

Állatorvostudományi Egyetem

Enterális baktériumok új bakteriofágjainak jellemzése

Készítette: Hajdu Eszter

Témavezető: Sváb Domonkos

ATK Állatorvos-Tudományi Intézet, tudományos főmunkatárs



Budapest, 2021

Tartalom

1. Bevezetés	4
1.1. <i>Escherichia coli</i>	4
1.1.1 Enterohemorragiás <i>E. coli</i> (EHEC)	5
1.1.1.1. <i>E. coli</i> O157:H7	6
1.2. Bakteriofágok	7
1.2.1 Általános jellemzők	7
1.2.2 Bakteriofágok rendszerezése	9
1.2.2.1. T4-szerű fágok	10
1.2.2.2. rV5-szerű fágok	11
1.2.2.3. HK578-szerű fágok	12
1.2.3 Bakteriofágok lehetséges alkalmazása	12
1.2.3.1. Bakteriofágok alkalmazása élelmiszerben	13
1.2.3.2. Bakteriofágok célzott alkalmazása <i>Escherichia coli</i> ellen	16
2. Célkitűzések, kérdések	20
3. Anyag és módszer.....	20
3.1. Bakteriumtörzs felszaporítása	20
3.2. Bakteriofágok felszaporítása	20
3.3. Fágtitrálás	21
3.4. Baktériumtörzsek és bakteriofágok	21
3.4.1 Nukleotidszekvenciák meghatározása	22
3.4.2 Bakteriofágok szétválasztása	22
3.4.3 Polimeráz láncreakció (PCR)	22
3.4.4 Agaróz gélelektroforézis.....	24
3.5. Gátlási kísérlet.....	24
3.5.1 Kísérlet célja	24
3.5.2 Baktériumtörzs.....	25
3.5.3 Fág propagálás	25
3.5.4 Ellenőrző előkísérletek	26
3.5.5 Hús beoltása, visszatenyésztés	26
4. Eredmények.....	27
4.1. Gátlási kísérlet.....	27
4.1.1 Hőmérséklet és MOI hatása.....	27
5. Megbeszélés és következtetések	28
6. Összefoglalás.....	30
7. Summary.....	31
8. Irodalom.....	32

9. Köszönetnyilvánítás	35
-------------------------------------	-----------

Rövidítések jegyzéke

A/E – attaching/effacing

CFU – colony forming unit

DAEC – diffusely adherent *E.coli*

EAEC – enteroaggregative *E. coli*

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

EHEC – enterohemorrhagic *E.coli*

EIEC – enteroinvasive *E.coli*

EOP – efficiency of plating

EPEC – enteropathogenic *E.coli*

ETEC – enterotoxigenic *E. coli*

FDA – U.S. Food and Drug Administration

GRAS – Generally Recognized as Safe

HUS – hemolitikus urémiás szindróma

LB – Luria-Bertani tápleves

LEE – locus of enterocyte effacement

LT – heat-labile toxin

MOI – multiplicity of infection

PAI – pathogenicity island

PCR – polymerase chain reaction

PFU – plack forming unit

PBS – phosphate buffered saline

ST – heat-stable toxin

STEC – Shiga toxin-producing *E. coli*

Stx – Shiga-toxin

TAE – trisz-acetát-EDTA

TBE – trisz-borát-EDTA

VT – verocytotoxin

1. Bevezetés

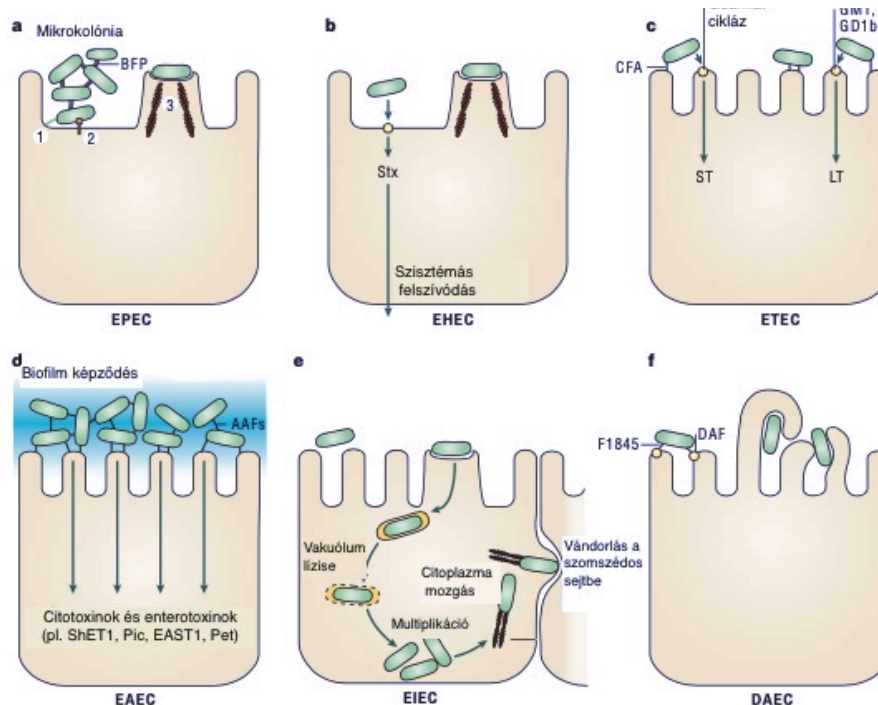
1.1. *Escherichia coli*

Az *Escherichia coli* baktérium az egészséges humán bélmikrobióta tagja, már a születés után néhány órával megtelepszik a gasztrointesztinális rendszerben. Általában a baktérium és gazdaszervezete képes évtizedeken keresztül szimbiózisban élni, anélkül, hogy ezek a kommenzalista törzsek bármilyen megbetegedést okoznának. Vannak azonban olyan, adaptálódott törzsek, amelyek specifikus virulencia faktorokra tettek szert, melyek segítségével képesek új gazdákhoz való alkalmazkodásra, és nagyszámú betegség előidézésére. Ezeknek a virulencia faktoroknak a legsikeresebb kombinációi vezettek a különböző *E. coli* patotípusok kialakulásához, amelyek mind különböző gerinces állatokban, mind emberben képesek akár igen súlyos megbetegedést is okozni. Ezek között a patotípusok között tehát előfordulnak állatorvosi, humán orvosi, vagy akár mindkét szempontból jelentősek is. Emberben három általános kórkép jellemzi az ilyen fertőzéseket: enterális/hasmenéses megbetegedés, húgyúti fertőzés vagy szepszis/meningitisz. Az intesztinális kórokozókat legalább 6 jól elkülöníthető patotípusra oszthatjuk: enteropatogén *E. coli* (EPEC), Shiga toxikus *E. coli* (STEC) (ezen belül enterohemorrágiás *E. coli* (EHEC)), enterotoxikus *E. coli* (ETEC), enteroaggregatív *E. coli* (EAEC), enteroinvazív *E. coli* (EIEC) és diffúzan-adherens *E. coli* (DAEC). A különböző patotípusok sokszor olyan csoportokból állnak össze, amelyek megegyeznek O (lipopoliszacharid) és H (flagellum) antigénjeikben. Ezek az antigének felelősek a szerocsoportok (O) és szerotípusok (H) kialakításáért (Kaper és mtsai, 2004).

A különböző patotípusok különbözőképpen lépnek interakcióba az eukarióta sejtekkel (**1. ábra**). Az EPEC törzsek a vékonybél enterocitáihoz tapadnak, lerombolva a mikrobolyhok normál felépítését, ez az úgynevezett „attaching and effacing” (A/E), mikrobolyh elhalást okozó kapcsolódás. A citoszkeletális átrendeződések a bél gyulladásához és hasmenéshez vezetnek. Az EHEC törzsek hasonló módon fertőznek, csak a vastagbélben. Ezeknek a törzseknek a fő megkülönböztető tulajdonsága a Shiga-toxin (Stx) termelés, ami a vérkeringésbe jutva akár életveszélyes komplikációkat is okozhat. Az előzőekhez hasonlóan az ETEC törzsek a vékonybél enterocitáihoz tapadnak, és vizes hasmenést váltanak ki, különböző hő-labilis (LT) és/vagy hő-stabil (ST) enterotoxinok segítségével. Az EAEC törzsek a vékony- és vastagbél epitel rétegén vastag biofilmet alkotnak, amiből szekréciós citotoxinokat és enterotoxinokat bocsátanak a sejtbe. Az EIEC behatol a vastagbél epiteliális sejtjeibe, ahol a

fagoszóma lízisét okozza, és aktin mikrofilamentumok segítségével mozog a sejten keresztül. Képes lehet oldalirányban direkt módon egyik sejtől a másikba is átjutni, vagy a sejtől kilépve a baso-laterális membránon át belépni a szomszédos sejtbe. A DAEC törzsek egyedi szignál transzdukciós hatást fejtenek ki a vékonybél enterocitáiban, ami megnyúlt, ujjszerű sejtkinövések kialakulását okozza, amik körülfogják a baktériumokat (Kaper és mtsai, 2004)

1. ábra *Escherichia coli* patotípusok (Kaper és mtsai, 2004 nyomán)



1.1.1 Enterohemorrágiás *E. coli* (EHEC)

Az EHEC patotípusba tartozó törzsek kiemelt figyelmet élveznek, mert zoonotikus és élelmiszer-közvetítte fertőzések kialakítására képesek, amelyek súlyosak lehetnek, főleg kisgyermek, idős, illetve immunkompromittált személyek esetében. Az általuk jelentett veszély a fertőzéshez szükséges alacsony csíraszám (<100) miatt is nagy. Az EHEC törzsek specifikusan a hemolítikus urémiás szindróma (HUS) kialakulásával hozhatóak összefüggésbe. Fő haszonállat rezervoárjuk a szarvasmarha, így olyan szarvasmarha eredetű élelmiszerekben, mint a nem megfelelően átfőtt darált marhahús vagy a pasztörizálatlan tej is előfordulhatnak, sőt az állatok trágyájával érintkezésbe kerülő termények is okozhatnak megbetegedéseket. A legtöbb zoonotikus fertőzéshez hasonlóan az EHEC által okozott betegség is főleg embereken figyelhető meg, míg a rezervoár fajok általában nem mutatják a fertőzés jeleit. A nagyon

alacsony fertőző dózis miatt akár az ivóvízzel, emberről emberre való terjedéssel, állatsimogatóban, vagy farmlátogatások alkalmával is megfertőződhetünk.

Ezekben a törzsekben a fő virulenciafaktor valamilyen Shiga toxin (Stx1, Stx2), másnéven verocytotoxin (VT), emiatt a STEC patotípus egy altípusának is tekinthetőek. Az Stx öt egyforma B alegységből és egy A alegységből tevődik össze, az előbbi a holotoxinnak a célsejt felületéhez kötéseért felelős, míg az utóbbi a riboszómális RNS-t hasítja, ezáltal a fehérjeszintézis gátlódik. Az Stx családon belül két alcsoportot különböztethetünk meg: az Stx1 és Stx2, amik körülbelül 55% aminosav egyezést mutatnak. Az Stx a vastagbélben termelődik, majd a vérárammal jut a vesékhez. Itt a vese endotél sejtjeit károsítja, és a mikroérrendszer elzáródását okozza, így vesegyulladást okoz, ami HUS kialakulásához vezethet. A HUS vérlemezkeszám csökkenéssel, hemolitikus anémiával és végül halálos kimenetelű akut veseelégtelenséggel járhat. Az Stx a vastagbélben helyi károsodást is okozhat, így klinikai megjelenése embereknél véres/vértelen hasmenés, hemorrágiás kolitisz, nekrózis és bélperforáció is lehet (Karmali, 2018; Newell és La Ragione, 2018). A Shiga toxin termelésért általában lambdoid fágokból kialakult profágok a felelősek. A profágok bakteriális stressz hatására lítikus ciklusba léphetnek, amelynek során a széteső baktériumsejtből a toxin a környezetbe jut. Emiatt az antibiotikumok használata STEC fertőzések kezelésére ellenjavalt, mivel stimulálhatja a toxin felszabadulását (Croxen és mtsai, 2013).

Emellett az EHEC törzsek rendelkeznek a LEE (locus of enterocyte effacement) patogenitás szigettel (PAI), ami a III-as típusú szekréciós rendszert, az intimin adhéziónak a fehérjét és egyéb szekréciós fehérjéket kódol, amik homológok az EPEC törzsek által termelttel. A LEE PAI az EPEC törzsek kulcs virulencia faktora, ez felelős a jellemző A/E kialakulásáért. Bár több mint 200 *E. coli* szerotípus képes Stx termelésre, de csak azokat nevezzük EHEC-nak, amik a LEE-vel is rendelkeznek. Az intimin fontos szerepet játszik a bél kolonizációjában, HUS betegekben erős immunválaszt vált ki a többi LEE kódolt fehérjéhez hasonlóan (Kaper és mtsai, 2004)

1.1.1.1. *E. coli* O157:H7

Az EHEC törzsek közül a legismertebb az O157:H7-es antigént hordozó szerotípus, ami több nagy *E. coli* járvány kitöréséért is felelős volt. Mivel ez a HUS betegekben leggyakrabban izolált baktérium, ezért valószínűleg jól reprezentálja az EHEC törzseket (Kaper és mtsai, 2004).

1.2. Bakteriofágok

A bakteriofágok (fágok) a Földön a legnagyobb számban előforduló organizmusok. Mind örökítőanyagukat, mind formájukat tekintve nagyon változatosak. Ezek a baktériumokat fertőző vírusok obligát sejtparaziták, szaporodásukhoz mindenképpen gazdasejtre van szükségük. Így elterjedésük és abundanciájuk szoros összefüggésben van a gazdaorganizmusokéval. A legtöbb baktérium és Archea a nyílt óceánokban, talajban, óceáni üledékben fordul elő, ahol egy ilyen sejtre akár 10 bakteriofág is juthat. Bár gazdaspecificitásuk miatt sok baktérium kapcsolódik az emberekhez és állatokhoz - mind patogénként, mind esszenciális szimbiontaként - ezeknek, és a hozzájuk kapcsolódó fágoknak a száma nagyságrendekkel kevesebb. Viszont hiába tekinthetjük kevésbé számottevőnek ezeknek a baktériumoknak a mennyiségét, mégis hatalmas a jelentőségük az emberek életében. Főleg különböző betegségek, vagy akár az élelmiszeripar szempontjából is lényegesek, ahol szintén összefüggésbe hozhatóak fertőzésekkel, vagy a termelés kapcsán számunkra előnyös módon használjuk fel őket. Így az ezeket fertőző bakteriofágok szerepe is kiemelkedő számunkra (Clokier és mtsai, 2011).

1.2.1 Általános jellemzők

A bakteriofágok, mint baktériumokat fertőző vírusok, általános jellemzőikben megegyeznek az eukarióta szervezeteket fertőző vírusokkal. Ezek a tulajdonságok a következők:

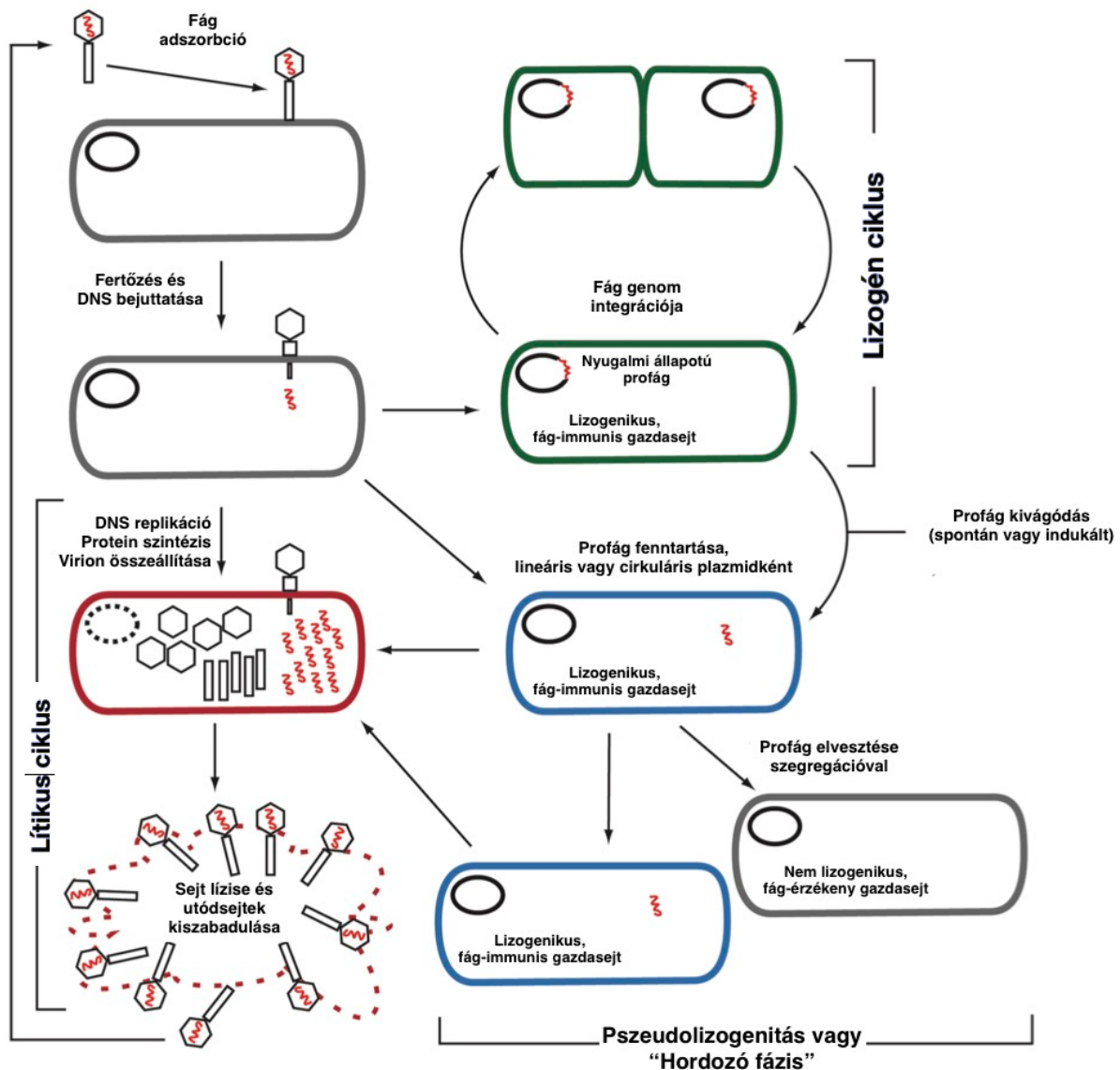
- obligát sejtparaziták
- nincs nukleinsav- és fehérjeszintetizáló rendszerük
- csak egyféle nukleinsavat tartalmaznak

De ezeken a korlátokon belül nagyon heterogének. Nukleinsavuk lehet RNS vagy DNS, szimpla vagy dupla szálú, lineáris vagy cirkuláris, folyamatos vagy szegmentált. Mindig rendelkeznek egy fehérjeburokkal, amit kapszidnak nevezünk. Ennek a fehérje- és lipidkomponensei meghatározzák a virion alakját, szimmetriaviszonyait. Ez alapján megkülönböztetünk négyféle fágformát: farkos (tailed), ikozahedrális (köbös), helikális (rod shaped) és pleomorf fágokat (Medveczky és mtsai, 1998).

A bakteriofágok, más vírusokhoz hasonlóan az általuk fertőzött sejtet használják a saját genetikai állományuk megsokszorozására. A fágok adszorpciója egy nagyon specifikus folyamat, így a legtöbb fág szűk gazdaspektrummal rendelkezik, általában faj- vagy akár törzs specifikusak is lehetnek. Ezt a tulajdonságot ki lehet használni, akár a fágtipizálás során, bizonyos baktériumtörzsek azonosítására, vagy a fágtiter-emelkedési reakcióban, ami minták baktériumtartalmának meghatározására szolgál. Előfordulnak azonban széles gazdaspektrumú fágok is, amik akár Gram+ és Gram- baktériumok fertőzésére egyaránt képesek lehetnek. Az ilyen fágoknak fontos szerepe lehet bizonyos gének terjesztésében a baktériumok között. A fágokat két fő életciklus típus jellemzi, ami meghatározza, hogy a gazdasejttel milyen interakcióba lépnek. A lítikus fágok az örökítőanyagukat a fertőzött sejtbe juttatva új fágok képződését indítják el, aminek hatására a sejt elpusztul és szétesik, belőle pedig kiszabadulnak az új vírus partikulák (virulens/vegetatív fág). Ezzel szemben a lizogén életciklust mutató fágok a fertőzött sejtet nem pusztítják el, hanem annak genomjába épülnek profágként (temperált fág). Vannak fágok amelyek képesek úgynevezett pszeudolizogén életmódra, és integrálódás nélkül, a sejten belül plazmidként léteznek tovább (**2. ábra**). A profág a baktériumsejt osztódásakor az utódbaktériumokba is átjut. Ez akár több ezer generáción keresztül is fennmaradhat, melynek során a fág képes a baktérium fenotípusának megváltoztatására, olyan gének expressziójával, amelyek a baktériumban eredetileg nem voltak jelen. Ez a folyamat a lizogén konverzió. A lítikus fertőzés során a fágreszecskek a baktérium génkészletéből származó szakaszt is átvehetnek, amit lizogén fertőzéssel képesek más baktériumokba átjuttatni, mikor profágként integrálódnak. Ezt transzdukciónak nevezzük, amely során új, öröklődő tulajdonságok (pl. virulencia, rezisztencia faktorok) jelenhetnek meg az utódbaktériumokban. A környezeti feltételek (pH, hőmérséklet, UV sugárzás) és a gazdasejt anyagcseréjének megváltozása a profág lítikus életciklusba lépését okozhatja. Ezt a hatást indukciónak nevezzük, mely a

baktérium líziséhez vezet (Medveczky és mtsai, 1998; Clokie és mtsai, 2011; Fortier és Sekulovic, 2013).

2. ábra Bakteriofágok jellemző életciklusai (Fortier és Sekulovic, 2013 nyomán)



1.2.2 Bakteriofágok rendszerezése

Ahogy az 1.2.1. fejezetben említettem, nagyrészt morfológiai szempontok alapján a fágokat 4 csoportra oszthatjuk:

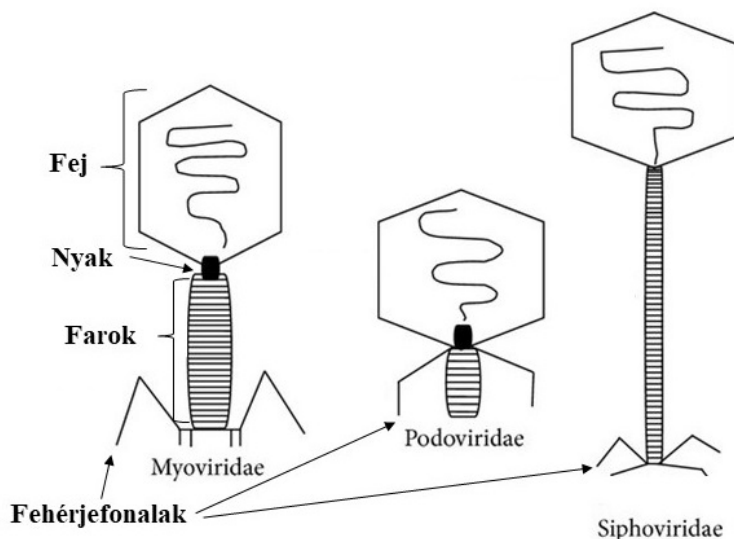
A köbös fágok nukleinsava RNS és DNS is lehet, ez alapján két csoportra osztjuk őket: DNS-t tartalmaz a *Microviridae*, a *Corticoviridae* és a *Tectiviridae*, ez lehet szimpla vagy duplaszálú is; RNS-t pedig a *Leviviridae* és *Cystoviridae* családok.

A fonalas fágok szimpla szálú DNS-t tartalmaznak, és három családot sorolunk ide: *Inoviridae*, *Lipotrixviridae*, *Rudiviridae*.

A pleomorf fágoknak nincsen kapszidja, dupla szálú DNS genomjukat mátrix-proteinnel kitöltött burok veszi körül. Ezt a csoportot a *Plasmaviridae* és a *Fuselloviridae* család képviseli. (Maniloff és mtsai, 1999)

A farkos bakteriofágok binális szimmetriájúak. A feji rész köbös szerkezetű, ebben található a dupla szálú DNS. Hozzá egy helikális farki rész kapcsolódik. Ennek a faroknak a tulajdonságai alapján 3 csoportot különítünk el: *Myoviridae* - hosszú, kontraktilis fark; *Siphoviridae* – hosszú, nem kontraktilis fark; *Podoviridae* – rövid fark (3. ábra). Ezen belül a fej alakja változhat, ikozaédres, oktaédres vagy megnyúlt formájú is lehet, ez alapján alcsoportokat is el lehet különíteni (Medveczky és mtsai, 1998; Maniloff és mtsai, 1999). Az általunk vizsgált bakteriofágok mind olyan csoportokba tartoznak, amik a farkos fágokhoz, a *Caudovirales* rendbe sorolhatóak, a következőkben ezeket ismertetem bővebben.

3. ábra A farkos fágok felépítése (Elbreki és mtsai, 2014 nyomán)



1.2.2.1. T4-szerű fágok

A T4-szerű fágok a *Myoviridae* családba, ezen belül is a *Tevenvirinae* alcsaládba tartoznak. Elnevezésüket a *Myovírusok* legkutatatottabb tagjáról, a T4 fágról kapták. Változatos ökológiai nichekben előfordulnak, az emlősök bélrendszerétől a nyílt óceánig. Közepesen

megnyúlt ikozaéderes feji rész és kontraktilis farokrész jellemzi őket, ami egy komplex alaplemezzel végződik, amiből 6 hosszú, megtört fehérjefonal ágazik szét (Desplats és Krisch, 2003). A több mint 160 bakteriofágból, amiket morfológiai szempontok alapján a T4-szerű fágok közé sorolhatunk, 130 morfológiailag megkülönböztethetetlen a T4 fágtól. Ennek a T4-típusú morfológiának az erős konzervációja arra utal, hogy a strukturális komponenseket kódoló része a fág genomnak evolúciósan fixált lehet. A T4-szerű fágok három fő szerkezeti proteint (gp18, gp19, gp23) tartalmaznak, ezek szekvenciájának összehasonlítása alapján négy csoportra oszthatjuk őket: T-páros, pseudo-T-páros, shizo-T-páros és exo-T-páros fágokra. Ez a felosztás a morfológiai adatokkal is egybeesik. A T-páros és pseudo-T-páros fágok hasonlítanak a T4 fágra leginkább, a shizo-T-páros fágok feji része egyértelműen nagyobb és hosszabb genommal rendelkeznek. Az exo-T-páros fágok a fej méretében és alakjában, illetve a kontraktilis fark hosszában is különböznek a T4-től. A növekvő morfológiai varianciája ezeknek az alcsoportoknak növekvő filogenetikai varianciával is jár. Az ismert T4-szerű fágoknak megközelítőleg 90%-a *E. coli*-t vagy más enterobaktériumokat képes megfertőzni, a maradék 10% filogenetikai szempontból távolabbi baktérium törzseket, mint az *Aeromonas*, *Vibrio* és a *Synechococcus*. Az enterobakteriális fágok nagy része a szennyvízből vagy csatornavízből származik, jelezve, hogy ezek természetes előfordulási helye az emberi és állati bélrendszer. (Desplats és Krisch, 2003; Kalinienė és mtsai, 2010)

1.2.2.2. rV5-szerű fágok

Az rV5-szerű fágok szintén a *Myoviridae* családba tartozó, nagyobb méretű fágok. *Vequintavirusok* közé sorolhatóak, ami a *Vequintavirinae* alcsaládba tartozik. Ez az alcsalád négy nemzetséget tartalmaz: *Avunavirus*, *Certrevirus*, *Seunavirus* és *Vequintavirus*. A törzs típusvírusát, a V5 fágot is felhasználták a Shiga-toxin termelő *E. coli* O157:H7 tipizálásánál. A legtöbb, már leírt ilyen fág gazdaorganizmusa az O157:H7 (Korf és mtsai, 2019). Kontraktilis farkokkal rendelkeznek, így morfológiailag a farkos bakteriofágokhoz tartoznak. A feji részük ikozahedrális, a farokrészhez 5-6 fehérjefonal csatlakozik. Genomjuk nagyméretű, több mint 100 kB hosszú. Széles gazdaspektrummal rendelkeznek (Kropinski és mtsai, 2013). A cikkben, amely az rV5 nemzetség létrehozását javasolta, a szerzők kiemelték a restrikciós helyek hiányát, a belső mag lipopoliszacharid receptorok használatát és a lizogenitással kapcsolatos gének hiányát, melyek hozzájárulnak a széles gazdaspektrumhoz, és biokontrollra ígéretessé tehetik őket (Santos és mtsai, 2011; Sváb és mtsai, 2018).

1.2.2.3. HK578-szerű fágok

Egy *Escherichia* fág, a HK578 a típusfágja ennek a csoportnak, mivel ezt izolálták először (Dhillon és mtsai, 1970). A *Siphoviridae* családba, ezen belül a *Dhillonvírus* nemzetségbe tartoznak, besorolásuk morfológiai hasonlóságokon alapul. Hajlékony farokrésszel és kis eltérésekkel majdnem azonos géntartalommal rendelkeznek (Korf és mtsai, 2019). A csoport tagjai közti eltérések főleg az eltérő gazdaspektrumban nyilvánulnak meg. A HK578-szerű fágok különböző, az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumokat fertőznek, mint például az *Escherichia*, *Sodalis* és *Shigella* nemzetségek. (Adriaenssens és mtsai, 2015)

1.2.3 Bakteriofágok lehetséges alkalmazása

A bakteriofágokat már 1915-ben felfedezte William Twort angol bakteriológus, és 1917-ben Felix d'Herelle francia-kanadai mikrobiológus felismerte baktériumok ellen való alkalmazásuk lehetőségét. Az antibiotikumok felfedezését megelőzően nagy népszerűségnek örvendtek, azonban azok elterjedésével kiszorultak a nyugati orvoslásból, főleg az antibiotikumok alkalmazásának egyszerűsége miatt. Kutatásuk azonban folytatódott néhány országban, például Grúziában, ahol rutinszerűen izolálták és nagyszámú megbetegedés ellen használták, és ma is használják őket. Az *Escherichia coli* fontos laboratóriumi és kórokozó törzset magába foglaló baktériumfaj, így később több vizsgálat is olyan fágokra koncentrált, amik kifejezetten ennek a baktériumnak a fertőzésére voltak képesek. Ezek a kutatások - mint a genetikai anyag alapjainak és a három nukleotidból felépülő aminosavaknak a felismerése, vagy a restrikciós enzimek felfedezése - képezik a modern molekuláris biológia alapjait (Clokier és mtsai, 2011).

Mivel az elmúlt időben az antibiotikum rezisztencia folyamatosan növekvő problémát jelent, mind a humán orvoslásban, mind az állategészségügyben, a bakteriofágokra ismét egyre nagyobb figyelem irányul. A fágterápia - vagyis a fágok antibakteriális felhasználása - egyre jobban előtérbe kerül, mivel azon kívül, hogy nem toxikus, a fág az egyetlen terápiás ágens, amely képes önmagát szabályozni, és a baktérium elpusztulása után eltűnik a szervezetből. Ráadásul a természet a fágok gyakorlatilag kifogyhatatlan forrása. Új fágokat tudunk izolálni a legtöbb baktérium ellen - a baktériumok és fágok folyamatosan ko-evolválódnak, ami azért fontos, mert egyre több új patogén baktérium jelenik meg. A humán fágterápiában az ún. fágkoktélok (több fág keveréke) alkalmazásának az az előnye, hogy olyan baktériumok ellen is

hatásos védekezés, amelyekben esetleg bizonyos fágokra már rezisztencia alakult ki. A fágokat gyakran más antibiotikus szerekkel együtt használják, ilyenkor képesek egymással szinergikusan működni. Bár a fágok valószínűleg nem tudják helyettesíteni az egyéb antibiotikus ágenseket, azonban jól használhatóak azokban az esetekben, ahol azok nem hatásosak. (Rohde et al. 2018)

1.2.3.1. Bakteriofágok alkalmazása élelmiszerben

Az élelmiszer-eredetű fertőzések világszerte okoznak kórházi ápolással, vagy akár halálozással járó megbetegedéseket, annak ellenére, hogy az élelmiszerhigiénia egyre fejlettebb. Az ilyen fertőzések 5 fő kiváltója közül 4 baktérium: *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella enterica* és *Shigella spp.*, amelyek évente több százmillió megbetegedést okoznak és több százezer halálos áldozatot követelnek, aránytalanul nagy számban érintve az 5 évnél fiatalabb gyerekeket. A tradicionális technikák - mint a pasztörözés, magas nyomáson való kezelés, besugárzás, vagy különböző kémiai fertőtlenítőszeres használata - különböző mértékben képes a mikrobák elpusztítására, azonban jelentős hátrulatóik is vannak. Ilyen például, hogy ha korrozív hatásúak, kárt tehetnek a feldolgozás során a gépezetekben, ronthatják az élelmiszer élvezeti értékét (és feltételezhetően tápértékét is). Ami a legfontosabb, hogy a patogének mellett elpusztítják a többi - sokszor a szervezet számára hasznos - baktériumot is, amelyek előfordulhatnak bennük. A fágok élelmiszeriparban való alkalmazása patogén baktériumok elleni biokontrollként széles körben kutatott, mivel ez egy természetes, biztonságos és specifikus védekezési módszer. Több fágkészítmény (pl. EcoShield™, ListShield™, ShigaShield™) már az amerikai Élelmiszer- és gyógyszerfelügyelet (FDA) által is jóvá lett hagyva, amik sikeresen használhatóak hús, hal és tejtermékeken vagy zöldségeken. Ráadásul ezeknek a kereskedelembe is forgalmazott készítményeknek a száma egyre nő (Moye és mtsai, 2018). A biokontrollként alkalmazható fágoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük (Hagens és Loessner, 2010):

- széles gazdaspektrum
- szigorúan lítikus életmód
- nem-patogén baktériumtörzsön való propagálhatóság
- ismert teljes genomszekvencia
- nem képes nem-virális eredetű DNS transzdukciójára

- nem tartalmaz patogenitással összefüggő, vagy potenciálisan allergén proteinek kódoló géneket
- szájon át történő alkalmazása nem okoz mellékhatásokat
- GRAS (Generally Recognized as Safe, az FDA jelölése biztonságos élelmiszerhez adott anyagokra)
- megfelelően stabil tárolás és alkalmazás során
- mennyisége növelhető kereskedelmi előállításra

Az előbb említett fágkészítmények közül a ListShield™, egy 6 fágból álló koktél hatékonyságát vizsgálták Perera és mtsai. (2015), *Listeria monocytogenes*-szel fertőzött salátán, almán, sajton, füstölt lazacon és fagyasztott késztermékeken. Ezek olyan élelmiszercsoportok, amik nagy eséllyel fertőződhetnek a baktériummal. Hogy próbára tegyék a fágok hatékonyságát, három *Listeria* törzsből álló koktélt alkalmaztak. A fágkészítményt minden esetben permetezéssel vitték fel az élelmiszerre, 10^6 - 10^8 PFU/g koncentrációban. Kontrollként foszfátpufferelt sóoldatot (PBS) vagy steril vizet használtak. Azt találták, hogy a kísérletesen megfertőzött élelmiszereken a fág-kezelés minden esetben szignifikánsan (~ 1 nagyságrend) csökkentette a kontaminációt. Emellett a fágkészítmény nem befolyásolta az élelmiszerek élvezeti értékeit, nem találtak változást azok színében, ízében vagy megjelenésében. Mivel a baktériumkoktélhoz hasonló körülmények előfordulása a laboratóriumon kívül nagyon valószínűtlen, lehetséges, hogy a fágok az itt kapott eredményeknél is hatásosabbak lehetnek a *Listeria* visszaszorításában.

Hasonlóan *Listeria* fágokkal dolgoztak - koagulinnal kombinálva - Rodríguez-Rubio és mtsai. (2015). A koagulin egy bakteriocin, vagyis baktériumok által termelt antimikrobiális peptid, amit tradicionálisan tartósításra használnak. A bakteriocinek a bakteriális rendszerekben előforduló versengésben gyakran szerepet játszanak. Ezek a szűk spektrumú protein alapú toxinok képesek közeli rokonságban álló fajok elpusztítására, ami a bakteriocin termelője számára jobb hozzáférést biztosít a limitált forrásokhoz. Specifikus sejtfelszíni receptorok segítségével jutnak a sejtbe, majd különböző mechanizmusok segítségével elpusztítják azt (Omar és mtsai, 2013). Rodríguez-Rubio és mtsai előzetes kísérletben bizonyították, hogy a fág és bakteriocin optimális körülmények között szinergisztikusan hatnak a baktériumra. A

vizsgálatban tartós (ESL) tejet fertőztek *Listeria monocytogenes*-szel, majd három kezelést alkalmaztak:

- bakteriofág (FWLLm1/FWLLm3)
- koagulin (C23)
- FWLLm1/FWLLm3 fág és koagulin keveréke

A két bakteriofággal két független kísérletet végeztek. A mintákat 4 °C-on, 10 napig tárolták. A bakteriofágok és a koagulin önmagában is képes volt a baktérium visszaszorítására, azonban a keverékek mindkét fág esetében hatékonyabbak voltak, az FWLLm1 fág és koagulin keveréke az életképes sejtek számát a kimutatási határérték alá csökkentette. Ezek az eredmények a bakteriofágok és bakteriocinek közti szinergikus hatás jelenlétére utalnak, így ezeknek az együttes alkalmazása indokolt lehet.

Soffer és mtsai (2017) a *Shigella* fajok ellen célzott, öt fágot tartalmazó ShigaShield™-et használták felvágotton, füstölt lazacon, előfőzött csirkén, salátán, dinnyén és joghurtban, a baktériumok elpusztítására. Ezeket az élelmiszereket olyan szempontok figyelembevételével választották ki, mint az eltérő viszkozitás, szén/fehérje tartalom és textúra. A kísérlet célja a fágoktól különböző koncentrációinak összehasonlítása volt. Baktériumtörzsként egy nalidixinsav-rezisztens *Shigella sonnei* törzset használtak. A baktériumot az élelmiszerek felületén egyenletesen eloszlatták, vagy abba belekeverték, majd 1 óra pihentetés után alkalmazták rajtuk a fágoktól. A készítményt permetezéssel vitték fel egyenletesen az élelmiszerekre, a joghurt esetében pedig belekeverték. Három koncentrációt alkalmaztak (1×10^8 PFU/ml, 1×10^9 PFU/ml, 1×10^{10} PFU/ml), kontrollként pedig vizet. A mintákat szobahőmérsékleten, 5 percig inkubálták. Emellett a koktélokban található összes fág genomját szekvenálták és analizálták. A legmagasabb koncentrációban a fágok minden élelmiszeren legalább 1 nagyságrend (90%) csökkenést okoztak a baktériumok számában. A kontrollhoz képest minden kezeléssel szignifikáns csökkenést értek el, kivéve a dinnye esetében, a legalacsonyabb koncentrációnál (45%). A szekvencia adatok alapján semmilyen veszélyes (virulencia, toxin, represszor vagy más baktérium eredetű) gént nem találtak. Tehát az adataik azt mutatták, hogy a ShigaShield™ alkalmazása biztonságos és hatásos lehet *Shigella*-val kontaminálódott élelmiszereken a baktérium mennyiségének csökkentésére.

1.2.3.2. Bakteriofágok célzott alkalmazása *Escherichia coli* ellen

Ahogy korábban említettem, a patogén *E. coli* törzsek által okozott fertőzések főleg nyers marhahússal, tejjel, illetve a trágyával érintkezésbe kerülő terményekkel terjedhetnek.

Az EcoShield™ hatékonyságát *E. coli* O157:H7 ellen, illetve az újrafertőződéssel szembeni védelmét vizsgálták Carter és mtsai (2012), marhahúson és salátán. Az EcoShield™ egy lítikus fágokból álló koktél, amelyet az FDA 2011-ben engedélyezett közvetlen vörös húson való alkalmazásra. A fágkészítményt a kísérlet előtt a gyártó által jelzett módon sóoldattal hígították. Három, nalidixinsav-rezisztens EHEC mutánsal dolgoztak, amelyek eredeti izolátumai humán eredetűek voltak. Lemért egész, illetve méretre vágott sült tarját és római salátát, valamint nyers darált marhahúst fertőztek. A bakteriofágokat minden esetben permetezéssel vitték fel. A tarján a kezelés idejének hatását vizsgálták. A baktériumtörzzsel való fertőzés után a húsokat 1 órát inkubálták, majd a kezelt mintákon alkalmazták a fágokat, míg a kontroll mintákra PBS-t vittek fel. Ezután hűtőbe helyezték őket, és 5, 15, 30, 60 és 120 perc, illetve 24 óra múlva levágtak darabokat, amelyeket peptonban emésztettek, majd nalidixinsav tartalmú táptalajra szélesztettek és megszámolták a túlélő baktériumokat. A darált húson a tárolási idő hatását vizsgálták. Nyers marhahúsdarabokat fertőztek meg, az előzőekhez hasonlóan kezelésként a fágokat, kontrollként PBS-t alkalmaztak. 1 nap hűtőben való tárolás után a mintákat ledarálták, majd egyforma adagokat vizsgáltak a már leírt módon. Az emésztés után baktériumszámot és fágtitert is számoltak. A mintavételt és vizsgálatot 1, 5 és 7 nap után ismételték. A darált húson visszafertőzési kísérletet is végeztek. A fertőzés és kezelés az előzőekhez hasonlóan történt. 1 nap hűtött tárolás után a mintákat ledarálták, majd a kezelt és kontroll mintákat is kétfelé osztották (A és B). Az A mintákat mindkét csoportból azonnal analizálták, és megállapították a túlélő baktériumok számát és a fágtitert. A B mintákat újrafertőzték a baktériummal, majd újabb 24 óra inkubáció után határozták meg a baktériumszámot és a fágtitert. A salátán a fágkoncentráció hatását nézték. A mintákat három csoportba osztották, fertőzték, majd az EcoShield™-et két különböző koncentrációban (1×10^8 PFU/ml, 1×10^7 PFU/ml) alkalmazták, kontrollként szintén PBS-t használtak. Szobahőmérsékleten 5 percig inkubálták a mintákat, majd egyforma adagokat analizáltak és megszámolták a túlélő baktériumokat. Az eredményeik azt mutatták, hogy a tarján minden időpontban szignifikánsan kevesebb baktérium maradt a kezelt mintákon, a kontrollhoz képest, és az idővel a lítikus aktivitás nem változott szignifikánsan. A darálthúson az eredetileg mutatott szignifikáns csökkenés szintén fennmaradt egészen a 7. napig. A rekontaminációs kísérletben

azonban az először mutatott csökkenés megfigyelhető volt, azonban az újabb baktériumfertőzés után nem volt szignifikáns különbség a kezelt és kontroll minták között. A salátán végzett kísérlet azt mutatta, hogy az EcoShield™ hatékonysága statisztikailag nagyobb volt magasabb koncentrációnál, de alacsony koncentrációnál is szignifikáns volt a baktériumszám csökkenése. Összefoglalva, az EcoShield™ a kezelés és tárolás idejétől, illetve az alkalmazott koncentrációtól függetlenül képes szignifikánsan csökkenteni az *E. coli* O157:H7 mennyiségét élelmiszeren, azonban nem véd meg az újrafertőződéstől, és a hatékonysága koncentrációfüggő.

Hudson és mtsai (2013) egy frissen izolált bakteriofág (FAHEc1) hatékonyságát nézték *E. coli* O157:7 ellen, nyers marhahúson. A FAHEc1 fágot csatornavízből izolálták. Vizsgálták még a fág gazdaspektrumát és elektronmikroszkópos képét is, illetve a DNS-ét izolálták és elemezték. Hatékonyságát először egy in vitro inaktivációs kísérlettel vizsgálták, ehhez táplevesshez adtak egy éjszakán át 37 °C-on inkubált, nem patogén *E. coli* O157:H7 tenyészetből 1 ml-t, ehhez adták a megfelelő hígítású fáguszuspenziót, majd 0, 3, 6 és 24 óra múlva vettek mintát, hogy a túlélő baktériumsejtek számát megállapítsák. A nyers marhahúson kifejtett hatás vizsgálatához két különböző O157:H7 változaton végeztek párhuzamosan kísérletet, biztosítandó, hogy az eredmények a változatok között is konzisztensek. Az egy éjszakán át inkubált, majd megtisztított baktérium tenyészetet 2x2 cm-es, vékonyra szeletelt nyers marhahúsra vitték fel, 1 óra 37 °C-os inkubáció után pedig hozzáadták a fáguszuspenziót. Ezt újabb 1 óra inkubáció követte. Az inkubáció után megállapították a túlélő baktériumok, illetve a jelenlévő fágreszecskek számát. A koncentráció és az inkubációs idő hatásának vizsgálatára megismételték az előbbi kísérletet, először különböző koncentrációjú fáguszuspenzió hozzáadásával, majd rögzített koncentrációk mellett az inkubációs idő változtatásával, végül változó fágkoncentrációkkal (3×10^3 , 4×10^5 , 2×10^7 PFU/ml), 1 és 3 órás inkubációval. Táplevessben, 37 °C-on a fágok kis koncentrációban is képesek voltak szinte teljesen feloldani a baktériumokat. 24 óra után kis mértékű visszanozás volt megfigyelhető. 5 °C-on a nagy koncentráció bizonyult hatásosabbnak (>4 nagyságrend csökkenés), az alacsonyabb koncentrációk megközelítőleg 1 nagyságrend csökkenést okoztak. Nyers húson az első kísérletben a fágok a kimutatási határérték alá csökkentették a baktériumok számát. A további kísérletek kimutatták, hogy a koncentráció növekedésével nő a fáguszuspenzió hatása is, míg az inkubációs idő növelése nem befolyásolta azt. Az egyéb vizsgálatok megállapították, hogy a fág a T4-szerű fágokhoz tartozik, majdnem kizárólag O157 szerocsoportú *E. coli*-t fertőz, és

nem tartalmazza az O157:H7-hez kapcsolható virulencia géneket. Tehát több olyan tulajdonságot is mutat, ami hasznossá teheti az ellene való védekezésben.

Grygorcewicz és mtsai (2019) egy korábban izolált lítikus bakteriofág hatékonyságát vizsgálták, szintén O157:H7 szerotípusú *E. coli* ellen, szűrt és szűretlen friss tejben. Két baktériumtörzzsel (A-1, A-2) dolgoztak, amiket humán székletből, illetve tehéntejből izoláltak. Az alkalmazott bakteriofág (ECPS-6) sertés-hígtrágyából származott. A friss tejet 2 µm-es pórusú szűrővel sterilizálva állították elő a szűrt tejet. A szűrt tejet az A-1 és A-2, míg a szűretlen tejet csak az A-2 baktériummal fertőzték meg, majd a szűrt tejhez nagyjából 5 MOI (az egy baktériumra eső fágreszecskek száma), a szűretlenhez pedig 50 MOI eléréséhez elegendő fágot adtak. A szűretlen tejet 12 órát, míg a szűrt tejet 10 napig inkubálták, 4 °C-on vagy 25 °C-on, ebből 24 óránként vettek mintát. Kromogénikus *E. coli* talajra (szűretlen) vagy LB agarra (szűrt) szélesztve számolták a túlélő baktériumok számát. A szűretlen és szűrt tejben is mindkét hőmérsékleten szignifikáns volt a baktériumszám csökkenése. A szűrt tejben 10 nap után a visszanozott baktériumok száma még mindig szignifikánsan kevesebb volt, mint a kontroll mintákban. A nagyobb csökkenést mindkét esetben 25 °C-on lehetett látni. A bakteriofág mind a szűrt, mind a szűretlen tejben, mindkét hőmérsékleten és MOI mellett képes volt a baktériumtörzsek visszaszorítására, így valószínűsíthető, hogy felhasználható a tej kezelése során, akár pasztörözést követően is.

A bakteriofágok alkalmazása nem csak közvetlenül az élelmiszereken lehetséges, hanem az azok kezeléséhez használt eszközökön is. Patel és mtsai (2011) spenót aratásához használt pengéken vizsgálták fágok hatékonyságát *E. coli* O157:H7 ellen, mivel az aratás során a spenót maradványok a pengére tapadhatnak, megfelelő táptalajt biztosítva a baktériumok növekedéséhez, akár biofilm képződéséhez is. Öt nalidixinsav-rezisztens *E. coli* törzs egyforma arányú keverékét használták, amit spenót kivonathoz, vagy tápleveshez adtak. Az új és rozsdás, sterilizált aratógép pengéket ezekbe helyezték bele, majd 48 órán át inkubálták állandó hőmérsékleten (22 °C), illetve változó hőmérsékleten (30 °C - 12 óra, 22 °C - 12 óra), utóbbi a kaliforniai nappali-éjjeli hőmérsékletváltozást szimulálta. 1, 24 és 48 óra után mintát vettek a baktériumszám megállapításához. A használt specifikus bakteriofágok előzőleg lettek izolálva, vágómarhák bélsarából. A 48 órán át inkubált pengékre permetezéssel vitték fel a fágoktételt, kontrollként pedig PBS-t használtak. Ezután 2 órán át 22 °C-on tárolták a pengéket, majd megszámlálták a rajtuk túlélő baktériumsejtek számát. A baktériumsejteket mind a spenót kivonathoz, mind a táplevesből ki lehetett mutatni, állandó és változó hőmérsékleten is, a

kimutatható sejtek száma az inkubációs idő növekedésével nőtt. A változó hőmérsékleten 24 óra után nagyobb volt a sejtszám, mint szobahőmérsékleten, illetve a táplevesből több baktérium volt kimutatható, mint a spenót-kivonatból. A pengék minősége (új/rozsdás) nem befolyásolta az eredményeket. A bakteriofág kezelés után a pengéken nem volt kimutatható az *E. coli* jelenléte, míg a kontroll csoportokban a baktériumszám nem változott szignifikánsan. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az O157:H7 képes a pengére kerülő spenóton megtapadni, és ezzel potenciálisan a frissen vágott spenótot megfertőzni. Specifikus bakteriofágok használata azonban alkalmas lehet az ez elleni védekezésre, és jó alternatívája a most alkalmazott, kevésbé hatékony hipokloritos kezelésnek.

2. Célkitűzések, kérdések

A kutatásunk célja olyan, főleg coliform-specifikus bakteriofágok izolálása és részletes jellemzése volt, amelyek potenciálisan alkalmasak lehetnek biokontrollban való alkalmazásra. Ahogy az 1.2.3.2. pontban említettem biokontrollban/fágterápiában alkalmazott fágoknak több fontos kritériumnak is meg kell felelniük, ezek közül az általunk vizsgált fágok esetében a következőkre koncentráltunk: legyen ismert a genomjuk, és ne tartalmazzon olyan virulencia, toxin termelés, vagy rezisztencia faktorokat kódoló géneket, amelyeket a baktériumnak képesek tovább adni, az életciklusuk szigorúan lítikus legyen, tehát ne tudjanak a baktérium genomjába beépülni, és stabilak maradjanak azokon a szállítási, tárolási és felhasználási hőmérsékleteken és pH-n, ami a kezelések során előfordulhat.

3. Anyag és módszer

3.1. Baktériumtörzs felszaporítása

A kísérletek során használt baktériumtörzsek tenyésztésekor felhasznált mintákat -70 °C-on tároltuk, 30% glicerint és Luria-Bertani (LB) táplevest tartalmaztak. Az LB tápleves az alábbi komponensekből tevődik össze:

- 10 g/l pepton
- 5 g/l élesztő kivonat
- 5 g/l NaCl

A szilárd LB táptalaj (LB agar) készítésekor 15 g/l agar is kerül a táplevesbe. A törzset szilárd táptalajra szélesztettük steril oltókacs segítségével, és 37 °C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk. A kísérleteket megelőző napon a törzset dúsítottuk, amihez a baktériumot a szilárd táptalajról oltókaccsal LB táplevesbe oltottuk, majd szintén 37 °C-on, 24 órán át inkubáltuk, miközben 180 rpm-en rázattuk.

3.2. Bakteriofágok felszaporítása

A bakteriofágok dúsításakor az adott kísérlethez használt propagálótörzset tartalmazó fedőagart használtunk, amit szilárd LB táptalaj tetejére öntöttünk. A fedőagar komponensei a következők:

- 100 µl a baktériumtörzs tömény, egyéjszakás folyadéktenyészetéből
- 800 µl LB tápoldat
- 100 µl MgSO₄
- 4,5 ml lágyagar (folyékony és szilárd LB 1:1 arányban, mely így csak 7,5 g agarózt tartalmaz literenként, és olvadáspontja alacsonyabb a rendes LB agarhoz képest)

A fedőagarra a bakteriofág szuszpenzióból 10 µl-es cseppeket raktunk, és 37 °C-on, 24 órát inkubáltuk. A másnapra megjelenő plakkokat (ahol a fág feloldotta a baktériumot) kémcső segítségével kivágtuk, és 1 ml LB táplevesbe helyeztük. ezután a mintákat baktériumhoz hasonlóan 37 °C-on, 24 órát rázattuk 180 rpm-en. A fágot és baktériumot is tartalmazó minták tisztításához Acrodisc Supor 220 nm pórusméretű steril szűrőt használtunk. A szűrletet 4 °C-on, Eppendorf csövekben tároltuk.

3.3. Fágtitrálás

A fágtitrálás során az adott fágból százszoros hígítási sort készítünk olyan módon, hogy 9 csőbe 90 µl LB levest mérünk, majd az elsőhöz a tömény fág-stockból 10 µl-t adunk. Ezután az első csőből a másodikba mérünk 10 µl-t, és így folytatjuk a 9. csőig, ahol elérjük a 10⁹ -es hígítást. Ezután csepptesztet (spot-assay) végzünk, tehát minden hígításból a propagáló törzset tartalmazó, a 3.2. fejezetben leírt módon elkészített fedőagarral rétegzett lemezre cseppentünk 5 µl-t, és 37 °C-on 24 órát inkubáljuk. Az inkubáció után létrejött plakkokat számoljuk, majd a hígítás mértékének és a kicseppentett minta térfogatának megfelelően, visszaszorzással kapjuk meg a fág titerét PFU/ml-ben (plakk-képző egység, a fertőzőképes fágok száma az adott térfogatban). Egy célbaktériumon kapott titert a gazdatörzsön mérthez hasonlítva kapjuk meg a fágnek az adott baktériumra jellemző oldási hatékonyságát (efficiency of plating, EOP).

3.4. Baktériumtörzsek és bakteriofágok

A baktériumtörzset és a bakteriofágokat az ATK Állatorvos-Tudományi Intézet biztosította. A bakteriofágokat magyarországi szarvasmarha állományok egészséges állatainak bélsarából izolálták. A fágok genomszekvenciáinak meghatározását a kutatócsoport végezte, ami után Papp Viktória ELTE TTK MSc-s hallgató diplomamunkájához kapcsolódóan egyedi plakkok dúsításával, majd polimeráz láncreakció (PCR), és agaróz gélelektroforézis segítségével differenciálta a fágokat. Ezeket a folyamatokat szeretném most bemutatni.

3.4.1 Nukleotidszekvenciák meghatározása

A fágok genomszekvenciáinak meghatározása Illumina NextSeq platformon keresztül történt. Az NCBI honlapján keresztül elérhető eszközökkel és BLAST nukleotid-összehasonlító algoritmussal elemezték, majd összehasonlították a nukleotidszekvenciákat. A vizsgálatok alapján a fágok a korábban ismertetett három csoport valamelyikébe, tehát a T4-szerű, az rV5-szerű, vagy a HK578-szerű (*Dhillonvirus*) fágok közé tartoztak. (Papp, 2020)

3.4.2 Bakteriofágok szétválasztása

A fáguszuszpenziókból egyedi plakkokat dúsítottak úgy, hogy a 3.3 fejezetben leírtak szerint hígítási sort készítettek, majd csepptesztet végeztek 10 µl-es cseppeket használva, O157:H7 Sakai törzset tartalmazó fedőagaron. A másnapra kialakult egyedi plakkokat fogpiszkáló segítségével 100 µl LB táplevest tartalmazó PCR csövekbe helyezték, és 2 órán át 37 °C-on inkubálták. Majd a szuszpenziót 1 ml friss LB tápleveshez keverték és további 4 órán keresztül 180 rpm-en rázatták, 37 °C-on. Az így kapott szuszpenziót Merck Millipore vagy Acrodisc Supor 220 nm pórusméretű steril szűrőn átszűrték, és 4 °C-on, Eppendorf csövekben tárolták.

3.4.3 Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR reakciót a Papp Viktória (2020) által leírt protokollnak megfelelően, a következők szerint végeztük. A PCR reakcióhoz szükséges DNS-t a 3.4.2. pontban leírt egyedi plakkot tartalmazó mintákból nyertük ki, QuickDNA miniprep segítségével. 17 µl fáguszuszpenziót, 2 µl puffert és 1 µl Sigma-Aldrich Amplification Grade Dnáz I enzimet (1 unit/µl aktivitás) használtunk fel az emésztéshez, a gyártó utasításainak megfelelően, amit 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. Ezután elkészítettük a templátot a PCR gépben, ez 20 perc inkubáció 99 °C-on, mely egyben a Dnáz enzim inaktiválására is szolgál. A PCR reakciók során a ThermoFisher által gyártott DreamTaq™ polimerázt vagy a DreamTaq™ Green Mastermixet használtuk. A DreamTaq Green Mastermix komponensei:

- DreamTaq™ Green Polimeráz
- 2X DreamTaq™ Green puffer (a gyártó nem publikálta a pontos összetételt)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP egyenként 4 mM koncentrációban
- 4 mM MgCl₂

A 25 µl végtérfogatú PCR elegyek 12,5 µl Mastermixet (DreamTaq™ Green Mastermix + primerek), 2 µl templát szuszpenziót és 10,5 µl desztilláltvizet tartalmaztak. A felsokszorozni kívánt szakaszokhoz a primereket a Sigma-Aldrich Magyarország Kft.-vel szintetizáltatták. A primerek (rV5 ribonukleotid reduktáz, T4 alaplemez, Dhillon kapszid és scaffold) és szekvenciáik a 1. táblázatban, a használt PCR program leírása a 2. táblázatban láthatóak (Papp, 2020).

Primerek	Szekvenciáik
rV5_rib_f	GACCAGTGCACGATCTCTGT
rV5_rib_r	ACTGACATGGGCGTTACCAA
T4_bp_f	GGAGACTATCCGAAGACTTGGC
T4_bp_r	CGCTCGGCAGGAATCATTTT
Dhillon_cs_f	AGTCCATGAGCAACAAGGCA
Dhillon_cs_r	CGCTTCCCTTTCGTATCGGG

2. táblázat Felhasznált primerek és szekvenciáik

Hőmérséklet	Idő
1. 94°C	3 perc
2. 94°C	30 s
3. 59°C	30 s
4. 72°C	60 s
5. 72°C	5 perc
6. 4°C	inkubálás további felhasználásig

1. táblázat Felhasznált PCR program

A 2-4. lépéseket összesen 30 ciklusban ismételtük.

3.4.4 Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével választották el egymástól. A gél készítéséhez TAE vagy TBE pufferben oldották fel az agarózt (89 mM Tris, 89 mM bórsav és 2 mM EDTA), olyan arányban, hogy 1 m/V%-os agaróz gél kapjanak, majd hozzáadtak 5 µl EcoSafe DNS festéket (Pacific Image Electronics). A gél zsebeibe 10 µl PCR terméket, valamint 7,5 µl Thermofisher Generuler 100 bp markert pipettáztak, mely a termékek ellenőrzésére szolgált. A futtatást 5 V/cm-en 1x-os TBE pufferben végezték gélelektroforézis készülék segítségével, 30 percig. Ezután a géleket ultraibolya fényben fényképezték (VWR Gel Documentation System) és VWR Image Capture Software program segítségével dokumentálták. (Papp, 2020)

A további kísérletekhez a fágokból a 3 típus egy-egy képviselőjét választottuk ki: a vb_EcoM_bov9_1 (T4), vb_EcoM_bov11CS3 (rV5) és vb_EcoS_bov25_1D (HK578) fágokat, melyek Papp Viktória dolgozatában még 9/1, 11C/3 és 25/1D néven szerepeltek (Sváb és mtsai, 2021). A 3.4.1. fejezetben említett előzetes szekvencia elemzések alapján a kiválasztott fágok legfontosabb adatai a következők:

- vb_EcoM_bov9_1: 166.440 bp genom méret, 35,4% G+C, 265 fehérje-kódoló gén és 9 tRNS gén
- vb_EcoM_bov11CS3: 135.960 bp genom méret, 43,7% G+C, 212 fehérje-kódoló gén és 5 tRNS gén
- vb_EcoS_bov25_1D: 44.747 bp genom méret, 54,5%, G+C, 63 fehérje-kódoló gén (tRNS gén nincs)

3.5. Gátlási kísérlet

3.5.1 Kísérlet célja

Kísérletünk lényege a fágok in-situ hatásának vizsgálata volt darált marhahúsban, különböző, a hús tárolása és szállítása során előforduló, illetve a baktérium számára optimális hőmérsékleteken és inkubációs időkkel.

3.5.2 Baktériumtörzs

A kísérlethez az O157:H7 Sakai törzs rifampicin-nalidixinsav kettős rezisztens mutánsát használtuk. Ehhez a mutánshoz úgy jutottunk, hogy 100 µl tömény, egy éjszakán keresztül LB levesben inkubált Sakai tenyészetet 100 µg/ml rifampicint tartalmazó agarlemezre szélesztettünk. Újabb egyéjszakás inkubáció után a túlélő telepeket ugyanilyen szelektív táptalajokra szélesztettük tovább. Amennyiben ezeknek a telepeknek a növekedése a szülőtörzs nem-szelektív telepeken tapasztalt növekedéséhez hasonló volt, úgy az adott mutánst rifampicin-rezisztensnek tekintettük. Ezeket tovább tenyésztettük, 100 µg/ml rifampicin jelenléte mellett, szilárd vagy folyékony táptalajon. Fagyasztott stockok tárolásánál egyéjszakás tömény folyadéktenyészetbe adtunk 30% glicerint, és -20, illetve -70 °C-ra helyeztük őket. Egy rifampicin-rezisztens mutáns tömény, egy éjszakán át inkubált tenyészetéből 100 µl-t 30 µg/ml nalidixinsavat és 100 µg/ml rifampicint tartalmazó táptalajra szélesztettünk, majd az inkubáció után túlélő telepekkel ugyanúgy jártunk el, mint a rifampicin-rezisztens mutánsok esetében, de már mindkét antibiotikum jelenlétében. Egy így kialakult sejtvonalat használtunk fel a kísérletek során. Előzetes kísérlettel beállítottuk azt a hígítást, ahol a visszatenyésztett baktérium még jól számlálható, ezt használtuk fel a későbbi baktérium-fág arány beállításakor, illetve a kontroll kísérletek során. Ennek során a baktériumtörzset 37 °C-on egy éjszakán át dúsítottuk, majd 10-szeres lépésekből álló hígítási sort készítettünk. A különböző hígításokból 100 µl-t szilárd LB táptalajra szélesztettük, és a legkönnyebben leolvasható, 5. hígítással dolgoztunk a kísérlet során. A megfigyelt baktériumtelepek számából, a hígításnak és a szélesztéshez használt térfogatnak a figyelembevételével, visszaszorzással kaptuk meg a baktériumszámot, CFU/ml-ben (telepformáló egység, az életképes baktériumok száma egy adott térfogatban).

3.5.3 Fág propagálás

A 3.4.2.2. fejezet végén választott három fággal dolgoztunk: T4- (vb_EcoM_bov9_1), rV5- (vb_EcoM_bov11CS3) és HK578-szerű (vb_EcoS_bov25_1D) fágokkal. Ezeket a 3.3. fejezetben leírtak szerint titráltuk, és a Sakai törzset tartalmazó fedőagar rétegen propagáltuk, majd minden fág esetében a három legmagasabb hígításban létrejött plakkot dúsítottuk (3.2. fejezet), szűrtük, majd ismét titráltuk. A második propagálás eredményeiből számoltuk a fágok titerét, ami $2,2 \times 10^{10}$, $2,2 \times 10^{12}$ és 2×10^9 PFU/ml volt. Ezek alapján állítottuk be a kísérlet

során használt hígítást az egyes fágokból, hogy a kapott MOI 0,1 vagy 10 legyen, az adott kísérleti elrendezésnek megfelelően.

3.5.4 Ellenőrző előkísérletek

Az előkísérletek során a bolti darált húson két szempontból is elő-ellenőrzést végeztünk. Egy gramm darált marhahúsra 1 ml LB táplevest mértünk, majd 37 °C-on 24 órán át inkubáltuk. Az így keletkezett tenyészetből 100 µl-t 100 µg/ml rifampicint és 30 µg/ml nalidixinsavat tartalmazó LB agar lemezen szélesztettük, illetve 200 µl-t centrifugáltunk, a felülúszót szűrtük, és a baktériumunkat tartalmazó lemezekre cseppentettünk. Ezzel a kísérlet előtt kizártuk rifampicin-nalidixinsav kettős rezisztens baktérium, illetve az általunk használt Sakai törzset lizálni képes fág jelenlétét, amelyek értékelhetetlenné tették volna az eredményeket.

3.5.5 Hús beoltása, visszatenyésztés

A kísérletet hasonlóan végeztük, mint Liu és mtsai (2015) és Sváb és mtsai (2018). Bolti darált hús egyforma, 1 g-os adagjaira 1 ml LB táplevest mértünk, majd beállított mennyiségű fággal és baktériummal fertőztük. A fágokat egyenként és koktélban (a három fág egyenlő arányú keveréke) is alkalmaztuk. Kontrollként fágmentes mintát használtunk. A keverékek részletes összetétele:

- *kontroll*: 1 ml O157:H7 Sakai
- *9/I*: 1 ml O157:H7 Sakai + 50 µl vb_EcoM_bov9_1 (1. hígítás)
- *11CS3*: 1 ml O157:H7 Sakai + 50 µl vb_EcoM_bov11CS3 (4. hígítás)
- *25/1D*: 1 ml O157:H7 Sakai + 50 µl vb_EcoS_bov25_1D (2. hígítás)
- *koktél*: 1 ml O157:H7 Sakai + 17 µl vb_EcoM_bov9_1 + 17 µl vb_EcoM_bov11CS3 + 17 µl vb_EcoS_bov25_1D (megfelelő hígítások)

Három hőmérsékleten vizsgáltuk a fágok hatékonyságát, 37 °C-on 2 órás, 25 °C-on 24 órás és 4 °C-on 48 órás inkubációs idővel. Az inkubációs idők letelte után a minták baktériummentes felülúszóját megfelelő hígításokban rifampicin-nalidixinsav tartalmú lemezekre szélesztettük, és megszámoltuk a másnapra (37 °C-on) kinőtt telepeket. Hőmérsékletenként három párhuzamos kísérletet végeztünk.

4. Eredmények

4.1. Gátlási kísérlet

	Kontroll (CFU/ml)	vb_EcoM_bov9_1 (CFU/ml)	vb_EcoM_bov11CS3 (CFU/ml)	vb_EcoS_bov25_1D (CFU/ml)	Koktél (CFU/ml)
<i>MOI 1</i>					
4 °C (48 óra)	8,83 x 10 ⁷	2,50 x 10 ⁷	4,33 x 10 ⁷	2,76 x 10 ⁷	3,15 x 10 ⁷
25 °C (24 óra)	4,38 x 10 ⁸	1,06 x 10 ⁸	1,29 x 10 ⁸	9,77 x 10 ⁷	2,26 x 10 ⁸
37 °C (2 óra)	1,38 x 10 ⁸	8,67 x 10 ⁷	1,03 x 10 ⁸	9,03 x 10 ⁷	3,80 x 10 ⁷
<i>MOI 10</i>					
4 °C (48 óra)	8,43 x 10 ⁷	8,67 x 10 ⁵	1,45 x 10 ⁷	2,31 x 10 ⁷	1,57 x 10 ⁶
25 °C (24 óra)	3,46 x 10 ⁸	1,17 x 10 ⁷	3,06 x 10 ⁷	5,31 x 10 ⁷	1,00 x 10 ⁵
37 °C (2 óra)	2,28 x 10 ⁸	3,04 x 10 ⁷	3,20 x 10 ⁷	1,68 x 10 ⁷	2,88 x 10 ⁷

3. táblázat Gátlási kísérlet eredményei - Az oszlopokban az adott kezelés után, a különböző hőmérsékleteken történő inkubáció után túlélő baktériumsejtek átlagos mennyiségét tüntettük fel. A kontroll mintákban lévő baktériumok átlagát az első oszlopban láthatjuk.

4.1.1 Hőmérséklet és MOI hatása

A visszatenyésztések alapján 0,1-es MOI mellett az összes fág és a koktél is minden hőmérsékleten közelítőleg 1 log₁₀ CFU/ml-el tudta visszaszorítani a baktériumot nyers marhahúson. MOI 10 mellett 4 és 25 °C-on minden fág esetében nőtt a hatékonyság, 37 °C-on csak a vb_EcoS_bov25_1D fág esetében láttunk javulást a MOI 0,1 esetében tapasztaltakhoz képest. 10-es MOI mellett, 4 °C-on az önmagukban alkalmazott fágok közel 1 nagyságrenddel nagyobb csökkenést (~2 log₁₀ CFU/ml) okoztak, mint a koktél. 25 °C-on azonban a koktél esetében láttunk több, mint 3 log₁₀ CFU/ml csökkenést, míg a fágok a 4 °C-on tapasztalathoz hasonlóan nagyjából 2 log₁₀ CFU/ml-el tudták visszaszorítani a baktériumot. 37 °C-on a fágok és a koktél is megközelítőleg 2 log₁₀ CFU/ml csökkenést okozott.

5. Megbeszélés és következtetések

Az eredményeink azt mutatják, hogy a fágok az összes vizsgált hőmérsékleten képesek voltak a baktérium szaporodásának visszaszorítására a darált marhahúson. Fontos kiemelni a 4 °C-on mutatott hatékonyságot, ahogyan Liu és mtsai (2015) is tették hasonló kísérletükben. Tudomásuk szerint az övék volt az első kísérlet, ami bakteriofágok hatékonyságát vizsgálta hűtött marhahúson. Ez azért fontos, mert az *E. coli* O157 akár 21 napig is képes életben maradni ilyen körülmények között, azonban az élelmiszer-közvetítette kórokozók növekedése minimális a hűtés során (Brooks és mtsai, 2008). A baktériumsejt aktivitása viszont elengedhetetlen a fág replikálódásához, így fontos megállapítani, hogy a fág a hűtés során is képes-e a baktérium lízisére. Liu és mtsai kísérletéhez hasonlóan az általunk vizsgált minden fág csökkentette a baktériumsejtek számát 4 °C-on, így potenciálisan alkalmasak lehetnek a hűtőben tartott hús kezelésére, mielőtt az a fogyasztókhoz kerülne.

Mivel a koktél használatával nagyobb eséllyel tudjuk elkerülni a fág-rezisztens mutánsok kialakulását, azt vártuk, hogy hatásosabb lesz, mint az önmagukban alkalmazott fágok, azonban az eredményeink ezt nem támasztották alá. Liu et al. (2015) 10-es, illetve 1000-es MOI mellett az itt leírtakhoz (MOI=0,1; 10) hasonló értékeket értek el, és az eredményeik szintén nem igazolták a koktél nagyobb hatékonyságát. Ennek oka az lehet, hogy a különböző bakteriofágok között versengés/kölcsönhatás alakulhat ki. Erre kevés adat van, de például kölcsönös kizárás léphet fel, ha egy baktériumot egyszerre több, más családból/nemzetségből származó fág fertőz meg (Mertens és Hausmann, 1986). Bár, ahogy az 1.2.3. fejezetben is említettem, a fágkoktélokat gyakran alkalmazzák annak érdekében, hogy megakadályozzák fág-rezisztens mutánsok kialakulását, de ezek a kölcsönhatások megnehezíthetik a hatásos koktélók összeállítását (Liu és mtsai, 2015).

Az antibiotikumokhoz hasonlóan a baktériumok a fágok ellen is képesek rezisztencia kialakítására, a fág-rezisztens mutánsok megjelenése pedig csökkentheti a fágkezelés hatékonyságát. Mivel a fágfertőzés első lépése a baktériumsejthez való adhézió, felszíni proteinek segítségével, amik receptorként szolgálnak, ha a baktériumok elvesztik ezeket a fágreceptorokat, rezisztenssé válnak. Egy másik lehetőség, hogy horizontális géntranszfer során szert tehetnek egy restrikciós-modifikációs rendszerre, ami lebontja a fág által bejuttatott nukleinsavat. Ezen kívül a rezisztenciát okozhatja egy gén mutációja is, amelynek terméke elengedhetetlen a fág replikációjához vagy összeszereléséhez. Azonban a fág-rezisztencia nem

okoz akkora problémát, mert a kialakulásának sebessége tized akkora, mint az antibiotikumok esetében. (Ly-Chatain, 2014).

Mint több más hasonló kísérletben (Hudson és mtsai, 2013; Liu és mtsai, 2015; Sváb és mtsai, 2018) a bakteriofágok nem voltak képesek az *E. coli* teljes eliminálására a húsból. Liu és mtsaihoz (2015) hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a hatékonyság az MOI emelkedésével nőtt. Így a baktériumok túlélésének magyarázata lehet, hogy a bakteriofágok nem voltak képesek a baktériumsejtek elérésére. Alacsony bakteriális sejtszámnál - mint a legtöbb természetes módon történő fertőzés során – a szintén alacsony fágreszecske szám miatt a baktérium és fág találkozása nagyon valószínűtlen. A MOI, tehát az egy baktériumra jutó fágreszecskek számának emelésével ez a valószínűség azonban növelhető. Ez azért fontos, mert a legtöbb *E. coli* O157 által okozott, élelmiszer eredetű járvány esetében a csíraszám kevesebb volt, mint 1 CFU/g (Hagens and Loessner, 2010).

Összefoglalva, az összes fág képes volt az *E. coli* Sakai O157:H7 lízisére darált marhahúson, minden általunk vizsgált hőmérsékleten. Nem mutatták jelét lizogenitásra való hajlamnak, és előzetes szekvencia analízisekből tudjuk (Papp, 2020), hogy nem tartalmaznak virulencia vagy antibiotikum-rezisztencia géneket. Ezek alapján alkalmasak lehetnek biokontrollként való alkalmazásra, akár alacsony hőmérsékleten is.

6. Összefoglalás

Az *Escherichia coli* egészséges emberben is a normál bélflóra tagja. Azonban előfordulhatnak erősen patogén törzsei is, mint a Shiga toxin termelő enterohemorragiás *E. coli* (EHEC). Ez a baktériumtörzs felelős lehet enyhébb enterális fertőzésektől kezdve komolyabb szisztémás megbetegedésekkel járó járványok kialakulásáért is. Specifikusan a hemolitikus urémiás szindróma (HUS) kialakulásával hozhatóak összefüggésbe. Az EHEC törzsek közül is a legfontosabb az O157:H7 antigént hordozó szerotípus, ami rendszeresen okoz emberben étel-miszer-közvetítette zoonotikus fertőzéseket, fő haszonállat rezervoárja pedig a szarvasmarha. Mind humán, mind állatorvosi szempontból egyre növekvő problémát jelent a patogén baktériumok esetében az antibiotikum rezisztencia kialakulása. Erre lehet megoldás lítikus bakteriofágok biokontrollként való alkalmazása. A bakteriofágok baktériumokat fertőző vírusok, a Földön a legnagyobb számban előforduló organizmusok. A lítikus bakteriofágok a baktériumsejt fertőzése után a sejt lízisét okozzák, amiből újabb vírusok szabadulnak fel. A célunk ilyen bakteriofágok izolálása és jellemzése volt, különös tekintettel az EHEC O157:H7 törzset fertőzni képes fágokra. A bakteriofágokat a kutatócsoport tagjai egészséges szarvasmarhák bélsarából izolálták. A fáguszuszpenzió szekvencia analízise és elődúsítása után az egyedi fágok szétválasztásra kerültek. A markergéneket PCR vizsgálattal állapítottuk meg. Az így szétválasztott fágok közül hárommal dolgoztunk tovább: T4-szerű vb_EcoM_bov9_1, rV5-szerű vb_EcoM_bov11CS3 és HK578-szerű vb_EcoS_bov25_1D fágokkal. Ezekkel a fágokkal in situ gátlási kísérletet végeztünk darált marhahúson. A fágok hatékonyságát egy O157:H7 Sakai törzs ellen egyenként, és a három fág egyenlő arányú keverékét tartalmazó koktéltban alkalmazva is vizsgáltuk, 4, 25 és 37 °C-on, két különböző koncentrációban (MOI 0,1, MOI 10). A fágok minden hőmérsékleten és koncentrációban képesek voltak a baktérium visszaszorítására nyers darálthúson, nem tapasztaltunk egyértelmű különbséget az egyes fágok és a koktél hatékonysága között. Az előzetes vizsgálatok alapján nem tartalmaztak az alkalmazást kizáró géneket, és szigorúan lítikus életmódúak voltak. A kísérletünk eredményei alapján a vb_EcoM_bov9_1, vb_EcoM_bov11CS3 és vb_EcoS_bov25_1D fágok potenciálisan alkalmasak lehetnek biokontrollban való alkalmazásra.

7. Summary

Characterisation of new bacteriophages infecting enteral bacteria

Escherichia coli is a bacterium normally colonizing the human gastrointestinal tract. However, there are highly pathogenic strains like the Shiga-toxin producing, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). These strains can cause enteral infections or outbreaks of severe systematic diseases. They are associated specifically with the development of haemolytic uremic syndrome (HUS). Probably the most important of the EHEC strains is the O157:H7 serotype, which regularly causes foodborne zoonotic infections, and its main livestock reservoir is cattle. The emergence of antibiotic resistance is an ever-growing problem, both in human medicine and veterinarian practice. One solution to this may be the use of lytic bacteriophages. Bacteriophages are viruses infecting bacteria and the most abundant organisms on Earth. Lytic phages induce the lysis of the infected bacterial cell, during which new virions are released in the surroundings. Our aim was to isolate and characterise such phages, especially ones infecting EHEC O157:H7 Sakai. The phages were isolated by the research group from the faeces of healthy cattle. Following the sequence analysis and pre-enrichment of the phage suspension, individual phages were separated. Marker genes were determined by PCR. We choose three of these separated phages for our further experiments: T4-like vb_EcoM_bov9_1, rV5-like vb_EcoM_bov11CS3 and HK578-like vb_EcoS_bov25_1D. We conducted an in situ bacterial challenge test on raw ground beef. The efficacy of the phages against a O157:H7 Sakai strain was measured individually and in a cocktail containing equal amounts of the three phages, at 4, 25 and 37 °C, using two different concentrations (MOI 0.1, MOI 10). The phages were able to effectively reduce the numbers of the bacterial cells at every temperature and concentration. We did not observe obvious differences between the individual phages or the cocktail. Previous data has shown that the phages do not carry virulence or resistance genes and are strictly lytic. The results of our experiment indicate that the phages vb_EcoM_bov9_1, vb_EcoM_bov11CS3 and vb_EcoS_bov25_1D may be potentially suitable to use in biocontrol.

8. Irodalom

- Adriaenssens, E.M., Edwards, R., Nash, J.H.E., Mahadevan, P., Seto, D., Ackermann, H.-W., Lavigne, R., Kropinski, A.M., 2015. Integration of genomic and proteomic analyses in the classification of the Siphoviridae family. *Virology* 477, 144–154.
- Brooks, J.C., Alvarado, M., Stephens, T.P., Kellermeier, J.D., Tittor, A.W., Miller, M.F., Brashears, M.M., 2008. Spoilage and Safety Characteristics of Ground Beef Packaged in Traditional and Modified Atmosphere Packages. *Journal of Food Protection* 71, 293–301. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.2.293>
- Carter, C.D., Parks, A., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Magnone, J., Senecal, A., Kropinski, A.M., 2012. Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157. *Bacteriophage* 2, 178–185. <https://doi.org/10.4161/bact.22825>
- Clokier, M.R.J., Millard, A. D., Letarov, A. V. & Heaphy, S., 2011. Phages in Nature. *Bacteriophage* 1. 1. 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B., 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26. 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Desplats, C., Krisch, H.M., 2003. The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages. *Research in Microbiology* 154, 259–267. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00069-X)
- Dhillon, T.S., Chan, Y.S., Sun, S.M., Chau, W.S., 1970. Distribution of Coliphages in Hong Kong Sewage. *Applied Microbiology* 20, 5.
- Elbreki, M., Ross, R.P., Hill, C., O'Mahony, J., McAuliffe, O., Coffey, A., 2014. Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Viruses* 21. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/382539>
- Fortier, L.C., Sekulovic, O., 2013. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 4, 354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>
- Grygorcewicz, B., Chajęcka-Wierzchowska, W., Augustyniak, A., Wasak, A., Stachurska, X., Nawrotek, P., Dołęgowska, B., 2020. In-milk inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the environmental lytic bacteriophage ECPS-6. *Journal of Food Safety* 40. <https://doi.org/10.1111/jfs.12747>
- Hagens, S., Loessner, M., 2010. Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11, 58–68. <https://doi.org/10.2174/138920110790725429>
- Hudson, J.A., Billington, C., Cornelius, A.J., Wilson, T., On, S.L.W., Premaratne, A., King, N.J., 2013. Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Food Microbiology* 36, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.006>
- Kaliniene, L., Klaus, V., Truncaite, L., 2010. Low-temperature T4-like coliphages vB_EcoM-VR5, vB_EcoM-VR7 and vB_EcoM-VR20. *Archives of Virology* 155, 871–880. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0656-6>

- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karmali, M.A., 2018. Factors in the emergence of serious human infections associated with highly pathogenic strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 308, 1067–1072. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.08.005>
- Kropinski, A.M., Waddell, T., Meng, J., Franklin, K., Ackermann, H.-W., Ahmed, R., Mazzocco, A., Yates, J., Lingohr, E.J., Johnson, R.P., 2013. The host-range, genomics and proteomics of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage rV5. *Virology Journal* 10, 76. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-76>
- Liu, H., Niu, Y.D., Meng, R., Wang, J., Li, J., Johnson, R.P., McAllister, T.A., Stanford, K., 2015. Control of *Escherichia coli* O157 on beef at 37, 22 and 4 °C by T5-, T1-, T4-and O1-like bacteriophages. *Food Microbiology* 51, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.001>
- Ly-Chatain, M.H., 2014. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00051>
- Maniloff J., Ackermann, H.W., Jarvis, A., 1999. Phage taxonomy and classification. *Encyclopedia of Virology* 1221-1228.
- Medveczky, I., Rusvai, M., Tuboly, S., Varga, J. 1998. Állatorvosi Járványtan I. Szerk.: Tuboly, S. Szeged: Szegedi Kossuth Nyomda Kft, 372-375.
- Mertens H., Hausmann R., 1982. Coliphage BA14: a New Relative of Phage T7 *Journal of General Virology* 62. 2. 331-341. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-62-2-331>
- Moye, Z., Woolston, J., Sulakvelidze, A., 2018. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses* 10, 205. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Newell, D.G., La Ragione, R.M., 2018. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 49–71. <https://doi.org/10.1111/tbed.12789>
- Papp V., 2020. Szarvasmarha eredetű lítikus colifágok jellemzése. ELTE TTK, Budapest
- Patel, J., Sharma, M., Millner, P., Calaway, T., Singh, M., 2011. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 Attached to Spinach Harvester Blade Using Bacteriophage. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 541–546. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0734>
- Perera, M.N., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Sulakvelidze, A., 2015. Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food Microbiology* 52, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.006>
- Rodríguez-Rubio, L., García, P., Rodríguez, A., Billington, C., Hudson, J.A., Martínez, B., 2015. Listeriaphages and coagulin C23 act synergistically to kill *Listeria monocytogenes* in milk under refrigeration conditions. *International Journal of Food Microbiology* 205, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.007>

- Rohde, C., Wittmann, J., Kutter, E., 2018. Bacteriophages: A Therapy Concept against Multi-Drug-Resistant Bacteria. *Surgical Infections* 19, 737–744. <https://doi.org/10.1089/sur.2018.184>
- Santos, S.B., Kropinski, A.M., Ceyssens, P.-J., Ackermann, H.-W., Villegas, A., Lavigne, R., Krylov, V.N., Carvalho, C.M., Ferreira, E.C., Azeredo, J., 2011. Genomic and Proteomic Characterization of the Broad-Host-Range Salmonella Phage PVP-SE1: Creation of a New Phage Genus. *Journal of Virology* 85, 11265–11273. <https://doi.org/10.1128/JVI.01769-10>
- Soffer, N., Woolston, J., Li, M., Das, C., Sulakvelidze, A., 2017. Bacteriophage preparation lytic for *Shigella* significantly reduces *Shigella sonnei* contamination in various foods. *PLOS ONE* 12. 3. e0175256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175256>
- Sváb, D., Falgenhauer, L., Chakraborty, T., Tóth, I., 2021. Complete Genome Sequences of Novel Bovine T4, rv5-Like, and Dhillonviruses Effective against *Escherichia coli* O157. *Microbiology Resource Announcements* 1. 10. e01261-2. <https://doi.org/10.1128/MRA.01261-20>
- Sváb, D., Falgenhauer, L., Rohde, M., Chakraborty, T., Tóth, I., 2018. Identification and characterization of new broad host-range rv5-like coliphages C203 and P206 directed against enterobacteria. *Infection, Genetics and Evolution* 64. 254-261 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.004>
- Valério, N., Oliveira, C., Jesus, V., Branco, T., Pereira, C., Moreirinha, C., Almeida, A., 2017. Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli*. *Virus Research* 240, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.015>

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Sváb Domonkosnak, valamint az Állatorvos-Tudományi Intézet dolgozóinak a munkám során nyújtott rengeteg segítséget. Nélkülük ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Alulírott SVÁB DOMONKOS TUD. FŐMTS. Igazolom, hogy

..... MAJDU ESZTER (a hallgató neve)

..... ENTERÁLIS BAKTÉRIUMOK ÚJ BAKTERIOFÁGIÁJAINAK JELLEMZÉSE című

diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2021 04. 30.

SVÁB DOMONKOS

svab domonkos

a témavezető neve és aláírása

ELKH ÁOTI

tanszék