNA iz bakterijskega kromosoma. Izrezana DNA se nato lahko obnaša kot litični virus, ki proizvede nove virusne delce in lizira celico. Spontana derepresija je zelo redki dogodek (približno 1 na 10.000 delitev lizogenizirane bakterije), vendar zagotavlja razmnoževanje fagov. Proces vstopa lizogenega faga v litični cikel imenujemo indukcija profaga (Adams, 1959; Shojaie in Dehestani, 2010; Kenneth, 2012). Siphoviridae fag ne more inficirati bakterije, ki že ima vstavljen to njegovo profagno sekvenco, zato je tak sev odporen proti tem fagu.

Lizogenizirane bakterije se lahko zdijo enake tistim, ki profagnih sekvenc ne vsebujejo, hkrati pa je lahko prav zaradi dodatnih bakteriofagnih genov njihov fenotip spremenjen, na primer pridobitev odpornosti proti antibiotikom ali drugačni virulenčni faktorji, kar imenujemo pozitivna lizogena konverzija. V splošnem so profagne sekvence zelo

pomembne za genetsko raznolikost in preživetvene sposobnosti bakterij (Deghorain in Van Melderen, 2012; Kenneth 2012). Bakterije imajo lahko v svojem genomu tudi več profagnih sekvenc in raziskave so pokazale, da ima večina bakterij - ne le stafilokokov - v svojem genomu vsaj en profag (Goerke in sod., 2009; Canchaya in sod., 2003). Pri lizogeniziranih sevih, ki vsebujejo veliko število profagnih sekvenc, lahko prihaja do genetskih prerazporejanj in posledično nastanka fagov z drugačnimi lastnostmi, lahko pa se fagni geni vključijo med bakterijske kodirajoče sekvence in tako povzročijo utišanje gena (negativna lizogena konverzija) ali nastanek novega proteina. Bakterije profagne sekvence relativno preprosto pridobijo, vendar se zdi, da je fiksacija profagov v bakterijski genom omejena le na bakteriofagne gene, ki prispevajo k možnosti preživetja gostitelja (Canchaya in sod., 2004; Deghorain in Van Melderen, 2012).

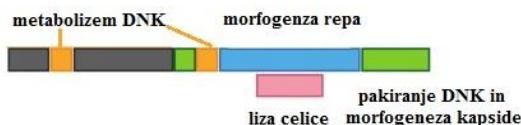
Bakteriofagne družine, ki okužujejo *S. epidermidis*, se razlikujejo tudi po načinu razmnoževanja. Za Myoviridae je značilno, da lahko vstopajo le v litični cikel, zato je ta družina iz vidika uporabnosti najbolj zanimiva. Prav tako so litični Podoviridae, za Siphoviridae pa je značilna lizogenija (ViralZone, 2012). Lastnost fagov Siphoviridae, da v določnem trenutku vstopijo v litični cikel, se namnožijo in lizirajo gostiteljske celice, izkoriščamo pri izolaciji bakteriofagov.

2.2.2.3 Genetika

Analiza velikosti genomov je pokazala, da morfološka delitev fagov v družine znotraj Caudovirales sovpada s to lastnostjo. Genomi fagov spadajo namreč v tri kategorije: majhni genomi (< 20 kb), kakršne imajo Podoviridae, srednja velikost genomov (~ 40 kb) – Siphoviridae in veliki genomi (> 125 kb), kot jih imajo Myoviridae (Kwan in sod., 2005). V genomu so kodirajoče regije pakirane tesno skupaj, med njimi je le malo intergenskih regij. Odstotek GC baznih parov je pri fagih navadno podoben gostiteljevim, pri *S. epidermidis* je to približno 32 % (Kwan in sod., 2005; *S. epidermidis* - NCBI, 2014).

Tako kot bakteriofagi, ki okužujejo druge rodove bakterij, imajo tudi za stafilokoke specifični bakteriofagi značilno, modularno organizacijo genoma. Moduli so nekakšne funkcionalne enote oziroma nabori genov, ki kodirajo določeno lastnost in se v genomu nahajajo blizu skupaj. Takšna organizacija omogoča rekombinacije znotraj vrste faga in učinkovito izmenjavo genskega materiala z drugimi fagi in njihovimi gostitelji. Za družine znotraj reda Caudovirales so značilni določeni tipi modulov in njihova organizacija (Lima-Mendez in sod., 2011; Deghorain in Van Melderen, 2012). Organiziranost modulov pri različnih družinah je prikazana na sliki 2.

Podoviridae
 velikost genoma: < 20 kb



Myoviridae
 velikost genoma: > 125 kb



Siphoviridae
 velikost genoma: ~ 40 kb



Slika 2: Prikaz modularne organizacije genoma po družinah bakteriofagov (Deghorain in Van Melderen, 2012).

Analize sekvence genomov fagov, ki okužujejo *S. aureus*, so pokazale, da se v genomih fagov družine Myoviridae nahaja več modulov in sicer za podvojevanje DNK, lizo celice, pakiranje DNK in morfogenezo kapside in mofrogenezo repa. Značilno je, da so njihovi moduli ohranjenih genov prekinjeni z dolgimi regijami, ki večinoma kodirajo gene z neznano funkcijo. Zanimivo je tudi, da so pri proučevanju strukturnih modulov ugotovili večjo podobnost (v smislu prisotnosti oziroma odsotnosti in organizacije genov) stafilokoknih Myoviridae s Siphoviridae, kot je podobnost med različnimi fagi Myoviridae, ki okužujejo različne bakterijske vrste (Deghorain in Van Melderen, 2012).

Tudi bakteriofagi družine Podoviridae imajo modularno organiziranost genoma. Poleg modulov za morfogenezo viriona in pakiranje DNK ter metabolizem DNK in lizo celic, so našli tudi module z geni, katerih funkcija še ni poznana. Za razliko od drugih družin, so pri tej moduli slabše definirani, veliko manj je tudi bralnih okvirjev (angl. *open reading frame*, ORF), kar je posledica veliko manjšega genoma. Poleg tega se geni za lizo celic in morfogenezo repa med seboj prekrivajo.

Za bakteriofage družine Siphoviridae je značilnih 5 funkcionalnih modulov: modul za lizogenijo, metabolizem DNK, pakiranje DNK z morfogenezo kapside, morfogenezo repa in lizo gostiteljeve celice. V nekaterih primerih imajo ti fagi tudi modul za virulenco, ki sledi modulu za lizogenijo ali lizo celice. Modul za lizogenijo je povezan z specifičnim načinom razmnoževanja, ki ga imajo le bakteriofagi družine Siphoviridae in jim omogoča vstavitev svojega genetskega materiala v gostiteljev genom (Deghorain in Van Melderen, 2012; Kwan in sod., 2005; Canchaya in sod., 2003).

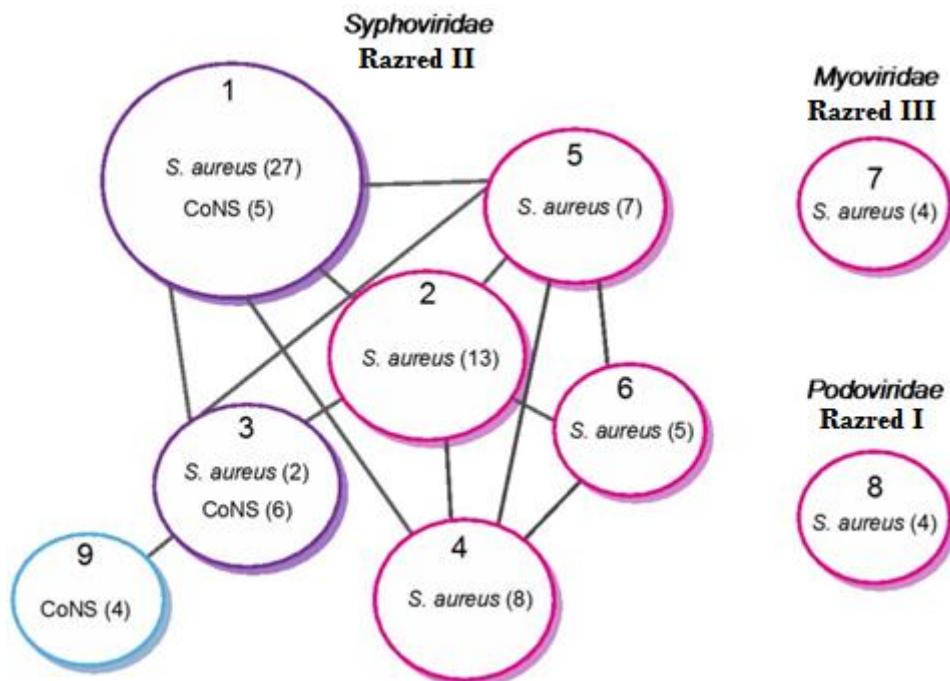
Ta lastnost bakteriofagov družine Siphoviridae je uporabna tudi za lažje odkrivanje in sekvenciranje fagnih genomov; večina objavljenih sekvenc fagov je pravzaprav profagov. Na spletu lahko najdemo več kot 70 sekvenc celotnih genomov, ki pripadajo za stafilokoke specifičnim fagom, večinoma take, ki okužujejo *S. aureus*. Večina sodi v družino Siphoviridae, nekaj pa je tudi miovirusov (Genomes Pages - Phage, 2014). Leta 2006 so objavili prvi dve sekvenci genomov, ki pripadata fagom *S. epidermidis*, z imenoma PH15 in CNPH82. Oba sodita v družino Siphoviridae (Daniel in sod., 2007). Španska skupina raziskovalcev je leta 2012 objavila sekvenci in analizi genomov za faga vB_SepiS-phiIPLA7 in vB_SepiS-phiIPLA5, ki prav tako spadata med Siphoviridae (Gutierrez in sod., 2012). Oktobra 2013 pa je bila objavljena tudi sekvencia genoma za *S. epidermidis* specifični fag SEP1 ozziroma phiIBB-SEP1, ki pa sodi v družino Myoviridae. Genetske in morfološke lastnosti nakazujejo, da ta fag spada v rod *Twort-like*, čeprav v primerjavi z drugimi predstavniki rodu, ki so bolj široko specifični, SEP1 napada le seve *S. epidermidis*. Širok nabor gostiteljev znotraj vrste, ki jih lahko okužuje, zaradi česar je zanimiv iz vidika uporabnosti – preprečevanje nastanka biofilmov v zdravstvu in kot antimikrobnna učinkovina (Melo in sod., 2014).

2.2.2.4 Drugi pristopi klasifikacije za stafilokoke specifičnih bakteriofagov

Kot že omenjeno, bakteriofage uvrščamo v red Caudovirales, večina pa jih sodi v eno izmed treh družin tega reda – Siphoviridae, Myoviridae in Podoviridae. Vendar je natančnejša klasifikacija bakteriofagov težavna zaradi modularne organiziranosti genoma. Bakteriofagi družine Siphoviridae (ki svoj genom vgradijo v genom gostitelja) si tekom razmnoževanja med seboj izmenjujejo ne le posamezne gene, ampak celotne module, zato so njihove sorodstvene vezi v mrežni povezavah v nasprotju s klasičnim filogenetskim drevesom. Za stafilokokne bakteriofage je bilo predlaganih nekaj različnih delitev, glede na njihove lastnosti. Začetni poskusi klasifikacije so se opirali predvsem na morfološke in fiziološke lastnosti, razvoj genomike in bioinformatike pa je omogočil tudi alteranativne možnosti klasifikacije fagov (Deghorain in Van Melderen, 2012). Brussow in Desiere sta na primer predlagala delitev sifovirusov glede na morfologijo njihove kapside, v dve poddružini: Sfi21-podobni fagi in Sfi11-podobni fagi. Sfi11-podobni fagi imajo dva velika proteina glave za razliko od Sfi21, ki vsebujejo le enega, poleg tega pa je le pri slednjih prisoten tudi proces proteolitičnega procesiranja tega protein (Brussow in Desiere, 2001).

Drugi pristopi za klasifikacijo teh fagov temeljijo na izbranih markerskih genih za strukturne komponente, kot je recimo gen za protein kapside, protein repa ali gen za integrizo, vendar takšne metode ne dajejo nobene informacije o mozaični strukturi genoma (Kahankova in sod., 2010). Kwan in sodelavci so poskusili za stafilokoke specifične bakteriofage klasificirati glede na njihovo velikost genoma, podobnosti na nukleotidnem in proteinskem zaporedju ter organizacijo genov. S pomočjo primerjalne genomike so jih uvrstili v tri klade (angl. clades), kasneje pa je skupina raziskovalcev po analizi dodatnih bakteriofagov *S. aureus* in *S. epidermidis* dodala še eno (Kwan in sod., 2005; Daniel in sod., 2007). Druga skupina raziskovalcev, pa je stafilokokne fage razdelila v 9 skupin (angl. clusters) na podlagi podobnosti njihovih proteomov. Skupini 7 in 8 predstavljata družini Myoviridae in Podoviridae, ostale skupine pa so sestavljene iz Siphoviridae bakteriofagov. Štiri od devetih skupin sestavljajo izključno *S. aureus* bakteriofagi, pri nekaterih drugih skupinah pa lahko opazimo očitno tesno povezavo med fagi, ki okužujejo tako *S. epidermidis* kot *S. aureus*. Fagi *S. epidermidis* spadajo v skupine 1, 3 in 9 (CoNS).

Ta delitev delno sovpada z delitvijo skupine Kwana in sodelavcev, bistvene pa so očitne mrežne sorodstvene vezi za razliko od klasičnega filogenetskega drevesa, kar je posledica modularnosti genomov (Slika 1.3) (Deghorain in Van Melderen, 2012).



Slika 3: Predstavitev mrežnih sorodstvenih odnosov med bakteriofagi devetih skupin glede na njihov proteom (Deghorain in Van Melderen, 2012).

2.2.3 Izolacija bakteriofagov, specifičnih za *S. epidermidis*

Virulentne bakteriofage pričakujemo povsod tam, kjer se nahaja tudi njihov gostitelj. Mikrookolja na in v človeškem telesu vsebujejo različne rodove in vrste bakterij, zato iz takšnih okolij lahko izoliramo zanje specifične bakteriofage (Chibani-Chennoufi in sod., 2004). V nedavni študiji so poskusili izolirati bakteriofage, specifične za *S. epidermidis*, in sicer iz vzorcev kot je mleko doječih mater (zdravih in takih, ki imajo mastitis), površine kože in izločkov sluznic. Same metode izolacij niso bile opisane, vendar so bile vse neuspešne - raziskovalcem ni uspelo izolirati bakteriofagov, sposobnih lize *S. epidermidis*. Po neuspešni direktni izolaciji so specifične bakteriofage pridobili s pomočjo profagnej indukcije (Gutierrez in sod., 2010).

Pri metodi profagnej indukcije gre za poskus spodbuditve litičnega cikla profagov, če se ti nahajajo v genomih bakterijskih sevov, torej če so bakterije lizogene. Navadno se v bakterijsko gojišče doda kemoterapevtik mitomicin C³ ali pa se indukcijo poskuša doseči z obsevanjem kulture z UV svetlobo. Zaradi spodbude iz okolja lahko prisotni lizogeni fagi vstopijo v litični cikel, povzročijo lizo gostiteljske celice in v okolico se sprosti veliko število virusnih delcev, ki jih z ustreznimi metodami lahko izoliramo, očistimo in

³ Mitomicin C je naravni kemijski agens, ki spada v skupino mitomicinov, proizvajajo pa ga streptomicete. Uporablja se kot prekurzor zdravil proti nekaterim tipom raka, deluje pa tudi protimikrobnno, saj se veže na DNK in preprečuje njen podvojevanje (Mitomycin, 2014).

namnožimo. Večina opisanih in sekvenciranih stafilokoknih bakteriofagov izhaja iz izolacije preko te metode, vendar lahko na tak način pridobimo le lizogene oziroma predstavnike Siphoviridae, ki pa iz aplikativnega vidika niso najbolj zaželeni. Direktna izolacija bakteriofagov, specifičnih za *S. epidermidis*, je prvič uspela in bila objavljena leta 2011, ko je skupini raziskovalcev uspelo izolirati litične fage – 4 fage Podoviridae in 3 fage Siphoviridae - iz nosne votline oziroma iz nosnic s pomočjo vzorčenja z vatiranimi palčkami (Aswani in sod., 2011). Fagi družine Myoviridae bakterije *S. epidermidis* so bili prvič izolirani leta 2013 iz vzorca odpadnih voda bolnišnice na Portugalskem (Melo in sod., 2014).

Sam potek izolacije virionov in čiščenja poteka enako, ne glede na to, ali so fagi lizogeni (inducirani profagi) ali litični. Tako kot pri metodi profagne indukcije kot pri direktni izolaciji, se mešanica različnih bakteriofagov nahaja v suspenziji. Pri postopku, imenovanem spot assay, opazujemo ali pride do pojava prosojnih območij (cone lize), v katerih bakterijska kultura zaradi prisotnosti litičnega faga ni mogla zrasti. Fage na tak način izoliramo in s pomočjo indikatorskega seva namnožimo (Mullan, 2001). Ob tem se pojavlja težava izolacije bakteriofagov – potrebujemo namreč primeren, na fag občutljiv bakterijski sev. Možno je namreč, da se v našem vzorcu nahajajo bakteriofagi, ki pa niso sposobni okuževati bakterij, ki jih imamo na voljo. Druge težave pri izolaciji so med drugim povezane s prenizkim številom bakteriofagov v vzorcu in občutljivostjo metode (Los in sod., 2008).

Za natančnejši opis in uvrstitev v pripadajočo družino izoliranega bakteriofaga so potrebne analize morfologije viriona (pregled vzorca s pomočjo elektronskega mikroskopa) ter druge raziskave, kot je analiza genoma in proteoma. Ena pomembnejših lastnosti iz vidika uporabnosti novo izoliranih bakteriofagov je njegova infektivnost, ki jo merimo z metodo ugotavljanja učinkovitosti nastanka plakov (angl. *efficiency of plaque formation, EOP*), še bolj pomembno pa je, kako širok je njegov nabor gostiteljev (Mullan, 2002). Zanima nas, kako specifičen je fag – lahko je omejen le na nekaj sevov, kar lahko omejuje njegovo uporabo kot protimikrobnou sredstvo.

2.3 FAGNA TERAPIJA

Fagna terapija je terapevtska uporaba litičnih bakteriofagov za zdravljenje infekcij s patogenimi bakterijami. Fage kot alternativo antibiotikom razvijajo v vzhodni Evropi in v ZDA, ne le za uporabo v humani medicini, ampak tudi na področju veterine, dentalne medicine, kmetijstva in živilstva. Poglavitna prednost uporabe bakteriofagov je njihova specifična narava. V teoriji naj bi bili fagi popolnoma neškodljivi za evkarionta, ki prejema bakteriofagno terapijo, prav tako pa naj ne bi škodili njegovi normalni mikrobni flori. Fagna terapija ima zelo malo (če sploh) stranskih učinkov za razliko od antibiotikov v uporabi, saj ne obremenjujejo jeter. Velika prednost je tudi samo-namnoževanje fagov v prisotnosti patogenih bakterij, zato v teoriji zadostuje le majhna doza terapevtskega sredstva za delovanje. Lahko rečemo, da so fagi pametna zdravila – "delujejo" v prisotnosti gostitelja, ko pa le-tega uničijo, se izločijo iz telesa. Prav tako je relativno preprosto najti specifične bakteriofage - saj gre za zelo številčno in raznoliko entiteto - in jih namnožiti z namenom uporabe v terapevtske namene, kar je velika prednost v primerjavi z razvojem antibiotikov, ki traja leta (Kenneth, 2012; Hausler, 2007).

Fagna terapija ima pa tudi nekaj omejitev, zaradi katerih bakteriofagi (še) niso del konvencionalnega zdravljenja v Zahodnem svetu. Prav visoka specifičnost fagov do gostitelja je ena od težav, predvsem v primeru, da vrsta patogenega mikroorganizma še ni določena. Tako kot proti antibiotikom, lahko bakterije postanejo odporne proti fagu, zato se za zdravljenje navadno uporablajo mešanice fagov. Največja težava pa je ne popolnoma predvidljiv in raziskan vpliv fagov na človeški imunski sistem (na primer pri intravenozni aplikaciji), saj gre za relativno velike proteinske molekule, ki lahko povzročijo tvorbo protiteles. Zato je pomemben tudi tip aplikacije takšnega terapevtika. Klinične in farmakološke študije, ki bi potrdile učinkovitost in popolno varnost bakteriofagov, pa so še v teku (Hausler, 2007). Trenutno fagno terapijo pri ljudeh uporablajo, ko gre za bakterije, ki so odporne proti antibiotikom, in sicer v Gruziji in v Rusiji (Bacteriophages, 2012).

Raziskave z namenom razvoja fagne terapije potekajo predvsem na najbolj znanih in problematičnih bakterijskih patogenih (*S. aureus*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*), medtem ko so raziskave fagov, specifičnih za *S. epidermidis* še v začetnih fazah. Novejše objave študij so v večini bazične narave in se nanašajo predvsem na izolacijo, morfološko in genetsko karakterizacijo izoliranih bakteriofagov, raziskovanje možnosti uporabe njihovih encimov, iz starejših objav pa je razvidna njihova uporaba pri tipizaciji sevov *S. epidermidis*, ki pa so jo izpodrinile druge, hitrejše metode.

2.4 UPORABA BAKTERIOFAGOV V DRUGIH TIPIH APLIKACIJ

Bakteriofage so kot take v veliki meri raziskali in opisali, nekatere izmed njih pa izkoriščamo v aplikacijah raziskovalnih laboratoriјev, biotehnološki industriji in na področju medicine. Že na začetku so se zavedali njihovega potenciala kot alternative antibiotikom za obvladovanje bakterijskih infekcij (fagna terapija), pa tudi kot diagnostičnega orodja za odkrivanje patogenov in razlikovanje med njimi. Sčasoma so bakteriofage začeli raziskovati in uporabljati tudi v drugih tipih aplikacij, kot je razvoj cepiv in dostavljanje le-teh v telo (Verheus in sod., 2010). V tem poglavju sem se osredotočila na nekaj zanimivejših aplikacij bakteriofagov, še posebej v povezavi z delom na bakteriofagih, specifičnih za *S. epidermidis*.

2.4.1 Fagna tipizacija

Pri metodi fagne tipizacije gre za zaznavanje razlik med občutljivostjo za različne bakteriofage, ki napadajo bakterije te vrste. Do razlik med sevi pride zaradi prisotnosti oziroma odsotnosti specifičnih receptorjev na celični steni bakterij, ki jih bakteriofagi prepoznavajo. Rezultat takšne tipizacije je kombinacija fagov, ki je sposobna okužiti sev. Ta metoda je sicer preprosta, poceni, je primerljiva med laboratorijski in ne zahteva veliko znanja in opreme, a ima nekaj slabosti. Včasih je tipizacija na tak način omejena, saj je možno, da fagi iz standardnega nabora za tipizacijo ne lizirajo naših bakterij v zadostni meri, ali pa nasprotno – jih lizirajo vsi fagi iz nabora. Težave se pojavijo tudi v primeru, ko gre za počasi rastoče bakterije, saj je za opazovanje nastanka con liz potrebna konfluentna rast bakterij na trdnem gojišču (Typing bacteria..., 2014; Chirakadze in sod., 2009; Talbot in Parisi, 1976; Van der Merwe in sod., 2014). Fagne tipizacije so se v bakterijski taksonomiji posluževali že leta 1938, nadomestile pa so jo zanesljivejše, hitre mikrobiološke in molekularne metode (Craigie in sod., 1938, cit po Van der Merwe in sod., 2014).

2.4.2 Bakteriofagi kot senzorji za prepoznavanje patogenih bakterij

Bakterijske okužbe zahtevajo hitro in učinkovito diagnostiko. Ena od možnosti ugotavljanja povzročitelja okužbe, je tudi uporaba bakteriofagov. Razvili so kar nekaj takšnih testov, ki temeljijo na specifični prepoznavi fagov, njihova poglavitna prednost pa je (poleg hitrosti, občutljivosti in specifičnosti) nizka cena. Večina testov je zastavljenih tako, da fagi, namenjeni detekciji patogenih bakterij, vsebujejo rekombinantno sekvenco, zaradi katere ob namnoževanju specifičnega faga dobimo merljiv signal (fluorescenca, luminiscenca, ...). Lahko pa pri testu opazujemo le nastanek con liz na ploščah s konfalentno rastjo bakterij. Pri takšnih tipih testov je zelo majhna možnost lažno pozitivnih rezultatov, saj gre za zaznavanje živih celic v nasprotju z molekularnimi metodami.

Trenutno so sicer na voljo testi, ki zaznajo specifične patogene, vendar bi v kliniki bili bolj uporabni biosenzorji, ki bi prepoznavali širok spekter patogenih bakterijskih vrst hkrati. Uporaba bakteriofagov v diagnostične namene je torej zelo perspektivna, k čemur prispeva tudi razvijajoče se področje nanotehnologije (Van der Merwe in sod., 2014).

2.4.3 Uporaba bakteriofagov za odstranjevanje in preprečevanje nastanka biofilmov

Kot je že opisano v poglavju 2.1.3, so biofilmi, ki jih bakterije ustvarjajo tako na inertnih kot tudi na "živih" materialih, pomembna strategija preživetja. V medicini predstavljajo veliko težavo, saj se jih je zelo težko znebiti. V primeru, da biofilm nastane v medicinskem implantatu, vstavljenem v človeško telo, je ta zelo odporen proti naravnemu človeški obrambi, sestava biofilma pa preprečuje tudi dostop antibiotikom, kar zelo oteži zdravljenje. Več in-vitro študij je pokazalo, da so bakteriofagi sposobni prodreti skozi sloj polisaharidov in drugih sestavnih delov biofilma do celic znotraj biofilma in ga tako uničiti, prav tako pa so fagi učinkoviti pri preprečevanju njihovega nastanka (Azeredo in Sutherland, 2008).

2.4.4 Uporaba fagnih encimov

Tako kot fagi sami, so iz aplikativnega vidika zanimivi tudi njihovi encimi. Endolizini oziroma lizini, so bakteriofagni encimi, ki so proizvedeni v pozni fazi genske ekspresije tekom litičnega cikla. Od znotraj razgrajujejo peptidoglikan bakterij in s tem omogočajo lizo celic ter razširjanje sintetiziranih bakteriofagov zunaj celic. Gre za različne tipe amidaz, endopeptidaz in glikozidaz, ki zelo specifično cepijo vezi med podenotami bakterijskega peptidoglikana. Zaradi njihovih lastnosti bi jih lahko uporabljali v podobne namene kot bakteriofage in kar nekaj raziskav je bilo opravljenih s tem namenom (Gutierrez in sod., 2014; Wang in Lu, 2009). Fagni endolizini so sicer poznani že več kot 40 let, leta 2001 pa so jih prvič uporabili kot površinsko antibakterijsko sredstvo, ki se je izkazalo kot zelo učinkovito. Od tedaj je bilo veliko raziskav in objav na to temo, iz rezultatov pa lahko sklepamo, da imajo ti encimi poleg učinkovitosti, tudi veliko prednosti v povezavi z varnostjo uporabe. Težavo pri sistemski uporabi endolizinov kot terapevtikov pa bi lahko predstavljala potencialna imunogenost (Borysowski in sod., 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

V nadaljevanju so našteti materiali, ki so bili potrebni za izvedbo laboratorijskega dela magistrske naloge. Opisani so tudi postopki priprave gojišč in reagentov, ki smo jih pri delu uporabljali za delo z bakterijami, bakteriofagi in njihovim dednim materialom.

3.1.1 Bakterijski sevi

Pred izolacijo ostalih bakterijskih sevov *Staphylococcus epidermidis*, smo imeli na voljo 4 klinične seve, pridobljene iz Ortopedske bolnišnice Valdoltra, kjer so opravili tudi test občutljivosti za antibiotike (Preglednica 1). Te seve smo uporabili za ugotavljanje rastne krivulje ter tudi kasneje pri izolaciji in drugim delom z bakteriofagi.

Preglednica 1: Začetni nabor sevov *S. epidermidis*

Ime seva	Izvor	Odpornost proti antibiotikom
SeV1	vnetje tkiva, stegnenica (27.7.2012)	odporen proti penicilinu, gentamicinu, cefoksitinu, ciprofloksacinu, eritromicinu in klindamicinu
SeV2	vnetje tkiva sklepne kapsule (6.7.2012)	odporen proti penicilinu, gentamicinu, cefoksitinu, ciprofloksacinu, eritromicinu in klindamicinu
SeV3	vnetje tkiva sklepne kapsule (6.7.2012)	odporen proti penicilinu in cefoksitinu
SeV4	punktat iz kolena (21.11.2012)	odporen proti penicilinu, cefoksitinu, ciproflaksacinu, eritromicinu in klindamicinu

3.1.2 Komercialni pripravki bakteriofagov

Na voljo smo imeli dva komercialna pripravka mešanic bakteriofagov in sicer Intestiphage, ki vsebuje fage, specifične za *Shigella spp.*, *Salmonella cholerae-suis*, *Staphylococcus*, *Proteus spp.*, *E. coli* in *P. aeruginosa*. Enkophage pa je mešanica fagov, specifičnih za *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli* in stafilokoke, vendar slednji ni več v proizvodnji v prodajne namene. Bakteriofagna pripravka sta bila proizvedena v Gruziji (Eliava Institute of Bacteriophages).

3.1.3 Gojišča, pufri in reagenti

Mikrobiološka gojišča, potrebna za izolacijo, kultivacijo in spremeljanje rasti bakterijskih sevov *S. epidermidis*, smo pripravljali po navodilih proizvajalca. Ta gojišča smo uporabljali tudi pri delu z izoliranimi bakteriofagi, kot je namnoževanje le-teh in določanje njihovega titra.

- Tekoče gojišče TSB (Tryptone Soya Broth): TSB smo pripravili tako, da smo 15 g osnovnega medija TSB (Oxoid; CM0129) raztopili v 500 ml deionizirane vode, premesali in sterilizirali v avtoklavu. Gojišče smo po avtoklaviranju shranjevali do uporabe v hladilniku (4 °C).

- Trdno gojišče TSA (Tryptone Soya Agar): pripravili smo ga tako, da smo zatehtali 15 g osnovnega gojišča TSB (Oxoid CM0129) in dodali 6 g agarja (končna koncentracija je 1,2 % w/v) Select agar (Sigma Aldrich; A5054) ter raztopili v 500 ml deionizirane vode in avtoklavirali. Po ohlajanju na 50 °C smo gojišče razlili na petrijeve plošče premera 70 ali 90 mm in jih shranili v hladilniku (4 °C) do uporabe.
- Trdno gojišče TSA z dodatkom TTC: To gojišče smo pripravili tako, da smo sterilnemu gojišču TSA pred razlivanjem na petrijeve plošče dodali 5 ml sterilne raztopine 1 % TTC (trifenil tetrazolijev klorid), zaradi katerega se bakterijske kolonije obarvajo rdeče. Tako pripravljeno gojišče smo razlili na petrijeve plošče premera 90 mm in jih shranili v hladilniku (4 °C) do uporabe. Ker je TTC občutljiv na svetlobo, smo plošče ovili v aluminijasto folijo.
- Mehko gojišče TSB: Pripravili smo ga tako, da smo zatehtali 6 g osnovnega gojišča TSB (Oxoid; CM0129) in dodali 2,1 g agarja (končna koncentracija je 0,7 % w/v) (Sigma Aldrich; A5054) ter raztopili v 300 ml deionizirane vode in avtoklavirali. Gojišče smo razdelili po 3 ml ali 5 ml v 15 ml centrifugirke in ga shranili v vodni kopeli pri 56 °C do uporabe.
- BHI - Možgansko-srčni infuzijski bujon: Za shranjevanje sevov smo uporabili tekoče gojišče možgansko-srčni infuzijski bujon (angl. brain heart infusion). Gojišče smo pripravili tako, da smo 18,5 g osnovnega medija (Merck; 1.10493.0500) raztopili v 500 ml deionizirane vode in sterilizirali. Gojišče smo ohladili na 50 °C in ga shranili pri 4 °C do uporabe.

Priprava pufrov in reagentov ter drugih kemikalij, potrebnih za delo z bakterijami, bakteriofagi in njihovo DNK.

- Solno-magnezijev pufer (SM): 0,1 M NaCl (Merck), 0,01 % (w/v) želatina (Sigma Aldrich), 8 mM MgSO₄ (Sigma Aldrich), 50 mM Tris pufer (Merck), pH 7,5. Pripravljen pufer smo sterilizirali v avtoklavu, po ohlajanju pa smo ga v mikrobiološki varnostni komori razdelili po 50 ml v centrifugirke in shranili v hladilniku (4 °C) do uporabe. SM smo uporabljali za redčenje in namnoževanje izoliranih bakteriofagov.
- 10 x TBE pufer za pripravo agaroznih gelov in elektroforeznega pufra: 0,89 M Tris, 0,89 M borova kislina (Merck), 20 mM EDTA (Kompleksal III, Semikem), pH 8. Pripravljen pufer smo na koncu prefiltrirali skozi 0,22 µm filter.
- 1 x TE pufer za pripravo agaroznih blokcev za PFGE: 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8. Pufer smo shranili v hladilniku do uporabe.
- 10 x TBE pufer za PFGE: 0,45 M Tris, 0, 89 M borova kislina, 0,20 mM EDTA, pH 8,5. Pufer smo shranili v hladilniku do uporabe.

- Pufer za lizo bakteriofagov: 10 mM Tris, pH 7,2, 100 mM EDTA, 1 % (w/v) sarkozil (Sigma Aldrich), 0,2 % (w/v) SDS (Sigma Aldrich), 1 mg/ml proteinaza K (Sigma Aldrich). Po pripravi smo pufer filtrirali skori 0,22 µm filter, razdelili v 50 ml centrifugirke in shranili v zamrzovalniku do uporabe.
- Pufer za spiranje: 50 mM EDTA (Kompleksal III, Semikem), 20 mM Tris (Sigma-Aldrich) pH 7,2. Po pripravi smo pufer filtrirali skori 0,22 µm filter, razdelili v 50 ml centrifugirke in shranili v zamrzovalniku do uporabe.

3.1.4 Seznam ostalih kemikalij, dodatkov in pripomočkov

- 1 % trifenil tetrazolijev klorid (TTC) (Sigma Aldrich);
- 50 % glicerol (Sigma Aldrich);
- komplet za barvanje po Gramu (Merck Millipore);
- Taq polimeraza (Thermo Scientific);
- mešanica deoksinukleotidtrifosfatov (dNTP mix, Thermo Scientific);
- restriktijski encim HindIII (Thermo Scientific);
- komplet za čiščenje PCR produktov (Qiagen, Thermo Scientific);
- barvili za barvanje elektroforeznih agaroznih gelov: etidijev bromid in SybrGold (Life Technologies);
- mitomicin C (500 µg/ml) (Sigma Aldrich);
- 1 % uranil acetat za negativno barvanje vzorcev za elektronsko mikroskopijo (Sigma Aldrich);
- DNaza (10 mg/ml) in RNaza (12,5 mg/ml) (Thermo Scientific);
- turbonukleaza (250 U/µl) (Accelagen)
- proteinaza K (20 mg/ml) (Sigma Aldrich);
- 10 mM fenilmethylsulfonil fluorid (v izopropanolu) (Sigma Aldrich);
- natrijev acetat (Sigma Alrich);
- 20 % (w/v) natrijev lavrilsulfat (SDS) (Sigma Aldrich);
- natrijev perklorat (Sigma Aldrich);
- mešanica fenol – kloroform – izoamil alkohol v razmerju 25:24:1 (Sigma Aldrich);
- kloroform (Sigma Aldrich);
- agarosa za kuhanje agaroznih gelov in "low melting temperature" agarosa za pripravo agaroznih blokcev za PFGE (Lonza);
- Lambda DNK, 500 µg/ml (New England Biolabs);
- DNK standard Concatemer CHEF DNA Size Standard (BioRad) za PFGE;
- DNK standarda 1 kb in "low range" (GeneRuler, ThermoScientific) za elektroforezo;
- nalagalni pufer (6x gel loading dye, ThermoScientific) za gelsko elektroforezo nukleinskih kislin;
- komplet za določanje vrste sevov rodu *Staphylococcus* API-STAPH (Bio-Merieux);
- komplet za izolacijo DNK po Gramu pozitivnih bakterij DNAid Mycobacteria (SmartHelix) in GeneJET Genomic Purification kit (ThermoScientific);
- komplet za čiščenje PCR produktov QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen);
- deionizirana voda;
- 99,8 % etanol
- fiziološka raztopina

3.1.5 Seznam laboratorijskih pripomočkov

- avtomatske pipete (Eppendorf) in nastavki za avtomatske pipete s filtri (Sarstedt)
- 1,5 ml centrifugirke (Sarstedt);
- 1,5 ml krioepruvete (Heto);
- injekcijske brizgalke (PB Plastik);
- 0,22 µm filter (Merck Millipore);
- 15 ml in 50 ml centrifugirke (Sterlin);
- plastične cepilne zanke (Labortechnika, Golias);
- petrijeve plošče premera 70 in 90 mm (Labortechnika, Golias);
- mikrotitrskie plošče (Iwaki);
- razkužilo Incidin (Ecolab);
- parafilm (Brand);
- rokavice (Kimberly Clark) in laboratorijski plašč (Dastex);
- laboratorijska steklovina (Duran, Brand), pribor za tehtanje, serološke pipete ...

3.1.6 Seznam laboratorijske opreme

- brezprašna komora (Iskra PIO);
- pH meter (Mettler Toledo);
- tehnicka (Tehnica Železniki);
- inkubator (Sanyo);
- vodna kopel (Kambič WB-30);
- mikrovalovna pečica (Gorenje)
- hladilnik (Gorenje, Zanussi);
- zamrzovalnik, - 86 °C (Heto Ultra Freeze) in zamrzovalnik, - 20 °C (Gorenje);
- vrtinčnik (Tehnica Železniki);
- laboratorijska centrifuga (Sigma);
- mikroskop (Motic) in digitalni fotoaparat (Nikon);
- čitalec mikrotitrskih plošč (Bioteck);
- avtoklav (Sutjeska, SU 30);
- magnetno mešalo (Tehnica Železniki);
- termostat za PCR reakcije (CSL Gradient Thermal Cycler, Cleaver Scientific);
- elektroforezna banjica za agarozno elektroforezo in vir napetosti (Biorad);
- Sistem za gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju - PFGE (Biometra) (Biotehniška fakulteta);
- Presevni elektronski mikroskop (angl. *transmission electron microscope*, TEM) (Philips CM100), opremljen z digitalno kamero BioScan 792 (Gatan) in programsko opremo Digital Micrograph za obdelavo slik (Nacionalni inštitut za biologijo);
- sistem za dokumentacijo gelov (E-box).

3.2 METODE DELA

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili metode, ki so plod dela raziskovalcev Laboratorijs za bioanalitiko (LBA) Centra odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo, oziroma so bili povzeti iz literature in modifcirani. Delo z bakterijami in bakteriofagi je potekalo v sterilnem okolju (v brezprašni komori ali pa ob plinskem

gorilniku). Pri delu z DNK smo pazili, da reagenti niso vsebovali DNaz ter da ni prišlo do kontaminacij vzorcev.

3.2.1 Revitalizacija bakterij in priprava delovne banke *S. epidermidis*

Začetni nabor bakterijskih sevov *S. epidermidis* (preglednica 1) je bil trajno shranjen v krioerpruvetah pri – 86 °C. Kulture smo s cepilno zanko nacepili do posamezne kolonije na petrijeve plošče z gojiščem TSA. Plošče smo inkubirali 20 h, aerobno pri 37 °C. Pripravili smo delovno banko teh sevov in sicer tako, da smo 1 kolonijo iz plošče precepili v 4 ml tekočega gojišča TSB in inkubirali 8 h, aerobno pri 37 °C, z mešanjem 120 rpm. Nato smo pripravili mešanico 200 µl tekočega gojišča BHI (možgansko-srčni infuzijski bujon), 200 µl 50 % glicerola in 600 µl tekoče kulture sevov. Mešanico smo premešali in razdelili po 150 µl v krioerpruvete, katere smo označili, nato pa shranili v zamrzovalnik.

3.2.2 Ugotavljanje rastne krivulje štirih sevov *S. epidermidis*

Delo smo pričeli z opisom rastne krivulje za seve, ki smo jih imeli na voljo. Najprej smo revitalizirali bakterije, tako da smo nacepili vse 4 seve na plošče TSA do posamezne kolonije in inkubirali 20 h (aerobno pri 37 °C). Naslednji dan smo posamezno kolonijo precepili v 4 ml gojišča TSB v epruveti in inkubirali 20 h (aerobno pri 37 °C, 120 rpm), tako da je bil pripravljen inokulum v stacionarni fazi rasti. Rastno krivuljo smo delali v paralelkah, kar pomeni, da smo za vsak sev ločeno precepili po 2 koloniji. Po inkubaciji smo prenesli 50 µl kulture v stacionarni fazi v 50 ml TSB gojišča, ki smo ga pripravili v 250 ml erlenmajericah. Pred inokulacijo smo odvzeli vzorec in mu pomerili optično gostoto (OD) pri 600 nm, saj je sterilno gojišče predstavljalo naše ozadje oziroma slepi vzorec. To vrednost smo na koncu odšteli od vrednosti pri vzorčenjih. OD pri 600 nm smo pomerili tudi takoj po inokulaciji, nato pa smo inkubirali erlenmajerice aerobno pri 37 °C, 120 rpm in vzorčili vsake 1,5 h do 12 h ter po 24 h in 48 h. Vsakemu vzorcu smo pomerili OD pri 600 nm v treh paralelkah in za risanje krivulje uporabili povprečje.

Rast bakterij pa smo spremljali tudi z metodo štetja kolonij – določali smo število kolonijskih enot na ml (CFU/ml). Vsak vzorec smo redčili po Kochu in redčitve prenesli na plošče TSA z dodatkom TTC-ja tako, da smo trikrat odpipetirali 10 µl ustrezne redčitve na predhodno označeno mesto na plošči. Plošče smo zavili v aluminijasto folijo in jih inkubirali 24 h (aerobno pri 37 °C). Pri ustreznih redčitvah smo kolonije prešteli (upoštevali smo, da je redčitev števna, če je število kolonij od 3 do 40) in s pomočjo enačbe (1) (ISO 4883, 1991) izračunali CFU/ml, pri čemer smo upoštevali povprečje števila kolonij pri treh paralelkah. Za oba parametra (OD pri 600 nm in CFU/ml) smo narisali graf v odvisnosti od časa.

$$N = \frac{\Sigma C * R}{0,01} \quad \dots (1)$$

Pri enačbi N pomeni koncentracijo celic v CFU/ml, ΣC pomeni povprečje vsote kolonij, R pa redčitev, pri kateri smo prešteli kolonije. 0,01 predstavlja volumen vzorca v ml.

3.2.3 Izolacija bakterij *S. epidermidis*

Uporabili smo sterilne vatirane palčke, s katerimi osebe nežno podrgnile po nosni votlini. Te palčke smo prenesli v sterilno gojišče, jih inkubirali pri 37 °C in gojišče je po nekaj urah postalo motno zaradi rasti naravno prisotnih mikroorganizmov. S cepilno zanko smo vzorce nacepili na plošče TSA do posamezne kolonije in si naslednji dan ogledali kolonije. Tiste, ki so bile po morfologiji kolonij podobne našim kliničnim izolatom *S. epidermidis*, smo še dvakrat precepili, da smo dosegli čistost kultur. Sledilo je namnoževanje neznanih sevov v 4 ml gojišča TSB in shranjevanje v zamrzovalnik (priprava delovne banke) po opisanem postopku do določanja oziroma potrjevanja vrste izoliranih sevov bakterij.

3.2.4 Opis izoliranih sevov

Najprej smo opisali izolirane seve glede na njihove morfološke lastnosti (barva, oblika kolonij), opazovali smo, kako hitro rastejo v tekočem TSB gojišču in jih pobarvali po Gramu. Uporabili smo komplet za barvanje po Gramu, si bakterije ogledali pod mikroskopom in jih fotografirali.

3.2.4.1 Izolacija bakterijske DNK

Izolirali smo DNK vseh bakterij (kliničnih sevov in novo izoliranih) s pomočjo kompletov za izolacijo DNK po Gramu pozitivnih bakterij DNAid Mycobacteria (Smart Helix) in GeneJET Genomic Purification kit (Thermo Scientific). Držali smo se navodil proizvajalca in na koncu 5 µl vzorca čiste bakterijske DNK nanesli na agarozni gel ter izvedli elektroforezo. Pripravili smo 100 ml 1 % agarognega gela, ga vili v okvir in ga po strjevanju postavili v elektroforezno banjico. Nalili smo še 1 x elektroforezni pufer TBE in v luknjice odpipetirali naše vzorce. Elektroforeza je tekla 1 h, pod napetostjo 100 V. Gel smo po končani elektroforezi pobarvali v etidijevem bromidu oziroma v raztopini barvila SybrGold in ga slikali. Slika gela nam je dala informacijo o količini in čistosti izolirane DNK.

3.2.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (angl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) za gen 16S rRNA in sekvenciranje gena

S pomočjo reakcije PCR smo pomnožili del 1542 bp velikega bakterijskega gena, ki kodira 16S ribosomsko RNK, ogrodje male ribosomske podenote. Reakcijske pogoje smo določili eksperimentalno. Uporabili smo začetne oligonuklotide, znane iz literature: fD1 (Weisburg in sod., 1991) in RU1406 (Olsen in sod., 1986).

Zaporedji začetnih oligonukleotidov:

- fD1: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
- RU1406: 5'-ACG GGC GGT GTG TRC-3'

Preglednica 2: Reakcijska mešanica PCR za odsek 16S rRNA

Sestavina mešanice	Končna koncentracija ali volumen
10 x PCR pufer (10 x Taq Buffer)	1 x
mešanica deoksinukleotidtrifosfatov (dNTP)	20,5 µM (vsakega)
Taq polimeraza	0,05 U/ml
začetni oligonukleotid 1	0,25 µM
začetni oligoukleotid 2	0,25 µM
gDNK bakterij	1 µl
dH ₂ O	dopolnitev do volumna 25 µl

Pripravljeno reakcijsko mešanico smo premešali in v termostatu za PCR reakcije in nastavili PCR program: 95 °C – 5 min, sledilo je 30 ciklov treh korakov: 95 °C – 30 s, 60 °C – 30 s in 72 °C – 1,15 min, na koncu pa še končno podaljševanje pri 72 °C – 5 min. Poleg naših vzorcev, smo pri PCR-ju vedno dodali še negativno kontrolo (1 µL dH₂O namesto DNK) in pozitivno kontrolo, ki je bila v tem primeru katerakoli bakterijska DNK, ki smo jo imeli na voljo (*Campylobacter sp.*, *E.coli*, ...).

Reakcije PCR smo po koncu programa nanesli na agarozni gel in izvedli elektroforezo, da bi preverili uspešnost PCR-ja. Sledilo je čiščenje pomnožka s pomočjo kompleta za čiščenje PCR reakcij. Očiščeno DNK smo ponovno nanesli na agarozni gel, da smo se prepričali o njeni čistosti in količini. Pripravljene in označene vzorce smo poslali na sekveniranje (GATC Biotech). Sekvenciranje je potekalo z uporabo začetnega oligonukleotida RU1406.

Pridobljene bakterijske sekvene za gen 16S rRNK smo primerjali s sekvencami znanih bakterij (BLAST) S spletni strani podatkovne baze SILVA (SILVA, 2014) smo prenesli vse sekvene za gen 16S rRNK za bakterije rodu *Staphylococcus* in s programom MEGA 5.2 izrisali filogenetsko drevo. Nato smo uporabili še test vezanja (angl. *bootstrap*), s katerim smo dobili informacijo o zanesljivosti filogentskega drevesa.

3.2.4.3 Potrditveni test API STAPH

Za potrditev vrste sevov so bili potrebni še biokemijski testi, ki temeljijo na razlikovanju vrst znotraj rodu glede na njihov metabolizem (prisotnost oz. odsotnost metabolnih encimov). Uporabili smo komercialni komplet za API STAPH, proizvajalca Bio-Merieux, pri katerem kot rezultat dobimo verjetnost (v odstotkih), da naši sevi sodijo v vrsto *S. epidermidis*.

3.2.5 Priprava plošč s konfluentno rastjo bakterij (angl. *bacterial lawn*) za delo z bakteriofagi

Preden smo lahko pričeli z izolacijo bakteriofagov, specifičnih za naše seve *S. epidermidis*, je bilo potrebno optimizirati pripravo plošč s konfluentno rastjo. Cilj je bil doseči enakomerno bakterijsko rast na petrijevi plošči, ki je dovolj intenzivna, da so cone lize jasno vidne, hkrati pa ne preveč gosta. Pomagali smo si z objavami drugih raziskovalcev iz tega področja in poskusili nekaj različnih protokolov:

1. protokol:

- Odpipetirali smo 100 µl bakterijske kulture v stacionarni fazi (po 20 h inkubacije) v 3 ml mehkega gojišča TSB.
- Mešanico smo vorteksirali in razlili na petrijevo ploščo premera 70 mm in inkubirali preko noči aerobno na 37 °C.

2. protokol:

- Najprej smo nacepili kulturo do posamezne kolonije na trdno gojišče TSA in inkubirali preko noči (20 h) aerobno na 37 °C.
- Naslednje jutro smo 2 koloniji nacepili v 2 ml tekočega gojišča TSB in inkubirali nekaj ur aerobno na 37 °C, 120 rpm, dokler OD 600 nm ni dosegla 0,5.
- Odpipetirali smo 100 µl bakterijske kulture v 3 ml mehkega gojišča TSB.
- Mešanico smo vorteksirali in razlili na petrijevo ploščo premera 70 mm in inkubirali preko noči aerobno na 37 °C.

3. protokol

- Najprej smo nacepili kulturo do posamezne kolonije na trdno gojišče TSA in inkubirali preko noči (20 h) aerobno na 37 °C.
- Naslednje jutro smo 1 kolonijo nacepili v 4 ml tekočega gojišča TSB in inkubirali preko noči aerobno na 37 °C, 120 rpm.
- Po inkubaciji smo prenesli 40 µl kulture v stacionarni fazi rasti v 4 ml svežega gojišča TSB in inkubirali aerobno pri 37 °C, 120 rpm, dokler OD 600 nm ni dosegla 0,140. Pri tej optični gostoti je kultura v zgodnji eksponentni fazi rasti.
- Odpipetirali smo 100 µl bakterijske kulture v 3 ml mehkega gojišča TSB.
- Mešanico smo vorteksirali in razlili na petrijevo ploščo premera 70 mm in inkubirali preko noči aerobno na 37 °C.
- Za kulturo v eksponentni fazi smo ugotovili tudi gostoto (CFU/ml).

3.2.6 Preverjanje prisotnosti profagnih sekvenc

3.2.6.1 PCR za intergazo in druge bakteriofagne gene

Prisotnost profagnih sekvenc smo preverjali z verižno reakcijo s polimerazo, pri kateri smo uporabili dva para začetnih oligonukleotidov, ki so jih načrtovali Gutierrez in sodelavci (Gutierrez in sod., 2012). Para začetnih oligonukleotidov nalegata na gen za integrizo dveh različnih *S. epidermidis* bakteriofagov – Intphi5 in Intphi7. Reakcijske pogoje smo določili eksperimentalno.

Zaporedja začetnih oligonukleotidov:

- Intphi5-1: 5'-GTA TGA CTA ACT GAG AAT AGC TTG-3'
- Intphi5-2: 5'-TAG AAG ATG GCA ACA ACA TTG AAG-3'
- Intphi7-1: 5'-TTT ATC TAA GTC TAG TTT AGA TAG G-3'
- Intphi7-2: 5'-GAC GAA GTG ATG AAA GGT AAT AG-3'

Preglednica 3: Reakcijska mešanica PCR

Sestavina mešanice	Končna koncentracija ali volumen
10 x PCR pufer	1 x
mešanica deoksinukleotidtrifosfatov (dNTP)	2,5 mM (vsakega)
Taq polimeraza	0,25 U/ μ l
začetni oligonukleotid 1	10 mM
začetni oligonukletid 2	10 mM
gDNK bakterij	1 μ l
dH ₂ O	dopolnitev do volumna 25 μ l

Pripravljene reakcijske mešanice smo premešali in v termostatu za PCR reakcije in nastavili PCR program za gen Intphi5: 95 °C – 1 min, sledilo je 30 ciklov treh korakov: 95 °C – 30 s, 48 °C – 30 s in 72 °C – 1 min, na koncu pa še končno podaljševanje pri 72 °C – 7 min; pri PCR-ju za Intphi7 je bila temperatura hibridizacije oligonukleotidov 52 °C. Poleg naših vzorcev, smo pri PCR-ju dodali še negativno kontrolo (1 μ L dH₂O namesto DNK).

Poleg PCR za gen za integrizo (2 različna para oligonukleotidov), smo izvedli PCR še za nekatere druge bakteriofagne gene, ki so jih načrtovali Pantuček in sodelavci (Pantuček in sod., 2004). Reakcijske pogoje smo določili eksperimentalno. Za ugotavljanje profagnih sekvenc smo tu uporabili 3 pare oligonukleotidov, specifične za družino *Siphoviridae*: SGA1 in SGA2, ki nalegata na gen, specifičen za fage, podobne fagu 3A (angl. 3A-like phages). SGB1 in SGB2 pomnožujeta gen, specifičen za fage, podobne fagu 11 (angl. 11-like phages). SGF1 in SGF2, pa pomnožujeta gen, specifičen za fage, podobne fagu 77 (angl. 77-like phages). Vsi trije geni kodirajo proteine repa.

Zaporedja začetnih oligonukleotidov:

- SGA1: 5'-TAT CAG GCG AGA ATT AAG GG-3'
- SGA2: 5'-CTT TGA CAT GAC ATC CGC TTG AC-3'
- SGB1: 5'-ACT TAT CCA GGT GGC GTT ATT G-3'
- SGB2: 5'-TGT ATT TAA TTT CGC CGT TAG TG-3'
- SGF1: 5'-CGA TGG ACG GCT ACA CAG A-3
- SGF2: 5'-TTG TTC AGA AAC TTC CCA ACC TG-3'

Preglednica 4: Reakcijska mešanica PCR za 3 bakteriofagne gene

Sestavina mešanice	končna koncentracija ali volumen
10 x PCR pufer	1 x
mešanica deoksinukleotidtrifosfatov (dNTP)	2,5 mM (vsakega)
Taq polimeraza	0,25 U/ μ l
začetni oligonukleotid 1	10 mM
začetni oligonukleotid 2	10 mM
gDNK bakterij	1 μ l
dH ₂ O	dopolnitev do volumna 25 μ l

Pripravljene reakcijske mešanice smo premešali in nesli v termostat za PCR reakcije in nastavili PCR program – enak za oba gena: 95 °C – 1 min, sledilo je 30 ciklov treh korakov: 95 °C – 30 s, 52°C – 30 s in 72 °C – 1 min, na koncu pa še končno podaljševanje pri 72 °C – 7 min. Poleg naših vzorcev, smo pri PCR-ju vedno dodali še negativno kontrolo (1 μ L dH₂O namesto DNK). PCR produkte smo na koncu nanesli na agarozni gel in izvedli elektroforezo.

3.2.7 Izolacija bakteriofagov

Osnovni princip iskanja in osamitve bakteriofagov je bil opazovanje, ali vzorec povzroči lizo bakterijskih celic na plošči, kar vidimo kot cono lize oziroma področje, kjer kultura zaradi bakteriofaga ni zrastla. Ta metoda se imenuje spot assay.

3.2.7.1 Spot assay

Najprej smo pripravili bakterijsko kulturo tako, da smo po revitalizaciji bakterij prenesli 1 kolonijo v 4 ml gojišča TSB in inkubirali 24 h (aerobno pri 37 °C, 120 rpm), nato pa odpipetirali 40 μ l kulture v stacionarni fazni v 4 ml svežega gojišča (v 15 ml centrifugirki) in inkubirali nekaj ur. Bakterijsko kulturo smo gojili do zgodnje eksponentne faze, pri čemer smo spremljali OD pri 600 nm, dokler ta ni dosegel 0,140. Število kolonijskih enot je pri tem OD približno $5,0 \times 10^8$ CFU/ml. Tako pripravljeno kulturo smo uporabili za pripravo plošč s konfluentno rastjo sevov. 100 μ L kulture smo odpipetirali v 3 ml TSB mehkega agarja, ki je bil do uporabe shranjen v vodni kopeli pri 65 °C. Mešanico smo premešali na vrtinčniku in jo razlili na ploščo TSA premera 70 mm (po 3. protokolu za pripravo plošč s konfluentno rastjo sevov). Počakali smo, da se je mehki agar strdil, ploščo označili, nato pa smo po 10 μ l vzorca nanesli na ploščo. Pri vseh vzorcih smo vedno dodali tudi negativno kontrolo; glede na vzorec, je bila ta: SM pufer, sterilna fiziološka raztopina ali pa deionizirana voda. V primeru, da je pri negativni kontroli nastala cona lize, rezultatov na tisti plošči nismo upoštevali. Plošče smo nato inkubirali 24 h (aerobno pri 37 °C), naslednji dan pa opazovali, ali je pri katerem od vzorcev nastala cona lize.

3.2.7.2 Indukcija profagov z mitomicinom C – izolacija lizogenih bakterofagov

Protokol za indukcijo profagov smo priredili po delu Gutierrez-a in sodelavcev (Gutierrez in sod., 2012). Bakterijske kulture smo inkubirali do zgodnje eksponentne faze rasti, nato pa smo dodali mitomicin C do koncentracije 10 μ g/ml, za negativno kontrolo pa smo

namesto mitomicina C dodali enak volumen dH₂O. Kulture z dodanim mitomicinom C in negativne kontrole smo inkubirali 3 h, pri 37 °C in mešanjem 120 rpm. Po inkubaciji smo bakterije odstranili s centrifugiranjem (10 min pri 9000 rpm) in filtriranjem skozi 0,22 µm filter. To je bil naš vzorec s katerim smo nato naredili spot assay z vsemi kulturami, ki smo jih imeli na voljo - vse kombinacije vzorec-kultura. Naslednji dan plošče s konfluentno rastjo sevov pregledali in ocenili, ali je prišlo do cone lize.

3.2.7.3 Izolacija bakteriofagov iz vzorca odpadnih voda in obogatitev (angl. *enrichment*)

Najprej smo naredili postopek obogatitve s 4 kliničnimi izolati. To je postopek, pri katerem vzorcu (v tem primeru vzorec odpadnih voda) dodamo naše seve in inkubiramo, da dosežemo rast bakterij. V primeru, da so v vzorcih bakteriofagi, ki so sposobni lize naših sevov, se bodo namnožili skupaj z njimi. Večje število fagov pa nam omogoča večjo možnost zaznave con lize pri spot assayju in lažjo izolacijo fagov.

Kulture (SeV1, SeV2, SeV3 in SeV4) smo inkubirali do zgodnje eksponentne faze rasti. V 15 ml centrifugirko smo odpipetirali 200 µl te kulture in centrifugirali (9000 g, 10 min). Gojišče smo odstranili. V peletu naj bi bilo približno $1,0 \times 10^8$ CFU. Pelet smo resuspendirali v 200 µl 10 x gojišča TSB in dodali 1800 µl vzorca odpadnih voda. Mešanico smo premešali in inkubirali 20 h, aerobno pri 37 °C. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali (9000 g, 10 min), filtrirali skozi 0,22 µm filter in naredili spot assay z vsemi kulturami (13). Naslednji dan smo opazovali nastanek con lize.

3.2.7.4 Izolacija za *S. epidermidis* specifičnih fagov iz komercialnega pripravka

Na voljo smo imeli tudi dva komercialna pripravka mešanic bakteriofagov in sicer Intestiphage in Enkophage. Naredili smo spot assay na naših kulturah in opazovali nastanek con lize. Nekateri vzorci so povzročili lizo več različnih bakterijskih sevov, zato smo jih obravnavali kot različne bakteriofage, jih ločeno očistili, namnožili in opisali.

3.2.7.5 Izolacija bakteriofagov s pomočjo sterilnih vatiranih palčk

Iskanje bakteriofagov smo nadaljevali s poskusom izolacije iz človeške kože in sluznice. Prostovoljci so si s sterilno vatirano palčko podrgnili po koži (roke, obraz in koža za ušesi) in jo potopili v 1 ml SM pufra. To smo inkubirali preko noči v hladilniku pri 4 °C. Vzorce smo dvakrat centrifugirali (9000 g, 10 min), tako da so posedli trdni delci in morebitne bakterije. S pripravljenimi vzorci smo naredili spot assay z vsemi kulturami, ki smo jih imeli na voljo.

Podobno smo naredili pri vzorčenju iz nosne votline – prostovoljci so si s sterilnimi palčkami podrgnili po nosni votlini, tako da smo od vsakega pridobili po 2 vzorca (paralelki). Eno od paralelk smo pomočili v pufer SM in inkubirali preko noči v hladilniku (4 °C), drugo pa v gojišče TSB in inkubirali pri 37 °C, pri čemer so se namnožile naravno prisotne bakterije. Iz istih vzorcev pa smo tudi izolirali seve SeC1 – SeC10. Naslednji dan smo vzorce dvakrat centrifugirali pri 9000 g, tako da so posedli trdni delci in morebitne bakterije. S pripravljenimi vzorci smo naredili spot assay z vsemi kulturami, ki smo jih imeli na voljo. Naknadno smo pridobili še 27 različnih vzorcev nosnih votlin drugih oseb in z njimi po inkubaciji v pufru SM naredili spot assay na vseh 13 sevih *S. epidermidis*.

3.2.7.6 Spiranje nosne votline s fiziološko raztopino in vzorčenje človeškega znoja

Nosne votline prostovoljcev smo spirali z 10 ml fiziološke raztopine in vzorec spiranja ujeli v centrifugirko. Temu je sledilo dvakratno centrifugiranje pri 9000 g (10 min). Zbirali in centrifugirali smo tudi znoj, nato pa te vzorce prav tako uporabili za spot assay na vseh 13 sevih *S. epidermidis*.

Tudi pri teh vzorcih naredili tudi obogatitev vzorcev. Filtriranemu vzorcu smo ločeno dodali 2 seva bakterij, in sicer SeC1 in SeV1 po protokolu za obogatitev vzorcev, ki je bil enak kot pri obogatitvi vzorcev odpadnih voda. Po končani inkubaciji smo bakterije odcentrifugirali (9000 g, 10 min), supernatant pa filtrirali in ga uporabili za spot assay.

3.2.8 Postopek čiščenja bakteriofagov

Z vsemi vzorci smo naredili spot assay na vseh kulturah, ki smo jih imeli na voljo. Po 24 h inkubaciji plošč pri 37 °C smo pri vzorcih, kjer je nastala cona lize, le-to odvzeli s pomočjo plastične cepilne zanke in jo prenesli v mikrocentrifugirko, v katero smo predhodno odpipetirali 100 µl pufra SM in jih inkubirali preko noči (24 h) v hladilniku pri 4 °C. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali (9000 g, 10 min). S supernatantom smo naredili metodo plakov (angl. *plaque assay*), cilj katere je bil pridobiti posamezne plake.

Najprej smo pripravili kulturo za plošče s konfluentno rastjo bakterij po enakem postopku, kot je opisana v poglavju spot assay. Nato smo pripravili vzorce: naredili smo 10-kratne redčitve vzorcev v pufru SM in od vsake redčitve odvzeli 100 µl, označili in shranili v hladilniku do uporabe. Pripravljeno kulturo smo premešali in po 100 µl dodali vzorcem (100 µl faga + 100 µl kulture), mešanico smo vortekstirali in inkubirali 15 min pri 37 °C. Nato smo celotni volumen (200 µl) odpipetirali v 3 ml mehkega gojišča TSB, vorteksirali in razlili na petrijevo ploščo premera 70 mm. Plošče smo predhodno označili, po tem ko se je mehki agar strdil, pa smo plošče inkubirali pri 37 °C, 18 – 24 h, aerobno. Naslednji dan smo plošče pregledali, če so kje nastali plaki, nato pa poiskali redčitev, kjer so bili plaki dovolj ločeni drug od drugega. S konico pipetnega nastavka smo 1 plak prenesli v 100 µl pufra SM in pustili v hladilniku preko noči. Nato smo ostanek gojišča odcentrifugirali in ponovili metodo plakov s supernatantom. Postopek smo ponovili trikrat, da lahko trdimo da gre za 1 sev faga in ne mešanico večih.

3.2.9 Namnoževanje fagov, ugotavljanje titra in priprava delovne banke izoliranih bakteriofagov

Naslednji korak po čiščenju bakteriofagov je njihova namnožitev, saj za karakterizacijo potrebujemo večji volumen in število fagov. Postopek namnožitve je zelo podoben metodi plakov, le da je cilj pridobiti plošče, prekrite s conami lize (konfluentne plošče). Na takšne plošče smo dodali 3 ml svežega pufra SM, jih oblepili s parafilmom in inkubirali pri sobni temperaturi z rahlim mešanjem. Po 4 h inkubacije smo SM z eluiranimi bakteriofagi odpipetirali v 15 ml centrifugirko in centrifugirali (9000 g, 10 min), da smo se znebili celic in ostankov gojišča. Bakteriofage smo filtrirali skozi 0,22 µm filter, da smo se izognili bakterijski okužbi in jim ugotovili titer. Tako pripravljeno delovno banko smo razdelili po vialah za zamrzovanje, jih označili in shranili pri – 86 °C do uporabe.

Ugotavljanje titra bakteriofagov je potekalo s pomočjo metode plakov. Postopek je bil enak kot pri čiščenju bakteriofagov. Po inkubaciji smo plošče pregledali in poiskali redčitve, pri katerih so bili plaki števni. To pomeni, da je število plakov med 30 in 300. Število plakov smo vpisali v obrazec za metodo plakov, končni titer bakteriofagov v PFU/ml (2) pa smo izračunali kot povprečje N pri vseh števnih ploščah pri različnih redčitvah.

Formula za izračun titra fagov (angl. *phage forming units/ml – PFU/ml*):

$$N = \frac{\Sigma C * R}{0,01} \quad \dots (2)$$

Pri tem pomeni N koncentracijo bakteriofagov podano v PFU/ml, ΣC predstavlja povprečje vsote plakov (v primeru, da imamo paralelke), R pa redčitev. 0,01 predstavlja volumen vzorca v ml.

3.2.10 Fiziološka in morfološka karakterizacija bakteriofagov

Na tej stopnji so se bakteriofagi razlikovali le v kulturi, na kateri smo jih namnoževali ter glede na vzorec, iz katerega smo jih izolirali. Nekateri bakteriofagi so se med seboj razlikovali tudi po velikosti plakov, ki so nastali na ploščah s konfulentno rastjo. Plake smo opisali glede na njihovo morfologijo: zelo majhni, majhni, srednje veliki, veliki in zelo veliki plaki.

3.2.10.1 Priprava mrežic za presevno elektronsko mikroskopijo (TEM)

Na naparjeno stran bakrene mrežice smo nanesli 20 µl suspenzije bakteriofagov in jo inkubirali 5 min. Mrežico smo posušili na filter papirju in jo sprali s 3 ml deionizirane vode. Na mrežico smo dodali eno kapljico 1 % uranil acetata in jo do suhega posušili na filter papirju pri sobni temperaturi. Vzorce so pregledali na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

3.2.10.2 Ugotavljanje nabora gostiteljev

Zanimalo nas je, koliko različnih sevov so izolirani bakteriofagi sposobni lizirati. To smo preverili z metodo spot assay, tako da smo najprej pripravili plošče s konfuletno rastjo vseh kultur, nanje pa ločeno nanesli po 10 µl bakteriofagov. Negativno kontrolo je predstavljal pufer SM. Pred spot assayem smo vse bakteriofage razredčili na podoben titer in sicer od $9,00 \times 10^6$ do $2,00 \times 10^7$ PFU/ml. Spot assay smo delali v paralelkah (vsak fag smo odpipetirali dvakrat). Po inkubaciji (24 h) smo ocenili cone lize od 0 do 4, glede na njihovo intenziteto oziroma prosojnost. 0 je pomenila, da je fag kulture ne lizira, 4 pa popolno lizo – cona liza je popolnoma prosojna. Rezultat nabora gostiteljev predstavlja tabela vseh kombinacij fag/sev z ocenami con lize, kjer so te nastale.

3.2.10.3 Ugotavljanje litičnosti/lizogenosti bakteriofagov

Naprej smo z vsemi fagi naredili metodo plakov na kulturah, s pomočjo katerih so bili izolirani. Nato pa smo iz posameznega plaka poskusili vzgojiti bakterijsko kulturo. S konico pipetnega nastavka smo iz plaka prenesli nekaj trdnega gojišča v sveže tekoče

gojišče in inkubirali pri 37 °C, aerobno. Če je kultura zrastla, smo (ko je njen OD 600 nm dosegel 0,140) naredili metodo plakov z enakim bakteriofagom. Naslednji dan smo opazovali, ali so nastali plaki. Ta test smo naredili za bakteriofage a, e, k, m, n, p, s, u, v in z.

3.2.11 Genetska karakterizacija bakteriofagov

3.2.11.1 Izolacija bakteriofagne DNK v agaroznih blokcih

Izolacijo fagne DNK v agaroznih blokcih smo izvedli po protokolu, ki je bil optimiziran v podjetju COBIK. Agarozne blokce, v katerih je bila nerazgrajena DNK, smo uporabili za gelsko elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (PFGE) ter restriktionsko analizo.

Protokol za pripravo agaroznih blokcev s fagno DNK

- Pripravili smo 250 µl fagne suspenzije in ji dodali encima DNaza (do koncentracije 25 µg/ml) in RNaza (do koncentracije 0,1 mg/ml) in inkubirali 1 h pri 37°C.
- Naredili smo PCR za gen 16S rRNK in izvedli gelsko elektroforezo, s čimer smo preverili prisotnost bakterijske DNK. V primeru pozitivnega PCR-ja, smo postopek z encimi ponovili.
- Inkubirali smo vzorce pri 75 °C, 10 min, da smo inaktivirali aktivnost DNaze in RNaze.
- Pripravili smo 2 % agarozo za pripravo agaroznih blokcev v pufru 1 x TE s pH 8 in jo do uporabe shranili v vodni kopeli pri 56 °C.
- Odpipetirali smo 200 µl agaroze k 200 µl suspenzije bakteriofagov. Počasi smo premešali in odpipetirali v plastične nastavke za pripravo blokcev.
- Ko so se blokci strdili (10 min v hladilniku pri 4 °C), smo jih prenesli v 15 ml centrifugirke v katerih je bil 1 ml pufra za lizo fagov. Blokce smo inkubirali preko noči v vodni kopeli pri 56 °C.
- Naslednji dan smo blokce sprali v pufru za spiranje z dodatkom 1 mM PMSF in jih v tem pufru inkubirali 1,5 h pri sobni temperaturi z rahlim mešanjem.
- Sledilo je še spiranje v pufru za spiranje in sicer 4-krat po 20 min z mešanjem (600 rpm).
- V pufru za spiranje smo shranili blokce in jih do uporabe postavili v hladilnik (4 °C).
- Preden smo naredili gelsko elektroforezo v pulzirajočem električnem polju, smo izolacijo fagne DNK preverili s klasično agarozno elektroforezo, pri kateri smo na gel nanesli približno 1 mm širok košček agaroznega blokca.

3.2.11.2 Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE) ter ocena velikosti genomov

Izolirano fagno DNK smo najprej analizirali s pomočjo elektroforeze v pulzirajočem električnem polju.

Protokol za izvedbo PFGE:

- Pripravili smo 2 l 0,5 x TBE pufra, ki smo ga potrebovali za elektroforezo ter za pripravo 100 ml agaroznega gela, za katerega smo uporabili agarozo, namenjeno za PFGE. Pripravili smo ga na enak način kot gel za običajno elektroforezo; agarozo smo raztopili v pufru s pomočjo segreganja v mikrovalovni pečici.
- Tekočo agarozo smo vlili v okvirček, nekaj ml pa smo shranili. Elektroforezni pufer smo zlili v banjico in ga ohladili na 14 °C.
- Po 30 min smo strjen gel vstavili v banjico in v luknjice naložili za 1 mm širok košček agaroznega blokca, tako da se je ta držal notranjega in dna žepka.
- Preostali prostor smo zapolnili s preostalo agarozo, nato pa zagnali elektroforezo.
- Začetni in končni pulzni čas sta bila 1 oziroma 8 s, elektroforeza je potekala 12 h, napetost je bila 6 V/cm, kot spreminjača toka pa je bil 120°. Temperatura, pri kateri je elektroforeza potekala, je bila 14 °C.
- DNK v gelu smo po končani elektroforezi pobarvali s SybrGold (45 min, s stresanjem).

Uporabili smo velikostni standard (Concatemer CHEF DNA Size Standard, Biorad), drugega pa smo pripravili sami: najprej smo naredili agarozni blokec, kateri je vseboval že čisto (kupljeno) DNK bakteriofaga Lambda. Sledila je restrikcija DNK v agaroznem bloku z encimom *HindIII* (protokol je opisan v nadaljevanju). S pomočjo spletnne aplikacije NEBCutter V2.0 smo si ogledali, kako veliki so nastali kosi DNK bakteriofaga Lambde. Natančne velikosti fragmentov smo potrebovali za izračun enačbe funkcije.

3.2.11.3 Cepitev fagne DNK z restrikcijskimi endonuklazami v agaroznih blokcih

Odločili smo se, da preverimo kakšen je restrikcijski profil DNK bakteriofagov, ter ali jih lahko glede na to lastnost ločujemo med seboj, pri čemer smo uporabili encim *HindIII*, proizvajalca ThermoScientific.

Protokol za cepitev DNK v agaroznih blokcih:

- Odrezali smo 2 mm širok košček agaroznega blokca s fagno DNK, ga prenesli v mikrocentrifugirko in mu dodali 200 µl 1 x pufra za restrikcijo.
- Nežno smo premešali in inkubirali 30 min pri sobni temperaturi.
- Po 30 minutah smo pufer odpipetirali, agaroznemu blokcu pa dodali restrikcijsko mešanico: 10 µl 10x restrikcijskega pufra, 80 µl deionizirane vode in 10 µl encima *HindIII* (100 enot encima/vzorec)
- Blokce smo v restrikcijskih mešanicah inkubirali preko noči (24 h) pri 37 °C.
- Naslednji dan samo naredili običajno gelsko elektroforezo, kjer smo agarozni blokec previdno prenesli v luknjice agaroznega gela. Elektroforeza je tekla 2,5 h, pri napetosti 100 V. Preprečili smo pregrevanje pufra s tem, da smo pod banjico postavili led.

3.2.11.4 Izolacija bakteriofagne DNK s fenol-kloroformno ekstrakcijo

Izolacijo fagne DNK smo izvedli po protokolu, ki je bil optimiziran v podjetju COBIK (Priloga A). Bakteriofagno DNK smo potrebovali za potrebe PCR-jev.

3.2.11.5 Pomnoževanje gena za integrazo in druge bakteriofagne gene

Enako kot pri preverjanju, ali ta gen vsebujejo naši bakterijski sevi, smo tudi pri bakteriofagih uporabili dva para oligonukleotidov za integrazni gen, ki so ga načrtovali Gutierrez in sodelavci. Uporabili smo enake reakcijske pogoje in program PCR. Pomnožke, ki so nastali pri PCR-ju, smo očistili in poslali na sekvenciranje, ter poravnali sekvence z orodjem BLAST.

Poleg gena za integrazo (2 različna para oligonukleotidov), smo izvedli PCR še za štiri druge bakteriofagne sekvence, ki so jih načrtovali Pantuček in sodelavci (Pantuček in sod., 2004). Enake oligonukleotide (SGA1 in SGA2, SGB1 in SGB2 ter SGF1 in SGF2) smo uporabili tudi za iskanje profagnih sekvenc pri bakterijah, vendar smo pri bakteriofagih uporabili še oligonukleotide za gen, specifičen za fage, podobne Twort. Twort-likevirus je rod, ki sodi v poddržino Spounavirinae družine Myoviridae. SGA, SGB in SGF so sekvence, specifične za družino Siphoviridae, pomnožek SGD pa za družino Myoviridae.

Par oligonukleotidov, specifičnih za družino Myoviridae, sta SGD1 in SGD2, ki pomnožujeta gen, specifičen za fage, ki so podobni fagu Twort (angl. *Twort-like phages*). Velikost pomnožka je 331 bp, gre pa za gen, ki kodira veliki protein kapside (angl. *major capsid protein*).

Zaporedji oligonukleotidov:

- SGD1: 5'-TGG GCT TCA TTC TAC GGT GA-3'
- SGD2: 5'-GTA ATT TAA TGA ATC CAC GAG AT-3'.

Uporabili smo enake reakcijske pogoje in program PCR kot pri delu z bakterijsko DNK. Produkte PCR smo nanesli na agarozni gel ter izvedli elektroforezo.

3.2.12 Pregled vseh ugotovljenih lastnosti izoliranih fagov

Oblikovali smo preglednico, v kateri so predstavljene lastnosti izoliranih bakteriofagov. Zaradi boljše preglednosti smo pri naboru gostiteljev in restikcijskem profilu genoma uporabili različne barve. Na podlagi teh lastnosti smo izolirane bakteriofage združili v nekaj skupin, ki so povezani z njihovim izvorom.

3.2.13 Sekvenciranje genoma bakteriofaga v in bioinformacijska analiza sekvence

Izolirali smo bakteriofagno DNA, po protokolu za izolacijo, ki je bil optimiziran v podjetju COBIK (Priloga 1). Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja je za nas opravilo podjetje Mycosynth (Švica) z napravo Illumina MiSeq, ki za sekvenciranje genomov uporablja visoko zmogljivo tehniko, pri kateri kot rezultat dobimo večje število prekrivajočih se krajših sekvenc DNK.

S pomočjo bioinformacijskih orodij Nextclip, Velvet in Prokka smo sestavili in anotirali sekvenco bakteriofaga v. V preglednici smo predstavili splošne podatke o njegovem genomu. Naredili smo primerjavo vseh genov in proteinov z objavljenimi genomi vseh znanih sekvenciranih za stafilokoke specifičnih bakteriofagov iz podatkovnih zbirk (76), pri čemer smo si pomagali z bioinformacijskim orodjem BLAST. V terminal operacijskega sistema Linux smo vpisali 2 ukaza:

- Za pridobitev primerjave nukleotidnih zaporedij vseh genov: blastn -db staph_fagi_nukl -query Staph_fag.ffn -outfmt 7 -eval 1e-10 -out Staph_fag_blastrez_nukl -max_target_seqs 10
- Za pridobitev primerjave aminokislinskih zaporedij vseh proteinov: blastp -db staph_fagi_prot -query Staph_fag.faa -outfmt 7 -eval 1e-10 -out Staph_fag_blastrez_prot -max_target_seqs 10

4 REZULTATI

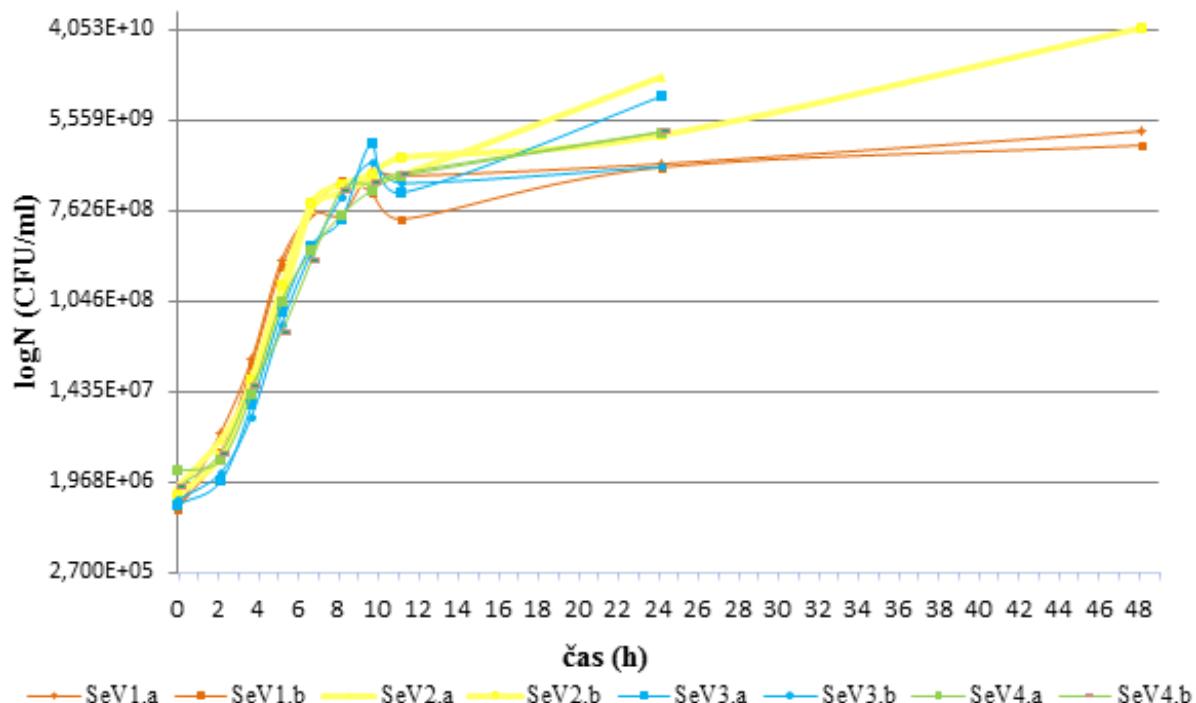
V prvem delu raziskovalne naloge smo ugotovili lastnosti bakterij, ki smo jih imeli na voljo; to so bili 4 klinični sevi *S. epidermidis*. Seve smo revitalizirali, namnožili in shranili v zamrzovalnik (- 86 °C), kar je bila naša delovna banka. Sledilo je ugotavljanje rastne krivulje, hkrati pa tudi izolacija dodatnih sevov. Odločili smo se vzorčenje iz nosne votline, od koder smo pridobili še nekaj sevov *S. epidermidis*. Tudi te smo po opisanih postopkih očistili, namnožili in shranili do nadaljnega dela.

Sledilo je potrjevanje identitete izoliranih in že prej pridobljenih sevov s pomočjo genetskih in molekularnih metod, nato pa smo optimizirali postopek priprave plošč s konfluentno rastjo, da smo se lahko lotili izolacije bakteriofagov. Poskusili smo z metodami za indukcijo morebitnih profagov, nato pa smo se lotili izolacije bakteriofagov predvsem iz vzorcev, v katerih smo pričakovali tudi njihove gostitelje.

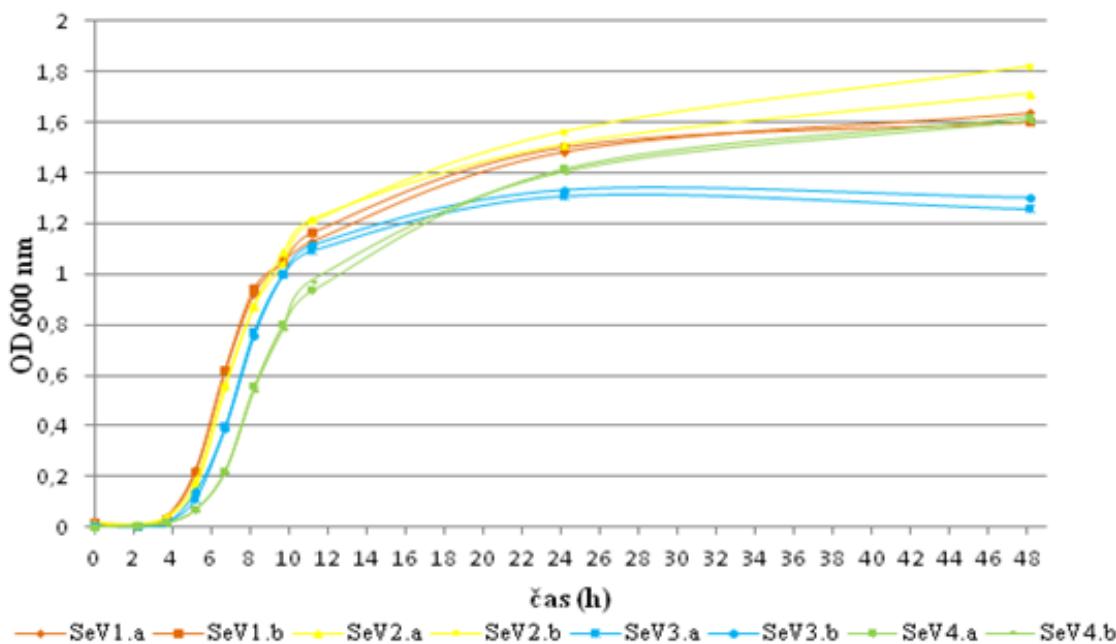
Po uspešni izolaciji in čiščenju bakteriofagov, smo le-te namnožili ter jih morfološko in genetsko preučili. Na koncu smo izbrali enega od izoliranih bakteriofagov, izolirali njegovo DNK in poslali na sekvenciranje njegov genome in ga analizirali.

4.1 RASTNA KRIVULJA ŠTIRIH SEVOV *S. epidermidis*

Za 4 seve *S. epidermidis* smo naredili umeritveno krivuljo tako, da smo vsako uro in pol (do 12 h, nato pa še po 24 h in 48 h) vzorčili in v paralelkah merili OD pri 600 nm, hkrati pa tudi ugotavljali CFU/ml (v treh paralelkah). Za izris obeh grafikonov smo uporabili povprečja paralelek (Sliki 4 in 5). Zaradi napake pri delu pri dveh sevih nismo pridobili podatkov za CFU/ml po 48 h inkubacije. V prilogi B so podani podatki merjenj optične gostote in CFU/ml.



Slika 4: Rastna krivulja 4 sevov *S. epidermidis* v paralelkah (CFU/ml).



Slika 5: Rastna krivulja 4 sevov *S. epidermidis* v paralelkah (OD 600 nm)

Iz grafov (sliki 4 in 5) lahko ocenimo, da vsi 4 sevi preidejo iz faze prilaganja v eksponentno fazo rasti po 4 urah. Eksponentna faza se zaključi po 10 – 12 h od začetka inkubacije. Iz slike 5, ki prikazuje odvisnost optične gostote pri 600 nm v odvisnosti od časa, vidimo, da ta tudi po 46 h še vedno narašča pri vseh kulturah, razen pri sevu SeV4. Ta sev se je tudi pri nadalnjem delu izkazal za najpočasneje rastočega. Faza odmiranja torej nastopi kasneje. Za delo s kulturo v zgodnji eksponentni fazi rasti smo izbrali čas po približno 4 urah, ko OD 600 nm doseže 0,140, za delo s kulturo v stacionarni fazi rasti pa čas po 20 h.

4.2 IZOLACIJA BAKTERIJ *S. epidermidis*

Na trdnem gojišču TSA so nastale kolonije, ki smo jih dvakrat precepili, da smo zagotovili čistost kultur, nato pa smo opisali morfologijo kolonij na trdnem gojišču TSA in opazovali, kako hitro rastejo v tekočem gojišču. Razen pri sevu SeC3, je tekoče gojišče postalo motno po približno enakem času kot pri sevih SeV1, SeV2, SeV3 in SeV4. Seve smo po enakem postopku kot za klinične seve namnožili v tekočem gojišču in shranili v zamrzovalnik.

Preglednica 5: Nabor izoliranih bakterij z opisom morfologije kolonij

Laboratorijsko ime seva	Kraj in datum izolacije	Izvor (izolacija)	Morfološki opis kolonij
SeC1	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 1	bele, zelo majhne kolonije
SeC2	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 2	bele, majhne kolonije
SeC3	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 2	krem, malo večje kolonije
SeC4	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 3	belo-prozorne kolonije
SeC5	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 4	bele, majhne kolonije

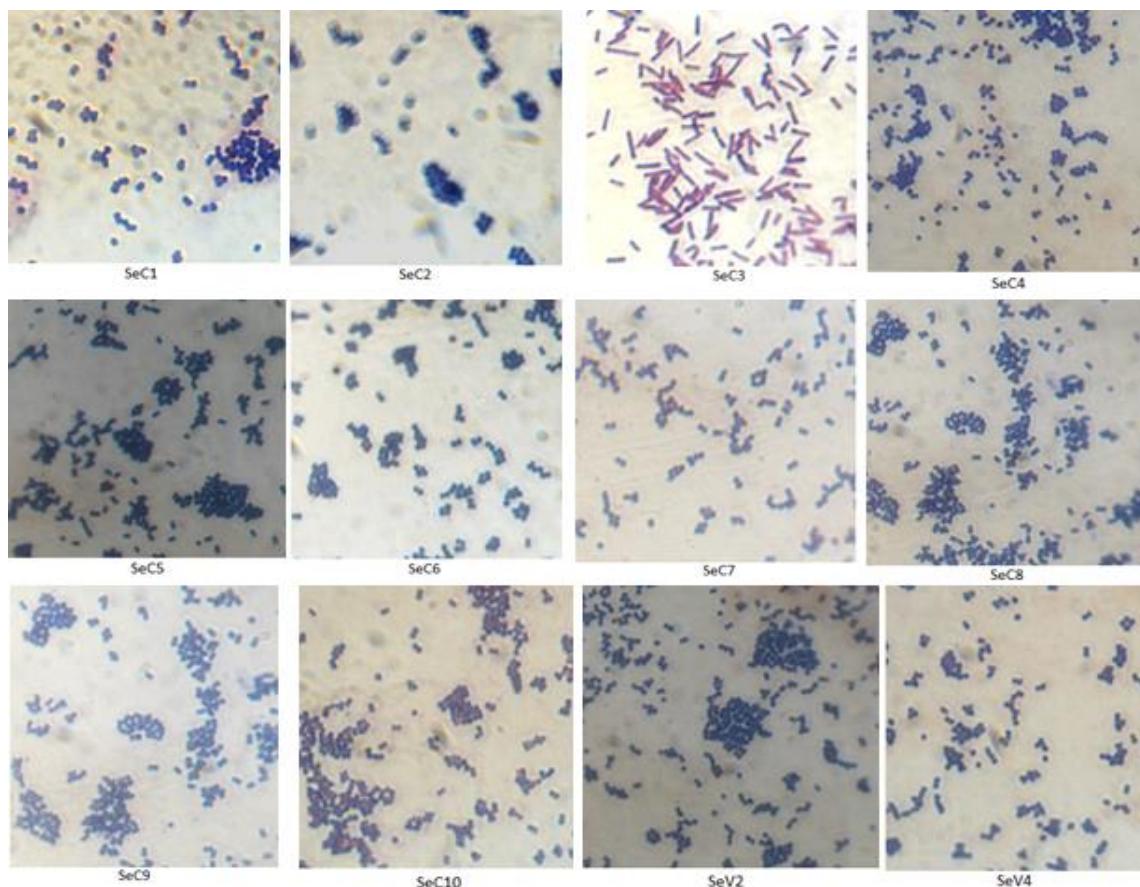
Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 5: Nabor izoliranih bakterij z opisom morfološke kolonije

Laboratorijsko ime seva	Kraj in datum izolacije	Izvor (izolacija)	Morfološki opis kolonij
SeC6	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 5	bele, majhne kolonije
SeC7	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 6	bele, srednje velike kolonije
SeC8	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 7	belo-prozorne, majhne kolonije
SeC9	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 8	bele, srednje velike kolonije
SeC10	Ljubljana, 10.4.2013	nosna votlina – oseba 9	belo-prozorne, majhne kolonije

4.2.1 Barvanje po Gramu

S pomočjo kupljenega kompleta za barvanje po Gramu (Gram-bacteria Staining, Merck Millipore) smo naše seve pobarvali, uporabili pa smo tekoče kulture v stacionarni fazi rasti. Pripravljene preparate smo si ogledali z mikroskopom in jih fotografirali.



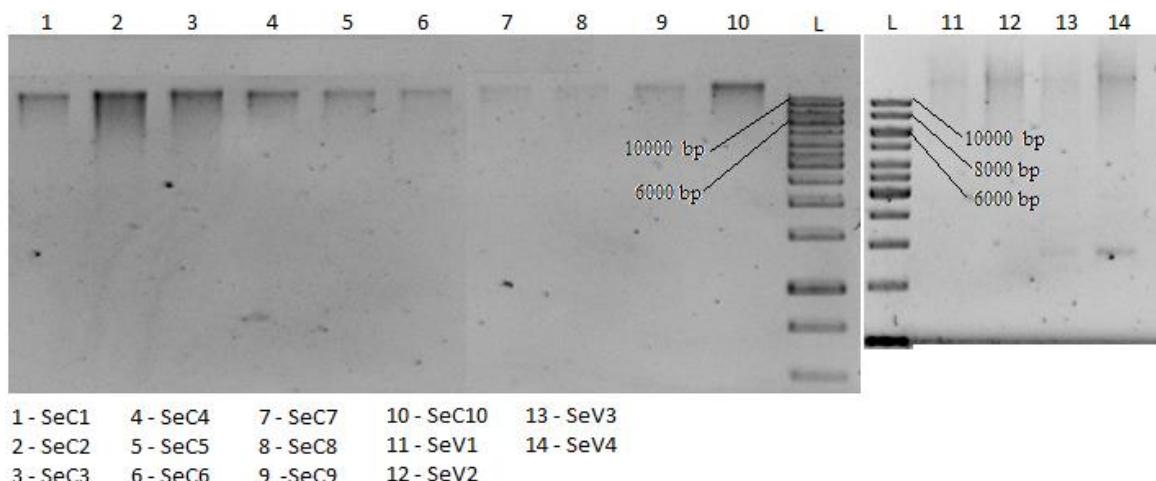
Slika 6: Slike po Gramu pobarvanih sevov

Vsi sevi so se obarvali modro, torej spadajo v skupino po Gramu pozitivnih bakterij. Celice so bile približno enake velikosti in oblike, prav tako so se vse združevale v pare ali skupke. Izbema je bil sev SeC3, za katerega smo po obliku sklepali, da gre za bakterijo rodu *Bacillus*. SeV1 in SeV3 sta bila podobna ostalim sevom, vendar nista prikazana na zgornji sliki (Slika 6).

4.3 DOLOČANJE IN POTRJEVANJE IDENTITETE SEVOV

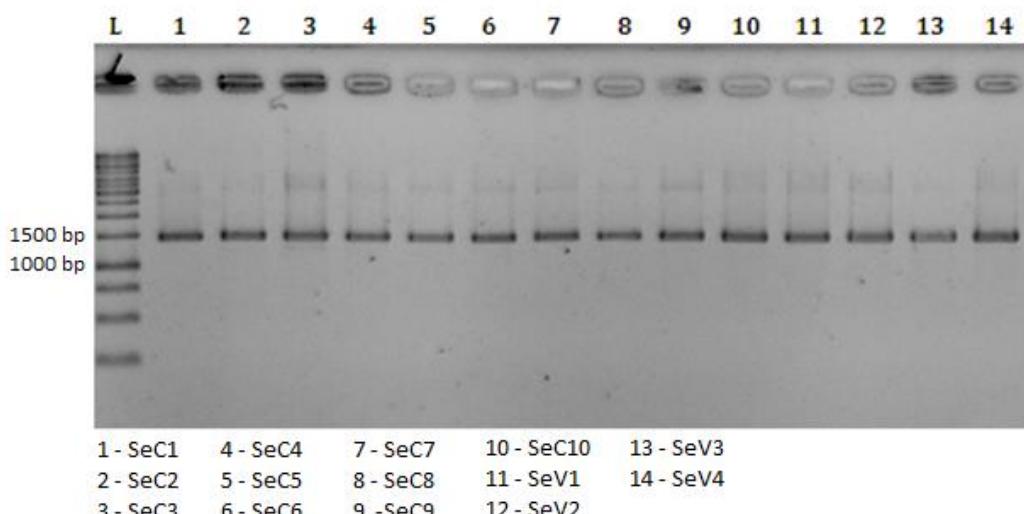
4.3.1 Izolacija bakterijske genomske DNK in sekvenciranje pomnožkov PCR gena 16S rRNK

Najprej smo bakterije namnožili in izolirali njihovo DNK. Uspešnost izolacije smo preverili s pomočjo agarozne elektroforeze (Slika 7). Na gel smo nanesli 5 µl vzorca in pustili elektroforezo teči 1 h pri napetosti 100 V. Gel smo pobarvali v etidijevem bromidu. Uporabljen je bil dolžinski standard velikosti 10000 bp (GeneRuler 1kb DNA Ladder).



Slika 7: Izolirana DNK sevov, ki smo jih izolirali in kliničnih sevov

Pri vseh vzorcih je izolacija gDNA bakterij uspela, čeprav z razlikami v izkoristkih. Sledil je PCR, s katerim smo pomnožili gen za 16S rRNK. Pomnožek smo očistili s komercialnim kompletom (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen); poslali na sekvenciranje, nato pa s pomočjo sekvence gena seve uvrstili v filogenetsko drevo. Na sliki 8 je očiščena DNA, pridobljena s PCR (5 µl vzorca) vseh 14 bakterij. Elektroforeza je tekla 30 minut pri napetosti 100 V, čemur je sledilo barvanje v etidijevem bromidu.



Slika 8: Očiščen PCR pomnožek za gen 16S rRNK bakterij

4.3.2 Izris filogenetskega drevesa

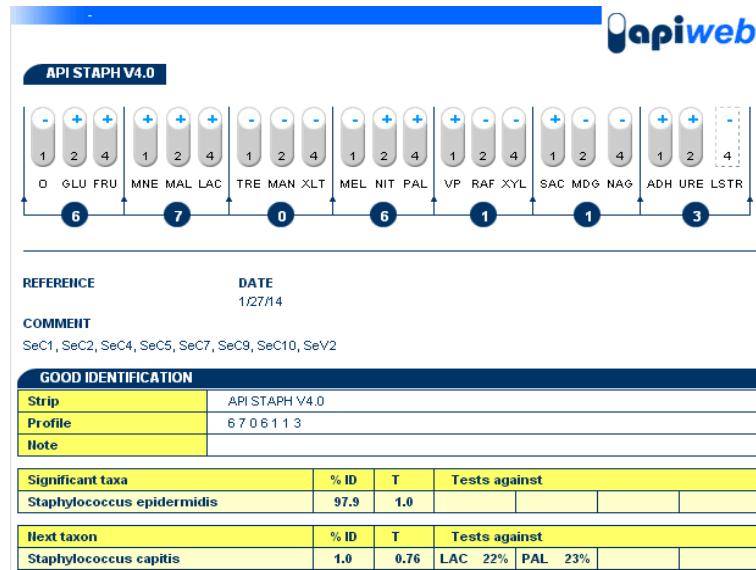
Pridobljene sekvene gena za 16S rRNK smo najprej primerjali z drugimi nukleotidnimi sekvencami – analiza z orodjem BLAST, da smo dobili podatek o rodu, v katerega sevi spadajo. Pri izolatu SeC3 sta bila najpogosteša najdena zapisa *Bacillus subtilis* in *Bacillus licheniformis*, torej smo lahko SeC3 izločili iz nadaljnega dela. Pri ostalih sevih je bil najpogosteši zadetek *S. epidermidis*. S spletni strani podatkovne baze SILVA (SILVA, 2014) smo prenesli vse sekvene za gen 16S rRNK za bakterije rodu *Staphylococcus* in s programom MEGA 5.2 izrisali filogenetsko drevo, v katerega smo vključili naše seve (razen SeC3). Za uvrstitev naših sevov v filogenetsko drevo smo uporabili več različnih substitucijskih modelov in algoritmов združevanja v gruče, vendar so si bila filogenetska drevesa med seboj zelo podobna. Na sliki 9 je prikazano filogenetsko drevo, izrisano s pomočjo metode največje verjetnosti (angl. *maximum likelihood*) in nukleotidnega substitucijskega modela Tamura-Nei. Zanesljivost izračunanega filogenetskega drevesa smo preverili s testom vezanja (angl. *bootstrap*), pri čemer je bilo naključno generiranih 500 ponovitev. Števila, prikazana ob razvezitvah so odstotki (bootstrap vrednost), ki povedo, v kakšni meri sovpadata originalno izračunano filogenetsko drevo in drevo z generiranimi vzorci.



Slika 9: Del filogenetskega drevesa rodu *Staphylococcus* z izoliranimi sevi (13)

4.3.3 Potrditveni test API STAPH

Pri naboru miniaturiziranih biokemijskih testov API STAPH (BioMerieux) določamo vrste rodu *Staphylococcus* glede na njihov metabolizem. Držali smo se navodil proizvajalca testa, podatke vnesli v računalniški program Apiweb in kot rezultat dobili verjetnost (v odstotkih) za katero vrsto gre.



Slika 10: Primer rezultata biokemijskega testa API STAPH, kot ga izpiše program Apiweb

Pri vseh sevih (razen SeC3, ki ga v test nismo vključili) smo dobili več kot 87 % verjetnost, da gre za *S. epidermidis*, zato smo jih pri nadaljnjem delu tudi tako obravnavali. V prilogi C so prikazane slike biokemijskega testa API STAPH za 10 sevov.

4.4 PRIPRAVA PLOŠČ S KONFLUENTNO RASTJO SEVOV ZA DELO S FAGI

Poskusili smo s tremi različnimi protokoli za pripravo plošč s konfluentno rastjo sevov. Rast na ploščah, pripravljena po 1. in 2. protokolu, je bila preveč intenzivna, zato smo za nadaljnje delo izbrali 3. protokol, saj je bila tu kultura v eksponentni fazi rasti, optična gostota pa dovolj nizka (0,140), da rast bakterij na plošči ni bila preveč intenzivna.

Preglednica 6: CFU/ml kultur, pripravljenih po 3. protokolu za plošče s konfluentno rastjo sevov

Sev	Redčitev	Število kolonij	CFU/ml (povprečje)	Sev	Redčitev	Število kolonij	CFU/ml (povprečje)
SeV1	10.maj	18	$2,50 \times 10^8$	SeV3	10.maj	24	$2,48 \times 10^8$
	10.maj	22			10.maj	25	
	10.maj	20			10.maj	20	
	10.jun	2			10.jun	2	
	10.jun	3			10.jun	3	
	10.jun	5			10.jun	3	

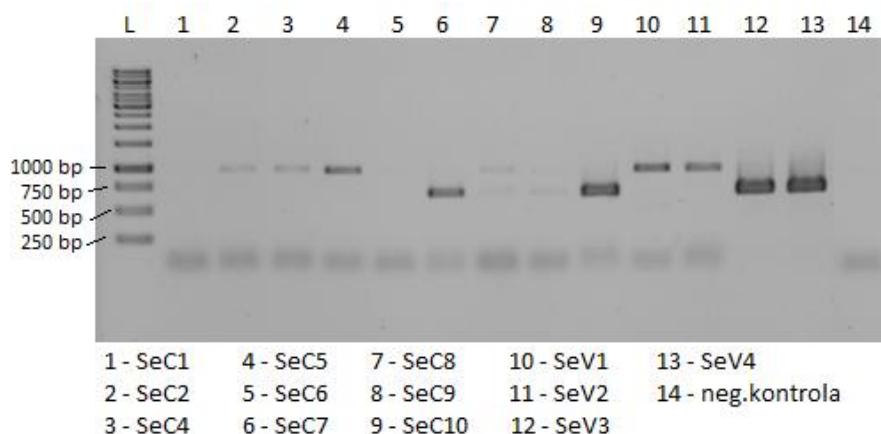
Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 6: CFU/ml kultur, pripravljenih po 3. protokolu za plošče s konfluentno rastjo sevov

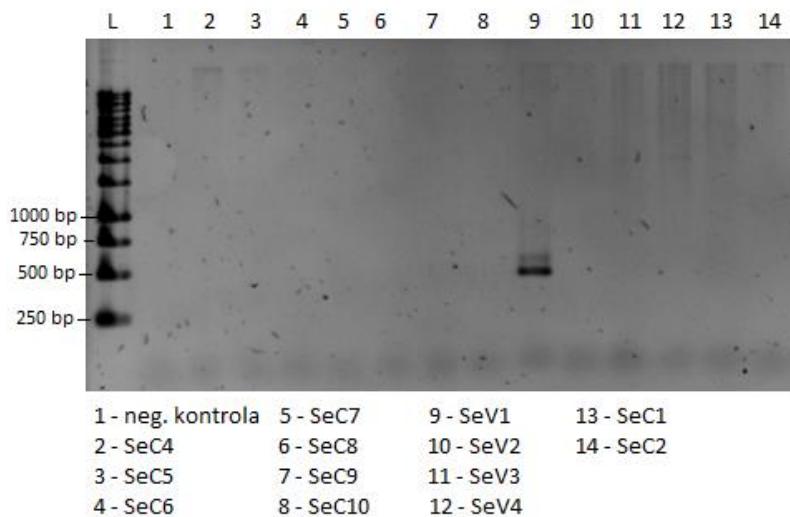
Sev	Redčitev	Število kolonij	CFU/ml (povprečje)	Sev	Redčitev	Število kolonij	CFU/ml (povprečje)
SeV2	10.maj	24	$2,65 \times 10^8$	SeV4	10.maj	24	
	10.maj	24			10.maj	30	
	10.maj	21			10.maj	27	$3,52 \times 10^8$
	10.jun	3			10.jun	5	
	10.jun	3			10.jun	4	
	10.jun	3			10.jun	5	

4.5 PREVERJANJE PRISOTNOSTI PROFAGOV

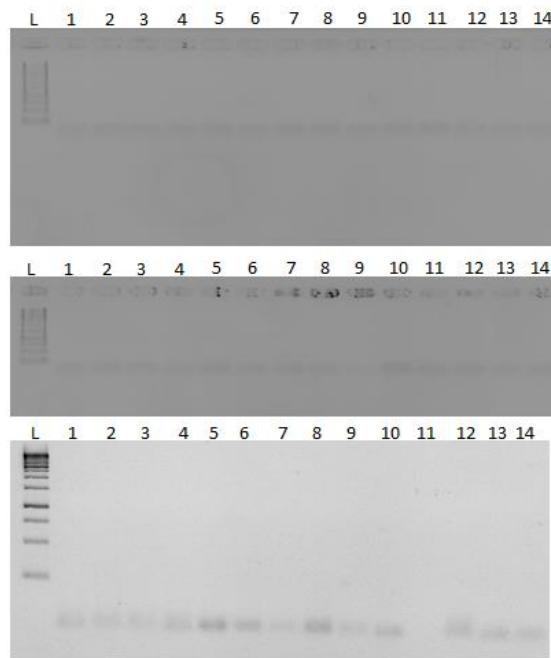
Gen za integrizo smo pri bakterijah poskusili pomnožili z dvema setoma začetnih oligonukleotidov (Intphi5-1 in Intphi5-2 ter Intphi 7-1 in Intphi 7-2) (sliki 11 in 12). Pogoji elektforeze pri so bili: čas – 45 min, napetost – 100 V, barvanje z barvilkom SybrGold (Life Technologies). Volumen nanesenega vzorca je bil 5 µl.



Slika 11: Pomnoževanje gena za integrizo z začetnima oligonukleotidoma Intphi5-1 in Intphi 5-2 (660 bp)



Slika 12: Pomnoževanje gena za integrazo z začetnima oligonukleotidoma Intphi7-1 in Intphi 7-2 (470 bp). Iz slike 11 lahko vidimo, da bi ta gen lahko vsebovali sevi SeC7, SeC8, SeC9, Se10, SeV3 in SeV4, pri sliki 12 pa je pomnožek viden pri sevu SeV1. Preverili smo še ali naši sevi vsebujejo še tri druge bakteriofagne sekvene, tako da smo le-te pomnožili z začetnimi oligonukleotidi SGA 1 in 2, SGB 1 in 2, SGF 1 in 2. Elektroforeza je potekala 30 min pri napetosti 100 V. Gel smo pobarvali z barvilkom SybrGold. Na agaroznem gelu ni bilo pomnožkov (slika 13).



1 - SeC1	4 - SeC5	7 - SeC8	10 - SeV1	13 - SeV4
2 - SeC2	5 - SeC6	8 - SeC9	11 - SeV2	14 - neg.kontrola
3 - SeC4	6 - SeC7	9 - SeC10	12 - SeV3	

Slika 13: Pomnoževanje za bakteriofage specifičnih sekvenc z začetnimi oligonukleotidi (od zgoraj navzdol) SGA 1 in 2 (744 bp), SGB 1 in 2 (405 bp) in SGF 1 in 2 (155 bp)

Prisotnost profagov smo poskusili preveriti tudi z metodo indukcije profagov s pomočjo dodatka mitomicina C. Rezultati poskusa so opisani pri poglavju o izolaciji bakteriofagov (4.6).

4.6 IZOLACIJA, ČIŠČENJE BAKTERIOFAGOV TER OPIS MORFOLOGIJE NJIHOVIH PLAKOV

Poskusili smo izolirati lizogene bakteriofage s pomočjo profagne indukcije z dodatkom mitomicina C (protokol opisan v poglavju 3.2.7.2), vendar na nobeni od plošč nismo opazili cone lize. Bakteriofage smo uspešno izolirali iz okolja na različne načine oziroma iz različnih tipov vzorcev. Pri nekaterih vzorcih so cone lize nastale pri velikem številu kultur. V tem primeru smo izbrali 1 ali 2 kulturi ter z njimi nadaljevali čiščenje.

4.6.1 Izolacija bakteriofagov iz odpadnih voda po obogativitvi na kliničnih izolatih

Obogatitev bakteriofagov smo naredili s štirimi sevi (SeV1, SeV2, SeV3 in SeV4), ki smo jih gojili v odpadni vodi, nato pa naredili spot assay na vseh 13 kulturah *S. epidermidis*. Na nekaterih ploščah so se pojavile cone lize, iz katerih smo uspešno izolirali in očistili 4 bakteriofage. Vsi izolirani bakteriofagi so povzročili nastanek con lize na sevu SeC2 in so izhajali iz istega vzorca odpadnih voda. Po prvem čiščenju smo si izbrali 4 posamezne plake, in jih ločeno očistili in namnožili. Možno je namreč, da gre za različne bakteriofage.

Preglednica 7: Bakteriofagi, izolirani iz vzorcev odpadnih voda po obogativitvi

Oznaka bakteriofaga	Vzorec	Sev, s pomočjo katerega smo fag izolirali	Opis plakov
a	vzorec odpadnih voda – obogatitev s sevom SeV3	SeC2	veliki plaki, zabrisan rob
b	vzorec odpadnih voda – obogatitev s sevom SeV3	SeC2	zelo veliki plaki, jasen rob
c	vzorec odpadnih voda – obogatitev s sevom SeV3	SeC2	zelo veliki plaki, jasen rob
d	vzorec odpadnih voda – obogatitev s sevom SeV3	SeC2	veliki plaki, jasen rob

4.6.2 Izolacija bakteriofagov iz komercialnih pripravkov bakteriofagov Enkophage in Intestiphage

Naredili smo spot assay z vsemi kulturami (13) in uspeli izolirati 8 bakteriofagov, enega od njih (f) pa nam po čiščenju ni uspelo namnožiti. Enako kot pri izolaciji iz odpadnih voda, smo tudi tukaj po prvem čiščenju pri nekaterih ploščah naključno izbrali nekaj plakov iz iste plošče (isti vzorec in sev), jih ločeno izolirali in jih obravnavali kot različne bakteriofage.

Preglednica 8: Bakteriofagi, izolirani iz vzorcev komercialnih pripravkov bakteriofagov

Oznaka bakteriofaga	Vzorec	Sev, s pomočjo katerega smo fag izolirali	Opis plakov
e	Enkophage	SeC2	majhni plaki
g	Intestiphage	SeC1	majhni plaki, zabrisan rob
h	Intestiphage	SeC1	majhni plaki, zabrisan rob
i	Enkophage	SeC1	majhni plaki, zabrisan rob
j	Enkophage	SeC1	zelo majhni plaki
k	Intestiphage	SeC2	srednje veliki plaki
l	Intestiphage	SeC2	majhni plaki

4.6.3 Poskus izolacije bakteriofagov iz kože in nosne votline pomočjo sterilnih vatiranih palčk

Imeli smo 3 vzorce iz površine človeške kože, s katerimi smo naredili spot assay na 4 kliničnih izolatih. Pri nobenem od sevov nismo opazili con lize. Vzorčili smo tudi nosne votline; imeli smo skupno 47 vzorcev, od teh jih je bilo 10 takšnih s predhodno obogativitvijo. Pri vseh vzorcih smo naredili spot assay, vendar con liz ni bilo.

4.6.4 Izolacija bakteriofagov iz vzorca spiranja nosne votline s fiziološko raztopino in vzorca znoja - z in brez obogativitve vzorcev na sevih SeC1 in SeV1

Naredili smo spot assay, pri katerem smo imeli 6 vzorcev: vzorec spiranja nosne votline, vzorec znoja, ter oba vzorca po obogativitvi na dveh različnih sevih *S. epidermidis*. Iz vzorcev nam je uspelo izolirati 10 bakteriofagov (preglednica 9).

Preglednica 9: Bakteriofagi, izolirani iz vzorcev spiranja nosne votline in znoja

Oznaka bakteriofaga	Vzorec	Sev, s pomočjo katerega smo fag izolirali	Opis plakov
m	vzorec spiranja nosne votline - obogatitev s sevom SeC1	SeC1	zelo veliki plaki
n	vzorec znoja	SeC1	srednje veliki plaki
o	vzorec znoja	SeC2	srednje veliki plaki
p	vzorec spiranja nosne votline	SeC2	srednje veliki plaki
r	vzorec spiranja nosne votline - obogatitev s sevom SeC1	SeC2	zelo veliki plaki
s	vzorec znoja - obogatitev s sevom SeV1	SeC2	srednje veliki plaki
t	vzorec spiranja nosne votline - obogatitev s sevom SeC1	SeC6	veliki plaki
u	vzorec spiranja nosne votline - obogatitev s sevom SeC1	SeC8	srednje veliki, šibki plaki
v	vzorec znoja	SeC8	srednje veliki plaki
z	vzorec spiranja nosne votline	SeC8	srednje veliki plaki

4.7 TITER NAMNOŽENIH BAKTERIOFAGOV IN PRIPRAVA DELOVNE BANKE IZOLIRANIH BAKTERIOFAGOV

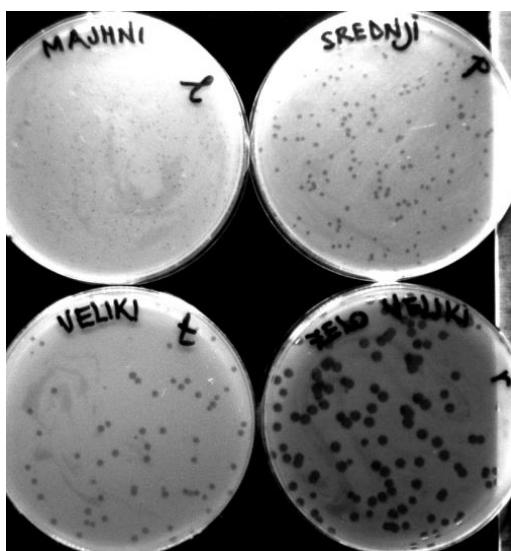
Po izolaciji in čiščenju 21 bakteriofagov smo jih najprej namnožili in si pripravili delovno banko fagov. Z metodo plakov smo ugotovili titer bakteriofagov in jih shranili v zamrzovalnik (- 86 °C), nato pa smo nadaljevali s karakterizacijo.

V prilogi D so podani podatki o številu plakov in izračun titra bakterfagov. V prilogi E je prikazan seznam izoliranih bakteriofagov z določenim titrom in volumnu po namnoževanju.

4.8 FIZIOLOŠKA IN MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGOV

4.8.1 Velikost plakov

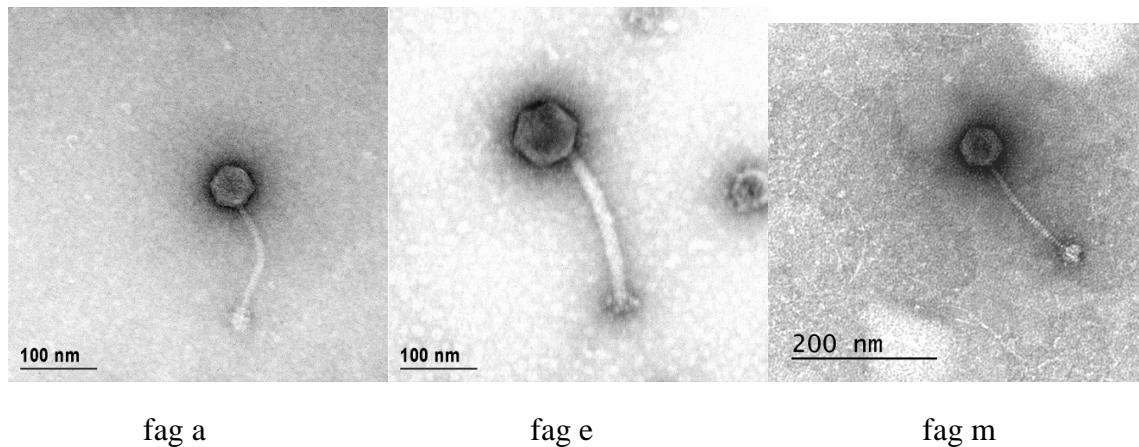
Velikost plakov bakteriofagov smo ugotovili med namnoževanjem in ugotavljanjem njihovega titra, opisani pa so v preglednicah 7, 8 in 9. Na sliki 14 so prikazani plaki različnih velikosti.



Slika 14: Razlike v velikosti plakov

4.8.2 Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) so bakteriofage pregledali pod presevnim elektronskim mikroskopom. Bakteriofagi znotraj posameznih vzorcev so imeli enako morfologijo. Na sliki 15 so prikazane fotografije bakteriofagov – po en predstavnik za 3 različne vire izolacij. Fotografije vseh izoliranih bakteriofagov so v prilogi F. V preglednici 10 so podani podatki o velikosti fagov.



Slika 15: Fag a – izolacija fagov iz odpadnih voda, fag b – izolacija fagov iz komercialnega pripravka, fag m – izolacija fagov iz spiranja nosne votiline

Vsi fagi očitno spadajo v red Caudovirales, in sicer v družini Siphoviridae ali pa Myoviridae. Lahko trdimo, da ne spadajo v družino Podoviridae, saj so repi izoliranih fagov dolgi. Glede na dimenzije repa in glave, bi lahko naše fage razporedili v nekaj skupin, ki tudi sovpadajo z izvorom fagov. V prvo skupino bi lahko spadali fagi a, b, c, d, ki imajo najmanjšo glavo (50 nm) in tanek rep (8 – 10 nm), dolžine 150 nm. V drugo skupino lahko razporedimo fage, ki izvirajo iz komercialnih pripravkov (e, g, h, i, j, k in l). Njihova glava je večja (80 nm), rep pa precej debelejši, kot je značilno za družino

Myoviridae. Glede na dolžino repa (200 nm) sklepamo, da ti fagi spadajo v poddružino – *Spounavirinae* in v enega od rodov – *Spounalikevirus* ali pa *Twortlikevirus*. Iz slike, ki prikazuje fag 1 lahko vidimo, da je njihov rep v skrčeni obliki, kontraktilni repi pa so značilni za bakteriofage družine *Myoviride*. Bakteriofage, ki smo jih izolirali iz vzorcev človeškega znoja in spiranja nosne votline, lahko postavimo v tretjo skupino (m, n, o, p, r, s, t, u, v in z). Po morfologiji so bolj podobni fagom, ki izvirajo iz odpadnih voda (a, b, c in d) in očitno spadajo v družino Siphoviridae. Njihove glave so premera 55 nm, rep pa je debeline 10 nm in dolžine 140 – 150 nm. Izjema je fag s, ki ima daljši rep. Bakteriofage, ki smo jih izolirali iz vzorcev človeškega znoja in spiranja nosne votline, lahko postavimo v tretjo skupino (m, n, o, p, r, s, t, u, v in z). Po morfologiji so bolj podobni fagom, ki izvirajo iz odpadnih voda (a, b, c in d) in očitno spadajo v družino Siphoviridae. Njihove glave so premera 55 nm, rep pa je debeline 10 nm in dolžine 140 – 150 nm. Izjema je fag s, ki ima daljši rep.

Preglednica 10: Opis morfologije bakteriofagov

Ime faga	Premer glave	Dolžina repa	Premer repa
a	50 nm	150 nm	8 - 10 nm
b	50 nm	150 nm	8 - 10 nm
c	50 nm	150 nm	8 - 10 nm
d	50 nm	150 nm	8 - 10 nm
e	80 nm	200 nm	18 - 20 nm
g	80 nm	200 nm	18 - 20 nm
h	80 nm	200 nm	18 - 20 nm
i	80 nm	200 nm	18 - 20 nm
j	80 nm	150 nm	20 nm
k	80 nm	200 nm	20 nm
l	70 - 80 nm	200 nm	18 - 20 nm
m	55 nm	150 nm	10 nm
n	55 nm	150 nm	10 nm
o	55 nm	150 nm	10 nm
p	55 nm	150 nm	10 nm
r	55 nm	150 nm	10 nm
s	55 nm	200 nm	10 nm
t	55 nm	140 nm	10 nm
u	55 nm	140 nm	10 nm
v	55 nm	140 nm	10 nm
z	55 nm	140 nm	10 nm

4.8.3 Nabor gostiteljev

S to analizo smo dobili informacijo o tem, pri katerih sevih iz naše zbirke so izolirani bakteriofagi sposobni povzročiti cono lize na ploščah s konfluentno rastjo sevov. Spot assay smo delali v paralelkah, kar pomeni, da smo vsako suspenzijo bakteriofaga na ploščo odpipetirali dvakrat. Prosojnost con lize je bila med paralelkama po večini enaka, v primeru kjer sta se prosojnosti con lize razlikovali, smo vpisali obe vrednosti ocen.

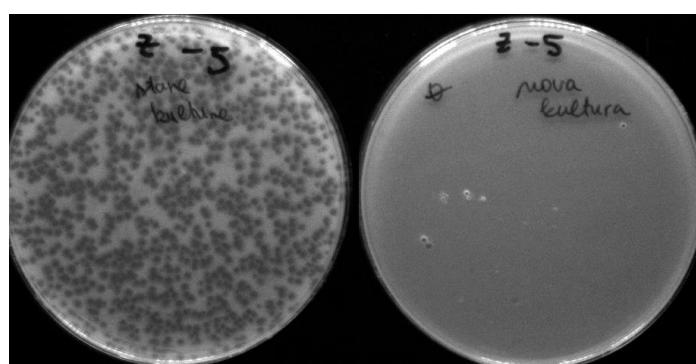
Negativna kontrola je bila pri vseh sevih negativna, kar pomeni, da cone lize ni bilo. Kultura SeC10 je bila okužena, zato nismo mogli ugotoviti, ali jo naši fagi lizirajo.

Preglednica 11: Nabor gostiteljev izoliranih bakteriofagov

sev\fag	a	b	c	d	e	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	r	s	t	u	v	z	neg. kontrola
SeC1	1	1	1	1	3	3	4	4	3	4	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	0	ok
SeC2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	4	3	3	0	ok
SeC4	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	1	0	0	3	1	2	0	ok
SeC5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ok
SeC6	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	3	0	0	0	3	0	3	3	0	0	ok
SeC7	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ok
SeC8	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	ok
SeC9	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ok
SeC10 – okužba	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
SeV1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	ok
SeV2	0	0	0	0	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ok
SeV3	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ok
SeV4	0	0	0	0	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ok

4.8.4 Lizogenost oziroma litičnost bakteriofagov

Glede na morfologijo smo sklepali, da nekateri izmed izoliranih bakteriofagov spadajo med v skupino lizogenih (Siphoviridae) – fagi a – d in m – z, drugi pa v skupino litičnih fagov (Myoviridae) – fagi e – l. Za prve je značilno, da svoj genom ustavijo v gostiteljevega, ki je po tem dogodku odporen proti fagu, ki ga je okužil. To smo preverili z metodo dveh zaporednih metod plakov, pri čemer smo bakterijsko kulturo za drugi del pripravili iz plaka in z njo ponovili metodo plakov z istim bakteriofagom. Iz vzorcev, kjer so bili plaki fagov e in j, nam kultura iz plaka ni uspelo vzgojiti, zato metode nismo mogli ponoviti. Pri bakteriofagih a, m, n, s, v in z v drugem koraku plakov ni bilo. Pri fagih p in u so plaki sicer nastali, vendar jih je bilo pri enaki redčitvi manj.



Slika 16: Primerjava plošč po obeh metodah plakov - kulturi na desni strani sta bili pripravljeni iz plakov plošč na levi strani

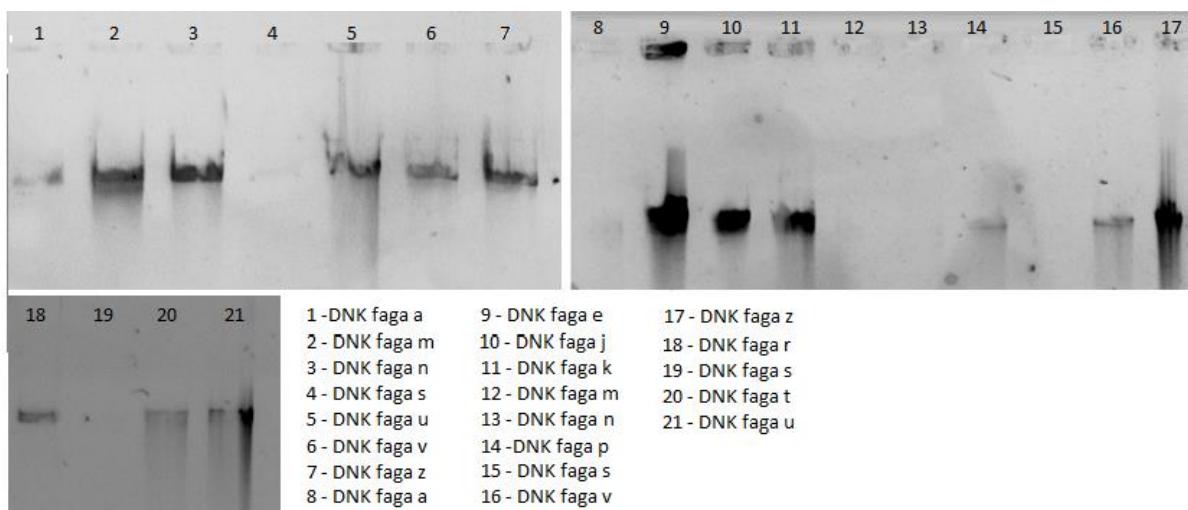
4.9 GENETSKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGOV

Glede na že pridobljene podatke o lastnostih izoliranih fagov, smo za genetsko karakterizacijo odločili izbrati manjšo skupino izoliranih fagov Iz skupine fagov, izoliranih

iz odpadnih voda, smo za nadaljevanje izbrali fag a, pri fagih izoliranih iz komercialnih pripravkov pa faga e in k. Iz skupine fagov, ki smo jih izolirali iz vzorcev znoja in spiranja nosne votline, smo za delo izbrali bakteriofage m, n, p, s, u, v in z. Pri delu smo nekatere od metod morali večkrat ponoviti, pri čemer smo se trudili, da smo uporabili čim več bakteriofagov (zato so pri cepitvah fagne DNK v blokcih z restrikcionskimi encimi prisotni tudi podatki za bakteriofage j, r in t).

4.9.1 Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE*) in ocena velikosti genomov

Uspešnost izolacije smo preverjali z agarozno elektroforezo, tako da smo približno milimeter širok košček agaroznega blokca vstavili v žepek agaroznega gela. Zaradi težav pri izolaciji smo postopek izolacije večkrat ponovili, pri nekaterih vzorcih izolacija po več poskusih sploh ni uspela (fag s). Elektroforeza je tekla 1 h (ozioroma 80 min pri vzorcih 8 – 17) pri napetosti 100 V, gele smo na koncu pobarvali v barvili SybrGold (slika 17).

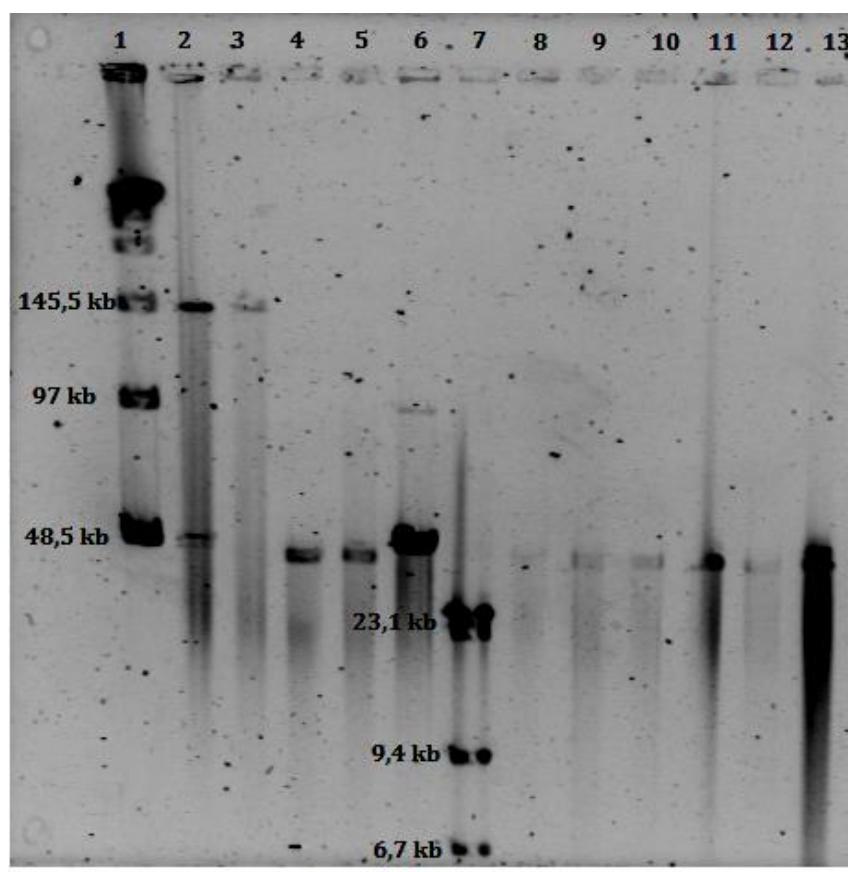


Slika 17: Izolacija bakteriofagne DNK v agaroznih blokcih

Glede na intenziteto elektroforeznih črt smo ocenili količino izolirane DNK v blokcih in glede na to poskusili prilagoditi velikost koščka blokca, ki smo ga nanesli na gel za PFGE.

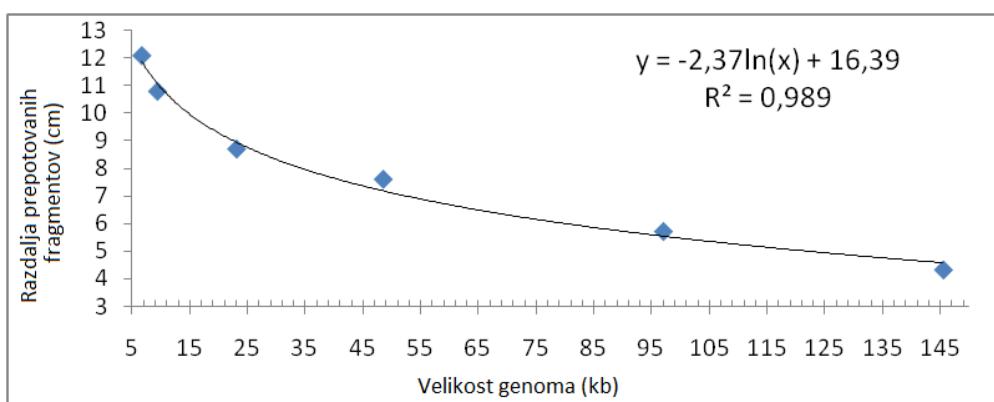
Metodo smo ponovili trikrat, da smo optimizirali pogoje elektroforeze (slika 18). Začetni in končni pulzni čas sta bila 1 ozioroma 8 s, elektroforeza je potekala 12 h, napetost je bila 6 V/cm, kot spreminjaanja toka pa je bil 120°. Temperatura, pri kateri je elektroforeza potekala, je bila 14 °C. Sledilo je merjenje razdalj od žepkov gela do elektroforeznih lis in izračun enačbe funkcije, s katero smo lahko ocenili velikosti genomov (slika 19, preglednica 12).

Pri vseh fagih, razen pri e in k, kjer je bila velikost okrog 145,5 kb, je bila velikost genoma nekoliko manjša od genoma bakteriofaga Lambda. Pri fagu k (žepek št. 2) je najverjetneje prišlo do kontaminacije z DNK Lambda, saj lahko vidimo šibko listo pri tej velikosti. Pri ponovitvi PFGE te elektroforetske lise ni bilo.



- | | |
|---|-----------------|
| 1 - Konkatemer CHEF DNA Size Standard | 8 - DNK faga a |
| 2 - DNK faga e | 9 - DNK faga p |
| 3 - DNK faga k | 10 - DNK faga s |
| 4 - DNK faga m | 11 - DNK faga u |
| 5 - DNK faga n | 12 - DNK faga v |
| 6 - Lambda DNK (48,5 kb) - nerazrezana | 13 - DNK faga z |
| 7 - Lambda DNK po restrikciji z encimom <i>Hind</i> III | |

Slika 18: PFGE z DNK izoliranih bakteriofagov



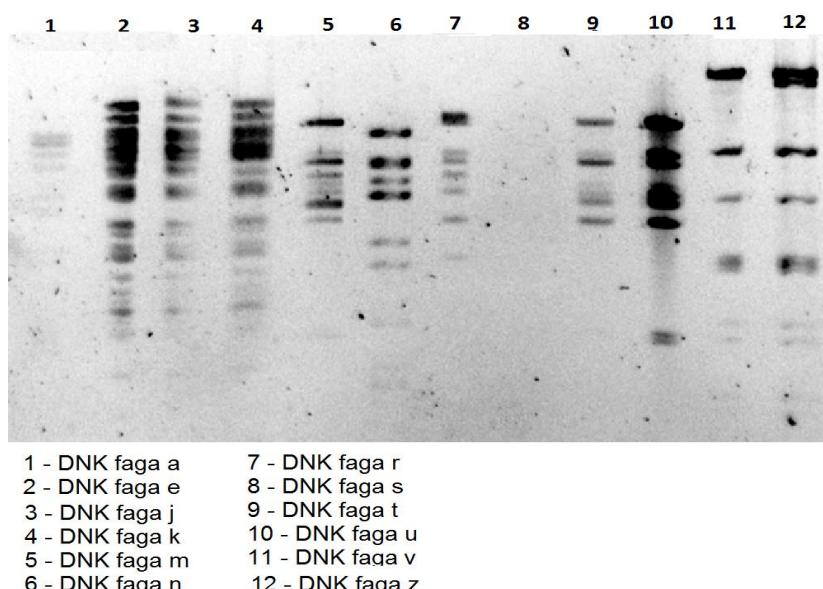
Slika 19: Razdalja prepotovanih fragmentov v odvisnosti od njihovih velikosti z izračunano enačbo funkcije, s pomočjo katere smo določili velikost genomov izoliranih fagov

Preglednica 12: Podatki o standardu za izračun enačbe funkcije (levo) ter izračunane velikosti genomov (desno) s pomočjo enačbe iz slike 19

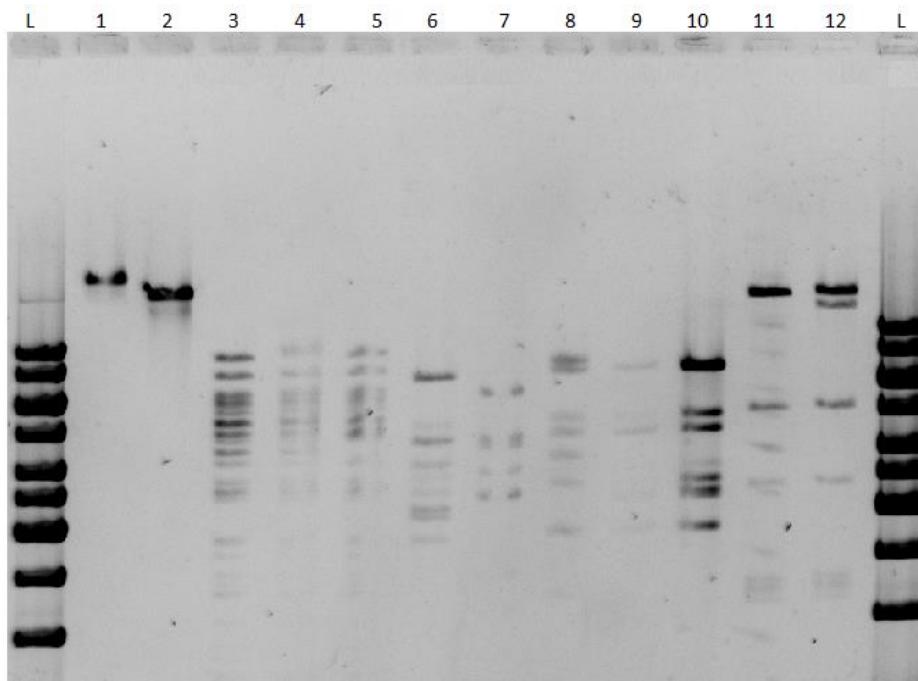
Standard	Dolžina (cm)	Velikost (kb)	Vzorec (fagna DNK)	Dolžina (cm)	Velikost (kb)
1	4,3	145,5	e	4,3	145,5
2	5,7	97	k	4,3	145,5
3	7,6	48,5	m	7,9	36
4	8,7	23,1	n	7,9	36
5	10,8	9,4	a	7,9	36
6	12,1	6,7	p	7,9	36
			s	7,9	36
			u	7,9	36
			v	7,9	36
			z	7,9	36

4.9.2 Cepitev bakteriofagne DNK v agaroznih blokcih z restriktičnimi endonukleazami

Poskusili smo s preprosto metodo razlikovanja med bakteriofagi, pri kateri smo z encimom *HindIII* cepili bakteriofagni genom v blokcih in restriktično mešanico nanesli na agarozni gel. Elektroforeza je tekla 2,5 h pri napetosti 100 V, gel smo pa pobarvali v barvilu SybrGold. Metodo smo še enkrat ponovili, pri čemer smo dodali tudi necepljeni DNK fagov e in z ter dolžinski standard (sliki 20 in 21). Iz slik lahko vidimo, da je cepitev uspela pri vseh vzorcih, pri fagih v in z po vsej verjetnosti bila nepopolna. Metoda se je izkazala za ponovljivo, saj smo pri ponovitvi metode pridobili skoraj identičen restriktični profil fagov. Na sliki 21 lahko tudi vidimo, da se tudi pri običajni elektroforezi vidi razliko v velikosti nerazgrajene DNK faga Myoviridae (fag e) in faga Siphoviridae (fag z). Na podlagi rezultatov iz obeh slik smo oblikovali preglednico elektroforeznih črt, iz katere smo dobili sliko o tem, koliko so si izolirani fagi med seboj podobni (slika 22).

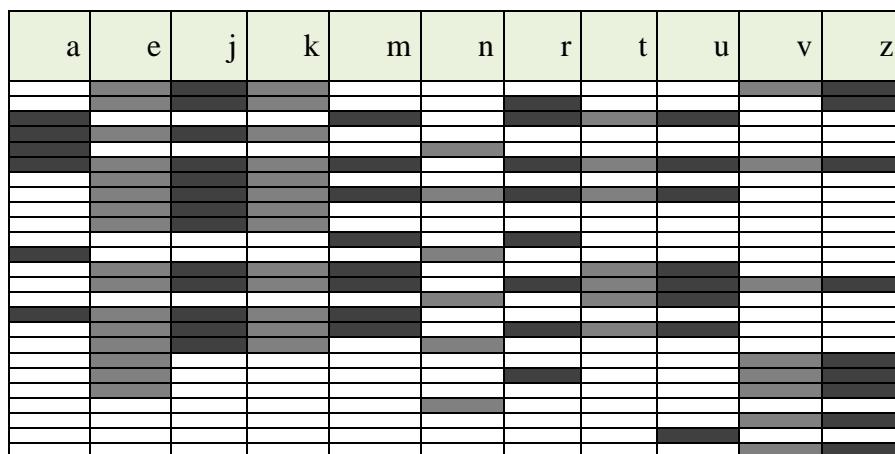


Slika 20: Cepitev fagne DNK z encimom *HindIII*



- | | |
|---------------------------|-----------------|
| 1 - necepljena DNK faga e | 7 - DNK faga n |
| 2 - necepljena DNK faga z | 8 - DNK faga r |
| 3 - DNK faga e | 9 - DNK faga t |
| 4 - DNK faga j | 10 - DNK faga u |
| 5 - DNK faga k | 11 - DNK faga v |
| 6 - DNK faga m | 12 - DNK faga z |

Slika 21: Cepitev fagne DNK z encimom *HindIII* (ponovitev)

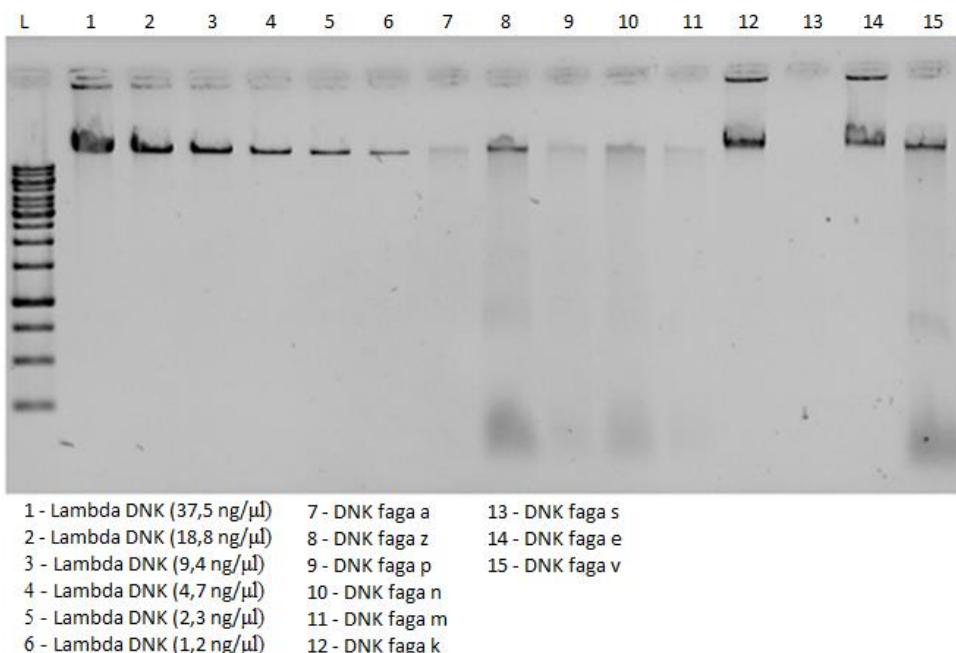


Slika 22: Analiza obeh slik restrikcije fagne DNK z encimom *HindIII* – za vsako elektroforezno liso je pobarvana določena celica preglednice

4.9.3 PCR za integrizo in druge bakteriofagne gene

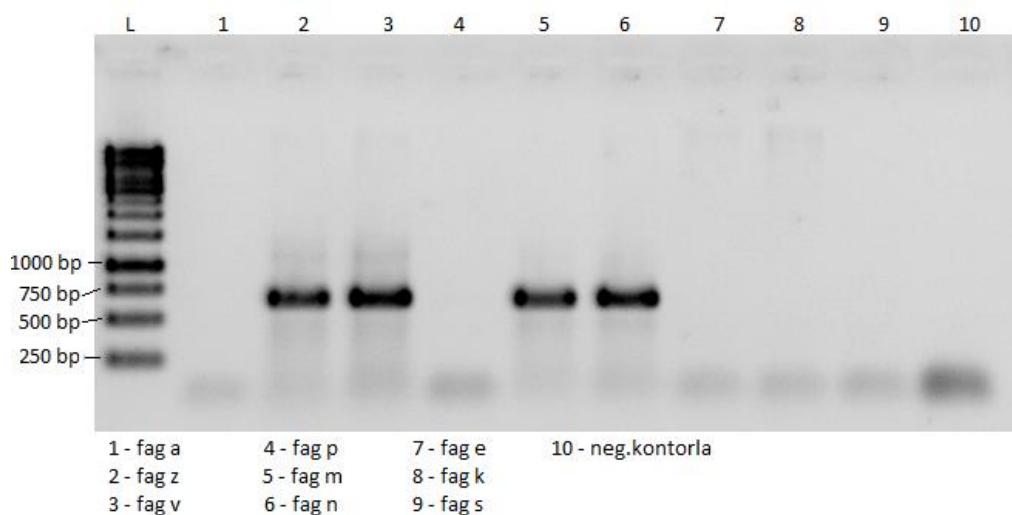
Za analizo genoma smo potrebovali DNK fagov v intaktni, čim manj razgrajeni obliki, medtem ko smo za potrebe PCR in sekvenciranja že leli imeti DNK v raztopini. To smo dosegli s pomočjo izolacije po protokolu, ki vključuje fenol-kloroformno ekstrakcijo.

Z izolirano DNK smo naredili agarozno elektroforezo, da smo preverili njeno koncentracijo in čistost. Elektroforeza je tekla 45 min, pri napetosti 100 V, na gel pa smo nanesli 5 µl vzorca. Barvanje je potekalo v etidijevem bromidu (slika 23).

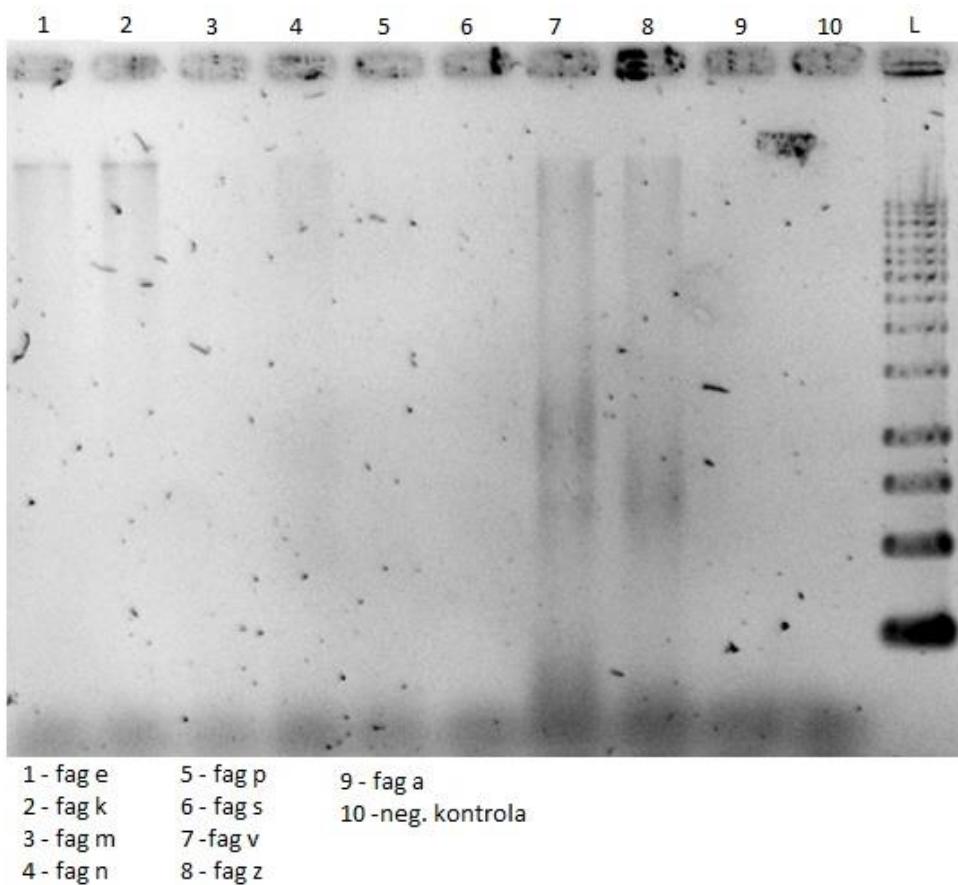


Slika 23: DNK bakteriofagov, izolirana s pomočjo fenol-kloroformne ekstrakcije in redčitve Lambde DNK za oceno koncentracij DNK izoliranih fagov

Po izolaciji DNK smo izvedli PCR, s katerim smo pomnoževali integrasni gen z dvema paroma začetnih oligonukleotidov: Intphi5-1 in Intphi5-2 ter Intphi7-1 in Intphi7-2. Elektroforeza je potekala 30 min pri napetosti 100 V. Na gel smo na nanesli 5 µl vzorca, gel pa smo barvali v barvili SybrGold. Na slikah 24 in 25 sta prikazana agarozna gela obeh elektroforez. Pomnožke smo dobili samo pri bakteriofagih m, n, v in z.



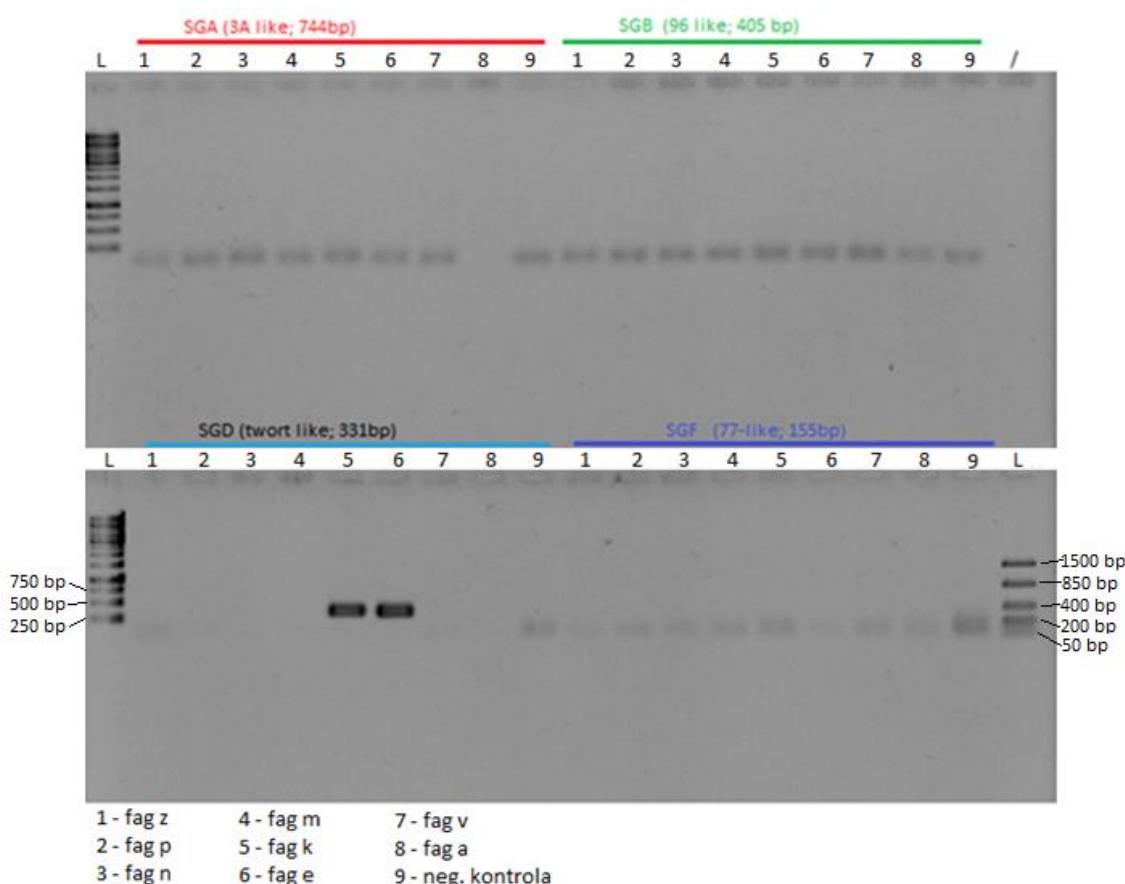
Slika 24: Pomnoževanje gena za integraso z začetnima oligonukleotidoma Intphi5-1 in Intphi5-2 (660 bp)



Slika 25: Pomnoževanje gena za integrazo z začetnima oligonukleotidoma Intphi7-1 in Intphi7-2 (470 bp)

Pomnožke, ki so nastali, smo očistili s kompletom za čiščenje PCR reakcij in poslali na sekvenciranje. Naredili smo poravnavo sekvenc s pomočjo bioinformacijskega orodja BLAST. Vse štiri sekvence so bile 99 % podobne sekvenci gena za integrazo bakteriofaga phiIPLA5.

Pomnožili smo tudi 4 druge bakteriofagne sekvence: 3 specifične za družino Siphoviridae (začetni oligonukleotidi SGA1 in SGA2, SGB1 in SGB2 ter SGF1 in SGF2) in 1 specifično za družino Myoviridae (SGD1 in SGD2). Rezultate pomnoževanja smo preverili na agarozni elektroforezi. Elektroforeza je tekla 30 min pri napetosti 100 V. Na gel smo nanašali po 5 µl vzorca, barvanje pa je potekalo z barvilm SybrGold. Pomnožke smo opazili samo pri dveh vzorcih – pri fagih e in k, kjer smo pomnoževali za Myoviridae specifično sekvenco (slika 26).



Slika 26: Pomnoževanje 4 bakteriofagnih genov

4.9.4 Zbrani podatki za vse izolirane bakteriofage

Naredili smo skupno preglednico podatkov bakteriofagov, ki smo jih pridobili z različnimi metodami.

Enake barve polj v preglednici pomenijo, da si fagi delijo določeno lastnost. Pri primerjavi cepitvenega profila genoma podobni barvi (na primer svetlo in temno vijolična) pomenita podoben, ne pa identičen profil.

Preglednica 13: Preglednica lastnosti izoliranih bakteriofagov

4.10 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA BAKTERIOFAGA V IN BIOINFORMACIJSKA ANALIZA SEKVENCE

V preglednici 14 so podane lastnosti genoma bakteriofaga v, v preglednici 15 pa seznam genov in proteinov, ki jih ti kodirajo, z njihovo predvideno funkcijo. Glede na to lastnost smo proteine razvrstili v module, ki so označeni z različnimi barvami. V preglednicah 16 in 17 sta v obliki preglednice prikazani primerjavi nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja z ostalimi bakteriofagi *Staphylococcus*. Genomi so bili na nivoju vsakega gena posebej poravnani z orodjem BLAST. Preglednici smo oblikovali glede na odstotek ujemanja (% ident) – višji odstotek ujemanja se sklada z intenzivnejši barvo v preglednici.

Preglednica 14: Splošne lastnosti genoma bakteriofaga v

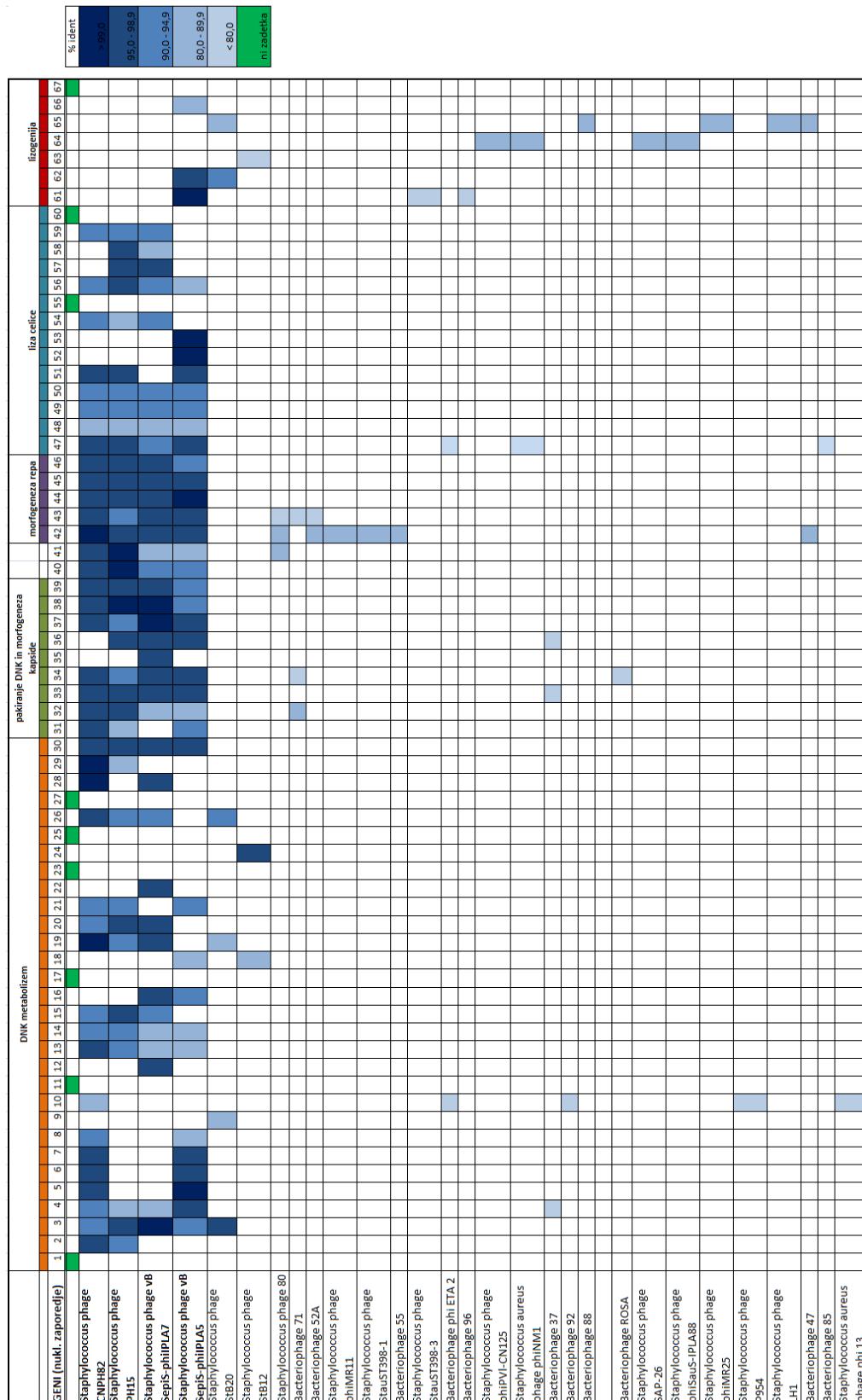
Lastnost	Bakteriofag v
gostitelj	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
velikost genoma	43039 bp
delež GC	34,6 %
število genov	67
gostota genov	1556,73 gen/Mb

Glede na določene lastnosti naj bi fag v spadal v družino Siphoviridae, z genomom velikosti okrog 36 kb. Bakteriofag smo namnožili s pomočjo plošč s konfluentno rastjo seva *S. epidermidis* SeC8 in izolirali ter očistili njegovo DNK. Določanje nukleotidnega zaporedja je opravilo podjetje Microsynth (Švica), ki za sekvenciranje genomov uporablja visoko zmogljivo tehniko, pri kateri kot rezultat dobimo večje število prekrivajočih se krajsih sekvenc DNK. Gre za postopek naključnega sekvenciranja (angl. *Whole genome shotgun sequencing*), pri katerem najprej ugotovimo zaporedje velikega števila klonov krajsih sekvenc, nato pa jih uredimo na podlagi informacije o njihovem medsebojnem prekrivanju (Griffiths in sod., 2005).

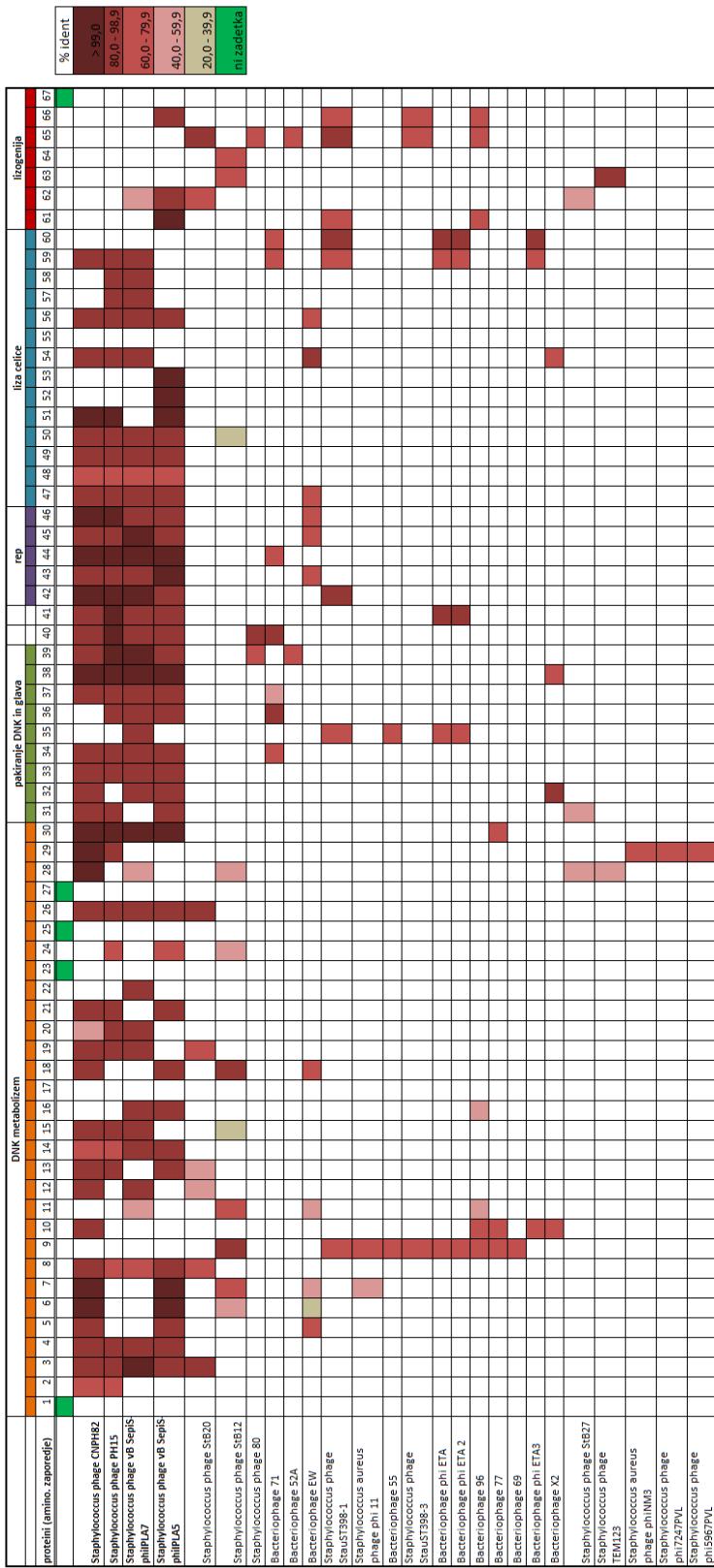
Iz analize sestavljene sekvence smo dobili podatek, da gre za genom velikosti 43039 bp. Ta številka je sicer za nekaj tisoč bp višja od ocenjene velikosti fagov Siphoviridae s pomočjo PFGE, vendar je to za nas potrditev, da gre za bakteriofag te družine.

Preglednica 15: Seznam genov in proteinov faga v z njihovo predvideno funkcijo

Preglednica 16: Primerjava bakteriofaga v z drugimi *Staphylococcus* bakteriofagi v obliki preglednice za nukleotidna zaporedja

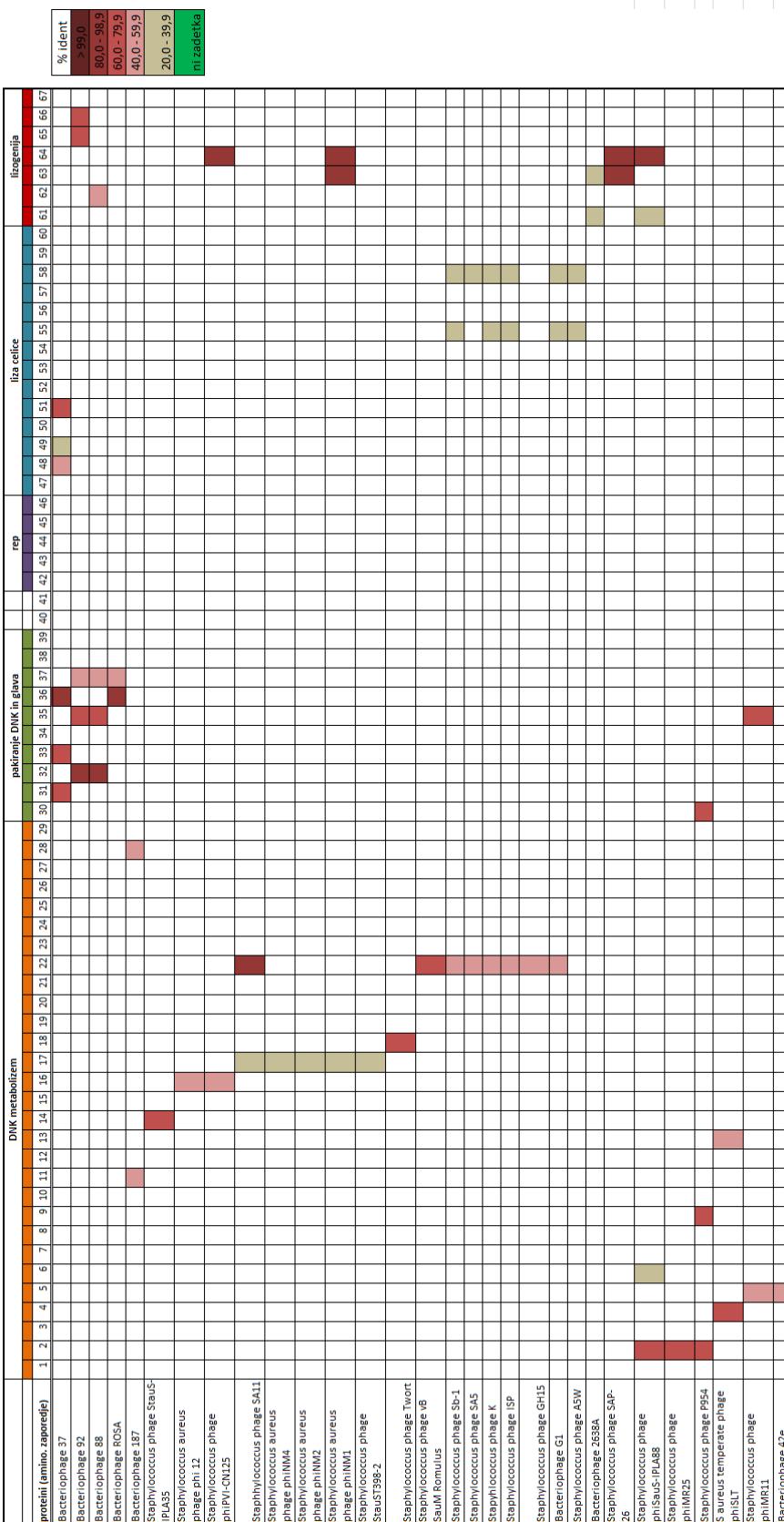


Preglednica 17: Primerjava bakteriofaga v z drugimi *Staphylococcus* bakteriofagi v obliki preglednice za aminokislinska zaporedja



Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 17: Primerjava bakteriofaga v z drugimi *Staphylococcus* bakteriofagi v obliki preglednice za aminokislinska zaporedja



5 RAZPRAVA

Pred izvedbo eksperimentalnega dela naloge smo si postavili delovne hipoteze, katere smo preko poskusov žeeli potrditi. Predpostavili smo, da bomo bakteriofage, specifične za *S. epidermidis*, našli v okoljih, kjer se nahajajo tudi njihovi gostitelji. Prav tako smo z eksperimenti žeeli pokazati, da se izolirani bakteriofagi med seboj (vsaj po nekaterih lastnostih) razlikujejo. Odločili smo se, da bomo pred začetkom izolacije poskusili pridobiti še nekaj sevov *S. epidermidis*, kar nam je tudi uspelo. Izkazalo se je, da so bili prav novo izolirani sevi ključni za izolacijo specifičnih bakteriofagov, saj so bili širje klinični izolati manj občutljivi za bakteriofage. Izolirane bakteriofage smo poskusili opisati z različnimi metodami, tako na morfološkem kot na genetskem nivoju.

5.1 DELO Z BAKTERIJAMI *S. epidermidis*

Najprej smo ugotovili rastno krivuljo 4 sevom, ki smo jih imeli takrat na voljo. Ti sevi so bili pridobljeni iz Ortopedske bolnišnice Valdoltra, izolirani pa so bili iz okužb, ki so nastale pri pacientih. Iz obeh slik rastnih krivulj smo dobili vpogled v to, kako hitro se bakterije razmnožujejo in koliko časa traja, da preidejo v eksponentno fazo rasti. Te podatke smo potrebovali za načrtovanje dela z bakteriofagi, saj smo na tak način izbrali čas, ko so bakterije v zgodnji eksponentni fazи oziroma stacionarni fazи rasti.

Menili smo, da bi bil za delo s fagi primeren večji nabor sevov *S. epidermidis*, zato smo se odločili za izolacijo iz okolja, kjer te bakterije pričakujemo. Iz nosne votline smo glede na morfologijo kolonij izbrali in nato izolirali 10 sevov, jih namnožili in shranili. Seve smo pobrali po Gramu in si jih ogledali z mikroskopom (slika 6). Vsi sevi so se obarvali modro, torej spadajo v skupino po Gramu pozitivnih bakterij. Celice so bile približno enake velikosti in oblike, prav tako so se vse združevale v pare ali skupke. Izjema je bil sev SeC3, za katerega smo po obliki sklepali, da gre za bakterijo rodu *Bacillus*. Glede na morfologijo kolonij so ustrezale opisom iz literature oziroma so bile podobne kliničnim izolatom (SeV1 - SeV4). Sledilo je določanje identitete izoliranih sevov. To smo izvedli z določanjem nukleotidnega zaporedja gena za 16S rRNA in sekvence uporabili kot poizvedbe na NCBI-BLAST. S pomočjo programa MEGA 5.2 smo nato izrisali filogenetsko drevo, pri čemer vključili pa smo tudi sekvence 16S rRNA drugih bakterij rodu *Staphylococcus*. Iz slike 9 vidimo, da je program vse sekvence naših sevov postavil na skupno vejo. Test vezanja (metoda Bootstrap) smo uporabili za izračun zanesljivosti filogenetskega drevesa in odstotek ob razvezitvi (89) je bil dovolj visok, da lahko zaupamo tem podatkom. Na isti veji filogenetskega drevesa smo poleg *S. epidermidis* dobili tudi nekatere druge vrste, kot je *S. saccharolyticus*, *S. capitis* in *S. caprae*. Ti sevi so *S. epidermidis* najbolj sorodni, saj tudi sodijo v isto skupino stafilokokov (skupina *S. epidermidis*) (Takahashi in sod., 1999). Ker lahko rastejo na človeškem telesu, samo se žeeli prepričati, da gre pri naših sevih za *S. epidermidis* in ne katero drugo vrsto. Naredili smo galerijo biokemijskih testov API STAPH, ki temelji na določanju bakterijskih vrst na podlagi razlik v njihovem metabolizmu. Pri vseh sevih (razen SeC3, ki ga v test nismo vključili) smo dobili več kot 87 % verjetnost, da gre za *S. epidermidis*, zato smo jih pri nadaljnjem delu tudi tako obravnavali.

Želeli smo ugotoviti, ali naše kulture v svojih genomih vsebujejo profagne sekvene, zato smo to najprej poskusili preveriti s pomočjo začetnih oligonukleotidov, s katerimi bi pomnožili za bakteriofage specifične sekvene. Pri tem smo si pomagali z objavo španskih raziskovalcev, ki so poleg karakterizacije bakteriofagov, specifičnih za *S. epidermidis*,

analizirali tudi prisotnost profagov v njihovih sevih (Gutierrez in sod., 2012). Znano je, da so profagne sekvene v baterijskih genomih zelo pogoste pri sevih *S. aureus*, saj ti vsebujejo v povprečju od 1 do 4 različne profagne sekvene na genom, za *S. epidermidis* pa ti podatki niso znani (Pantuček in sod., 2004). Gutierrez in sodelavci so dizajnirali oligonukleotide za tri bakteriofagne gene: gen za integraso (*int*), holin (*hol*) in protein glave bakteriofaga (angl. *major head protein, mhp*), pri čemer so si pomagali z genomske analizo 4 bakteriofagov: phiIPLA5, phiIPLA7, PH15 in CNPH82. Oligonukleotidni par Intphi5 naj bi bil specifičen za fage podobne phiIPLA5, drugi par – Intphi7 pa za fage podobne ostalim trem naštetim (Gutierrez in sod., 2012). Pomnožke pričakovanih velikosti smo dobili pri petih sevih, vendar v tem primeru pomnožkov nismo poslali na sekvenciranje, zato ne moremo trditi, da gre za specifičen gen, saj je možno tudi, da je prišlo do naključne hibridizacije oligonukleotidov. Vseeno smo s tem pridobili informacijo o možnosti, da naši sevi vsebujejo profage.

Poleg gena za integraso smo izvedli PCR še za tri druge bakteriofagne (Siphoviridae) gene. Raziskovalci (Pantuček in sod., 2004) so te oligonukleotide dizajnirali tako z namenom klasifikacije bakteriofagov, specifičnih za *S. aureus*, kot tudi za iskanje profagov v baterijskih sevih. Pomnožkov nismo dobili, vendar ne moremo trditi, da naše bakterije ne vsebujejo teh genov. Glede na to, da so bili oligonukleotidi načrtovani za hibridizacijo z bakteriofagnimi sekvencami specifičnimi za *S. aureus*, je mogoče, da so bili ti preveč specifični, da bi nalegali tudi na DNK *S. epidermidis*.

5.2 IZOLACIJA BAKTERIOFAGOV, SPECIFIČNIH ZA SEVE *S. epidermidis*

Najbolj preprosta metoda, s katero bi izolirali bakteriofage, specifične za naše seve, bi bila indukcija lizogenih profagov. Največ bakteriofagov, specifičnih na *S. epidermidis*, je bilo namreč izolirano na tak način. Vsi bakteriofagi, izolirani s postopkom profagne indukcije, so lizogeni (Gutierrez in sod., 2010; Bes, 1994). Nam s protokolom, pri katerem smo kulturam v tekočem gojišču dodali 10 µg/ml mitomicina C, ni uspelo pridobiti bakteriofagov. Razlogov za to je lahko več: možno je, da sevi ne vsebujejo profagnih sekven, ki bi jih lahko inducirali, morda je pa bila težava v sami metodi indukcije. Poskusili bi lahko z višjimi koncentracijami mitomicina C ali pa bi na primer seve obsevali z UV svetlobo. Težava je lahko tudi na strani zaznavanja induciranih bakteriofagov – možno je, da noben od naših sevov ni občutljiv za inducirane bakteriofage, ali pa da metoda spot assay preprosto ni dovolj občutljiva, da bi fage lahko odkrili in izolirali. Sledil je poskus izolacije iz vzorcev, za katere smo sklepali, da bi lahko vsebovali specifične bakteriofage.

Predvidevali smo, da vzorec odpadnih voda vsebuje veliko število različnih bakteriofagov (poleg ostalih snovi), zato smo se odločili za metodo obogativitve s sevi, ki smo jih imeli na voljo (SeV1, SeV2, SeV3 in SeV4), za zaznavanje bakteriofagov pa smo uporabili vseh 13 sevov. Na ta način smo izolirali 4 bakteriofage (a, b, c in d). Melo in sodelavci so na podoben način iz odpadnih voda izolirali in opisali prvi fag, ki je specifičen za *S. epidermidis* in spada v družino Myoviridae (Melo in sod., 2014).

Izolacijo bakteriofagov smo nadaljevali z uporabo dveh komercialnih pripravkov mešanic bakteriofagov (Enkophage in Intestiphage, proizvajalca Eliava). Oba pripravka naj bi vsebovala tudi fage, specifične za stafilokoke, zato smo upali, da bodo cone lize nastale tudi na katerem od naših sevov. Izolirali in očistili smo 7 bakteriofagov, ki smo jih opisali.

Glede na število con lize, ki so jih fagi povzročili, bi lahko izolirali večje število fagov, vendar smo se raje osredotočili na izolacijo iz vzorcev človeškega izvora.

Pri izolaciji bakteriofagov iz vzorčenja kože in nosne votline s pomočjo suhih vatiranih palčk smo bili neuspešni, razlog pa je najverjetneje prenizko število bakteriofagov, ki se ujamejo na vatirano palčko, da bi jih lahko zaznali, možno je tudi, da v naši zbirki sevov ni primerenega indikatorskega seva. S pomočjo te metode so drugi avtorji uspešno izolirali za *S. epidermidis* specifične fage, ki sodijo v družini Siphoviridae in Podoviridae (Aswani in sod. 2011). Nato smo poskusili s podobno metodo, kjer smo vzorčili na način, pri katerem je prišlo do spiranja površine človeške kože oziroma sluznice. Pri vzorčenju kože smo uporabili "naravno" spiranje kože – vzorčenje znoja, ki nastaja med fizično aktivnostjo, pri vzorčenju nosne votline pa smo le-to spirali s fiziološko raztopino. Metoda se je izkazala kot uspešna, saj nam je uspelo izolirati 10 bakteriofagov. Tako po vzorčenju smo naredili tudi obogatitev, in sicer z dvema izbranimi sevoma – SeC1 in SeV1, saj smo predpostavili, da se razlikujeta (glede na izvor), s čimer smo povečali možnost, da bo kateri od njiju občutljiv za prisotne bakteriofage. Takšne metode za izolacijo bakteriofagov še ni bilo opisane v literaturi.

5.3 FIZIOLOŠKA IN MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGOV

Razlike med bakteriofagi smo najprej opazili v intenziteti con lize pri izolaciji in nato pri čiščenju bakteriofagov, saj so bili plaki različnih velikosti (slika 14). Pri kasnejšem delu s fagi smo opazili, da velikost plakov ni popolnoma ponovljiva; zato pri karakterizaciji bakteriofagov tega podatka nismo upoštevali. Pri plakih nekaterih naših fagov smo opazili tudi delno motnost plakov. Tudi ta je odvisna od lastnosti bakteriofaga in od gostitelja; če je določen odstotek bakterij v kulturi odporen proti bakteriofagu, to vidimo kot rahlo motnost plaka, motnost cone lize pa lahko na primer nastane tudi v primeru, da ima bakteriofag nižjo stopnjo adsorpcije (Gallet in sod., 2011).

Izolirane bakteriofage smo si želeli ogledali pod mikroskopom, da bi dobili informacije o družini, v katero spadajo. Na Nacionalnem inštitutu za biologijo so naše vzorce pregledali s presevnim elektronskim mikroskopom in nam posredoovali fotografije z ocenami dimenzijs posameznih fagov. Bakteriofagi znotraj vzorcev so imeli enako morfologijo, zato smo sklepali, da so naši vzorci homogeni in ne gre za mešanico fagov, ki bi spadali v različne družine. Iz fotografij fagov lahko vidimo, da jih lahko po morfologiji razdelimo v dve skupini: take z ožjim in daljšim repom (najverjetneje Siphoviridae) in take z debelejšim in nekoliko krajskim repom (najverjetneje Myoviridae) (Deghorain in Van Melderen, 2012).

O bakteriofagih nam veliko pove podatek o tem, kako širok spekter bakterijskih sevov so sposobni okužiti, kar je iz vidika uporabnosti ključen podatek. S to metodo dobimo tudi pregled o tem, v kolikšni meri so si izolirani fagi med seboj podobni. Bakteriofagi, izolirani iz odpadnih voda (a – d) so imeli enak litični spekter, cone lize pa so bile zelo jasne le pri sevu SeC2, s pomočjo katerega smo te fage tudi izolirali. V nasprotju s temi fagi, so fagi e – m povzročili nastanek cone lize na skoraj vseh kulturah – tudi pri kliničnih izolatih, čeprav so bile te pri večini šibke (oceni 1 in 2). Ta podatek ni presenetljiv, saj je pričakovano, da bodo fagi v komercialnih pripravkih imeli širok nabor gostiteljev, da bodo kot antibiotično sredstvo kar najbolj učinkoviti. Med temi fagi opazimo manjši razlike v litičnih spektrih, vendar lahko v grobem trdimo, da so si zelo podobni. V tretji skupini, kjer so fagi izolirani iz znoja in nosne votline, so nastale večje razlike v naboru gostiteljev, ki

jih lahko lizirajo. Nekateri med njimi so zelo specifični in so povzročili nastanek cone lize le pri enem ali dveh sevih (fagi s, u, z), večina pa jih je najbolje lizirala seva SeC1 in SeC2. Noben od fagov ni liziral kliničnih izolatov (razen faga u). Ti bakteriofagi so bili izolirani iz enakih vzorcev kot bakterije (SeC1 – SeC10), zato so verjetno zanje bolj specifični zaradi dejstva, da prihajajo iz podobnih okolij. Med viri nism zasledila raziskave, kjer v naboru gostiteljev fagov bi primerjali bakterije, ki izhajajo iz podobnega oziroma drugačnega okolja.

Za bolj informativno sliko o tem bi bilo potrebno imeti veliko več sevov, ki so si med seboj kar se da različni (različen izvor). Za seve, ki smo jih izolirali iz nosnih votlin (SeC1 – SeC10) je sicer možno, da gre za bakterije s podobnimi lastnostmi, predvidevamo pa, da so si med seboj bolj podobni v primerjavi s skupino kliničnih izolatov (SeV1 – SeV4), kar so rezultati metode za določanje nabora gostiteljev tudi potrdili. Iz preglednice 11 vidimo, da so klinični sevi bolj odporni proti pridobljenim fagom v primerjavi z našimi izolati. Možen razlog tega je vsebnost določenih profagnih sekvenc v genomih bakterij ali pa so ti sevi v nekaterih drugih lastnostih tako drugačni, da se nanje večina naših fagov ni mogla vezati.

Glede na morfologijo smo sklepali, da nekateri izmed izoliranih bakteriofagov spadajo v skupino lizogenih (Siphoviridae), drugi pa v skupino litičnih fagov (Myoviridae). Za prve je značilno, da svoj genom vstavijo v gostiteljevega, kateri je po tem dogodku odporen proti fagu, ki ga je okužil (Adams, 1959). To smo preverili z metodo dveh zaporednih metod plakov, pri čemer smo kulturo za drugi del pripravili iz plaka in z njo ponovili metodo plakov z istim bakteriofagom. Rezultati tega poskusa so bili podobni pričakovanim. Izbrali smo dva bakteriofaga, za katera smo sklepali, da spadajo v družino Myoviridae (e in j) in nekaj fagov, z morfologijo značilno za družino Siphoviridae (a, m, n, p, s, u, v in z). Kot je že opisano v poglavju Morfologija plakov, pride pri fagih Myoviridae do popolne lize bakterij in prosojnih con lize, zato ni presenetljivo, da nam ni uspelo namnožiti kulture iz plaka, kar pomeni da sta faga e in j litična (slika 16). Pri ostalih vzorcih (za katere sklepamo, da spadajo med Siphoviridae) smo bili uspešni in smo kulturo namnožili ter ponovili metodo plakov. Pri bakteriofagih a, m, n, s, v in z v drugem koraku plakov ni bilo, zaradi česar sklepamo, da so fagi lizogenizirali kulturo in je ta nanje postala odporna. Pri fagih p in u (kjer so plaki nastali, a jih je bil njihov titer nižji), je možno, da je prišlo do spontane indukcije profagov, torej da so bakterije postale lizogenizirane in se je zaradi neznanega razloga profagna sekvenca inducirala in sprožila lizo celic.

5.4 GENETSKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGOV

Za namen karakterizacije izoliranih bakteriofagov na genetskem nivoju smo se lotili izolacije njihove DNK. Cilj je bil ugotoviti velikost genoma bakteriofagov in tako ugotoviti, v katero družino sodijo ter s pomočjo drugih metod preveriti, ali gre za enake oziroma različne fage. Izvedli smo gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju (PFGE) in ocenili velikost njihovih genomov. Pri vseh fagih, razen pri e in k, kjer je bila velikost okrog 145,5 kb, je bila velikost genoma nekoliko manjša od genoma bakteriofaga Lambda – 48,5 kb (Becker in Murialdo, 1990). Faga e in k glede na velikost genoma (145,5 kb) sodita v družino Myoviridae, medtem so manjši genomi, velikosti okrog 40 kb, značilni za družino Siphoviridae. Ti rezultati za uvrstitev fage v družine so v skladu z drugimi lastnostmi (morfologija virionov in podatki o lizogeniji) (Deghorain in Van Melderen, 2012; ViralZone, 2012).

5.4.1 Cepitev genomske DNK bakteriofagov v agaroznih blokcih

Preprosta metoda za ugotavljanje, ali gre za enake ali različne fage, je cepitev fagnih genomov z encimom, čemur sledi elektroforeza, kot so delali tudi drugi avtorji (Bailey in sod., 1980; Santos in sod., 2010). Za analizo smo izbrali encim *HindIII*, ki cepi palindromno sekvenco DNA AAGCTT, in sicer med adeninoma. Kot smo tudi pričakovali, so se restrikcijski profili bakteriofagov med seboj razlikovali. Najbolj podobni med seboj so bili profili fagov izoliranih iz komercialne mešanice fagov (e, j in k), zato sklepamo, da smo iz mešanice uspeli izolirati bakteriofage, ki so si med seboj bolj podobni. Na njihovo podobnost kažejo tudi druge metode, ki smo jih izvedli (morfologija viriona in nabor gostiteljev). Restrikcijski profil faga a (izolacija iz odpadnih voda) se je popolnoma razlikoval od ostalih. Med seboj zelo podobni so si bili tudi profili fagov m, t in u ter v in z, kar se sklada s podatki o njihovem izvoru. Možno je tudi, da gre za enak bakteriofag, čeprav le na podlagi restrikcijskega profila tega ne moremo trditi. Do razlik namreč lahko pride zaradi le nekaj mutacij na mestih, ki jih encim prepozava. Metodo bi lahko ponovili z drugim encimom, ali pa bi se odločili za druge metode, kot je sekvenciranje celotnih genomov ali pa naključno pomnoževanje fragmentov (Gutierrez in sod., 2011). Vseeno se je ta metoda izkazala za učinkovit in hiter na način preverjanja podobnosti fagov, tako kot so to počeli tudi drugi avtorji (Karama in Gyles, 2008). Ocenili smo podobnost fagov in jih razvrstili v 4 skupine (preglednica 13, zadnja vrstica).

5.4.2 Verižna reakcija s polimerazo za integrizo in druge bakteriofagne gene

Izvedbo reakcije PCR smo potrebovali fagno DNA v raztopini, zato smo jo najprej izolirali, in sicer po protokolu, ki vključuje ekstrakcijo s fenol-kloroformom (priloga A). Nato smo se lotili ugotavljanja, ali naši bakteriofagi vsebujejo gen za integrizo. Pomagali smo si z objavo španskih raziskovalcev, ki so izvedli genomsko karakterizacijo dveh bakteriofagov, specifičnih za *S. epidermidis* (Gutierrez in sod., 2012). Njuna genoma sta bila sekvencirana, nato pa so na podlagi njunih genov oblikovali nekaj parov oligonukleotidov, s katerimi so kasneje analizirali prisotnost profagov v njihovih sevih *S. epidermidis*, kar smo poskusili tudi mi. Za ugotavljanje zmožnosti lizogenije fagov smo izbrali ista dva para oligonukleotidov - Intphi5-1 in Intphi5-2 (pomnožek integraze faga phi-IPLA5) in Intphi7-1 in Intphi7-2 (integriza faga phi-IPLA7). Pomnožek ustrezne velikosti bi nam dal informacijo, da gre za lizogen tip bakteriofaga, saj striktno litični tega gena nimajo. Fagne integrize so namreč encimi, ki uravnavajo mestno-specifično vstavitev fagnega genoma v genom gostitelja (Groth in Calos, 2004). Pri vzorcih m, n, v in z smo dobili elektroforetske črte velikosti okoli 660 bp, zato smo pomnožek postali na sekvenciranje (slika 24). Sekvenca je pokazala, da gre za gen integraze faga phi-IPLA5. Za te vzorce lahko torej potrdimo, da gre za lizogene tipe bakteriofagov, saj vsebujejo gen za integrizo. Pri ostalih vzorcih pomnožka nismo dobili. Pri fagih e in k jih tudi nismo pričakovali, saj spadata v ne-lizogeno družino Myoviridae. Prisotnost elektroforetske črte bi lahko pričakovali pri ostalih fagih Siphoviridae - a in p (pa tudi s, če bi bila izolacija DNA uspešna), vendar je ni bilo. Možno je, da je razlog v neoptimiziranih pogojih PCR, tehničnih napakah pri delu ali pa imajo ti fagi drugačne integrize (Deghorain in Van Melderen, 2012). Pri reakciji s parom začetnih oligonukleotidov Intphi7-1 in Intphi7-2 nismo dobili nobene elektroforetske črte (slika 25). Razlog je verjetno podoben kot je pri pomnoževanju gena za integrizo z Intphi5-1 in Intphi5-2.

Izvedli smo tudi PCR za štiri druge bakteriofagne gene, za katere so Pantuček in sodelavci pripravili začetne oligonukleotide: 3 specifične za družino Siphoviridae (SGA, SGB in SGF) in 1 specifičen za družino Myoviridae (SGD) (Pantuček in sod., 2004). Oligonukleotidi pomnožujejo dele ohranjenih genov in raziskovalci so razvili multipleks PCR za hitro ugotavljanje za kateri tip faga (če pomnožujemo fagno DNK) oziroma profaga (če pomnožujemo bakterijsko DNK) gre. Cilj njihove raziskave je bil ugotoviti, v katero od skupin znotraj družin sodijo njihovi za *S. aureus* specifični bakteriofagi. Za ugotavljanje, ali fagi pripadajo družini Myoviridae, so pripravili oligonukleotide, specifične za fage podobne Twort (*Twortlikevirus*), katere smo uporabili tudi mi. Skupine, podobne fagom Siphoviridae - 3A, 11 in 77 so za človeka pomembnejše, saj okužujejo patogene seve *S. aureus*. Pregledali smo, ali ti oligonukleotidi hibridizirajo tudi z DNK bakteriofagov *S. epidermidis* in izvedli PCR s štirimi pari oligonukleotidov. Iz slike 26 lahko vidimo, da pri oligonukleotidih, specifičnih za družino Siphoviridae, pomnožkov ni bilo. Možno je, da naši izolirani bakteriofagi ne spadajo v nobeno od teh treh skupin, ali pa gre za napačne pogoje PCR-ja. Pri PCR-ju z oligonukleotidnim parom za družino Myoviridae lahko na sliki vidimo pomnožke prave velikosti (med 300 in 400 bp) pri le fagih e in k, kar smo tudi pričakovali. Pomnoževali smo veliki protein kapide, za potrditev pa bi morali pomnožek očistiti in sekvencirati.

5.4.3 Pregled lastnosti izoliranih bakteriofagov

Fage smo razvrstili v preglednico, pri čemer smo jih poskusili razvrstiti v nekaj skupin glede na njihove lastnosti. Večina fagov spada v družino Siphoviridae, nekateri (tisti, ki izhajajo iz komercialnega pripravka) pa v družino Myoviridae. Podatki o morfologiji in velikosti genoma se skladajo s to delitvijo. Glede na nabor gostiteljiv naših fagov lahko sklepamo, da imamo vsaj 10 različnih fagov, če pa upoštevamo ostale lastnosti (izvor, morfologija fagov, restriktični profil) jih lahko razvrstimo v le nekaj skupin, ki se pa ne ujemajo za vse lastnosti. Na primer, bakteriofaga v in z izhajata iz relativno različnih okolij (nosna votlina, znoj) in se razlikujeta glede na nabor gostiteljev, vendar imata enako morfologijo virionov in plakov ter enak restriktični profil njunih genomov. Da bi ugotovili, v kakšni meri se ta dva faga (in ostali) med seboj razlikujeta, bi bile potrebne nadaljnje analize. Najbolj zanesljiva metoda za opis naših fagov bi bilo določanje in primerjava nukleotidnih zaporedij njihovih genomov. Na tej stopnji smo izoliranim bakteriofagom uspešno določili filogenetsko družino in ugotovili, da se razlikujejo glede na njihove morfološke, genetske in fizioške lastnosti. Grob zaključek (če upoštevamo le izvor fagov) je, da smo izolirali vsaj 3 različne skupine fagov.

5.5 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA BAKTERIOFAGA V

Za sekvenciranje smo izbrali enega od bakteriofagov, ki smo ga izolirali iz naravne ekološke niše *Staphylococcus epidermidis* – kože oziroma iz človeškega znoja. Poleg te lastnosti, smo se za ta bakteriofag odločili tudi zaradi tega, ker je bila izolacija njegove DNK najbolj uspešna. Primerjava sekvence bakteriofaga v z že objavljenimi je pokazala, da je naš bakteriofag je očitno najbolj podoben ostalim štirim bakteriofagom, ki so prav tako specifični za *S. epidermidis*. Ti fagi so PH15, CNPH82, vB SepiS-phiIPLA7 in vB SepiS-phiIPLA5. Bakteriofaga PH15 in CNPH82 sta bila prva sekvenirana faga, specifična za *S. epidermidis* (Daniel in sod., 2007). Druga dva bakteriofaga je sekvenirala španska skupina raziskovalcev in ju naredila primerjalno analizo tudi s fagoma PH15 in CNPH82. Ugotovili so podobnosti na nukleotidni ravni, kot tudi na strukturni ravni genoma tako z

PH15 in CNPH82, kot tudi s fagi, ki lizirajo *S. aureus* in druge stafilokoke (Guterrez in sod., 2012). Tudi mi smo našli kar nekaj podobnosti (na nukleotidnem in aminokislinskem nivoju) z drugimi za stafilokoke specifičnimi fagi, za katere pa ni znano, ali lizirajo tudi *S. epidermidis*, poleg drugih stafilokokov.

Organizacija genoma faga v je tipično modularna, tako kot je to pri ostalih bakteriofagih (Deghorain in Van Melderen, 2012). Geni za posamezen modul ležijo na genomu blizu skupaj, kar smo videli s pomočjo z analizo funkcije proteinov, ki je predstavljena v preglednici 15. Določili smo 5 modulov: metabolizem DNK, pakiranje DNK in glava faga, rep, liza celice in lizogenija. Iz preglednic podobnosti genov in proteinov našega bakteriofaga z drugimi fagi *Staphylococcus* lahko opazimo tudi, kateri od modulov so med bakteriofagi najbolje ohranjeni. Zelo visoke podobnosti vidimo pri modulih za morfologijo viriona (pakiranje DNK in glava faga ter rep), medtem ko so pri modulih povezanih s fiziologijo, podobnosti nižje, kar je pričakovano. Razlike med bakteriofagi opazimo predvsem v modulu za lizogenost, ki je zelo pomembna predvsem iz vidika okuževanja gostiteljev oziroma njihovo razmnoževanje na splošno. Nasprotno pa raznolikosti v modulu za metabolizem DNK ni moč enostavno pojasniti. Tudi Gutierrez in sodelavci so ugotovili, da sta si njihova faga najbolj podobna drugim v modulih za morfologijo glave in repa, medtem ko so našli večje razlike pri modulu za lizo (Guterrez in sod., 2012).

6 SKLEPI

Z eksperimentalnim delom smo dosegli zastavljene cilje, saj smo uspešno izolirali bakterije *S. epidermidis* in zanje specifične bakteriofage. Te smo najprej očistili in namnožili v za njih občutljivih sevih, nato pa smo se lotili karakterizacije. Izolirane bakteriofage smo z različnimi metodami opisali na morfološkem, fiziološkem in genetskem nivoju ter jih glede na njihove lastnosti postavili v nekaj skupin. S pomočjo pridobljene sekvene enega od novo izoliranih bakteriofagov smo dobili veliko zanesljivih informacij o njegovi filogeniji.

Glede na rezultate, lahko potrdimo naslednje postavljene hipoteze:

- Bakteriofagi specifični za *S. epidermidis* se nahajajo v okoljih, kjer se njihov gostitelj lahko podvojuje - nekatere bakteriofage (e, g, h, i, j, k in l) smo izolirali iz enakih okolij, kot njihove gostitelje; to so človeški znoj in notranjost nosne votline, ki smo jo vzorčili s pomočjo spiranja s fiziološko raztopino. Ta okolja so naravne ekološke niše *S. epidermidis*, kar potrjuje našo hipotezo.
- Izolirani bakteriofagi bodo morfološko podobni že poznanim – morfologijo izoliranih bakteriofagov smo preverili z ogledom vzorcev pod presevnim elektronskim mikroskopom. Izolati so se glede na morfologijo v grobem delili v dve skupini: z debelejšim in tanjšim repom. Prva je bila podobna fagom družin Myoviridae, druga pa Siphoviridae, ki so dobro poznane in opisane. Med našimi izolati ni bilo nobenega bakteriofaga, ki bi imel drugačno morfologijo, zaradi katere jih ne bi mogli uvrstiti v katero od že znanih družin oziroma poddružin bakteriofagov. Tudi to hipotezo smo potrdili.
- Izolirani bakteriofagi se bodo med seboj razlikovali na genetskem nivoju in litičnem spektru – litični spekter je pokazal, da se izolirani bakteriofagi med seboj razlikujejo; nekateri fagi (predvsem izolati iz komercialnih pripravkov) so bili sposobni lize večine sevov, ki smo jih imeli na voljo, medtem ko so drugi (bakteriofagi u, v in z) lizirali le 1 ali 2 od teh sevov. Tudi karakterizacija na genetskem nivoju je pokazala razlike med njimi. Fagi so se razlikovali velikosti genomov in restriktionskem profilu, zato lahko hipotezo potrdimo.

7 POVZETEK

Delo smo pričeli z izolacijo *S. epidermidis* iz okolij, kjer smo to bakterijo pričakovali – človeška sluznica in koža. Izolirali smo 10 sevov *S. epidermidis*, katere smo dodali naboru 4 sevov, ki so bili izolirani iz okužb pacientov bolnišnice Valdoltra. Po potrjevanju vrste 14 sevov in določanju njihove rastne krivulje, smo se lotili izolacije zanje specifičnih bakteriofagov. Izolirali smo skupno 21 bakteriofagov, ki so bili specifične za naše seve *S. epidermidis*. Izolirane bakteriofage smo opisali z različnimi metodami. Morfološkega opisa izoliranih fagov smo se lotili opazovanjem njihove morfologije s presevno elektronsko mikroskopijo. Ugotovili smo, da se ti uvrščajo v dve družini: Siphoviridae in Myoviridae. Morfologija fagov nam je veliko povedala o čistosti fagov (pri posameznem vzorcu smo dobili homogeno populacijo virionov). V naslednjem koraku smo preverili litični spekter naših fagov tako, da smo naredili spot assay na vseh sevih, ki smo jih imeli na voljo in s tem preverili, kako široko/ozko specifični so fagi ter ugotovili, da se izoliranih fagi v tej lastnosti razlikujejo med seboj; nekateri med njimi so bolj široko specifični, drugi pa lizirajo na primer le enega od sevov. Nato smo s pomočjo dveh zaporednih metod plakov ugotovili, da so nekateri izmed fagov striktno litični, medtem ko so drugi sposobni tudi lizogenije. Ti rezultati so se skladali z uvrstitevijo v družine posameznih izolatov, saj je ta povezana z načinom razmnoževanja le-teh.

Genetska karakterizacija fagov je vključevala izolacijo fagne DNK, oceno velikosti genoma s pomočjo gelske elektroforeze v pulzirajočem polju, profiliranje z naključno restrikcijo genoma ter pomnoževanjem genov, specifičnih za različne družine fagov. Na koncu smo izbrali enega od izoliranih bakteriofagov (fag v) ter poslali njegovo DNK na sekvensiranje. S sekvenco bakteriofaga smo dobili veliko zanesljivih informacij o našem fagu, med drugim smo lahko preverili podobnosti z ostalimi *Staphylococcus* bakteriofagi na nukleotidnem in aminokislinskem nivoju ter dobili vpogled v organiziranost njegovega genoma.

Z eksperimentalnim delom smo potrdili delovne hipoteze in dosegli cilje, ki smo si jih zastavili pred začetkom dela. Zaključimo lahko, da nam je uspelo izolirati bakteriofage, specifične za seve *S. epidermidis*, ki smo jih imeli na voljo. S pomočjo različnih metod smo jih opisali in ugotovili, da se v nekaterih lastnostih razlikujejo med seboj, na podlagi katerih smo jih raporedili v nekaj skupin. Večina bakteriofagov je sodila v družino Siphoviridae, ki je iz vidika aplikativnosti manj zanimiva zaradi sposobnosti lizogenije. Vsi bakteriofagi, za katere smo potrdili, da sodijo v družino Myoviridae, so bili izolirani iz dveh komercialnih pripravkov, kar smo tudi pričakovali – za potrebe fagne terapije so zaželeni le litični fagi. Kljub temu, da nam striktno litičnih fagov iz ostalih vzorcev ni uspelo izolirati, je bila naša metoda izolacije očitno zelo upešna in bi potencialno lahko pripomogla k pridobivanju fagov, zanimivih za različne tipe aplikacij.

8 VIRI

- Abedon S. T., Kuhl S. J., Blasdel B. G., Kutter E. M. 2011. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1, 2: 66–85
- Ackermann H. W. 1998. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Advances in Virus Research*, 51: 135–201
- Ackermann H.-W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154, 4: 245–251
- Ackermann H.-W. 2009. Phage classification and characterization. V: *Bacteriophages: Methods and Protocols Vol.1: Isolation, characterization, and interactions*. Clokie R. J. M. in Kropinski M. A. (eds.). Vol. 501. Humana Press: 127 -140
- Ackermann H.-W. 2011. Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia* 32, 2: 90-94
- Adams H. A. 1959. *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers: 592 str.
- Antibiogram. 2013. Wikipedia.
<http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiogram> (23. maj 2014)
- Arciola C. R. 2009. New concepts and new weapons in implant infections. *The International Journal of Artificial Organs*, 32, 9: 533–536
- Arciola C. R., Campoccia D., Gamberini S., Donati M. E., Pirini V., Visai L., Speziale P., Montanaro L. 2005. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*, 26, 33: 6530–6535
- Aswani V., Tremblay D. M., Moineau S., Shukla S. K. 2011. *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages from the anterior nares of humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 21: 7853–7855
- Azeredo J., Sutherland I. W. 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9, 4: 261–266
- Bacteriophage. 2012. Todar's online textbook of bacteriology.
<http://textbookofbacteriology.net/phage.html> (17. mar. 2014)
- Bailey J. N., Dembinski D. R., McAllister W. T. 1980. Derivation of a restriction map of bacteriophage T3 DNA and comparison with the map of bacteriophage T7 DNA. *Journal of Bacteriology*, 35, 1:176-183
- Balcazar J. L. 2014. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *Plos Pathogens*, 10, 7, doi: 10.1371/journal.ppat.1004219: 4 str.
- Becker A., Murialdo H. 1990. Bacteriophage lambda DNA: the beginning of the end. *Journal of Bacteriology*, 172, 6: 2819–2824
- Bes M. 1994. Characterization of thirteen *Staphylococcus epidermidis* and *S. saprophyticus* bacteriophages. *Research in Virology*, 145, 2: 111-121
- Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górska A. 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Experimental Biology and Medicine*, 231, 4: 366–377
- Brüssow H., Desiere F. 2001. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages. *Molecular Microbiology*, 39, 2: 213–222
- Calendar R. 1988. *The bacteriophages*. New York, Springer: 614 str.

- Campoccia D., Montanaro L., Speziale P., Arciola C. R. 2010. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*, 31, 25: 6363–6377
- Canchaya C., Fournous G., Brüssow H. 2004. The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Molecular Microbiology*, 53, 1: 9–18
- Canchaya C., Proux C., Fournous G., Bruttin A., Brüssow H. 2003. Prophage genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 2: 238–276
- Chibani-chennoufi S., Bruttin A., Brüssow H., Dillmann M., Brüssow H. 2004. Phage-host interaction: an ecological perspective 186, 12: 3677-3686
- Chirakadze I., Perets A., Ahmed R. 2009. Phage Typing. V: Bacteriophages: Methods and Protocols, Vol. 2: Molecular and applied aspects. Clokie R.J.M. in Kropinski M.A. (eds.). Vol. 502. Humana Press: 293-305
- Clark J. R., March J. B. 2006. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology*, 24, 5: 212–218
- Cogen A. L., Yamasaki K., Muto J., Sanchez K. M., Crotty Alexander L., Tanios J., Ali Y., Kim E. J., Nizet V., Gallo R. L. 2010. *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulin-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A Streptococcus. *PloS One*, 5, 1, doi: 10.1371/journal.pone.0008557: 7.str.
- Costerton J. W. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 5418: 1318–1322
- Cuervo A., Carrascosa J. L. 2012. Bacteriophages: structure. eLS - Wiley Online Library, doi: 10.1002/9780470015902.a0024053: 7 str.
- Daniel A., Bonnen P. E., Fischetti V. A. 2007. First complete genome sequence of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, 189, 5: 2086–2100
- Deghorain M., Van Melderen, L. 2012. The staphylococci phages family: an overview. *Viruses*, 4, 12: 3316–3335
- Delgado S., Arroyo R., Jiménez E., Marín M. L., del Campo R., Fernández L., Rodríguez J. M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiology*, 9, 82, doi: 10.1186/1471-2180-9-82: 11 str.
- Drugs - FDA. 2011. U.S. Food and Drug Administration.
<http://www.fda.gov/drugs/resourcesforyou/consumers/ucm143568.htm> (27. okt. 2014)
- Frank D. N., Feazel L. M., Bessesen M. T., Price C. S., Janoff E. N., Pace N. R. 2010. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PloS One*, 5, 5 doi:10.1371/journal.pone.0010598: 15 str.
- Genomes Pages – Phage. 2014. EMBL – EBI.
<http://www.ebi.ac.uk/genomes/phage.html> (11. mar. 2014)
- Gallet R., Kannoly S., Wang N. I. 2011. Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiolgy*, 11:181, doi:10.1186/1471-2180-11-181: 16 str.
- Gilbert P., Collier P. J., Brown M. R. 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 10: 1865–1868

- Goerke C., Pantucek R., Holtfreter S., Schulte B., Zink M., Grumann D., Bröker W. B. M., Doskar J., Wolz C. 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Journal of Bacteriology*, 191, 11: 3462–3468
- Good L., Awasthi S. K., Dryselius R., Larsson O., Nielsen P. E. 2001. Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nature Biotechnology*, 19, 4: 360–364
- Greenwood D., Slack R. C. B., in Pentherer, J. F. 1998. Medical microbiology: A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnostic and control. 15th ed. Elsevier: 168-173
- Griffiths A., Wessler S .R., Lewontin R. C., Gelbart W. M., Suzuki D. T. in Miller J. H. 2005. Introduction to genetic analysis. 8th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 782 str.
- Groth, A. C. in Calos, M. P. 2004. Phage Integrases: Biology and Applications. *Journal of Molecular Biology*, 335, 3: 667–678
- Gutiérrez D., Martín-Platero A. M., Martínez B., Rodríguez A., García P., Martínez B. 2011. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 322, 1: 90-97
- Gutiérrez D., Martínez B., Rodríguez A., García P. 2010. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Staphylococcus epidermidis*. *Current Microbiology*, 61, 6: 601–608
- Gutiérrez D., Martínez B., Rodríguez A., García P. 2012. Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential. *BMC Genomics*, 13, 228, doi:10.1186/1471-2164-13-228: 10 str.
- Gutiérrez D., Martínez B., Ruas-Madiedo P., Rodríguez A., García P. 2014. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PloS One*, 9, 9, doi: 10.1371/journal.pone.0107307: 8 str.
- Haq I. U., Chaudhry W. N., Akhtar M. N., Andleeb S., Qadri I. 2012. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal*, 9, 1, doi: 10.1186/1743-422X-9-9: 9 str.
- Hausler, T. Bacteriophage therapy – Pros and Cons. 2007.
<http://www.bacteriophagetherapy.info/ECF40946-8E2F-4890-9CA6-D390A26E39C1/Pros%20and%20cons%20of%20phage%20therapy.html> (13. maj 2014)
- Hwang I., Hwang H. J., Choi H., Kim J. K., Lee G. D. 2012. Synergistic effects between silvernanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 1719-1726
- ISO 4833. 1991. Microbiology general guidance for the enumeration of microorganisms colony count technique at 30°C: 5 str.
- Kahánková J., Pantůček R., Goerke C., Růžičková V., Holochová P., Doškař J. 2010. Multilocus PCR typing strategy for differentiation of *Staphylococcus aureus* siphoviruses reflecting their modular genome structure. *Environmental Microbiology*, 12, 9: 2527–2538
- Karama M, Gyles C. L. 2008. Characterization of verotoxin-encoding phages from *Escherichia coli* o103:h2 strains of bovine and human origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 16: 5153 – 5158

- Kozitskaya S., Cho S. H., Dietrich K., Marre R., Naber K., Ziebuhr W. 2004. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infection And Immunity*, 72, 2: 1210–1215
- Kwan T., Liu J., DuBow M., Gros P., Pelletier J. 2005. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 14: 5174–5179
- Lima-Mendez G., Toussaint A., Leplae R. 2011. A modular view of the bacteriophage genomic space: identification of host and lifestyle marker modules. *Research in Microbiology*, 162, 8: 737–746
- Lina G., Boutite F., Tristan A., Bes M., Etienne J., Vandenesch F. 2003. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal agr alleles. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1: 18–23
- Loś J. M., Golec P., Wegrzyn G., Wegrzyn A., Loś M. 2008. Simple method for plating *Escherichia coli* bacteriophages forming very small plaques or no plaques under standard conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 16: 5113–5120
- Mack D., Becker P., Chatterjee I., Dobinsky S., Knobloch J. K. M., Peters G., Rohde H., Herrmann M. 2004. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 2-3: 203–212
- Madigan M.T., Clark D. P., Stahl D. in Martinko J. M. 2010. Brock biology of microorganisms, 13th ed. New Jersey, Pearson: 989-990
- Madhusoodanan J., Seo K. S., Remortel B., Park J. Y., Hwang S. Y., Fox L. K., Park Y. H., Deobald C. F., Wang D., Liu S., Daughert, S. C., Gill A. L., Bohach G. A., Gill S. R. 2011. An enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, 193, 8: 1854–1862
- Mehlin C., Headley C. M., Klebanoff S. J. 1999. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *Journal of Experimental Medicine*, 189, 6: 907–918
- Melo L. D. R., Sillankorva S., Ackermann H.-W., Kropinski A. M., Azeredo J., Cerca N. 2014. Isolation and characterization of a new *Staphylococcus epidermidis* broad-spectrum bacteriophage. *The Journal of General Virology*, 95, 2: 506–615
- Mitomycin. 2014. Wikipedia.
<http://en.wikipedia.org/wiki/Mitomycin> (25. mar. 2014)
- Molin S., Tolker-Nielsen T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 3: 255–261
- Montanaro L., Spezzale P., Campoccia D., Ravaioli S., Cangini I., Pietrocola G., Giannini S., Arciola C. R. 2011. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiology*, 6, 11: 1329–1349
- MRSA – Na meticilin odporni *Staphylococcus aureus*. 2014. Ministrstvo za zdravje RS.
http://www.mz.gov.si/si/delovna_področja/zdravstveno_varstvo/razvoj_zdravstvenega_varstva/nacionalna_komisija_za_obvladovanje_bolnišnicnih_okuzb/informacija_za_bolnike_in_svojce/ (31. jan. 2014)

- Mullan W. M. A. Isolation and purification of bacteriophages. 2001. Dairy Science.
<http://www.dairyscience.info/index.php/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html> (13. sep. 2014)
- Mullan W. M. A. Plaque formation. 2002. Dairy Science.
<http://www.dairyscience.info/index.php/enumeration-of-lactococcal-bacteriophages/plaque-formation.html> (13. sep. 2014)
- Olsen G. J., Lane D. J., Giovannoni S. J., Pace N. R., Stahl D. A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annual Review of Microbiology, 40: 337-365
- Otto M. 2008. Staphylococcal biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322: 207–228.
- Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* - the “accidental” pathogen. Nature Reviews. Microbiology, 7, 8: 555–567
- Pantůček R., Doškař J., Růžičková V., Kašpárek P., Oráčová E., Kvardová V., Rosypal S. 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. Archives of Virology, 149, 9: 1689–1703
- PFGE Typing. 2014. Applied Maths.
<http://www.applied-maths.com/applications/pulsed-field-gel-electrophoresis-pfge-typing> (3. sep. 2014)
- Phages. 2013.
<http://phages.org/> (26. apr. 2014)
- Pingoud A., Jeltsch A. 2001. Structure and function of type II restriction endonucleases. Nucleic Acids Research, 29, 18: 3705–3727
- Presterl E., Suchomel M., Eder M., Reichmann S., Lassnigg A., Graninger W., Rotter M. 2007. Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60, 2: 417–420
- Santos S. B., Fernandez E., Carvalho C. M., Sillankorva S., Krylo V. N., Pletenea E. A., Shaburova O. V., Nicolau A., Ferrieira E. C., Azeredo J. 2010. Applied Environmental Microbiology, 76, 21:7338-7342
- S. epidermidis* – NCBI. 2014. National Center for Biotechnology Information.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/155> (6. mar. 2014)
- Shojaie F., Dehestani M. 2010. The simulation of virus life cycle with quantum gates. Computers in Biology and Medicine, 40, 3: 359–362
- SILVA. 2014.
<http://www.arb-silva.de/> (18. jun. 2014)
- Sulakvelidze A., Kutter E. 2005. Bacteriophage Therapy in Humans. V: Bacteriophages biology and applications. Sulakvelidze, A. in Kutter, E. (eds.), Boca Raton, CRC: 436
- Takahashi T., Satoh I., Kikuchi N. 1999. Phylogenetic relationship of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on the 16S rRNA gene sequence analysis. International Journal of Systematic Bacteriology, 49: 725–728
- Talbot H. W., Parisi J. T. 1976. Phage Typing of *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Clinical Microbiology, 3, 5: 519–523

- Tang D., Ando S., Takasaki Y., Tadano J. 2000. Mutational analyses of restriction endonuclease--HindIII mutant E86K with higher activity and altered specificity. *Protein Engineering*, 13, 4: 283–289
- Thorberg B. M., Danielsson-Tham M. L., Emanuelson U., Persson Waller K. 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*, 92, 10: 4962–4970
- Toms A. D., Davidson D., Masri B. A., Duncan C. P. 2006. The management of peri-prosthetic infection in total joint arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 88, 2: 149–155
- Travis J. All the World's a Phage: Viruses that eat bacteria abound—and surprise. 2003. *Science News Online*.
http://www.phschool.com/science/science_news/articles/all_worlds_phage.html (5. feb. 2014)
- Typing bacteria. The oral environment.
<http://www.ncl.ac.uk/dental/oralbiol/oralenv/tutorials/typingbacteria.htm> (16. maj 2014)
- Van der Merwe R. G., Van Helden P. D., Warren R. M., Sampson S. L., Gey van Pittius N. C. 2014. Phage-based detection of bacterial pathogens. *The Analyst*, 139, 11: 2617–2626.
- Verheust C., Pauwels K., Mahillon J., Helinski D. R., Herman P. 2010. Contained use of bacteriophages: risk assessment and biosafety recommendations. *Applied Biosafety*, 15, 1: 32-44
- ViralZone. 2012. ExPASy – Bioinformatics Resource Portal.
http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/236.html (4. mar. 2014)
- Virus taxonomy. 2013. International Committee of Taxonomy on Viruses.
<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (5. feb. 2014)
- Virusi. 2014. Wikipedia.
<http://sl.wikipedia.org/wiki/Virusi> (13. mar. 2014)
- Von Eiff C., Arciola C. R., Montanaro L., Becker K., Campoccia, D. 2006. Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. *The International Journal of Artificial Organs*, 29, 4: 360–367
- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K., Whitman W. B. 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3. 2nd ed. New York, Springer: 1450 str.
- Vuong C., Otto M. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4, 4: 481–489
- Wagner P. L., Waldor M. K. 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infection and Immunity*, 70, 8: 3985–3993
- Wang Y., Lu C. 2009. Bacteriophage lysins: progress and perspective – a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 49, 10: 1277–1281
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane, D. J. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173, 2: 697-703

- Wu F., Della-Latta P. 2006. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. V: Advanced techniques in diagnostic microbiology. Tang, W.Y. in Stratton, C.W. (eds.) New York, Springer: 540 str.
- Zhao L., Wang H., Huo K., Cui L., Zhang W., Ni H., Zhang Y., Wu Z., Chu P. K. 2011. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 24: 5706–5716
- Ziebuhr W., Hennig S., Eckart M., Kränzler H., Batzill C., Kozitskaya S. 2006. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28: Suppl 1, S14–20

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojem mentorju doc. dr. Tomažu Accettu za vso strokovno pomoč in natančen pregled naloge. Hvala somentorju dr. Matjažu Peterki za odlično usmerjanje, številne nasvete in kritičen pregled naloge. Recenzentki prof. dr. Ines Mandić-Mulec se zahvaljujem za konstruktivno kritiko naloge.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem Laboratorija za bioanalitiko, posebej dr. Niki Janež in Andreji Kokošin, za uvajanje v svet raziskovanja, za ustvarjanje prijetnega delovnega vzdušja in vso pomoč pri delu. Hvala tudi sodelavcem Laboratorija za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu za vzpodbudne besede in nasvete.

Hvala dr. Karmen Stopar za hiter tehničen pregled magistrske naloge.

Posebna zahvala gre moji družini in Mateju, za vso podporo in razumevanje. Hvala Jerneji za neštete stimulativne pogovore.

PRILOGA A

Protokol za ekstrakcijo DNK bakteriofagov

Najprej smo namnožili bakteriofag s pomočjo elucije fagov iz konfulentnih plošč v pufer, namnoženim fagom pa določili titer. Za izolacijo DNK je bil titer fagov vsaj 1×10^9 . Suspenzijo smo pustili nekaj dni v hladilniku pri 4°C .

Dodali smo turbonukleazo (Accelagen) do koncentracije 125 U/mL; za optimalno delovanje turbonukleaze smo dodali še MgCl₂ do koncentracije 1 mM, premešali in inkubirali preko noči z rahlim stresanjem pri sobni temperaturi.

Sledilo je preverjanje prisotnosti bakterijske DNK s pomočjo PCR-ja za gen 16S rRNK. V primeru pozitivnega PCR-ja smo ponovili korak z dodatkom turbonukleaze do koncentracije 125 U/ml in inkubirali 1 h pri 37°C .

Turbonukleazo smo inaktivirali z dodatkom 0,1 M EDTA.

Fagno kapsido smo odprli z dodatkom 0,5 % SDS, 1 % sarkozilom in 1 mg/mL proteinaze K. Mešanico smo premešali in jo inkubirali v vodni kopeli 2 h pri 56°C .

Dodali smo mešanico fenol:kloroform:izoamilalkohol (25:24:1) v razmerju 1:1, premešali in centrifugirali 15 min, 4000 g.

Previdno smo odvzeli vodno fazo in ponovili prejšnji korak.

Previdno smo odvzeli vodno fazo in ji dodali kloroform v razmerju 1:1. Centrifugirali smo 10 min, 6000 g.

Ponovno smo odvzeli vodno fazo in ji dodali 1/10 volumna 3 M natrijevega acetata in 2 volumna hladnega absolutnega etanola.

Premešali smo z obračanjem centrifugirke, nato pa inkubirali preko noči pri -20°C , da je prišlo do precipitacije DNK.

Naslednji dan smo centrifugirali 1 uro pri 9000 g, pri 4°C .

Pelet smo sprali z 80% hladnim etanolom in ponovno centrifugirali, 30 min pri 9000g, pri 4°C .

Supernatant smo zavrgli, pelet (DNK) pa smo posušili na zraku, nato pa resuspendirali v 10 mM TRIS pufru, pH 8,5.

DNK smo analizirali na agaroznem gelu. V primeru prisotnosti RNK, smo to odstranili z dodatkom 0,5 mg/mL RNaze A, nato smo inkubirali 2 h pri 37°C in ponovili fenol-kloroformno ekstrakcijo ter precipitacijo DNK. DNK smo ponovno analizirali na agaroznem gelu in po potrebi ponovili tretiranje z RNazo. Čisti DNK smo določili koncentracijo in jo hranili v zamrzovalniku pri -20°C .

PRILOGA B

Podatki merjenj optične gostote (OD 600nm) in CFU/ml bakterij (povprečja triplikatov)

Vzorec - paralelki	OD 600 nm po času (h)									
	0	2,15	3,7	5,2	6,7	8,2	9,7	11,2	24,15	48,15
SeV1.a	0,008	0,004	0,043	0,230	0,618	0,923	1,048	1,131	1,484	1,638
SeV1.b	0,017	0,006	0,037	0,223	0,624	0,946	1,048	1,165	1,502	1,602
SeV2.a	0,015	0,011	0,043	0,182	0,562	0,876	1,084	1,217	1,510	1,712
SeV2.b	0,015	0,004	0,036	0,159	0,552	0,874	1,040	1,206	1,562	1,820
SeV3.a	0,003	0,004	0,021	0,113	0,398	0,775	1,001	1,095	1,310	1,259
SeV3.b	0,008	0,005	0,021	0,144	0,394	0,761	1,001	1,117	1,333	1,303
SeV4.a	0,001	0,007	0,017	0,069	0,220	0,555	0,801	0,934	1,414	1,621
SeV4.b	0,001	0,002	0,015	0,070	0,220	0,545	0,785	0,976	1,403	1,605

Vzorec- paralelki	CFU/ml po času (h)									
	0	2,15	3,7	5,2	6,7	8,2	9,7	11,2	24,15	48,15
SeV1.a	1,07E+06	5,83E+06	2,90E+07	2,60E+08	7,00E+08	7,00E+08	1,80E+09	1,63E+09	2,13E+09	4,35E+09
SeV1.b	1,10E+06	3,77E+06	2,53E+07	2,23E+08	7,67E+08	1,47E+09	1,13E+09	6,33E+08	1,97E+09	3,20E+09
SeV2.a	1,77E+06	5,00E+06	1,63E+07	1,03E+08	8,00E+08	1,13E+09	1,50E+09	1,67E+09	1,43E+10	/
SeV2.b	1,47E+06	3,47E+06	1,90E+07	1,47E+08	9,00E+08	1,37E+09	1,70E+09	2,45E+09	4,00E+09	4,20E+10
SeV3.a	1,20E+06	2,00E+06	1,07E+07	8,33E+07	3,57E+08	6,33E+08	3,32E+09	1,13E+09	9,33E+09	/
SeV3.b	1,33E+06	2,40E+06	8,33E+06	6,33E+07	3,08E+08	1,03E+09	2,20E+09	1,40E+09	2,00E+09	/
SeV4.a	2,50E+06	3,17E+06	1,37E+07	1,03E+08	3,17E+08	7,00E+08	1,20E+09	1,63E+09	4,27E+09	/
SeV4.b	1,77E+06	3,70E+06	1,63E+07	5,33E+07	2,58E+08	1,20E+09	1,40E+09	1,73E+09	4,30E+09	/

PRILOGA C

Slika biokemijskih testov API STAPH



PRILOGA D

Podatki o številu plakov in izračun titra (PFU/ml) bakteriofagov

Ime faga	Število plakov - 1. paralelka	Število plakov - 2. paralelka	Redčitev, pri kateri so bili plaki števni	Titer bakteriofaga - povprečje paralelk (PFU/ml)
a	40	58	10^{-5}	4,90E+07
b	56	75	10^{-6}	6,55E+08
c	53	49	10^{-6}	5,10E+08
d	53	52	10^{-6}	5,25E+08
e	114	126	10^{-6}	1,20E+09
g	42	47	10^{-6}	4,45E+08
h	62	63	10^{-6}	6,25E+08
i	105	/	10^{-5}	1,05E+08
j	38	62	10^{-6}	5,00E+08
k	44	/	10^{-7}	4,40E+09
l	198	158	10^{-6}	1,78E+09
m	85	99	10^{-7}	9,20E+09
n	124	101	10^{-7}	1,13E+10
o	91	98	10^{-4}	9,45E+06
p	366	359	10^{-6}	9,20E+09
r	64	75	10^{-7}	6,95E+09
s	182	224	10^{-6}	2,03E+09
t	37	43	10^{-7}	4,00E+09
u	169	/	10^{-6}	1,69E+09
v	201	228	10^{-7}	2,15E+10
z	230	209	10^{-7}	2,20E+10

PRILOGA E

Seznam izoliranih bakteriofagov z določenim titrom in volumnu po namnoževanju

Ime bakteriofaga	Vzorec	Titer bakteriofaga (PFU/ml)	Volumen (ml)
a	vzorec odpadnih voda – obogatitev s sevom SeV3	4,90E+07	20
b	vzorec odpadnih voda – obogatitev s sevom SeV3	6,55E+08	4,5
c	vzorec odpadnih voda – obogatitev s sevom SeV3	5,10E+08	2,5
d	vzorec odpadnih voda – obogatitev s sevom SeV3	5,25E+08	2,9
e	Enkophage	1,20E+09	2,4
g	Intestiphage	4,45E+08	2,9
h	Intestiphage	6,25E+08	2,5
i	Enkophage	1,05E+08	3,4
j	Enkophage	5,00E+08	2,5
k	Intestiphage	4,40E+09	4
l	Intestiphage	1,78E+09	2,5
m	vzorec spiranja nosne votline - obogatitev s sevom SeC1	9,20E+09	2,3
n	vzorec znoja	1,13E+10	2,5
o	vzorec znoja	9,45E+06	3,7
p	vzorec spiranja nosne votline	9,20E+09	5
r	vzorec spiranja nosne votline - obogatitev s sevom SeC1	6,95E+09	4
s	vzorec znoja - obogatitev s sevom SeV1	2,03E+09	3
t	vzorec spiranja nosne votline - obogatitev s sevom SeC1	4,00E+09	2,3
u	vzorec spiranja nosne votline - obogatitev s sevom SeC1	1,69E+09	3,5
v	vzorec znoja	2,15E+10	2,1
z	vzorec spiranja nosne votline	2,20E+10	2,8

PRILOGA F

Fotografije vseh izoliranih bakteriofagov (TEM)

