



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU**



MSc Aleksandra Petrović Fabijan

**ULOGA BAKTERIOFAGA FAMILIJE *Siphoviridae* U LIZOGENOJ
KONVERZIJI VRSTE *Bordetella bronchiseptica* I NJIHOV
ANTIMIKROBNI POTENCIJAL**

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

Novi Sad, 2016

Koristim ovaj jedinstveni trenutak da izrazim svoju iskrenu zahvalnost svima na Departmanu za biologiju i ekologiju i Prirodno-matematičkom fakultetu koji su omogućili izradu ove disertacije u okviru istraživanja na projektu „Novel natural antimicrobial agents for bacterial pathogen control“ (HUSRB 1203/214/250 NNA) koje kofinansira Evropska Unija, i projektu „Praćenje zdravstvenog stanja divljači i uvođenje biotehnoloških postupaka u detekciji zaraznih zoonoznih agenasa – analiza rizika za zdravlje ljudi, životinja i kontaminaciju životne sredine“ (br. projekta TR 31084) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Posebnu zahvalnost dugujem mentoru, prof. dr Petru Kneževiću, osobi koja je sve ovo omogućila. Hvala mu za nesebičnu pomoć pri izradi i pisanju ove disertacije, za razumevanje od prvog dana naše saradnje, za spremnost i želju da svoje znanje podeli sa mnom, za podršku i optimizam koji mi je uvek pružao. Njegov izvanredan naučno-istraživački pristup mi je pokazao put ka kreativnosti i inventivnosti u nauci, na čemu sam mu neizmerno zahvalna.

Hvala članovima komisije, prof. dr Draganu Radnoviću, prof. dr Vesni Milošević i dr Tamašu Petroviću na predanom čitanju disertacije, konstruktivnim i stručnim sugestijama.

Veliku zahvalnost na pomoći tokom izrade doktorske disertacije takođe dugujem, prof. dr Gaboru Rakhely i njegovoj grupi sa Departmana za biotehnologiju, Univerziteta u Segedinu koji su omogućili sekvencioniranje genoma bakteriofaga.

Hvala i prof. dr Roku Kostanjseku sa Biotehničkog fakulteta u Ljubljani za pomoć u izradi elektronskih mikrografija faga.

Zahvaljujem se i dr Nicole Guiso i mr Aleksandri Marković na ustupljenim Bordetella bronchiseptica sojevima iz animalnog i humanog patološkog materijala.

Hvala prof. dr Malgorzati Lobočkoj na pomoći i konstruktivnim savetima koji su mi pomogli pri pisanju disertacije.

Veliku zahvalnost na lepoj saradnji i pomoći u izradi eksperimentalnog dela disertacije dugujem prof. dr Nedi Mimici-Dukić, dr Dragani Četojević-Simin, prof. dr Ljiljani Vlaški, prof. dr Dragani Obreht-Vidaković i prof. dr Mihajli Đan. Veliko hvala i doc. dr Slobodanu Spasojeviću, dr Gospavi Lazić i dr Gordani Kovačević na nesebičnoj pomoći prilikom izrade disertacije.

Iskrenu zahvalnost dugujem članovima Katedre za mikrobiologiju, pre svega prof. dr Olgi Petrović, prof. dr Draganu Radnoviću, prof. dr Jelici Simeunović, prof. dr Maji Kraman, dr Ivici Tamašu i dr Verici Aleksić. Veliko hvala i svim kolegama doktorandima, Oliveri, Kristini, Dragani, Ljiljani, Dajani, Eleonori, Milani i Milivoju na pomoći, podršci i uvek prisutnom optimizmu.

Zahvaljujem se prijateljima, pre svega mojoj Dijani, užoj i široj porodici na podršci i bezgraničnom razumevanju.

Posebnu, ogromnu zahvalnost dugujem mom mužu Draganu bez čije ljubavi, podrške i razumevanja ovaj rad ne bi bio moguć.

Najveću zahvalnost i ljubav dugujem svojim roditeljima, Žaklini i Bošku, kao i bratu Strahinji, koji su mi, u teškim vremenima iza nas, utabali put do mesta na kome se u ovom trenutku nalazim. Oni su učinili da danas budem ovde, s toga svoju doktorsku disertaciju posvećujem upravo njima.

Aleksandra Petrović Fabijan

SADRŽAJ

SADRŽAJ	iii
1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO.....	3
2.1. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	4
2.1.1. KARAKTERISTIKE VRSTE <i>Bordetella bronchiseptica</i>	4
2.1.2. ZNAČAJ VRSTE <i>B. bronchiseptica</i>	8
2.1.3. OSETLJIVOST <i>B. bronchiseptica</i> NA ANTIBIOTIKE	14
2.2. BIOLOGIJA BAKTERIOFAGA	16
2.2.1. UMERENI BAKTERIOFAGI	22
2.3. OSETLJIVOST BAKTERIOFAGA NA FIZIČKE I HEMIJSKE AGENSE	23
2.4. TAKSONOMIJA BAKTERIOFAGA	24
2.4.1. RED <i>Caudovirales</i>	26
2.4.2. FAMILIJA <i>Siphoviridae</i>	27
2.4.2.1. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE FAMILIJE <i>Siphoviridae</i>	28
2.4.2.2. KARAKTERISTIKE GENOMA FAMILIJE <i>Siphoviridae</i>	30
2.5. ULOGA BAKTERIOFAGA U PATOGENOSTI BAKTERIJA.....	31
2.5.1. TRANSDUKCIJA	33
2.5.2. HORIZONTALNI TRANSFER GENA IZMEĐU FAGA	34
2.6. ULOGA BAKTERIOFAGA U LIZOGENOJ KONVERZIJI BAKTERIJA	35
2.7. PRIMENA BAKTERIOFAGA KAO ANTIMIKROBNIH AGENASA.....	39
2.8. ENDOLIZINI BAKTERIOFAGA I NJIHOV ANTIMIKROBNI POTENCIJAL	42
2.9. <i>Bordetella bronchiseptica</i> BAKTERIOFAGI	46
3. CILJ RADA	49
4. MATERIJAL I METODE	52
4.1 <i>Bordetella bronchiseptica</i> SOJEVI	53
4.2. IZOLACIJA FAGA	53
4.2.1. POREKLO UZORAKA	54
4.2.2. METODA SA JEDNIM SLOJEM AGARA	55
4.3. PROPAGACIJA I PURIFIKACIJA FAGA	57
4.3.1. PROPAGACIJA BAKTERIOFAGA	57
4.3.2. KONCENTROVANJE I PREČIŠĆAVANJE BAKTERIOFAGA	58
4.3.3. ODREĐIVANJE BROJNOSTI IZOLOVANIH FAGA U SUSPENZIJI	60
4.4. POTVRDA POREKLA FAGA	61
4.5. UTVRĐIVANJE LITIČKOG SPEKTRA	61
4.6. UTVRĐIVANJE EFIKASNOSTI INFEKCIJE ALTERNATIVNIH DOMAĆINA BAKTERIOFAGIMA	62
4.7. ODREĐIVANJE PARAMETARA MULTIPLIKACIJE FAGA.....	62
4.8. MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA ODABRANIH FAGA	63
4.9. UTVRĐIVANJE EFEKTA RAZLIČITIH FAKTORA SPOLJAŠNJE SREDINE NA INFEKTIVNOST FAGA.....	63
4.10. ODREĐIVANJE PROTEINSKOG PROFILA ODABRANIH FAGA	64
4.11. KARAKTERIZACIJA GENOMA BAKTERIOFAGA	65
4.11.1. IZOLACIJA DNK	65
4.11.2. RESTRIKCIONA DIGESTIJA GENOMSKE DNK BAKTERIOFAGA ENDONUKLEAZAMA.....	66
4.11.3. UTVRĐIVANJE PRISUSTVA <i>cos</i> REGIONA	68

4.11.4. SEKVENCIONIRANJE GENOMA ODABRANIH BAKTERIOFAGA.....	69
4.11.5. KOMPARATIVNA GENOMIKA I FILOGENETSKA ANALIZA SEKVENCIONIRANIH FAGA	69
4.11.6. DETEKCIJA POTENCIJALNIH TOKSINA I GENA ZA REZISTENCIJU NA ANTIBIOTIKE.....	70
4.12. UTVRĐIVANJE POJAVE NOVIH OSOBINA BAKTERIJA NAKON INFEKCIJE FAGIMA	71
4.12.1. INFEKCIJA SOJEVA FAGOM I POTVRDA INFEKCIJE	71
4.12.2. BIOFILM INFICIRANIH I NEINFICIRANIH SOJEVA	73
4.12.3. KINETIKA HEMOLIZE.....	74
4.12.4. ANTIBIOGRAM INFICIRANIH I NEINFICIRANIH SOJEVA.....	74
4.12.5. ISPITIVANJE POKRETLJIVOSTI INFICIRANIH BAKTERIJA.....	76
4.12.6. ISPITIVANJE HIDROLIZE ŽELATINA INFICIRANIH BAKTERIJA	77
4.13. <i>In vitro</i> ISPITIVANJE LITIČKE EFIKASNOSTI ODABRANIH BAKTERIOFAGA	77
4.13.1. DVOSTEPENA INKUBACIJA U MIKROTITAR PLOČAMA SA TTC-OM	77
4.14. EFEKAT FAGA NA BIOFILM	78
4.14.1. EFEKAT NA FORMIRANJE BIOFLMA	78
4.14.2. EFEKAT NA FORMIRANI BIOFILM.....	79
4.15. <i>In silico</i> KARAKTERIZACIJA ENDOLIZINA FAGA.....	79
5. REZULTATI.....	81
5.1. REZULTATI IZOLACIJE <i>B. bronchiseptica</i> BAKTERIOFAGA	82
5.2. REZULTATI LITIČKOG SPEKTRA BAKTERIOFAGA.....	83
5.3. REZULTATI EFIKASNOSTI FORMIRANJA PLAKA NA HOMOLOGNIM ALTERNATIVNIM DOMAĆINIMA	87
5.4. REZULTATI KRIVE MULTIPLIKACIJE FAGA.....	89
5.5. REZULTATI KARAKTERIZACIJE FAGA.....	90
5.5.1. REZULTATI ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE FAGA	90
5.5.2. EFEKAT RAZLIČITIH FAKTORA SPOLJAŠNJE SREDINE NA INFEKTIVNOST FAGA	91
5.5.3. REZULTATI SDS-PAGE ELEKTROFOREZE	97
5.5.4. Rezultati restrikcione digestije DNK faga.....	98
5.5.5. Rezultati detekcije <i>cos</i> regiona u genomima <i>B. bronchiseptica</i> bakteriofaga.....	100
5.6. ANOTACIJA GENOMA ODABRANIH FAGA.....	101
5.6.1. REZULTATI KOMPARACIJE GENOMA I FILOGENETSKE ANALIZE SEKVENCIONIRANIH FAGA.....	109
5.7. REZULTATI PRETRAGE BAKTERIJSKIH TOKSINA	113
5.8. REZULTATI FORMIRANJA LIZOGENA I ULOGA FAGA U KONVERZIJI BAKTERIJE	126
5.8.1. Rezultati produkcije biofilma inficiranih i neinficiranih sojeva.....	129
5.8.2. REZULTATI KINETIKE HEMOLIZE.....	133
5.8.3. REZULTATI ANTIBIOGRAMA INFICIRANIH I NEINFICIRANIH SOJEVA.....	134
5.8.4. Rezultati ispitivanja pokretljivosti, produkcije fimbrija i likvefakcije želatina inficiranih sojeva	136
5.8.5. Rezultati ispitivanja hidrolize želatina inficiranih sojeva	138
5.9. Litička efikasnost odabranih bakteriofaga – inhibicija rasta bakterija i efekat na biofilm..	138
5.10. REZULTATI KARAKTERIZACIJE ENDOLIZINA FAGA.....	143
6. DISKUSIJA.....	147
6.1. IZOLACIJA FAGA	148
6.2. LITIČKI SPEKTAR FAGA	149
6.3. EFIKASNOST LIZE BAKTERIOFAGA NA HOMOLOGNIM ALTERNATIVNIM DOMAĆINIMA....	150
6.4. KRIVA MULTIPLIKACIJE FAGA.....	151
6.5. MORFOLOGIJA BAKTERIOFAGA	153

6.6. UTICAJ TEMPERATURE NA INFEKTIVNOST FAGA.....	154
6.7. UTICAJ pH NA INFEKTIVNOST FAGA	155
6.8. UTICAJ NATRIJUM-HLORIDA I UREE NA INFEKTIVNOST FAGA	157
6.9. STRUKTURNI PROTEINI FAGA	160
6.10. KARAKTERISTIKE GENOMA <i>B. bronchiseptica</i> FAGA.....	161
6.11. INTEGRACIJA FAGA I LIZOGENA KONVERZIJA BAKTERIJE	169
6.12. PRODUKCIJA BIOFILMA INFICIRANIH I NEINFICIRANIH <i>B. bronchiseptica</i>	172
6.13. KINETIKA HEMOLIZE INFICIRANIH I NEINFICIRANIH <i>B. bronchiseptica</i>	175
6.14. ANTIBIOGRAM INFICIRANIH I NEINFICIRANIH <i>B. bronchiseptica</i>	177
6.15. POKRETLJIVOST PILIMA I FLAGELAMA, PRODUKCIJA FIMBRIJA I LIKVEFAKCIJA ŽELATINA INFICIRANIH I NEINFICIRANIH <i>B. bronchiseptica</i> SOJEVA	180
6.16. MOGUĆNOST PRIMENE FAGA FAMILIJE <i>Siphoviridae</i> KAO ANTI - <i>B. bronchiseptica</i> AGENASA.....	183
6.16.1. INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE	183
6.16.2. EFEKAT FAGA NA <i>B. bronchiseptica</i> BIOFILM	185
6.16.3. <i>In silico</i> KARAKTERIZACIJA ENDOLIZINA.....	188
7. ZAKLJUČCI	193
8. LITERATURA	200
9. PRILOZI.....	223

SPIŠAK SLIKA I GRAFIKA

Slika 1. Kapsula vrste <i>B. bronchiseptica</i> , negativno bojenje kapsule po Maneval-u	5
Slika 2. Flagele vrste <i>B. bronchiseptica</i> , bojenje flagela po Leifson-u	6
Slika 3. Komparacija genoma vrsta <i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> i <i>B. bronchiseptica</i>	14
Slika 4. Morfologija virusa	17
Slika 5. Morfotipovi bakteriofaga po Bradley-u	18
Slika 6. Šematski prikaz ciklusa multiplikacije faga	19
Slika 7. Raspored gena bakteriofaga uključenih u proces lize Gram negativnih bakterija (genska kaseta za lizu)	21
Slika 8. Šematski prikaz litičkog i lizogenog ciklusa bakteriofaga	22
Slika 9. Pregled porodica bakteriofaga	26
Slika 10. Šematski prikaz građe bakteriofaga λ iz familije <i>Siphoviridae</i>	29
Slika 11. Šematski prikaz funkcionalnih delova genoma bakteriofaga λ	31
Slika 12. Transdukcija, tj. prenos DNK bakterije posredstvom bakteriofaga	34
Slika 13. Prikaz himerične prirode nekih faga nastalih putem horizontalnog transfera gena	35
Slika 14. Lizogena konverzija - bakterijska ćelija dobija nove osobine uslovljene prisustvom profaga	36
Slika 15. Šematski prikaz holin-zavisnog i holin-nezavisnog eksporta endolizina	44
Slika 16. Struktura peptidoglikana i specifična mesta na koja različiti endolizini deluju	45
Slika 17. Elektronska mikrofografija (TEM) bakteriofaga BPP-1	47
Slika 18. Lokaliteti i poreklo uzoraka korišćenih za izolaciju faga	54
Slika 19. Reizolacija faga metodom iscrpljivanja	57
Slika 20. Ploče sa semikonfluentnim i pojedinačnim plakama <i>B. bronchiseptica</i> specifičnih bakteriofaga	58
Slika 21. Trake sa fagima nakon centrifugiranja u gradijentu gustine CsCl-a	60
Slika 22. Izolacija bakteriofaga iz uzorka tretiranog visokom temperaturom (100 °C) tokom 20 minuta i netretiranog uzorka	83
Slika 23. Izgled plaka <i>B. bronchiseptica</i> bakteriofaga na originalnom i alternativnom domaćinu	84
Slika 24. Ispitivanje litičkog spektra spot metodom	85
Slika 25. Određivanje EOP spot metodom na alternativnom <i>B. bronchiseptica</i> Bbchiot domaćinu	87
Grafikon 1. Kriva multiplikacije CN1 faga na 26 °C i na 37 °C	89
Slika 26. Elektronske mikrofografije <i>B. bronchiseptica</i> faga	91
Grafikon 2. Efekat pH na infektivnost <i>B. bronchiseptica</i> faga	93
Grafikon 3. Efekat NaCl-a na infektivnost <i>B. bronchiseptica</i> faga	94
Grafikon 4. Efekat temperature na infektivnost <i>B. bronchiseptica</i> faga	95
Grafikon 5. Efekat uree na infektivnost <i>B. bronchiseptica</i> faga	96
Slika 27. Proteinski profil odabranih <i>B. bronchiseptica</i> bakteriofaga	97
Slika 28. Restrikciona digestija DNK <i>B. bronchiseptica</i> faga sa enzimima Hinfl, SmaI i EcoRV	99
Slika 29. Utvrđivanje prisustva <i>cos</i> regiona , RFLP profil faga nakon digestije sa EcoRV i SmaI	100
Slika 30. Cirkularni prikaz LK3 genoma	108
Slika 31. Poravnavanje DNK sekvenci odabranih faga vrste <i>B. bronchiseptica</i> i	111

<i>Pseudomonas sp.</i> faga pomoću Mauve progresivnog algoritma	
Slika 32. Dendrogram generisan na osnovu sekvenci kompletnog genoma <i>B. bronchiseptica</i> faga i proteinskih sekvenci glavnog proteina kapsida	112
Slika 33. Dendrogram generisan na osnovu proteinskih sekvenci gena koji kodira proteinsku mernu traku dužine repa	113
Slika 34. Potvrda prisustva DNK bakteriofaga u genomskoj DNK bakterije, kao dokaz infekcije fagom	126
Slika 35. Potvrda prisustva DNK bakteriofaga u plazmidnoj DNK bakterije, kao dokaz infekcije fagom	127
Slika 36. RFLP potvrda infekcije sojeva <i>B. bronchiseptica</i> bakteriofagima	127
Slika 37. Stabilnost lizogena tokom šest sukcesivnih subkultivacija	128
Slika 38. PCR <i>B. bronchiseptica</i> bakteriofaga sa specifičnim prajmerima Bbr-F i Bbr-R	129
Slika 39. Rast neinficiranog i LK3 fagom inficiranog soja <i>B. bronchiseptica</i> (Bbchiot) u LB bujonu nakon inkubacije od 48 h	129
Grafikon 6. Biofilm inficiranih i neinficiranih <i>B. bronchiseptica</i> sojeva nakon inkubacije od 24 h	131
Grafikon 7. Biofilm inficiranih i neinficiranih <i>B. bronchiseptica</i> sojeva nakon inkubacije od 48 h	132
Slika 40. Krvni agar sa goveđom krvi: inficirani i neinficirani sojevi <i>Bordetella bronchiseptica</i>	133
Slika 41. Antibiogram inficiranog i neinficiranog <i>B. bronchiseptica</i> soja	134
Grafikon 8. Litička efikasnost <i>B. bronchiseptica</i> bakteriofaga	140
Grafikon 9. Efekat <i>B. bronchiseptica</i> bakteriofaga na formiranje biofilma	141
Grafikon 10. Efekat <i>B. bronchiseptica</i> bakteriofaga na formirani biofilm	142
Grafikon 11. SignalP-HMM i SignalP-NN predikcija signalne peptidne sekvence endolizina LK3 faga	143
Slika 42. Dendrogram (Neighbour Joining) konstruisan na osnovu proteinske sekvence endolizina odabranih <i>B. bronchiseptica</i> i <i>Pseudomonas sp.</i> faga	144
Slika 43. Poravnavanje proteinskih sekvenci endolizina <i>B. bronchiseptica</i> faga pomoću MUSCLE programa	145
Slika 44. Trodimenzionalna struktura i kvalitet 3D modela <i>B. bronchiseptica</i> endolizina prema Swiss-modelu	146

SPISAK TABELA

Tabela 1. Karakteristike nekih rodova bakteriofaga iz familije <i>Siphoviridae</i>	28
Tabela 2. Faktori virulencije Gram negativnih bakterija kodirani od strane umerenih bakteriofaga	38
Tabela 3. Prednosti i nedostaci upotrebe bakteriofaga i antibiotika	42
Tabela 4. <i>B. bronchiseptica</i> sojevi	53
Tabela 5. Priprema rastvora različitih koncentracija za ultracentrifugiranje u gradijentu CsCl-a	59
Tabela 6. Karakteristike odabranih restrikcioni enzima	67
Tabela 7. Specifični prajmeri korišćeni za potvrdu infekcije fagima	72
Tabela 8. Uspešnost izolacije faga iz uzoraka površinskih voda	82
Tabela 9. Litički spektar <i>B. bronchiseptica</i> faga	86
Tabela 10. Efikasnost lize <i>B. bronchiseptica</i> faga na alternativnim domaćinima	88
Tabela 11. Morfološke karakteristike odabranih faga	90
Tabela 12. Anotacija genoma LK3 faga	101
Tabela 13. Procenat sličnosti sekvence <i>B. bronchiseptica</i> DNA genoma i odabranih srodnih bakteriofaga	109
Tabela 14. Rezultati predikcije egzotoksina u genomu LK3 faga	115
Tabela 15. Relativni % hemolize od strane inficiranog i neinficiranog referentnog soja <i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 10580 nakon 48 h u odnosu na 1% SDS	133
Tabela 16. Osetljivost inficiranih i neinficiranih <i>B. bronchiseptica</i> sojeva na antibiotike određena disk-difuzinom metodom	135
Tabela 17. MIC antibiotika za neinficirane i inficirane <i>B. bronchiseptica</i> sojeve	136
Tabela 18. Pokretljivost inficiranih i neinficiranih <i>B. bronchiseptica</i> sojeva pomoću pila i flagela	137
Tabela 19. Produkcija fimbrija inficiranih i neinficiranih <i>B. bronchiseptica</i> sojeva	138

1. UVOD

Bakteriofagi (fagi) su najrasprostranjeniji entitet na planeti, čija se brojnost u prirodi kreće u rasponu od 10^{30} do 10^{32} . Bakteriofage je otkrio francuski naučnik Felix d'Herelle koji je 1917. godine definisao da su to virusi slični biljnim i animalnim virusima i nazvao ih bakteriofagima (Maramorosch et al, 2012). Odmah nakon otkrića privukli su pažnju naučne javnosti upravo zbog svoje sposobnosti da parazitiraju na bakterijama i tako utiču na njihovu brojnost (Drulis-Kawa et al, 2015). Međutim, nakon Flemingovog otkrića antibiotika 1929. godine, istraživanja na polju bakteriofaga značajno su zanemarena. S druge strane, istraživanja i klinička ispitivanja sa bakteriofagima nastavila su da se sprovode u nekim zemljama kao što je Gruzija (kao deo bivšeg SSSR-a) gde su se litički fagi rutinski izolovali i koristili u lečenju najrazličitijih infekcija (Chanishvili, 2009). Tokom poslednjih nekoliko decenija, bakteriofagi su se ponovo našli u žiži naučne javnosti usled sve raširenije pojave multiple i pan rezistencije među bakterijama. Naime, pojedini fagi pokazali su izuzetan antimikrobni potencijal u kontroli planktonskih ćelija, ćelija u biofilmu i multirezistentnih bakterija. Posebno interesantni sa aspekta primene u kontroli bakterijskih infekcija su enzimi faga, tj. lizini za koje je dokazano da poseduju veći antimikrobni potencijal od samih viriona. Upravo zbog toga je početkom 21. veka, tačnije 2001. godine definisana nova grupa antimikrobnih agenasa poznatija kao enzibiotici. Reč je nastala kombinacijom reči "enzimi" i "antibiotici", a skovana je od strane Daniela Nelsona i njegove grupe (Nelson et al, 2001).

Bakteriofage karakteriše dualna priroda: postoje obligatno litički i umereni fagi. Obligatno litički fagi nakon multiplikacije dovode do destrukcije, tj. lize bakterijske ćelije. Pored ovoga, postoje i umereni fagi koji mogu da perzistiraju u bakterijskoj ćeliji, tako što integrišu svoju DNK u genom domaćina, tj. bakterije. DNK faga se u ovom slučaju označava kao profag. Oni se multipliciraju u toku replikacije bakterijske DNK i novonastale ćelije sadrže profage. Umereni bakteriofagi su posebno interesantni sa aspekta patogenosti bakterije. Prvi podaci o ulozi faga u patogenosti bakterije datiraju još iz 1927. godine, kada su dva naučnika, Frobisher i Brown, otkrili da netoksigena streptokoke stiču sposobnost produkcije toksina nakon izlaganja profiltriranom supernatantu toksigene kulture streptokoka (Frobisher and Brown, 1927). Ovi naučnici su u stvari opisali fenomen lizogene konverzije koji nastaje kada umereni fag indukuje promene u fenotipu inficirane bakterije. Tokom vremena je dokazano da je veliki broj toksina kodiran genomom bakteriofaga i da fagi učestvuju u diseminaciji ovih gena među bakterijskim sojevima. Pored toksina, veliki broj faktora virulencije je kodiran od strane bakteriofaga, kao što su adhezini, različiti strukturni proteini i enzimi, pa čak i geni za rezistenciju na antibiotike. Fagi takođe mogu da kodiraju i neke regulatorne faktore koji povećavaju ekspresiju bakterijskih gena koji su u vezi sa virulencijom, dok drugi kodiraju enzime koji menjaju bakterijske komponente uključene u virulenciju. Međutim, iako je prošlo više od 100 godina od otkrića, o bakteriofagima se još uvek malo zna, posebno kada je reč o njihovoj ulozi u patogenosti bakterije.

2. OPŠTI DEO

Bordetella bronchiseptica je patogena bakterija i jedan od glavnih uzročnih respiratornih infekcija kod domaćih i divljih životinja. Retko izaziva infekcije kod ljudi sa izuzetkom imunokompromitovanih osoba. Dosadašnja saznanja o mogućnostima primene bakteriofaga ove vrste kao antimikrobnih agenasa i njihovoj ulozi u lizogenoj konverziji veoma su ograničena.

2.1. *Bordetella bronchiseptica*

2.1.1. KARAKTERISTIKE VRSTE *Bordetella bronchiseptica*

Taksonomski položaj vrste *Bordetella bronchiseptica* prema Bergey-ju (Brenner et al, 2005) je sledeći:

Regnum : Prokaryotae

Phylum : Proteobacteria

Classis : Betaproteobacteria

Ordo: Burkholderiales

Familia : *Alcaligenaceae*

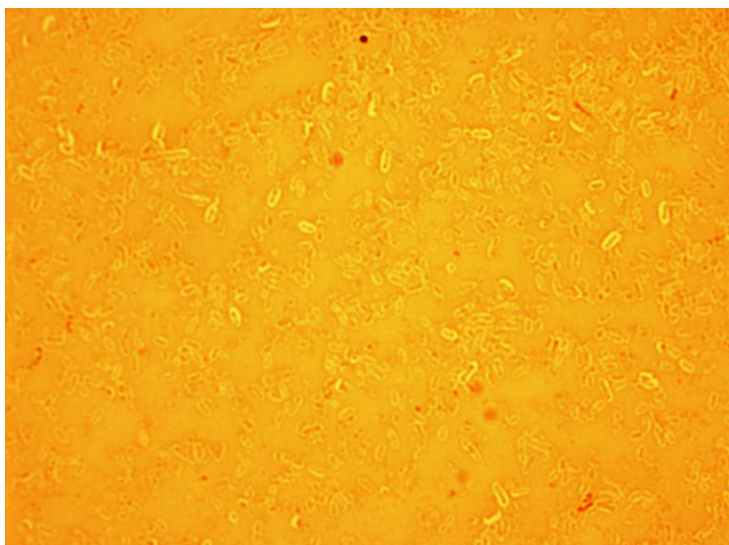
Genus : *Bordetella*

Species : *B. bronchiseptica*

Bakterije vrste *Bordetella bronchiseptica* su Gram negativni, obligatno aerobni i nesporulišuci pleomorfni kokobacili. Taksonomiju roda, naročito vrste *B. bronchiseptica*, karakteriše dinamična istorija. Vrsta *B. bronchiseptica* je prvi put identifikovana 1910. godine (Ferry, 1912) kao *Bacillus bronchicanis*, pošto je izolovana iz respiratornog trakta psa obolelog od štenećaka. Nakon izolacije organizma sa identičnim karakteristikama, ovaj put iz respiratornog trakta morskih prasadi, majmuna i ljudi, organizam je dobio novo ime - *Bacteria bronchiseptica*. Zbog postojanja velike sličnosti sa bakterijama iz roda *Alcaligenes*, *Brucella* i *Haemophilus*, bakterija je u narednom periodu menjala ime u *Alcaligenes bronchisepticus*, *Brucella bronchiseptica*, *Alcaligenes bronchicanis* i *Haemophylus bronchisepticus* (Goodnow, 1980). Moreno i Lopez (1952) su definisali novi rod *Bordetella* u čast Jules Bordeta, mikrobiologa koji je prvi izolovao organizam koji izaziva veliki kašalj. U ovaj rod svrstana je i vrsta *Bordetella bronchiseptica*.

Veliki broj studija pokazao je da je *B. bronchiseptica* blisko srodna sa poznatim humanim patogenima, *B. pertussis* i *B. parapertussis*. Ova sličnost je dokazana različitim molekularnim analizama, kao što su DNK-DNK hibridizacija, Tm vrednosti rRNK-DNK hibrida, % zastupljenost GC parova u genomu bakterija, sličnost 16S rRNK i 23S rRNK sekvenci gena itd. (Brenner et al, 2005; Parkhill et al, 2003). Pored toga, genotipizacijom, tj. analizom multilokusne enzimske elektroforeze i distribucijom insercionih sekvenci dokazano je da su *B. pertussis* i *B. parapertussis* evoluirale od predaka sličnih vrsti *B. bronchiseptica*; tokom evolucije ove dve vrste došlo je do delecije i inaktivacije određenih gena, a nastale razlike u virulenciji u vezi su sa gubitkom regulatornih ili kontrolnih funkcija nekih gena (Parkhill et al, 2003).

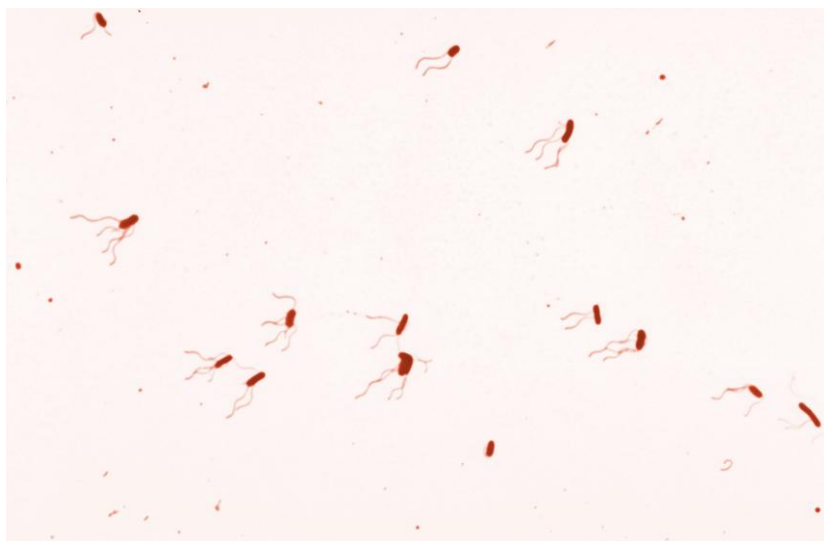
Kao što je već naglašeno, *B. bronchiseptica* je Gram negativan, nesporulišuci, pleomorfan štapić, koji se na preparatu javlja kao pojedinačan i/ili u paru (Slika 1). Dimenzije štapića su 0,2-0,5 μm x 0,5-2 μm , dok veličina nekih filamentoznih formi može dostići i 0,4 x 8,0 μm (Goodnow, 1980; Parton, 2007).



Slika 1. Kapsula vrste *B. bronchiseptica*, negativno bojenje kapsule po Maneval-u.

B. bronchiseptica je uglavnom pokretna bakterija koja poseduje flagele tipa peritriha (Slika 2). Ova bakterija može posedovati dva tipa flagela: prvi tip se sastoji od trostrukog heliksa dijametra oko 14 nm, dok je drugi sačinjen od 5 do 6 pojedinačnih lanaca i može dostići debljinu od 22 nm (Goodnow, 1980). *B. bronchiseptica* poseduje polisaharidnu kapsulu koja joj omogućava preživljavanje u slučaju nepovoljnih uslova (Moxon i Kroll, 1990)

(Slika 1). Bakterija takođe poseduje pile koje igraju značajnu ulogu u inicijalnoj kolonizaciji respiratornog epitela (Bemis i Plotkin, 1982).



Slika 2. Flagele vrste *B. bronchiseptica*, bojenje flagella po Leifson-u

(Izvor: <http://www.slideshare.net/Ghenghesh/lecture>).

Sve vrste roda *Bordetella* su obligatni aerobi, koji optimalno rastu na temperaturama od 30 °C do 37 °C. Metabolizam ovih organizama se zasniva na oksidaciji aminokiselina, dok ugljene hidrate uglavnom ne koriste. Nikotin-amidi, organski azot i sumpor neophodni su za njihov rast (Weiss, 1992). *B. bronchiseptica* se lako izoluje iz respiratornog trakta kako obolelih, tako i zdravih životinja i to iz nazalnog i trahealnog brisa (Goodnow, 1980). Uzorci se zasejavaju na selektivne podloge koje sadrže antibiotike. Za izolaciju se najčešće koriste modifikovan Bordet-Gengou (B-G) krvni agar na kom *B. bronchiseptica* stvara zonu β -hemolize, i Ugljeni agar sa konjskom krvi koji je po nekim autorima osetljiviji kada je u pitanju izolacija vrsta iz roda *Bordetella* (Regan i Lowe, 1977; Muller et al, 1997a). U cilju inhibicije rasta nazofarengijalnih mikrobionata koriste se antibiotici u određenoj koncentraciji (penicilin 0,25-0,5 μgml^{-1} za B-G agar i cefaleksin 40 μgml^{-1} za ugljeni agar). Takođe, za diferencijaciju *B. bronchiseptica* od drugih Gram negativnih štapića, često se koristi 200 mg nitrofurantoina/ml medijuma (Fuzi, 1975). Pored toga, u podloge se može dodavati i streptomycin, a rast gljiva se inhibira dodatkom nistatina (Fiizi, 1973). Za izolaciju *B. bronchiseptica* koristi se, ali znatno ređe, Smith-Baskerville agar, pošto ova podloga sadrži amfotericin B, koji može da ometa rast *B. bronchiseptica* (Goodnow, 1980). Pored navedenih,

definisano je i opisano još nekoliko medijuma za izolaciju *Bordetella sp.* koji se danas ređe koriste, a to se pre svega odnosi na različite varijacije B-G agara (Lautrop, 1960; Imaizumi et al, 1983). Dakle, *B. bronchiseptica* dobro raste na svim podlogama koje se koriste u izolaciji *Bordetella* i u nutritivnom smislu je manje zahtevnija od ostalih predstavnika roda. Tako npr. uspešna izolacija *B. bronchiseptica* zabeležena je i na MacConkey agaru (Lariviere et al, 1992; Goodnow, 1980; Brenner et al, 2005).

Od transportnih podloga, najčešće se koristi polučvrsti ugljeni Regan-Lowe agar sa konjskom krvi i cefaleksinom (Regan i Lowe, 1977). U cilju uspešnije izolacije *B. bronchiseptica* iz uzorka koriste se podloge za obogaćenje, kao što su Stainer-Scholte, Srčano-infuzioni i Triptozno-fosfatni bujon. Inokulisane ploče se inkubiraju na temperaturi od 36 ± 1 °C u trajanju od 24 do 48 h. Na MacConkey agaru kolonije *B. bronchiseptica* su crvenkaste, okružene tankom crvenom zonom sa izmenjenim žutim medijumom ispod same kolonije. Na krvnom agaru *B. bronchiseptica* daje sitne, sivo obojene, sjajne kolonije dijametra 1-2 mm. Hemoliza se može uočiti na goveđem krvnom agaru, dok na konjskom agaru hemoliza odsustvuje.

B. bronchiseptica poseduje katalaznu, oksidaznu i ureaznu aktivnost, usvaja citrate, ne proizvodi vodonik-sulfid i indol i redukuje nitrata (Brenner et al, 2005; Denes et al, 2006). Interesantna je činjenica da ova bakterija daje pozitivan ureaza test za svega nekoliko sati, zbog čega se ovaj test najčešće koristi u preliminarnoj identifikaciji *B. bronchiseptica*, naročito u razlikovanju ove vrste od *B. pertussis*, koja je ureaza negativna.

Antigena struktura ove bakterije je relativno jednostavna. Rod *Bordetella* poseduje 14 termolabilnih kapsularnih antigena (K) označenih arapskim brojevima, od toga 7 antigena je zajedničko za sve vrste ovog roda, dok je K12 karakterističan samo za vrstu *B. bronchiseptica*. Pored toga, *B. bronchiseptica* može da poseduje i K antigene 8, 9, 10 i 11 (Bhatia i Icchpujani, 2003). Pored kapsularnog, ova bakterija poseduje termostabilan, somatski (O) i flagelarni (H) antigen. U vezi sa tim, test aglutinacije sa monovalentnim serumom može poslužiti za karakterizaciju sojeva (Šamanc, 2009).

Za identifikaciju *B. bronchiseptica* najčešće se koristi PCR tehnika (lančana reakcija polimeraze). PCR identifikacija vrsta u okviru roda *Boredetella* je pouzdaniji i osetljiviji metod u odnosu na metode klasične mikrobiologije tj. biohemijske testove (Brenner et al, 2005; Hazbor et al, 1999). Međutim, Register i Nicholson (2007) su ukazali na mogućnost pogrešne identifikacije *B. bronchiseptica* kao *B. pertussis*. Naime, prajmeri koji su dizajnirani

za RT-PCR (eng. *real time PCR*) identifikaciju *B. pertussis* uz pomoć sekvence gena za pertaktin pokazali su se kao nedovoljno specifični za ovu vrstu, zbog čega se javlja mogućnost pogrešne identifikacije *B. bronchiseptica* kao *B. pertussis* ukoliko se dobijeni rezultati ne potvrde odgovarajućim dopunskim biohemijskim testovima. Do nedavno, jako mali broj pouzdanih metoda se koristio u tipizaciji *B. bronchiseptica*. Ribotipizacija je jedna od najčešće korišćenih metoda u karakterizaciji *B. bronchiseptica* izolata poreklom iz različitih životinjskih vrsta. Ova metoda pružila je osnovu za grupisanje organizama u različite tipove i omogućila sagledavanje genetskog diverziteta među izolatima *B. bronchiseptica* (Register et al, 1997). U cilju potpunijeg sagledavanja molekularne epidemiologije vrste *B. bronchiseptica*, Sacco i sar. (2000) predložili su kombinovanu upotrebu analize restrikcionih fragmenata (RFLP, eng. *Restiction Fragment Lenght Polymorphism*) i ribotipizacije. Pored svega navedenog, karakterizacija bilo koje bakterije podrazumeva i karakterizaciju njenog genoma. Tako npr. podaci dobijeni sekvencioniranjem genoma vrste *B. bronchiseptica* pružili su bolji uvid u evoluciju, adaptaciju ove vrste na domaćina, kao i na mehanizme virulencije (Register et al, 2015).

2.1.2. ZNAČAJ VRSTE *B. bronchiseptica*

Bordetella bronchiseptica je primarno respiratorni patogen domaćih, laboratorijskih i divljih životinja (Garcia-Cantu et al, 2000). Prevalenca infekcije je najveća kod pasa, mačaka, svinja, zečeva i morskih prasića, dok se bordetelioze ređe javljaju kod konja, majmuna, lisica, pacova, oposuma, ptica i drugih životinja (Deeb et al, 1990; Goodnow, 1980; Kadlec, 2006). Veća prevalenca i afinitet bakterije prema određenim domaćinima može se objasniti razlikama u adherenciji za respiratorni epitel različitih organizama. Tako npr. *B. bronchiseptica* pokazuje značajnu redukciju u adherenciji na ljudske i pileće epitelijalne ćelijske linije u odnosu na ćelijske linije zečeva i hrčkova (Tuomanen et al, 1983). *B. bronchiseptica* se lako izoluje iz respiratornog trakta obolelih životinja uzimanjem nazalnog i trahealnog brisa. Takođe, fenotipska sličnost *B. bronchiseptica* sa vrstom *Alcaligenes faecalis* ukazuje na mogućnost izolacije ove vrste iz prirodnih sredina, ali njeno prisustvo u takvoj sredini nije dokumentovano (Porter et al, 1991).

Ova bakterija je uzročnik dva značajna oboljenja kod svinja: bronhopneumonije i atrofičnog rinitisa. U slučaju atrofičnog rinitisa (lat. *Rhinitis atrophicans*) *B. bronchiseptica* produkuje nekoliko toksina od kojih je najvažniji dermonekrotični toksin (DNT), koji izaziva distrofične promene na gornjo-viličnim kostima, delimičnu ili potpunu atrofiju nosnih školjki i deformaciju ili potpuni nestanak nosnog septuma (Šamanc, 2009; Brockmeier et al, 2002; Elias et al, 1990). U kasnijoj fazi bolesti dolazi do pojave osteomijelitisa nosnih kostiju i inflamatornih promena na distalnim partijama respiratornog sistema tj. bronhija i pluća. Kod težih oblika infekcije može doći do širenja bakterije neurolimfogenim putem, pa infekcija može da zahvati meninge i mozak i dovede do meningitisa/encefalitisa, odnosno meningoencefalitisa (Šamanc, 2009). U slučaju mešane infekcije uzrokovane *B. bronchiseptica* i toksigene *Pasteurella multocida* klinička slika je teža, a ishod bolesti ozbiljniji (Coward et al, 1989). Atrofični rinitis je bolest od ekonomskog značaja, s obzirom na to da ova infekcija ometa ishranu i dovodi do značajnih gubitaka u stočarskoj proizvodnji (Roop et al, 1987). Slučajevi bronhopneumonije kod svinja često su povezani sa atrofičnim rinitisom. Bronhopneumonija se najčešće javlja kao komplikacija rinitisa, mada postoje i izolovani slučajevi bronhopneumonije koji nisu u vezi sa atrofičnim rinitisom (Ross et al, 1989).

Zarazni traheobronhitis je veoma kontagiozna i akutna bolest gornjih delova respiratornog sistema pasa i mačaka, uglavnom blagog toka. Bolest se manifestuje paroksizmalnim kašljem, rinitisom, limfadenopatijom, iscedkom iz nosa, a u težim slučajevima bronhopneumonijom (Viitanen et al, 2015). Jedan od glavnih uzročnika bolesti je *B. bronchiseptica*, dok parainfluenca virus i pseći korona virus retko izazivaju infektivni traheobronhitis pasa i mačaka (Schuiz et al, 2014). U slučaju bakterijske infekcije, bolest se manifestuje mukopurulentnim rinitisom, traheobronitisom i u težim slučajevima gnojnom pneumonijom (Egbernik et al, 2009).

Kod kunića, *B. bronchiseptica* je komensal i jedan od glavnih etioloških agenasa akutnog ili hroničnog oboljenja disajnih puteva poznatog kao zarazna kijavica. Ova bolest je visoko kontagiozna i može dovesti do velikih gubitaka, tj. visoke stope smrtnosti, ukoliko se ne leči. Infekcija se širi direktnim kontaktom bolesnih i zdravih životinja, preko čoveka koji je u kontaktu sa bolesnim životinjama i preko nosnog iscedka kojim se kontaminira hrana i voda za životinje (Gjurić, 1985). Kliničku sliku bolesti karakteriše pojava bistrog i sluzavog nosnog iscedka, visoka temperatura i odbijanje hrane. Ukoliko se bolest ne leči adekvatno i

blagovremeno, za samo dva dana može doći do uginuća životinje. U slučaju komplikacija, tj. koinfekcije sa vrstom *P. multocida* javlja se peritonitis i pneumonia (Gjurić, 1985; Berglof et al, 2000).

Iako spada u zoonotske agense, *B. bronchiseptica* retko izaziva infekcije kod ljudi sa izuzetkom imunokompromitovanih i imunonekompetentnih osoba. Ljudi se obično ne smatraju prirodnim domaćinima ove vrste i Woolfrey i Moddy (1991) su na osnovu postojećih literaturnih podataka zaključili da je do 1991. godine konstatovano ukupno 23 slučaja infekcije ljudi povezanih sa vrstom *B. bronchiseptica*. Infekcije su uglavnom konstatovane kod imunokompromitovanih ljudi, pre svega hroničnih bolesnika obolelih od cistične fibroze, limfoma, AIDS-a i dr. (Lorenzo-Pajuelo, 2002; Wallet et al, 2002; Delluc et al, 2012; Wernli et al, 2011; Woolfrey i Moddy, 1991; Belen et al, 2003). Pored toga, zabeleženo je i nekoliko slučajeva infekcije kod imunokompetentnih individua (Rath et al, 2008; de la Torre et al, 2012). Infekcija se najčešće manifestuje u vidu bronhitisa, pneumonije ili paroksizmalnog kašlja, dok su sistematske infekcije tipa meningitisa i septikemije retke (Kadlec, 2006; Pruller et al, 2015). Jedan slučaj bakteremije sa *B. bronchiseptica* kao etiološkim agensom zabeležen je 1984. godine i završio se smrtnim ishodom (Katzenstein et al, 1984). Takođe, Rath i sar, (2008) zabeležili su slučaj pneumonije izazvane *B. bronchiseptica* kod imunonekompetentnog novorođenčeta sa ekstremno malom telesnom masom, koja je uspešno izlečena upotrebom meropenema. Infekcija najčešće nastaje usled transmisije patogena sa inficirane životinje na čoveka (Gueirard et al, 1995; Garcia-de-la Fuente et al, 2015), a zabeležena je i nozokomijalna transmisija ove vrste (Huebner et al, 2006; Bose et al, 2008).

B. bronchiseptica, kao i drugi pripadnici roda *Bordetella*, poseduje širok spektar faktora virulencije. Oni predstavljaju stepen patogenosti neke bakterije koji omogućavaju bakteriji da adherira za domaćina, izvrši invaziju i/ili luči toksine, tj. uzrokuje oboljenje (Petrović et al, 2007). Među faktorima virulencije *B. bronchiseptica* najvažniji su pertaktin, fimbrije, endotoksini, filamentozni aglutinin i drugi faktori koji obezbeđuju adhezivnost i kolonizaciju. Dermonekrotični toksin (DNT) i bifunkcionalna adenilat ciklaza/hemolizin ključni su toksini u patogenezi ove vrste. Ovi toksini dovode do oštećenja tkiva, izmene imunog odgovora domaćina i supresiju antitela (Stepniewska et al, 2012).

Skoro sve vrste roda *Bordetella* produkuju trahealni citotoksin (TCT), koji izaziva ciliostazu i inhibiciju sinteze DNK u cilijarnom respiratornom epitelu (Goldman, 1988). Ovaj

toksin je interesantan po tome što poseduje malu molekulska masu (921 Da). Po hemijskom sastavu trahealni citotoksin je disaharid tetrapeptid i pripada familiji muramil peptidaza sa različitim biološkim aktivnostima: ponaša se kao pirogen, pojačava sekreciju citokina i izaziva stanje dubokog sna.

Dermonekrotični toksin (DNT) je polipeptid molekulske težine 160,6 kDa koji se sastoji od 1464 aminokiselina. Genetičke studije potvrdile su prethodna istraživanja kada je u pitanju primarna sekvenca ovog toksina. *B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica* produkuju identičan toksin u fizičko-hemijskom, serološkom i biološkom smislu (Walker et al, 1994). U pitanju je termolabilan toksin koji gubi aktivnost nakon 10 minuta izlaganja na 60 °C. Izaziva vazokonstrikciju, ishemiju, nekrozu i lezije na koži i atrofiju slezine. U slučaju atrofičnog rinitisa kod svinje proizvodi degenerativne promene u osteoblastima, te dovodi do deformacije kostiju lica (Horiguchi et al, 1994).

Kao što je navedeno ranije, sve vrste roda *Bordetella*, uključujući vrstu *B. bronchiseptica* poseduju somatski (O) antigen koji je zapravo deo bakterijskog endotoksina. Iako su u genetičkom smislu veoma bliske, *B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica* poseduju različite lipopolisaharidne molekule (LPS) koji ulaze u sastav spoljašnje membrane. Sve tri vrste imaju sličan lipid A i građu jezgra, dok je sinteza somatskog antigena karakteristična samo za *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica* (Zarrouk et al, 1997). Smatra se da je razlika u građi LPS u vezi sa patogenošću vrste i opsegom domaćina (Preston et al, 2006).

B. parapertussis i *B. bronchiseptica* pokazuju adenilat-ciklaznu aktivnost (AC) sličnu onoj kod *B. pertussis*, iako se ovi toksini (ACT) međusobno razlikuju po antigenosti. Ovaj toksin prodire i intoksikuje različite tipove ćelija, a njihova primarna meta su neutrofili, monociti, makrofazi i ćelije prirodne ubice (Hawletti i Gordon, 1988; Guermonperez et al, 2001). ACT ili Cya A, produkt *cyaA* gena je bifunkcionalni protein koji poseduje adenilat-ciklaznu i hemolitičku aktivnost. Ovaj toksin spada u RTX familiju kalcijum-zavisnih citolizina, tj. toksina čiji prototip je *E. coli* hemolizin (Coote, 1992). Sintetiše se kao inaktivni protoksin, a konvertuje se u aktivnu formu putem palmitilacije (kovalentnim vezivanjem masnih kiselina za cisteinske, serinske ili treoninske rezidue proteina). Ovaj toksin proizvodi tanku zonu β-hemolize oko *B. bronchiseptica* kolonija na Bordet-Gengou agaru.

Pertaktin je do nedavno smatran potencijalnim virulentnim faktorom tri blisko srodne vrste *B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica*, koji spada u familiju

autotransportera. Ovaj protein pokazuje osobine karakteristične za adhezine i invazine (Dougan et al, 1991), a njegova uloga u patogenosti bakterije definisali su Inatsuka i sar. (2010) kada su *in vitro* dokazali da ovaj faktor igra ključnu ulogu u rezistenciji bakterija iz roda *Bordetella* na domaćinove neutrofile.

Fimbrije su filamentozne strukture smeštene na površini bakterijske ćelije i predstavljaju jedne od glavnih faktora odgovornih za vezivanje i perzistentnu kolonizaciju trahealnog epitela vrste *B. bronchiseptica*. Pored toga, dokazano je da ove strukture učestvuju u razvijanju humoralnog odgovora prilikom infekcije (Matto et al, 2000).

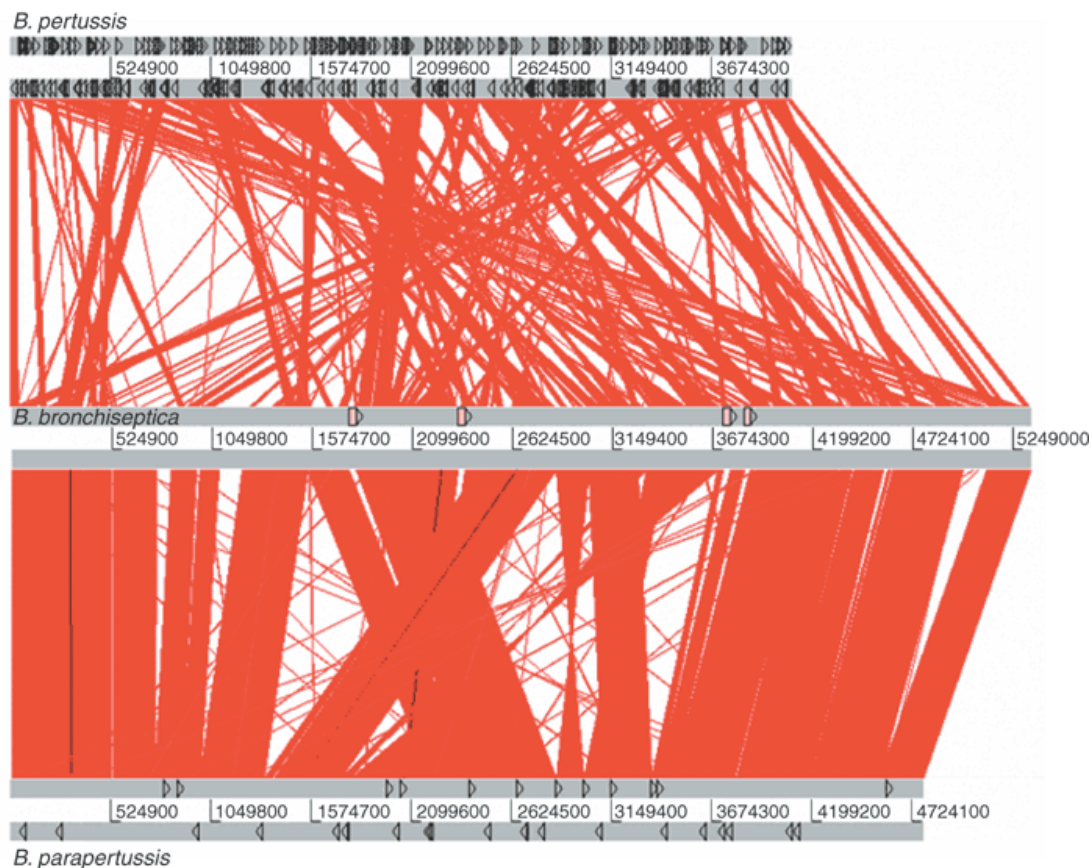
Filamentozni hemaglutinin (FHA) je jedan od najbolje proučenih faktora virulencije predstavnika roda *Bordetella*. U pitanju je dugačak, štapićast visoko-imunogen sekretorni protein koji se nalazi na površini bakterijske ćelije (Satto et al, 1999). Ovaj faktor jedan je od primarnih komponenti acelularnih pertusis vakcina (Kimura et al, 1990). Funkcija filamentoznog hemaglutininina dosta je izučavana i utvrđeno je da ima esencijalnu ulogu u adherenciji (vezuje se za glikosfingolipide cilijarnih membrana) i kolonizaciji epitelijalnih ćelija (Tuomanen et al, 1988; Cotter et al, 1998). Filamentozni hemaglutinin (FHA) može da utiče na imuni sistem domaćina tako što dovodi do povećane ekspresije pro-inflamatornih citokina u epitelijalnim ćelijama i makrofazima.

Sekretorni sistem tipa III karakterističan je za vrstu *B. bronchiseptica*, a smatra se da ima funkciju u perzistenciji ove vrste u donjim partijama respiratornog trakta (Yuk et al, 2000).

Kao većina oportunističkih patogena, tako i vrste roda *Bordetella* poseduju dvo-komponentni transdukcioni signalni sistem poznatiji kao BvgAS (*Bordetella* geni za virulenciju), koji je uključen u virulenciju ovih bakterija. U okviru ovog sistema, razlikuju se tri faze: virulentna Bvg⁺, avirulentna Bvg⁻ i intermedijerna Bvg⁽ⁱ⁾ (Matto et al, 2001). Kada bakterija raste u nutritivno bogatoj podlozi na 37 °C, dolazi do transkripcije gena koji kodiraju faktore virulencije, kao što su filamentozni hemaglutini, fimbrije i bifunkcionalna adenilat-ciklaza/hemolzin (Yasuhiko et al, 2004). Molekulsku osnovu ovog procesa čini kaskadna fosforilacija autofosforilišuće senzor-kinaze (BvgS), gde je krajnji akceptor fosforne grupe BvgA DNK vezujući protein, koji se tim procesom aktivira. Specifični geni, npr. geni za pokretljivost, represovani su u ovoj fazi, a njihova ekspresija dešava se u Bvg⁻ fazi, koja se aktivira kada se bakterija inkubira na temperaturi <25 °C i/ili u prisustvu milimolarnih koncentracija nikotinske kiseline ili magnezijum sulfata. Pored toga, postoje i specifični

mutanti BvgAS sistema koji su permanentno “zaključani” u jednoj od faza, čime postaju otporni na modulacije koje dolaze iz okolne sredine (Cooter et al, 1994). Interesantno je spomenuti rezultate analize mutanata zaključanih u Bvg⁺ fazi usled supstitucije jedne aminokiseline u *bvgS* lokusu (Arg → His,) (Cotter et al, 1994). Naime, naučnici ove studije pretpostavili su da će nemogućnost fenotipske modulacije koja je prisutna kod zaključanih mutanata negativno uticati na neku fazu infekcije (kolonizaciju, uspostavljanje infekcije, transmisiju i sl.). Međutim, oni su utvrdili da i divlji i mutantni sojevi zaključani u Bvg⁺ fazi, podjednako dobro uspostavljaju infekciju u respiratornom traktu zečeva. Važno je napomenuti da postoji i treća, Bvg⁽ⁱ⁾ faza u kojoj dolazi do ekspresije specifičnih gena, npr. *bipA* koji kodira fazni protein BipA (Bvg- intermedijarni fazni protein A), a čija funkcija je u vezi sa adhezijom i kolonizacijom respiratornog epitela. Pored toga, autori ove studije ukazali su da je ova faza važna u transmisiji patogena putem aerosola (Kathryn et al, 2001). Takođe, utvrđeno je da je formiranje biofilma najintezivnije upravo u ovoj fazi (Irie et al, 2004).

Komparacijom genomskih sekvenci, potvrđena je prethodno definisana hipoteza da su *B. pertussis* i *B. parapertussis* nezavisno evoluirale od pretka sličnog *B. bronchiseptica*. Svega nekoliko gena karakteristično je za vrste *B. pertussis* i *B. parapertussis*, dok za razliku od njih, *B. bronchiseptica* poseduje više od 600 gena koji su jedinstveni za ovu vrstu i nisu prisutni u genomima druge dve vrste (Slika 3). Analizom gena koji su tokom evolucije izgubile *B. pertussis* i *B. parapertussis*, ustanovljeno je da su uglavnom u pitanju geni uključeni u membranski transport, regulaciju ekspresije i sinteze površinskih proteina i metabolizam malih molekula. Većina faktora virulencije, kao što su filamentozni aglutini, pertaktin, fimbrije i neki od toksina, zajednička su karakteristika sve tri gore navedene vrste. Drugi faktori virulencije su karakteristični i eksprimiraju se samo kod određenih vrsta. Tako npr. pertusis toksin eksprimira se samo kod *B. pertussis*, dok je sekretorni sistem tipa III karakterističan za vrstu *B. bronchiseptica* (Parkhill et al, 2003). Do sada je sekvencionirano 3 kompletna genoma vrste *B. bronchiseptica*, dok je 62 genoma parcijalno sekvencionirano. Sekvence svih genoma nalaze se u GenBank bazi podataka pod određenim pristupnim brojem.



Slika 3. Komparacija genoma vrsta *B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica* (Parkhill et al, 2003). Sive linije predstavljaju vodeći i zaostajući lanac, crni trouglovi elemente insercionih sekvenci, roze polja profage dok crvene linije ukazuju na DNK sličnost između genoma (blastN).

2.1.3. OSETLJIVOST *B. bronchiseptica* NA ANTIBIOTIKE

Bakterijske infekcije respiratornog trakta kod životinja najčešće se leče konvencionalnim antimikrobnim agensima i to pre svega tetraciklinima, fluorohinolonima, penicilinima, fenikolima ili kombinacijom trimetoprima i sulfonamida (Briyne et al, 2014; Kadlec et al, 2004).

O antibiotskoj rezistenciji vrste *B. bronchiseptica* malo se zna. Ispitivanje osetljivosti ove bakterije na antibiotike uglavnom je sprovedeno na izolatima poreklom od svinja, pasa i mačaka (Speakman, 1997; Kadlec et al, 2004; Priebe et al, 2003; Speakman et al, 2000). Komparacija rezultata dobijenih u ovim studijama praktično je nemoguća zbog korišćenja različitih metoda antibiograma (Steinfeld et al, 2012; Dayao et al, 2014; Steponiewska et al, 2014). Bez obzira na sve, rezistencija sojeva *B. bronchiseptica* na određene antibiotike je

evidentna. Bakterija pokazuje smanjenu osetljivost na beta-laktame (peniciline i cefalosporine druge i treće generacije) usled produkcije beta-laktamaze, a rezistencija na cefalosporine javlja se i usled smanjene propustljivosti spoljašnje membrane za ove antibiotike (cefalotin, ceftiofur) (Brockmeier et al, 2012; Kadlec et al, 2007; Burton et al, 1996). Pored toga, nedavno je utvrđeno da bakterija pokazuje rezistenciju na trimetoprim/sulfametaksazol i tetraciklin (Kadlec et al, 2004).

Mikrodiluciona metoda propisana CLSI standardima (2013) pokazala se kao najpouzdanija u određivanju osetljivosti *B. bronchiseptica* izolata na antibiotike (Pruller et al, 2015). Ipak, Pruller i sar. (2015) su u ranijoj studiji demonstrirali da su MIC vrednosti "homogenije" kada se očitavanje rezultata izvrši nakon 24 h inkubacije, u odnosu na rezultate dobijene očitavanjem nakon 16-20 časova kako je i propisano u standardima (Pruller et al, 2015).

Na osnovu rezultata dobijenih u studiji iz 1997. godine, *B. bronchiseptica* sojevi izolovani od mačaka pokazali su osetljivost na tetraciklin, doksiciklin i enrofloksacin (Speakman et al, 1997a). Interesantno je da su kod istih izolata detektovani mobilni genetički elementi, koji kodiraju rezistenciju na tetracikline (Speakman et al, 1997b). Diseminacija ovih elemenata među *B. bronchiseptica* sojevima može predstavljati ozbiljan problem, pošto su tetraciklini najčešće prvi lek izbora u lečenju bordetelioza kod pasa i mačaka. Isti autori su ispitivali rezistenciju *B. bronchiseptica* poreklom od pasa i utvrdili da je većina izolata osetljiva na tetraciklin, doksiciklin, amoksicilin/klavulansku kiselinu i enrofloksacin i da je generalno rezistencija na antibiotike veća kod sojeva izolovanih od mačaka u odnosu na rezistenciju koju pokazuju pseći izolati. Interesantna je i činjenica da u izolatima od pasa nije detektovana rezistencija na tetracikline, s obzirom na to da se oni najčešće koriste u lečenju zaraznog trahebronhitisa kod ovih životinja (Speakman et al, 2000).

B. bronchiseptica sojevi izolovani od svinja pokazali su rezistenciju na beta laktame, prvenstveno peniciline i cefalosporine, florfenikol, makrolide (tilmikosin) i aminoglikozide (streptomycin) (Kadlec et al, 2004; Pruller i sar, 2015). Molekularnim analizama je utvrđeno da 5 od 6 sojeva poseduje plazmid sa integronom klase I, koga čine dve genske kasete, jedna koja nosi gene za rezistenciju na trimetoprim (*dfrA1*) i druga koja nosi gene za rezistenciju na hloramfenikol (*catB3*) (Kadlec et al, 2005). Na istom integronu pronađen je gen *sul1* odgovoran za rezistenciju na sulfonamide. Porast rezistencije bakterije na sulfonamide je

evidentan. Ovi antibiotici dugo su predstavljali lek izbora u lečenju atrofičnog rinitisa kod svinja, a danas je čak 75% sojeva rezistentno na navedeni antibiotik (Šamanc, 2009).

Imajući u vidu činjenicu da je izbor antibiotika u kontroli *B. bronchiseptica* prilično sužen, neophodno je tragati za novim alternativnim antimikrobnim agensima. U tom smislu bakteriofagi i njihovi enzimi, a to se pre svega odnosi na endolizine, mogu predstavljati alternativno rešenje problema.

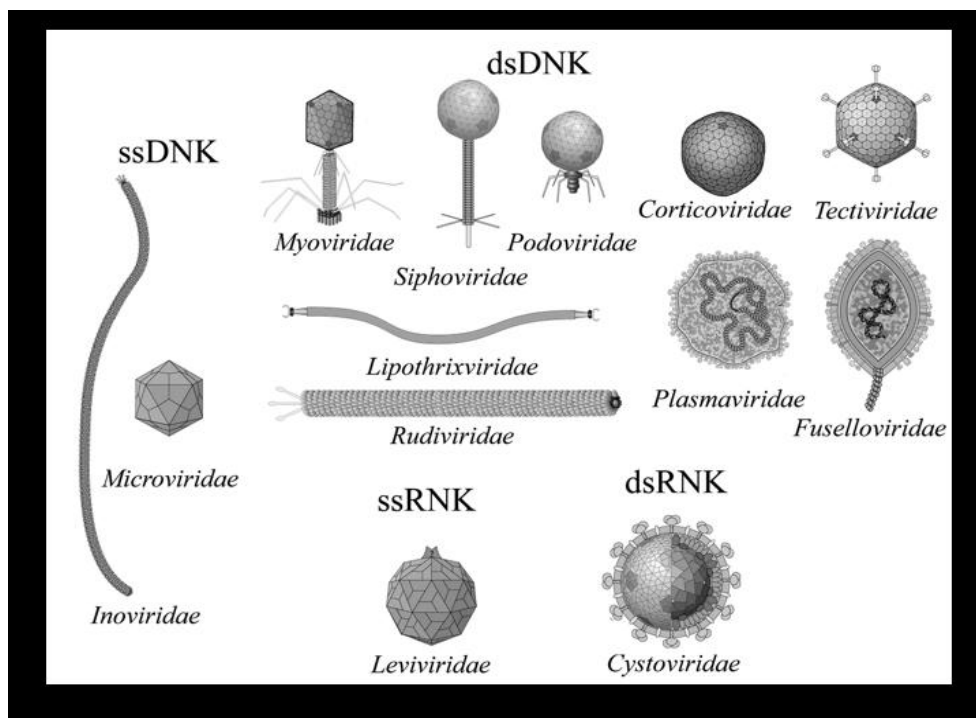
2.2. BIOLOGIJA BAKTERIOFAGA

Bakteriofagi, ili kraće fagi, su obligatni intracelularni paraziti bakterija. Karakteriše ih acelularna građa i kao što je slučaj sa drugim virusima, nesposobni su da se umnožavaju van ćelije domaćina.

Virion, tj. čestica bakteriofaga je izuzetno malih dimenzija (20-300 nm), a njenu osnovnu građu čine kapsid, proteinski deo i nasledni materijal, tj. nukleinska kiselina. Ove dve strukture zajedno čine nukleokapsid (Slika 4). Kapsid je sačinjen od subjedinica, tzv. kapsomera, a njih čine još manje subjedinice protomere. U virionu se nalazi samo jedan od četiri moguća tipa nukleinske kiseline: dvolančana DNK (dsDNK), jednolančana DNK (ssDNK), dvolančana RNK (dsRNK) i jednolančana RNK (ssRNK). Pored osnovne građe, u sastav nekih viriona ulaze i ugljeni hidrati koji grade granate peplomere, fosfo- i glikolipidi i drugi biomolekuli (Knežević, 2012).

U zavisnosti od rasporeda kapsomera oko nukleinske kiseline, nukleokapsid može imati nekoliko različitih tipova simetrije (Slika 4):

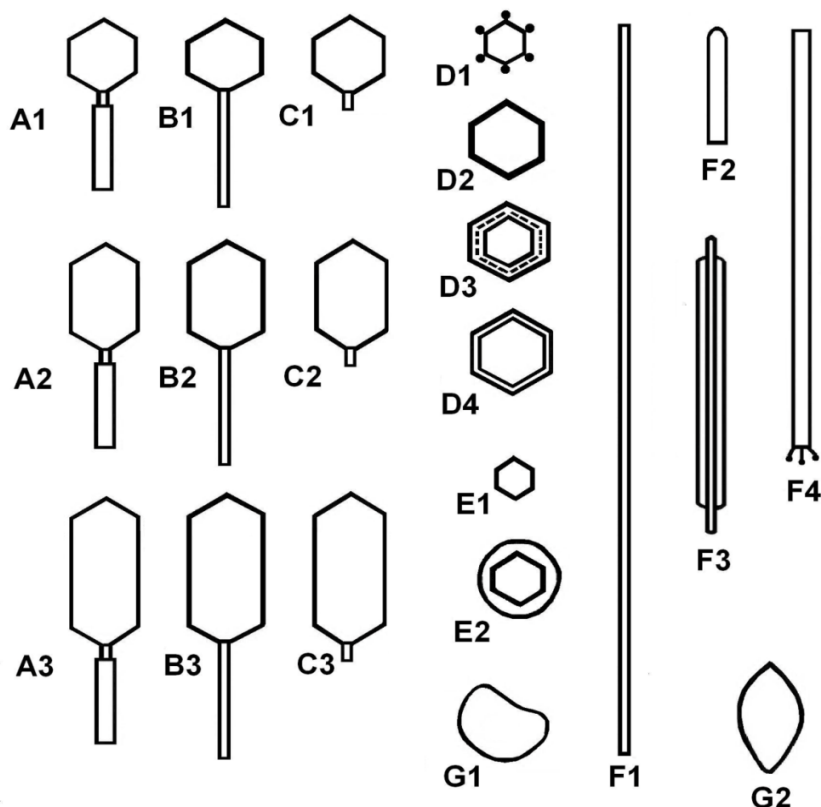
1. helikalnu ili spiralnu simetriju - kapsomere su spiralno raspoređene oko naslednog materijala;
2. kubičnu, poliedralnu ili ikozaedralnu simetriju - kapsomere su raspoređene tako da grade ikozaedar;
3. kompleksnu ili binarnu simetriju - karakteristična za fage iz reda *Caudovirales* kod kojih se razlikuje glava i rep; rep se završava bazalnom pločom na kojoj se mogu naći fibrile, dok se na spoju glave i repa nalazi tzv. kragna;
4. plemorfni fagi - kapsomere su nepravilno raspoređene; ovakva građa je karakteristična za fage koji inficiraju arhee.



Slika 4. Morfologija virusa prokariota
(Izvor: www.viralzone.expasy.org)

Deo viriona mogu sačinjavati i neki nestrukturani proteini, kao što je lizozim, koji razgrađuje bakterijski muropeptid ili neki drugi molekuli, npr. egzopolisaharidi.

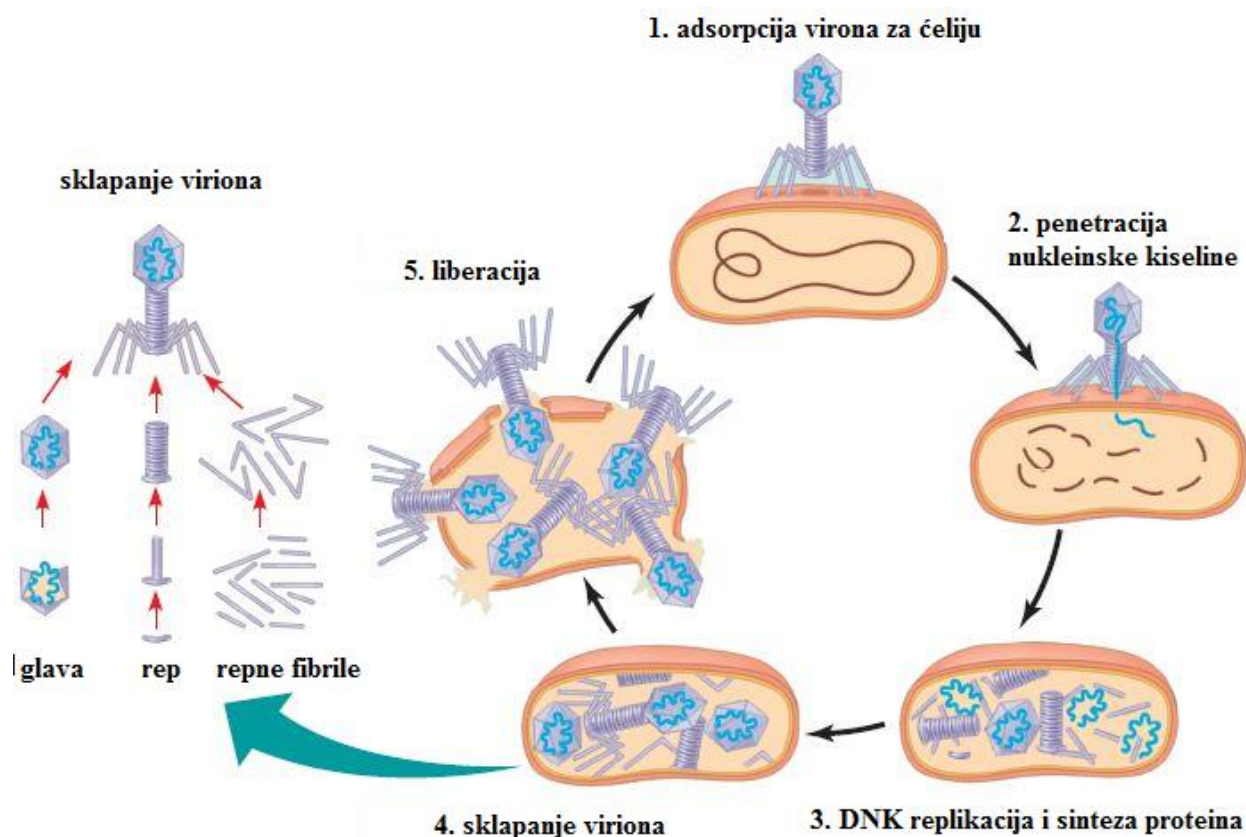
Zbog kompleksne građe bakteriofaga, Bradley je 1976. godine izvršio njihovu morfološku tipizaciju. Bakteriofagi su na osnovu građe podeljeni na tipove i podtipove, što i danas predstavlja osnovu podele ove grupe virusa na familije. Prema njemu, fagi su podeljeni na sedam grupa: morfotip A imaju fagi sa dugim, kontraktilnim repom (fam. *Myoviridae*); morfotip B imaju fagi sa dugačkim, fleksibilnim, ali nekontraktilnim repom (fam. *Siphoviridae*); morfotip C pripadaju fagi sa kratkim repom (fam. *Podoviridae*); morfotip D i E imaju fagi sa kubičnom, morfotip F sa spiralnom simetrijom, dok su u grupu G svrstani pleomorfni fagi (Slika 5) (Knežević, 2012).



Slika 5. Morfotipovi bakteriofaga po Bradley-u (Ackerman, 2001)

Bakteriofage karakteriše dualna priroda: na osnovu životnog ciklusa podjeljeni su na virulentne, tj. obligatno litičke i umerene fage (Slika 6). Infekcija obligatno litičkim fagima se završava lizom ćelije domaćina, dok umereni fagi perzistiraju u bakterijskoj ćeliji. Postoji i treća grupa, a to su fagi koji perzistiraju u bakterijskoj ćeliji u formi plazmida. Takvi fagi se nalaze u stanju mirovanja, pri čemu ne dolazi do multiplikacije faga kao što je to slučaj kod litičkog ciklusa, niti sinhrona replikacije sa bakterijskim genomom koja je karakteristična za lizogeni ciklus. Bakterijska kultura sa ovakvim fagima se naziva pseudolizogena (Los et al, 2012).

Proces umnožavanja faga, bez obzira da li su u pitanju obligatno litički, pseudolizogeni ili umereni fagi započinje isto, tj. adsorpcijom faga za bakterijsku ćeliju i penetracijom nukleinske kiseline (Knežević, 2012) (Slika 6).



Slika 6. Šematski prikaz ciklusa multiplikacije faga

(Izvor: <https://sites.google.com/site/bacteriophage4>)

Proces umnožavanja virusnih partikula kod pripadnika reda *Caudovirales*, tačnije kod T4 faga započinje pričvršćivanjem bakteriofaga za površinu bakterijske ćelije kao posledica visoko specifične reakcije antireceptora faga koji se nalazi na površini viriona (adhezina, liganda) i receptorskog molekula na bakterijskoj ćeliji. Zbog specifičnosti ove reakcije (tipa “ključ-brava”), fagi mogu da inficiraju sve bakterije koje poseduju odgovarajući receptor, bez obzira na taksonomsku pripadnost, te ih karakteriše grupna specifičnost. S druge strane, postoje fagi koji su specifični samo za određene sojeve jedne vrste kao što je slučaj sa fagom 001A vrste *Pseudomonas aeruginosa*, pa takve fage karakteriše uska specifičnost (Knežević, 2009). Receptori za bakteriofage mogu biti gotovo svi biomolekuli na površini bakterije, kao što su fimbrije, flagele, površinski proteini, kapsula, murein i u slučaju Gram pozitivnih bakterija lipotejhojne kiseline (Hertveldt i Lavigne, 2008; Givan et al, 1982; Shea i Seaman, 1984; Bakr et al, 2002). Bakteriofagi mogu koristiti i dva receptora, od koga je jedan primarni, a drugi sekundarni. Kod bakterija sa kapsulom, fagi se najpre vezuju za sekundarne receptore u kapsuli, potom dolazi do enzimske razgradnje kapsule i na kraju dolazi do

vezivanja za primarne receptore, koji su smešteni na ćelijskom zidu bakterije (Hughes et al, 1998). Za proces adsorpcije veoma su važni spoljašnji faktori, pre svega temperatura, ali i hemijski faktori koji mogu značajno da utiču na sam proces. Tako npr. efikasnost adsorpcije mogu da povećaju joni dvovalentnih metala (magnezijuma i kalcijuma), dok žuč i ugljeni hidrati negativno utiču na vezivanje faga za bakteriju. Od fizičkih faktora, temperatura ima najveći značaj kad je u pitanju adsorpcija faga. Fagi pokazuju različit stepen adsorpcije na određenim temperaturama. Neki fagi bolje adsorbuju na niskim temperaturama, dok drugi kao što su neke *Siphoviridae*, se podjednako uspešno vezuju za domaćina na temperaturama do 50 °C u toku 30 minuta (Knežević, 2012). Bakterija može da izgubi ili promeni receptore za koje se vezuju fagi, pa takva ćelija postaje rezistentna na infekciju određenim bakteriofagom.

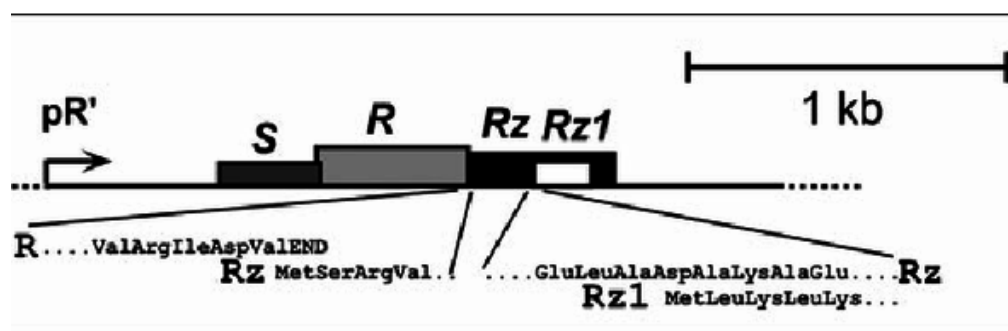
Nakon adsorpcije faga za ćeliju domaćina, sledi naredna faza, tj. penetracija koja podrazumeva ubacivanje nukleinske kiseline u bakterijsku ćeliju posredstvom enzima koji ulaze u sastav viriona. Kao rezultat toga, na površini bakterijske ćelije ostaje kapsid, pa se ovaj proces naziva i dekapidacija. Da bi se zaštitila od egzo- i endonukleaza bakterije, nukleinska kiselina faga se cirkularizuje po ulasku u ćeliju. Još jedan način zaštite nukleinske kiseline faga od bakterijskih enzima jesu modifikovani nukleotidi koje fagi mogu da imaju, kao što su npr. hidrosimetil deoksiuridin (Knežević, 2012). Nakon penetracije nukleinske kiseline u bakterijsku ćeliju sledi faza multiplikacije, u kojoj dolazi do sinteze ranih, a potom i kasnih proteina koji su neophodni u narednoj fazi, tj. morfogenezi. Na osnovu nukleinske kiseline faga, transkribuju se, a potom i sintetišu najpre proteini koji štite nukleinsku kiselinu faga, a potom dolazi do sinteze proteina koji ometaju metaboličke procese u bakteriji. U sledećoj potfazi dolazi do sinteze proteina uključenih u proces replikacije virusnog genoma, a sam kraj multiplikacije podrazumeva sintezu strukturnih proteina viriona (Knežević, 2012).

U sledećoj fazi umnožavanja dolazi do sklapanja virusnih partikula. Ova faza sastoji se od dve potfaze, jedna podrazumeva integraciju virusih partikula, druga maturaciju virusnih čestica. Period od momenta penetracije do pojave prvih viriona u bakterijskoj ćeliji naziva se period eklipse. U ovoj fazi virusi se ne mogu detektovati ni ekstracelularno, ni intracelularno. Nakon ove faze sledi maturacija, gde dolazi do povećanja brojnosti virusa intracelularno, dok se njihovo prisustvo ekstracelularno još uvek ne može detektovati. Period eklipse i maturacije zajedno čine latentni period. Na kraju ovog perioda moguće je uočiti (uz pomoć

elektronskog mikroskopa) zrele virione u bakterijskoj ćeliji spremne za liberaciju, koja ujedno predstavlja poslednju fazu umnožavanja (Knežević, 2012).

Bakteriofagi se oslobađaju najčešće lizom domaćina, dok je samo za neke filamentozne fage karakteristično oslobađanje putem pupljenja. Većina faga koji inficiraju Gram pozitivne bakterije, lizira ćeliju posredstvom dvokomponentnog proteinskog sistema holin-lizin. Prva komponenta, tj. holin sintetise se u kasnoj fazi infekcije i u određenom trenutku dolazi do depolarizacije membrane, što aktivira holine. Ovaj protein se aktivira procesom oligomerizacije, koja dovodi do formiranja rupa u citoplazmataskoj membrani bakterije. U međuvremenu dolazi do akumulacije endolizina (lizina) u citoplazmi, tj. druge komponente pomenutog sistema. Ovi enzimi su u stvari peptidoglikan hidrolaze, koji razgrađuju kovalentne veze u ćelijskom zidu bakterija. U zavisnosti od toga koju vezu u peptidoglikanu razgrađuju, podeljeni su u šest klasa o kojima će više biti reči u daljem tekstu. Zahvaljujući holinima koji formiraju otvore u membrani, endolizini imaju slobodan pristup ćelijskom zidu bakterije.

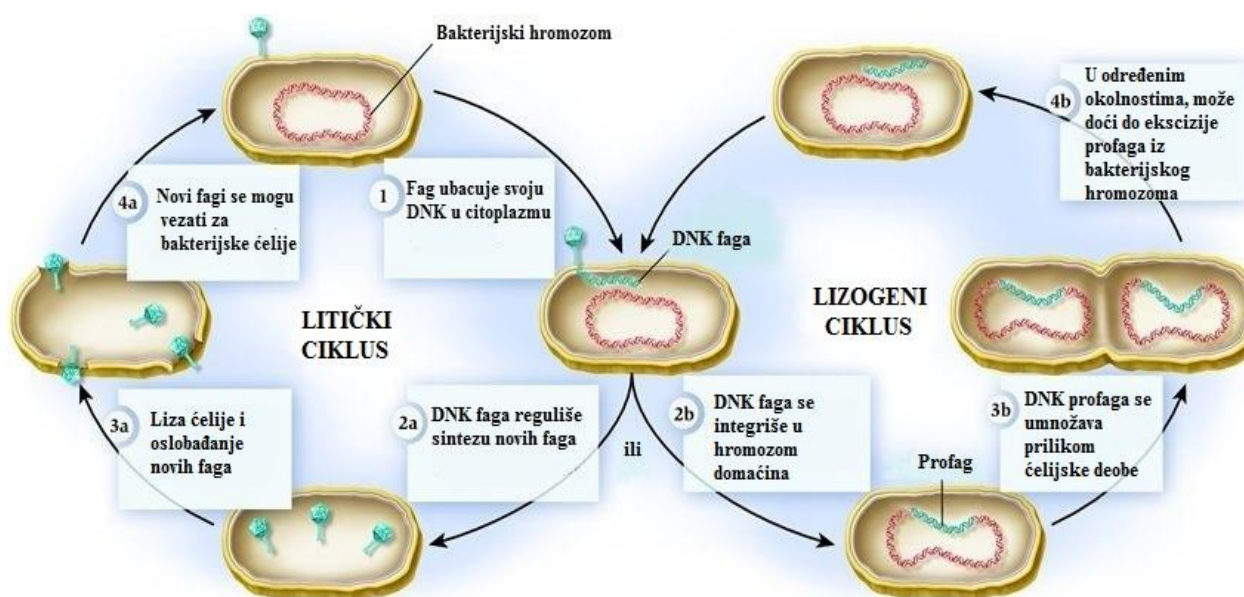
Bakteriofagi koji inficiraju Gram negativne bakterije poseduju nešto kompleksniji sistem za oslobađanje novoformiranih viriona. Pored holina i lizina, ovi fagi imaju i treću komponentu tzv. spanin. Spanin je transmembranski protein koji se sastoji od dve subjedinice Rz i Rz1. Geni koji kodiraju Rz i Rz1, i njihove ekvivalente karakteristični su po tome što međusobno dele istu DNK sa različitim okvirima čitanja (Berry et al, 2008) (Slika 7). Ovi proteini u stvari su lipoproteinski signalni peptidi koji stvaraju fizičku vezu između unutrašnje i spoljašnje citoplazmatske membrane. Smatra se da učestvuju u poslednjoj fazi liberacije, prenoseći mehanički stres sa holinima narušene citoplazmatske membrane do spoljašnje membrane, dovodeći do njene disrupcije (Berry et al, 2008).



Slika 7. Raspored gena bakteriofaga uključenih u proces lize Gram negativnih bakterija (genska kasetna za lizu); S-holin, R-lizin, Rz i Rz1-spanini (Berry et al, 2008)

2.2.1. UMERENI BAKTERIOFAGI

Umereni fagi ne moraju da se umnožavaju i liziraju ćelije, već mogu da perzistiraju u bakterijskoj ćeliji tako što integrišu svoj genom u bakterijsku DNK nakon infekcije. Ovako inficirana bakterijska kultura naziva se lizogena, a DNK bakteriofaga koja je integrisana u bakterijski genom naziva se profag. Profag se replikuje zajedno sa bakterijskom DNK i prenosi se vertikalnim transferom gena, tj. sa jedne generacije na sledeću. Proteini tako integrisanog faga se ne ekspimiraju zahvaljujući represornom proteinu, koji se ekspimirira i inhibira ekspresiju svih ostalih proteina. Međutim, u određenim uslovima može doći do gubitka aktivnosti represornog proteina, nakon čega sledi isecanje profaga iz DNK bakterije i započinjanja litičkog ciklusa (Slika 8). Ovaj proces inicijacije litičkog ciklusa umerenog faga naziva se indukcija, a može biti izazvana različitim nepovoljnim faktorima, kao što su UV zračenje, mitomicin C, vodonik-peroskid itd. (Knežević, 2012).



Slika 8. Šematski prikaz litičkog i lizogenog ciklusa bakteriofaga

(Izvor: <http://biology-forums.com/index>)

Kao što je ranije naglašeno, posebnu grupu bakteriofaga čine fagi koji perzistiraju u formi plazmida, u cirkularnoj formi, tj. ekstrahromozomski. Neki bakteriofagi, kao što su pojedini predstavnici familije *Inoviridae*, inficiraju bakteriju uvek na ovaj način. Ovaj fenomen se može javiti i kod bakterija inficiranih fagima iz reda *Caudovirales*, koje se nalaze u nepovoljnim uslovima sredine (npr. izgladnjivanje), a završava se inicijacijom lizogenog ili

litičkog ciklusa, onog momenta kada nastupe povoljni uslovi. Ovakva bakterijska kultura se naziva pseudolizogena (Guttman et al, 2005; Knežević, 2012). Smatra se da ovaj fenomen ima značajnu ulogu u preživljavanju faga u slučaju kada se domaćin, tj. bakterija nalaze u nepovoljnim uslovima ili kada je rast usporen (Los i Wegrzyn, 2012).

2.3. OSETLJIVOST BAKTERIOFAGA NA FIZIČKE I HEMIJSKE AGENSE

Osetljivost faga na fizičke i hemijske agense je prilično raznolika. Većina faga je otporna na sušenje, neotporna na visoke temperature i UV zračenje i različito osetljiva na promene pH vrednosti.

Temperatura je ključni faktor za očuvanje infektivnosti faga (Olson et al, 2004). Kao što je već opisano, ovaj faktor je od izuzetne važnosti za adsorpciju, penetraciju, multiplikaciju i dužinu latentnog perioda (Jonczyk et al, 2011). Temperature niže od optimalnih utiču negativno na infektivnost faga; svega nekoliko faga ulazi u proces multiplikacije, pa je samim tim i broj oslobođenih faga po ciklusu mnogo manji nego u optimalnim uslovima. S druge strane, temperature više od optimalnih takođe negativno utiču na biologiju faga, najčešće produžavajući dužinu njihovog latentnog perioda (Tey et al, 2009). Rezistencija na visoke temperature se najčešće sreće kod faga izolovanih iz prirodne sredine i faga laktokoka (Buzrul et al, 2007).

Kada je u pitanju pH vrednost, većina faga dobro preživljava pH od 5 do 8, sa izuzetkom nekih faga koji dobro podnose nisku pH vrednost od 3 do 4, ili pak visoku, oko 11. Za pojedine fage je karakteristično da zadržavaju vijabilnost u širokom opsegu pH vrednosti, kao što je npr. bakteriofag vrste *Lactococcus casei*, koji zadržava infektivnost u opsegu pH 4-11 (Capra et al, 2006). Najčešće je slučaj da opseg pH vrednosti na kojima bakterija može da raste određuje pH opseg u kome je infektivnost faga očuvana. Tako npr. pH vrednost u okviru koje je moguć rast vrste *Pseudomonas aeruginosa* iznosi od 5,6 do 8, sa optimumom oko 7,4, dok je za bakteriofage specifične za ovu vrstu pokazano da su najstabilniji na pH 7. S druge strane, neki fagi pokazuju bolje očuvanje infektivnosti na nižim ili višim pH vrednostima u odnosu na optimalne vrednosti za preživljavanje bakterije domaćina. Tako na primer, bakteriofagi vrste *P. aeruginosa* iz familije *Podoviridae* pokazuje relativno dobru stabilnost na pH vrednostima oko 3 (Knezevic, 2011).

Nagle promene osmotskog pritiska, tj. osmotski šok dovodi do izbacivanja nukleinske kiseline iz kapsida i inaktivacije faga. Ovo se dešava kada se fagi prebacuju iz sredine sa visokom koncentracijom soli u sredinu sa malom koncentracijom soli (Lark i Adams, 1953). Adams je (1949) ispitivao stabilnost T5 faga u rastvorima soli (fosfatni pufer, pufer sa citratom i pufer sa kalcijumom). On je uočio da su fagi ostali stabilni u puferu sa kalcijumom, ali da su izgubili vijabilnost u fosfatnom puferu, dok su fagi u puferu sa citratom inaktivirani gotovo odmah. Na osnovu njegovog rezultata, ali i mnogih drugih istraživanja, predloženo je dodavanje kalcijum-hlorida u suspenzije virusa, kako bi se očuvala njihova stabilnost tokom procesa purifikacije (Chow et al, 1971).

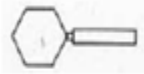
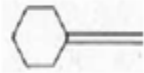








Urea takođe može da utiče na infektivnost faga, pošto je u pitanju agens koji denaturiše proteine. Tako su Gupta i Yin (1995) utvrdili da bakteriofag T7 značajno gubi infektivnost već nakon 30 sekundi izlaganja 6 mol L^{-1} rastvoru uree. Whang i sar. (1996) ukazali su da dvovalentni joni kao što su Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} i Ni^{2+} stabilizuju aktivnost faga u prisutvu uree, za razliku od trovalentnih jona (Al^{3+} i Au^{3+}) koji destabilizuju fage u takvim uslovima.

S obzirom da je osetljivost faga na različite fizičke i hemijske agense prilično raznolika (razlike su detektovane čak među fagima koji pripadaju istoj familiji), veoma je važno poznavati optimalne vrednosti faktora sredine u slučaju svakog pojedinačnog faga. Ovo je od izuzetne važnosti kako u slučaju primene faga u terapijske svrhe, tako i u slučaju umernih faga i njihove moguće uloge u lizogenoj konverziji bakterije.

2.4. TAKSONOMIJA BAKTERIOFAGA

Aktuelnu klasifikaciju bakteriofaga izvršio je Hans W. Ackermann zajedno sa članovima Internacionalnog Komiteta Taksonomije Virusa osnovanog 1966. godine (ICTV) u Moskvi. Virusi prokariota svrstani su u 10 familija, sa najmanje pet potencijalno novih familija koje čekaju novu klasifikaciju. Do sada je jako mali broj faga morfološki okarakterisano putem elektronskog mikroskopa, a smatra se da je najmanje 5000 izolovano, ali ne i okarakterisano (Ackerman, 2009). U klasifikaciji bakteriofaga od velikog značaja su sledeće karakteristike: karakteristike genoma i replikacije, fizičko-hemijske, biološke i antigenske karakteristike viriona i morfologija faga (simetrija i složenost viriona).

Osnovna taksonomska jedinica klasifikacije kod bakteriofaga je vrsta, a najčešće korišćena familija. Trenutno najveću taksonomsku jedinicu u klasifikaciji bakteriofaga čine 2 reda (*Caudovirales* i *Ligamenvirales*). *Caudovirales* obuhvata preko 96% klasifikovanih bakteriofaga sa tri porodice: *Myoviridae*, *Podoviridae* i *Siphoviridae*. Porodica *Myoviridae* je podeljena u pet potporodica: *Peduvirinae* sa 2 roda koja sadrže 19 vrsta, *Sponuvirinae* sa 5 rodova koji sadrže 17 vrsta, *Tevenvirinae* sa 8 rodova u kojima je svrstano 43 vrste, *Eucampyvirinae* sa 2 roda koja sadrže 7 vrsta i *Vequintavirinae* sa tri roda koja sadrže 11 vrsta. Ovoj familiji pripadaju još 28 rodova koji nisu svrstani ni u jednu potfamiliju. Porodicu *Podoviridae* čine dve potfamilije, *Autographivirinae* sa 4 roda u kojima je svrstano 20 vrsta i *Picovirinae* sa 2 roda u kojima je svrstano 9 vrsta. Ovoj familiji pripadaju i 14 rodova faga koji nisu svrstani ni u jednu porodicu. Porodicu *Siphoviridae* čine dve potfamilije: *Guernseyvirinae* sa 3 roda u kojima je svrstano 17 vrsta i *Tunavirinae* sa 6 rodova u koje je svrstano 20 vrsta, dok 57 rodova sa 328 vrsta faga nije svrstano u potfamilije. Pored tri porodice svrstane u red *Caudovirales* definisano je još sedam porodica: *Microviridae* sa potfamilijom *Bullavirinae* (3 roda sa 14 vrsta) i *Gokushovirinae* (3 roda sa 7 vrsta), *Corticoviridae* (1 rod sa 1 vrstom), *Tectiviridae* (1 rod sa 4 vrste i 1 vrsta koja ne pripada ni jednom rodu), *Leviviridae* (2 roda sa 4 vrste), *Cystoviridae* (1 rod sa 1 vrstom), *Inoviridae* (2 roda sa 43 vrste) i *Plasmaviridae* (1 rod sa 1 vrstom) (ICTV, 2015) (Slika 9).

Oblik	Red ili Porodica	Nukleinska kiselina, strukture, veličina	Član
	<i>Caudovirales</i>	dsDNA (L), bez omotača	
	<i>Myoviridae</i>	Rep kontraktilan	T4
	<i>Siphoviridae</i>	Rep dug, nekontraktilan	λ
	<i>Podoviridae</i>	Rep kratak	T7
	<i>Microviridae</i>	ssDNK (C), 27 nm, 12 kapsomera	ϕ X174
	<i>Corticoviridae</i>	dsDNK (C), kompleksan kapsid, lipidi, 63 nm	PM2
	<i>Tectiviridae</i>	dsDNK (L), unutrašnje lipidne vezikule, pseudo rep, 60 nm	PRD1
	<i>Leviviridae</i>	ssRNK (L), 23 nm, sličan poliovirusu	MS2
	<i>Cystoviridae</i>	dsRNK (L), segmentisan, lipidni omotač, 70 - 80 nm	ϕ 6
	<i>Inoviridae</i>	ssDNK (C), filament ili štapić, 85 - 1950 x 7 nm	fd
	<i>Plasmaviridae</i>	dsDNK (C), lipidni omotač, bez kapsida, 80 nm	MVL2

C - cirkularna, L - linearna

Slika 9. Pregled porodica bakteriofaga (Ackermann 2011).

2.4.1. RED *Caudovirales*

Do danas je opisana morfologija za oko 4500 faga sa repom primenom elektronske mikroskopije. Međutim, podaci kao što su struktura viriona, karakteristike replikacije i organizacija genoma dostupni su za veoma mali broj faga. Fagi sa repom pripadaju redu *Caudovirales* i čine 96% svih do sada opisanih faga, a tako i jednu od najvećih grupa virusa

koji inficiraju bakterije iz carstva Bacteria i Archea (Ackermann, 1996; King et al, 2012). *Siphoviridae* su najzastupljenija gupa ovih faga (62%), zatim slede *Myoviridae* (24%), najređe su *Podoviridae* (14%) (Holt, 1984, 1986, 1989,1989).

Familiju *Myoviridae* čine fagi sa dugim, manje ili više rigidnim kontraktilnim repom dužine 80-455 nm i širine 16–20 nm. Ovi fagi se sastoje od centralnog jezgra koga čine naslagani prstenovi od šest subjedinica okruženi helikalnom i kontraktilnom kragom koja odvađa glavu od vrata. Procesi sklapanja glave i repova viriona odvijaju se nezavisno jedan od drugog. U poređenju sa drugim fagima sa repom, *Myoviridae* poseduju veće glave, sadrže više DNK i imaju veću osetljivost na zamrzavanje, odmrzavanje i osmotski šok. Rodovi ove familije diferencirani su na osnovu organizacije genoma, mehanizma DNK replikacije i njenog pakovanja, kao i prisustva ili odsustva neobičnih baza i DNK polimeraze (King et al, 2012).

Familiju *Podoviridae* čine fagi sa kratkim, nekontraktilnim repom dimenzija 20x8 nm. Kao i kod *Myoviridae*, sklapanje proteina glave se odvija nezavisno od slapanja proteina repa. Klasifikacija ove familije nedavno je revidirana i bazirana na dostupnim proteomskim podacima koji su u vezi sa biološkim karakteristikama koje podrazumevaju morfologiju, organizaciju genoma, mehanizam DNK pakovanja i prisustvo ili odsustvo gena za DNK ili RNK polimerazu. Fagi su svrstani u grupe upotrebom različitih algoritama i analizom dostupne literature i eksperimentalnih podataka.

2.4.2. FAMILIJA *Siphoviridae*

Familiju *Siphoviridae* čine fagi sa veoma dugačkim, tankim i nekontraktilnim repom. Najbolje proučeni predstavnik familije *Siphoviridae* je umereni UV inducibilni λ fag enterobakterija. Do sada je opisano ukupno 65 rodova; familiju *Siphoviridae* čine dve potfamilije, *Guernseyvirinae* (sa 3 roda) i *Tunavirinae* (sa 6 rodova) i 57 rodova koji nisu svrstani u potfamilije. Taksonomska struktura familije *Siphoviridae* iz poslednjeg, devetog izveštaja Taksonomije virusa (2012) prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Karakteristike nekih rodova bakteriofaga iz familije *Siphoviridae* (Virus Taxonomy, 2012)

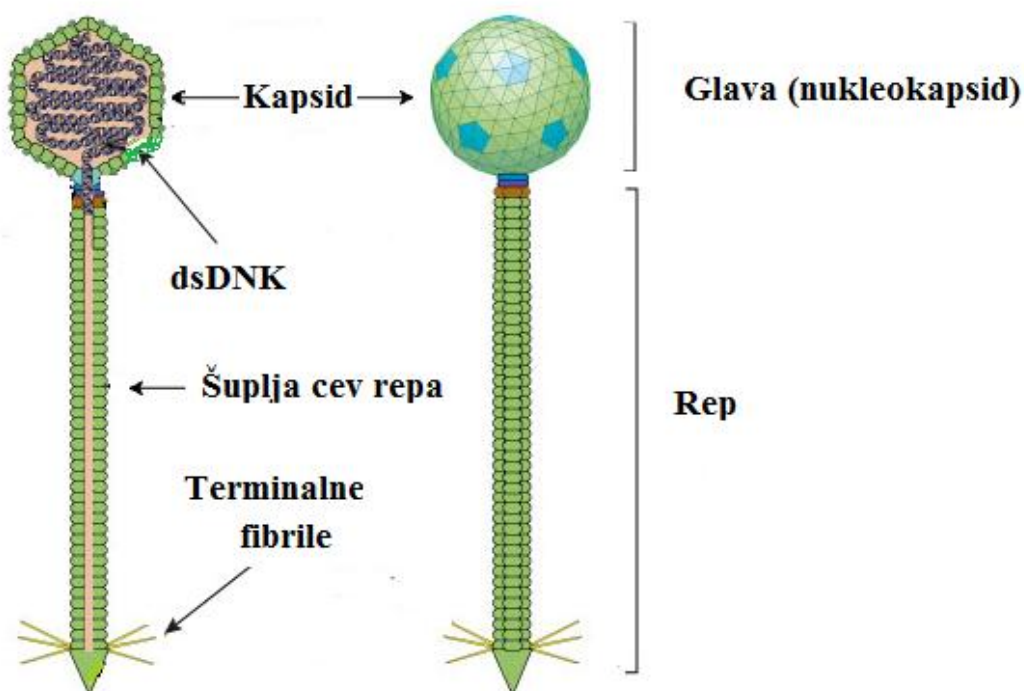
Rod	Tipski predstavnik	Karakteristike roda
	<i>Escherichia lambda</i> fag	DNK poseduje kohezivne krajeve i pakuje se kao jedinični filament.
T1 virusi	<i>Escherichia</i> fag T1	Veoma fleksibilni repovi, DNK je cirkularno permutovana, poseduje <i>pac</i> mesta i terminalne ponovke.
T5 virusi	<i>Escherichia</i> fag T5	Virioni imaju velike i dugačke glave i izlomljena repna vlakna. DNK ima pet jednolančanih prekida, tj. rupa, dugačke terminalne ponovke i kodira polimerazu tip A (<i>E. coli</i> Pol I). Penetracija nukleinske kiseline se vrši u dva koraka.
L5 virusi	<i>Mycobacterium</i> fag L5	DNK poseduje <i>cos</i> region i kodira DNK polimerazu tip A (<i>E. coli</i> Pol I).
C2 virusi	<i>Lactococcus</i> C2 fag	Glave su dugačke, a DNK poseduje <i>cos</i> regione i kodira DNA polimerazu tip B.
PsiM1 virusa	<i>Methanobacterium</i> psiM1 fag	Domaćini ovih virusa su arhee. Genomi ovih faga su cirkularno permutovani sa terminalnim ponovcima.
PhiC31 virusi	<i>Streptomyces</i> phiC31 fag	DNK poseduje <i>cos</i> regione, kodira polimerazu tip A serin-specifičnu rekombinazu.
N15 virusi	<i>Escherichia</i> N15 fag	DNK profaga je prisutna u vidu linearne ekstrahromozomske DNK sa kovalentno zatvorenim i u oblike ukosnice telomerazama. DNK ima kohezivne krajeve, a pakuje se kao jedinični molekul.
Spbeta virusi	<i>Bacillus</i> SPbeta fag	Virioni imaju najveće glave i najduže repove u čitavoj familiji.

* *Cos* region – jednolančani kohezivni krajevi DNK; *Pac* mesto – parcijalno permutovani krajevi DNK faga koji se pakuju "headfull" mehanizmom

2.4.2.1. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE FAMILIJE *Siphoviridae*

Čestica bakteriofaga - virion, kao i kod drugih virusa sastavljena je iz proteinske komponente koja se naziva kapsid i iz nukleinske kiseline. Kapsid je sastavljen iz subjedinica - kapsomera, koje zajedno sa nukleinskom kiselinom čine nukleokapsid. Fagi iz familije *Siphoviridae* imaju linearnu dsDNK. Zavisno od rasporeda kapsomera oko nukleinske

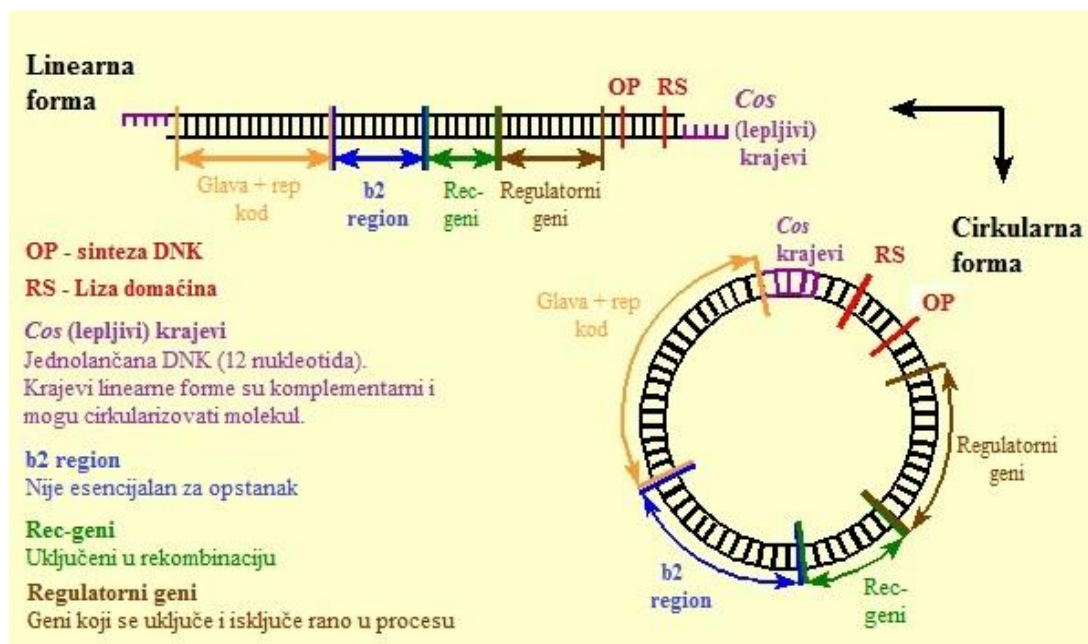
kiseline, nukleokapsid može imati nekoliko različitih tipova simetrije. Fagi iz reda *Caudovirales*, uključujući i fage familije *Siphoviridae*, imaju kompleksnu, odnosno binarnu simetriju (Knežević, 2012). Kod bakteriofaga sa kompleksnom (binarnom) simetrijom možemo razlikovati nekoliko komponenti: glava, koja je kubične (ikozaedarne) simetrije, rep, kragna (okovratnik), bazalna ploča i terminalne fibrile (Sabour i Griffiths 2010; Madigan et al, 2012). Rep, koji je dug, fleksibilan i nekontraktilan organizovan je potpuno drugačije od glave (nukleokapsida). On je praktično šuplja cev određene dužine i širine izgrađena od promenljivog broja redova od podjedinica (Slika 10) (Eiserling, 1983; Katsura, 1983; Lengyel et al, 1974; Mazz i Felluga, 1973). Glava i rep su pričvršćeni preko malog diska koji počinje sa unutrašnje strane glave do konekcije sa repom. Disk se zove konektor ili portalni protein oligomer (Valpuesta i Carrascosa, 1994). Fagi sa repom su relativno veliki virusi čiji je kapsid otprilike iste veličine kao adeno i reovirusi. Uglavnom im se dimenzije glave kreću između 34 i 160 nm, ali je najčešće oko 60 nm. Za familiju *Siphoviridae* veličina glave se kreće između 47 i 97 nm, a prosečno je oko 55 nm. Dužina repa kreće se između 79 i 539 nm, u proseku oko 191 nm (Murphy et al, 1995).



Slika 10. Šematski prikaz građe bakteriofaga λ iz familije *Siphoviridae*
(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/142.html)

2.4.2.2. KARAKTERISTIKE GENOMA FAMILIJE *Siphoviridae*

Genom faga sa repom čini jedan linearan molekul dsDNK (Sekaninova et al, 1994). Veličine DNK ovih faga se kreću između 17 i 725 kb (Ackermann i DuBow, 1987b). Sadržaj parova guanina i citozina (GC) faga sa repom obično odgovara onom kod njihovih domaćina. Kreće se u širokom rasponu kao i kod herpesvirusa (32-75 %, Roizman i Sears, 1996). Ovi fagi poseduju mnoge specifičnosti u građi ili sastavu genoma: cirkularne permutacije, terminalne ponovke, *cos* i *pac* mesta, terminalne proteine, jednolančane rupe, modifikacije baza i DNK-vezanih šećera. *Cos* mesta ili kohezivni krajevi su lepljivi DNK produžetci od 7 do 21 nukleotida koji omogućavaju da se genom faga cirkularizuje nakon infekcije, takođe imaju ulogu i u DNK pakovanju (Slika 11) (Lillehau et al, 1991; Lubbers et al, 1994). Kombinacija cirkularne permutacije i terminalnih ponovaka generalno, ali ne i uvek, ukazuje na postojanje *pac* mesta za inicijaciju DNK pakovanja. *Pac* mesto ukazuje na replikaciju DNK u vidu konkatamera (jedan konkatamer se sastoji od velikog broja genoma faga) i na "headfull" mehanizam pakovanja, koji podrazumeva pakovanje DNK faga dok se glava kapsida ne napuni, što iznosi više od 100% genoma, pri čemu su geni takve DNK cirkularno permutovani. Fagi sa *pac* mestima mogu biti virulentni ili umereni. Nasuprot tome, fagi sa *cos* mestima su generalno umereni i nikad nemaju cirkularne permutacije i terminalne ponovke (Moynet et al, 1985). Modifikovane baze mogu zameniti obične baze potpuno ili delimično. Njihova uloga je da zaštite infektivnu DNK faga od degradacije bakterijskim restriktivnim endonukleazama (Stolt et al, 1994).



Slika 11. Šematski prikaz funkcionalnih delova genoma bakteriofaga λ (familija *Siphoviridae*)
 (Izvor: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/>)

Fagi familije *Siphoviridae* uglavnom imaju genom veličine 35 do 70 kbp smešten u ikozaedarnom kapsidu (Ackermann, 1998; Hatfull et al, 2010). Premda je fag lambda, član ove porodice, jedan od najproučavanijih model mikroorganizama i dalje nije poznato koji geni su ključni za ove fage, a koji nisu. Pokušaj da se odredi minimalni funkcionalni genom *Siphoviridae* dodatno komplikuje i to da poznati genomi pokrivaju širok raspon veličina (16.9 kb do preko 121 kb), nedostatak genske konzervacije između faga (Brüssow i Desiere, 2001) i specifičnosti DNK pakovanja, pa je time ograničena mogućnost pravljenja delecionih mutanata (Catalano et al, 1995).

2.5. ULOGA BAKTERIOFAGA U PATOGENOSTI BAKTERIJA

Većina gena koji kodiraju faktore virulencije bakterija smešteno je na različitim mobilnim genetskim elementima, DNK sekvencama koje mogu da menjaju mesto unutar genoma. U njih spadaju transpozoni (sekvence koje mogu da menjaju mesto u genomu najčešće dovodeći do reverznih mutacija), plazmidi (fizički odvojene sekvence od hromozoma koje se nezavisno replikuju), ostrva patogenosti (posebna grupa genomskih ostrva karakteristična za bakterije koja se stiču putem horizontalnog transfera gena) i bakteriofagi (virusi koji inficiraju bakterije unutar kojih se replikuju). U vezi sa tim, evidentno

je da bakteriofagi kao grupa mobilnih genetskih elemenata, imaju značajnu ulogu u evoluciji patogenih bakterija. Prvi podaci o ulozi bakteriofaga u patogenosti bakterija datiraju još iz 1927. godine kada su Frobisher i Brown otkrili da netoksigena streptokoka nakon izlaganja profiltriranom supernatantu toksigene kulture streptokoka stiču sposobnost produkcije toksina (Frobisher i Brown, 1927).

Bakteriofagi mogu prenositi bakterijsku DNK u procesu poznatom kao transdukcija, koja može biti generalizovana i specijalizovana. Na ovaj način fagi mogu prenositi bakterijske gene važne u patogenosti. Sa druge strane, određeni toksini mogu biti kodirani genomom faga, pa nakon infekcije fagom bakterija ima veću toksičnost, adhezivnost i/ili invazivnost. Ovaj fenomen se naziva lizogena konverzija fagom. Vremenom je pronađeno da su mnogi toksini kodirani fagima i uloga faga u patogenosti bakterija i dalje se proučava, sa akcentom na širenje gena koji kodiraju toksine među bakterijskim sojevima (Bishai i Murphy, 1988; Groman, 1984).

Koevolucija bakterija i faga ima značajnu ulogu u oblikovanju mikrobnog diverziteta (Weinbauer i Rassoulzadegan, 2004, Avrani et al, 2011). Evolucija bakterija je otpočela mnogo pre postanka životinja. Ustvari, one su bile prvi, a neko vreme i jedini stanovnici Zemlje. Dakle, rana evolucija podrazumevala je kompeticiju, razmenu gena i selekciju samo između bakterija. Pretpostavlja se da su fagi učestvovali u ranoj evoluciji bakterija. Fagi nemaju fosilnih ostataka i nemaju molekularni sat. Analiza DNK sekvenci i poređenje sekvenci između postojećih faga je trenutno jedini način koji pruža uvid u evoluciju faga.

Tokom poslednje decenije, broj sekvenciranih genoma je drastično porastao; preko 5000 genoma faga danas je dostupno u banci gena (NCBI genomskoj bazi podataka). Za genome faga je pre svega karakterističan visok stepen genetičkog diverziteta. Drugo, arhitektura genoma je mozaična, što se javlja kao posledica neobično visokog stepena horizontalnog transfera gena u njihovoj evoluciji. I na kraju, genomi faga sadrže mnogo genetskih sekvenci nepoznate funkcije, te stoga predstavljaju najveći rezervoar neistraženih gena.

Bakterije, za razliku od eukariota, nemaju polno razmnožavanje koje bi im omogućilo razmenu alela unutar populacije. Kod bakterija razmena genetskog materijala se postiže horizontalnim transferom gena: na ovaj način cele funkcionalne jedinice mogu biti prenete sa jedne bakterije na drugu, pri čemu prenos nije ograničen barijerom vrste. Veličina DNK koja se prenosi na ovaj način može biti u širokom opsegu, manje od 1 do preko 100 kb.

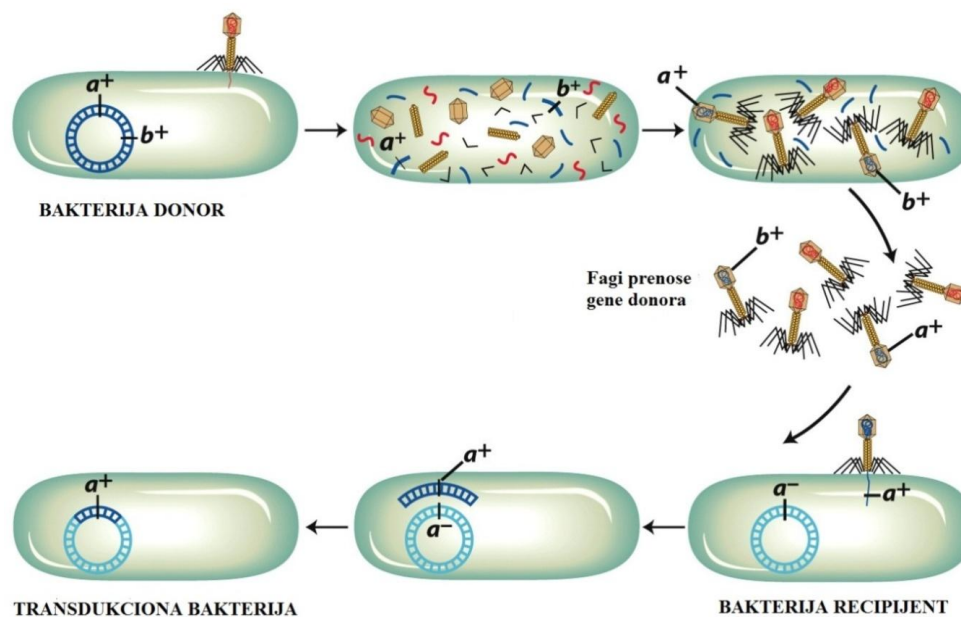
Primljena DNK iz drugih izvora može da kodira čitave metaboličke puteve ili kompleksne površinske strukture. DNK može biti usvojena kao u procesu transformacije direktno iz spoljašnje sredine ili prenešena putem konjugacije. Pored toga i transpozabilni genetički elementi imaju ulogu u ovim procesima. Pored navedenih procesa, bakteriofagi su značajni prenosioci gena kod bakterija (Smoot et al, 2002).

Horizontalni transfer gena posredstvom bakteriofaga nastaje putem transdukcije ili lizogene konverzije (Bushman, 2002).

2.5.1. TRANSDUKCIJA

Transdukcija je proces prenošenja genetskog materijala sa jedne bakterije na drugu posredstvom bakteriofaga. Transdukcija se može vršiti kao generalizovana ili specijalizovana (Petrović et al, 2007).

Generalizovana transdukcija podrazumeva prenošenje bilo kojeg dela DNK domaćina posredstvom bakteriofaga. Prilikom sazrevanja faga u ćeliji domaćina, greškom se u kapsid faga može upakovati deo DNK bakterije umesto virusne. Virion koji nastaje na ovaj način naziva se transdukciona partikula i on se nakon lize bakterijske ćelije oslobađa zajedno sa ostalim virionima koji nose DNK faga. Transdukciona partikula je infektivna i može inficirati novu bakterijsku ćeliju. Kao rezultat infekcije ovakvim virionom ne dolazi do lize bakterijske ćelije, pošto u bakterijsku ćeliju ne penetrira DNK faga, već DNK prethodnog domaćina. Pošto transdukujuća partikula ne uzrokuje normalnu virusnu infekciju naziva se i defektni fag. DNK prethodnog domaćina se ne replikuje, već se rekombinuje sa genetskim materijalom novog domaćina (Slika 12). Bakteriofagi sposobni za generalizovanu transdukciju mogu biti i litički i lizogeni, ali mehanizam pakovanja DNK domaćina u kapsid je isti u oba slučaja. Veličina DNK molekula koja može da se prenese fagom ograničena je veličinom kapsida, a verovatnoća da transdukujuća partikula sadrži neki određeni gen je jako mala - $1:10^6-10^8$ (Petrović et al, 2007). Postoje brojni primeri gde bakteriofagi putem generalizovane transdukcije prenose gene od značaja za bakterijsku patogenost. Tako npr. fagi streptokoka mogu da prenose rezistenciju na različite antibiotike (tetraciklini, hloramfenikol, makrolidi, linkomicin, klindamicin i streptomycin) putem generalizovane transdukcije (Ubukata et al, 1975; Hyder i Streitfeld, 1978).

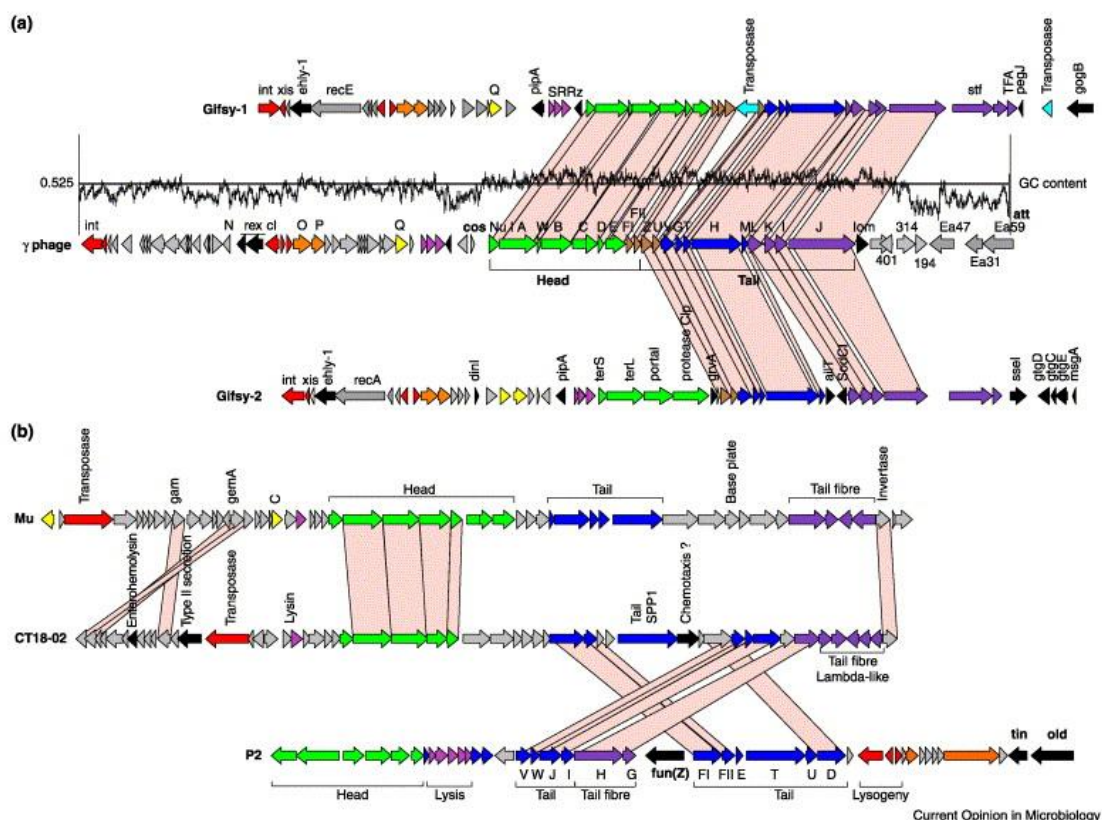


Slika 12. Transdukcija, tj. prenos DNK bakterije posredstvom bakteriofaga
(Izvor: <http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=5152>)

Specijalizovana transdukcija podrazumeva prenos tačno određenog segmenta DNK domaćina posredstvom umerenog bakteriofaga. Ovaj način transdukcije otkriven je kod *E. coli*, a vrši se putem λ faga, koji se integriše u genom bakterija na tačno određenom mestu, odmah pored gena koji kodira enzim za usvajanje galaktoze. DNK takvog faga se replikuje zajedno sa bakterijskim genomom do momenta indukcije, kada se DNK faga iseca iz genoma. Može se desiti da se DNK faga iseče pogrešno, tako da se pored DNK faga iseče i deo DNK domaćina, koja nosi određene gene (u slučaju λ faga galaktozni operon, koji nosi gene za usvajanje galaktoze) (Petrović et al, 2007).

2.5.2. HORIZONTALNI TRANSFER GENA IZMEĐU FAGA

Faktori virulencije bakterija mogu se prenositi između faga koji pripadaju različitim grupama čime se povećava horizontalni transfer gena između bakterija (Desier et al, 2002; Miroid et al, 2001). Analize sekvencioniranih genoma nekih kolifaga takođe su ukazale da se velike grupe, tj. čitavi klasteri gena mogu prenositi između različitih grupa faga. Različiti sadržaj GC parova na levoj i desnoj strani genoma lambda faga ukazuje na himeričnu prirodu faga i horizontalni transfera gena (Slika 13).



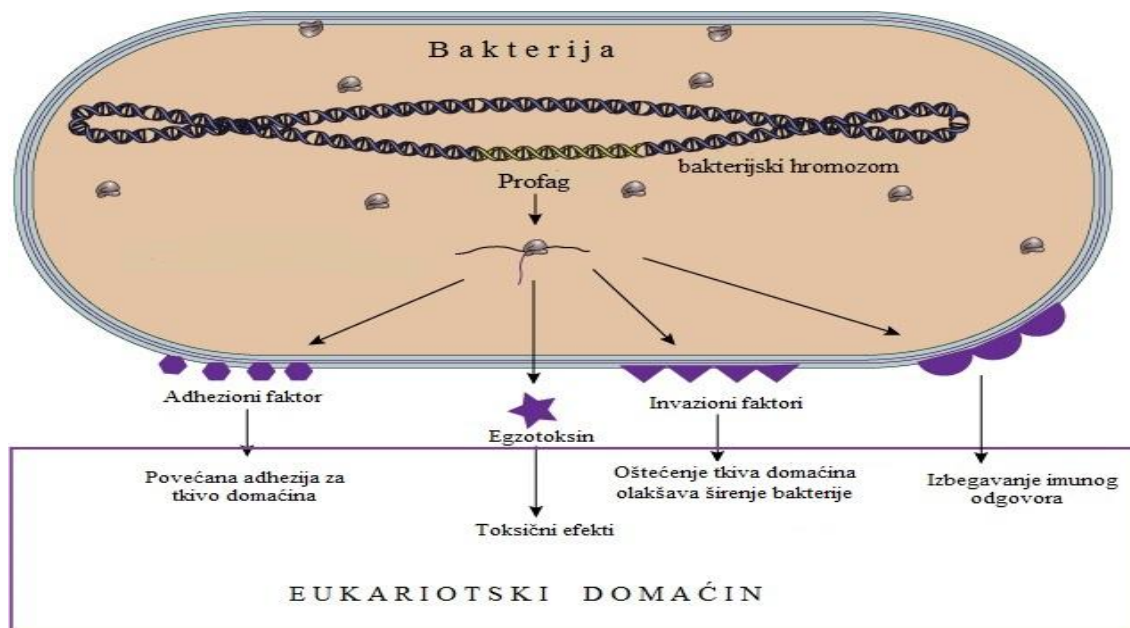
Slika 13. Prikaz himerične prirode nekih faga nastalih putem horizontalnog transfera gena; (a) Poravnanje nukleotidne sekvence *Salmonella* Gifsy-1 i Gifsy-2 faga sa λ fagom vrste *E. coli*; (b) poravnanje nukleotidne sekvence *Salmonella* profaga CT18-20 sa fagima Mu i P2 (Moreno-Switt et al, 2013).

Mozaična struktura genoma faga je veća kod onih koji inficiraju Gram negativne bakterije u odnosu na fage koje inficiraju Gram pozitivne (Brussow i Desiere, 2001). Najnoviji podaci sekvenciranja genoma faga ukazali su na postojanje hibrida između faga različitih rodova, familija, pa čak i između umerenih i obligatno litičkih faga (Chanchaya et al, 2003; Allison et al, 2002). Ovi podaci uneli su konfuziju u već jasno definisane grupe faga i taksonomiju faga uopšte (Lawrence et al, 2002).

2.6. ULOGA BAKTERIOFAGA U LIZOGENOJ KONVERZIJI BAKTERIJA

Umereni bakteriofagi mogu bakterijskoj ćeliji da obezbede nove osobine, ekspiriranjem virusnih gena ili ugradnjom u bakterijske gene koji zatim gube funkciju, a samim tim gubi se i odgovarajuća karakteristika bakterija. Tako npr. bakteriofag β obezbeđuje produkciju toksina bakterije *Corynebacterium diphtheriae*, dok fag L54a

uzrokuje gubitak lipolitičke aktivnosti bakterije *Staphylococcus aureus*. Ove promene osobina bakterija, koje su rezultat infekcije fagom, označavaju se kao lizogena koverzija fagom (Slika 14) (Knežević, 2012).



Slika 14. Lizogena konverzija - bakterijska ćelija dobija nove osobine uslovljene prisustvom profaga (Izvor: http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/3965.html)

Egzistencija profaga ne bi bila značajna za evoluciju patogenih bakterija da fagi ne prenose korisne gene lizogenu. Poznato je da neki geni faga povećavaju preživljavanje lizogena. Represija i isključivanje infektivnih funkcija faga doprinose selektivnoj prednosti lizogena, jer sprečavaju ulazak faga u litički ciklus (Bossi et al, 2003).

Jedan od najpoznatijih primera faktora virulencije kodiranih od strane faga su egzotoksini. Upravo ovi faktori predstavljaju jedan od glavnih mehanizama patogenosti različitih bakterijskih patogena, uključujući *V. cholerae*, *C. diphtheriae* i *Clostridium botulinum* (Boyd, 2001). Ovi toksini su funkcionalno različiti, a uključuju neke od najpotentnijih toksina ikada opisanih, kao što su tetanus, botulinum i difterija toksin, koji su kodirani profagima vrsta *Clostridium tetanii*, *C. botulinum* i *Corynebacterium diphtheriae*. Analize genoma faga pokazale su da se geni za toksine kod *C. diphtheriae* i *S. pyogenes* nalaze blizu mesta u genomu faga kojim se on integriše u DNK bakterije (*att* mesto). Ova specifična lokacija je uslovlila hipotezu da ovi geni profaga ustvari predstavljaju bakterijske gene, koji su stečeni neispravnom ekscizijom iz prethodnog bakterijskog domaćina. Nekada ovi geni i dalje pokazuju jasnu razliku u procentualnoj zastupljenosti GC parova, što ukazuje na

drugačije poreklo ovih delova DNK (Ferretti et al, 2001). Egzotoksini kodirani fagima mogu se podeliti na enterotoksine, neurotoksine i citotoksine. Ovi toksini omogućavaju bakterijama da izazovu čitav niz poremećaja i bolesti koje se kreću od blagih gastrointestinalnih poremećaja do ozbiljnih stanja, kao što su sepsa i toksikemija. Tako npr. enterohemolizin *Escherichia coli* serotipa O157 :H7 i šiga toksin kodirani su λ fagima (Wagner et al, 1991; Johansen et al, 2001). Jedan od svakako najpoznatijih primera toksina kodiranih genomom faga jeste kolera toksin vrste *Vibrio cholerae*. Ovaj toksin kodiran je čuvenim ϕ CTX filametoznim fagom. DNK ovog faga može biti integrisana na jednom ili čak dva mesta u genomu bakterije (Mekalanos, 1983).

Pored toksina koji mogu biti kodirani od strane faga, neki naučnici su ukazali na moguću ulogu faga u regulaciji ekspresije nekih gena, koji su uključeni u patogenost bakterija. Tako npr. agensi koji izazivaju indukciju faga kao što su mitomicin C, povećavaju produkciju šiga toksina (Stx) vrste *E. coli*. Kasnije je dokazano da povećanoj produkciji Stx od strane *E. coli* inficirane fagom koji kodira taj toksin, prethodi povećana ekspresija gena koji kodira antiterminator (Al-Jumaili et al, 1992; Neely i Friedman, 1998).

Fagi mogu da utiču na patogenost bakterije tako što povećavaju transmisiju bakterija, a primer za to je kolera toksin, koji povećava adenilat-ciklaznu aktivnost enterocita i dovodi do profuznih dijareja za koje se smatra da značajno doprinose fekalno-oralnoj transmisiji vrste *Vibrio cholerae*. Pošto je gen kolera toksina kodiran genomom faga, ovaj sistem je dobar primer doprinosa bakteriofaga transmisiji svog domaćina, tj. *V. cholerae* među ljudima.

Bakteriofagi mogu prenositi i druge faktore virulencije. Figueroa-Bossi i Bossi (1991) su pokazali da izolati *S. Typhimurium* koji imaju Gifsy-2 fag u formi profaga u genomu, pokazuju različit fenotip u odnosu na sojeve koji nemaju Gifsy-2. Ovaj profag kodira gen za superoksid dismutazu, sodC, koji ima ulogu u virulenciji. Bakteriofag λ i njemu srodni fagi kodiraju proteine na spoljašnjoj membrani bakterija, koji su važni za bakterijsku otpornost na urođen imuni sistem, kao što je sistem komplementa (Barondess i Beckwith, 1990). Zanimljivo je da nedavni podaci ukazuju na to da VPI ϕ *Vibrio cholerae* bakteriofag kodira pile koje imaju ulogu u kolonizaciji (Karaolis et al, 1999).

Fagi mogu igrati značajnu ulogu u prvim fazama bakterijske infekcije, koje podrazumevaju adheziju, kolonizaciju i invaziju bakterije. Tako npr. bakteriofagi vrste *Streptococcus mitis* učestvuju u adheziji bakterije domaćina, a ovaj fenomen su opisali

Bensing i et al, (2001). Oni su identifikovali dva proteina PblA i PblB, čiji geni imaju sličnost sa sekvencama koje kodiraju proteine kapsida i repa. Delecijom gena koji kodiraju ove proteine (*pblA* i *pblB*) smanjuje se adhezivna sposobnost bakterije.

U procesu invazije humanih i animalnih tkiva bakterije koriste spektar enzima, od kojih su najvažniji kolagenaza, hijaluronidaze i hemolizin. Tako npr. vrsta *Salmonella* Typhimurium poseduje gene koji kodiraju tip III sekretorni sistem, koji ubacuje efektivne proteine direktno u citoplazmatsku membranu domaćina (Hueck, 1998). Jedan od najpoznatijih efektivnih proteina je svakako SopE koji aktivira humanu Rho GTP-azu i na taj način omogućava nesmetani ulazak bakterije u ćelije. Gen koji kodira SopE (*sopE*) nalazi se u genomu umerenog bakteriofaga, koji je označen kao SopEφ.

Tokom infekcije, bakterije dolaze u kontakt sa serumom i fagocitima i drugim elementima koji su sastavni deo urođenog imunog sistema domaćina. Unutar fagocita bakterije se nalaze pod velikim oksidativnim stresom koji se javlja usled produkcije superoksid radikala od strane ćelijskih organela. Opstanak bakterije u ovakvim uslovima zavisi od produkcije enzima kao što su npr. superoksid dismutaze, koje katališu konverziju superoksidnih anjona do vode i kiseonika. Figueroa-Bossi i Bossi (2001) su pokazali da je superoksid dismutaza (SodC) vrste *S. Typhimurium* kodirana genomom bakteriofaga.

Primeri faktora virulencije kodiranih od strane umerenih bakteriofaga prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Faktori virulencije Gram negativnih bakterija kodirani od strane umerenih bakteriofaga (Boyd, 2001)

Vrsta bakterije	Bakteriofag	Faktor virulencije (gen)	Faktor virulencije (protein)	Referenca
<i>Escherichia coli</i>	λ	OMP (<i>lom</i>)	Proteini koji učestvuju u adheziji za domaćina	Pacheco et al, 1997
<i>Vibrio cholerae</i>	VPI φ	TCP pilin (<i>tcp</i>)		Karaolis et al, 1999
<i>Salmonella enterica</i>	ε ³	O-antigen (<i>rfb</i>)		Wright et al, 1971
<i>Salmonella enterica</i>	P22	O-antigen (<i>gtr</i>)	Proteini koji menjaju prepoznavanje antigena	Vander Byl i Kropinski, 2000
<i>Shigella flexneri</i>	Sf6	O-antigen (<i>oac</i>)		Clark et al, 1991
<i>Shigella flexneri</i>	SfII, SfV, SfX	O-antigen (<i>gtrII</i>)		Allison i Verma, 2000
<i>Salmonella enterica</i>	SopEφ	Efektor tipa III (<i>sopE</i>)	Proteini koji učestvuju u ćelijskoj invaziji	Mirold et al, 1999
<i>Salmonella enterica</i>	Gifsy-1	Efektor tipa III (<i>gogB</i>)		Figueroa-Bossi et al, 2001
<i>Salmonella enterica</i>	Gifsy-1	IS-slična sekvenca		Figueroa-Bossi et al,

		(gipA)	2001
<i>Salmonella enterica</i>	Gifsy-2	Efektor tipa III (<i>gtgB</i>)	Figueroa-Bossi et al, 2001
<i>Salmonella enterica</i>	Gifsy-3	Efektor tipa III (<i>sspH1</i>)	Figueroa-Bossi et al, 2001
<i>Escherichia coli</i>	λ	OMP (<i>bor</i>)	Barondess liBeckwith, 1990
<i>Escherichia coli</i>	λ	OMP (<i>eib</i>)	Sandt Et al, 2002
<i>Escherichia coli</i> O157	Sp4, 10	Superoksid dismutaza (<i>sodC</i>)	Proteini neophodni za intraćelijsko preživljavanje
<i>Salmonella enterica</i>	Gifsy-2	Superoksid dismutaza (<i>sodCI</i>)	Ohnishi et al, 2001
<i>Salmonella enterica</i>	Fels-1	Superoksid dismutaza (<i>sodCIII</i>)	Figueroa-Bossi et al, 2001
<i>Clostridium botulinum</i>	C1	Neurotoksin (<i>ct1</i>)	Barksdale i Arden, 1974
<i>Escherichia coli</i>	H-19B	Šiga toksin(<i>stx</i> 1,2)	O'Brien et al, 1984
<i>Escherichia coli</i>	øFC3208	Enterohemolizin (<i>hly</i>)	Beutin Et al, 1993
<i>Vibrio cholerae</i>	øCTX	Citotoksin (<i>ctx</i>)	Nakayama et al, 1999
<i>Vibrio cholerae</i>	CTXø	Kolera toksin (<i>ctxAB</i>)	Egzotoksini Waldor i Meklanos, 1996
<i>Vibrio cholerae</i>	CTXø	Ace toksin (<i>ace</i>)	Trucksis et al, 1993
<i>Vibrio cholerae</i>	CTXø	ZOT toksin (<i>zot</i>)	Fasano et al, 1991
<i>Salmonella enterica</i>	Fels-1	Neuraminidaze (<i>nanH</i>)	Figueroa-Bossi et al, 2001
<i>Salmonella enterica</i>	Gifsy-1,2	Hemolizin (<i>ehly</i>)	McClelland, 2001
<i>Salmonella enterica</i>	Gifsy-1,2	Serum-rezistentni protein (<i>ail</i>)	McClelland, 2001
<i>Salmonella enterica</i>	Gifsy-2, Fels-1	Antivirulentni gen (<i>grvA</i>)	Pretpostavljeni faktori virulencije
<i>Vibrio cholerae</i>	K139	G-protein sličan (<i>glo</i>)	Ho i Slauch, 2001 Redl i Makalanos, 1995

2.7. PRIMENA BAKTERIOFAGA KAO ANTIMIKROBNIH AGENASA

Razmatranje upotrebe bakteriofaga kao antimikrobnih agenasa datira još od momenta njihovog otkrića (Sulakvelidze et al. 2001; Kutter i Sulakvelidze 2004). Prvi koji je primenio bakteriofage kao antimikrobne agense bio je naučnik Felix d'Herelle, koji je ujedno i zaslužan za njihovo otkriće. D'Herelle je 1919. godine prvi put primenio bakteriofage u terapiji pacijenta obolelog od dizenterije u pariskoj bolnici. Posle samo jedne aplikacije

bakteriofaga, pacijent se oporavio u toku 24 h. Međutim on nije objavio rezultate svog ispitivanja, da bi 2 godine kasnije Richard Bruynoghe i Joseph Maisin objavili izveštaj o upotrebi bakteriofaga u terapiji oboljenja kože uzrokovanog stafilkokama. Bez obzira što nije objavio rezultate svoje prve primene bakteriofaga, d'Herelle nije prestao sa daljim istraživanjima primene bakteriofaga u terapiji. On je ispitivao primenu bakteriofaga u terapiji infekcija živine izazvane vrstom koja se tada zvala *Bacillus gallinarum*, danas poznatom pod imenom *Salmonella Gallinarum*, koja je uzročnik ptičije tifoze. Rezultati upotrebe su pokazali smanjenje stope smrtnosti, a objavljene rezultate 1921. godine kasnije su potvrdili holandski naučnici. Ispitivanja bakteriofaga su kasnije vršena širom sveta, a jedan od najznačajnijih je upotreba bakteriofaga od strane d'Herelle u lečenju pacijenata obolelih od bubonske kuge u Egiptu 1925. godine. Nakon aplikacije bakteriofaga u limfne čvorove došlo je do potpunog oporavka pacijenata. Interes upotrebe bakteriofaga je rastao i našao primenu u II svetskom ratu, kako od strane ruskih, tako i nemačkih vojnika. Do naglog smanjenja interesa primene bakteriofaga, pa samim tim i istraživanja vezanih za njihovu primenu, dovelo je otkriće antibiotika i početak antibiotske ere (Sulakvelidze et al. 2001; Kutter i Sulakvelidze 2004). Ipak, istraživanja vezana za primenu faga nastavila su da se sprovode na nekim mestima u svetu. Tako je npr. sredinom prošlog veka, Pasterov Institut iz Pariza proizvodio fage za lečenje infekcija izazvanih bakterijama *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* itd. Pored toga, Švajcarska je takođe proizvodila preparate na bazi bakteriofaga, dok su SAD proizvodile vakcine od lizata pojedinih bakterija, koje se i danas uspešno koriste u vakcinaciji životinja. Najveći deo istraživanja vezanih za izolaciju i primenu faga sproveden je na Eliava Institutu u Tbilisiju (Gruzija) i u manjoj meri i na Hirsfeld Institutu u Wroclaw-u (Poljska) (Knežević, 2012). Interes za primenu bakteriofaga kao antimikrobnih agenasa u poslednjih nekoliko decenija naglo raste usled sve većeg broja bakterija koje ispoljavaju rezistentnost na mnoge antibiotike. Širom sveta, sve veći broj naučnika ispituje potencijal upotrebe bakteriofaga kao antimikrobnih agenasa u medicini, veterini, prevenciji formiranja biofima, ribarstvu, prehrambenoj i drugim granama industrije. Najveći fokus trenutnih istraživanja je usmeren ka patogenima rezistentnim na različite antibiotike i koji uzrokuju teška oboljenja sa visokom stopom smrtnosti. Takođe, danas se istraživanja sprovode kako *in vitro* tako i *in vivo*, na životinjama i ljudima. Najveći broj istraživanja izvršen je na fagima patogenih bakterija koje izazivaju gastrointestinalne poremećaje, u prvom redu *E. coli*, a zatim i *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae* itd. (Smith i Huggins, 1982; Berchieri et al, 1991;

Sarkar et al, 1996; Biswas et al, 2002). Istraživanja vezana za kolifage pokazala su veoma visoku efikasnost ovih faga u lečenju septikemija i meningitisa. Kada se primene u visokoj dozi (10^6 viriona i više), bakteriofagi imaju isti efekat kao i antibiotici (Barrow et al, 1998). Berchieri i sar. (1991) su ustanovili da bakteriofagi vrste *Salmonella enterica* serotip Typhimurium perzistiraju u digestivnom traktu eksperimentalnih životinja onoliko dugo koliko i sama bakterija.

Pored velikih prednosti postoje i nedostaci upotrebe bakteriofaga kao antimikrobnih agenasa. Najveći problem jeste što su potrebna dugotrajna ispitivanja bakteriofaga da bi se otkrile njihove osobine. Pored toga, postoje problemi pojave otpornosti bakterije na bakteriofage, mogućnost ugrađivanja bakteriofaga u genom bakterije i pojava novih osobina bakterija, koje mogu povećati virulentnost. Pojavom sve savremenijih metoda ti problemi će biti prevaziđeni i upotreba bakteriofaga će biti bezbedna. Danas već postoji nekoliko komercijalnih proizvođača koji su patentirali bakteriofage kao lekove. Upporedni pregled delovanja bakteriofaga i antibiotika prikazan je u tabeli 3 (Inal, 2003; Brussow 2005; Stenholm et al, 2008; Fu et al, 2010; Sabour i Griffiths 2010).

Jedna od glavnih prednosti faga u odnosu na antibiotike jesu minimalni neželjeni efekti. Za razliku od mnogih antibiotika za koje je dokazano da su toksični, mutageni ili teratogeni (npr. aminoglikozidi, fluorohinoloni i sl.) ili dovode do drugih neželjenih efekata tipa preosetljivosti i anafilaktičkog šoka (npr. β -laktami), bakteriofagi nemaju neželjena delovanja ili su ona minimalna. Iz navedenih razloga, kombinovana primena faga i subinhibitornih koncentracija antibiotika je razmatrana u nekoliko studija i utvrđeno je postojanje sinergizma između faga i određenih antibiotika. Sinergizam između faga i antibiotika predstavlja fenomen gde subinhibitorne koncentracije antibiotika u kombinaciji sa fagima imaju bolji efekat nego kada se agensi primene pojedinačno, najčešće tako što antibiotici doprinose produkciji faga (Ryan et al, 2012). Knezevic i sar. (2013) su utvrdili postojanje sinergističkog efekta između *Pseudomonas* σ -1 sifovirusa i subinhibitornih koncentracija ceftriaksona, koji je uspešno redukovao bakterijski rast. Druga grupa naučnika, Ryan i sar. (2012) je utvrdila da kombinovana upotreba T4 faga i subinhibitornih koncentracija cefotaksima uspešno redukuje rast *E. coli* biofilma.

Za razliku od bakteriofaga humanih patogena, prvenstveno predstavnika rodova *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Vibrio* itd. koji su dobro proučeni, o

bakteriofagima animalnih i oportunističkih patogena postoji mali broj literaturnih podataka (Loc-Carrillo i Abedon, 2011; Sulakvelidze et al, 2001; Knezevic et al, 2009; Chan et al, 2013).

Tabela 3. Prednosti i nedostaci upotrebe bakteriofaga i antibiotika (na osnovu Sulakvelidze et al, 2001).

Bakteriofagi	Antibiotici
Litički fagi uvek ispoljavaju baktericidni efekat.	Neki antibiotici ispoljavaju samo bakteriostatski efekat.
Veoma specifični (uglavnom inficiraju ciljnu bakterijsku vrstu), pa ne dolazi do sekundarnih infekcija.	Antibiotici uništavaju patogene mikroorganizme, ali i mikrobionte, što može dovesti do ozbiljnih sekundarnih infekcija.
Replikuju se na mestu infekcije i tako su dostupni gde su najpotrebniji.	Metabolišu se i eliminišu iz tela i ne zadržavaju se uvek na mestu infekcije.
Veoma efikasni u prevenciji i uklanjanju biofilma zbog posedovanja enzima tipa depolimeraza koji omogućavaju penetraciju faga unutar biofilma.	Biofilmovi su uglavnom rezistentni na antibiotike zbog otežanog prolaska antibiotika unutar biofilma.
Zbog svoje visoke specifičnosti, ispoljavaju minimalan efekat na mikrobionte crevnog trakta.	Antibiotici su šireg spektra delovanja zbog čega uništavaju i komensale crevnog trakta i dovode do bakterijskih superinfekcija i kandidoza.
Nisu opisane nikakve nuspojave.	Primećene su mnoge nuspojave, uključujući intestinalne poremećaje, alergije i sekundarne infekcije.
Bakterija otporna na jedne bakteriofage je osetljiva na infekciju drugim fagima.	Otpornost na antibiotike nije ograničena na ciljnu bakteriju.
Odabir novih bakteriofaga je relativno brz proces koji često može biti izvršen u roku od nekoliko dana ili nedelja.	Razvoj novih antibiotika protiv rezistentnih bakterija može da traje i nekoliko desetina godina.

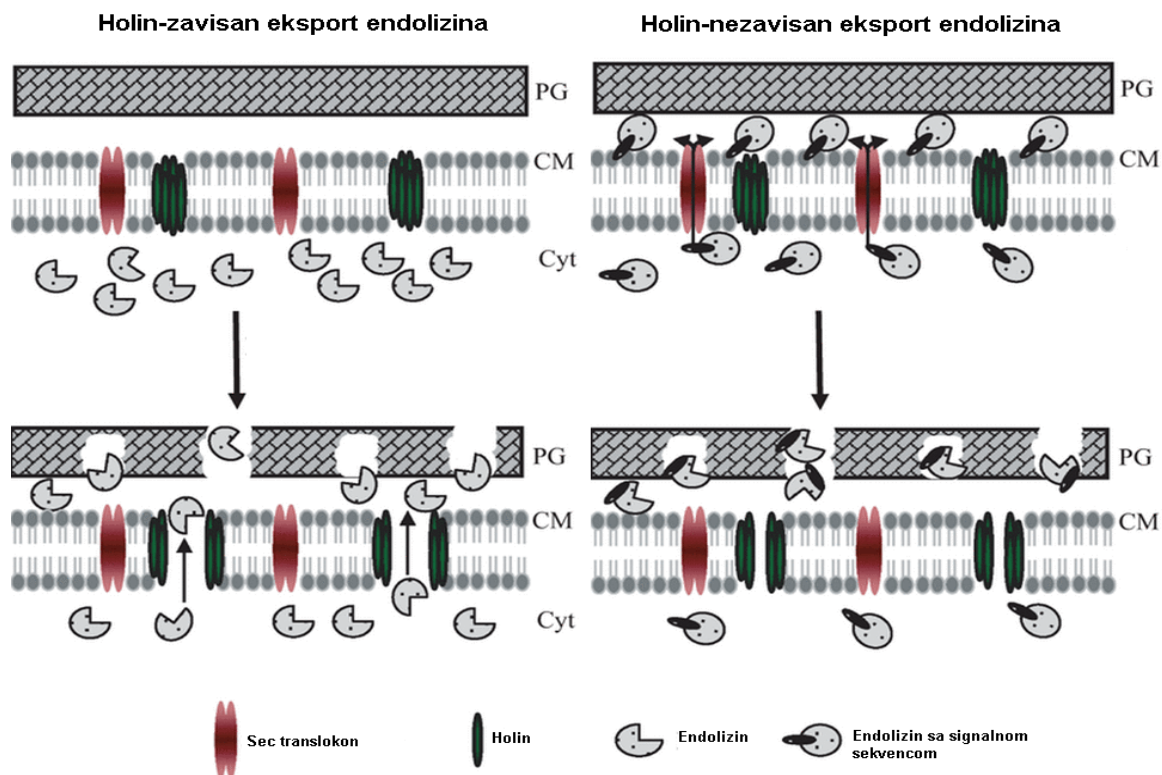
2.8. ENDOLIZINI BAKTERIOFAGA I NJIHOV ANTIMIKROBNI POTENCIJAL

S obzirom na visok stepen rezistencije bakterija na konvencionalne antibiotike, neprestano se traga za novim antimikrobnim agensima. Pored celih viriona, čiji se antimikrobni potencijal intezivno ispituje, enzimi bakteriofaga, a posebno endolizini (lizini), aktivno se proučavaju poslednjih nekoliko decenija. Ovi enzimi razgrađuju kovalentne veze u peptidoglikanu (PG) bakterijske ćelije tokom liberacije, pa se nazivaju još i peptidoglikan

hidrolaze. Enzimi sa sličnom funkcijom pronađeni su i kod bakterija (bakteriocini i autolizini) i telesnim tečnostima životinja (lizozim). S obzirom da se sintetšu u samoj ćeliji i deluju na PG iz same ćelije, nazivaju se još i endolizini. Važno je naglasiti da ovi enzimi mogu da vrše hidrolizu PG i u slučaju kada se primene egzogeno (Schmelcher et al, 2013). Uzimajući u obzir gore navedene činjenice, evidentno je da ovi enzimi imaju antimikrobni potencijal, zbog čega su svi oni dobili zajedničko ime - enzibiotici (Nelson et al, 2001).

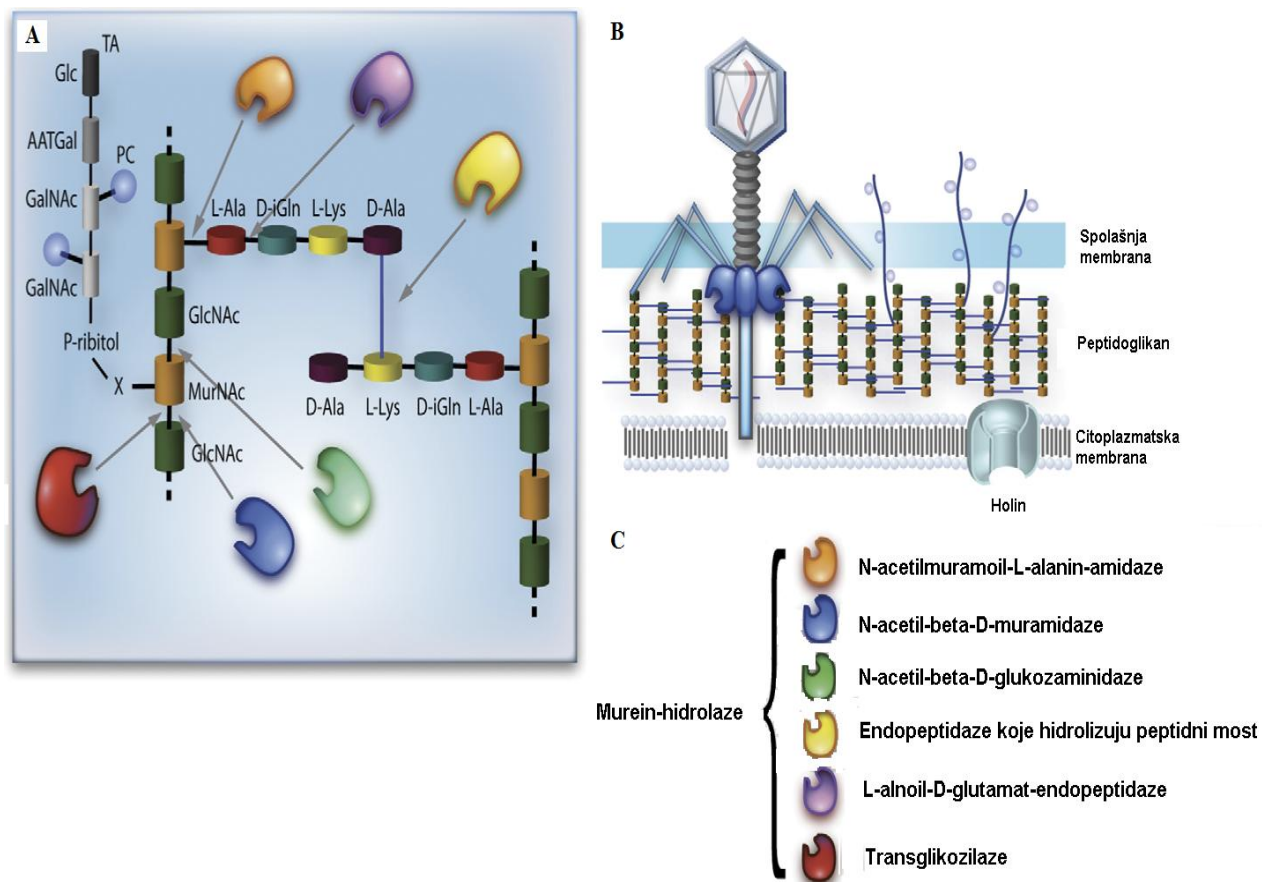
Do nedavno je primena endolizina kao antimikrobnih agenasa bila ograničena na Gram pozitivne patogene, čiji PG nije zaštićen dodatnim spoljašnjim omotačem, kao što je to slučaj sa Gram negativnim bakterijama. Međutim, dokazano je da je proteinskim inženjeringom moguće konstruisati endolizine koji prolaze kroz spoljašnju membranu, a koji u isto vreme poseduju visoku antibakterijsku aktivnost. Tako npr. hemijski modifikovan lizin, tzv. artilizin ima mogućnost prolaska kroz spoljašnju bakterijsku membranu i ima visok baktericidni efekat na Gram negativne bakterije, uključujući vrste *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* (Briers et al, 2014).

Lizini mogu da imaju globularnu strukturu, koja se sastoji samo od katalitičkog domena i modularnu strukturu, koja pored katalitičkog poseduje i domen koji se vezuje za ćelijski zid. U prethodnom delu je opisano funkcionisanje dvokomponentnog sistema holin-lizin, koji služi za oslobađanje novosintetisanih viriona; dugo se smatralo da je proces u kojima su holini neophodni za eksport endolizina univerzalan za sve fage. Međutim, Sao-Jose i sar. (2000) dokazali su da neki fagi, kao što je *Oenococcus* fag fOg44 poseduju N-terminalnu signalnu sekvencu, čijom proteolitičkom razgradnjom započinje eksport lizina do PG uz pomoć bakterijskog sekretornog sistema (*sec* translokon). U tom slučaju funkcija holina ostaje upitna. Iako ne učestvuju u eksportu endolizina, smatra se da holini imaju ulogu u aktivaciji oslobođenih lizina (Nascimento et al, 2008). Takvi holini se nazivaju još i pinholini pošto formiraju male rupe u citoplazmatskoj membrani bakterija, dovodeći do depolarizacije membrane i proteolitičke razgradnje N-terminalne signalne sekvence, odnosno aktivacije lizina (Slika 15). Globularna struktura lizina se najčešće sreće kod Gram negativnih bakterija, dok je modularna karakteristična za Gram pozitivne bakterije. Smatra se da lizini sa modularnom strukturom pokazuju veću enzimsku aktivnost (zbog prisustva dodatnog PG-vezujućeg domena koji zadržava enzim u blizini PG-a) pa samim tim i veći antimikrobni potencijal u odnosu na nedomularne, tj., globularne (Fishetti et al, 2010; Walmagh i sar. 2013).



Slika 15. Šematski prikaz holin-zavisnog i holin-nezavisnog eksporta endolizina (Catalao et al, 2013)

Do sada je opisano šest klasa endolizina: N-acetilmuramoil-L-alanin amidaze, endopeptidaze koje razlažu peptidni most, L-alanoil-D-glutamat endopeptidaze, N-acetil-beta-D-muramidaze (lizozimi), N-acetil-beta-D-glukozaminidaze i litičke transglikozilaze (Slika 16). Većina lizina ima samo jednu od navedenih enzimskih aktivnosti, retko dve. Interesantna je činjenica da lizini mogu delovati i neenzimskim putem na ćeliju i to putem destabilizacije citoplazmatske membrane bakterija određenim aminokiselinskim sekvencama. Ove sekvence pokazuju sličnost sa onima utvrđenim kod katjonskih antimikrobnih peptida (Knežević, 2012).



Slika 16. Struktura peptidoglikana i specifična mesta na koja različiti endolizini deluju (A) i šematski prikaz ćelijskog zida (B) i različite klase murein-hidrolaza (C) (Hermoso et al, 2007)

In vivo ispitivanja vezana za uticaj lizina na imuni sistem miševa i zečeva pokazala su da ovi enzimi ne utiču značajno na imuni sistem, ne izazivaju anafilatički šok i ne proizvode neželjene efekte bilo kog tipa (Jado et al, 2003; Loeffler et al, 2003). Iako je u nekoliko studija utvrđen porast antitela prilikom *in vivo* aplikacije lizina, dokazano je da ova antitela ne inhibišu njihovu aktivnost (Fishetti, 2010; Rashel et al, 2007).

Sinergistički efekat dva antimikrobna agensa može značajno redukovati dozu leka i povećati terapijski efekat, pri čemu se u isto vreme umanjuje rizik od razvijanja antimikrobne rezistencije delovanjem na dve različite strukture ili funkcije simultano (Schmelcher et al, 2013). Sinergizam između različitih lizina i antibiotika ispitan je u nekoliko studija. Istovremenom aplikacijom dva lizina dolazi do efektivnije lize bakterije, pošto delovanje jednog enzima omogućava bolju pristupačnost za delovanje drugog (Schmelcher et al, 2012; Loeffler i Fishetti, 2003). Tako npr. himerični - streptokokni/stafilokokni lizini λ SA2-E-Lyso-SH3b i λ SA2-E-Lyso-SH3b pokazuju sinergizam u slučaju kombinovane primene

sa lizostafinom u lečenju mastitisa laboratorijskih miševa (Schmelcer et al, 2012). Pored toga, sinergistički efekat je utvrđen između lizina i određenih antibiotika: Cpl-1 streptokokni lizin pokazuje sinergizam sa gentamicinom i penicilinom, kao što MV-L stafilokokni lizin pokazuje sinergizam kada se primeni zajedno sa glikopeptidnim antibioticima (Rashel et al, 2007). Zbog visoke specifičnosti lizina i nepromenljivosti njihovih ciljnih veza u PG, smatra se da ovi enzimi ne dovode do razvoja rezistencije kod bakterija (Schmelcher et al, 2013).

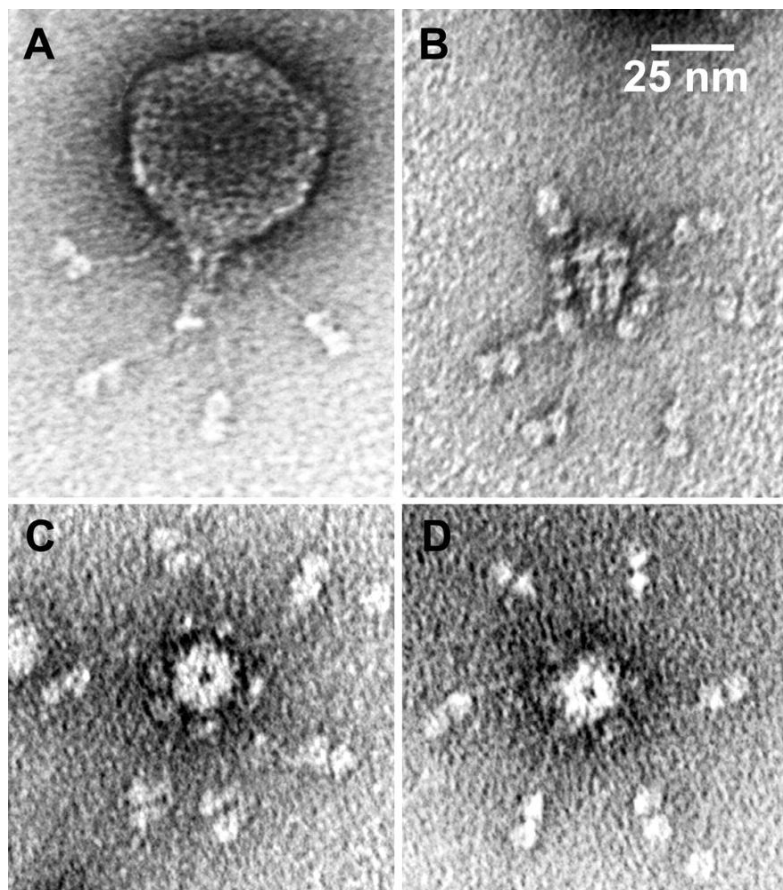
Uzimajući u obzir prednosti primene endolizina, proučavanje novih endolizina je od velikog interesa sa aspekta terapije.

2.9. *Bordetella bronchiseptica* BAKTERIOFAGI

Iako je *B. bronchiseptica* otkrivena pre više od jednog veka (Ferry, 1912), ne postoje detaljni literaturni podaci o njenim fagima, sa izuzetkom nekoliko umerenih faga indukovanih iz bakterijskih sojeva, za koje je dokazano da su specifični za ovu vrstu i da pripadaju porodici *Podoviridae* (Liu et al, 2004).

Prvi podaci o *B. bronchiseptica* bakteriofagima datiraju iz 1961. godine, kada je grupa naučnika iz Kanade izolovala 38 faga iz 48 različitih sojeva vrste *B. bronchiseptica*. Trideset i pet od 48 testiranih sojeva *B. bronchiseptica* pokazalo je osetljivost na jedan ili nekoliko faga. Takođe, 9 sojeva vrste *B. pertussis* bilo je osetljivo na najmanje dva faga, dok su *B. pertussis*, *Alcaligenes faecalis* i *Brucella sp.* bili rezistentni na ove fage (Rauch i Pickett, 1961). Pored toga, ovi naučnici su dodatno okarakterisali tri obligatno litička mutanta ovih izolata. Ovi fagi nisu detaljnije okarakterisani, te ne postoje podaci o njihovoj morfologiji i taksonomskoj pripadnosti. Druga grupa naučnika, Mebel i sar. (1985) su utvrdili prisustvo umerenih faga u sojevima koji su se koristili u produkciji vakcina. Prisustvo faga u sojevima dokumentovano je samo transmisivnim elektronskim mikroskopom. Rezultati mikrografija ukazuju da su u pitanju fagi iz porodice *Siphoviridae*, morfotipa B1.

Do sada je svega nekoliko umerenih faga iz porodice *Podoviridae* okarakterisano (Slika 17), a njihovi genomi su sekvencionirani. Ovi fagi su dobijeni indukcijom iz kulture *B. bronchiseptica*, za koje se ispostavilo da generišu diverzitet tzv. *mtd* gena koji diktira specifičnost receptorskih molekula faga za *Bordetella* vrste. Ova izmena selektivnosti se javlja zbog nukleotidne supstitucije na tačno određenom mestu u varijabilnom regionu 1 (VR1) *mtd* gena posredstvom reverzne transkriptaze (Liu et al, 2002).



Slika 17. Elektronska mikrografija (TEM) bakteriofaga BPP-1: kompletni virion (A); rep bakteriofaga (B); rep sa parcijalno razdvojenim fibrilama (C) i izolovani rep sa fibrilama (D) (Liu et al, 2004).

BPP-1 je umereni fag izolovan iz kliničkog soja vrste *B. bronchiseptica*, koji pokazuje jasnu specifičnost za Bvg+ fazu *B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica*. Primarni receptor BIP-1 je pertaktin, transportni protein koji je smešten u spoljašnjoj membrani bakterije, a koji se eksprimira samo u Bvg+ fazi *Bordetella* vrsta. Sa učestalošću 10^{-6} , ovaj fag daje dve klase specifičnih mutanata. Prva klasa je označena sa BMP (Bvg- specifični fag, eng. *Bvg minus-tropic phage*), koji su specifični i inficiraju isključivo ćelije koje se nalaze u Bvg- fazi. Druga klasa mutanata označena je kao BIP (Bvg nespecifičan fag, eng. *Bvg indiscriminate phage*), koji može da inficira obe, Bvg+ i Bvg- fazu sa istom efikasnošću.

Liu i sar. (2002) su postavili hipotezu da menjanje tropizma uključuje produkciju RNK intermedijera koji sadrže šablonske ponovke (TR eng. *template repeat*), reverznu transkripciju uz pomoć reverzne transkriptaze (Brt) koja je kodirana fagima i na kraju integraciju mutiranih cDNK kopija šablonskih ponovaka u varijabilni region 1. Svi zajedno, *mtd*, VR1, TR i *brt* lokus čine "evolucijsku kasetu", koja generiše diverzitet vezan za interakcije liganda i receptora (Liu et al, 2002).

Kako bi bolje razumeli biologiju *Bordetella* faga, isti autori su 2004. godine sekvencionirali genome BPP-1, BMP-1 i BIP-1 faga i pokazali da svi navedeni fagi mogu služiti za prenos genetičkih markera između vrsta roda *Bordetella*. Korišćenjem životinjskih modela za kolonizaciju *B. bronchiseptica*, ovi autori su ukazali na moguću ulogu faga u lizogenoj konverziji bakterije. Genetske mape sekvencioniranih faga BPP-1, BMP-1 i BIP-1 su cirkularnog tipa i sadrže ~ 43 000 bp sa 65,4% GC udela (Liu et al, 2004) i 49 kodirajućih genskih sekvenci.

Dai i sar. (2009) otišli su korak dalje i uradili trodimenzionalnu strukturnu analizu celog BIP-1 faga upotrebom krioelektronske tomografije. Ovi naučnici su došli do saznanja da je Mtd protein faga, tj. antireceptor, smešten na distalnom kraju fibrila koji se nalaze na repu, čime se objašnjava visok afinitet Mtd molekula za ćelijsku površinu tokom inicijacije infekcije.

Na osnovu svega iznetog, evidentno je da se o fagima vrste *B. bronchiseptica* za sada malo zna. Zbog toga je neophodno izolovati i okarakterisati i bakteriofage iz drugih familija, prvenstveno iz najbrojnije i najrasprostranjenije familije *Siphoviridae*.

3. CILJ RADA

Na osnovu postojećih literaturnih podataka, evidentno je da se o bakteriofagima oportunističkih i animalnih patogena malo zna, za razliku od faga humanih patogena o kojima postoji veliki broj literaturnih podataka. Naročito malo podataka je dostupno o ulozi ovih faga u patogenosti bakterija. Shodno tome, cilj ovog rada je izolacija *B. bronchiseptica* specifičnih bakteriofaga iz najveće familije faga *Siphoviridae*, njihova karakterizacija i utvrđivanje značaja, sa aspekta eventualne primene faga kao antimikrobnih agenasa, ali i sa aspekta njihove moguće uloge u patogenosti ove vrste posredstvom lizogene konverzije.

Cilj disertacije će biti ostvaren kroz nekoliko specifičnih aktivnosti:

- Izolacija *B. bronchiseptica* specifičnih bakteriofaga iz familije *Siphoviridae* iz prirodne sredine, što će predstavljati prve rezultate izolacije *B. bronchiseptica* specifičnih bakteriofaga iz prirodne sredine, kao i prve izolovane fage iz navedene familije specifične za ovu bakteriju.
- Propagacija, tj. umnožavanje faga kako bi se dobile visoko prečišćene suspenzije virusa, oslobođene od bakterija i ostalih ćelijskih komponenata sa visokim titrom faga. Dobijeni stokovi koristiće se za dalje eksperimente vezane za karakterizaciju bakteriofaga.
- Određivanje litičkog spektra i efikasnosti infekcije na alternativnim domaćinima. Dobijeni rezultati ukazaće na širinu litičkog spektra faga, kao i njihovu specifičnost. Fagi sa različitim litičkim profilom biće odabrani za detaljniju karakterizaciju.
- Utvrđivanje dužine latentnog perioda i broja viriona koji se oslobađa po jednom ciklusu, što predstavlja jedan od pokazatelja litičke efikasnosti.
- Morfološka karakterizacija faga u cilju utvrđivanja taksonomske pripadnosti faga.
- Utvrđivanje efekta različitih faktora spoljašnje sredine na infektivnost faga. Ovi podaci doprineće postojećim saznanjima o biologiji bakteriofaga, a mogu biti od značaja kada je u pitanju primena faga kao antimikrobnih agenasa.
- Utvrđivanje proteinskog profila nekoliko odabranih faga, kao važne taksonomske karakteristike. Ovi rezultati omogućiće određivanje molekulske mase glavnih

proteina kapsida, kao i međusobno poređenje faga na osnovu njihovog proteinskog profila.

- Restrikciona digestija genoma faga u cilju njihovog međusobnog poređenja i preliminarne karakterizacije genoma faga.
- Sekvenciranje genoma bakteriofaga u cilju određivanja taksonomske pripadnosti faga, njihove prirode (umereni/litički), ali i ispitivanja moguće uloge faga u patogenosti bakterija korišćenjem različitih bioinformatičkih softvera.
- *In silico* analiza genoma u cilju detekcije gena čiji produkti mogu biti toksini za životinje i ljude, kao i detekcija i analiza endolizina koji se mogu koristiti kao antimikrobni agensi.
- Komparativna genomska analiza faga, koja će ukazati na taksonomsku pripadnost faga, na sličnosti i razlike kako između samih *B. bronchiseptica* faga, tako i u odnosu na druge fage čiji su genomi dostupni u bazi podataka.
- Infekcija *B. bronchiseptica* sojeva fagima i PCR i RFLP potvrda infekcije. Rezultati će ukazati na mogućnost lizogene konverzije *B. bronchiseptica* fagima, a ujedno će poslužiti kao osnova za dalja ispitivanja vezana za ulogu ovih faga u patogenosti bakterije.
- Utvrđivanje pojave novih fenotipskih osobina *B. bronchiseptica* sojeva nakon infekcije fagima, odnosno promene hemolitičke sposobnosti, osetljivosti na antibiotike, sposobnosti formiranja biofilma, pokretljivosti pomoću flagela i pila, kao i produkcije fimbrija. Ovi rezultati ukazaće na moguću ulogu faga u procesima koji su pre svega važni sa aspekta patogenosti bakterije.
- Utvrđivanje antimikrobnog potencijala faga, odnosno litičke efikasnosti faga, kao i efekta faga na formiranje i na već formirani biofilm. Pored toga, izvršiće se detekcija i *in silico* analiza gena za endolizine u genomima sekvenciranih faga.

4. MATERIJAL I METODE

U radu su korišćene savremene metode izolacije i karakterizacije bakteriofaga, analize virusnog genoma, ispitivanja efekta faga na patogenost bakterije i primene faga kao antimikrobnih agenasa.

4.1 *Bordetella bronchiseptica* SOJEVI

U istraživanju je korišćeno ukupno 12 sojeva vrste *Bordetella bronchiseptica*. Jedan soj je bio referentan iz American Type Culture Collection (ATCC 10580), dok su ostali sojevi izolovani iz različitih uzoraka poreklom od životinja i ljudi (Tabela 4).

Tabela 4. *B. bronchiseptica* sojevi

Poreklo <i>B. bronchiseptica</i> sojeva	Oznaka sojeva
Humani izolati	L:594
	S2
	R1
	LEG
	SEI
	DEL
Animalni izolati	Bbr973
	Bbchiot
	CV
	LORD
	Bbr3416

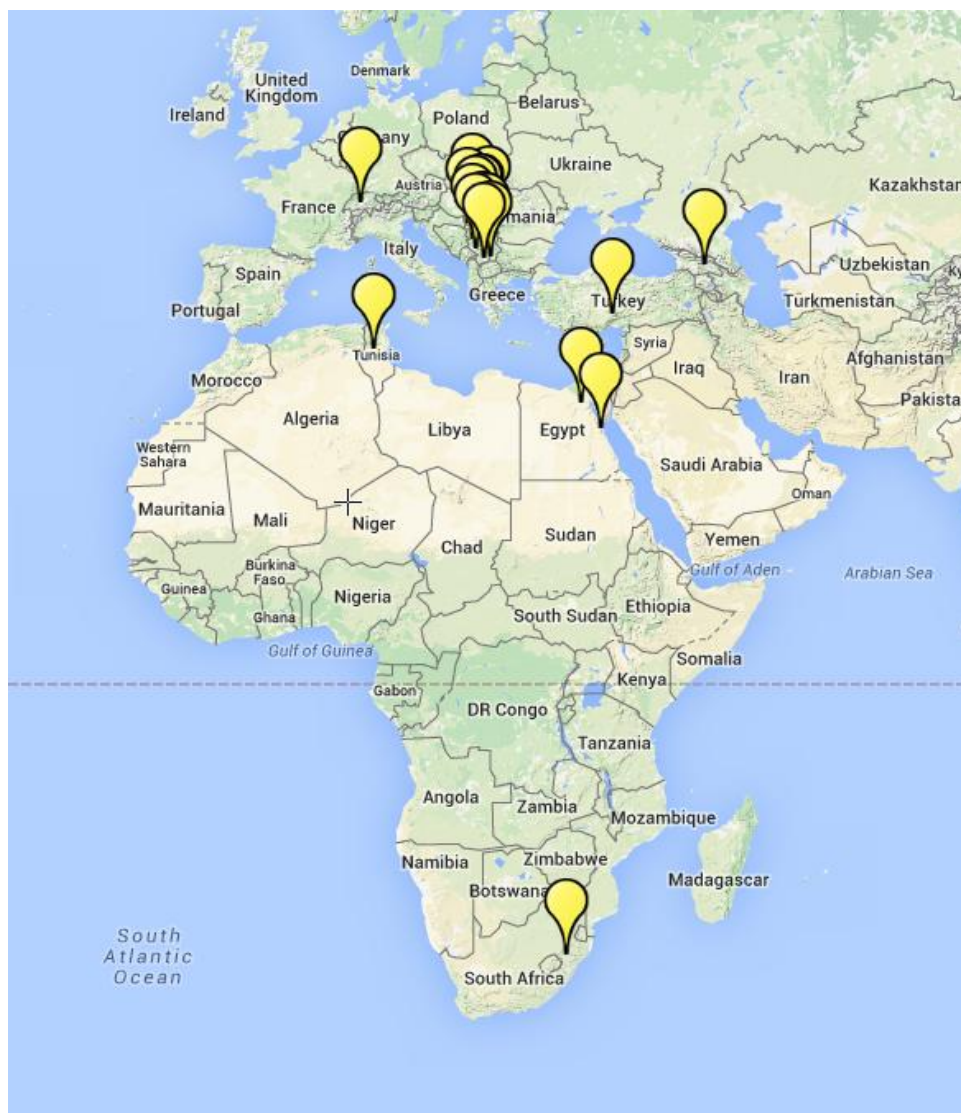
B. bronchiseptica sojevi poreklom od životinja i ljudi su dobijeni ljubaznošću dr Nicole Guiso sa Departmana za molekularnu prevenciju i terapiju ljudskih bolesti, Pasterovog instituta u Parizu (Francuska) i mr Aleksandre Marković sa Veterinarskog instituta iz Subotice (Srbija).

4.2. IZOLACIJA FAGA

Bakteriofagi su izolovani direktno iz uzoraka površinskih i otpadnih voda, bez korišćenja obogaćenja, primenom opisanih metoda.

4.2.1. POREKLO UZORAKA

Ukupno 66 uzoraka površinskih voda poreklom iz Srbije (59), Mađarske (1), Gruzije (1), Egipta (2), Južnoafričke Republike (1), Turske (1) i Švajcarske (1) korišćeno je za izolaciju faga (Slika 18). Uzorci su sakupljeni tokom 2013. i 2014. godine, a uključuju reke, jezera, mora, ribnjake, urbane vode, irigacione kanale, vode iz pojila za životinje, otpadne vode svinjskih farmi i komunalne otpadne vode.



Slika 18. Lokaliteti i poreklo uzoraka korišćenih za izolaciju faga

Uzorci vode su vodili poreklo iz slatkovodnih ekosistema i to pre svega iz reka: Dunav, Sava, Tisa, Timok, Neva, Jegrička, Nil i Limat (13 uzorka), gde je kvalitet vode odgovarao α i β -mezosaprobnoj zoni; eutrofnih jezera Paličkog i Ludaškog (4 uzorka) i oligotrofnih Belocrkvanjskih jezera i Borkovačkog jezera (5 uzorka), ribnjaka na teritoriji

Vojvodine (6 uzoraka), potoka na teritoriji južne Srbije, oko Smedereva i Kopaonika i vodopada iz Tbilisija (6 uzoraka), močvara u Banatu i okolini Smedereva (4 uzorka) i irigacionih kanala na teritoriji opštine Sremska Mitrovica i Novog Sada (6 uzorka). Od urbanih voda, obrađeno je dva uzorka vode koja su poreklom iz gradskih fontana u Kruševcu i Tbilisiju. Jedan uzorak je bio poreklom iz Crvenog mora (Egipat). Ukupno 11 uzoraka sakupljeno je iz pojila različitih životinja (riba, ptica, majmuna, gnuva, srndaća, merkata i dr.) iz zoološkog vrta Palić, uključujući i dva uzorka koja su uzeta iz posude sa vodom koju su koristile domaće mačke. Od otpadnih voda svinjarskih farmi sakupljeno je ukupno 2 uzorka sa svinjske farme u mestu Karađorđevo kod Bačke Topole. Komunalne otpadne vode uzorkovane su u Novom Sadu i Subotici na mestu gde se izlivaju otpadne kanalizacione vode grada Novog Sada na mestu GC1 i GC2 (3 uzorka) i kanalu u Subotici pored gradske deponije u koji se takođe ispuštaju neprečišćene otpadne vode grada (1 uzorak).

Uzorci vode sakupljani su u sterilnim staklenim ili plastičnim posudama i transportovani su u najkraćem mogućem roku u laboratoriju. Uzorci su obrađivani odmah po dospeću u laboratoriju ili najkasnije 48 h po dospeću, a do tada su čuvani u frižideru na 4 °C.

Uzorci koji vode poreklo sa istih lokacija (npr. GC1 iz Novog Sada), uzeti su u različitim vremenskim intervalima, tako da svi uzorci bili različitog geografskog/hronološkog porekla.

4.2.2. METODA SA JEDNIM SLOJEM AGARA

Bakteriofagi su izolovani korišćenjem tzv. *single agar layer* (eng.) metode (Grabow, 1986), tj. metode sa jednim slojem agara. U pitanju je kvantitativna metoda koja se koristi za detekciju i određivanje brojnosti kolifaga u uzorcima voda (U.S. EPA, 2011).

Uzorci voda su profiltrirani kroz filtere dijametra pora 0,45 µm (Sartorius Co., Goettingen, Germany) u cilju uklanjanja bakterija i drugih suspendovanih čestica. U cilju uklanjanja krupnijih čestica, uzorci poreklom sa svinjskih farmi su najpre filtrirani kroz filter papir, a potom i kroz filtre dijametra pora 0,45 µm.

Za izolaciju faga korišćen je referentni soj vrste *Bordetella bronchiseptica* ATCC 10580. Bakterije su gajene preko noći na 37 °C, u tečnoj LB (Luria-Bertani) podlozi (Hi-media, India).

Prisustvo faga u uzorcima određeno je prema U.S. EPA (2001). Dvostruko koncentrovana rastopljena i prohlađena (oko 45 °C) podloga, Luria-Bertani agar (LBA)/Trypton Salt agar (TSA) izmešana je sa istom zapreminom (1:1 v/v) profiltriranog uzorka kako bi se zadržala odgovarajuća koncentracija hranljivih materija. U 100 ml uzorka je dodavano je i 5 ml prekonoćne bakterijske kulture i rastvor kalcijum-hlorida, kako bi se fagi bolje adsorbovali za bakterije. Podloga je zatim razlivena u petrijeve ploče. Nakon inkubacije od 24-48 h na 37 °C, ploče su pregledane i na pločama na kojima su se javile plake izvršena je izolacije plaka, tj. faga. Iz svakog uzorka koji je dao plake, izolovan je jedan plak, kako bi se izbegla izolacija klonalno identičnih faga. Plake su izolovane uz pomoć sterilne bakterijske eze, pri čemu je uziman i deo čvrste podloge na kojoj su se nalazili fagi. Zatim su plake sa podlogom prebačene u kivete sa SM puferom i 1% hloroformom kako bi se bakterijske ćelije lizirale i time povećala brojnost faga. SM pufer (50 mmol L⁻¹ Tris-HCl [pH 7,4]; 100 mmol L⁻¹ NaCl; 8 mmol L⁻¹ MgSO₄; 0.01% želatin) je sterilisan u autoklavu i čuvan u frižideru. Tris-HCl (pH 7,4) je pripreman kao 1 M rastvor, čiji pH je podešen na 7,4 dodavanjem koncentrovane HCl (Sambrook i Russell, 2001).

Suspenzije faga su desetostepeno razređene, a reizolacija faga je ponovljena najmanje tri puta zasejavanjem faga iz različitih razređenja i/ili metodom iscrpljivanja uz pomoć sterilnog brisa (Slika 19). Nakon inkubacije, pikirane su pojedinačne plake iz inokulisanog razređenja koje je dalo pojedinačne plake.



Slika 19. Reizolacija faga metodom iscrpljivanja

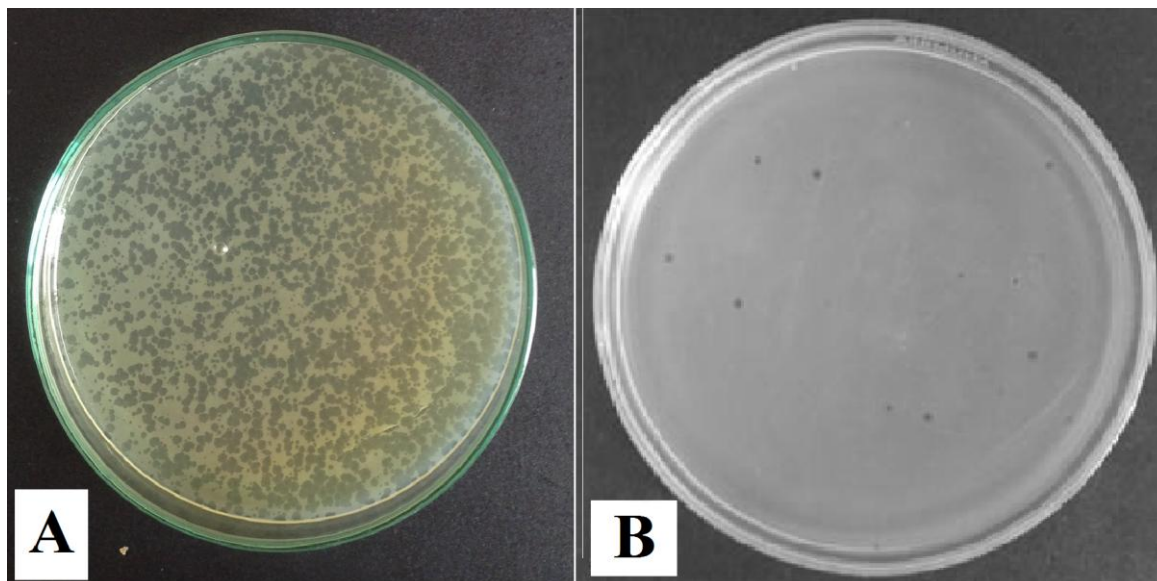
4.3. PROPAGACIJA I PURIFIKACIJA FAGA

Propagacija faga vršena je na čvrstim podlogama, dok je purifikacija faga rađena prema metodi opisanoj od strane Sambrook i Russel (2001).

4.3.1. PROPAGACIJA BAKTERIOFAGA

U cilju karakterizacije bakteriofaga vršeno je umnožavanje, tj. propagacija izolovanih bakteriofaga. Umnožavanje faga vršeno je na čvrstoj LB i polutečnoj λ top podlozi, korišćenjem metode sa dva sloja agara (eng. *double layer method*) (Sambrook i Russell, 2001).

Od sadržaja kiveta sa plakama je prethodno pripremljena serija desetostepenih razređenja i utvrđeno je koje razređenje daje seminkonfluentne plake (Slika 20).



Slika 20. Ploče sa semikonfluentnim (A) i pojedinačnim plakama *B. bronchiseptica* specifičnih bakteriofaga (B)

Propagacije faga je izvođena dodavanjem bakterije domaćina u rastopljenu λ top podlogu zajedno sa suspenzijom virusa. Zatim je sadržaj epruvete prelivan preko čvrste LB podloge. U cilju propagacije faga korišćeno je razređenje koje je dalo semikonfluentne plake, pri čemu je za umnožavanje korišćeno najmanje 60 petri ploča sa LB podlogom. Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C, u petrijeve ploče je dodavano po 5 ml SM pufera, a zatim su ploče ostavljene na 4 °C preko noći kako bi što veći broja faga difunovao u pufer. Sledećeg dana, SM pufer sa fagima je aspiriran u erlenlamjer zajedno sa polutečnom λ top podlogom. U aspiriranu suspenziju faga je zatim dodat i hloroform (do 5,0 %), a fagi su čuvani u frižideru.

4.3.2. KONCENTROVANJE I PREČIŠĆAVANJE BAKTERIOFAGA

Prečišćavanje i koncentrovanje faga vršeno je metodama koje su opisane od strane Sambrook i Rusell (2001).

Dobijena suspenzija faga je centrifugirana na 13,000xg, tokom 15 minuta pri temperaturi od 4 °C u cilju uklanjanja bakterijskih ćelija. Supernatant sa fagima je profiltriran prvo kroz filtr pora 0,45 μ m, a zatim i kroz filtr pora 0,2 μ m u sterilne erlenmajer posude.

U cilju precipitacije, odnosno koncentrovanja faga, u suspenziju je dodavan koncentrovani rastvor NaCl i polietilen glikola 6000 (PEG6000) do koncentracije 1 M i 10%, redom. Kivete su ostavljane na ledu preko noći, a precipitirani bakteriofagi su potom istaloženi centrifugiranjem na 10.000xg u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 4 °C. Dobijeni supernatant je odliven, a talog bakteriofaga u PEG6000 je resuspendovan u 500 µl SM pufera. Koncentrovanje faga vršeno je jednom.

Kod faga koji nisu podvrgnuti daljem prečišćavanju u gradijentu cezijum-hlorida rađena je ekstrakcija PRG6000. Ekstrakcija je všena je tako što je u kivete sa fagima dodavana jednaka zapremina hloroforma (v/v), a zatim je vršeno centrifugiranje na 3,000xg tokom 15 minuta na 4 °C. Nakon toga, vodena faza koja se izdvojila na površini i koja sadrži fage, aspirirana je na 4 °C kako ne došlo do ponovnog rastvaranja PEG6000. Čitav postupak je ponovljen još jednom u slučaju da je suspenzija faga bila veoma viskozna.

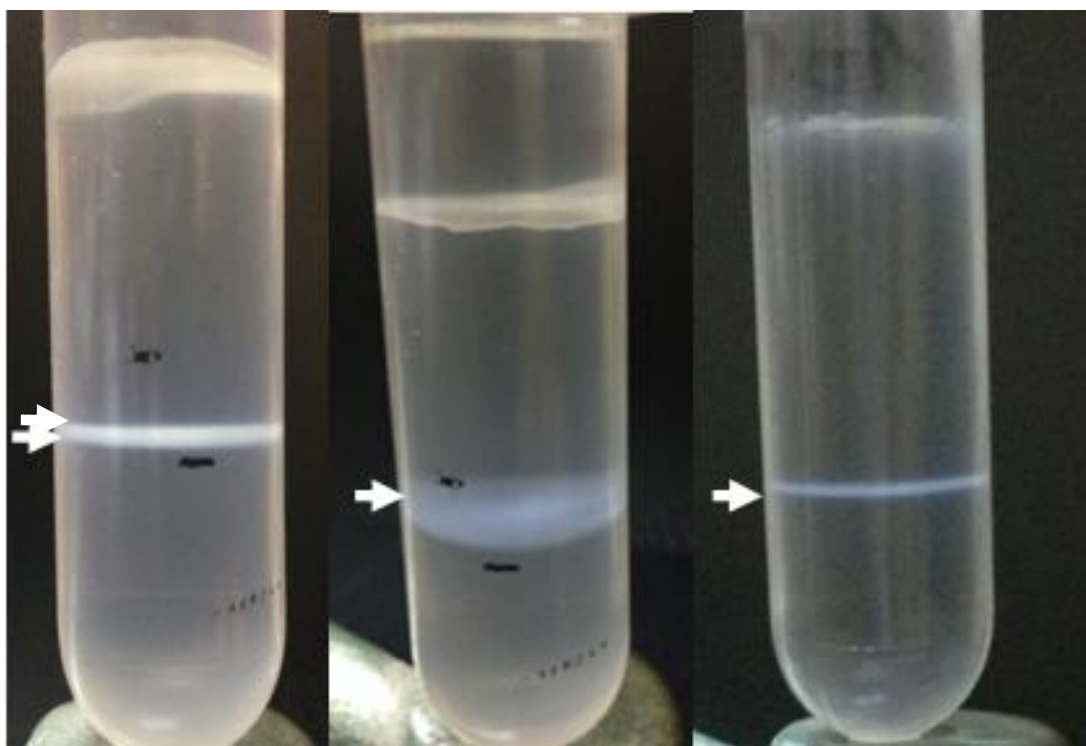
U cilju analize proteina kapsida i karakteristika genoma faga, vršeno je prečišćavanje faga u gradijentu gustine CsCl-a. Četiri rastvora različite gustine CsCl-a pripremani su u SM puferu prema recepturi prikazanoj u tabeli 5. Najpre je nalivan rastvor najmanje gustine (1,33/gcm³), a zatim je uz pomoć igle i šprica na dno dadat rastvor veće gustine (1,45 g/cm³). Na isti način je nalivan treći (1,5 g/cm³) i četvrti rastvor (1,7g/cm³) cezijum-hlorida. Na ovako pripremljen gradijent cezijum-hlorida je dodavana suspenzija faga sa CsCl-om (0,75g/ml), tako da se slojevi ne izmešaju.

Tabela 5. Priprema rastvora različitih koncentracija za ultracentrifugiranje u gradijentu CsCl-a

Gustina (g/cm ³)	CsCl (g)	SM (ml)
1.33	11	23,42
1.4	15	21.25
1.5	16.75	20.5
1.7	23.75	18.75

Ovako pripremljeni fagi i gradijent su centrifugirani na 45,000xg tokom 6 h na temperaturi od 4 °C upotrebom rotora Beckman SW27. Nakon centrifugiranja, trake sa fagima su aspirirane pomoću šprica i igle (Slika 21). U cilju uklanjanja CsCl-a, suspenzije sa

purifikovanim fagima su podvrgnute višekratnoj dijalizi u SM puferu bez želatina (2 litre pufera na 1 ml suspenzije faga).



Slika 21. Trake sa fagima nakon centrifugiranja u gradijentu gustine CsCl-a

4.3.3. ODREĐIVANJE BROJNOSTI IZOLOVANIH FAGA U SUSPENZIJI

U cilju određivanja brojnosti faga u suspenziji, napravljena je serija desetostepenih razređenja suspenzije prečišćenih faga na prethodno opisan način. U rastopljenu λ top podlogu dodavano je bakterija domaćin i razređenje suspenzije, a zatim je podloga prelivana preko čvrste LB podloge, prethodno razlivene u petrijevu ploču. Zasejavanje svakog razređenja je vršeno u 3 ponavljanja. Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C, plake su prebrojane i određena je prosečna brojnost faga, koja je izražena po mililitru (PFU ml^{-1} , broj jedinica koje formiraju plake u 1 mililitru).

4.4. POTVRDA POREKLA FAGA

U cilju potvrde da fagi vode poreklo iz prirodne sredine i da nisu indukovani iz soja koji je korišten pri izolaciji, *B. bronchiseptica* ATCC 10580, prisustvo profaga u genomu domaćina ([NZ_CM002881.1](#)) je analizirano PHAST serverom. PHAST (PHAge Search Tool) je dizajniran da identifikuje, anotira i grafički prikaže sekvence profaga u bakterijskim genomima (Zhou et al, 2011). Identifikovani genom faga je podvrgnut teoretskoj restrikcionalnoj digestiji sa endonukleazama i upoređen sa RFLP profilom izolovanih faga. Pored toga, određeni uzorci su zagrejani na 100 °C tokom 20 min i zasejani paralelno sa netretiranim uzorcima kako bi se potvrdilo da izolovani fagi vode poreklo iz prirodne sredine. Kao dodatna potvrda da su fagi izolovani iz prirodne sredine korišćena je PCR reakcija i prajmeri koji su dizajnirani na osnovu genomskih sekvenci faga. O PCR metodi i prajmerima korišćenim u ove svrhe biće više reči u poglavlju 4.12.1.

4.5. UTVRĐIVANJE LITIČKOG SPEKTRA

Litički spektar izolovanih faga određivan je tzv. "spot" metodom (Knežević et al, 2009).

U rastopljenu λ top podlogu je dodavano 100 μ l bakterije koja je zatim razlivena u petrijeve ploče koje sadrže LB čvrstu podlogu. Nakon 20 minuta, na osušenu podlogu dodavano je po 10 μ l suspenzije bakteriofaga, brojnosti $\sim 1 \times 10^6$. Po završetku inkubacije od 24 h na 37 °C, posmatrana je pojava zone liziranih bakterijskih ćelija na mestu inokulacije faga. Litičke zone su opisivane kao prozirne, zamućene ili prozirne sa halom. Litički spektar je okarakterisan kao uzak - ukoliko su fagi lizirali do 30 % sojeva, umeren - ukoliko su lizirali od 30 do 50 % ili širok - ukoliko su litičke zone zabeležene kod preko 50% sojeva (Knezevic et al, 2009).

Litički spektar bakteriofaga je testiran na 11 *B. bronchiseptica* sojeva i 14 sojeva koji pripadaju različitim taksonima, uključujući: *Alcaligenes faecalis* (JR-22 *Acinetobacter baumannii* (ATCC BAA-747 i ATCC 19606), *Plesiomonas shigelloides* (ATCC 51903 i ATCC 14029), *Escherichia coli* (ATCC 13706), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 11632), *Enterococcus faecalis* (laboratorijski soj 36913 EXB-U53), *Salmonella enterica* subsp.

enterica serovar Eneritidis (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (laboratorijski soj 36913), *Providencia rettgeri* (ATCC 9250), *Providencia stuartii* (ATCC 49809), *Morganella morganii* subsp. *morganii* (ATCC 25829) i *Proteus mirabilis* (ATCC 35659).

Svaki izolat faga je ispitivan u kombinaciji sa svim sojevima u najmanje tri nezavisna eksperimenta.

4.6. UTVRĐIVANJE EFIKASNOSTI INFEKCIJE ALTERNATIVNIH DOMAĆINA BAKTERIOFAGIMA

U cilju određivanja efikasnosti infekcije faga na alternativnim domaćinima korišćena je "spot" metoda.

Efiksantost infekcije bakteriofaga na alternativnim domaćinima ispitivana je korišćenjem tri soja vrste *B. bronchiseptica*: referentni soj ATCC 10580 (originalni domaćin), 3416 i BbChiot (alternativni domaćini). Serija desetostepenih razređenja faga je inokulisana na prosušenu λ top podlog. Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C, zabeleženo je poslednje razređenje koje je dalo plake. Efikasnost formiranja plaka (EOP) na alternativnom domaćinu je izražena relativno, kao odnos broja plaka dobijen na alternativnom domaćinu i onog dobijenom na originalnom domaćinu (Kutter, 2009).

4.7. ODREĐIVANJE PARAMETARA MULTIPLIKACIJE FAGA

Određivanje dužine latentnog perioda i broja oslobođenih faga po jednom ciklusu vršeno je posredstvom krive rasta, prema neznatno modifikovanoj metodi koji su opisali Nagayoshi i sar. (2016). Ovi parametri određeni za CN1 fag i to na originalnom domaćinu. Prekonoćna bakterijska kultura je centrifugirana (5000xg, 5 min), a pelet je zatim resuspendovan u svežem LB-u tako da brojnost bakterija bude $\sim 10^5$. Suspenzija faga je zatim pomešana sa bakterijskom suspenzijom pri multiplicitetu infekcije 10 (MOI ~ 10), koji predstavlja odnos broja faga i broja bakterijskih ćelija. Smeša bakteriofaga i bakterija je zatim paralelno inkubirana na 26 °C i 37 °C, kako bi došlo do adsorpcije faga za bakterijske ćelije. Nakon inkubacije smeša je tri puta isprana u LBB-u u cilju uklanjanja slobodnih viriona (5000xg, 5 min). Pelet je zatim rastvoren u 100 ml LBB-a a inkubacija je nastavljena na 26 °C i

37 °C. Uzorci su uzimani na samom početku eksperimenta i u intervalima od 10 minuta. Uzorci su centrifugirani, a supernatant je zasejavan na LBA kako bi se utvrdio broj faga. Broj faga oslobođenih po jednom ciklusu (eng. *burst size*) računat je kao odnos broja faga u 1 ml uzorka na kraju eksperimenta u odnosu na inicijalni broj inficiranih bakterijskih ćelija. Eksperiment je izvođen u tri nezavisna ponavljanja.

4.8. MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA ODABRANIH FAGA

Proučavanje morfoloških karakteristika osam faga vršeno je upotrebom transmisionog elektronskog mikroskopa, a uzorci su pripremani prema protokolu za negativno bojenje koji je opisan od strane Bozzola i Russell (1998). Fagi za ove analize su odabrani na osnovu sličnosti, odnosno razlika u poreklu, litičkom spektru i RFLP profilu.

Na bakarne mrežice obložene ugljenikom koje sadrže Formvar film nanete su suspenzije faga tokom 5 minuta, kako bi fagi adsorbovali. Nakon isteka vremena, višak suspenzije je uklonjen filter hartijom, a pričvršćeni virioni su kontrastirani rastvorom uranil-acetata (0,5-1%) u toku 1 minuta. Tako obojeni uzorci su osušeni na vazduhu, a zatim su analizirani uz pomoć Philips CM 100 transmisionog elektronskog mikroskopa (Philips, Holandija), pri naponu od 80 kV. Elektronske mikrografije su dobijene pomoću Gatan Bioscan CCD kamere i Digital Micrograph Software 3.4. (Gatan Inc., USA). Dobijene slike su korišćene za morfološku karakterizaciju faga; dimenzije glave i repa (dužina i širina svakog) i rezultat su namanje deset merenja, a dobijene vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm S.D.

4.9. UTVRĐIVANJE EFEKTA RAZLIČITIH FAKTORA SPOLJAŠNJE SREDINE NA INFektivnost FAGA

Stabilnost četiri odabrana faga (CN2, MW2, LK3 i FP1) ispitivana je u različitim uslovima sredine - na različitoj pH vrednosti, temeperaturi, pri različitoj koncentraciji uree i NaCl-a.

Efekat pH vrednosti na stabilnost faga ispitivan je korišćenjem SM pufera odgovarajuće kiselosti, čiji pH je podešavan pomoću HCl i NaOH. Infektivnost faga ispitivana je na 6 različitih pH vrednosti: 1,5, 3, 5, 7, 9 i 11.

Uticaj temperature na infektivnost faga ispitivana je na ukupno 6 različitih vrednosti temperature: 4 °C, 37 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C i 75 °C.

Efekat uree na stabilnost i infektivnost faga ispitivana je primenom 6 različitih koncentracija uree: 0,5 M, 1 M, 3 M, 5 M, 7,5 M i 10 M, dok je efekat NaCl-a na fage ispitivan primenom rastvora koncentracija: 1,5 %, 3 %, 5 %, 7,5 % i 10 %.

Odgovarajuće razređenje faga ($\sim 1 \times 10^5$) je tretirano SM puferom odgovarajuće kiselosti ili rastvorom određene koncentracije, dok je u slučaju temperature suspenzija faga u SM puferu bila izlagana različitim temperaturama korišćenjem termostata, vodenog kupatila i frižidera. Inkubacija tretiranih suspenzija trajala je 30 minuta na 37 °C. Kontrola je podrazumevala inkubaciju suspenzije faga, koja nije tretirana hemisjistikim agensom, tj. u slučaju pH, SM pufer čiji pH je podešen na 7,4, a u slučaju temperature kontrola je predstavljala fage koji su inkubirani na 10 °C. Infektivnost faga određena je metodom plaka na referentnom soju *B. bronchiseptica* ATCC 10580 u dva ponavljanja, a svaki eksperiment je rađen i u dva nezavisna ponavljanja. Rezultati su prikazani grafički, kao procenat infektivnih viriona nakon tretmana u odnosu na brojnost u kontroli. Dobijene vrednosti izražene su kao srednja vrednost \pm S.D.

4.10. ODREĐIVANJE PROTEINSKOG PROFILA ODABRANIH FAGA

Proteinski profil faga CN1, CN2, MW2 i LK3 je određen metodom SDS-PAGE (natrijumdodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza) (Laemmli, 1970). Prečišćeni fagi podvrgnuti su ekstrakciji proteina metodom hloroform/metanol (Sambrook i Russell, 2001). Suspenzije faga prečišćene u gradijentu CsCl-a tretirane su metanolom i hloroformom u odnosu 1:1:0,75. Dobijena smeša je centrifugirana tokom 10 min na 14000 rpm (Eppendorf 5424R centrifuga) na 4 °C. Gornji sloj sa puferom je uklonjen, a ostatak smeše sa proteinima i metanolom je tretiran istom zapreminom metanola (1:1 v/v). Smeša je ponovo centrifugirana na 14000 rpm tokom 10 minuta na 4 °C. Nakon ovog koraka gornji sloj, tj.

metanol je uklonjen, a postupak sa metanolom je ponovljen još jednom. Proteini su dobijeni kao talog u kivetama.

Ekstrahovani proteini su tretirani puferom za denaturaciju (Tris-HCl (pH 9) 0.5 molL⁻¹; SDS 4% w/v; glicerol 10% v/v; bromfenol plavo 10 % w/v; β merkaptoetanol 10% v/v), a zatim su prokuvani 10 minuta. Takvi uzorci su pušteni na 10 % w/v poliakrilamid gel na 200 V u toku 100 minuta u puferu (Tris-HCl 0,25 molL⁻¹; glicin 0,19 molL⁻¹; SDS 0,1% w/v, pH 8,65). Proteinski marker sa proteinima različitih molekulskih masa korišćen je u cilju utvrđivanja molekulske mase proteina viriona (ThermoFisher Scientific, Litvanija). Gelovi su nakon elektroforeze fiksirani u rastvoru metanola i glacijalne sirćetne kiseline (50 % metanola i 10 % glacijalne sirćetne kiseline), a zatim obojeni bojom Coomassie Brilliant Blue R. Nakon obezbojavanja gelova, izvršena je njihova dokumentacija primenom Canon EOS1100D kamere i BioDocAnlayze 2.2 softvera (Biometra, Germany). Molekulska masa strukturnih proteina faga je izračunata pomoću krive konstruisane na osnovu dužine pređenog puta proteina poznate molekulske mase.

4.11. KARAKTERIZACIJA GENOMA BAKTERIOFAGA

Karakterizacija genoma faga vršena je restrikciom digestijom DNK faga i sekvencioniranjem odabranih genoma *B. bronchiseptica* faga. Karakterizacija je takođe podrazumevala anotaciju i pretragu genoma u cilju otkrivanja potencijalnih toksina, kao i komparativnu genomiku sekvenciranih genoma.

4.11.1. IZOLACIJA DNK

U cilju izolacije DNK iz viriona, suspenzije bakteriofaga prečišćene u gradijentu CsCl-a tretirane su DNK-zom I na 37 °C, u trajanju od 2 h ili preko noći, radi uklanjanja celokupne bakterijske DNK, koja je eventualno zaostala tokom procesa prečišćavanja faga, a koja bi ometala analizu virusne DNK. Nakon inkubacije, DNK-za I je inaktivisana na temperaturi od 65 °C u trajanju od 1 h.

Ekstrakcija DNK iz bakteriofaga izvršena je primenom metode fenol/hloroform opisane od strane Sambrook i Russell (2001). Nakon razaranja kapsida primenom Na₂EDTA

(20mM), proteinaze K ($50 \mu\text{gml}^{-1}$) i SDS (0.5%), dobijena smeša je inkubirana 1 h na temperaturi od $56 \text{ }^\circ\text{C}$, a zatim prohlađena do sobne temperature. Prohlađena smeša je tretirana hladnim ekvilibrisanim fenolom (1:1 v/v) i centrifugirana na 3000xg u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Dobijena vodena faza je prenetu u nove kivete, gde je tretirana smešom fenola i hloroforma (v/v). Smeša je ponovo centrifugirana na 3000xg u toku 5 minuta na sobnoj temperaturi. Dobijena vodena faza je prenetu u nove kivete, gde je tretirana hloroformom, a zatim ponovo centrifugirana pod istim uslovima. Dobijena vodena faza je prenetu u nove kivete. U cilju precipitacije DNK, u smešu je dodat dvostruki volumen 96% ledenog etanola i 3 M natrijum-acetat (1:10 v/v). Smeša je inkubirana 30 minuta na temperaturi od $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, nakon čega je DNK istaložena centrifugiranjem na $18,000\text{xg}$ tokom 20 minuta na temperaturi od $4 \text{ }^\circ\text{C}$. U cilju uklanjanja soli i precipitacije DNK, pelet je ispran 70 % ledenim etanolom, centrifugiran, a potom osušen. Peleti su najpre resuspendovani u puferu sa RNK-zom, ponovo precipitirani i osušeni, a kasnije suspendovani u elucionom puferu (Mini Prep, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5).

4.11.2. RESTRIKSIONA DIGESTIJA GENOMSKE DNK BAKTERIOFAGA ENDONUKLEAZAMA

Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, skrać. RFLP) je molekularna metoda kojom se analiziraju varijacije u DNK sekvencama koje nastaju usled postojanja različitih lokacija za restrikcionu digestiju endonukleazama (Marjanović i Primorac, 2009). Izolovana DNK je tretirana restrikcionim enzimima u cilju preliminarnog određivanja veličine genoma i utvrđivanja klonalne različitosti bakteriofaga. Restrikcioni enzimi korišćeni za RFLP metodu bili su EcoRI, EcoRV, HinfI, SmaI, BamHI, XbaI, Sall, PvuI, BglII and DraI, a njihove karakteristike su prikazane u tabeli 6.

Tabela 6. Karakteristike odabranih restrikcioni enzima

Restrikcioni enzim	Restrikciono mesto	Osetljivost na metilaciju	Proizvođač
Hinfl	5'... G↓ANTC ...3'	Osetljiv na neke CpG kombinacije	New England Biolabs, Beverly, Mass.
EcoRI	5'... G↓AATTC ...3'	Osetljiv na neke CpG kombinacije	Lithuania, Fast Digest, Thermo Scientific
EcoRV	5'... GAT↓ATC ...3'	Osetljiv na neke CpG kombinacije	Lithuania, Fast Digest, Thermo Scientific
SmaI	5'... CCC↓GGG ...3'	Osetljiv na neke CpG kombinacije	Lithuania, Fast Digest, Thermo Scientific
BamHI	5'... G↓GATTC ...3'	Nije osetljiv na metilacije.	Lithuania, Fast Digest, Thermo Scientific
XbaI	5'... T↓CTAGA ...3'	Osetljiv na dam metilaciju	Lithuania, Fast Digest, Thermo Scientific
SalI	5'... G↓TCGAC ...3'	Osetljiv na neke CpG kombinacije	Lithuania, Fast Digest, Thermo Scientific
PvuI	5'... CGAT↓CG ...3'	Osetljiv na neke CpG kombinacije	Lithuania, Fast Digest, Thermo Scientific
BglII	5'... GAT↓ATC ...3'	Nije osetljiv na metilacije.	Lithuania, Fast Digest, Thermo Scientific
DraI	5'... TTT↓AAA ...3'	Nije osetljiv na metilacije.	Lithuania, Fast Digest, Thermo Scientific

- CpG metilacija – metilacija na GpC mestu (deo genoma gde citozin prati guanin); dam metilacija - metilacija na N⁶ pozicija adenina u sekvenci GATC ; dcm metilacija - metilacija na C5 poziciji drugog citozina u sekvencama CCAGG i CCTGG

Restrikcija endonukleazama Fast Digest je vršena u trajanju od 10 do 15 minuta, sa odgovarajućim puferom za digestiju, vodom i određenom koncentracijom enzima prema preporuci proizvođača. U slučaju non-fast digest enzima inkubacija je vršena u trajanju od 1 do 2 h, takođe na 37 °C. Po završetku inkubacije DNK fragmenti su razdvojeni agarozna gel elektroforezom na 0,4 % i 2 % gelu sa etidijum bromidom, nakon čega su gelovi izloženi UV zracima u cilju vizuelizacije dobijenih traka i fotografisani.

U cilju komparacije RFLP profila odabranih *B. bronchiseptica* faga sa fagima ove vrste koji su do sada sekvencirani i skladišteni u GenBank-u, kao i profaga detektovanog pomoću PHAST algoritma (Zhou et al, 2011) u soju koji je korišćen kao domaćin pri izolaciji faga, korišćen je online bioinformatički softver u sklopu baze koja se zove Rebase (Roberts i sar,

2007). Rebase predstavlja veliku bazu podataka koja sadrži informacije o restrikcionim enzimima, DNK metiltransferazama i srodnim proteinima uključenim u biološke precese restrikcije-modifikacije. Ova baza takođe sadrži i bioinforamtički program koji omogućava teorijsku restrikcionu digestiju nukleinskih kiselina, tj. enzimsku digestiju DNK *in silico*. U program se unosi željena sekvenca u sirovom ili tzv. FASTA fromatu, maksimalne veličine 10 Mb, zatim se označava tip sekvence (linearna/cirkularna) i % gela za radvajanje fragmenata, a potom se pristupa analizi. Kao rezultat dobija se slika gela sa fragmentima DNK nastalim digestijom preko 400 različitih enzima, sa mogućnošću teorijske varijacije koncentracije agaroznog gela i preciznog utvrđivanja veličine dobijenih fragmenata.

4.11.3. UTVRĐIVANJE PRISUSTVA *cos* REGIONA

U cilju detekcije prisustva *cos* regiona u genomu faga, korišćena je metoda koju su opisali Casjens i Gilcrease (2009). Eksperiment se sastojao od toga da se DNK faga najpre enzimski razloži pomoću restrikcionog enzima. U tu svrhu za ovaj eksperiment paralelno, tj. odvojeno su korišćena dva enzima- EcoRV koji daje nekoliko većih fragmenata i SmaI koji seče DNK na više mesta i daje veći broj manjih fragmanata. Enzimski razložena DNK je podeljena u dve serije- u prvoj je DNK zagrejana na 80 °C tokom 15 min, dok je u drugoj DNK podvrgnuta zagrevanju na 65 °C tokom 10 minuta. U oba slučaja isečena DNK je podeljena u dve kivete. Nakon toga jedna kiveta je odmah stavljena na led, u cilju brzog hlađenja, dok je druga hlađena sporo u PCR aparatu od 80 °C do 24 °C , tj. od 65 °C do 24 °C tokom 40 minuta. Detekcija *cos* regiona vršena je i restrikcionom digestijom DNK pomoću enzima EcoRV nakon zagrevanja na 65 °C, odnosno brzog i sporog hlađenja. Nakon hlađenja, DNK je analizirana pomoću elektroforeze na agaroznom gelu.

U slučaju da fagi poseduju *cos* krajeve, dva fragmenta će biti vidljiva u uzorku koji je brzo ohlađen, dok će u uzorku koji je sporo ohlađen ti isti fragmenti izostajati ili će biti jako slabo vidljivi. U uzorku koji je sporije ohlađen dolazi do spajanja ova dva frgmenta u jedan veći, što se na gelu očituje gubitkom dve trake i pojavom nove čija je veličina jednaka zbiru traka koje su izgubljene (tj. koje su se spojile).

4.11.4. SEKVENCIONIRANJE GENOMA ODABRANIH BAKTERIOFAGA

U cilju utvrđivanja prirode faga (litički/umereni), taksonomske pripadnosti, razlika između izolovanih faga, moguće uloge faga u patogenosti bakterije, ali i karakterizacije njihovih lizina, nekoliko *B. bronchiseptica* faga je odabrano i njihovi genomi su kompletno sekvencionirani. DNK faga CN1, CN2, MW2, LK3 i FP1 je sekvencirana korišćenjem Illumina tehnologije sekvenciranja (eng. *Illumina next-generation sequencing*) koja koristi klonalnu amplifikaciju i sekvenciranje putem hemijske sinteze, pri čemu je proces sekvenciranja brz i veoma precizan. Proces sekvenciranja se sastoji od simultane identifikacije DNK baza i njihovovog umetanja u nukleinski lanac, a svaka baza emituje jedinstveni fluorescentni signal, što se koristi za determinaciju redosleda u DNK sekvenci.

De novo sklapanje sekvenciranih fragmenata vršeno je pomoću CLC Genomics Workbench 6.5 softvera. Predikcija otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frame*; ORF) vršena je korišćenjem bioinformatičkih softvera GeneMarkS, Glimmer i RAST (Besemer et al, 2001; Delcher et al, 1999; Aziz et al, 2008).

Analiza svakog ORF-a vršena je upotrebom BLAST algoritma (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*), koji omogućava komparaciju i identifikaciju nukleotidnih i proteinskih sekvenci sa postojećim sekvencama koje se nalaze u bazi (Altschul et al, 1990). Ovaj softver koristi heuristički metod za pronalaženje sličnih sekvenci putem lociranja kratkih preklapanja između dve sekvence.

Kompletne genomske sekvence *B. bronchiseptica* faga CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1 deponovane su u GenBank bazi podataka pod određenim pristupnim brojem.

4.11.5. KOMPARATIVNA GENOMIKA I FILOGENETSKA ANALIZA SEKVENCIONIRANIH FAGA

U cilju komparacije genomskih karakteristika između sekvenciranih *B. bronchiseptica* faga, ali i ovih faga sa drugim sličnim fagima, tj. genomima iz GenBank baze, korišćen je Progressive Mauve algoritam (Darling et al, 2004). Mauve algoritam prepoznaje konzervisane regione u genomu, preraspodele i inverzije u istim i precizno identifikuje mesta takvih preraspodela u genomima. Ovaj softver predstavlja multipli sistem za poravnavanje genoma koji prepoznaje i poravnava regione lokalne kolinearnosti, tzv. lokalne kolinearne blokove

(LCB), koji sadrže sekvence sa konzervisanim elementima, zajedničkim za sve genome uključene u analizu. Prilikom poravnavanja, Mauve program koristi ClustalW ili MUSCLE progresivne algoritme za poravnavanje svakog LCB-a.

Rezultati poravnavanja su prikazani u vidu horizontalnih panela u kojima se nalazi po jedna sekvenca genoma predstavljena u vidu blokova različitih boja i obojenim linijama koje izlaze iz njih. Ove linije predstavljaju region genomske sekvence, koji je poravnat sa delom drugog genoma, tj. koji je homologan tom delu genoma. U panelima se takođe nalaze nazivi i koordinate genoma.

Za utvrđivanje filogenetske sličnosti između sekvenciranih faga, korišćen je MEGA 7 softver (Kumar et al, 2016). Dendrogrami su konstruisani na osnovu celih DNK sekvenci faga i na osnovu semikonzervativnih proteinskih sekvenci pojedinačnih gena (eng. *tail tape length measure* proteina i glavnog proteina kapsida) (Smith et al, 2013). Sekvence su prethodno poravnate pomoću MUSCLE algoritma. Za konstruisanje dendrograma korišćen je Neighbor-Joining metod, Bootstrap metod sa 1000 Bootstrap replikacija i rutovanje na osnovu čega su fagi razvrstani u klastere.

Proteinske sekvence faga CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1 korišćene u izradi denrograma nalaze se u u priložima ove disertacije (9.4. i 9.5.).

4.11.6. DETEKCIJA POTENCIJALNIH TOKSINA I GENA ZA REZISTENCIJU NA ANTIBIOTIKE

U cilju detekcije potencijalnih gena koji kodiraju toksine i/ili gene za rezistenciju na antibiotike korišćeno je nekoliko bioinformatičkih softvera.

DBETH (eng. *Database of Bacterial Exotoxins for Human*) predstavlja bazu podataka koju čine sekvence, strukture, mreže interakcija i analitički podaci za više od 230 egzotoksina iz 26 različitih rodova bakterija patogenih za čoveka (Chakraborty et al, 2012). Svi toksini su klasifikovani u 24 različite klase. Ova baza pruža platformu za identifikaciju sekvenci sličnih potencijalnim egzotoksinima preko metoda koje su zasnovane na homologiji, kao i metoda koje nisu zasnovane na homologiji. Kod pristupa zasnovanog na homologiji, moguće je identifikovati sekvence slične potencijalnim toksinima, tako što će se ili pokrenuti BLASTp naspram sekvence toksina, ili + HMMER naspram domena toksina identifikovanog preko DBETH. Kod metoda koje nisu zasnovane na homologiji, deo DBETH koristi pristup

mehaničkog učenja da indentifikuje potencijalne egzotoksine (Toxin Prediction by Support Vector Machine based approach) (DBETH, 2015). Svi ORF faga CN1, CN2, MW2, LK3 i FP1 analizirani su u DBETH softveru. Prilikom istraživanja, sekvence su unošene u softver u FASTA formatu, a pri tom su korišćene sve navedene analize, kako bi imali što realniju sliku o potencijalnim toksinima kodiranim ispitivanim fagima.

BTXpred server takođe je korišćen u cilju detekcije potencijalnih toksina u genomima bakteriofaga. Server vrši predikciju bakterijskih toksina i njihove funkcije iz sekvenci nukleinske kiseline korišćenjem SVM, HMM i PSI-Blast algoritma. Pored toga, server omogućava predikciju toksina sa čak 96.07% tačnosti. Korisnicima omogućava i klasifikaciju egzotoksina u sedam različitih grupa, prema funkcijama na osnovu njihovih molekularnih meta, sa 100% tačnosti (BTXpred, 2015): 1. aktivatori adenilat ciklaze, 2. aktivatori guanilat ciklaze, 3. enterotoksini, 4. neurotoksini, 5. makrofagni citotoksini, 6. vakuolizirajući citotoksini i 7. tiol aktivni citotoksini.

4.12. UTVRĐIVANJE POJAVE NOVIH OSOBINA BAKTERIJA NAKON INFEKCIJE FAGIMA

U cilju ispitivanja uloge faga u lizogenoj konverziji bakterija izvršena je infekcija referentog i dva *B. bronchiseptica* soja poreklom iz patološkog materijala (ATCC 10580, Bbchiot i Bbr3416). Ispitivana je produkcija biofilma, kinetika hemolize, rezistencija na antibiotike, pokretljivost i hidroliza želatina inficiranih i neinficiranih sojeva.

4.12.1. INFEKCIJA SOJEVA FAGOM I POTVRDA INFEKCIJE

Nekoliko sojeva vrste *B. bronchiseptica* koji su osetljivi na fage (ATCC 10580, Bbchiot, 3416) i fag LK3 su inkubirani na 37 °C tokom 30 minuta pri multiplicitetima infekcije (MOI) 0,1, 1, 10 i 100, kako bi se bakterije inficirale fagom. Nakon isteka inkubacije, bakterija je zasejena metodom iscrpljivanja na MacConkey agar. Inficirane bakterije su najmanje dva puta subkultivisane, a potvrda infekcije fagom rađena je izolacijom genomske i plazmidne DNK pomoću komercijalnog kita (Thermo Scientific, Nemačka) i PCR-om i restrikcionom digestijom endonulkeazama genomske DNK bakterije. Za potvrdu infekcije putem PCR-a,

dizajnirana su dva para specifičnih prajmera na osnovu sekvenciranih genoma (Tabela 7). Za PCR je korišćena DNK izolovana iz inficiranih i neinficiranih bakterija, pri čemu je za pozitivnu kontrolu korišćena DNK faga. PCR reakcija se odvijala u PCR aparatu (Biometra, Nemačka), a uslovi u kojima je izvođena PCR amplifikacija odabranih gena je podrazumevala najpre inicijalnu denaturaciju na 94 °C 5 minuta, praćenu sa 30 reakcionih ciklusa (denaturacija na 94 °C 30 sekundi, vezivanje prajmera na 55 °C 30 sekundi, ekstenzija na 72 °C 30 sekundi) i finalnom ekstenzijom na 72 °C 7 minuta. Za kontrolu kvaliteta bakterijske DNK korišćen je par prajmera dizajniran na osnovu esencijalnog gena *recA* vrste *B. bronchiseptica* (eng. *housekeeping gene*) (Tabela 7). PCR amplifikacija *recA* gena podrazumevala je inicijalnu denaturaciju na 94 °C tokom 5 minuta, praćenu sa reakcionih ciklusa (denaturacija na 94 °C 30 sekundi, vezivanje prajmera na 55 °C 20 sekundi, ekstenzija na 72 °C 60 sekundi) i finalnom ekstenzijom na 72 °C tokom 7 minuta. Dobijeni produkti su razdvojeni na 1% agarozu gelu u 1xTAE puferu pri naponu od 120 V. Korišćen je standard od 100 bp u cilju određivanja veličine PCR produkta. Vizuelizacija i fotografisanje gela vršeno je pomoću BioDocAnalyze Transiluminatora (Biometra, Nemačka).

Tabela 7. Specifični prajmeri korišćeni za potvrdu infekcije fagima

Naziv prajmera	Sekvenca (5'→3')	Očekivani product (bp)
Bbr-F	AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A	241
Bbr-R	TGA CTT CAT GGT TGC CGT TC	
Hem-F	ACG CCC GAA CCG TTA TTT GG	170
Hem-R	CAT TTC CCC GCA ACT CGA CA	
RecA-F	5' ATGGCGACAACGAGGTGCGAA 3'	263
RecA-R	5' CAGCAGGTCGGTCAGGTTGA 3'	

Za dodatnu potvrdu infekcije sojeva fagom korišćena je restrikciona digestija genomske DNK inficiranih i neinficiranih bakterija FastDigest enzimom Sall (Thermo Scientific, Litvanija). DNK inficirane i neinficirane bakterije tretirane je enzimom Sall tokom 15 minuta na 37 °C, a zatim je razdvajanje fragmenata vršeno na 1% agarozu gelu. Ovaj enzim seče DNK bakterije na veliki broj manjih fragmenata koji se na gelu manifestuju u vidu smira. Isti enzim nema restrikciono mesto u genomu faga, što se na gelu vidi kao jasna traka, čija veličina odgovara veličini genoma faga.

U ovom eksperimentu kao kontrole su korišćene genomska DNK neinficirane bakterije tretirana enzimom Sall i genomska DNK faga tretirana istim enzimom.

U cilju ispitivanja stabilnosti lizogena korišćena je gore opisana PCR metoda. U tu svrhu bakterijski sojevi inficirani fagom, ATCC 10580/LK3, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3 subkultivisani su nekoliko puta u kontinuitetu na LBB, a nakon rasta kulture iz svakog soja izolovana je genomska DNK. Posle šestog presejavanja, PCR-om je utvrđeno prisustvo ili odsustvo faga u genomima ispitvanih *B. bronchiseptica* sojeva. Pored toga, DNK drugih izolovanih faga korišćena je kao templejt kako bi se potvrdilo prisustvo ciljanih gena u genomu faga ali i prisustvo eventualnih razlika između faga.

4.12.2. BIOFILM INFICIRANIH I NEINFICIRANIH SOJEVA

Potencijal formiranja biofilma inficiranih (ATCC 10580/LK3, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) i neinficiranih sojeva *B. bronchiseptica* (ATCC 10580, BbChiot i Bbr3416) analizirana je modifikovanom metodom sa kristal violetom u mikrotitar pločama sa ravnim dnom (Stjepanovic et al, 2000).

Bakterije su gajene u LB podlozi na 37 °C tokom 48 h. Nakon inkubacije bakterije su isprane u destilovanoj vodi tri puta, a zatim je brojnost bakterija podešena na 10^3 , 10^5 i 10^7 . U dve odvojene mikrotitar ploče paralelno je dodavano 200 µl bakterija odgovarajuće brojnosti. Obe mikrotitar ploče su postavljene na inkubaciju na 37 °C, jedna tokom 24 h, druga tokom 48 h. Negativnu kontrolu je u eksperimentu predstavljala sterilna LB podloga (200 µl), a pozitivna podloga sa referentnim sojem vrste *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Nakon isteka inkubacije, svi otvori, uključujući one u kojima se nalazila kontrola, isprani su tri puta sa fosfatnim puferom (pH 7,4) kako bi se uklonile ćelije koje nisu deo biofilma. Formirani biofilm je fiksiran sa 150 µl metanola tokom 15 minuta. Po isteku vremena metanol je uklonjen, a ploča je postavljena u termostat na 44 °C tokom 20 min radi sušenja. Osušena ploče je bojena 0,4 % rastvorom kristal violeta tokom 15 minuta, a potom je boja uklonjena mlazom tekuće vode sve do prestanka ispiranja boje. Ploča je ponovo vraćena na sušenje u termostat na 44 °C tokom 15-20 minuta, a zatim je u svaki otvor dodavano 150 µl 33 % sirćetne kiseline kako bi se boja spontano oslobodila. Apsorbanca je očitavana na Multiscan GO (Thermo Scientific, USA) čitaču mikrotitar ploča na 595 nm.

Eksperiment je rađen u triplkatu, u tri nezavisna ponavljanja. Rezultati su predstavljeni u vidu histograma kao srednje vrednosti apsorbance sa S.D.

4.12.3. KINETIKA HEMOLIZE

Vrsta *B. bronchiseptica* daje hemolizu na čvrstim podlogama koje sadrže krv različitih sisara (Goodnow, 1980). U ovom eksperimentu je ispitivano da li postoji značajna razlika hemolize eritrocita od strane inficiranih i neinficiranih sojeva. Za pravljenje krvnog agara korišćena je ovčija i goveđa krv. Krvni agar je inokulisan sa bakterijama, a ploče su inkubirane tokom 24 h na 37 °C i zabeležene su promene.

Kinetika hemolize eritrocita goveda, ovaca i pacova analizirana je za inficirani (ATCC 10580/LK3) i neinficirani soj (ATCC 10580) prema metodi opisanoj od strane Janda i Abbott (1993). Eksperiment je podrazumevao pravljenje 1 % rastvora eritrocita u 0.9 % NaCl-u, nakon čega je rastvor eritrocita pomešan sa bakterijama čija brojnost je odgovarala 1.5 McFarlanda. Dobijena smeša je inkubirana na 37 °C u trajanju od 48 h. Po isteku inkubacije, kvantifikovan je oslobođeni hemoglobin pomoću Multiscan GO čitača mikrotitar ploča (Thermo Scientific, USA) na 540 nm. Kao pozitivna kontrola korišćen je 1 % rastvor SDS-a, a kao negativna kontrola 0,9 % NaCl. Dobijene vrednosti su analizirane u programu STATISTICA 12.0, pri čemu je korišćen t-test radi utvrđivanja statistički značajnih razlika u hemolizi eritrocita.

4.12.4. ANTIBIOGRAM INFICIRANIH I NEINFICIRANIH SOJEVA

Za utvrđivanje razlika između inficiranih (ATCC 10580/LK3, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) i neinficiranih sojeva *B. bronchiseptica* (ATCC 10580, BbChiot i Bbr3416) u pogledu osetljivosti na antibiotike korišćena je disk difuziona metoda i određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

Testiranje osetljivosti inficiranih i neinficiranih sojeva na antibiotike disk difuzionom metodom (Bauer-Kirby test) vršeno je prema CLSI protokolu (2007). U tu svrhu korišćeni su antibiotici iz grupe beta-laktama, aminoglikozida, tetraciklina, fluorohinolona, makrolida, hloramfenikola, karbapenema i sulfonamida, proizvođača Bioanalyse (Turska). Od beta laktama korišćeni su ampicilin (10 µg), amoksicilin (25 µg), amoksicilin/klavulanska kiselina

(20/10 µg), cefaleksin (30 µg), cefoksitin (30 µg), ceftazidim (30 µg) i cefotaksim (30 µg); od aminoglikozida amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), streptomycin (10 µg), kanamicin (30 µg), tobramicin (10 µg), netilmicin (30 µg) i neomicin (30 µg). Kao predstvanik klase tetraciklina korišćeni su tetraciklin (30 µg) i doksiciklin (30 µg), od fenikola hloramfenikol (30 µg), dok je ciprofloksacin (5 µg) korišćen kao predstvanik fluorohinolona. Od karbapenema je u svrhu eksperimenta korišćen imipenem (10 µg), od makrolida aztreonam (30 µg) i od sulfonamida sulfametaksazol/trimetoprim (23,75/1,25 µg). Kao podloga korišćen je komercijalni dehidrirani Mueller-Hinton agar (Torlak, Srbija) razliven u petri ploče u debljini od 4 mm. Bakterija je gajena u LB podlozi na 37 °C tokom 48 h. Za dobijanje inokuluma određenog zamućenja korišćen je standard 0,5 McFarland-a. Inokulacija suspenzije vršena je *pour and distribute* metodom, koja podrazumeva prelivanje površine agara sa nekoliko mililitara suspenzije, tako da je u potpunosti prekrije, a potom aspiraciju viška suspenzije. Nakon inokulacije petri ploče su ostavljane da se osuše na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta, a potom su na inokulisanu površinu, stavljeni diskovi sa antibioticima. Referentni soj *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 korišćen je za kontrolu ove metode. Osetljivost svakog izolata ispitivana je na tri petri ploče. Pripremljene petrijeve ploče inkubirane su u obrnutom položaju u termostatu na 37 °C tokom 24h. Nakon inkubacije meren je prečnik zone inhibicije oko diska sa antibiotikom i određena je osetljivost inficiranih i neinficiranih sojeva.

Čitav eksperiment je rađen u dva nezavisna ponavljanja, a dobijene vrednosti su analizirane u programu STATISTICA 12.0, pri čemu je korišćen t-test radi utvrđivanja razlika u osetljivosti na testirane antibiotike između inficiranog i neinficiranog soja. Rezultati su prikazani tabelarno kao srednje vrednosti \pm S.D.

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) antibiotika vršeno je primenom modifikovane mikrodilucione metode (NCCLS, 2003; CLSI, 2007), za amoksicilin/klavulansku kiselinu (Mediochemie, Kipar), ceftazidim (PharmaSwiss, Švajcarska) i streptomycin sulfat (Sigma-Aldrich, Nemačka). Bakterijske suspenzije gustine 0,5 McFarland (2×10^8 CFU mL⁻¹) su razređene u dvostruko koncentrovanom Mueller Hinton bujonu (HiMedia, Indija) u odnosu 1:100 (v/v). Ovako inokulisana podloga dodata je u bunarčiće mikrotitar ploče u zapremini od 100 µL tako da je brojnost bakterija u svakom bunarčiću iznosila oko 1×10^6 CFU ml⁻¹. Isti volumen dvostrukih razređenja antibiotika u vodi dodat je u bunarčiće mikrotitar ploče, pri čemu se finalna koncentracija svakog antibiotika u mikrotitar pločama kretala u opsegu od 0,125 do 256 mgL⁻¹. Mikrotitar ploče su inkubirane tokom 24 h

na 37 °C, nakon čega je u svaki bunarčić ploče dodato 10 µL 1 % rastvora 2,3,5-trifenil tetrazolium hlorida (TTC-a), koji se dehidrogenazama vijabilnih bakterijskih ćelija redukuje do formazana crvene boje. Nakon dodatne inkubacije u trajanju od 2 h na 37 °C, očitana je MIC vrednost za svaki antibiotik. Najmanja koncentracija antibiotika potrebna da spreči pojavu crvene boje formazana smatrana je MIC vrednošću. Referentni soj *Escherichia coli* ATCC 25922 korišćen je za kontrolu ove metode. Eksperiment je rađen u tri nezavisna ponavljanja. Dobijeni rezultati su predstavljeni tabelarno kao vrednosti geometrijske sredine.

4.12.5. ISPITIVANJE POKRETLJIVOSTI INFICIRANIH BAKTERIJA

U cilju sagledavanja što realnije slike o ulozi faga u patogenosti bakterije, pored formiranja biofilma, kinetike hemolize i rezistencije na antibiotike, i druge fenotipske karakteristike su ispitivane i beležene kod bakterija koje su inficirane fagom.

Pokretljivost pilima, ili trzajuće kretanje, ispitivano je korišćenjem LB čvrste podloge sa 1,5 % agara, razlivene u petrijevu posudu. Inficirane (ATCC 10580/LK3, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) i neinficirane bakterije (ATCC 10580, BbChiot i Bbr3416) zasejane su ubodom u centar ploče u duplikatu, u dva nezavisna ponavljanja. Ploče su postavljene na inkubaciju (37 °C tokom 48 h). Nakon isteka inkubacije izmerena je i zabeležena zona zamućenja, tj. rasta na dodiru podloge i stakla na dnu petrijeve ploče. Kao kontrola korišćen je referentni soj vrste *P. aeruginosa* PAO1. Rezultati ispitivanja trzajućeg kretanja prikazani su tabelarno kao srednje vrednosti prečnika rasta \pm S.E.

Pokretljivost flagelama ispitivana je upotrebom LBA podloge sa 0,3 % agara u pertijevim posudama. Podloge su inokulisane inficiranim i neinficiranim bakterijama pomoću igličaste eze iz tečne kulture, u duplikatu i u dva nezavisna ponavljanja. Ploče su inkubirane na 37 °C tokom 48 h. Po isteku inkubacije izmerena je zona sa difuznim zamućenjem. Rezultati ispitivanja pokretljivosti predstavljeni tabelarno kao srednje vrednosti prečnika rasta \pm S.E.

Produkcija fimbrija ispitana je modifikovanom metodom opisanom od strane Jain i Chen (2007). Bakterije su zasejane na LBA podlogu koja sadrži 0,5 % NaCl-a, a potom paralelno inkubirane na 26 °C i 37 °C tokom pet dana, kako bi se utvrdile razlike u produkciji

fimbrija. Nakon isteka inkubacije, bakterije su suspendovane u fiziološkom rastvoru, tako da njihova brojnost bude $\sim 1 \times 10^9$. Bakterijska suspenzija je potom centrifugirana (16,000xg, 10 min), a dobijeni pelet je resuspendovan u 0,002 % rastvoru kongo-crvenog tokom 10 minuta. Rastvor je ponovo cetrifugiran, a absorbanca dobijenog supernatanta je izmerena na 500 nm. Rezultati su predstavljeni kao procenat redukcije koncentracije kongo-crvenog, koje su vezale fimbrije, u odnosu na sterilan rastvor boje bez bakterija. Kao kontrola korišćen je referentni soj vrste *E. coli* ATCC 25922.

4.12.6. ISPITIVANJE HIDROLZE ŽELATINA INFICIRANIH BAKTERIJA

Mogućnost hidrolize želatina ispitivana je korišćenjem komercijalne podloge Hranljivi želatin životinjskog porekla (Torlak, Srbija). Podloga sa želatinom je razlivena u epruvete, a nakon hlađenja inokulacija bakterija je vršena pomoću igličaste eze. Epruvete su inkubirane tokom 48 h na 37 °C. Nakon inkubacije epruvete su ostavljene u frižideru tokom 30 minuta, a potom je vršeno očitavanje rezultata Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni soj vrste *P. aeruginosa* PAO1, dok je za negativnu kontrolu korišćen referentni soj vrste *E. coli* ATCC 25922.

4.13. *In vitro* ISPITIVANJE LITIČKE EFIKASNOSTI ODABRANIH BAKTERIOFAGA

Litička efikasnost faga ispitivana je metodom dvostepene inkubacije u mikrotitar pločama sa TTC-om i modifikovanom metodom u mikrotitar pločama sa kristal violetom u cilju testiranja efekta faga na formiranje i već formirani biofilm ATCC 10580 *B. bronchiseptica* soja.

4.13.1. DVOSTEPENA INKUBACIJA U MIKROTITAR PLOČAMA SA TTC-OM

Litička efikasnost bakteriofaga CN2, MW2, LK3 i FP1, ispitana je metodom koju je opisao McLaughlin (2007), a modifikovali Knezevic i sar. (2011). Eksperiment je izvođen u sterilnim mikrotitar pločama sa ravnim dnom i 96 otvora. Litička efikasnost faga je ispitana na originalnom domaćinu *B. bronchiseptica* ATCC 10580. U kolone je sipano 100 μ l bakterije

u dvostruko koncentrovanu LB podlogu (2xLBB) (brojnosti $\sim 1 \times 10^5$ CFUml⁻¹), dok je u redove dodavana ista zapremina desetostepenih razređenja bakteriofaga, tako da je brojnost faga u svakoj sledećoj koloni bila 10 puta veća. Desetostepena razređenja faga su pripremana u SM puferu. Brojnost faga u velovima kretala se od 1×10^1 do 1×10^6 , tako da je litička efikasnost faga ispitivana pri vrednostima MOI od 0.0001 do 10, u dva ponavljanja. Pozitivna kontrola je podrazumevala kombinaciju bakterija i SM pufera bez faga, dok je negativna kontrola predstavljala kombinaciju SM pufera i 2xLBB podloge. Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C, u sve otvore ploče dodat je 2,3,5-trifenil tetrazolijum hlorid (TTC), tako da njegova krajnja koncentracija u svakom otvoru bude 50 µg, nakon čega je usledila inkubacija u trajanju od 4 h. U toku ovog perioda došlo je do redukcije TTC-a posredstvom dehidrogenaza živih bakterija, pri čemu je nastao formazan crvene boje. Po završetku inkubacije očitavana je apsorbance u svim otvorima pomoću Multiscan GO (Thermo Scientific) čitača mikrotitar ploča na 540 nm

Dobijene apsorbance su korišćene za utvrđivanje litičke efikasnosti faga. Srednja vrednost negativnih kontrola oduzeta je od svih apsorbanci i od apsorbance pozitivnih kontrola. Odnos srednje apsorbance identičnih tretmana i srednje vrednosti pozitivnih kontrola pomnožen je sa sto, a dobijena vrednost je potom oduzeta od 100%, kako bi se dobio procenat inhibicije rasta. Eksperiment je urađen za svaki fag u duplikatu, u namanje dva ponavljanja. Rezultati su prikazani grafički kao srednje vrednosti dva nezavisna eksperimenta sa S.D.

4.14. EFEKAT FAGA NA BIOFILM

Određivanje efekta faga na *B. bronchiseptica* biofilm vršeno je ispitivanjem efekta faga na formiranje i već formirani biofilm referentog ATCC 10580 soja.

4.14.1. EFEKAT NA FORMIRANJE BIOFILMA

Određivanje efekta faga na proces formiranja biofilma ispitivana je modifikovanom metodom u mikrotitar pločama, koja se koristi za procenu potencijala bakterija da formiraju biofilm (Knežević i Petrović, 2008). Efekat faga CN2, LK3 i FP1 ispitivan je na originalnom

domaćinu *B. bronchiseptica* ATCC 10580. Sadržaj vela bio je identičan prethodno opisanom za određivanje litičke efikasnosti faga. Bakterija je gajena u LBB podlozi, a nakon inkubacije, svaki otvor je ispran tri puta sa 1xPBS (pH 7,4), nakon čega su ploče osušene, a zatim i fiksirane sa 150 µl metanola u trajanju od 15 minuta. Nakon toga metanol je uklonjen, ploče su isprane destilovanom vodom i osušene, a zatim su obojene sa 150 µl 0,4 % rastvora kristal violeta u trajanju od 20 minuta. Nakon isteka vremena, boja je uklonjena mlazom vodovodske vode, sve do prestanka ispiranja boje. Ploče su osušene u termostatu na 44 °C tokom 20 minuta, a potom je u svaki otvor dodato 150 µl 33 % sirćetne kiseline, kako bi se boja spontano ratvorila. Nakon 20 minuta, apsorbance u otvorima su merene pomoću Multiscan GO (Thermo Scientific) čitača mikrotitar ploča na 595 nm.

Svaka kombinacija faga i bakterije radjena je u dva nezavisna ponavljanja, a ceo eksperiment je rađen u duplikatu. Rezultati su prikazani grafički, a izračunavanja su identična onima pri određivanju litičke efikasnosti faga.

4.14.2. EFEKAT NA FORMIRANI BIOFILM

Efekat faga CN2, LK3, MW2 i FP1 na formirani biofilm ispitan je na način sličan prethodno opisanom, ali je u velove dodavana samo bakterija, koja je inkubirana tokom 24 h na 37 °C. Nakon isteka inkubacije svi otvori su isprani tri puta sa 1xPBS (pH 7,4), a zatim je u otvore dodata suspenzija faga odgovarajuće brojnosti i 2xLBB podloga. Ploča je zatim ponovo vraćena na inkubaciju na 37 °C tokom 24 h. Po isteku inkubacije otvori u pločama su isprani tri puta korišćenjem 1xPBS (pH 7,4), a biofilm je kvantifikovan na prethodno opisan način.

Svaka kombinacija brojnosti faga i bakterija je urađena u duplikatu, a ceo eksperiment je izveden u dva nezavisna ponavljanja. Rezultati su predstavljeni grafički, a izračunavanja su vršena kao što je prethodno opisano za litičku efikasnost faga.

4.15. *In silico* KARAKTERIZACIJA ENDOLIZINA FAGA

U svrhu *in silico* karakterizacije endolizina pet odabranih faga CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1 korišćeno je nekoliko bioinforamtičkih servera i programa.

U MEGA 7 je konstruisan dendrogram na osnovu proteinske sekvence endolizina *B. bronchiseptica* faga i endolizina nekoliko *Pseudomonas* faga iz GeneBank baze podataka, koji su pokazali sličnost sa *B. bronchiseptica* fagima (Kumar et al, 2016). Za konstruisanje dendrograma korišćen je Neighbor Joining test sa 1000 Bootstrap replikacija i rutovanje na osnovu kojih su endolizini razvrstani u klastere.

SignalP 3.0 Server je korišćen za predikciju signalnih peptida na osnovu primarne strukture proteina, tj. aminokiselinske sekvence (Bendtsen et al, 2004). Cilj ove analize bio je da se utvrdi eventualno prisustvo signalne peptidne sekvence u endolizinu *B. bronchiseptica* faga.

SWISS-MODEL server je korišćen za modelovanje trodimenzionalne strukture endolizina, koristeći kao template eksperimentalno utvrđene strukture predstavnika iz srodnih familija (Guex et al, 2009). Za potrebe ove analize korišćena je aminokiselinska sekvenca endolizina *B. bronchiseptica* faga, tj. primarna struktura endolizina.

Proteinske sekvence endolizina faga CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1 korišćene za *in silico* karakterizaciju nalaze se u u prilogu ove disertacije (9.6.).

5. REZULTATI

U radu je izolovano ukupno 29 *B. bronchiseptica* faga iz familije *Siphoviridae*. Svim fagima je određen litički spektar i EOP (eng. *efficiency of plating*). Nekoliko odabranih faga je detaljno okarakterisano i njihovi genomi su sekvencionirani, u skladu sa ciljevima rada.

5.1. REZULTATI IZOLACIJE *B. bronchiseptica* BAKTERIOFAGA

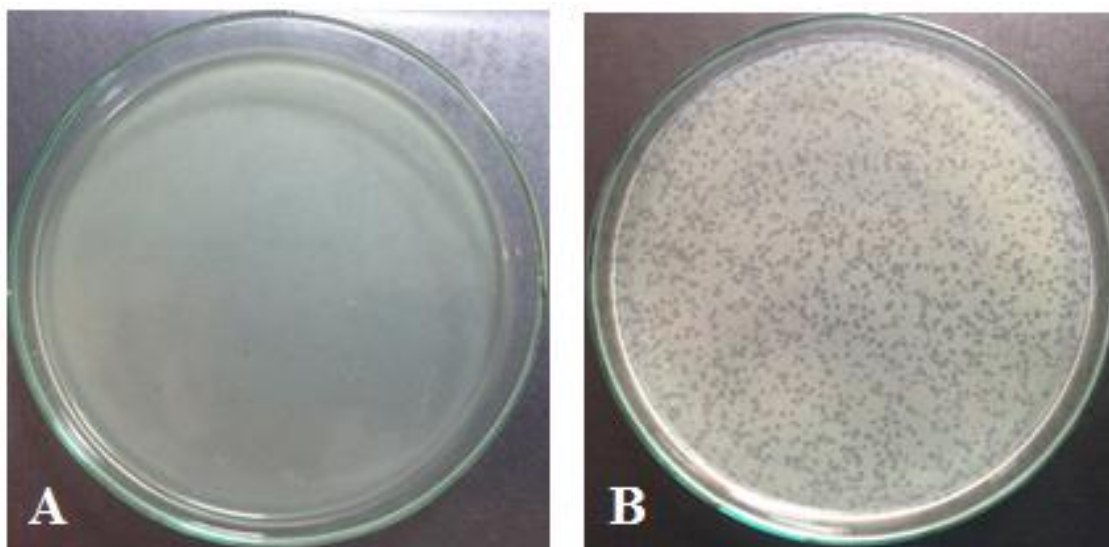
Fagi su uspešno izolovani iz 44,6 % uzoraka (29 od 66) (Tabela 8). Uspešnost izolacije bila je najveća iz komunalnih otpadnih voda i ribnjaka, s obzirom na to da su fagi izolovani iz 83,3 % ovih uzorka. Ni jedan fag nije izolovan iz otpadnih voda svinjskih farmi i morske vode. Fagi su uspešno izolovani i iz uzoraka jezerske vode (55,6 %), a manji broj izolata je dobijen iz vode močvara, potoka i irigacionih kanala (50,0 %). Relativno uspešna izolacija faga zabeležena je i iz uzoraka rečne vode (30,8 %). S druge strane, najmanji broj pozitivnih uzoraka je vodio poreklo iz životinjskih pojila (15,4 %).

Tabela 8. Uspešnost izolacije faga iz uzoraka površinskih voda

Poreklo uzorka	Broj uzoraka	Broj izolovanih faga	Oznaka faga
Reke	13	4	vB_BbrS_RV1; vB_BbrS_RV2; vB_BbrS_RV3; vB_BbrS_RV4
More	1	0	-
Jezera	9	5	vB_BbrS_LK1; vB_BbrS_LK2; vB_BbrS_LK3; B_BbrS_LK4; vB_BbrS_LK5
Ribnjaci	6	5	vB_Bbr_FP1; vB_BbrS_FP2; vB_BbrS_FP3; vB_BbrS_FP4; vB_BbrS_FP5
Močvare	4	2	vB_BbrS_SW1; vB_BbrS_SW2
Potoci	6	3	vB_BbrS_CR1; vB_BbrS_CR2; vB_BbrS_CR3
Irigacioni kanali	6	3	vB_BbrS_CN1; vB_BbrS_CN2; B_BbrS_CN3
Životinjska pojila	13	2	vB_BbrS_TR1; vB_BbrS TR2
Otpadne vode svinjskih farmi	2	0	-
Komunalne otpadne vode	6	5	vB_BbrS_MW1; vB_BbrS_MW2; vB_BbrS_MW3; vB_BbrS_MW4; vB_BbrS_MW5

Iz svakog uzorka koji je dao plake, izolovan je po jedan plak koji je prebačen u kivete sa 1 ml SM pufera i 0,5 % hloroforma, kako bi se izvršila liza bakterija i kako bi se fagi u neliziranim ćelijama oslobodili u cilju povećanja njihove brojnosti. Izolovani fagi su čuvani na +4 °C do dalje upotrebe.

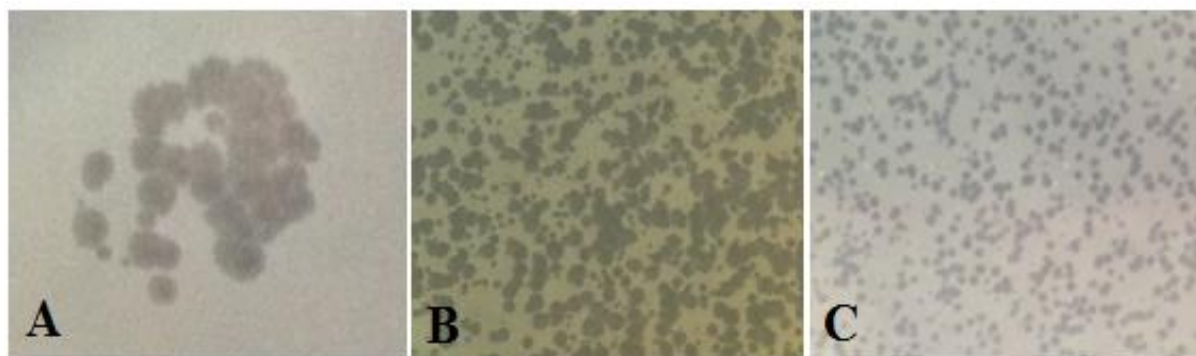
Da bi se dokazalo da su fagi izolovani iz prirodne sredine, nekoliko odabranih uzoraka je zagrejano (100 °C tokom 20 minuta). Odsustvo faga u ovako tretiranim uzorcima u odnosu na netretirane ukazalo je da fagi nisu indukovani iz bakterije i da vode poreklo iz prirodne sredine (Slika 22).



Slika 22. Izolacija bakteriofaga iz uzorka tretiranog visokom temperaturom (100 °C) tokom 20 minuta (A) i netretiranog uzorka (B).

5.2. REZULTATI LITIČKOG SPEKTRA BAKTERIOFAGA

Litički spektar faga je ispitivan korišćenjem 11 homolognih i 14 heterolognih domaćina. Na originalnom domaćinu, svi fagi su formirali prozirne plake dijametra 0,5-2 mm, dok su na alternativnim domaćinima zabeležene uglavnom zamućene ili plake sa halom (Slika 23). Veličina plaka različitih faga bila je uglavnom uniformna i kretala se kretala od 0,5 do 2 mm. Dobijeni rezultati ukazuju da *B. bronchiseptica* fagi poseduju uzak i umeren litički spektar.

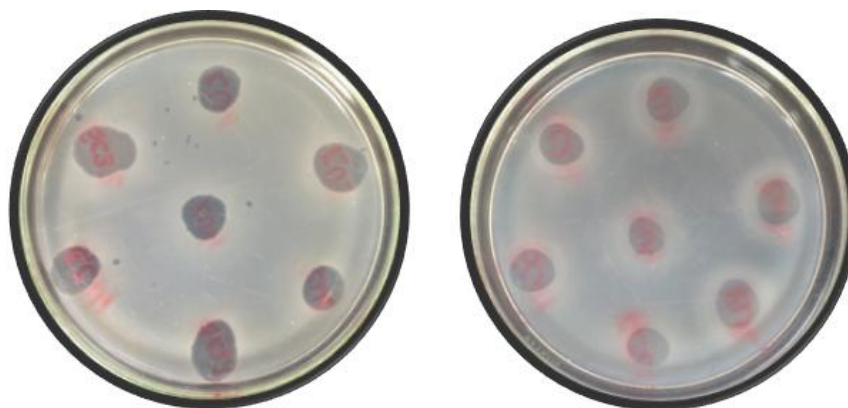


Slika 23. Izgled plaka: A) bakteriofag MW2 na alternativnom domaćinu Bbchiot; B) bakteriofag LK5 na originalnom domaćinu ATCC 10580; C) bakteriofag CR3 na originalnom domaćinu ATCC 10580.

Rezultati ispitivanja litičkog spektra na heterolognim domaćinima prikazani su u tabeli 9 i slici 24. Od 12 sojeva domaćina, uključujući i originalnog domaćina, fagi su mogli da inficiraju najviše 5 sojeva, dok 7 sojeva nije bilo osetljivo na infekciju ni jednim izolovanim fagom.

Primenom spot metode i inkubacijom faga sa alternativnim domaćinima na 37 °C, lizirano je 3-5 sojeva *B. bronchiseptica*. Na osnovu litičkog profila, izdvojene su tri različite grupe faga: u prvu grupu su svrstani fagi koji su lizirali 25 % sojeva (16 izolata faga), dok su u drugu i treću grupu svrstani fagi koji su lizirali 33,3 % sojeva (druga grupa je obuhvatila 11 i treća 2 izolata faga).

Ispitivanjem litičkog spektra faga na alternativnim domaćinima na 25 °C izdvojilo se čak šest različitih grupa faga, odnosno 6 različitih litičkih profila. U prve tri grupe spadaju fagi koji su mogli da se multipliciraju na 33,3 % sojeva (13 faga u prvoj, 2 u drugoj i 1 u trećoj grupi); četvrtu grupu faga čine izolati koji su lizirali čak 41,7 % sojeva (11 faga), dok petu i šestu grupu čine fagi koji su lizirali 25 % homolognih sojeva (po 1 fag u obe grupe).



Slika 24. Ispitivanje litičkog spektra spot metodom: prozirne litičke zone na originlanom domaćinu, *B. bronchiseptica* ATCC 10580 (levo); mutne litičke zone sa halom na alternativnom *B. bronchiseptica* Bbchiot domaćinu (desno).

Fagi nisu formirali litičke zone na heterolognim domaćinima iz familije *Enterobacteriaceae*, *Alcaligenaceae* i *Moraxelaceae*, kao ni na dve ispitivane vrste Gram pozitivnih bakterija.

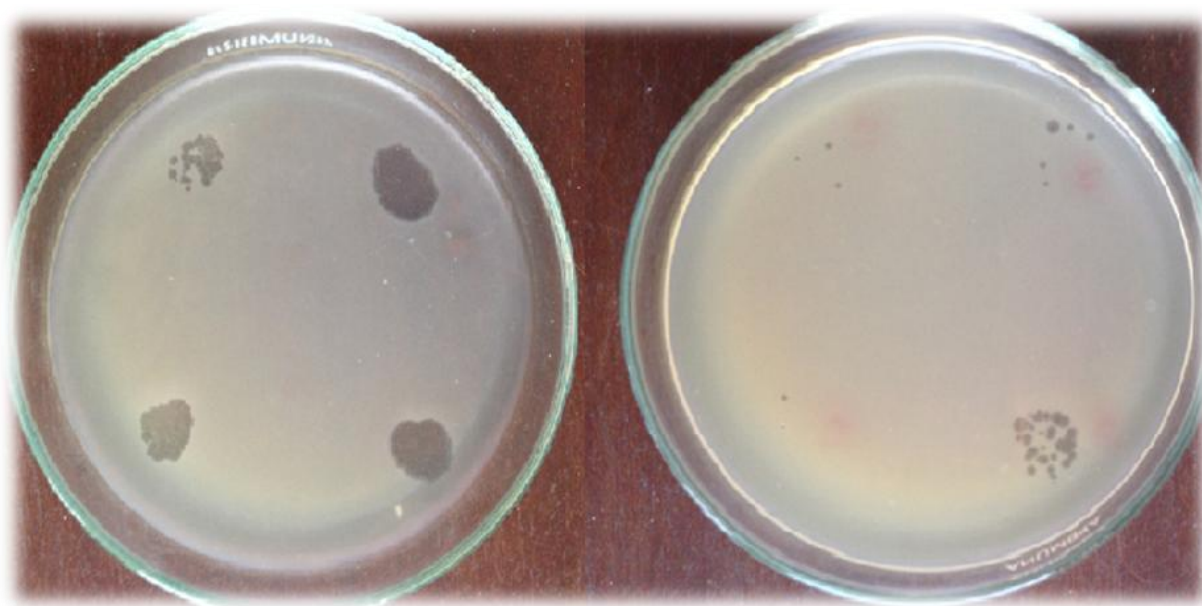
Tabela 9. Litički spektar *B. bronchiseptica* faga

Vrsta bakterije	Oznaka soja	Litička grupa								
		37 °C			25 °C					
		I grupa	II grupa	III grupa	I grupa	II grupa	III grupa	IV grupa	V grupa	VI grupa
		vB_BbrS_CN1	vB-BbrS_CR1	vB_BbrS_FP5	vB_BbrS_CN1	vB_BbrS_MW1	vB_BbrS_CN2	vB_BbrS_CN3	vB_BbrS_FP1	vB_BbrS_LK5
		vB_BbrS_CN2	vB_BbrS_FP1	vB_BbrS_TR2	vB_BbrS_CR1	vB_BbrS_RV1		vB_BbrS_CR2		
		vB_BbrS_CN3	vB_BbrS_P4		vB_BbrS_CR3			vB_BbrS_FP4		
		vB_BbrS_CR2	vB_BbrS_K1		vB_BbrS_P2			vB_BbrS_FP5		
		vB_BbrS_CR3	vB_BbrS_LK2		vB_BbrS_LK2			vB_BbrS_LK1		
		vB_BbrS_FP2	vB_BbrS_LK3		vB_BbrS_LK3			vB_BbrS_LK4		
		vB_BbrS_FP3	vB_BbrS_LK5		vB_BbrS_MW4			vB_BbrS_MW2		
		vB_BbrS_LK4	vB_BbrS_MW1		vB_BbrS_RV2			vB_BbrS_MW3		
		vB_BbrS_MW3	vB_Bbrs_MW2		vB_BbrS_RV3			vB_BbrS_MW5		
		vB_BbrS_MW5	vB_BbrS_MW4		vB_BbrS_SW1			vB_BbrS_RV4		
		vB_BbrS_RV1	vB_BbrS_RV4		vB_BbrS_SW2			vB_BbrS_TR2		
		vB_BbrS_RV2			vB_BbrS_TR1					
		vB_BbrS_RV3			vB_BbrS_FP3					
		vB_BbrS_SW1								
		vB_BbrS_SW2								
		vB_BbrS_TR1								
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	L:594	-	-	+	-	+	+	+	-	-
	SEI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S2	-	+	-	+	-	+	+	-	+
	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LORD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	973	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BbChiot	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	CV1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3416	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	DEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10580ⁱ	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Druge vrste		-	-	-	-	-	-	-	-	-

++prozirne plake; + prozirne plake sa halom ili mutne plake; bez reakcije;ⁱoriginalni domaćin faga ATCC 10580

5.3. REZULTATI EFIKASNOSTI FORMIRANJA PLAKA NA HOMOLOGNIM ALTERNATIVNIM DOMAĆINIMA

Rezultati efikasnosti formiranja plaka (eng. *efficiency of plating*, skraćeno EOP) *B. bronchiseptica* bakteriofaga prikazani su na slici 25 i u tabeli 10.



Slika 25. Određivanje EOP spot metodom na alternativnom *B. bronchiseptica* Bbchiot domaćinu

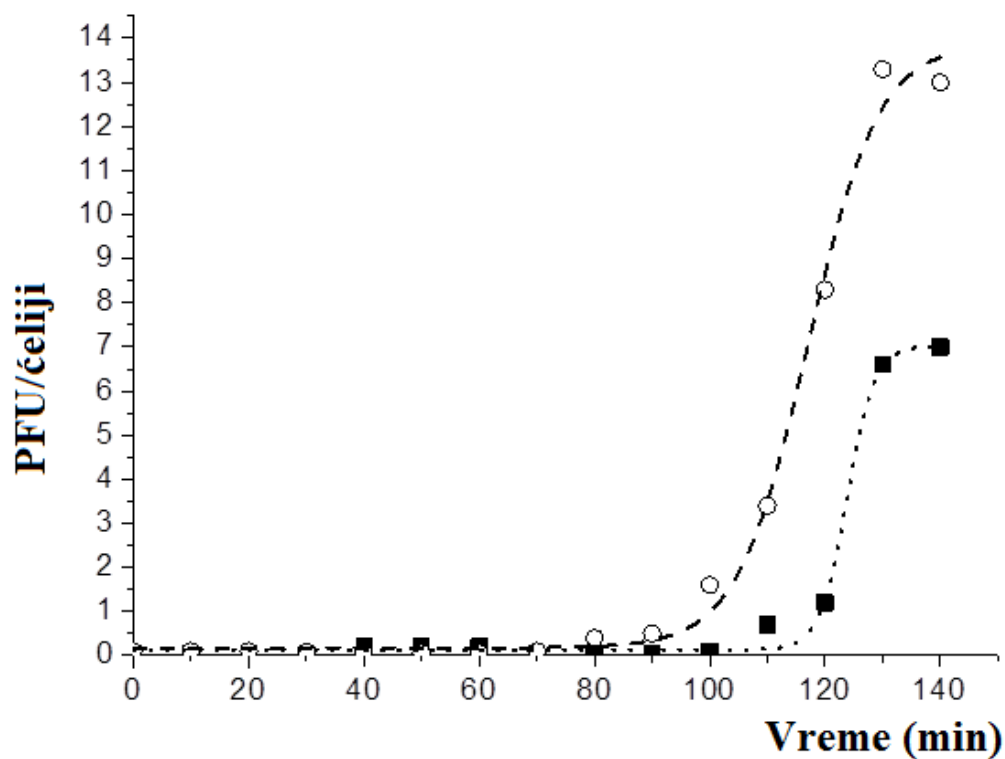
B. bronchiseptica fagi pokazali su različit EOP na alternativnim domaćinima. Naime, čak šest faga je pokazalo veću efikasnost formiranja plaka na alternativnim domaćinima (Bbchiot i Bbr3416) u odnosu na referentni soj, koji je bio originalni domaćin (EOP=10 i 100). Veliki broj faga je pokazao jednaku efikasnost lize na originalnom i dva alternativna domaćina (EOP=1). Kao što je i očekivano, većina faga je pokazala niži EOP u odnosu na originalnog domaćina, sa vrednostima od 0,001 do 0,1.

Tabela 10. Efikasnost lize *B. bronchiseptica* faga na alternativnim domaćinima

<i>B. bronchiseptica</i>	EOP					
alternativni domaćini	100	10	1	0,1	0,01	0,001
BbChiot	vB_BbrS_LK4	vB_BbrS_CN1 vB_BbrS_CR3 vB_BbrS_LK5 vB_BbrS_MW3	vB_BbrS_CN2 vB_BbrS_CN3 vB_BbrS_FP1 vB_BbrS_FP3 vB_BbrS_LK2 vB_BbrS_MW2 vB_BbrS_RV1 vB_BbrS_RV4 vB_BbrS_SW2 vB_BbrS_TR1 vB_BbrS_TR2 vB_BbrS_MW5	vB_BbrS_CR2 vB_BbrS_FP5 vB_BbrS_LK1 vB_BbrS_LK3 vB_BbrS_MW1 vB_BbrS_MW4 vB_BbrS_RV3 vB_BbrS_SW1	vB_BbrS_CR1 vB_BbrS_FP4 vB_BbrS_RV2	vB_BbrS_FP2
3416	-	vB_BbrS_FP1 vB_BbrS_LK5	vB_BbrS_CN3 vB_BbrS_CR3 vB_BbrS_FP2 vB_BbrS_LK4 vB_BbrS_RV1 vB_BbrS_TR1 vB_BbrS_TR2	vB_BbrS_CN2 vB_BbrS_CR2 vB_BbrS_FP3 vB_BbrS_FP5 vB_BbrS_LK1 vB_BbrS_LK2 vB_BbrS_MW1 vB_BbrS_MW2 vB_BbrS_MW3 vB_BbrS_MW4 vB_BbrS_MW5 vB_BbrS_RV4	vB_BbrS_CN1 vB_BbrS_CR1 vB_BbrS_FP4 vB_BbrS_LK3 vB_BbrS_RV2 vB_BbrS_RV3 vB_BbrS_SW1 vB_BbrS_SW2	-

5.4. REZULTATI KRIVE MULTIPLIKACIJE FAGA

Rezultati multiplikacije CN1 bakteriofaga na soju ATCC 10580 na 26 °C i 37 °C prikazani su na grafikonu 1. Fag CN1 završava svoj ciklus multiplikacije za oko 130 minuta. Ovaj fag ima prilično dug latentni period kako na 25 °C tako i na 37 °C (90 i 110 min redom), a iz jedne inficirane ćelije se oslobađa dvostruko više faga na 37 °C (oko 13) u odnosu na 26 °C (oko 6).



Grafikon 1. Kriva multiplikacije CN1 faga na 26 °C (■) i na 37 °C (○)

5.5. REZULTATI KARAKTERIZACIJE FAGA

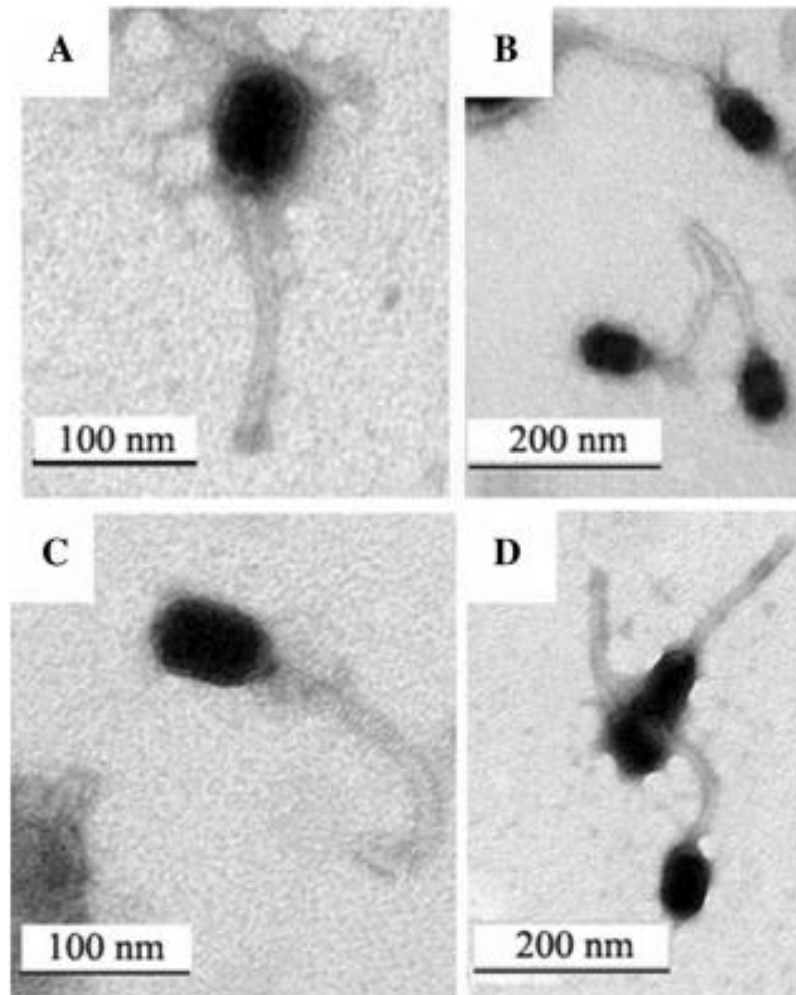
U ovom delu su predstavljeni rezultati karakterizacije *B. bronchiseptica* faga.

5.5.1. REZULTATI ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE FAGA

Morfološka svojstva osam *B. bronchiseptica* faga ispitivana su pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa. Karakteristike četiri odabrana faga predstavljene su u tabeli 11 i na slici 26, s obzirom na to da je svih osam faga imalo veoma sličnu morfologiju. Na osnovu rezultata transmisione elektronske mikroskopije fagi pripadaju redu *Caudovirales*, pošto poseduju binarnu strukturu, koju čine glava i rep (King et al, 2012). Fagi poseduju glavu čija dužina iznosi oko 72 nm i širina oko 52 nm. Pored toga, fagi poseduju dugačak, nekontraktilan i fleksibilan rep dužine od oko 160 nm i širine oko 12 nm. Dodatne strukture nisu uočene ni na jednom od ispitivanih bakteriofaga. Prema ICTV bakteriofagi sa dugim repom pripadaju porodici *Siphoviridae*, a prema Bradley-evoj kategorizaciji B2 morfotipu.

Tabela 11. Morfološke karakteristike odabranih faga

Dimenzije viriona (nm)				
Fag	Dužina glave	Širina glave	Dužina repa	Širina repa
vB_BbrS_RV4	72.2 ± 1.5	50.6 ± 2.2	162.4 ± 3.9	11.8 ± 1.6
vB_BbrS_FP2	70.5 ± 3.5	49.4 ± 2.5	158.9 ± 1.9	12.6 ± 1.1
vB_BbrS_LK3	73.7 ± 2.6	54.9 ± 1.8	161.8 ± 4.9	13.1 ± 1.3
vB_BbrS_CN1	72.1±1.3	53.4±2.6	160.8±3.1	12.8±1.6



Slika 26. Elektronske mikrografije *B. bronchiseptica* faga LK3 (A); FP2 (B); RV4 (C) i CN1 (D).

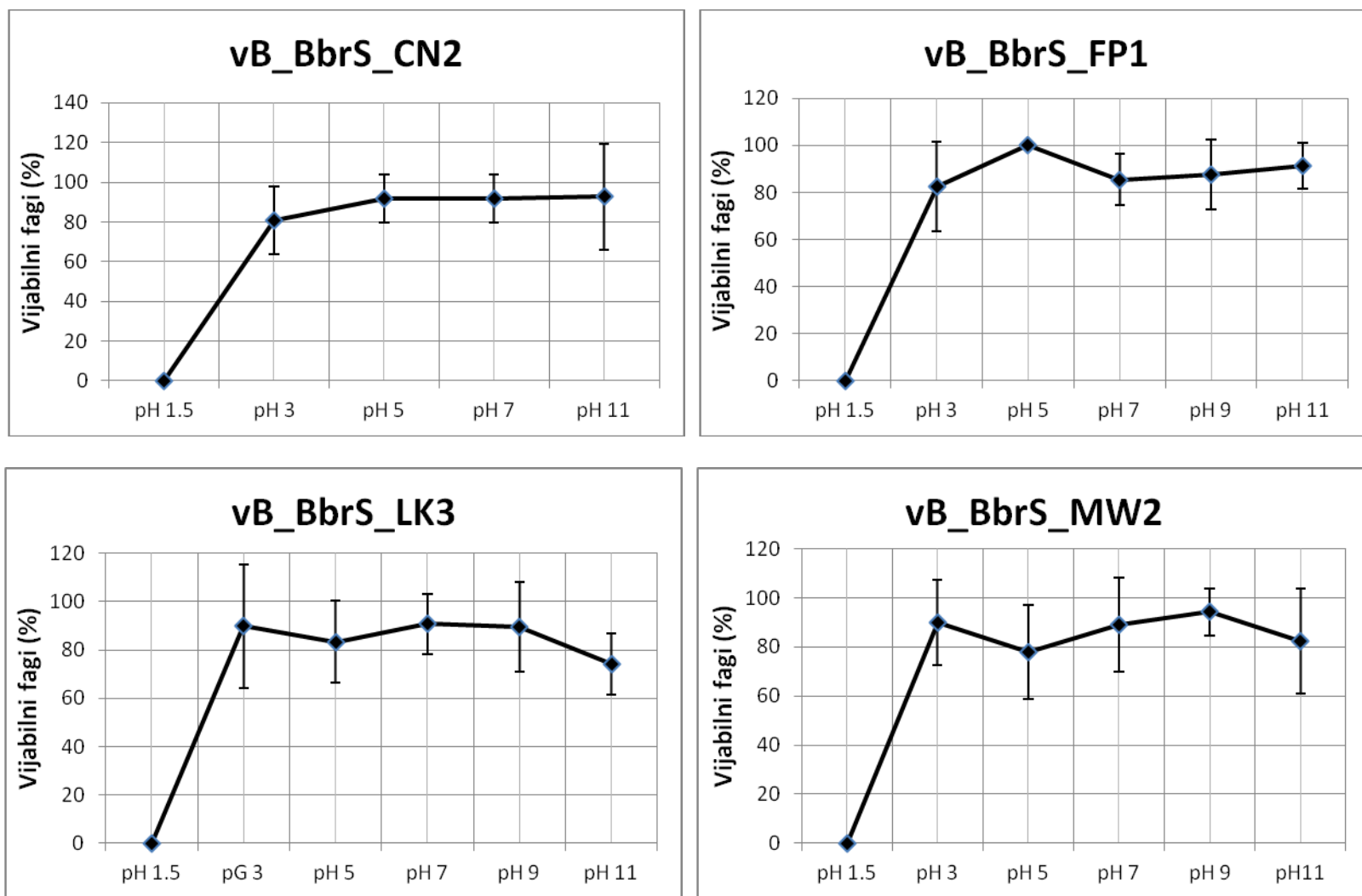
5.5.2. EFEKAT RAZLIČITIH FAKTORA SPOLJAŠNJE SREDINE NA INFektivNOST FAGA

Rezultati ispitivanja očuvanja infektivnosti četiri odabranih bakteriofaga CN2, FP1, LK3 i MW2 na različitim pH vrednostima u toku 30 min prikazani su na grafikonu 2. Svi fagi pokazali su ekstremnu osetljivost na pH 1,5, tj. nijedan fag nije zadržao infektivnost na ovoj pH vrednosti. Pored toga, broj faga sa očuvanom infektivnošću na svim ostalim ispitivanim pH vrednostima bila je prilično ujednačena. Naime, oko 80 % faga zadržalo je infektivnost na svim ispitivanim pH vrednostima u opsegu od 3 do 11.

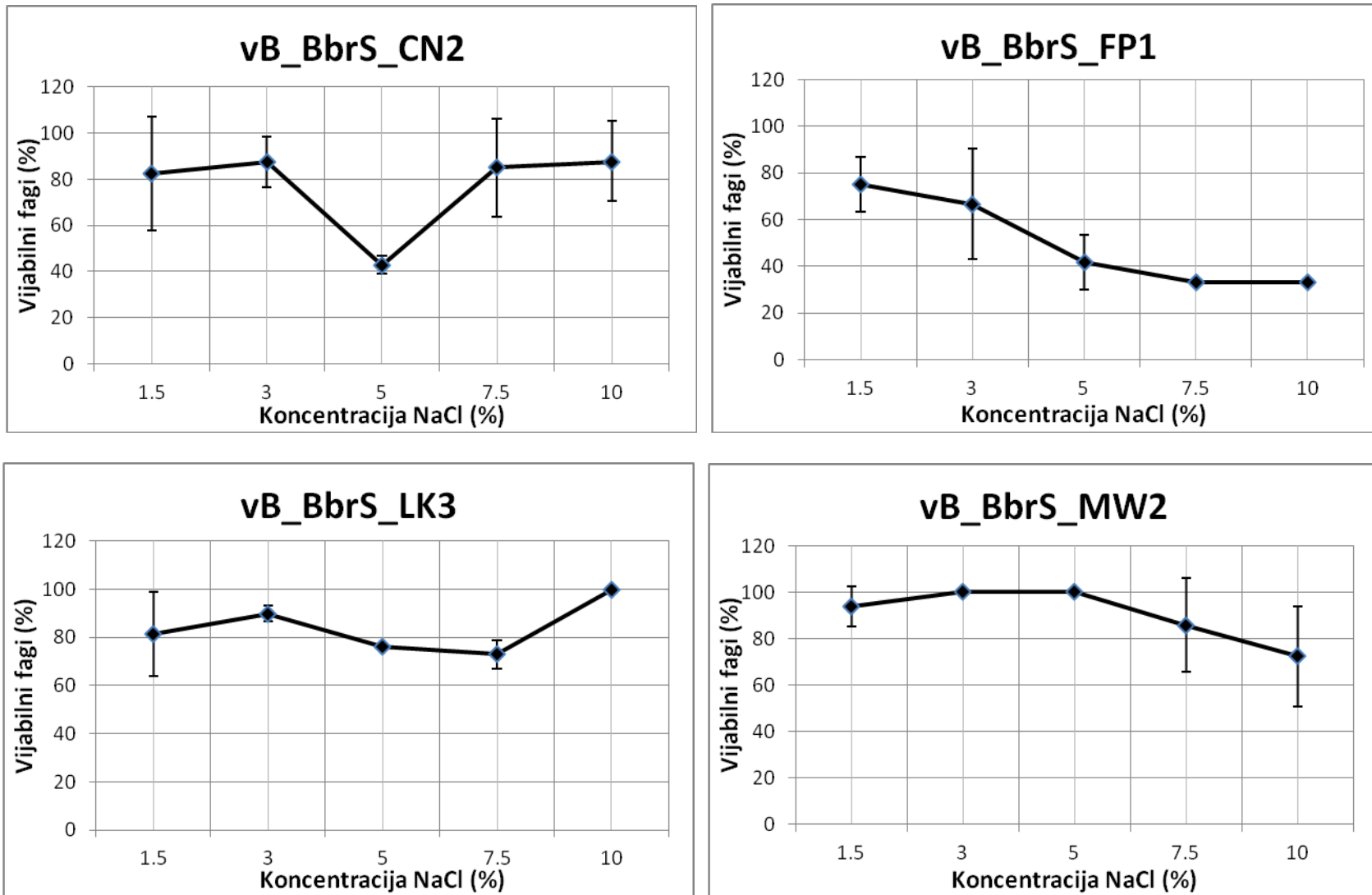
Kada je u pitanju efekat različitih koncentracija NaCl-a, fagi pokazuju dva obrasca preživljavanja. Naime, fag FP1 pokazuje osetljivost na veće koncentracije NaCl-a, kao što su 5 %, 7,5 % i 10 %. Procenat faga koji su zadržali infektivnost pri ovim koncentracijama je oko 40 %. Za razliku od njega, fagi CN2, LK3 i MW2 su bili znatno rezistentniji na visoke koncentracije NaCl (Grafikon 3).

Kada je u pitanju efekat temperature, svi fagi pokazuju uglavnom isti obrazac očuvanja infektivnosti. Naime, većina faga dobro podnosi sve ispitivane temperature, osim 75 °C, pri kojoj dolazi do inaktivacije svih viriona u toku 30 min. Fagi zadržavaju infektivnost pri temperaturama od 55 °C i 65 °C, pri čemu infektivnost zadržava 40 % i više početne brojnosti faga (Grafikon 4).

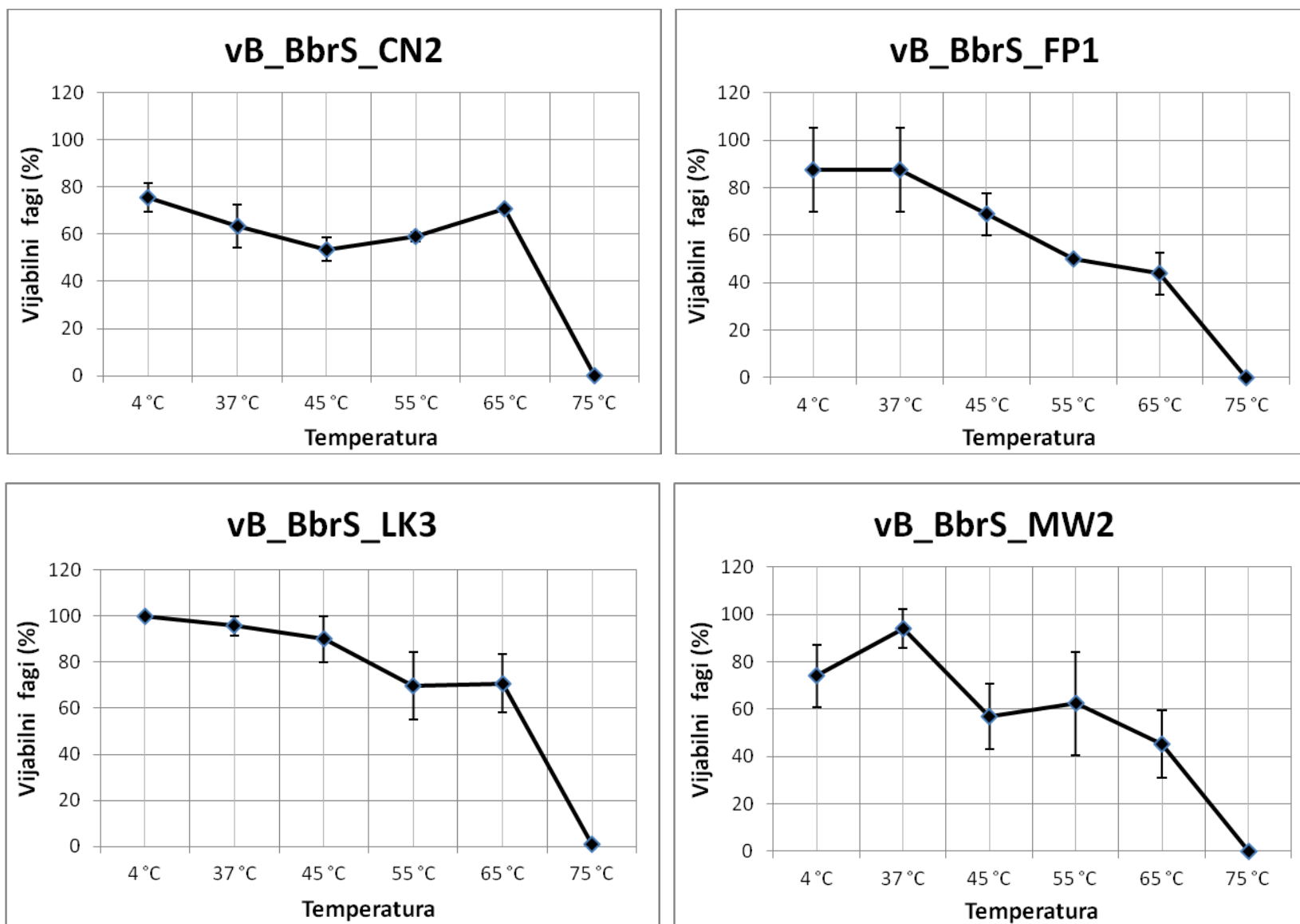
Ispitivani fagi pokazali su isti obrazac održavanja infektivnosti u prisustvu rasvora uree različite koncentracije. Fagi MW2 i FP1 pokazali su veću osetljivost na 5 M i 7,5 M rastvore uree u odnosu na ostale fage, tj. manje od 50 % faga je zadržalo infektivnost pri ovim koncentracijama uree. Za razliku od njih, LK3 fag je pokazao veću rezistenciju na visoke koncentracije uree, odnosno više od 50 % viriona je sačuvalo infektivnost pri koncentraciji 7,5 M uree (Grafikon 5)



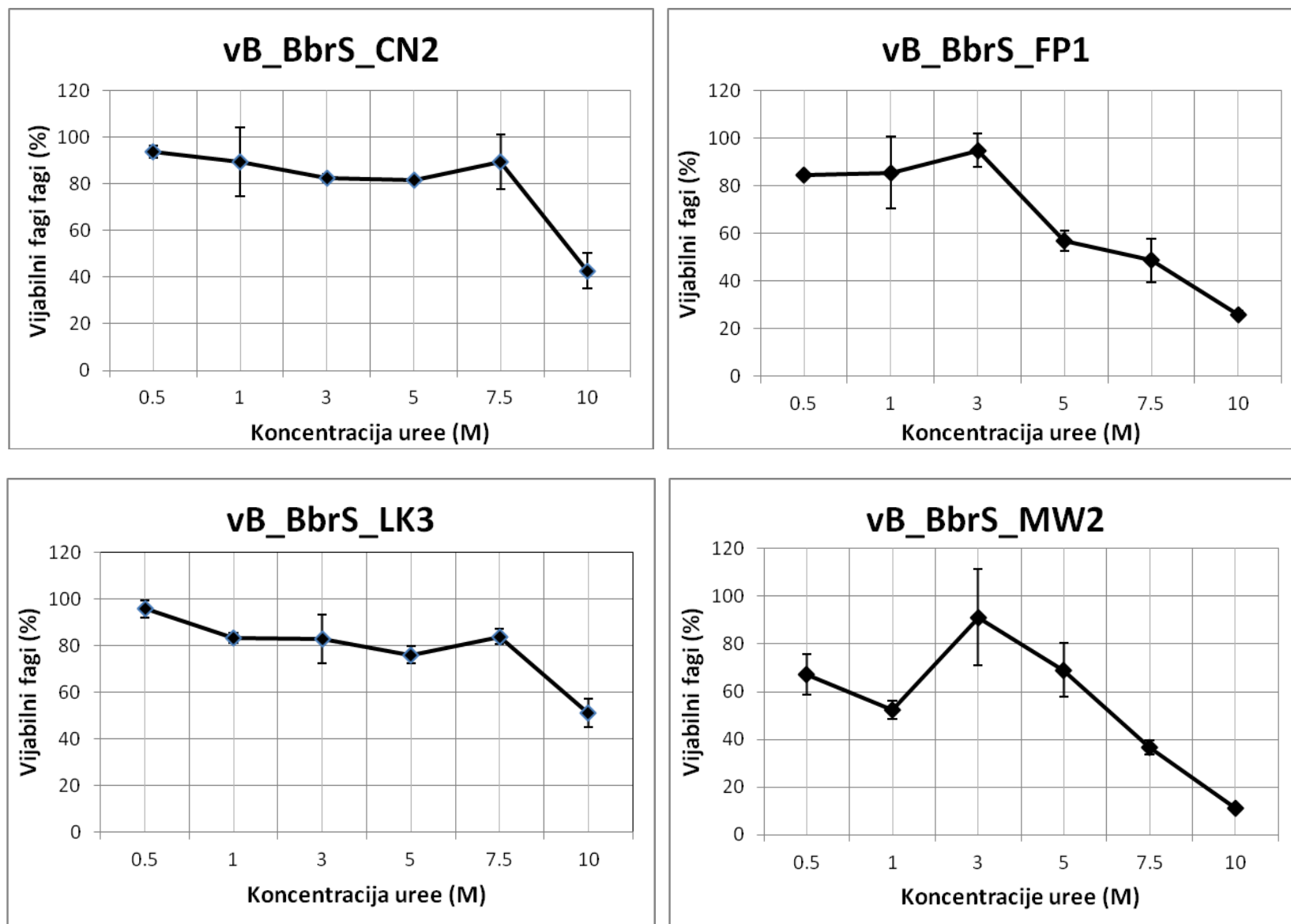
Grafikon 2. Efekat pH na infektivnost *B. bronchiseptica* faga



Grafikon 3. Efekat NaCl-a na infektivnost *B. bronchiseptica* faga



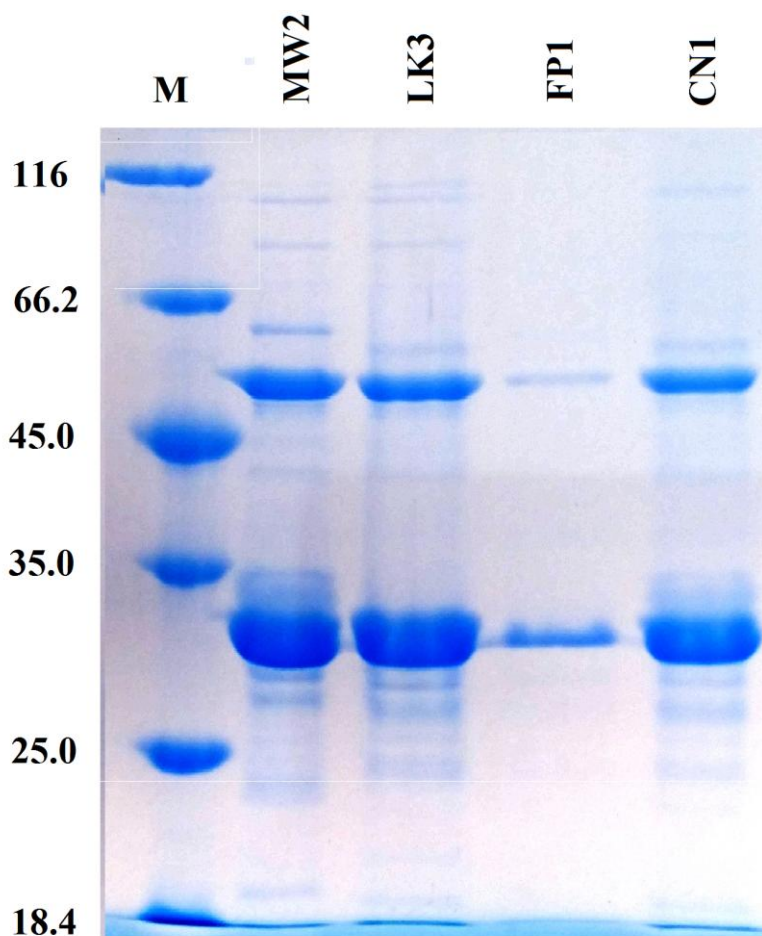
Grafikon 4. Efekat temperature na infektivnost *B. bronchiseptica* faga



Grafikon 5. Efekat uree na infektivnost *B. bronchiseptica* faga

5.5.3. REZULTATI SDS-PAGE ELEKTROFOREZE

Proteinski profil četiri odabrana bakteriofaga (CN1, LK3, MW2 i FP1) prikazan je na slici 27. Na osnovu rezultata SDS-PAGE elektroforeze, *B. bronchiseptica* fagi poseduju veoma slične strukturne proteine, sa najmanje 8 karakterističnih traka i glavnim proteinom kapsida veličine oko 32,5 kDa. Na slici se takođe uočavaju trake drugih proteina koji su približno iste veličine kod svih faga i iznose oko 100, 81 (83 kod LK3), 61 (59,5 kod LK3 faga), 53, 42, 28 i 26 kDa sa izuzetkom FP1 faga kod koga se većina ovih proteina ne uočava.



Slika 27. Proteinski profil odabranih *B. bronchiseptica* bakteriofaga

5.5.4. Rezultati restrikcione digestije DNK faga

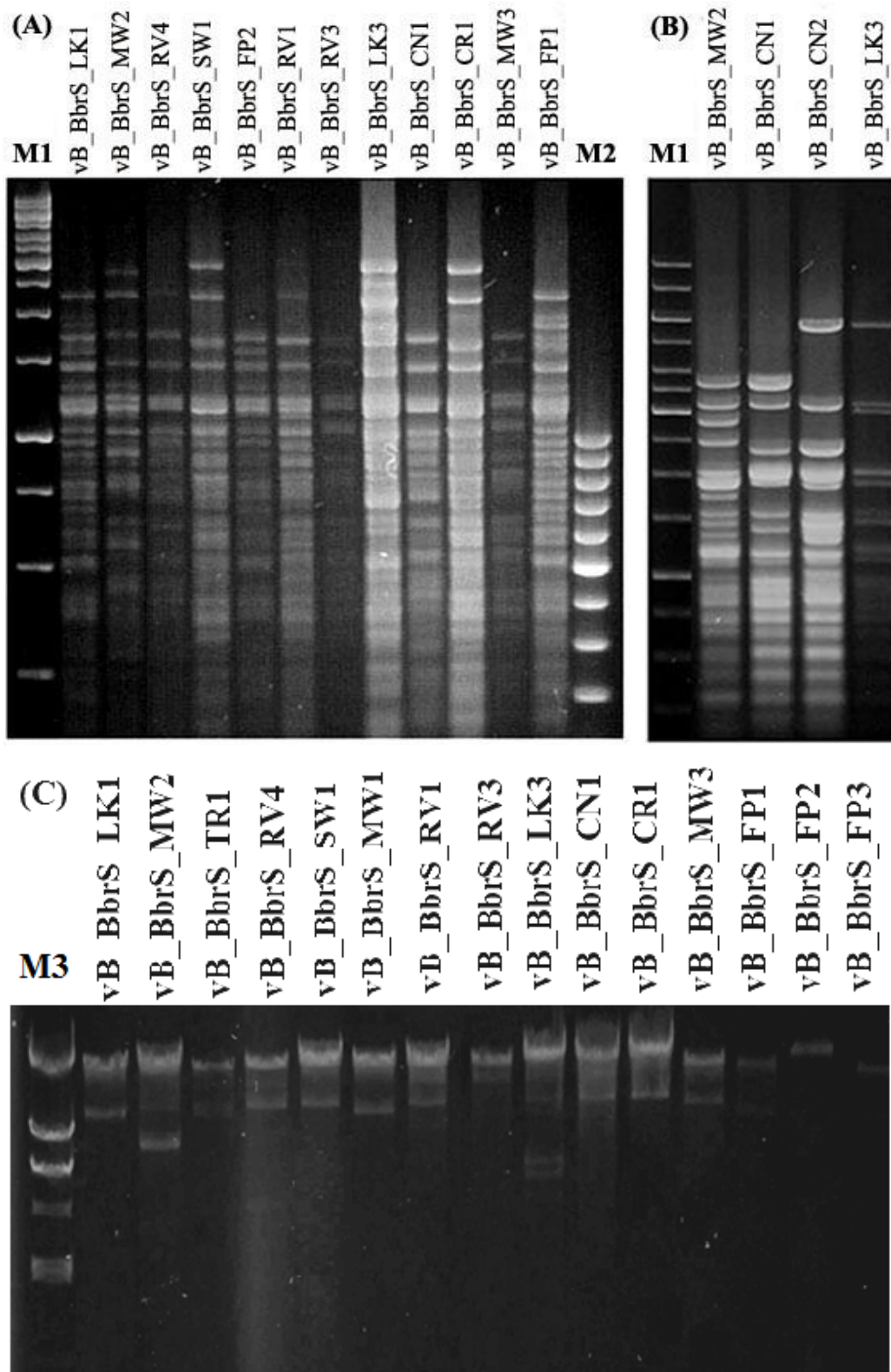
Rezultati restrikcione digestije DNK bakteriofaga pokazali su da svi ispitivani bakteriofagi u okviru viriona poseduju genom od dvolančanog DNK molekula (dsDNK).

Digestiji restrikcionim enzimom EcoRV bila je podložna DNK svih ispitivanih bakteriofaga (Slika 28). Broj fragmenata dobijen digestijom genomske DNK faga LK3, FP2 i RV3 enzimom EcoRV je najmanje 2; bakteriofaga LK1, FP3, FP4, MW4, CR1, CR2, SW1 i MW3 najmanje 3, dok je broj fragmenata genomske DNK faga FP1, MW2, RV1, CN1, RV4 i TR1 najmanje 4.

Restrikciona digestija DNK faga sa BglII, PvuI, Sall, BamHI, XbaI, TaqI i DraI nije dala vidljive fragmente, tj. DNK faga je bila neosetljiva na ove enzime (rezultati nisu prikazani).

Ispitujući genom soja *B. bronchiseptica* ATCC 10580 korišćenjem PHAST servera, detektovan je jedan fag u genomu ove bakterije, koji pokazuje veliku sličnost sa *Cronobacter* fagom phiES15. Ovaj fag takođe pripada familiji *Siphoviridae*, ali njegova DNK pokazuje drugačiju *in silico* osetljivost na digestiju restrikcionim endonukleazama koje su korišćene u digestiji *B. bronchiseptica* faga (Prilog 9.1).

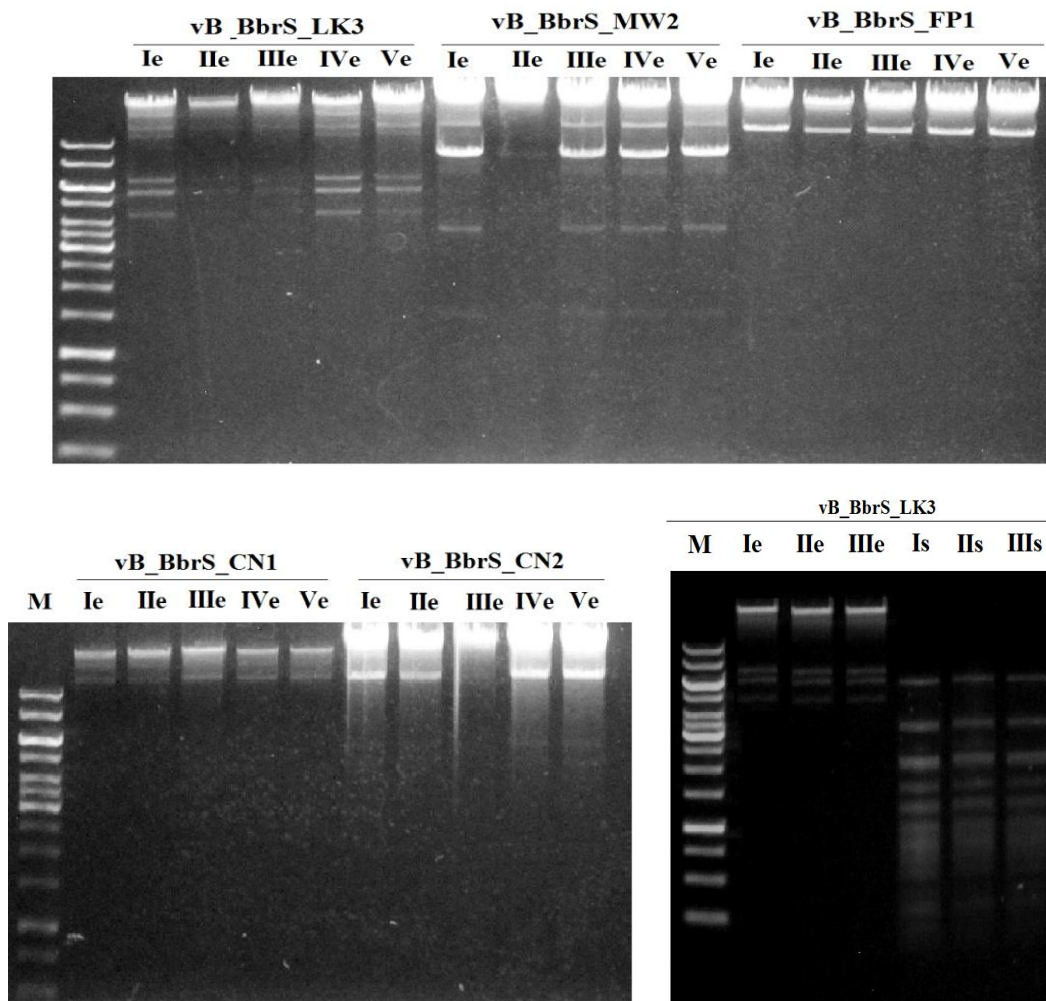
In silico restrikciona digestija srodnih *B. bronchiseptica* bakteriofaga iz familije *Podoviridae* (BIP-1, BMP-1 i BPP-1) gore navedenim endonukleazama, ukazuje da genom ovih faga sadrži specifična mesta za restrikciju sledećim enzimima: BglII, EcoRI, HhaI, HpaII, PvuI, Sall, SmaI i TaqI (Prilozi 9.2 i 9.3). Restrikcionom digestijom BglII, EcoRI, HhaI, HpaII i TaqI enzimima, dobijen je veliki broj fragmenata, dok je nešto manji broj fragmenta dobijen delovanjem PvuI, Sall i SmaI enzima. DNK ovih faga nije sadržala specifična mesta za delovanje BamHI, DraI, EcoRV, HindIII, KpnI i XbaI enzima.



Slika 28. Restrikciona digestija DNK *B. bronchiseptica* sa enzimima Hinfi (A), SmaI (B) i (C) EcoRV; M1: 1 kb marker; M2: 100 bp marker; M3: DNK lambda/HindIII marker

5.5.5. Rezultati detekcije *cos* regiona u genomima *B. bronchiseptica* bakteriofaga

Rezultati ispitivanja prisustva *cos* mesta u genomu *B. bronchiseptica* faga prikazani su na slici 29. Razlika u intezitetu traka nakon brzog i sporog hlađenja isečene i zagrejane DNK nije utvrđena. Takođe, razlika između sporog i brzog hlađenja tretirane DNK zagrevane na dve različite temperature (65 °C i 80 °C) i restrikcijom digestijom pre i posle zagrevanja i hlađenja nije utvrđena. Dobijeni rezultati ukazuju da *B. bronchiseptica* sifovirusi na poseduju *cos* region u svojim genomima, dok je prisustvo *pac* mesta detektovano kod većine, na osnovu njihovih DNK tretiranim restrikcijom enzimom EcoRV (Slika 28C).



Slika 29. RFLP profil faga nakon digestije sa EcoRV (e) i Smal (s): I- bez tretmana; II- nakon brzog hlađenja enzimski tretirane DNK; III- nakon sporog hlađenja enzimski tretirane DNK; IV- restrikcijom digestija nakon brzog hlađenja netretirane DNK; V- restrikcijom digestija nakon sporog hlađenja netretirane DNK; M - 1 kb

5.6. ANOTACIJA GENOMA ODABRANIH FAGA

Rezultati sekvencioniranja pet *B. bronchiseptica* bakteriofaga: CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1 potvrdili su da fagi u svom kapsidu sadrže dvostruku lineranu DNK molekulu. Veličina genoma faga kreće se između 59.779 do 62.030 baznih parova, dok se zastupljenost GC parova kreće od 63,97% do 64,07%. Transportne RNK (tRNK) nisu detektovane u genomima *B. bronchiseptica* faga. Svih pet faga poseduju integrazu i represor, što ukazuje da su u pitanju umereni fagi. Broj kodirajućih sekvenci u genomima faga varira i kreće se između 79 i 82. U tabeli 12 i na slici 30 dat je pregled gena i njihovih mogućih funkcija kod faga LK3, koji je najdetaljnije okarakterisan. Kompletni genomi sekvencioniranih faga deponovani su u GenBank bazi podataka pod određenim pristupnim brojem (CN1-KY00221; CN2-KY00219; LK3-KX961385; MW2-KY00218; FP1-KY00220).

Tabela 12. Anotacija genoma LK3 faga

Red. broj	Molekulska masa	Sličnost sa sekvencama iz GenBank baze podataka (blastP)					
		Naziv	Konzervativni region	Pristupni broj	E vrednost	Pokrivenost sekvence (%)	Identičnost (%)
1	7.41	pretpostavljeni membranski protein [Pseudomonas fag PaMx74]	-	YP_0091 99480.1	4e-14	96	43
2	66.33	helikaza [Pseudomonas fag MP1412]	helikaza konzervativan C – terminalni domen	YP_0065 61009.1	0.0	97	83
3	13.38	hipotetički protein [Pseudomonas fag LKO4]	-	AGI1123 9.1	2e-67	95	85
4	20.18	hipotetički protein [Pseudomonas fag M6]	-	YP_0012 94551.1	1e-97	96	84
5	29.87	hipotetički protein [Pseudomonas fag MP1412]	-	YP_0065 61012.1	1e-169	100	83
6	44.93	ATP-vezujući protein [Pseudomonas fag AN14]	helikaza, pretpostavljena RecD/TraA familija ATP-zavisna egzo DNK-aza (egzonukleaza V),	ANO574 01.1	0.0	99	88

			alfa subjedinica, helikaze superfamilija				
7	61.71	ribonukleotid- difosfat reduktaza, subjedinica alfa [Pelagibacter fag HTVC019P]	klasa I ribonukleotid reduktaza	YP_0075 17830.1	0.0	98	51
8	37.89	ribonukleotid- difosfat reduktaza, beta subjedinica [nekultivisan Mediterranski fag uvMED]	ribonukleotid reduktaza, beta subjedinica	BAR2538 3.1	2e-127	94	54
9	33.42	hipotetički protein [Pseudomonas fag M6]	protein nepoznate funkcije (DUF3489)	YP_0012 94557.1	5e-61	70	67
10	32.78	hipotetički protein [Pseudomonas fag AN14]	-	ANO574 07.1	2e-161	98	77
11	9.04	nije pronađena značajna sličnost	-	-	-	-	-
12	30.58	treonin dehidrataza [Pseudomonas fag AN14]	triptofan sintaza, beta subjedinica (tip II)	ANO574 08.1	2e-165	100	81
13	54.91	pretpostavljena DNK fotoliza [Pseudomonas fag PAE1]	DNK fotoliza [replikacija, rekombinacija i popravka DNK]	YP_0092 15737.1	0.0	99	79
14	20.25	pretpostavljena trifosfat hidrolaza [Pseudomonas fag PAE1]	AAA domen	YP_0092 15738.1	6e-98	96	81
15	38.6	hipotetički protein [Pseudomonas fag M6]	-	YP_0012 94563.1	1e-176	99	74
16	20.94	hipotetički protein [Pseudomonas fag YuA]	-	YP_0015 95838.1	2e-122	98	92
17	40.6	timidilat sintaza/deoksiuridi lat hidriksimetil transferaze [Pseudomonas fag MP1412]	timidilat sintaze i pirimidin hidroksimetilaze	YP_0065 61023.1	0.0	100	76
18	21.45	5'- deoksinukleotidaza [Pseudomonas fag	5'-nucleotidaze	YP_0092 15745.1	8e-84	95	78

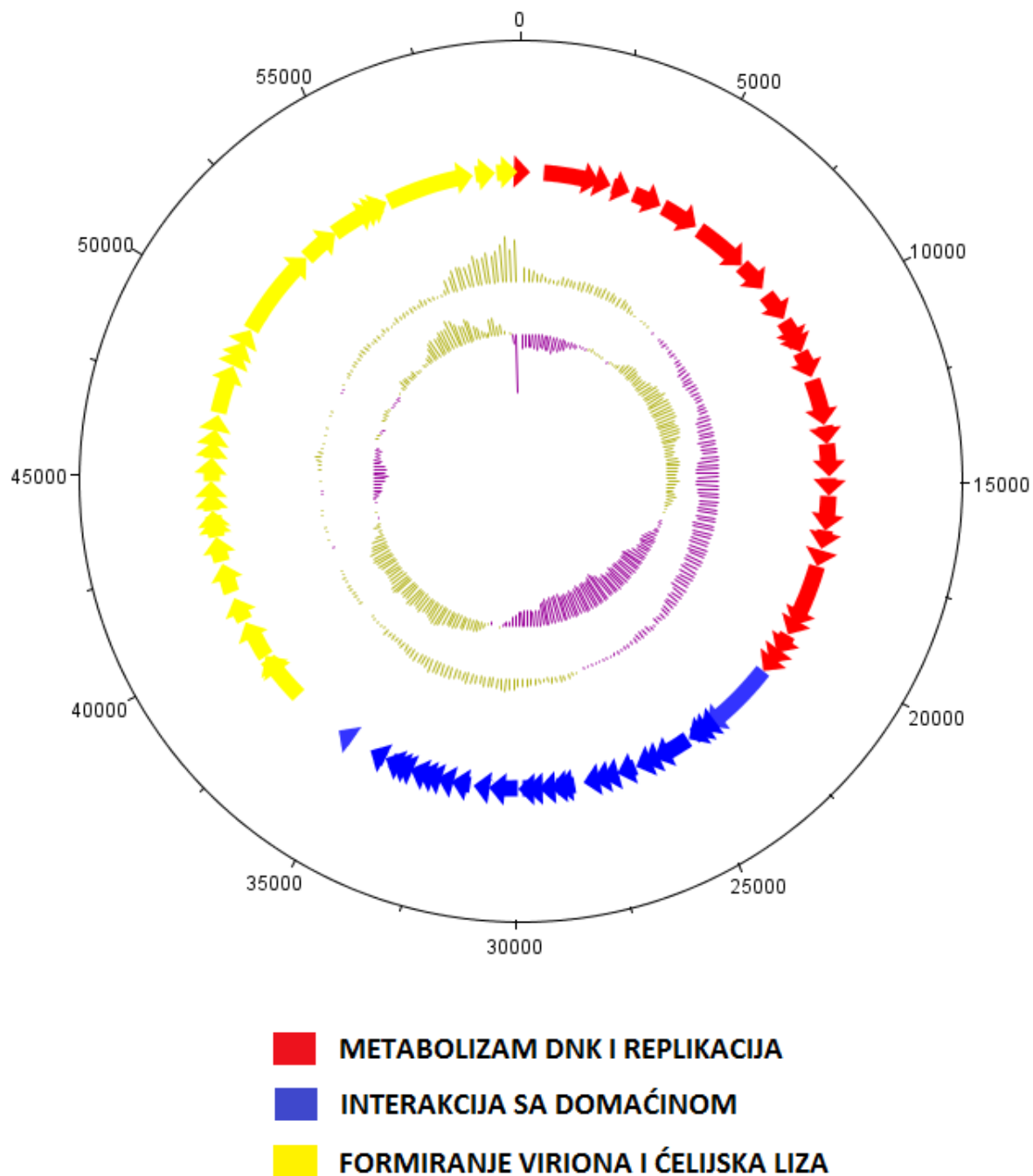
PAE1]							
19	14.64	hipotetički protein [Pseudomonas fag PAE1]	protein nepoznate funkcije (DUF3310)	YP_0092 15747.1	1e-65	96	74
20	73.46	pretpostavljena DNK polimeraza A [Pseudomonas fag PAE1]	DNK polimeraza A familija	YP_0092 15748.1	0.0	99	84
21	11.84	pretpostavljena DNK primaza [Pseudomonas fag PAE1]	-	YP_0092 15749.1	4e-23	62	67
22	24.6	pretpostavljena deoksicitidilat deaminaza [Pseudomonas fag MP1412]	deoksicitidilat deaminaze domen	YP_0065 61029.1	5e-79	69	72
23	14.98	hipotetički protein [Pseudomonas fag M6]	-	YP_0012 94574.1	6e-65	100	71
24	12.64	pretpostavljeni represor [Pseudomonas fag PAE1]	-	YP_0092 15752.1	4e-58	100	78
25	92.2	integraza [Pseudomonas fag MP1412]	fag/plazmid primaza, P4 familija, C- terminalni domen	YP_0065 61033.1	0.00	99	85
26	8.03	hipotetički protein [Pseudomonas fag MP1412]	-	YP_0065 61034.1	3e-35	97	88
27	8.38	ne-ribozomalna peptid sintetaza [<i>Paenibacillus massiliensis</i>]	-	WP_026 281361.1	0.52	75	37
28	7.27	hipotetički protein [Pseudomonas fag MP1412]	-	YP_0065 61035.1	1e-14	98	52
29	44.66	hipotetički protein [Pseudomonas fag LKO4]	-	AGI1126 9.1	0.0	99	92
30	13.07	hipotetički protein [Pseudomonas fag YuA]	adenosilmetionin- 8-amino-7- transaminaza	YP_0015 95853.1	2e-17	93	40
31	9.63	hipotetički protein [<i>Pseudomonas thermotolerans</i>]	-	WP_017 938998.1	7e-25	94	61
32	22.4	pretpostavljena proifosfataza [Pseudomonas fag PAE1]	nukleozid trifosfat pirofosfohidrolaza (EC 3.6.1.8) MazG-like domain	YP_0012 94582.1	6e-72	98	56

found in mouse							
33	17.69	hipotetički protein [Pseudomonas fag YuA]	-	YP_0015 95856.1	8e-73	100	65
34	10.59	hipotetički protein [Enterobacteriaceae ATCC 29904]	glioksalaza I	WP_040 075918.1	1e-26	96	52
35	11.45	hipotetički protein [Pseudomonas fag LKO4]	-	AGI1127 8.1	1e-17	98	93
36	20.93	ribonukleaza T [Pseudomonas fag LKO4]	DEDDh 3'-5' familija ekzonukleaza	AGI1128 4.1	1e-123	97	92
37	6.63	RNK-polimeraza vezujući protein [Pseudomonas fag LKO4]	-	AGI1128 5.1	1e-35	100	95
38	9.42	hipotetički protein [Pseudomonas fag AN14]	-	ANO574 41.1	7e-53	100	97
39	12.11	hipotetički protein PAE1_72 [Pseudomonas fag PAE1]	-	YP_0092 15763.1	4e-45	88	81
40	5.57	nije pronađena značajna sličnost	-	-	-	-	-
41	33.07	DNK-vezujući protein [Mycobacterium fag Milly]	-	YP_0091 25515.1	1e-05	36	36
42	17.24	diguanilat-ciklaza sa GGDEF domenom [Pseudomonas fag MP1412]	diguanilat-ciklaza (DGC) ili GGDEF domen	YP_0065 61050.1	4e-66	97	71
43	22.05	transkripcioni elengacioni protein SprT [<i>Microbacterium</i> sp. XT11]	-	ALX6728 4.1	6e-32	89	42
44	15.71	antirestrikcioni protein [Pseudomonas fag AN14]	antorestrikcioni protein	ANO574 44.1	2e-96	100	98
45	12.52	hipotetički protein [Pseudomonas fag AN14]	-	ANO574 45.1	7e73	100	94
46	7.63	hipotetički protein [Pseudomonas fag M6]	RNK polimeraza, sigma faktor	YP_0012 94512.1	3e-42	100	99
47	10.11	hipotetički protein	-	AGI1129	5e-50	93	98

		[Pseudomonas fag LKO4]		3.1			
48	16.59	hipotetički protein [Pseudomonas fag LKO4]	-	AGI1129 4.1	4e-57	95	65
49	7.44	peptidaza [Nocardiopsis halotolerans]	-	WP_017 569351.1	2.6	61	38
50	8.14	MBL metalo-hidrolaza [Streptomyces xanthophaeus]	-	WP_031 153548.1	1.1	95	32
51	18.87	nukleotid pirofosfohidrolaza [Ardenticatena maritima]	nukleozid trifosfat pirofosfohidrolaza (EC 3.6.1.8) MazG-sličan domen	WP_054 493505.1	1e-31	84	46
52	18.69	terminaza, mala subjedinica [Pseudomonas fag AN14]	-	ANO573 69.1100	1e-69	99	59
53	58.52	terminaza, velika subjedinica [Pseudomonas phage MP1412]	terminazi-slična familija	YP_0065 61058.1	0.0	100	83
54	52.29	strukturni protein [Pseudomonas phage AN14]	domen nepoznate funkcije (DUF4055)	ANO573 71.1	0.0	95	80
55	3.99	hipotetički protein [Pseudomonas fag LKO4]	-	AGI1129 9.1	0.020	100	46
56	44.77	mali strukturni protein [Pseudomonas fag AN14]	pretpostavljeni protein koji učestvuje u morfogenezi glave kod faga SPP1 gp7 familija	ANO573 73.1	0.0	100	75
57	27.4	strukturni protein [Pseudomonas fag MP1412]	-	AGI1130 2.1	2e-156	99	92
58	32.64	glavni strukturni protein [Pseudomonas fag MP1412]	-	YP_0065 61063.1	0.0	100	88
59	24.32	hipotetički protein BPPAER656_00750 [Pseudomonas fag YMC11/02/R656]	-	YP_0091 87472.1	5e-19	27	73
60	20.02	adhesinu-sličan protein	-	WP_012 956841.1	0.62	26	39

[Methanobrevibacter ruminantium]							
61	5.5	hipotetički protein [Pseudomonas fag M6]	-	YP_0012 94528.1	8e-12	100	59
62	19.7	Rz protein [Pseudomonas fag3MP1412]	Rz protein za lizu kod bakteriofaga	YP_0065 61067.1	5e-84	100	75
63	12.5	holin [Pseudomonas fag LKO4]	-	AGI1130 8.1	5e-43	100	70
64	27.58	endolizin [Pseudomonas fag YuA]	membranski vezana litička murein- transglikozilaza	YP_0015 95885.1	4e-147	97	81
65	18.63	strukturni protein [Pseudomonas fag MP1412]	-	YP_0065 61070.1	1e-78	99	70
66	13.34	strukturni protein faga [Pseudomonas fag YuA]	-	YP_0015 95887.1	5e-62	100	75
67	16.52	strukturni protein faga [Pseudomonas fag YuA]	-	YP_0015 95888.1	1e-67	100	70
68	53.97	glavni strukturni protein [Pseudomonas fag MP1412]	-	YP_0065 61073.1	0.0	99	76
69	16.83	pretpostavljeni strukturni protein [Pseudomonas fag NP1]	-	AND7486 7.1	1e-50	91	54
70	10.13	protein koji učestvuje u sklapanju repa [Pseudomonas fag vB_PaeS_SCH_Ab2 6]	-	YP_0090 44353.1	1e-14	98	39
71	15.27	strukturni protein viriona [Pseudomo nas fag PaMx25]	-	ALH2381 0.1	8e-36	87	52
72	99.75	<u>proteinska merna traka dužine repa</u> [Pseudomonas fag MP1412]	tape measure domen	YP_0065 61076.1	0.0	99	59
73	43.7	strukturni protein faga [Pseudomonas fag YuA]	-	YP_0015 95895.1	8e-71	97	33
74	50.87	strukturni protein	konzervativni	YP_0092	5e-99	100	41

		viriona [Pseudomonas fag PaMx28]	hipotetički protein faga Von Willebrandov faktor tipa A (vWA) domain	10642.1			
75	8.61	putativni strukturni protein viriona [Pseudomonas fag PaMx74]	-	YP_0091 99473.1	4e-30	98	63
76	7.72	protein koji učestvuje u sklapanju repa [Burkholderia fag7AH2]	-	YP_0065 61132.1	5e-14	79	52
77	101.59	von Willebrandov faktor tip A [Roseovarius sp. BRH_c41]	Von Willebrandov faktor tip A (vWA) domen	KJS42436 .1	0.0	90	42
78	24.97	koagulacioni faktor 5/8 tip proteina [Agromyces sp. Leaf222]	koagulacioni faktor 5/8 C- terminalni domen	WP_055 860310.1	3e-06	57	321
79	24.38	F5/8 tip C domen [Burkholderia pseudomallei]	F5/8 tip C domen; koagulacioni faktor 5/8 C- terminalni domen	CPF0595 2.1	2e-11	61	38



Slika 30. Cirkularni prikaz LK3 genoma (DNAPlotter, Carver et al, 2009). Spoljašnji krug predstavlja LK3 gene uključene u metabolizam i DNK replikaciju (crveno), interakciju sa domaćinom (plavo), formiranje viriona i ćelijsku lizu (žuto); centralni krug predstavlja % GC parova, dok središnji krug označava GC asimetriju između vodećeg i zaostajućeg DNK lanca (eng. *skew*); ljubičasta boja – vrednosti ispod prosečnih, žuta boja – vrednosti iznad prosečnih.

5.6.1. REZULTATI KOMPARACIJE GENOMA I FILOGENETSKE ANALIZE SEKVENCIONIRANIH FAGA

Rezultati sličnosti DNK sekvenci *B. bronchiseptica* i njima sličnih *P. aeruginosa* faga prikazani su u tabeli 13. Kao što se iz tabele može videti, *B. bronchiseptica* fagi pokazuju veliki procenat DNK sličnosti koji se kreće od 87,4 % do 96,04 %. Dva faga, LK3 i CN1 su međusobno najbližnja i dele čak 96,04 % sekvence, dok se fagi LK3 i FP1 najviše razlikuju i dele 87,4% DNK sekvence. Sa *P. aeruginosa* fagima, *B. bronchiseptica* fagi pokazuju 40,6-48,8 % sličnosti. Najveća sličnost je uočena između MP1412 i CN1 faga (48,8 %), dok je najmanji procenat sličnosti zabeležen između LKO4 i CN2 faga (40,6 %).

Tabela 13. Procenat (%) sličnosti sekvence *B. bronchiseptica* DNA genoma i odabranih srodnih bakteriofaga (podvučene su vrednosti >95%)

	vB_BbrS_CN1	vB_BbrS_CN2	vB_BbrS_LK3	vB_BbrS_MW2	vB_BbrS_FP1	<i>Pseudomonas</i> fag Yua	<i>Pseudomonas</i> fag MP1412	<i>Pseudomonas</i> fag LKO4
vB_BbrS_CN1	100,0	91,2	<u>96,04</u>	94,1	89,3	47,8	51,2	48,8
vB_BbrS_CN2	88,3	100,0	88,3	90,2	91,2	40,8	46,2	40,6
vB_BbrS_LK3	<u>96,04</u>	92,02	100,0	92,2	88,3	44,7	47,2	45,4
vB_BbrS_MW2	93,1	93,1	91,2	100,0	90,2	46,2	47,2	46,4
vB_BbrS_FP1	88,3	93,1	87,4	90,2	100,0	40,6	46,2	42,1
<i>Pseudomonas</i> fag Yua	48,0	43,1	42,0	47,0	42,1	100,0	90,2	91,2
<i>Pseudomonas</i> fag MP1412	49,6	46,2	47,2	46,4	46,2	86,4	100,0	88,3
<i>Pseudomonas</i> fag LKO4	47,2	40,8	45,4	44,8	41,3	86,5	87,3	100,0

Rezultati Mauve progresivnog poravnavanja DNK sekvenci *B. bronchiseptica* faga CN1, CN2, LK3, MW2, FP1 i *Pseudomonas aeruginosa* faga MP1412, M6, LKO4 i AN14 prikazani su na slici 31. Na slici se jasno uočavaju lokalni kolinearni blokovi (LKB) – konzervisane sekvence koje se ne nalaze pod uticajem rekombinacija, horizontalnog transfera gena i delecija. Svih 9

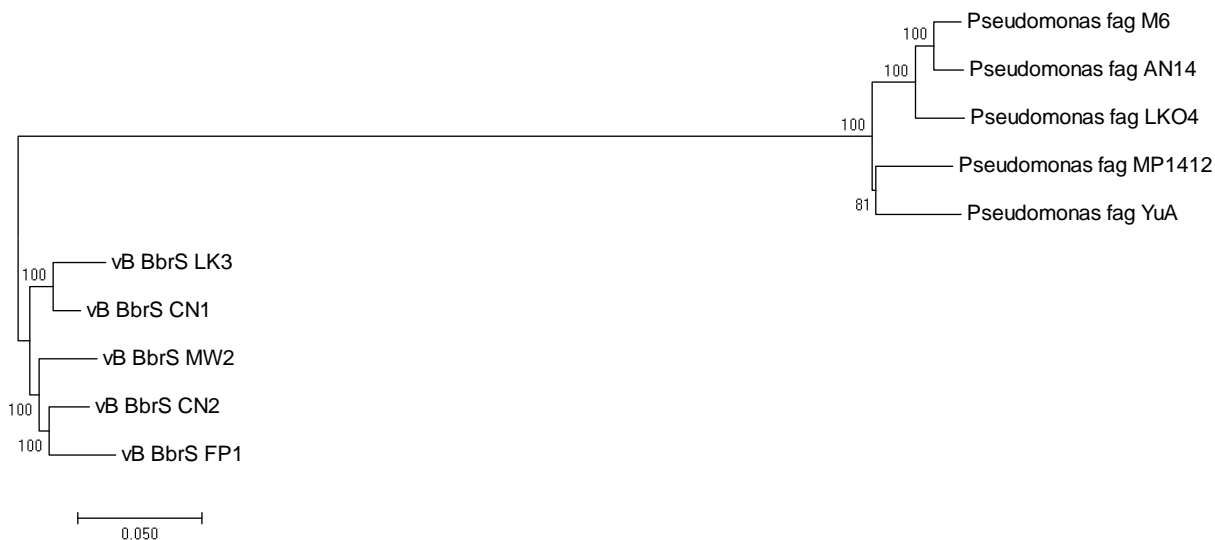
analiziranih genoma dele najveći broj LKB-ova, što ukazuje da su fagi veoma slični. Najvarijabilni deo genoma kod svih analiziranih faga je središnji deo između 30 kb i 35 kb.

Na slici 32 je prikazan dendrogram konstruisan na osnovu genomskih sekvenci faga koji pokazuje da se *B. bronchiseptica* fagi filogenetski jasno razlikuju od *P. aeruginosa* faga. Na slici se uočavaju dva klastera, jedan sa *B. bronchiseptica* fagima i drugi sa *P. aeruginosa* fagima. U okviru klastera sa *B. bronchiseptica* fagima izdvajaju se dve manje grane, jedna sa dva faga (CN1 i LK3) i druga sa tri faga (CN2, FP1 i MW2). Drugi dendrogram je konstruisan korišćenjem sekvenci za proteinsku mernu traku dužine repa (eng. *tail tape length measure protein*) (Prilog 9.5.) *B. bronchiseptica* i njima sličnih *P. aeruginosa* faga (blastP) (Slika 33). Rezultati Neighbor-Joining testa pokazuju grupisanje proteinskih sekvenci u dva klastera, jednog sa *B. bronchiseptica* i drugi sa *P. aeruginosa* fagima. U klasteru sa sekvencama *B. bronchiseptica* faga dolazi do razdvajanja na dve manje grane, jedne sa sekvencom FP1 i druge sa ostalim fagima (CN1, CN2, LK3 i MW2). Treći dendrogram konstruisan je na osnovu proteinskih sekvenci glavnog proteina kapsida faga (Prilog 9.5.) pruža uvid u drugačiju srodnost faga (Slika 34). Naime, u klasteru sa *B. bronchiseptica* fagima razdvajaju se dve grane, jedan sa sekvencom MW2 i druga sa ostalim fagima koji su dalje rapoređeni u tri podgrupe. Prvu podgrupu čine sekvence dva faga, CN1 i LK3, drugu FP1 i treću CN2.

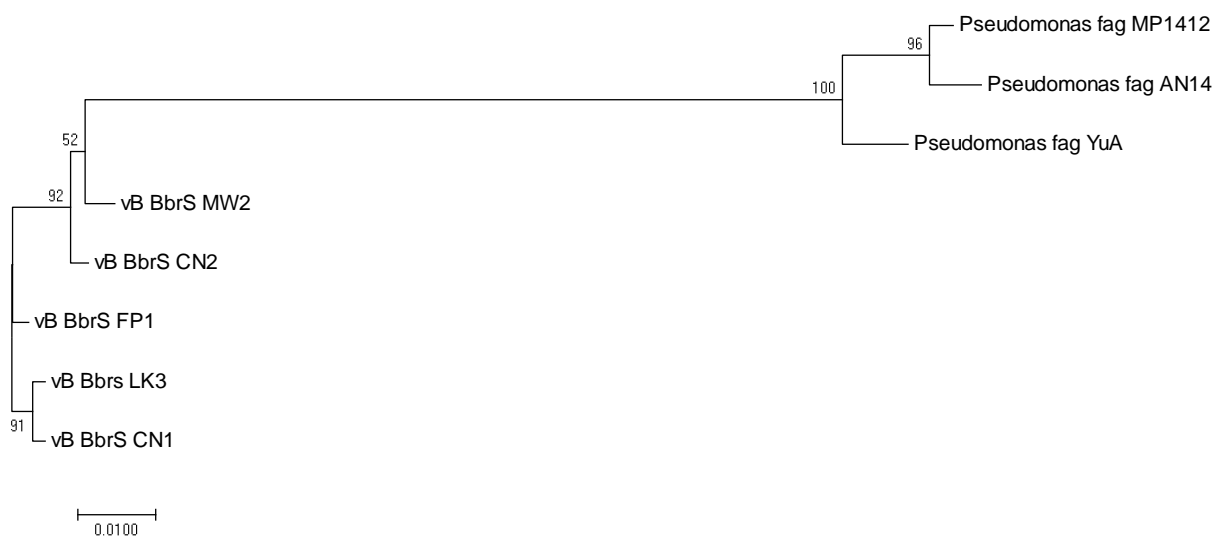


Slika 31. Poravnavanje DNK sekvenci odabranih faga vrste *B. bronchiseptica* i *Pseudomonas sp.* faga pomoću Mauve progresivnog algoritma

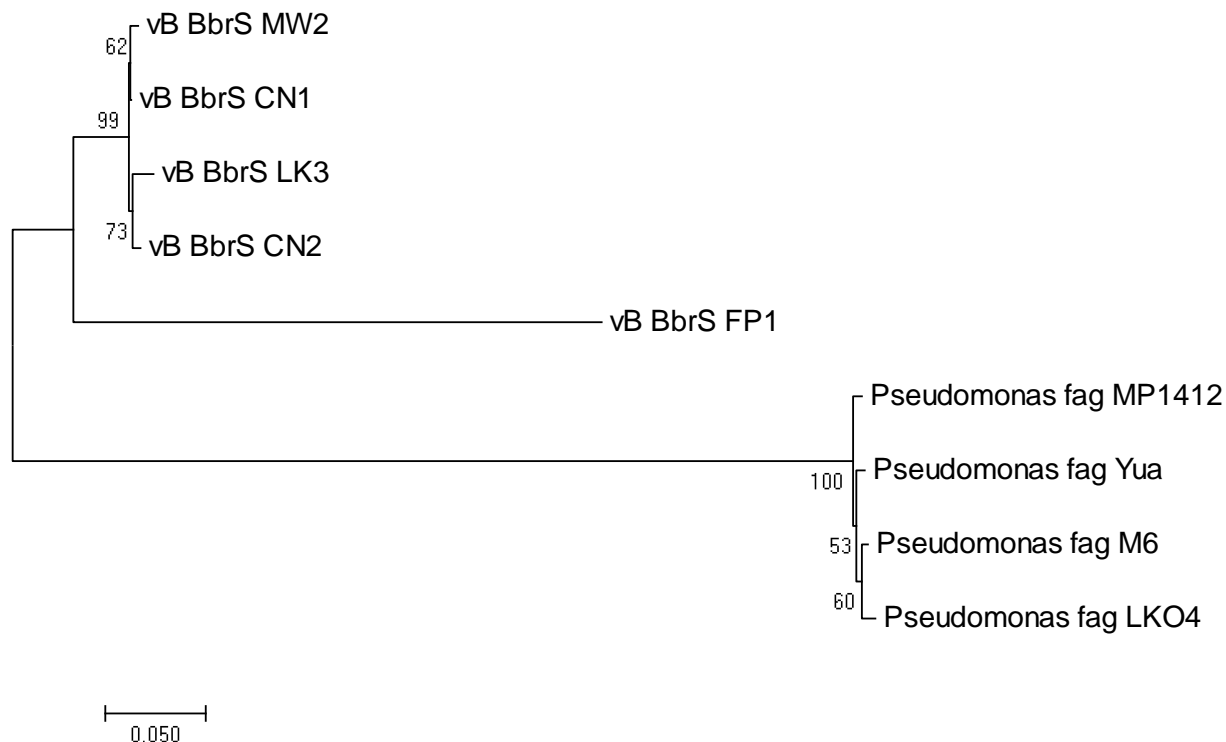
A)



B)



Slika 32. Dendrogram generisan na osnovu sekvenci kompletnog genoma *B. bronchiseptica* faga (A) i proteinskih sekvenci glavnog proteina kapsida (B)



Slika 33. Dendrogram generisan na osnovu proteinskih sekvenci gena koji kodira proteinsku mernu traku dužine repa

5.7. REZULTATI PRETRAGE BAKTERIJSKIH TOKSINA

Rezultati identifikacije potencijalnih egzotoksina u genomu LK3 faga, zasnovanih na homologiji domena toksina, homologiji sekvence toksina (blastP) i rezultata predikcije potencijalnih toksina na osnovu mehaničkog učenja DBETH softvera prikazani su u tabeli 14. Rezultati pretrage bakterijskih toksina u genomima drugih *B. bronchiseptica* faga (CN1, CN2, MW2 i FP1), nalaze se u prilogu diertacije (prilog 9.18, 9.19, 9.20 i 9.21). Analiza domena toksina kod LK3 faga pokazala je da ORF4, ORF9 i ORF40 pokazuju sličnost sa kolera tipom toksina. Male E vrednosti ($<10^{-21}$) ukazuju na veliko podudaranje njihovih aminokiselinskih sekvenci sa aminokiselinskim sekvencama potencijalnih toksina.

Rezultati identifikacije sekvenci sličnih potencijalnim egzotoksinima (blastP) ukazuju da skoro svi ispitani proteini LK3 faga pokazuju sličnost sa barem jednom sekvencom bakterijskih

toksina, sa izuzetkom 6 od ukupno 80 proteina. ORF2 pokazao je sličnost sa kanalnim proteinom iz hemolizin III familije, dok je ORF3 pokazao sličnost sa kolagenzaom. Proteini ORF24 i ORF67 ukazali su na sličnost sa proteinima uključenim u metabolizam lipida. Ovi proteini pokazuju sličnost sa prekursorom C za sfingomijelinazu (ORF24) i putativnu fosfolipazu D (ORF67). Proteinske sekvence ORF17, ORF18, ORF25, ORF28, ORF33, ORF37, ORF48, ORF64, ORF69, ORF72, ORF74 i ORF77 pokazuju sličnost sa proteinima efluksnih pumpi.

Rezultati predikcije potencijalnih toksina na osnovu mehaničkog učenja DBETH softvera ukazuju da većina testiranih protiena mogu biti potencijalni toksini, dok svega 3 proteina ne pokazuje to svojstvo.

Rezultati pretrage toksina u BTXpred softveru pokazali su da SVM AA i SVM dipetid analiza daju pozitivne rezultate predikcije egzotoksina za 37,5 %, odnosno za 21,3 % ispitivanih proteina. Za razliku od prethodne dve analize, PSI-BLAST, tip toksina, funkcija i HMM analiza nisu dali pozitivne rezultate ni za jedan testirani protein.

Tabela 14. Rezultati predikcije egzotoksina u genomu LK3 faga (potencijalni toksini su podvučeni)

Red. broj	DBETH											BTXpred						
	Domen toksina				Sličnost sa sekvencom toksina (blastP)							Potenc. toksin	PSI-BLAST	Tip toksina	Funkcija	SVM AA	SVM dipeptid	HMM
	Naziv	No.	E vrednost	Tip toksina	Naziv	No.	Identičnost	E	Skor	QC (%)								
1.	-	-	-	-	protein spoljašnje membrane, autotransporter [Sebalidella termitidis ATCC 33386]	YP_003309143.1	32.69	0.76	29.3	50	+	-	-	-	-	-		
2.	-	-	-	-	hemolizin III familija, kanalni protein [Syntrophobacter fumaroxidans MPOB]	YP_844366.1	40.91	1.9	31.6	74	-	-	-	-	-	-		
3.	-	-	-	-	kolagenaza [Hathewayia histolytica]	BAA77453.1	27.69	0.17	31.2	53	+	-	-	-	-	-		
4.	<u>kolera enterotoksin</u>	<u>PF01375.10</u>	<u>4.8e-21</u>	<u>kolera enterotoksin</u>	endonukleaza/egzonukleaza/fosfataza [Rhodococcus erythropolis SK121]	ZP_04385188.1	24.32	0.54	31.2	34	+	-	-	-	-	-		
5.	-	-	-	-	protein AcrB/AcrD/AcrF familije [Pseudomonas stutzeri A1501]	YP_001172680.1	26.00	0.25	33.1	32	+	-	-	-	+	+		
6.	-	-	-	-	DNK helikaza superfamilija [Escherichia coli UTI89]	YP_543814.1	36.96	1.8	31.2	11	-	-	-	-	-	-		

7.	-	-	-	-	hipotetički protein [<i>Dictyoglomus turgidum</i> DSM 6724]	YP_002353214.1	27.84	0.034	37.4	16	-	-	-	-	+	-	-
8.	-	-	-	-	endonukleaza/egzonukleaza/fosfataza [<i>Ralstonia pickettii</i> 12J]	YP_001898341.1	28.40	1.1	31.6	24	+	-	-	-	+	-	-
9.	<u>kolera enterotoksinn</u>	PF01375.10	1e-130	<u>kolera enterotoksin</u>	hidrofobni transporter / efluks-1 familija [<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822]	ZP_03154428.1	27.03	2.6	30.0	22	+	-	-	-	-	-	-
10.	-	-	-	-	kardiolipin sintetaza [<i>Photobacterium angustum</i> S14]	ZP_01233984.1	33.93	4.0	29.3	17	+	-	-	-	-	-	-
11.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12.	-	-	-	-	hipotetički protein [<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017]	YP_001516194.1	37.84	3.0	29.6	93	+	-	-	-	+	-	-
13.	-	-	-	-	domen proteina kardiolipin sintetaze [<i>Bacillus</i> sp. SG-1]	ZP_01860931.1	24.64	0.55	33.1	97	+	-	-	-	+	+	-
14.	-	-	-	-	transmembranski lipoproteinski transporter [<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1]	YP_001021328.1	40.00	8.6	27.3	14	+	-	-	-	-	-	-

15.	-	-	-	-	hipotetički protein [<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472]	NP_901963.1	36.59	1.7	30.8	80	+	-	-	-	-	-	-
16.	-	-	-	-	hipotetički protein [<i>Clostridium ramosum</i> DSM 1402]	ZP_02428177.1	29.79	4.7	28.1	17	+	-	-	-	-	-	-
17.	-	-	-	-	eksporter za antibiotike, RND superfamilija [<i>Frankia sp.</i> Eu11c]	ZP_06234809.1	42.5	2.2	38	76	+	-	-	-	+	-	-
18.	-	-	-	-	<u>kation-efluks sistemski protein CzcA</u> [<i>Sulfurimonas gotlandica</i> GD1]	<u>ZP_05071158.1</u>	<u>33.33</u>	<u>0.094</u>	<u>33.9</u>	<u>23</u>	+	-	-	-	-	-	-
19.	-	-	-	-	hidrofobni/amfipatični efluks-1 protein familije [<i>Ruegeria pomeroiyi</i> DSS-3]	YP_166638.1	44.19	0.017	35.0	22	+	-	-	-	-	+	-
20.	-	-	-	-	ParB protein [<i>Ruminococcus flavefaciens</i> FD-1]	ZP_06145260.1	32.26	0.46	33.9	63	+	-	-	-	-	-	-
21.	-	-	-	-	CBS domen proteina [<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 16]	ZP_05118893.1	45.83	1.4	28.1	14	+	-	-	-	-	-	-
22.	-	-	-	-	tRNA (5-aminometil- 2-tiouridilat)- metiltransferaze	ZP_06405193.1	41.94	2.2	29.6	93	+	-	-	-	+	-	-

					[<i>Prevotella sp.</i> oral taxon 299 str. F0039]													
23.	-	-	-	-	sfgomijelinaza C prekursor [<i>Vibrionales bacterium</i> SWAT-3]	ZP_01814192.1	29.69	0.33	30.8	33	+	-	-	-	-	-	-	-
24.	-	-	-	-	kation efluks sistemski protein CZCA [<i>Planctomyces maris</i> DSM 8797]	ZP_01853417.1	30.36	1.8	27.7	33	+	-	-	-	-	-	-	-
25.	-	-	-	-	manoza-1-fosfat guanililtransferaza/manoza-6-fosfat izomeraza [<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054]	YP_624022.1	31.71	1.0	33.1	68	+	-	-	-	-	-	-	-
26.	-	-	-	-	CzcA familija, efluksna pumpa za teške metale [<i>Pedobacter heparinus</i> DSM 2366]	YP_003092946.1	34.55	0.059	32.7	52	+	-	-	-	+	+	-	-
27.	-	-	-	-	tip I efluksni sekretorni sistem spoljašne membrane protein, TolC [<i>Pseudomonas entomophila</i> L48]	YP_610401.1	38.10	7.4	25.8	41	+	-	-	-	+	+	-	-
28.	-	-	-	-	hipotetički protein [<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC	NP_840967.1	32.26	1.2	28.5	33	+	-	-	-	-	-	-	-

					19718]												
29.	-	-	-	-	endonukleaza/egzonukleaza/fosfataza [Tolomonas auensis DSM 9187]	YP_002891981.1	40.91	1.3	31.6	70	+	-	-	-	+	-	-
30.	-	-	-	-	hipotetički protein [Ruminococcus obeum ATCC 29174]	ZP_01963405.1	25.00	6.0	26.2	61	+	-	-	-	-	-	-
31.	-	-	-	-	akriflavin protein za rezistenciju [Opitutus terrae PB90-1]	YP_001817817.1	38.10	1.8	27.7	54	+	-	-	-	-	-	-
32.	-	-	-	-	<u>efluksna pumpa za antibiotike</u> [Candidatus Hamiltonella defensa 5AT (Acyrtosiphon pisum)]	YP_002924384.1	<u>45.24</u>	<u>3.9</u>	<u>28.5</u>	<u>14</u>	+	-	-	-	+	-	-
33.	-	-	-	-	CzcA familija, efluksni protein za teške metale [Parvibaculum lavamentivorans DS-1]	YP_001414630.1	35.45	0.17	32.3	47	+	-	-	-	-	-	-
34.	-	-	-	-	integralni membranski protein [Streptomyces viridochromogenes]	ZP_05535054.1	30.14	4.7	26.6	51	+	-	-	-	-	+	-
35.	-	-	-	-	NAD+-asparagin ADP-ribosiltransferaza [Streptococcus mitis B6]	YP_003445585.1	43.48	1.1	28.5	17	+	-	-	-	-	-	-

36.	-	-	-	-	efluksni membranski protein [<i>Flavobacterium bacterium</i> BAL38]	ZP_01735100.1	30.19	0.46	316	17	+	-	-	-	-	-	-
37.	-	-	-	-	endonukleaza/egzonukleaza/fosfataza [<i>Caulobacter seignis</i> ATCC 21756]	ZP_06121465.1	29.41	9.1	25.4	56	+	-	-	-	+	-	-
38.	-	-	-	-	ne-ribozomalna sintetaza [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a]	YP_234877.1	34.04	0.81	28.9	40	+	-	-	-	-	-	-
39.	<u>kolera enterotoksin kin</u>	PF01375.10	1.3e-130	<u>kolera enterotoksin</u>	eksportovana peptidaza [<i>Chlamydomophila abortus</i> S26/3]	YP_220172.1	25.00	0.30	30.4	47	+	-	-	-	+	-	-
40.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
41.	-	-	-	-	proteinski toksin [<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 31758]	YP_001400798.1	59.18	0.0	815	73	+	-	-	-	-	-	-
42.	-	-	-	-	bifunkcionalni protein subjedinice translokaza protein SecD/SecF [<i>Bacteroides fragilis</i> 3_1_12]	ZP_05283581.1	23.39	0.56	30.8	57	+	-	-	-	-	-	-
43.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
44.	-	-	-	-	akriflavin protein za	YP_002218649.1	28.42	1.0	29.3	49	+	-	-	-	+	-	-

					rezistenciju [<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 53993]												
45.	-	-	-	-	hipotetički protein [<i>Vibrio cholerae</i> 2740-80]	ZP_01677459.1	32.65	0.16	31.2	28	+	-	-	-	-	-	-
46.	-	-	-	-	konzervativni hipotetički protein [<i>Polaribacter</i> sp. MED152]	ZP_01052175.1	30.51	9.8	25.4	60	+	-	-	-	+	-	-
47.	-	-	-	-	katjon efluksni protein [<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> T-27]	<u>YP_002762125.1</u>	<u>47.06</u>	<u>0.037</u>	<u>33.5</u>	<u>28</u>	+	-	-	-	-	-	-
48.	-	-	-	-	akriflavin protein za rezistenciju [<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i> ATCC 19860]	ZP_06209992.1	60.00	2.7	28.1	76	+	-	-	-	+	-	-
49.	-	-	-	-	inzitol fosfat fosfataza SopB; efektni protein SopB	SOPB_SALBN	50.00	2.2	27.7	25	+	-	-	-	-	-	-
50.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
51.	-	-	-	-	akriflavin protein za rezistenciju [<i>Thioalkalivibrio</i> sp. K90mix]	YP_003459757.1	48.48	0.76	30.4	12	+	-	-	-	-	-	-
52.	-	-	-	-	akriflavin protein za	ZP_03700511.1		1.6	29.3	20	+	-	-	-	-	-	-

					rezistenciju [<i>Flavobacteria bacterium</i> MS024- 3C]		32.73										
53.					CzcA familija, efluksni protein za teške metale [<i>Pseudomonas putida</i> F1]	YP_001265383.1	37.25	4.5	30.4	60	+	-	-	-	-	-	-
54.					akriflavin protein za rezistenciju [<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831]	YP_001756967.1	32.41	0.19	34.7	14	+	-	-	-	-	-	-
55.					metil-akseptujući protein [<i>Vibrio alginolyticus</i> 40B]	ZP_06179448.1	39.39	1.1	28.5	89	+	-	-	-	-	-	-
56.					NAD+-asparagin, ADP- riboziltransferaza [<i>Streptococcus mitis</i> B6]	YP_003445585.1	30.00	0.12	35.0	68	+	-	-	-	+	-	-
57.					površinski protein [<i>Clostridium kluveri</i> DSM 555]	YP_001394490.1	32.86	1.6	30.4	18	+	-	-	-	-	-	-
58.					<u>leukocidin/iz</u> <u>hemolizin toksin</u> familije [<i>Vibrio sp.</i> Ex25]	<u>ZP_04921430.1</u>	<u>36.73</u>	<u>9.4</u>	<u>28.1</u>	<u>84</u>	+	-	-	-	+	+	-

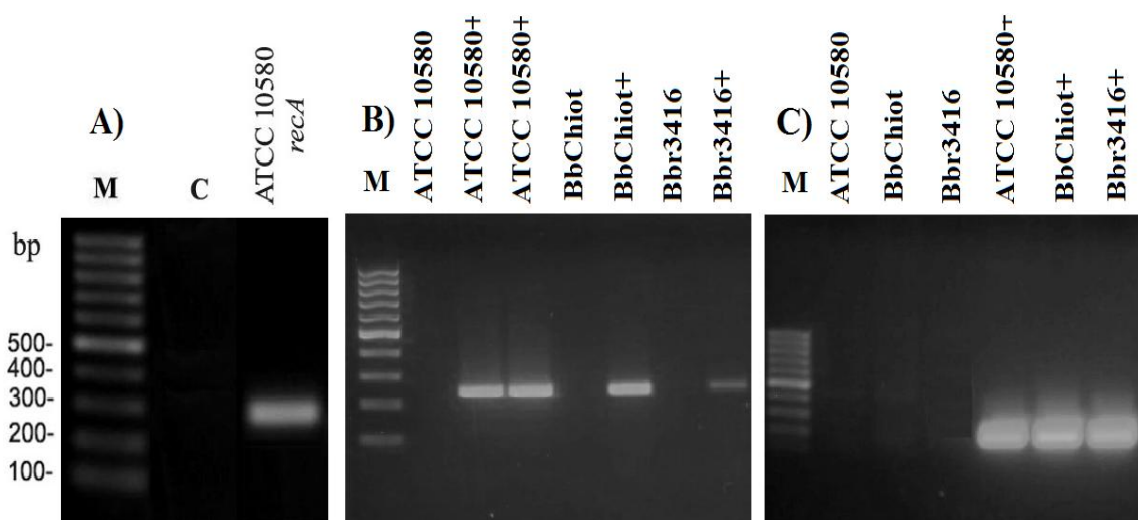
59.					protein za membranski eksport, SecD [<i>Bacillus cellulosilyticus</i> DSM 25222]	ZP_06362363.1	28.12	4.0	28.9	25	+	-	-	-	-	-	-
60.					alfa-N-arabinofuranozidaza [<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32]	YP_001183570.1	46.43	4.5	28.1	99	+	-	-	-	-	-	-
61.					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
62.					metil-akseptujući protein [<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555]	YP_001396205.1	20.93	6.0	27.7	63	+	-	-	-	-	-	-
63.					<u>efluksna pumpa za transport antibiotika, HAE1 familija transportnih proteina</u> [<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ]	<u>YP_002801502.1</u>	<u>33.70</u>	<u>0.009</u>	<u>35.4</u>	<u>52</u>	+	-	-	-	-	-	-
64.					-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
65.					ToIC familija, protein tipa I sekretornog sistema spoljašnje membrane [<i>Kangiella korensis</i> DSM 16069]	YP_003147191.1	50.00	5.6	27.7	85	+	-	-	-	+	+	-
66.					<u>pretpostavljena fosfolipaza D</u> [<i>Rhizobium etli</i> CIAT 652]	<u>YP_001985064.1</u>	<u>30.77</u>	<u>0.31</u>	<u>30.4</u>	<u>29</u>	+	-	-	-	-	-	-

67.					pretpostavljeni magnezijum/kobalt efluksni protein CorB [gamma proteobacterium HTCC2207]	ZP_01224091.1	40.00	0.37	31.2	16	+	-	-	-	+	+	-
68.					efluksni protein spoljašnje membrane [Capnocytophaga ochracea DSM 7271]	YP_003140508.1	36.54	0.51	33.5	67	+	-	-	-	+	+	-
69.					pretpostavljeni bakar/srebro protein za rezistenciju [Kordia algicida OT-1]	ZP_02163894.1	37.04	0.24	31.6	25	+	-	-	-	+	+	-
70.	-	-	-	-	protein sa CBS/transporter-domenom [Fusobacterium mortiferum ATCC 9817]	ZP_04567458.1	40.00	4.7	26.6	25	+	-	-	-	+	-	-
71.	-	-	-	-	efluksni protein spoljašnje membrane [Asticcacaulis excentricus CB 48]	ZP_04771701.1	42.86	0.43	31.12	16	+	-	-	-	-	+	-
72.	-	-	-	-	RND transporter, HAE1/HME familija, premeaza protein [Brevundimonas sp.]	ZP_05032983.1	25.69	1.0	33.5	99	+	-	-	-	+	-	-

73.	-	-	-	-	RND efluksni sistem, lipoprotein spoljašnje membrane, NodT familija [<i>Burkholderia multivorans</i> CGD1]	ZP_03583923.1	36.00	5.2	29.6	89	+	-	-	-	-	-	-
74.	-	-	-	-	akriflavin protein za rezistenciju [<i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> ATCC 9039]	YP_001833981.1	30.88	1.5	31.6	95	+	-	-	-	+	+	-
75.	-	-	-	-	replikacioni protein B [<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4]	YP_003068122.1	26.76	4.8	26.6	67	+	-	-	-	-	-	-
76.	-	-	-	-	efluksni protein spoljašnje membrane [<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 53993]	YP_002220135.1	44.44	2.1	27.7	28	+	-	-	-	-	-	-
77.	-	-	-	-	akridinska efluksna pumpa [<i>Photobacterium asymbiotica</i>]	YP_003042229.1	31.97	0.57	34.3	71	+	-	-	-	+	+	-
78.	-	-	-	-	konzervativni hipotetički protein [<i>Streptomyces sviveus</i> ATCC 29083]	ZP_05016081.1	48.57	3.2	29.3	96	+	-	-	-	+	+	-
79.	-	-	-	-	hipotetički protein [<i>Clostridium ramosum</i> DSM 1402]	ZP_02428177.1	30.16	0.94	30.8	16	+	-	-	-	+	+	-

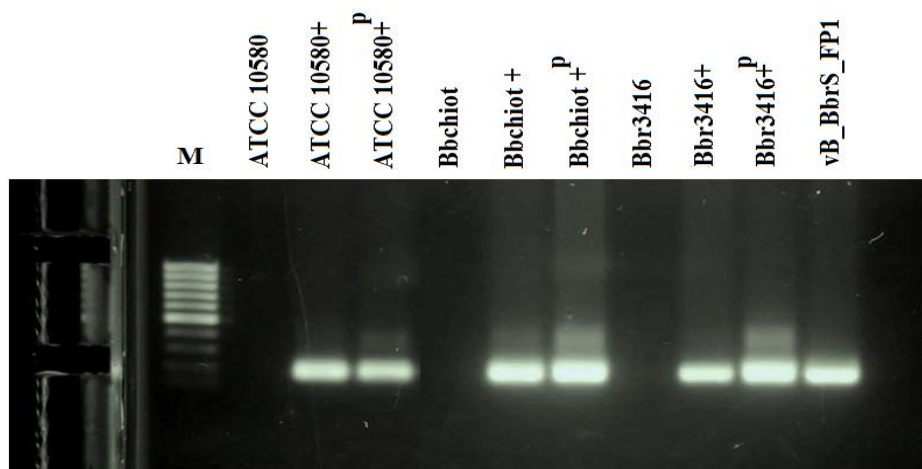
5.8. REZULTATI FORMIRANJA LIZOGENA I ULOGA FAGA U KONVERZIJI BAKTERIJE

U svrhu potvrde infekcije *B. bronchiseptica* sojeva fagom LK3 (ATCC 10580/LK3, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3), korišćena je PCR metoda sa dva para specifičnih prajmera (Bbr i Hem) dizajniranih na osnovu DNK sekvence pet sekvencioniranih faga (CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1) (Slika 34). Na fotografiji je jasno uočljivo prisustvo produkta PCR reakcije (~250 bp u slučaju Bbr prajmera i ~170 bp u slučaju Hem prajmera) u genomskoj DNK LK3 fagom inficiranih sojeva bakterija.



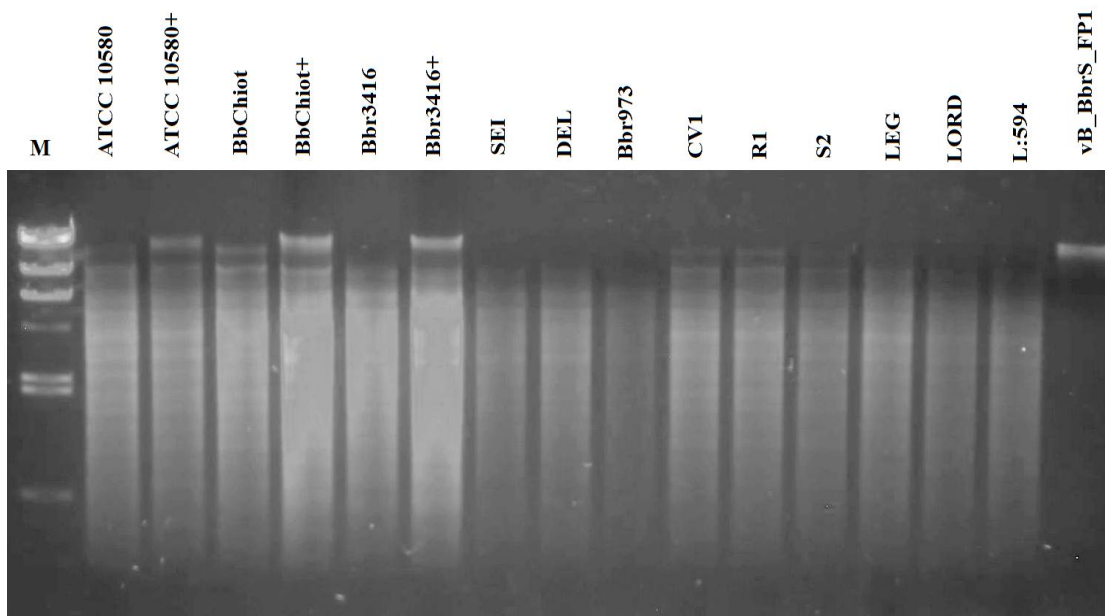
Slika 34. Potvrda prisustva DNK bakteriofaga u genomskoj DNK bakterije, kao dokaz infekcije fagom LK3: A) Kontrola kvaliteta bakterijske DNK sa Bbr-recA prajmerima; B) PCR potvrda specifičnim prajmerima Bbr-R i Bbr-F; PCR potvrda specifičnim prajmerima Hem-R i Hem-F. M-marker (100 bp), C- negativna kontrola sa destilovanom vodom, ATCC 10580, Bbchiot i Bbra3416-neinficirani sojevi; ATCC 10580+, Bbchiot+ i Bbr3416+-inficirani sojevi

Rezultati PCR metode dobijeni korišćenjem plazmidne DNK i prajmera Hem takođe ukazuju na prisustvo očekivanog produkta PCR reakcije (~170 bp) (Slika 35), što dodatno potvrđuje prisustvo LK3 faga u inficiranim bakterijama.



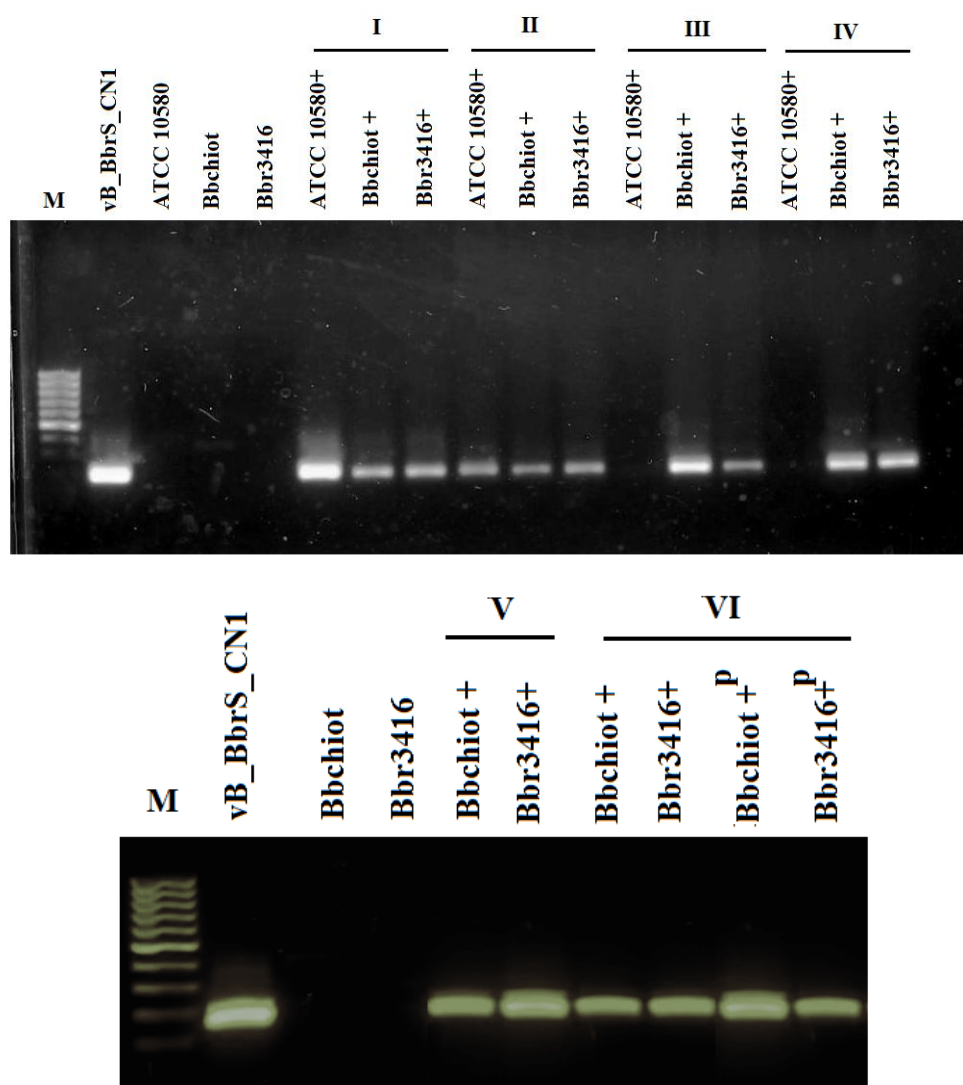
Slika 35. Potvrda prisustva DNK bakteriofaga u plazmidnoj DNK bakterije, kao dokaz infekcije fagom LK3: M-marker (100 bp), ATCC 10580, Bbchiot i Bbr3416-genomska DNK neinficiranih sojeva; ATCC 10580+, Bbchiot+ i Bbr3416+-genomska DNK inficiranih sojeva; 10580+^P, Bbchiot+^P i Bbr3416+^P-plazmidna DNK inficiranih sojeva

Restrikciona digestija enzimom Sall, takođe je potvrdila infekciju sojeva *B. bronchiseptica* LK3 fagom (Slika 36). Enzim Sall isekao je bakterijsku DNK na veliki broj manjih fragmenata, pri čemu je DNK faga ostala neisečena. DNK faga se izdvojila kao najveća traka na gelu, a njena veličina odgovara veličini DNK LK3 faga.



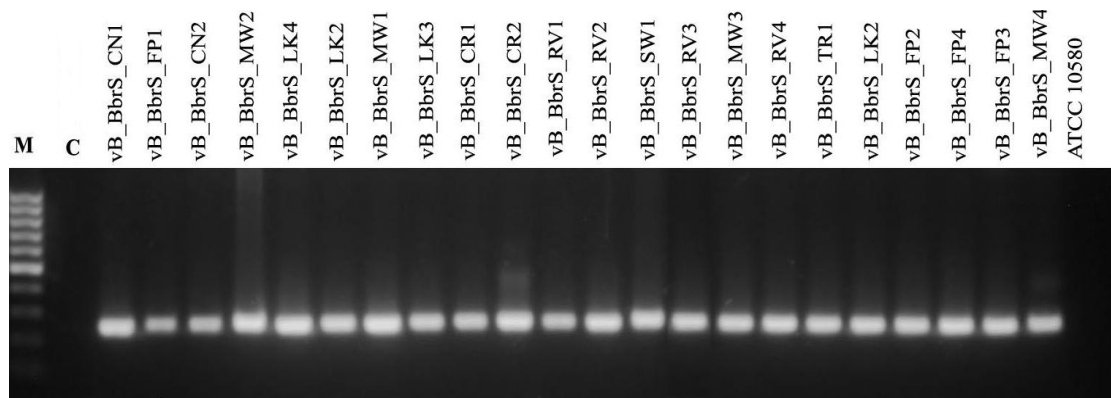
Slika 36. RFLP potvrda infekcije sojeva *B. bronchiseptica* bakteriofagima
M - marker DNK lambda/HindIII; ATCC 10580, Bbchiot i Bbra3416, SEI, DEL, Bbr973, CV1, R1, S2, LEG, LOF L:594-neinficirani sojevi; ATCC 10580+, Bbchiot+ i Bbr3416+-inficirani sojevi; FP1- DNK faga

U cilju ispitivanja stabilnosti lizogena i infekcije sojeva LK3 fagom, takođe je korišćena PCR metoda i par specifičnih prajemera Hem. Rezultati PCR metode pokazali su da *B. bronchiseptica* fagi formiraju nestabilne lizogene u originlanom domaćinu ATCC 10580 (Slika 37). Već nakon treće subkultivacije PCR-om se ne detektuju očekivani produkti i bakterija više nije inficirana fagom. Druga dva inficirana soja, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3 pokazali su se stabilnijim kada je u pitanju formiranje lizogena i dali su očekivani PCR produkt čak i nakon šestog presejavanja. Kod navedenih sojeva je korišćenjem plazmidne DNK takođe dobijen produkt nakon šeste subkultivacije.



Slika 37. Stabilnost lizogena tokom šest sukcesivnih subkultivacija (I-VI); M – marker 100 bp; ATCC 10580, Bbchiot i Bbr3416-neinficirani sojevi; ATCC 10580+, Bbchiot+ i Bbr3416+-inficirani sojevi

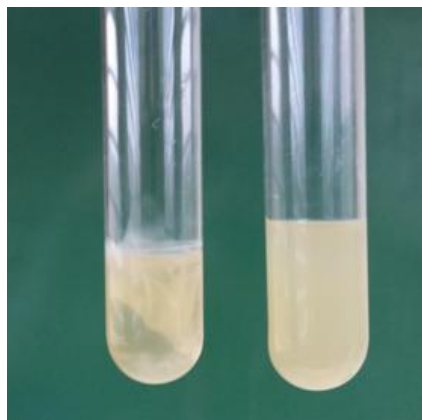
Rezultati PCR metode dobijeni korišćenjem DNK 23 *B. bronchiseptica* faga i prajmera Bbr-F i Bbr-R ukazuju na prisustvo očekivanog produkta PCR reakcije (~241 bp) kod svih analiziranih faga (Slika 38).



Slika 38. PCR *B. bronchiseptica* bakteriofaga sa specifičnim prajmerima Bbr-F i Bbr-R. M-marker (100 bp); C- destilovana voda kao negativna kontrola; ATCC 10580 –genomska DNK originalnog neinficiranog domaćina

5.8.1. Rezultati produkcije biofilma inficiranih i neinficiranih sojeva

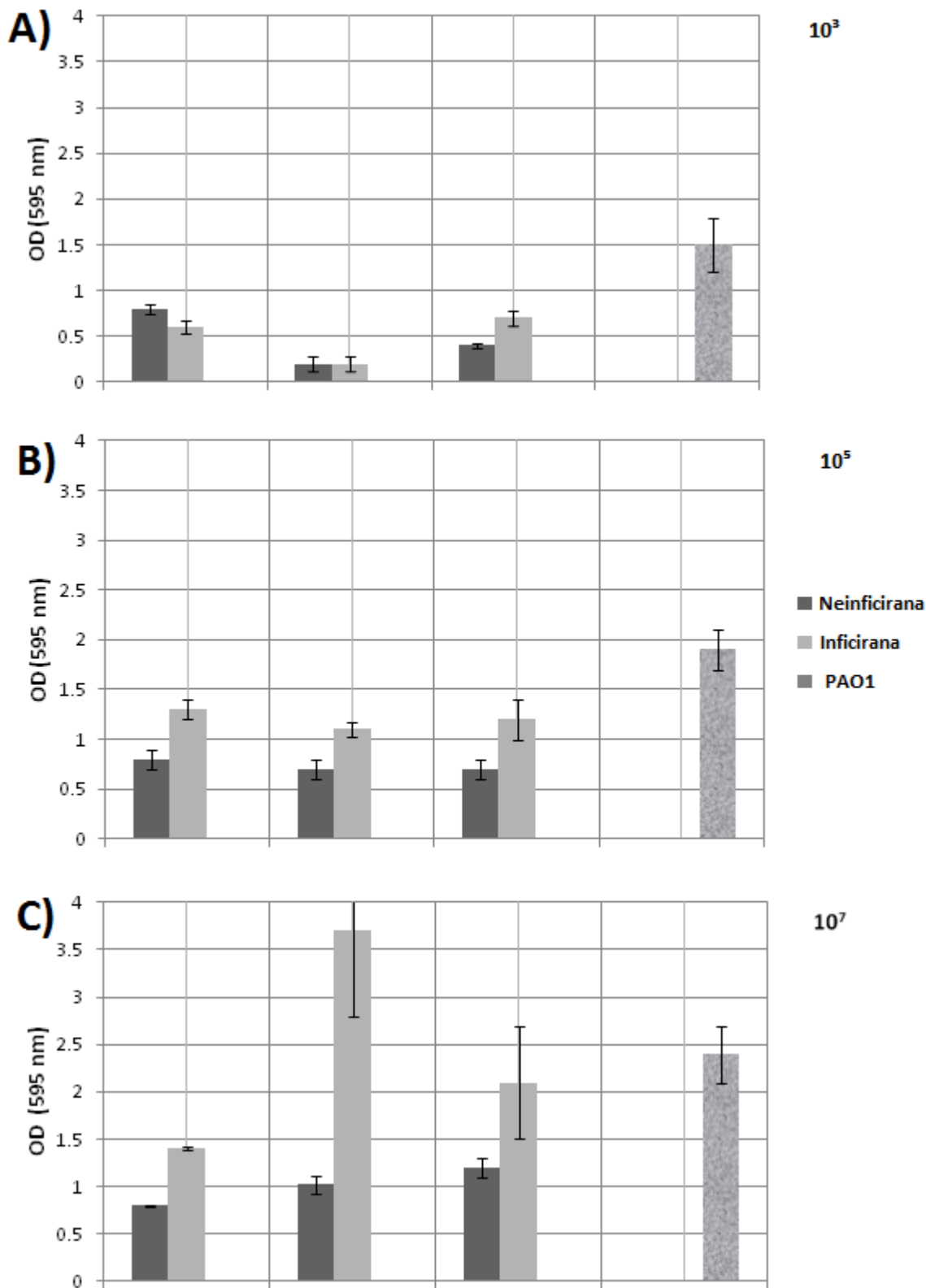
Ispitivana je mogućnost produkcije biofilma od strane inficiranih i neinficiranih sojeva nakon 24 h i 48 h inkubacije. Na slici 39 prikazane su epruvete inficiranog (Bbchiot/LK3) i neinficiranog soja (Bbrchiot). Na osnovu karakteristika rasta u tečnoj kulturi u staklenoj epruveti evidentna je promena adhezivnosti ćelija, koja je dokazana u eksperimentu u mikrotitar pločama od polistirena.



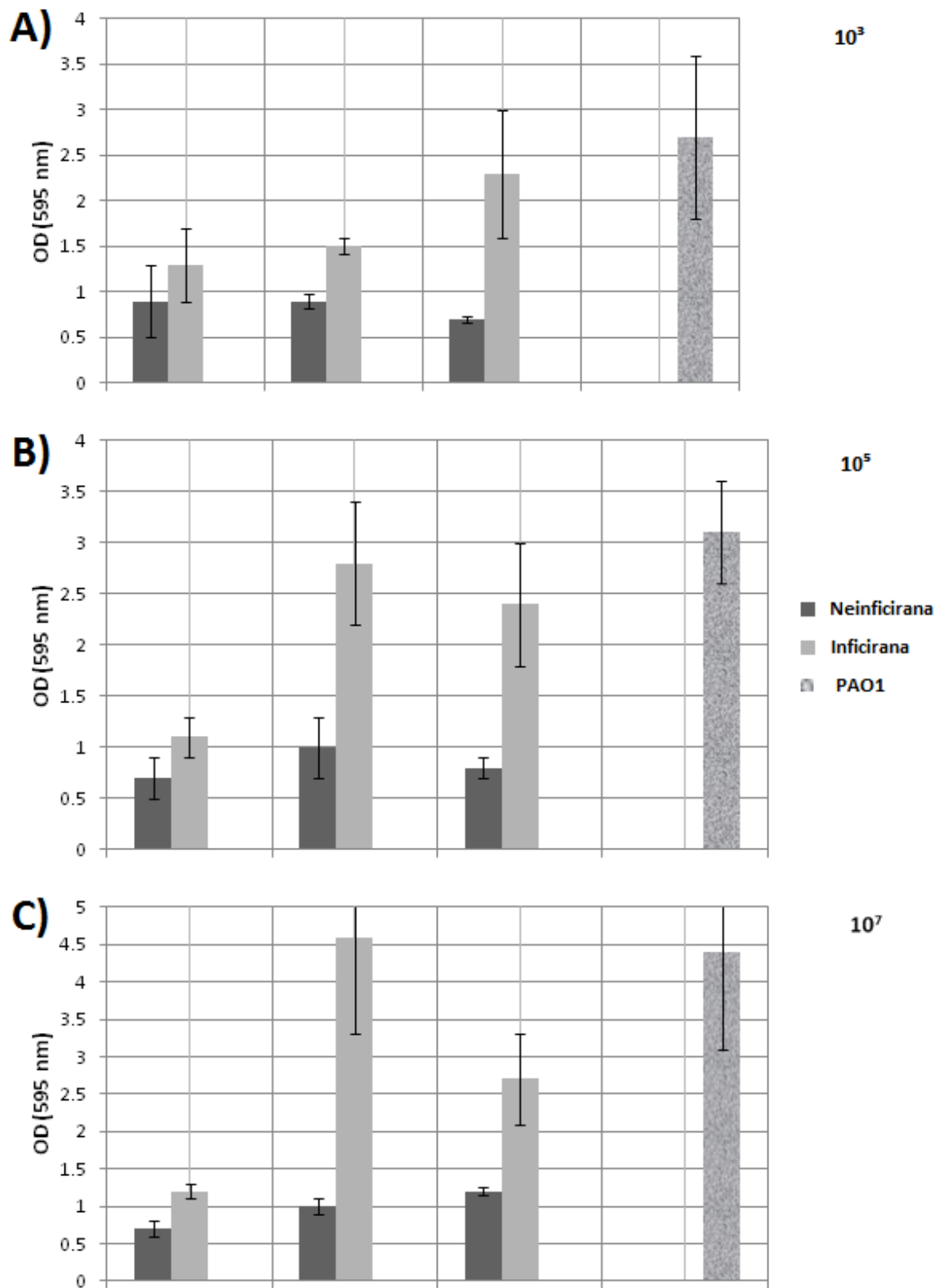
Slika 39. Rast *B. bronchiseptica* (Bbchiot) u LB bujonu nakon inkubacije od 48 h (levo- inficiran soj fagom LK3, desno- neinficiran soj)

Nakon 24 h inkubacije, biofilm su formirale i inficirane i neinficirane bakterije, pri sve tri ispitivane početne brojnosti bakterija 10^3 , 10^5 i 10^7 (Grafikon 6). Interesentno je primetiti da je inficirana bakterija formirala manje biofilma u odnosu na neinficiranu u slučaju referentnog soja ATCC 10580 i to samo pri početnoj brojnosti bakterija 10^3 nakon 24 h inkubacije. Pri istoj početnoj brojnosti (10^3), kod inficiranog i neinficiranog bakterijskog soja Bbchiot takođe nije utvrđena razlika u biomasi biofilma. Sem ova dva primera, u svim ostalim slučajevima, tj. pri različitim početnim brojnostima bakterija, inficirana bakterija je pokazala statistički značajano veći potencijal u formiranju biofilma u odnosu na neinficiranu ($p < 0.01$).

Statistički značajna razlika utvrđena je i u formiranju biofilma između inficiranih i neinficiranih sojeva *B. bronchiseptica* nakon inkubacije od 48 h (Grafikon 7). Sve inficirane bakterije pokazale su veći potencijal formiranja biofilma u odnosu na neinficirane bakterije, bez obzira na početnu brojnost bakterija u eksperimentu ($p < 0.01$). Interesentno je da su neke inficirane bakterije (Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) formirale čak 2-4 puta veću količinu biofilma u odnosu na divlje sojeve.



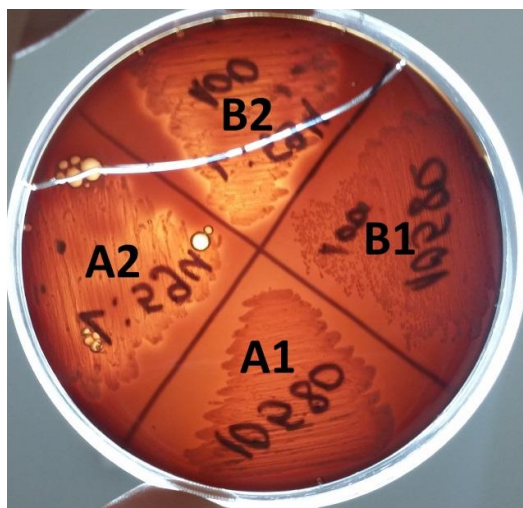
Grafikon 6. Biofilm inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva nakon inkubacije od 24 h: (A) početna brojnost bakterija 10^3 , (B) 10^5 i (C) 10^7



Grafikon 7. Biofilm inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva nakon inkubacije od 48 h: (A) početna brojnost bakterija (CFUml^{-1}) 10^3 , (B) 10^5 i (C) 10^7

5.8.2. REZULTATI KINETIKE HEMOLIZE

Ispitivanje razlike u hemolizi i rastu inficiranih i neinficiranih sojeva *B. bronchiseptica* su očitane direktno sa petri ploča na kojima je vršeno ispitivanje. Razlika u hemolizi nije primećena između inficiranih (ATCC 10580/LK3 i L:594/LK3) i neinficiranih sojeva (ATCC 10580 i L.594) na ovčijem i goveđem krvnom agaru (Slika 40).



Slika 40. Krvni agar sa goveđom krvi: inficirani (B) i neinficirani (A) sojevi *B. bronchiseptica* (1- Bbr ATCC 10580; 2- Bbr L: 594)

Rezultati analize kinetike hemolize prikazani su u tabeli 14. Utvrđena je statistički značajna razlika u hemolizi ovčijih eritrocita između soja inficiranog LK3 fagom (ATCC 10580/LK3) i neinficiranog soja *B. bronchiseptica* (ATCC 10580), dok značajna razlika nije uočena u hemolizi goveđih i pacovskih eritrocita.

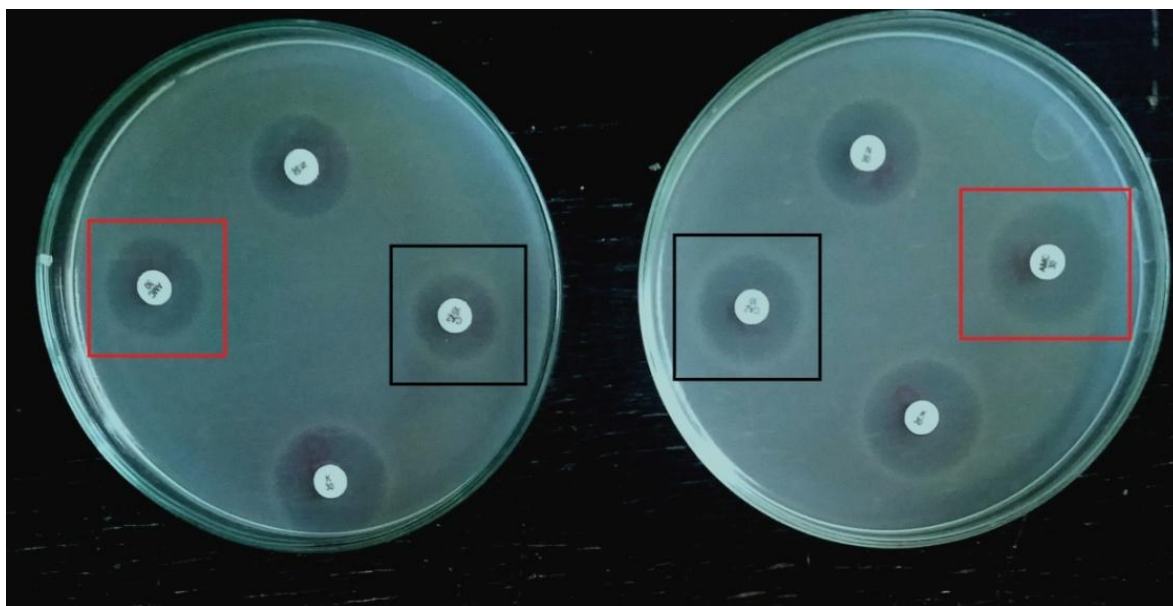
Tabela 15. Relativni % hemolize od strane inficiranog i neinficiranog referentnog soja *Bordetella bronchiseptica* ATCC 10580 nakon 48 h u odnosu na 1% SDS

Poreklo krvi	Inficiran soj ATCC 10580/LK3	Neinficiran soj ATCC 10580
Ovca	26 ± 0.28*	14.3 ± 3.7*
Pacov	38.1 ± 6.1	47 ± 6.8
Govedo	59.1 ± 12.02	66.95 ± 7

5.8.3. REZULTATI ANTIBIOGRAMA INFICIRANIH I NEINFICIRANIH SOJEVA

Rezultati antibiograma *B. bronchiseptica* sojeva inficiranih fagom LK3 (ATCC 10580/LK3, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) i neinficiranih (ATCC 10580, Bbchiot i Bbr3416) dobijeni disk-difuzionom metodom, prikazani su na slici 41 i u tabeli 16. Rezultati ukazuju na postojanje značajne razlike u osetljivosti na antibiotike iz grupe beta-laktama, tetraciklina i sulfonamida. Naime, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između inficiranog (ATC10580/LK3) i neinficiranog (ATCC 10580) soja utvrđena je u osetljivosti na amoksisilin/klavulansku kiselinu, doksiciklin i trimetoprim/sulfametaksazol, dok je razlika između inficiranog (Bbchiot/LK3) i neinficiranog (Bbchiota) bila statistički značajna jedino u slučaju osetljivosti na amoksisilin/klavulansku kiselinu i ceftazidim.

Statistiki značajna razlika između inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva nije utvrđena u slučaju drugih antibiotika.



Slika 41. Antibiogram inficiranog (levo) i neinficiranog (desno) *B. bronchiseptica* soja Bbchiot

Tabela 16. Osetljivost inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva na antibiotike određena disk-difuzinom metodom (podvučene su statistički značajne razlike)

<i>B. bronchiseptica</i> sojevi	Dijametar zone inhibicije (mm) ± SD										
	AMP (20µg)	AMX (25µg)	AMC (20/10µg)	LEX (30 µg)	FOX (30 µg)	CAZ (30 µg)	CTX (30 µg)	AMK (30 µg)	GEN (10 µg)	STR (10 µg)	KAN (30 µg)
ATCC 10580	6 (R)	6 (R)	15,8±2,1 (I)	6 (R)	6 (R)	17,3±3 (I)	6 (R)	21,8±0,3 (S)	21,5±0,4 (S)	24,8±0,9 (S)	20,1±0,9 (S)
ATCC 10580/LK3	6 (R)	6 (R)	<u>12,1±0,9</u> (R)	6 (R)	6 (R)	16±2 (I)	6 (R)	23,4±1,9 (S)	20,8±0,5 (S)	25,8±0,6 (S)	21,3±0,6 (S)
Bbchiot	6 (R)	6 (R)	18,8±1 (S)	6 (R)	6 (R)	20±1 (I)	6 (R)	19±1,5 (S)	19±1,21 (S)	18,6±1,4 (S)	18±0,9 (S)
Bbchiot/LK3	6 (R)	6 (R)	<u>15,3±0,9</u> (I)	6 (R)	6 (R)	<u>13,5±0,5</u> (R)	6 (R)	18,5±0,4 (S)	19,5±0,4 (S)	17,5±1,3 (S)	19±0,3 (S)
Bbr3416	6 (R)	6 (R)	11,6±0,8 (R)	6 (R)	6 (R)	-	6 (R)	18±1 (S)	16,9±0,6 (S)	18,9±0,9 (S)	16,6±0,5 (I)
Bbr3416/LK3	6 (R)	6(R)	13±0,5 (R)	6 (R)	6 (R)	-	6 (R)	20,8±1,5 (S)	18,8±2,6 (S)	21,1±1,3 (S)	15,6±0,5 (I)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	6 (R)	6 (R)	0	6 (R)	6 (R)	24,5±0,5 (O)	6 (R)	18,5±2,1 (S)	18,5±2,1 (S)	17,7±3,1 (S)	13,5±2,1 (R)

	NET (30 µg)	TOB (10 µg)	NEO (30 µg)	TET (30 µg)	DOX (30 µg)	CIP (5 µg)	ATM (30 µg)	CHL (30 µg)	IMP (10 µg)	SXT (23,75/1, 25 µg)
ATCC 10580	24,1±2, 5 (S)	21,3±0, 4 (S)	16,1±0,5 (S)	33,5±1,3 (S)	43±1,2 (S)	34,3±2,6 (S)	6 (R)	31,5±0,4 (S)	31,8±1,5 (S)	25,5±4,1 (S)
ATCC 10580/LK3	26,1±1 (S)	21,4±0, 6 (S)	18,6±0,3 (S)	32,8±2,5 (S)	<u>38,3±1</u> (S)	33,5±0,6 (S)	6 (R)	29,7±3,4 (S)	30,5±0,6 (S)	<u>19,6±1,1</u> (S)
Bbchiot	22±0,0 (S)	17±0,0 (S)	15,8±0,5 (I)	26,5±2,6 (S)	33,5±1,7 (S)	28,8±0,5 (S)	6 (R)	26,8±2,1 (S)	31,3±0,6 (S)	6 (R)
Bbchiot/LK3	24,8±0, 5 (S)	18,3±0, 8 (S)	14,4±0,5 (I)	27,2±0,3 (S)	35,9±3,6 (S)	27,4±1,1 (S)	6 (R)	28,2±2,5 (S)	30,3±0,6 (S)	6 (R)
Bbr3416	21±1,4 (S)	18,8±0, 3 (S)	15,8±0,6 (I)	24,1±2,2 (S)	33,3±0,5 (S)	25±0,8 (S)	6 (R)	21,6±0,8 (S)	27±2,6 (S)	6 (R)
Bbr3416/LK3	21,4±0, 5 (S)	21,5±1, 1 (S)	14,9±0,3 (I)	25,5±2,4 (S)	35,3±0,5 (S)	23,1±0,8 (S)	6 (R)	22,6±0,5 (S)	25,3±2,5 (S)	6 (R)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	22±0,0 (S)	21,5±0, 5 (S)	15±1,4 (I)	13±0,0 (I)	13,5±0,7 (S)	25,5±0,7 (S)	16±1,4	15,5±2,1 (I)	23,5±2,1 (S)	6 (R)

- AMP-ampicilin; AMX-amoksisilin; AMC-amoksisilin/klav.kiselina; LEX-cefaleksin; FOX-cefoksitin; CAZ-ceftazidim; CTX-cefotaksim; AMK-amikacin; GEN-gentamicin; STR-streptomycin; KAN-kanamicin; NET-netilmicin; TOB-tobramicin; NEO-neomicin; TET-tetraciklin; DOX-doksiciklin; CIP-ciprofloksacin; ATM-aztreonam; CHL-hloramfenikol; IMP-imipenem; SXT-sulfametaksazol/trimetoprim

- S - osetljiv soj; I – intermedijerno (umereno) osetljiv soj; R – rezistentan soj

Dobijene MIC vrednosti potvrđuju deo rezultata dobijenih disk-difuzionom metodom (Tabela 17). Minimalna inhibitorna koncentracija za amoksicilin/klavulansku kiselinu se razlikuje između inficiranog (ATCC 10580/LK3) (6,3 µg/ml) i neinficiranog soja (ATCC 10580) (4 µg/ml), dok je vrednost MIC-a kod inficiranog (Bbchiot/LK3) i neinficiranog soja (Bbchiot) ista (8 µg/ml). Za antibiotik ceftazidim uočena je statistički značajna razlika u MIC vrednostima između inficiranog (Bbchiot/LK3) i neinficiranog soja (Bbchiot): Bbchiot/LK3 je rezistentiji na ceftazidim (MIC 12,7 µg/ml) u odnosu na neinficirani soj Bbchiot (MIC 8 µg/ml).

Tabela 17. MIC antibiotika za neinficirane i inficirane *B. bronchiseptica* sojeve (podvučene su statistički značajne razlike)

<i>B. bronchiseptica</i> sojevi	MIC vrednosti (µg/ml)		
	AMC	CAZ	STR
ATCC 10580	4 (I)	4 (I)	128 (R)
ATCC 10580/LK3	6,3 (R)	4 (I)	128 (R)
Bbchiot	8 (R)	8 (R)	128 (R)
Bbchiot/LK3	8 (R)	12,7 (R)	128 (R)
Bbr3416	6,7 (R)	13,3 (R)	256 (R)
Bbr3416/LK3	6,7 (R)	13,3 (R)	256 (R)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8 (S)	5,3 (S)	32 (R)

* AMC – amoksicilin/klav. kiselina; CAZ – ceftazidim; S – streptomycin

* rezultati su predstavljeni kao geometrijska sredina tri ponavljanja

5.8.4. Rezultati ispitivanja pokretljivosti, produkcije fimbrija i likvefakcije želatina inficiranih sojeva

Pokretljivost pilima i flagelama na 37 °C inficiranih (ATCC 10580/LK3, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) i neinficiranih sojeva (ATCC 10580, Bbchiot i Bbr3416) vrste *B. bronchiseptica* prikazana je u tabeli 18. Rezultati pokretljivosti flagelama kod Bbchiot soja jasno ukazuju na postojanje razlike između inficiranog i neinficiranog soja; inficirani soj je pokazao statistički značajno veću zonu rasta, tj. plivajućeg kretanja u odnosu na neinficirani soj. U slučaju ostalih sojeva, razlika u dijametru zone rasta nije značajna, tj. razlike u pokretljivosti flagelama između inficiranih i neinficiranih bakterija nisu uočene ili su veoma male.

Rezultati pokretljivosti pilima takođe ukazuju na postojanje razlika između inficiranih i neinficiranih sojeva (Tabela 18). Za razliku od pokretljivosti flagelama, ovde je uočena manja zona rasta kod dva inficirana soja (Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) u odnosu na neinficirane (Bbchiot i 3416). U slučaju referentnog soja, razlike u pokretljivosti pilima između inficiranog (ATCC 10580/LK3) i neinficiranog soja (ATCC 10580) nisu uočene.

Tabela 18. Pokretljivost inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva pomoću pila i flagela (podvučene su statistički značajne razlike)

<i>B. bronchiseptica</i> sojevi	Dijametar zone rasta (mm) ± S.E.	
	Pokretljivost flagelama na 37°C	Pokretljivost pilima 37°C
ATCC 10580	14.6 ± 0.7	4 ± 0.0
ATCC 10580/LK3	14.4 ± 1.6	4.3 ± 0.2
Bbchiot	66.9 ± 2.5	5 ± 0.3
Bbchiot/LK3	78.2 ± 1.8	4.1 ± 0.2
Bbr3416	78.8 ± 1.7	6.8 ± 0.3
Bbr3416/LK3	75.8 ± 2.9	4 ± 0.3
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	35.2 ± 0.8	7.8 ± 0.3

Rezultati produkcije fimbrija na 37 °C i 26 °C kod inficiranih (ATCC 10580/LK3, ATCC 10580/CN2, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) i neinficiranih sojeva (ATCC 10580, Bbchiot i Bbr3416) prikazani su u tabeli 19. Statistički značajna redukcija kongo-crvenog uočena je kod dva soja ($p < 0,5$); inficirani ATCC/CN2 redukovao je znatno više kongo-crvenog u odnosu na neinficirani ATCC 10580, dok je suprotan slučaj zabeležen kod neinficiranog Bbr3416 soja koji je znatno više redukovao boju u odnosu na inficirani soj Bbr3416/LK3. Ostali inficirani i neinficirani sojevi nisu pokazali značajnije razlike u redukciji kongo-crvenog. Razlike u produkciji pila između inficiranih i neinficiranih sojeva inkubacijom na 26 °C i 37 °C su manje ili više iste. Generalno, manja produkcija fimbrija zabeležena je na 26 °C u odnosu na produkciju koja je dobijena inkubacijom bakterija na 37 °C. Jedino u slučaju soja ATCC 10580/CN2 je utvrđena veća produkcija fimbrija na 26 °C (39,8 % redukcije kongo-crvenog) u odnosu na produkciju koja je zabeležena na 37 °C.

Tabela 19. Produkcije fimbrija inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva (podvučene su statistički značajne razlike)

<i>B. bronchiseptica</i> sojevi	% redukcije kongo-crvenog	
	37°C	26°C
ATCC 10580	10 ± 2,1	9.1 ± 1,3
ATCC 10580/LK3	11,8 ± 2	8.5 ± 2,3
ATCC 10580/CN2	26.9 ± 1,4	39.8 ± 2,1
Bbchiot	23.6 ± 2,3	14.7 ± 3,5
Bbchiot/LK3	27.9 ± 1,5	17.2 ± 2,7
Bbr3416	39.5 ± 1,4	48.2 ± 3,9
Bbr3416/LK3	8.6 ± 2,2	6.4 ± 2,9
<i>E. coli</i> ATCC 25922	70.2 ± 4,8	68.3 ± 3,1

5.8.5. Rezultati ispitivanja hidrolize želatina inficiranih sojeva

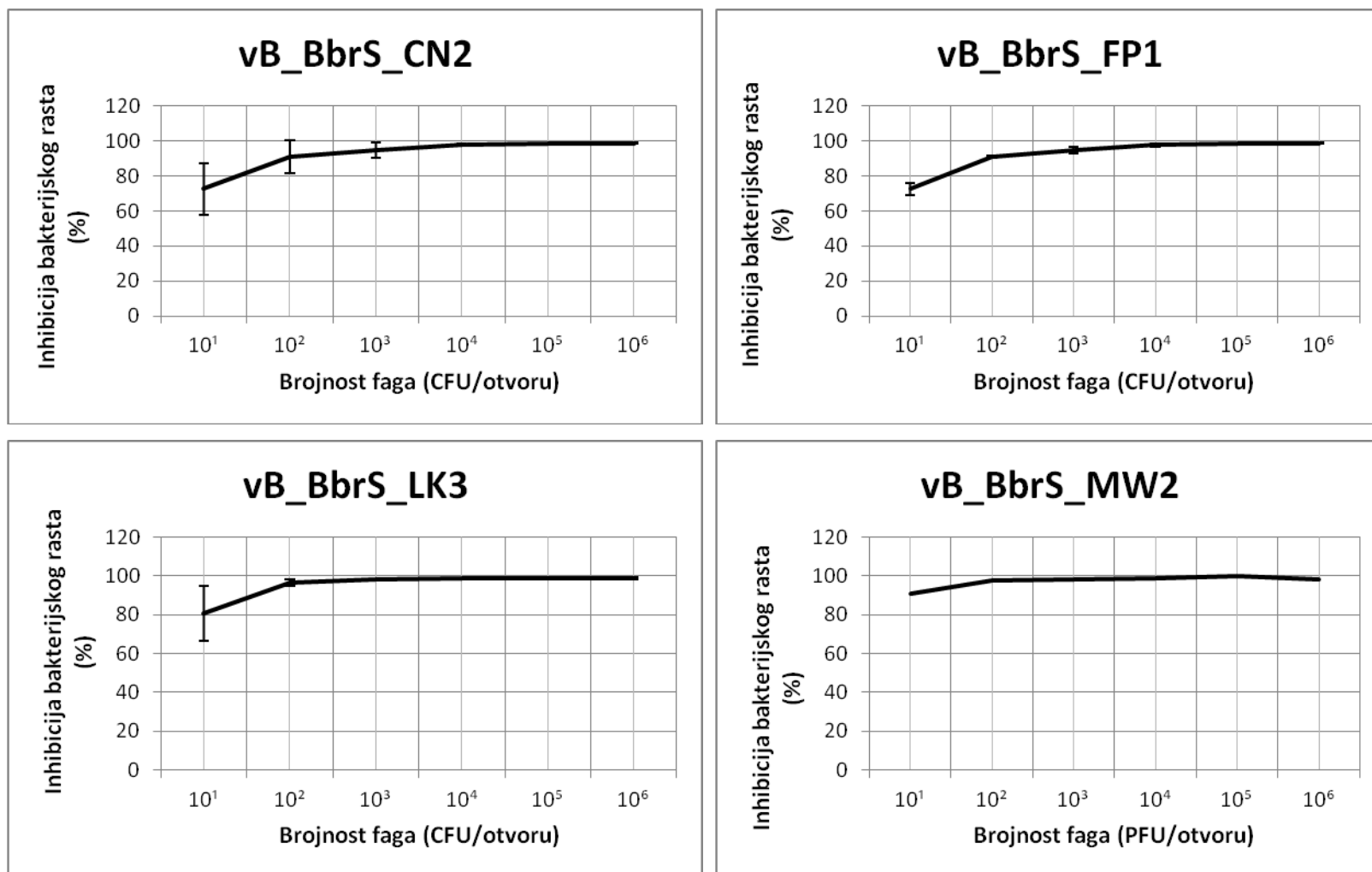
Rezultati hidrolize želatina nisu ukazali na postojanje razlika između inficiranih (ATCC 10580/LK3, ATCC 10580/CN2, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) i neinficiranih sojeva (ATCC 10580, Bbchiot i Bbr3416). Nijedan od sojeva nije vršio likvefakciju želatina (rezultati nisu prikazani).

5.9. Litička efikasnost odabranih bakteriofaga – inhibicija rasta bakterija i efekat na biofilm

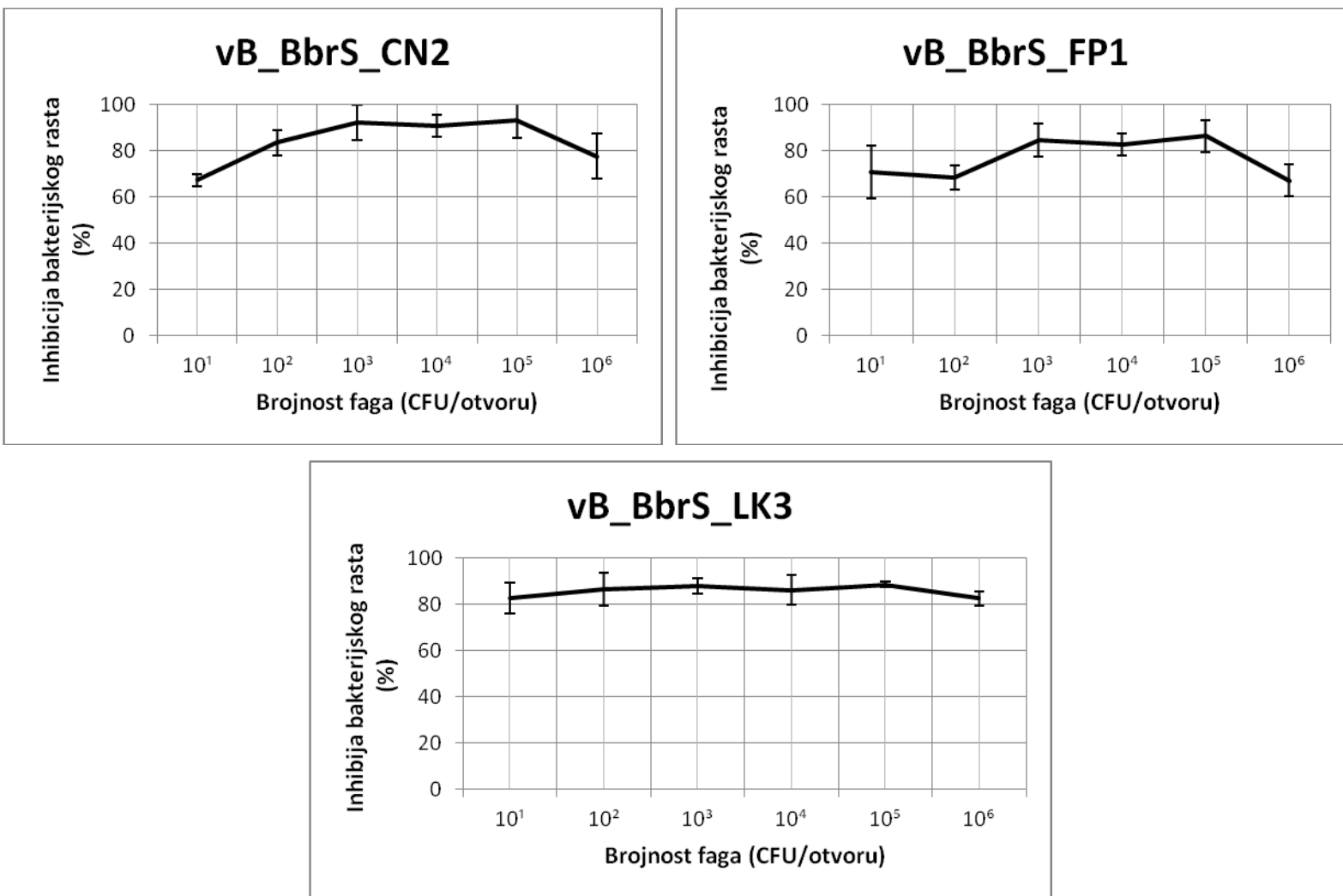
Rezultati litičke efikasnosti faga na referentnom *B. bronchiseptica* ATCC 10580 soju ukazuju na postojanje sličnog obrasca efikasnosti lize ispitivanih faga (Grafikon 8). Naime, svih pet bakteriofaga pokazalo je relativno visoku efikasnost lize referentnog soja. Pri najmanjoj brojnosti bakterije (1×10^1 CFU/otvoru), svi fagi uspešno su inhibirali bakterijski rast (~60 % i više). Inhibicija rasta prelazila je 90 % već pri brojnosti faga 10^2 (MOI 0,001), pri čemu je izuzetak bio FP1, koji je inhibirao rast bakterija do 91,9 % tek pri brojnosti faga 1×10^3 (MOI 0,01). Litička efikasnost *B. bronchiseptica* faga uglavnom je bila najveća pri multiplicitetu infekcije 1, pri čemu apsolutna inhibicija rasta nije postignuta ni pri jednom ispitivanom multiplicitetu infekcije. Fag koji je pokazao najveću litičku efikasnost bio je MW2: ovaj fag je inhibirao čak 99,7 % bakterija i to pri brojnosti od 1×10^5 (MOI 1).

Rezultati efekta faga na formiranje biofilma prikazani su na grafikonu 9. Rezultati inhibicije formiranja biofilma veoma su slični i pokazuju da *B. bronchiseptica* fagi inhibiraju formiranje biofilma u visokom procentu. U zavisnosti od multipliciteta infekcije, procenat inhibicije formiranja biofilma kretao se od 60 % do preko 90 %. Najmanju redukciju biofilma pokazao je bakteriofag FP1, koji nije prešao 90 % inhibicije ni pri najvećem multiplicitetu infekcije. Za razliku od njega, bakteriofag CN2 inhibirao je oko 92 % bakterijskog rasta u okviru biofilma. Kao i u slučaju litičke efikasnosti, najveća redukcija biofilma zabeležena je pri 1×10^5 faga (MOI 1), dok potpuna inhibicija formiranja biofilma nije postignuta.

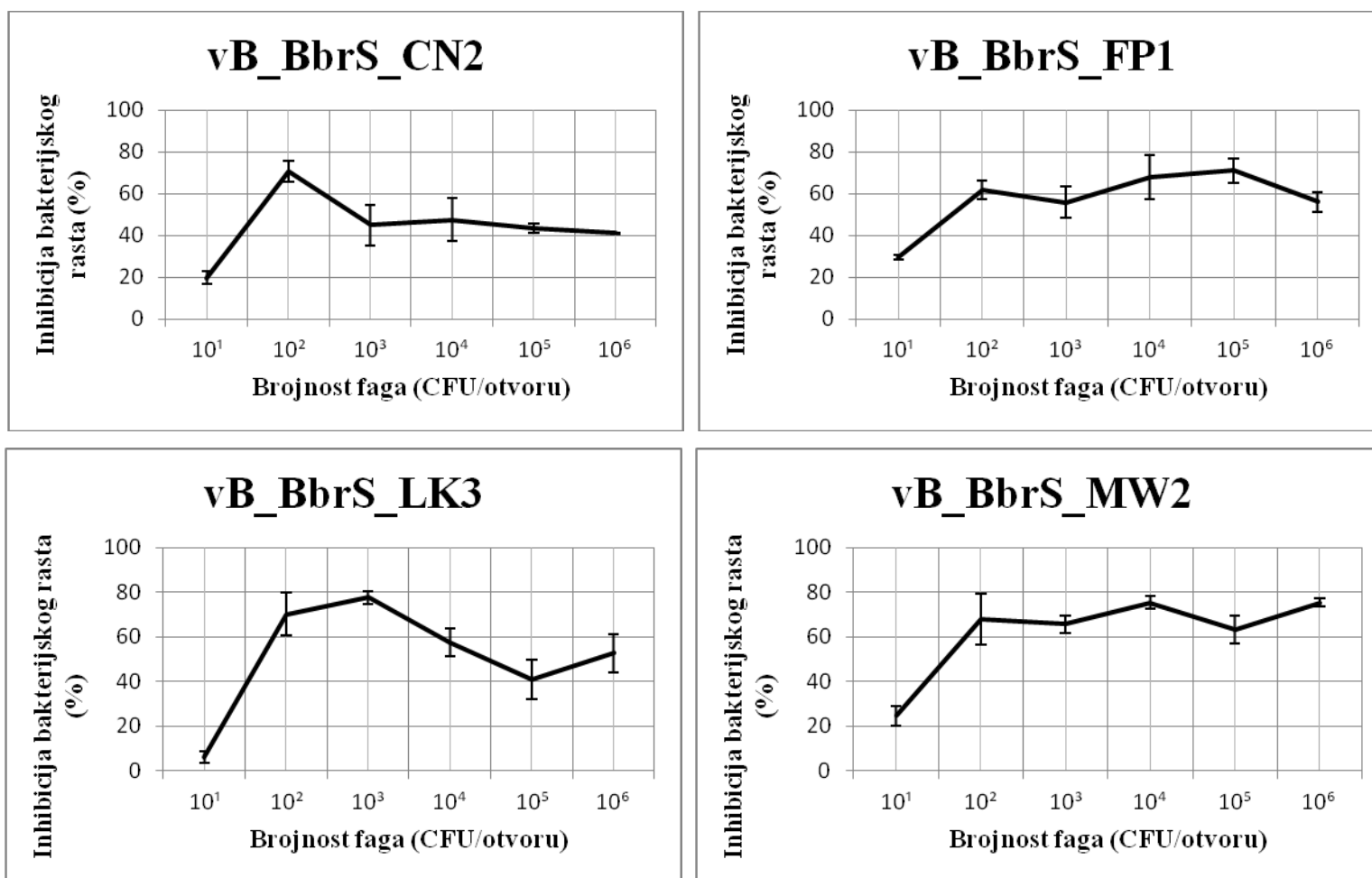
Rezultati efekta *B. bronchiseptica* bakteriofaga na već formirani biofilm predstavljeni su na grafikonu 10. Dobijeni rezultati ukazuju da fagi ispoljavaju slabiji efekat na već formirani biofilm u odnosu na biofilm koji je u procesu formiranja. Naime, najveću efikasnost u uklanjanju formiranog biofilma pokazao je fag LK3, koji je inhibirao nešto manje od 80 % prethodno formiranog biofilma i to pri MOI 0,01. Najmanju efikasnost u uklanjanju formiranog biofilma pokazali su fagi CN2 i FP1, čiji maksimum inhibicije biofilma nije prelazio 70 %. Interesantno je primetiti da većina faga pokazuje najveći efekat, tj. maksimalnu inhibiciju uklanjanja formiranog biofilma kada je brojnost faga, pa samim tim i MOI mali (0,0001, 0,001 i 0,1).



Grafikon 8. Litička efikasnost *B. bronchiseptica* bakteriofaga



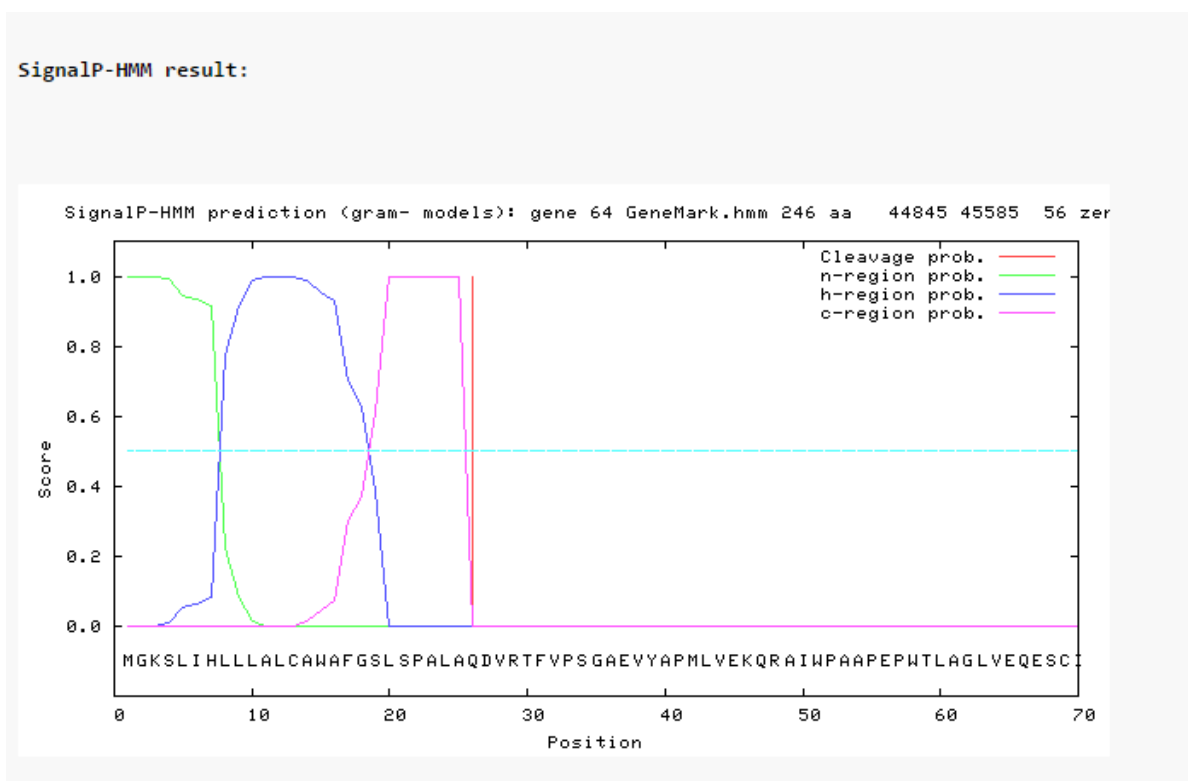
Grafikon 9. Efekat *B. bronchiseptica* bakteriofaga na formiranje biofilma

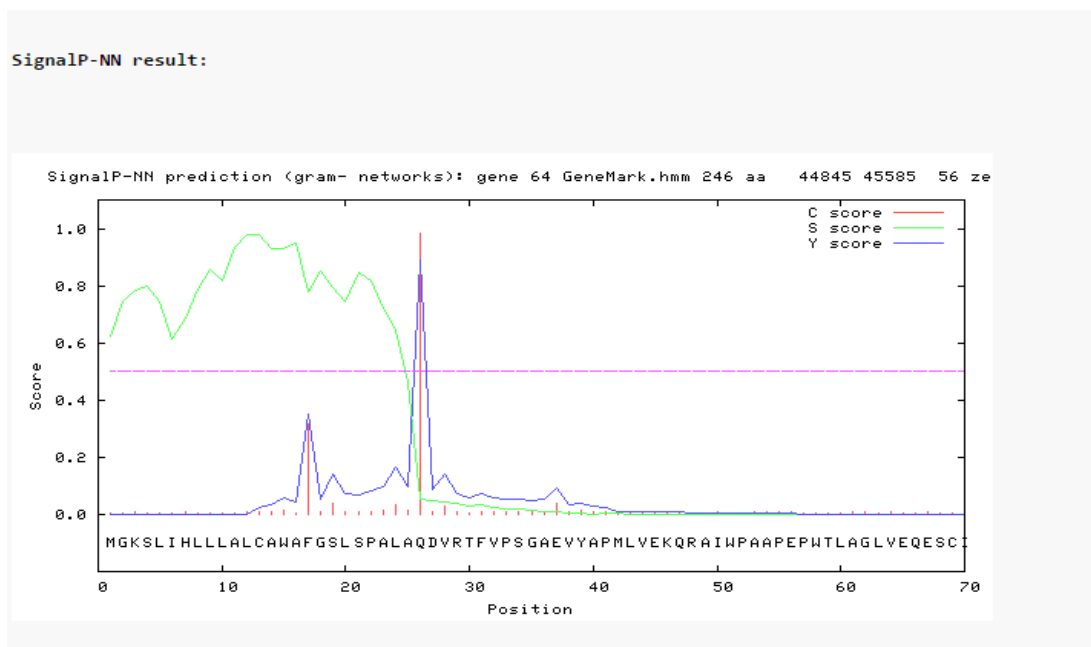


Grafikon 10. Efekat *B. bronchiseptica* bakteriofaga na formirani biofilm

5.10. REZULTATI KARAKTERIZACIJE ENDOLIZINA FAGA

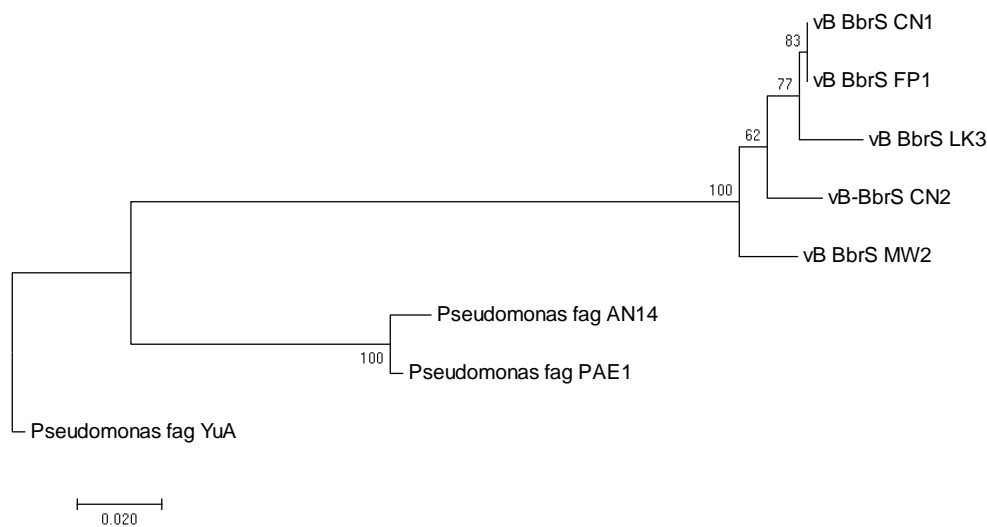
Rezultati parcijalne karakterizacije endolizina pet *B. bronchiseptica* faga (CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1) ukazuju da endolizini ovih faga najverovatnije poseduju signalnu, proteinsku sekvencu (Grafikon 11). Rezultati predikcije konzervisanog regiona ukazuju da ispitivani endolizini poseduju globularnu strukturu i da pripadaju grupi litičkih murein transglikozilaza.





Grafikon 11. SignalP-HMM i SignalP-NN predikcija signalne peptidne sekvence endolizina LK3 faga

Filogenetskim analizama, tj. konstrukcijom dendrograma pomoću Neighbour Joining testa, jasno se izdvajaju dva velika klastera; jedan sa endolizinima *B. bronchiseptica* faga i drugi sa lizinima *P. aeruginosa* faga iz GeneBank baze podataka koji su pokazali visoku sličnost sa endolizinima *B. bronchiseptica* faga (blastP) (Slika 42). Endolizin MW2 faga se najviše razlikuje od endolizina drugih *B. bronchiseptica* faga, dok su endolizini CN1 i FP1 veoma slični.



Slika 42. Dendrogram (Neighbour Joining) konstruisan na osnovu proteinske sekvence endolizina odabranih *B. bronchiseptica* i *Pseudomonas sp.* faga

6. DISKUSIJA

U predstojećim poglavljima biće dat pregled rezultata dobijenih u ovoj studiji, njihov značaj, kako sa aspekta uloge faga u lizogenoj konverziji bakterije, tako i sa aspekta moguće primene faga kao anti-*B. bronchiseptica* agenasa. Pored toga, biće dat i pregled rezultata drugih autora u vezi sa karakterizacijom faga, antimikrobnim potencijalom i ulogom faga u lizogenoj konverziji bakterija.

6.1. IZOLACIJA FAGA

Bakteriofagi su najrasprostranjeniji biološki entitet na planeti čija procenjena brojnost iznosi oko 10^{30} sa oko 10^8 vrsta (Bergh et al, 1989; Hendrix et al, 2002; Rohwer et al, 2003). Do danas je urađeno mnoštvo studija na temu izolacije i karakterizacije faga različitih vrsta bakterija. Savremena tehnologija i mogućnosti sekvencioniranja genoma, omogućili su bolje razumevanje biologije i taksonomije faga. O fagima vrste *B. bronchiseptica* postoji malo literaturnih podataka, koji se pre svega odnose na umerene fage dobijene indukcijom ili spontanom oslobađanjem faga iz bakterijske kulture. Do sada, bakteriofagi ove vrste nisu izolovani iz prirodnih sredina.

S obzirom da je svega nekoliko faga vrste *B. bronchiseptica* opisano do sada (Rauch i Piccket, 1961; Mabel et al, 1986) i da su rezultati detaljnije karakterizacije dostupni samo za tri veoma srodna umerena faga iz familije *Podoviridae* (Liu et al, 2002; Liu et al, 2004), rezultati ove studije predstavljaju prvu izolaciju i karakterizaciju *B. bronchiseptica* specifičnih bakteriofaga iz prirodne sredine, kao i prvu karakterizaciju faga ove bakterije koji pripadaju familiji *Siphoviridae*. Izolacija *B. bronchiseptica* faga iz površinskih voda bila je relativno uspešna s obzirom na to da je gotovo polovina uzoraka bila pozitivna na prisustvo faga (44,6 %). Uzimajući u obzir činjenicu da fagi generalno nastanjuju sredine u kojima se nalaze njihove bakterije domaćini (Mills et al, 2013), velika brojnost i široka rasprostranjenost *B. bronchiseptica* faga zabeležena u ovom radu, veoma je interesantna, s obzirom da voda nije prirodno stanište vrste *B. bronchiseptica*. Iako ne postoje dokazi izolacije *B. bronchiseptica* iz prirodne sredine, Porter i sar. (1991) su dokazali da *B. bronchiseptica* može da preživi nekoliko nedelja u sredini siromašnoj nutrijentima kao što je fosfatni pufer. Ovo ukazuje na moguće prisustvo bakterije u prirodnoj sredini, čime bi se delimično objasnila uspešna izolacija njenih faga iz takvih sredina.

Interesantno je spomenuti da, iako metoda obogaćenja nije korišćena, u nekim uzorcima je zabeležena visoka brojnost faga (preko 10 PFU ml^{-1}). S druge strane, iako je *B. bronchiseptica* patogen svinja, izolacija faga bila je bezuspešna iz uzorka poreklom od otpadnih voda svinjskih farmi. U vezi sa tim, mora se uzeti u obzir činjenica da su uzorci filtrirani kroz filter papir i da ovaj tretman može dovesti do gubitka velikog broja faga (Knežević et al, 2009). Takođe je moguće da su fagi odsustvovali u ovim uzorcima ili da je njihova brojnost bila veoma mala, tj. ispod granice detekcije.

Odsustvo faga u zagrejanom uzorku predstavlja jednu od potvrda da fagi vode poreklo iz prirodne sredine, tj. da nisu indukovani što potvrđuje veliku abudancu *B. bronchiseptica* faga u prirodnoj sredini.

6.2. LITIČKI SPEKTAR FAGA

Poznavanje litičkog spektra bakteriofaga izuzetno je važno, naročito u razmatranju njihove moguće primene kao antimikrobnih agenasa, ali i sa aspekta uloge faga u patogenosti bakterija. Pri tome je u prvom slučaju poželjno da fagi imaju širok litički spektar, a u drugom uzak, kako se patogenost ne bi širila na druge sojeve. Ispitivanja u ovoj studiji pokazala su da *B. bronchiseptica* fagi poseduju uzak i umeren litički spektar.

Prema rezultatima litičkog spektra na originalnom domaćinu, svi fagi su formirali prozirne plake dijametra 0,5-2 mm, dok su na alternativnim domaćinima zabeležene uglavnom zamućene ili plake sa halom. Na osnovu rezultata litičkog spektra na homolognim domaćinima na 37 °C, formirane su tri različite grupe, dok je ispitivanjem litičkog spektra faga na 25 °C izdvojeno čak šest različitih grupa, tj. 6 različitih litičkih profila. Značajne razlike u litičkom spektru faga na ispitivanim temperaturama nisu iznenađujuće, s obzirom na to da *B. bronchiseptica* poseduje BvgAS dvokomponentni transdukcioni sistem, koji reguliše ekspresiju gena odgovornih za virulenciju i pokretljivost. Naime, ukoliko se bakterija gaji u nutrijentima bogatom medijumu, na 37 °C, doćiće do indukcije Bvg+ faze za koju je karakteristična ekspresija gena za virulenciju, kao što su filamentozni hemaglutinin (FHA), fimbrije i bifunkcionalni adenilatciklaza/hemolizin. U suprotnom, ukoliko se bakterija gaji u prisustvu milimolarnih

koncentracija modulatora (MgSO₄ ili nikotinske kiseline) i na temperaturi ispod 30 °C, BvgAS je negativno regulisan (Bvg⁻ faza), što dovodi do smanjenja virulencije, koju prati povećanje ekspresije gena koji kodiraju flagele (Akerley et al, 1992; Irie et al, 2004). Pored ove dve faze, postoji i treća faza Bvgi, koja predstavlja međufazu u kojoj je zabeležena pojačana ekspresija filamentoznog hemaglutinina i fimbrija i smanjena ekspresija bifunkcionalne adenilatciklaze/hemolizina. Smatra se da u ovoj fazi dolazi do formiranja biofilma vrste *B. bronchiseptica* (Irie et al, 2004; Vergara-Irigaray, 2005). Fenotipske varijacije bakterije koje su izazvane temperaturnim promenama, pre svega u slučaju sojeva sa oznakom S2 i L:594, najverovatnije su imale uticaja na ekspresiju receptora faga, s obzirom da su ovi sojevi bili osetljivi na fage jedino na 25 °C. Takođe, bitno je istaći da su Bvgⁱ i Bvg⁻ faze temperaturno zavisne, zbog čega se pretpostavlja da su dominantne u uzorcima iz spoljašnje sredine, za razliku od kliničkih uzoraka kod kojih dominira Bvg⁺ faza. Uzimajući u obzir iznete činjenice, širi litički spektar bakteriofaga dobijen inkubacijom na 25 °C u skladu je sa poreklom samih faga. Ne treba zanemariti činjenicu da temperaturne razlike detektovane u litičkom spektru na 25 °C i 37 °C mogu biti posledica i osetljivosti proteina faga na temperaturne promene, kao što su represor, ligand ili neki drugi proteini.

S obzirom na veliku rasprostranjenost faga u uzorcima iz prirodne sredine, pretpostavka je bila da fagi nisu specifični za vrstu *B. bronchiseptica*. Međutim, interesantno je da fagi nisu imali sposobnost da liziraju testirane sojeve iz klase Gammaproteobacteria (familija *Moraxelaceae* i *Enterobacteriaceae*) i Betaproteobacteria (familija *Alcaligenaceae*), kao ni Gram pozitivne predstavnike. Činjenica da fagi ne mogu da liziraju druge vrste bakterija jasno ukazuju na specifičnost faga, najmanje za rod *Bordetella*, iako ni mogućnost da liziraju druge vrste bakterija koje nisu uključene u litički spektar, ne treba zanemariti.

6.3. EFIKASNOST LIZE BAKTERIOFAGA NA HOMOLOGNIM ALTERNATIVNIM DOMAĆINIMA

Efikasnost formiranja plaka (eng. *efficiency of plating*, skraćeno EOP) *B. bronchiseptica* bakteriofaga ispitivana je kako bi se odredilo koji su fagi najefektniji u liziranju ove bakterije. U

idealnim uslovima, svaki virion koji adherira za ćeliju domaćina može izvršiti infekciju i multiplicirati se u ćeliji, što rezultira pojavom plaka na odgovarajućem bakterijskom soju. Međutim, veliki broj faktora može da utiče na efikasnost lize, kao što su specifičan soj bakterije domaćina, zbog čega je važno utvrditi EOP na različitim domaćinima koji su osetljivi na fage (Kutter et al, 2009; Viazis et al, 2011). Određivanje EOP-a je posebno važno kada se razmatra primena faga u antimikrobnoj terapiji (Viscardi et al, 2008).

Kao što je i očekivano, većina faga je pokazala jednak ili niži EOP na alternativnim domaćinima (Bbchiot i Bbr3416) u odnosu na originalnog (ATCC 10580). S druge strane, čak šest faga je pokazalo veću litičku efikasnost na alternativnim, u odnosu na originlanog domaćina. Posebno je interesantno što jedan od njih, bakteriofag LK5 pokazuje bolju litičku efikasnost na oba alternativna domaćina (EOP 10) što može eventualno ukazati da soj *B. bronchiseptica* ATCC 10580 nije najpogodniji domaćin navedenog faga. Ovakav fenomen može se objasniti prisustvom većeg broja receptora za fage na ćelijama, koji povećavaju adsorpciju faga za bakteriju. Pored toga, ne treba zanemariti da je u prečišćenom lizatu moguće prisustvo spontano indukovanih faga iz soja na kom je vršena propagacija faga.

S obzirom da oko 45 % faga pokazuje jednak ili veći EOP na alternativnim domaćinima, jasno je da *B. bronchiseptica* bakteriofagi poseduju relativno dobru efikasnost lize na alternativnim *B. bronchiseptica* sojevima.

6.4. KRIVA MULTIPLIKACIJE FAGA

Određivanje parametara multiplikacije faga veoma je važno, naročito s aspekta njihove primene kao antimikrobnih agenasa. Dužina latentnog perioda, eklipse i broj viriona koji se oslobodi iz jedne inficirane ćelije po ciklusu ukazuje na litički potencijal jednog faga. Broj viriona oslobođenih u jednom ciklusu karakterističan je za svaki fag, a zavisi od nutritivnog statusa bakterije, s obzirom da fagi koriste bakterijske enzime i gradivne komponente za umnožavanje, ali i od aktivnosti regulatornih proteina samih faga, kao što su polimeraza i drugi esencijalni enzimi neophodni u multiplikaciji i maturaciji faga. Smanjena aktivnost enzima može limitirati

fage da maksimalno iskoriste bakterijske resurse, a kao posledica javlja se smanjen broj novosintetisanih faga po ciklusu (Fowler i Cohen, 1948; Nguyen i Kang, 2014).

Ispitivanjem parametara krive rasta *B. bronchiseptica* bakteriofaga CN1 na 26°C i 37°C utvrđeno je da je latentni period veoma dug (110 i 90 minuta), a da je broj oslobođenih faga na kraju jednog ciklusa jako mali (6 i 13). Duplo manje faga oslobođenih na 26°C u odnosu na 37°C može se objasniti činjenicom da uslovi za rast domaćina nisu bili idealni. *B. bronchiseptica* najbolje raste na 37°C, zbog čega je i logično što se veći broj faga formirao na ovoj temperaturi, nego na 26°C. Ne treba izgubiti iz vida činjenicu da ovakvi rezultati ukazuju na umerenu prirodu faga i da je mali broj oslobođenih viriona verovatno rezultat integracije faga u bakterijski genom, pre nego lize ćelije od strane faga. Slične rezultate dobili su Goh i sar. (2005), koji su utvrdili da dužina latentnog perioda kod umerenih bakteriofaga vrste *Clostridium difficile* (ϕ C2, ϕ C5, ϕ C6 i ϕ C8) varira u zavisnosti od faga i kreće se od 32 do 118 minuta, dok je broj viriona koji se oslobodi iz ćelije veoma mali i kreće se između 5 do 33. Kod drugih umerenih faga, kao što su ϕ CP6 fagi vrste *Serratia liquefaciens* broj oslobođenih viriona na kraju ciklusa je mnogo veći i kreće se između 41 i 224, dok je dužina latentnog perioda između 35 i 108 minuta (Ashelford et al, 1999). Za razliku od navedenih faga, *Bacillus megaterium* sifofag ϕ BM ima latentni period koji traje oko 40 minuta, dok broj oslobođenih faga na kraju ciklusa iznosi oko 65.

Bitno je naglasiti da je jedan od faktora koji utiču na parametre krive multiplikacije faga svakako multiplicitet infekcije (Gadagkar i Gopinathan, 1980). Pozitivna korelacija između multipliciteta infekcije i broja oslobođenih faga na kraju ciklusa je potvrđena u slučaju bakteriofaga 13 vrsta *Mycobacterium smegmatis* (Gadagkar i Gopinathan, 1980). Ovaj fag oslobodi 50 novih viriona po jednoj inficiranoj ćeliji kada je multiplicitet infekcije 1, a duplo više, odnosno 100 faga pri multiplicitetu infekcije 5. Međutim, druga dva naučnika, Delbruck i Luria (1942) koji su radili na α i β fagima koji inficiraju *E. coli*, nisu utvrdili pozitivnu korelaciju između multipliciteta infekcije i broja oslobođenih viriona po jednom ciklusu. S obzirom da je u ovom radu korišćen MOI 10 i uzimajući u obzir činjenicu da su fagi pokazali manju litičku efikasnost i efekat na biofilm pri većim vrednostima MOI, kao i činjenicu da većina umerenih faga ulazi u lizogeni ciklus pri većim vrednostima MOI i nepovoljnijim uslovima sredine (Bourret i Fox, 1988;

Riipinen et al, 2007), mali broj faga zabeležen u ovom radu može se objasniti integracijom faga u bakterijski genom. Posmatrano sa aspekta primene faga u antimikrobnoj terapiji, rezultati određivanja parametara multiplikacije faga nisu zadovoljavajući, s obzirom da se veoma mali broj viriona oslobodi po jednom ciklusu. Uzimajući u obzir činjenicu da parametri multiplikacije nisu jedini koji utiču na litičku efikasnost faga, potrebno je ispitati i druge karakteristike faga, kao što su sposobnost inhibicije rasta bakterije, efekat faga na biofilm i endolizine faga u cilju boljeg sagledavanja njihovog antimikrobnog potencijala. Posmatrano sa aspekta lizogene konverzije fagom, rezultati ukazuju na integraciju faga u bakterijski genom i njihovu moguću umešanost u lizogenu konverziju bakterije.

6.5. MORFOLOGIJA BAKTERIOFAGA

Kao što je već rečeno, o *B. bronchiseptica* bakteriofagima izolovanim i okarakterisanim od strane drugih autora postoji malo podataka, koji se pre svega odnose na njihov litički spektar i rezultate morfološke karakterizacije faga. Prema rezultatima koji su dobili Mebel i sar. (1985), *B. bronchiseptica* fagi detektovani u sojevima za proizvodnju vakcina, pripadaju porodici *Siphoviridae* i prema Bradley-u morfotipu B1. Druga grupa naučnika, Liu i sar. (2002) izolovali su i okarakterisali tri faga koji pripadaju drugoj najbrojnijoj porodici *Podoviridae* (morfotip C1).

Rezultati elektronske mikroskopije dobijeni u ovom radu jasno ukazuju da *B. bronchiseptica* fagi poseduju relativno uniformne morfološke karakteristike – svi pripadaju porodici *Siphoviridae*, a prema Bradley-u B2 morfotipu. S obzirom da većina svih do sada opisanih faga (preko 96%) pripada redu *Caudovirales*, od kojih preko 60% pripada porodici *Siphoviridae*, nije iznenađujuće što fagi izolovani u ovom radu pripadaju baš toj porodici (Adriaenssens et al, 2015; Velesler i Cambillau, 2011). S druge strane, interesantna je činjenica da *B. bronchiseptica* fagi pripadaju B2 morfotipu koji nije toliko čest među fagima reda *Caudovirales*, odnosno znatno je ređi u odnosu na B1 morfotip. Naime, fagi sa morfotipom B2 karakteriše izdužena glava i postojanje dodatnih slojeva subjedinica kapsida u ekvatorijalnom nivou glave, a sreće se kod nekih faga čiji su domaćini bakterije iz roda *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Clostridium* i dr. (Miklic i Rogelj, 2003; Kwan et al, 2005; Ackermann i Eisenstark,

1974). S obzirom da je u ovom radu utvrđena velika sličnost u DNK sekvenci između *B. bronchiseptica* faga i okarakterisanog *P. aeruginosa* Yua faga, nije iznenađujuće ni što ovi fagi imaju i isti morfotip. Važno je naglasiti da su *P. aeruginosa* jedni od najbolje okarakterisanih faga sa velikim brojem opisanih vrsta, pa je utvrđena sličnost verovatno posledica toga što su podaci o fagima drugih vrsta nedostupni.

6.6. UTICAJ TEMPERATURE NA INFektivNOST FAGA

Temperatura je jedan od osnovnih faktora koji utiče na biologiju i stabilnost bakteriofaga (Olson et al, 2004; Yates et al, 1985). Ovaj faktor ima ključnu ulogu u adsorpciji, penetraciji, multiplikaciji i dužini latentnog perioda (Jonczyk et al, 2011). Kada je temperatura niža od optimalne, svega nekoliko faga penetrira u bakterijsku ćeliju, pa se samim tim manji broj faga multiplicira. S druge strane i visoke temperature mogu da prolongiraju latentni period (Tey et al, 2009).

Poznavanje uticaja različitih temperatura na infektivnost faga je od izuzetnog značaja, naročito kada je u pitanju njihova primena kao antimikrobnih agenasa, ali i u slučaju potrebe za kontrolom faga u određenim sredinama, za umerene fage koji vrše transfer determinanti patogenosti. Bakteriofagi su različito osetljivi na visoke temperature, što je prvenstveno u skladu sa optimumom rasta domaćina. Rezultati ove disertacije ukazuju da *B. bronchiseptica* fagi pokazuju relativno dobru stabilnost pri širokom temperaturnom rasponu. S obzirom da je *B. bronchiseptica* mezofilna bakterija, interesantno je primetiti da se bakteriofagi specifični za ovu vrstu pokazali visoku toleranciju na povišene temperature u toku 30 min. Fagi koji se posebno ističu u tom smislu su, LK3, CN1 i CN2, koji zadržavaju infektivnost čak i pri uslovima pasterizacije. Ovakva otpornost na visoke temperature zabeležena je u slučaju *Campylobacter* faga iz familije *Siphoviridae*, koji su pokazali dobru stabilnost na 50 °C, 60 °C i 70 °C tokom 30 min. Slične rezultate su dobili Yang i sar. (2010) koji su utvrdili da čak 73,2% AB1 *Acinetobacter baumannii* faga iz familije *Siphoviridae* zadržava stabilnost nakon inkubacije na 50 °C tokom 60 min. *Pseudomonas* fagi σ -1, J-1 I 001A iz familije *Siphoviridae* najoptimalnije se adsorbuju u temperaturnom opsegu od 7 do 45 °C (Knezevic et al, 2011). Prema Breitbart i sar. (2004),

bakteriofagi izolovani iz termalnih izvora zadržavaju infektivnost pri širokom rasponu temperatura; čak 75 % faga ostaje intaktno kad se inkubira na temperaturi leda (0 °C), dok isti fagi pokazuju veću osetljivost pri izlaganju temperaturi ključanja (105 °C), s obzirom da 18-30% faga zadržava infektivnost u toku 20 h. Iako je dobro poznato da su bakterije roda *Lactococcus* uglavnom mezofilne bakterije, visoka termalna rezistencija zabeležena je u slučaju nekoliko *Lactococcus* faga iz familije *Siphoviridae* (Luiz et al, 2016; Meslier et al, 2012). Tako npr. čak 50% *Lactococcus* spp. bakteriofaga se inaktivira pri temperaturi od 90 °C (5 min) (Buzrul et al, 2007), dok su Atamer i sar. (2008) pokazali da oko 40% *Lactococcus lactis* faga u mleku preživljava zagrevanje do 80 °C (5 min). Pored toga, većina faga je pokazalo osetljivost pri višim temperaturama (95 °C, tokom 5 min), pri čemu dolazi do inaktivacije faga. Dakle, dobijeni rezultati za *B. bronchiseptica* fage nisu iznenađujući, s obzirom da i drugi virusi familije *Siphoviridae* pokazuju visoku toleranciju na povišene temperature.

Dobro je poznato da pripadnici familije *Siphoviridae* poseduju najstabilnije virione. Takođe poznato je da je rezistencija faga na visoke temperature karakteristična za viruse koji poseduju lipidni omotač (Beer et al, 2003) koji štiti proteine viriona od denaturacije. S obzirom da fagi iz familije *Siphoviridae* ne poseduju spoljašnji lipidni omotač, tolerancija na visoke temperature je najverovatnije posledica otpornosti proteina na denaturaciju. Detektovana otpornost na visoke temperature je poželjna u slučaju da se fagi upotrebljavaju kao antimikrobni agensi, a nepoželjna u slučaju kada su fagi umereni. S obzirom da značajno preživljavaju temperaturu pasterizacije, jasno je da temperaturni tretman namirnica poreklom od životinja ne inaktivira ove fage u potpunosti i da pasterizacija ne predstavlja barijeru u njihovoj transmisiji, što omogućava širenje virulencije i lizogenu konverziju novih domaćina u slučaju kada su fagi umereni.

6.7. UTICAJ pH NA INFEKTIVNOST FAGA

Još jedan od značajnih faktora koji utiču na stabilnost i infektivnost bakteriofaga je pH sredine. Posebno je važno poznavanje optimalnih pH vrednosti za preživljavanje i stabilnost

faga u slučaju njihove primene kao antimikrobnih agenasa, ali i kontrole umerenih faga koji mogu da utiču na patogenost bakterije. Bakteriofagi su različito osetljivi na promenu pH, što je prvenstveno u skladu sa optimumom rasta domaćina.

S obzirom da su Schneider i sar. (2000) dokazali da *Bordetella bronchiseptica* može da perzistira u ekstremno kiselim sredinama, kao što je unutrašnjost fagocita, rezultati ispitivanja stabilnosti njenih faga pri širokom opsegu pH nisu iznenađujući. Naime, *B. bronchiseptica* fagi pokazuju relativno dobru stabilnost na svim ispitivanim pH vrednostima (3, 5, 7, 9 i 11), sa izuzetkom pH 1.5, na kojoj nijedan vijabilan fag nije detektovan nakon 30 min. Interesantno je istaći da svih pet ispitivanih faga pokazuju gotovo jednaku stabilnost u alkalnim (pH 9 i 11) i kiselim sredinama (pH 3 i 5). S obzirom da nijedan fag nije zadržao vijabilnost na pH 1,5 pretpostavlja se da pri ovako niskim pH vrednostima dolazi do denaturacije proteina faga, zbog čega fagi gube infektivnost. Drugačije rezultate su dobili Whitman i Marshall (1971) koji su ispitivali stabilnost *Pseudomonas* bakteriofaga *ps1* i *wy* iz familije *Siphoviridae*. Ovi fagi pokazali su osetljivost na kisele sredine: čak 99% faga je izgubilo infektivnost usled izlaganja niskim pH vrednostima sredine kao što su pH 3 i 4 tokom 60 min. Slično tome, Knezevic i sar. (2011) su utvrdili da se brojnost *P. aeruginosa* faga iz familije *Siphoviridae* redukuje na polovinu nakon 30 min, na pH 5 za fage J-1 i 001A, odnosno na pH 3 za fag σ -1. Yang i sar. (2010) su utvrdili da *Acinetobacter baumannii* AB1 fag takođe iz familije *Siphoviridae* gubi više od 50% infektivnosti na pH 5 tokom 30 minuta. Dobru stabilnost bakteriofaga pri različitim pH vrednostima utvrdili su i Othman i sar. (2015) za *Bacillus megaterium* fag iz familije *Siphoviridae*. Autori ove studije su dokazali da *B. megaterium* fagi zadržavaju infektivnost u pH opsegu između 4 i 9 tokom 16 h. Druga grupa naučnika, Jamal i sar. (2015) utvrdili su da *Klebsiella pneumoniae* Z fag iz iste familije zadržava stabilnost tokom 1 h u pH opsegu 5-11, dok na pH 1 i 3 nije detektovan nijedan vijabilan fag. Sharp i sar. (1946) proučavali su stabilnost T2 faga u opsegu pH od 2-11. Rezultati eksperimenata su pokazali da je fag stabilan u relativno širokom pH opsegu (5-9), pri čemu je optimum bio pH 5.5. Na pH višim od 4 zabeležene su promene koje su bile reverzibilne, dok je na pH 7 zabeležen veoma mali gubitak infektivnosti faga. Jepson i March (2004) su ispitivali aktivnost λ faga u rasponu pH od 2 do 14. Nakon 24 h inkubacije na sobnoj temperaturi, fagi su pokazali dobru stabilnost u širokom pH opsegu, a autori nisu zabeležili

značajan pad brojnosti faga na pH 3-11. Na pH 2 i 11 nije detektovan nijedan vijabilan fag. Uzimajući u obzir gore navedene činjenice, rezultati stabilnosti *B. bronchiseptica* faga u širokom pH opsegu (3-11) nisu iznenađujući i u skladu su rezultatima drugih autora.

Detektovana otpornost *B. bronchiseptica* faga na širok opseg pH poželjna je u slučaju primene faga u terapijske svrhe, zbog variranja kiselosti različitih telesnih tečnosti, a nepoželjna je u slučaju kada su fagi umereni. Iako se pokazalo da *B. bronchiseptica* fagi ne preživljavaju pH 1,5 koji je karakterističan za sredinu želuca, paralelna primena antacida koji regulišu pH i oralna aplikacija faga može predstavljati terapijsku opciju u kontroli *B. bronchiseptica* bakterije. S obzirom da u značajnom procentu prezivljavaju u uslovima sredine sa ekstremnim pH, jasno je da dezinfekcija kiselinama i bazama u postrojenjima sa namirnicama poreklom od životinja ne inaktivira ove fage u potpunosti, što omogućava širenje virulencije i lizogenu konverziju novih domaćina, kada su fagi umereni.

6.8. UTICAJ NATRIJUM-HLORIDA I UREE NA INFEKTIVNOST FAGA

Dobro je poznato da osmotski šok dovodi do inaktivacije bakteriofaga (Jonczyk et al, 2011). Međutim, za uspešnu infekciju i multiplikaciju, bakteriofagima je neophodna mala koncentracija dvovalentnih metala, kao što su kalcijum i magnezijum (Baross et al, 1978). U niskim koncentracijama, joni natrijum-hlorida interaguju sa proteinima i dovode do stabilizacije proteinske strukture i smanjenja proteinske naelektrisanosti. Međutim, visoke koncentracije soli dovode do denaturacije proteina, što se negativno odražava i na strukturnu stabilnost nukleinske kiseline faga (Fennema, 1996). Bakteriofagi pokazuju različitu osetljivost na koncentracije natrijum-hlorida, što je uglavnom u skladu sa optimumom rasta domaćina.

S obzirom da su Porter i sar. (1991) ukazali da vrsta *B. bronchiseptica* zadržava infektivnost u morskoj sredini i do 3 nedelje, rezultati preživljavanja faga u različitim koncentracijama natrijum-hlorida nisu iznenađujući. Naime, u radu je utvrđena relativno visoka rezistencija faga na natrijum-hlorid. U zavisnosti od vrste faga, od 40% do preko 90% viriona *B. bronchiseptica* faga je pokazalo stabilnost pri najvišim testiranim koncentracijama natrijum-hlorida (10%). S obzirom da su Leibo i sar. (1979) utvrdili da je rezistencija T7 faga na osmotski

šok posledica postojanja proteina koji se nalazi u kapsidu viriona, pretpostavlja se da *B. bronchiseptica* fagi poseduju sličan mehanizam rezistencije na povišene koncentracije soli.

U literaturi postoji veoma malo podataka vezanih za osetljivost faga na različite koncentracije soli, naročito onih iz familije *Siphoviridae*, kojima pripadaju *B. bronchiseptica* fagi. Rezultati stabilnosti *B. bronchiseptica* faga delimično su u saglasnosti sa rezultatima koje su zabeležili drugi autori. Naime, Seaman i Day (2007) su uspešno izolovali bakteriofage iz uzoraka slatina u Severnoj Americi gde je salinitet zemljišta bio između 0,3 % i 27 % (Wilson et al, 2004). Jedan od izolovanih faga bio je iz familije *Myoviridae* koji poseduje neobično velik genom (oko 340 Kb). Autori ovog rada su objasnili da je mogući razlog postojanja tako velikog genoma postojanje dodatnih proteina koji su važni u adaptaciji na ekstremne uslove sredine. Whitman i Marshall (1971) su utvrdili da koncentrovani rastvori natrijum-hlorida i saharoze dovode do značajne redukcije u brojnosti *Pseudomonas ps1* i *wy* faga. Naime, čak 99% *ps1* faga je pokazalo gubitak vijabilnosti u 4 mol/L NaCl-a, dok su fagi označeni sa *wy* izgubili 26% vijabilnosti. S druge strane, 2 mol/L rastvor saharoze je doveo do gubitka infektivnosti 50% *ps1* faga i 48% *wy* fag. Isti autori su pokazali da 0.1% citrat, koji se nalazi u polutečnom medijumu, dovodi do gubitka infektivnosti 30% faga. Drugačije rezultate zabeležili su Leibo i Mazur (1969) koji su ispitivali stabilnost T4B sifovirusa. Naime, T4B bakteriofag je inaktiviran u slučaju naglog prenošenja faga iz koncentrovanog u manje koncentrovani rastvor. Nagla promena osmotskog pritiska može da uzrokuje oslobađanje nukleinske kiseline iz faga. Iste promene na fagima, usled prelaska faga iz koncentrovanijeg u manje koncentrovani rastvor, zabeležili su i drugi autori (Lark i Adams, 1953; Yamamoto et al, 1968). U slučaju eksperimenata sa *B. bronchiseptica* fagima, fagi su iz SM pufera preneti u rastvore različitih koncentracija NaCl i rezultati ukazuju da osmotski šok kod ovih faga ne utiče značajno na gubitak infektivnosti. Testiranje stabilnosti T5 bakteriofaga inkubiranjem na 37 °C u rastvorima soli različite koncentracije utvrđeno je da su fagi stabilni u rastvoru sa kalcijumovim jonima, dok je gubitak aktivnosti zabeležen u fosfatnom puferu, a nagla inaktivacija je zabeležena u citratnom rastvoru (Adams, 1949). Nijedan T5 fag nije ostao vijabilan nakon 2 h inkubacije u 10 mmol/l fosfatnom puferu i 2 mmol/L citratnom rastvoru (pH 7). Adams je takođe dokazao da dvovalenti metali u milimolarnim koncentracijama mogu sprečiti inaktivaciju faga. Njegovo objašnjenje bilo je da je povećana stabilnost T5 faga u prisustvu

različitih anjonskih rastvora posledica stvaranja kompleksa između faga i jona. U eksperimentima sa *B. bronchiseptica* fagom nisu dodavani joni dvovalentnih metala, što ukazuje na veoma dobru stabilnost viriona i u odsustvu ovih jona.

Visoke koncentracije uree (> 6 M) najčešće uzrokuju inaktivaciju viriona, koja nastaje usled denaturacije proteina faga (Tabor et al, 1983; Buzel et al, 1962; Roberts i Lloyd, 2007). U ovom radu utvrđeno je da *B. bronchiseptica* fagi pokazuju dobru stabilnost pri gotovo svim testiranim rastvorima uree (0,5-10 M urea). U tom smislu, najviše se ističu LK3 i CN1 fagi koji su pokazali rezistenciju pri visokim koncentracijama uree: više od 50% viriona sačuvalo je infektivnost pri koncentraciji 7,5 M uree. Za razliku od njih, bakteriofagi MW2 i FP1 pokazali su nešto veću osetljivost na ureu: manje od 50% faga je zadržalo infektivnost na 5 M i 7,5 M rastvoru uree u toku 30 min. Veoma mali broj podataka vezanih za osetljivost faga na ureu je dostupan u literaturi i oni se uglavnom odnose na fage iz porodice *Podoviridae*. Naime, Gupt i Yin (1995) su pokazali da čak 50% T7 bakteriofaga iz porodice *Podoviridae* izgubi aktivnost tokom 30 s izlaganja 6 mol/L rastvoru uree. Ovi naučnici su takođe utvrdili da dvovalentni joni (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) dovode do stabilizacije faga u prisustvu uree, dok trovalentni joni (Al^{3+} i Au^{3+}) dodatno destabilišu fage. Cooper (1962) je utvrdio da 7,2 M rastvor uree dovodi do promena na površini kapsida polio virusa, koja je praćena pucanjem virusne partikule, a zatim i gubitkom infektivnosti i oslobađanjem RNK iz viriona. S obzirom da je dobro poznato da visoke koncentracije uree dovode do denaturacije proteina virusa, tj. proteina faga, visoka rezistencija *B. bronchiseptica* faga koja je zabeležena u ovom radu ukazuje da oni poseduju proteine koji pokazuju visok stepen rezistencije na ureu i koji ne podležu ireverzibilnim strukturnim promenama zabeleženim kod drugih virusa (Lang et al, 1963; Fujioka et al, 1969).

Bakteriofagi pokazuju bolje preživljavanje u širokom opsegu vrednosti različitih faktora kao što su temperatura i inaktivirajući agensi (npr. amonijak), u odnosu na animalne i humane viruse (Bertrand et al., 2012; Kim et al., 2012; Emmoth et al, 2011). Ovo ih čini pouzdanim model virusima, zbog čega mogu da se koriste u monitoringu preživljavanja i stabilnosti humanih i animalnih virusa u prirodnim sredinama (Decrey et al., 2011; Emmoth et al, 2011). Rezultati stabilnosti *B. bronchiseptica* faga u različitim koncentracijama NaCl-a i uree su pokazali visok stepen stabilnosti u širokom opsegu koncentracija NaCl-a i uree, odnosno fagi zadržavaju

infektivnost (više od 50%) u sredinama sa visokim koncentracijama soli NaCl-a (7,5 i 10%) i uree (7,5 M) u toku 30 min. Na osnovu dobijenih rezultata i prethodnih razmatranja ispitivani bakteriofagi mogu poslužiti kao indikatori preživljavanja i stabilnosti animalnih i humanih virusa u takvim sredinama.

6.9. STRUKTURNI PROTEINI FAGA

Fagi čiji su proteinski profili analizirani SDS-PAGE (CN1, CN2, LK3 i MW) pokazuju veoma sličan proteinski profil sa najmanje 8 karakterističnih traka i glavnim proteinom kapsida veličine oko 33 kDa. Poređenjem molekulske mase strukturnih proteina dobijenih SDS-PAGE elektroforezom i molekulske mase pretpostavljenih strukturnih proteina na osnovu sekvence genoma (blastP), utvrđeno je postojanje razlika kod pojedinih proteina. Naime, veličine glavnog proteina kapsida *in silico* (ORF59) su u skladu sa onima dobijenim SDS-PAGE elektroforezom. Strukturni proteini ORF58 i ORF66 u genomu faga takođe odgovaraju dvema trakama sa tim veličinama dobijenim elektroforezom proteina. Molekulska masa ostalih proteina dobijenih elektroforezom nije u saglasnosti sa rezultatima anotacije genoma. Takođe, anotacijom genoma detektovan je strukturni protein veličine 44,7 kDa koji nije detektovan na gelu. Razlog neusaglašenim rezultatima je verovatno mala koncentracija pojedinih strukturnih proteina, zbog čega se oni ne detektuju na gelu. S druge strane neki strukturni proteini su verovatno podložni posttranslacionoj obradi, što takođe objašnjava postojanje razlika u molekulskim masama detektovanim na gelu i *in silico*. Uzimajući u obzir da su proteinski profili faga međusobno slični, može se zaključiti da su u pitanju fagi koji su veoma srodni. Rezultati su takođe u skladu sa rezultatima proteinskog profila *Pseudomonas* Yua faga kojeg su okarakterisali Ceysens i sar. (2007), a sa kojima *B. bronchiseptica* fagi pokazuju visoku sličnost u DNK sekvenci. Naime, ovi autori su identifikovali 16 proteina koje poseduje Yua fag, od kojih su izdvojili ORF56 (32,2 kDa) i ORF66 (54 kDa) proteine sa najverovatnijom funkcijom proteina glavnog kapsida i proteina repa. S obzirom da je proteinskom analizom *B. bronchiseptica* faga utvrđeno postojanje proteina veličine 53,3 kDa, pretpostavlja se da je u pitanju protein repa sličan proteinu repa Yua virusa.

6.10. KARAKTERISTIKE GENOMA *B. bronchiseptica* FAGA

Usled velikih morfoloških sličnosti, taksonomija bakteriofaga sve više se oslanja na analizu genoma bakteriofaga. Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (eng. restriction fragment length polymorphism, skraćeno RFLP) predstavlja metodu kojom se identifikuju razlike u genetskoj sekvenci nastale usled postojanja/nepostojanja specifičnih kratkih palindromskih sekvenci za aktivnost restrikcionih enzima. Utvrđivanje RFLP profila faga je od izuzetne važnosti, jer omogućuje međusobno poređenje faga sa sličnim morfološkim karakteristikama.

Na osnovu rezultata restrikcione digestije DNK *B. bronchiseptica* faga, utvrđeno je da fagi poseduju dvolončani (ds) DNK molekul i da pokazuju relativno sličan RFLP profil. Takođe, dokazano je i da ne postoji povezanost između RFLP profila faga i uzorka iz kog su izolovani. Od ukupno 11 enzima koji su korišćeni u restrikcionoj digestiji, čak 7 enzima nije dalo vidljive fragmente, što ukazuje da genom *B. bronchiseptica* faga ne poseduje specifična mesta za pomenute enzime. Ovakav rezultat se takođe može objasniti prisustvom modifikovanih baza u genomu bakteriofaga, koje imaju funkciju zaštite nukleinske kiseline faga od bakterijskih endonukleza i onemogućavaju restrikcionu aktivnost enzima (Warren, 1980). Interesantno je istaći rezultate digestije restrikcionim enzimom EcoRI, koji nije generisao vidljive fragmente. Ovo ukazuje da genom faga ne poseduje specifična mesta za delovanje ovog enzima. Međutim, *in silico* digestijom DNK sekvenciranih faga EcoRI restrikcionim enzimom dobijeno je 4 trake, što ukazuje na prisustvo specifičnih mesta za delovanje ovog enzima u genomu analiziranog faga. Iste rezultate su zabeležili i Ceysens i sar. (2008) za *Pseudomonas virus Yua*, koji nije dao vidljive fragmente na gelu, dok je *in silico* detektovano četiri specifična mesta za EcoRI enzim. S obzirom na to da je u genomu *B. bronchiseptica* faga detektovana sekvenca koja kodira antirestrikcioni protein (ORF43), pretpostavlja se da ovaj protein direktno reaguje sa EcoRI restrikcionim enzimom ometajući njegovu aktivnost, usled čega digestija ovim enzimom izostaje (Ceysens et al, 2008). Za razliku od većeg broja enzima koji nisu dali vidljive fragmente, Hinf, HhaI i SmaI su razgradili DNK na veliki broj manjih fragmenta, što ukazuje na prisustvo velikog broja specifičnih mesta za ove enzime u genomu faga. Na osnovu razlika u pozicijama isecanja

od strane ovih restrikcioni enzima, jasno je da je većina bakteriofaga klonalno različita, što je još jedan dokaz da nisu indukovani iz bakterije domaćina. Interesantno je još napomenuti da bakteriofagi CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1 i CN2 poseduju RFLP profile koji se međusobno, ali i u poređenju sa drugim fagima, vidno razlikuju, zbog čega su, između ostalog, odabrani za sekvencioniranje genoma.

Kao jedan od dokaza da su fagi izolovani iz prirodne sredine i da nisu indukovani je i *in silico* restrikciona digestija profaga detekovanog od strane PHAST servera u genomu *B. bronchiseptica* ATCC 10580. Ovom analizom, dokazano je da su izolovani fagi novi i da se u pogledu RFLP profila u velikoj meri razlikuju od detektovanog profaga. U ovom smislu su od posebnog značaja RFLP profili dobijeni enzimima koji nisu osetljivi na modifikovane baze, kakav je BglIII. Ovaj enzim je sekao DNK profaga na veliki broj fragmenata, a sekvence za restrikciju kod izolovanih *B. bronchiseptica* su bile odsutne (rezultati potvrđeni *in silico* restrikcijom digestijom).

Kada je u pitanju *in silico* restrikciona digestija srodnih *B. bronchiseptica* faga (BIP-1, BMP-1 i BPP-1) izolovanih od strane Liu i sar. (2002), takođe postoje jasne razlike u RFLP profilu između njih i *B. bronchiseptica* sifovirusa, što je i očekivano, jer fagi pripadaju dvema različitim familijama, *Podoviridae* i *Siphoviridae*. Tako je npr. DNK faga BIP-1, BMP-1 i BPP-1 *in silico* podložna digestiji od strane TaqI i PvuI (tj. postoje restrikciona mesta za ove enzime), dok fagi izolovani u ovoj studiji ne poseduju specifična mesta za delovanje ovih enzima (što je dokazano RFLP metodom, a kasnije i analizom sekvenci).

Specifičnosti DNK faga usko su povezane sa načinom njenog pakovanja u kapsid. Svi fagi sa repom poseduju linearni, dsDNK molekul koji se slično pakuje u prokapsid pomoću proteina translokaze. Međutim, njihove replikativne strategije i priroda krajeva upakovane DNK mogu da variraju. Razlikuje se 6 tipova krajeva koji su do sada okarakterisani: (i) jednolančani kohezivni (lepljivi) krajevi, (ii) cirkularno permutovani direktni ponovci, (iii) nepermutovani, kratki direktni terminalni ponovci (od nekoliko stotina baza), (iv) nepermutovani dugački direktni terminalni ponovci (od nekoliko hiljada baza), (v) krajevi koji sadrže DNK sekvencu domaćina i (vi) kovalento vezani terminalni proteini (Casjens i Gilcrease, 2009). U genomu *B. bronchiseptica* sifovirusa nije utvrđeno prisustvo *cos* regiona, tj. jednolančanih lepljivih krajeva,

s obzirom da je RFLP profil ostao isti i nakon zagrevanja i hlađenja. Ipak, na osnovu RFLP-a, može se zaključiti da bakteriofagi poseduju tzv. *pac* mesto (eng. *pac* site), što je posebno vidljivo nakon primene EcoRV enzima. Naime, DNK nekih faga se replikuje u vidu konkatamera, kompleksa koji sadrže veliki broj povezanih kopija DNK faga (Casjens i Glicrease, 2009). Kraj svakog konkatamera se seče na specifičnom *pac* mestu. Potom sledi pakovanje DNK u kapsid sve do momenta dok se kapsid ne napuni. Ostatak konkatamera služi za punjenje novog kapsida, tako da se na kraju dobiju parcijlano permutovani genomi faga (Casjens i Gilcrease, 2009). Traka koja sadrži *pac* mesto je svetlija na gelu u odnosu na ostale, s obzirom da je prisutna u manje kopija nego drugi fragmenti (*pac* fragment se stvara samo jednom u jednoj seriji pakovanja konkatamera). Na RFLP profilima faga nastalim digestijom EcoRV jasno se uočava svetliji fragment kod većine profila, što ukazuje da ovi fagi poseduju *pac* mesto. Fagi koji poseduju *pac* mesto najčešće učestvuju u generalizovanoj transdukciji, odnosno bakterijska DNK se lako upakuje u kapsid umesto genoma faga, pa se ovo mora imati u vidu prilikom izbora faga u terapijske svrhe, kako bi se izbegao horizontalni transfer nepoželjnih gena (Hunag i Masters, 2014).

Poznavanje organizacije genoma faga, kodirajućih sekvenci i njihovih potencijalnih funkcija veoma je važno. Na osnovu genomske sekvence moguće je pretpostaviti kakva je priroda samog faga. Umereni fagi najčešće poseduju integrazu, represor i druge gene koji su važni za integraciju u genom i perzistenciju faga. Takođe, analizom genoma moguće je detektovati i analizirati endolizine u cilju moguće antimikrobne primene, ali i toksine i faktore virulencije, koji mogu da utiču na patogenost domaćina bakteriofaga.

Sekvencirani genomi faga iz reda *Caudovirales* variraju kada je u pitanju veličina genoma; *Leuconostoc* fag L5 poseduje genom veličine svega 2,435 bp, dok *Pseudomonas* fag 201phi2-1 ima genom vreličine 316,674 bp. Dakle, ne postoji univerzalni opseg veličine genoma, ali se mogu uočiti četiri velike grupe koje dominiraju u redu *Caudovirales*. Najveći broj do sada sekvenciranih genoma (50%), spada u prvu grupu faga čija veličina genoma se kreće od 30-50 kbp. Drugu grupu (oko 20%) čine fagi sa manjim genomima veličine oko 10 kbp, treću fagi sa genomima veličine 100-200 kbp (6%), dok u četvrtu grupu spadaju fagi sa genomima preko 50 kbp i manjim od 10 kbp (Hatfull, 2008). Najveći broj sekvenciranih faga spada u red

Caudovirales za koji je karakteristično da poseduju dvostruki linearni DNK molekul. Najveći broj ovih faga poseduje genom koji je veći od 15 kbp, što je u saglasnosti sa strukturom viriona, odnosno dimenzijama viriona, a pre svega glave faga. Ne treba izgubiti iz vida da pripadnici familije *Siphoviridae* poseduju tzv. *tape measure* (eng.) protein, čija dužina odgovara dužini repa faga (gen za ovaj protein je veličine 1,5-6,0 kbp). Zbog svega navedenog, najveći broj faga iz porodice *Siphoviridae* poseduje genome veće od 20 kbp. Za razliku od njih, većina faga koji poseduju mnogo veće genome (>125 kbp) pripadaju familiji *Myoviridae*. S obzirom da su fagi koji inficiraju iste domaćine u genetičkom kontaktu jedni sa drugima, nije iznenađujuća činjenica da takvi fagi često dele zajedničke sekvence. Do sada je okarakterisano više od 35 genoma faga koji inficiraju rod *Pseudomonas*, 48 za *Staphylococcus* i 50 za rod *Mycobacterium*, a među njima postoje brojni primeri faga koji inficiraju jednog domaćina i koji dele veliki deo sekvence genoma (Hatfull et al, 2005; Kwan et al, 2005; Kwan et al, 2006).

Rezultati sekvenciranja pet bakteriofaga vrste *B. bronchiseptica* su u saglasnosti sa strukturom i veličinom genoma karakterističnom za familiju *Siphoviridae*, kao i sa dimezijama glave viriona. Genomi ovih faga kodiraju 79-82 gena koji su grupisani u tri velika modula uključena u: (i) DNK metabolizam i replikaciju, (ii) interakciju sa domaćinom i (iii) formiranje viriona i lizu domaćina. Za obligatno litičke fage karakteristično je da sadrže gene koji kodiraju DNK polimerazu, primazu, helikazu i druge gene koji su uključeni u proces replikacije (Lohr et al, 2005). Prisustvo gena za integrazu u genomu *B. bronchiseptica* faga ukazuju na njihovu umerenu prirodu. Evolutivno gledano, moguće je da su fagi prvobitno bili obligatno litički, ali su kasnije dobili integrazu. Rezultati analize genoma *B. bronchiseptica* faga ukazuju na postojanje nekoliko enzima koji imaju važnu ulogu u metabolizmu DNK. Naime, genom ovih faga poseduje sekvence koje kodiraju ribonukleotid-difosfat-reduktazu koja učestvuje u DNK sintezi, tj. katališe redukciju ribonukleozid-difosfata u odgovarajuće deoksiribonukleozid difosfate. Pored toga, u genomima faga je detektovana i deoksicitidilat deaminaza, koja hidrolizuje deoksicitidilat monofosfat u deoksiuridin monofosfat, čime se obezbeđuje nukleotidni supstrat za timidilat sintazu, koja je takođe detektovana u genomima faga. Deoksiuridin monofosfat, poznatiji i kao deoksiuridična kiselina predstavlja jedan od intermedijera u metabolizmu deoksiribonukleotida. Timidilat sintaza je enzim koji katališe metilaciju 2'-deoksiuridin-5'-monofosfata (dUMP) u 2'-

deoksitimidin-5'-monofosfat (dTMO) sa molekulom N⁵,N¹⁰-metilen-tetrahidrofolatom (mTHF) kao kofaktorom (Ferrari et al, 2003). Kada su u pitanju geni koji su uključeni u interakciju sa domaćinom, jedan od najkarakterističnijih koji je detektovan u genomu *B. bronchiseptica* faga je svakako diguanilat-ciklaza sa GGDEF domenom. Ovaj enzim je dobro poznat bakterijski protein koji katališe sintezu cGMP (ciklični guanozion monofosfat), globalnog sekundarnog glasnika, koji kontriliše pokretljivost i biofilm kod bakterija. Gen koji kodira ovaj enzim prvi je detektovan u genomu vrste *Pseudomonas virus Yua* (Ceyssens et al, 2008). *B. bronchiseptica* fagi poseduju i gene koji kodiraju neribozomalnu peptid sintetazu, koja sintetise peptide nezavisno od ribozoma i iRNK. Ovi peptidi mogu biti toksini, siderofori ili pigmenti. Ono što je jedinstveno za ove fage je sekvenca koja sadrži von Willebrandov proteinski domen koji ima značajnu ulogu u ćelijskoj adheziji (Whittaker i Hynes, 2002). Ovaj domen se javlja kod Eukaryota i Prokaryota. Kod Eukaryota ovaj protein predstavlja VIII faktor koagulacije i igra važnu ulogu u adheziji trombocita na mestu povrede, dok je njegova funkcija kod Prokaryota još uvek nerazjašnjena (Whittaker i Hynes, 2002).

B. bronchiseptica fagi poseduju integrazu koja pokazuje 99% sličnosti sa integrazom MP1412 *Pseudomonas* faga, kao i represor koji pokazuje 100% sličnosti sa PAE1 *Pseudomonas* fagom. Ovo ukazuje da bakteriofagi imaju mogućnost integracije u genom domaćina, odnosno ukazuje na njihovu umerenu prirodu.

B. bronchiseptica fagi ne poseduju reverznu transkriptazu; genska sekvenca koja kodira ovaj specifičan enzim nije detektovana u genomima sifovirusa za razliku od umerenih *B. bronchiseptica* faga iz familije *Podoviridae* kod kojih je reverzna transkriptaza prisutna u genomu gde generiše nukleotidni diverzitet u *mtd* regionu odgovornim za specifičnost receptorskih molekula faga za *Bordetella* vrste (Liu et al, 2002).

Litička kasetna ovih faga se sastoji od holina, endolizina i spanina (Rz proteina), što je generalno karakteristika faga koji inficiraju Gram negativne bakterije. O endolizinima faga će biti više reči u poglavlju 6.20.3..

Bolje poznavanje organizacije i funkcije jedinstvenih proteina *B. bronchiseptica* faga uključenih u interakciju sa domaćinom, koji su blastP pretragom okarakterisani kao hipotetički

proteini, može pružiti osnovu za razumevanje inetrakcije između faga i domaćina i otkrivanje novih antimikrobnih meta za uspešniju kontrolu *B. bronchiseptica* infekcija.

Sekvenciranje genoma velikog broja faga i komparativne genomske analize do sada su omogućile bolje razumevanje prevalence, interakcije između faga i domaćina, kao i bolje sagledavanje genetičkog diverziteta faga (Merphy et al, 2015). Komparativna analiza genoma *B. bronchiseptica* faga je ukazala na postojanje visokog stepena homologije između izolovanih faga. Pored toga, filogenetske analize celih genoma i visokokonzervativnih proteina ukazale su na njihovu evolutivnu povezanost. Naime, s obzirom na to da dele >87% DNK sličnosti, *B. bronchiseptica* fagi su veoma srodni. Najveća varijabilnost u DNK sekvencama, nastala kao posledica delecija, inverzija ili insercija, zabeležena je u regionu između 30 kb i 40 kb. Ovaj region sadrži gene koji kodiraju uglavnom hipotetične proteine, ali i neke proteine sa poznatom funkcijom, kao što su diguanilat ciklaza sa GDDFF domenom. Bakteriofagi FP1, CN2 i MW2 pokazuju <95% sličnosti u DNK sekvencama, zbog čega se prema pravilima ICTV-a smatraju različitim vrstama. S obzirom da fagi LK3 i CN1 dele >95% sličnosti genoma, predstavljaju dva izolata iste vrste. Rezultati filogenetske analize su u skladu sa prethodno iznetim rezultatima sličnosti u DNK sekvenci. Naime, na filogenetskom stablu konstruisanom na osnovu celih genomskih sekvenci izdvajaju se fagi LK3 i CN1 u jedan klaster i MW2, FP1 i CN2 u drugi klaster. U okviru drugog klastera formirane su dve manje grane, jedna sa CN2 i FP1 i druga sa MW2. S druge strane, filogenetsko stablo formirano na osnovu aminokiselinske sekvence *tail tape measure* proteina pruža uvid u drugačiju raspodelu faga po klasterima. Prema njemu, FP1 fag je izdvojen u jedan klaster, LK3 i CN1 kao i u slučaju celih genoma u drugi i CN2 i MW2 u treći klaster. Analizom filgenetskog drveta konstruisanog na osnovu sekvence glavnog proteina kapsida dobijeni su rezultati slični onima dobijenim konstruisanjem drveta na osnovu genomskih sekvenci faga. Naime, sekvenca MW2 se najviše razlikuje od ostalih sekvenci, zbog čega je formiran zaseban klaster. Drugom klasteru pripadaju sekvence ostalih faga, s tim što su one dodatno grupisane, tako da CN1 i LK3 formiraju jednu granu, dok sekvenca FP1 faga formira drugu.

Poređenjem *B. bronchiseptica* bakteriofaga sa *Yuavirus* fagima bakterije *P. aeruginosa* može se uočiti postojanje visokog stepena homologije kako u DNK, tako i u proteinskim

sekvencama. S obzirom da dele >41% sličnosti u DNK sekvencama i visok stepen homologije proteina, prema pravilima ICTV-a, *B. bronchiseptica* fagi takođe pripadaju rodu *Yuavirus*. Ovaj rod je prema klasifikaciji iz 2015. godine označen kao *Yuavirusi*, po tipskom predstavniku *Pseudomonas* fagu Yua. Ovaj fag poseduje genom veličine 58,663 bp i sadrži 64.3% GC parova, a anotacijom genoma ovog faga utvrđeno je postojanje 78 gena. *B. bronchiseptica* fagi pokazuju slične karakteristike: veličina genoma se kreće od 59,779 do 62,030 bp, dok se zastupljenost GC parova kreće od 63,97 do 64,07%. Interesantno je primetiti da je GC% u genomim domaćina ove dve grupe faga, tj. kod tipskih predstavnika *P. aeruginosa* i *B. bronchiseptica* veoma sličan (66.2 i 68.2%; izvor NCBI baza), a što je vrlo blisko GC% faga. Broj gena kod *B. bronchiseptica* faga kreće se između 79-82. Kao što je ranije naglašeno, Yua fag i *B. bronchiseptica* sifovirusa pokazuju sličan proteinski profil, tj. veličina proteina glavnog kapsida i proteina repa ova dva faga su veoma bliske.

Na osnovu ovih razmatranja jasno je da su *B. bronchiseptica* fagi međusobno slični, ali i da pokazuju izvesnu sličnost sa *Pseudomonas* fagima iz roda *Yuavirusa* i to kako u pogledu morfologije, tako i na nivou DNK sekvence i proteina. U vezi sa tim predlaže se klasifikacija faga u rod *Yuavirus*, sa četiri nove vrste:

- *Bordetella virus LK3*, sa tipskim predstavnikom *Bordetella* fag LK3; ovoj vrsti pripada i soj *Bordetella* fag CN1
- *Bordetella virus CN2*, sa tipskim predstavnikom *Bordetella* fag CN2;
- *Bordetella virus MW2*, sa tipskim predstavnikom *Bordetella* fag MW2 i
- *Bordetella virus FP1*, sa tipskim predstavnikom *Bordetella* fag FP1.

Brojni rezultati komparativne genomike bakterija pokazali su da bakterije i njihovi virusi koevoluiraju. Ovaj process je evidentan u slučaju patogenih bakterija, čiji genomi često sadrže brojne profage ili ostatke integrisanih faga. Mnogi od tih faga mogu da kodiraju faktore virulencije i na taj način igraju značajnu ulogu u patogenosti bakterija (Boyd, 2012; Wagner i Waldor, 2002). Imajući u vidu ovu činjenicu, bilo je neophodno ispitati da li u genomima ovih faga postoje geni koji mogu kodirati potencijalne toksine, pri čemu je LK3 uzet kao reprezentativan fag. Analizom sekvenci sličnih potencijalnim egzotoksinima zasnovanom na homologiji domena toksna, upotrebom DBETH softvera, utvrđeno je postojanje nekoliko

proteina koji bi mogli da utiču na patogenost bakterije. ORF4, ORF9 i ORF40 pokazuju veliku sličnost sa kolera enterotoksinom ($\leq 2E-21$). DBETH softver prepoznaje ove proteine kao potencijalne toksine, dok BTXpred odbacuje pretpostavku da ORF4 i ORF9 kodiraju potencijalne toksine, a ORF40 prepoznaje kao potencijalni egzotoksin (predikcija preko SVM dipeptida).

Sagledavanjem rezultata dobijenih analizom sekvenci sličnih potencijalnim egzotoksinima, koja je zasnovana na homologiji same sekvence toksina (blastP) evidentno je preklapanje, u manjoj ili većoj meri, sa nekolicinom potencijalnih toksina. Interesantne podatke su pokazali ORF2. i ORF3. Pre svega, produkt ORF2 pokazuje sličnost sa kanalnim proteinom, koji spada u hemolizin III familiju proteina ($E=1,9$). Međutim, analiza ovog proteina kako u DBETH, tako i u BTXpred softveru odbacuje pretpostavku da ovaj protein ima direktnu vezu sa kodiranjem potencijalnih toksina. Produkt ORF3 pokazuje sličnost sa enzimom kolagenazom vrste *Hathewayia histolytica* ($E=0,17$) i DBETH softver ga prepoznaje kao potencijalnog toksina, dok BTXpred odbacuje pretpostavku da ovaj protein može imati funkciju toksina. Veliki broj proteina (ORF9, 14, 17, 27, 28, 33, 34, 37, 48, 54, 64, 69, 72, 74 i 77) pokazuje sličnost sa proteinima efluksnih pumpi i sekretornih kanala različitih vrsta bakterija. Efluksne pumpe su proteinski transporteri smešteni u citoplazmatskoj membrani, čija funkcija je ispumpavanje toksičnih molekula, kao što su antibiotici, van ćelije. Na taj način se sprečava njihova akumulacija u ćeliji. Efluksne pumpe su odgovorne za promene koje se javljaju u osetljivosti na antibiotike, obično tako što bakterije koje su bile osetljive (S) na određeni antibiotik postaju intermedijerno osetljive (I), dok bakterije koje su bile intermedijerno osetljive postaju rezistentne (R) (Zhong et al, 2013). S obzirom na to da ove pumpe predstavljaju jedne od glavnih mehanizama antibiotske rezistencije kod bakterija, rezultati pretrage ukazuju na potencijalnu umešanost faga u rezistenciju bakterija na antibiotike (Poole, 2007; Soto, 2013). Putem mehaničkog učenja DBETH softver prepoznaje ORF42 kao toksin nepoznate funkcije vrste *Yersinia pseudotuberculosis* ($E=0,0$ $I=81,5$; $Q.C.=73$), dok je ORF59 identifikovan kao potencijalni leukocidin vrste *Vibrio sp.* ($E=9,4$; $I=28,1$; $Q.C.=84$). Oba proteina su prepoznata od DBETH programa kao potencijalni toksini, dok BTXpred potvrdio potencijalnu ulogu toksina za ORF59 predikcijom na nivou SVM dipeptid i SVM aminokiselinskog sastava. Iako rezultati ove pretrage ukazuju na mnogostruku ulogu faga u patogenosti bakterije *B. bronchiseptica*, ne treba izgubiti iz vida činjenicu da većina

sekvenci sličnih nekom od toksina pokazuje veliku E vrednost, koje ne zadovoljavaju kriterijum sličnosti zbog čega je potrebno dodatno potvrditi njihovu funkciju.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na moguću ulogu faga u hemolizi i citotoksičnosti vrste *B. bronchiseptica*, kao i ulogu u rezistenciji na antibiotike. Pored toga, rezultati ukazuju na koje proteine kod *B. bronchiseptica* faga LK3 bi trebalo obratiti veću pažnju u budućim istraživanjima. Isto tako, treba imati u vidu da je za preko 50% pretpostavljenih proteina utvrđena potencijalna veza sa toksinima u BTXpred, dok DBETH na osnovu mehaničkog učenja pokazuje pozitivne predikcije toksina za čak 96,6% ispitivanih proteina. Ovo ujedno ukazuje na nedostatke oba softvera, ali se baze podataka stalno dopunjavaju i potrebno je ponoviti predikcije toksina nakon određenog vremena, tj. kada se baze dopune. Ne treba izgubiti iz vida ni činjenicu da su oba softvera zasnovana na pretrazi baze gena humanih patogena, kao i to da je pretraga ograničena na egzotoksine i da u tom slučaju drugi faktori virulencije nisu uzimani u obzir.

Konačno, rezultati dobijeni biosoftverskim istraživanjima ukazuju na mogućnost da *B. bronchiseptica* fag LK3 ima ulogu u patogenosti svog domaćina *B. bronchiseptica* i mogu pružiti dobru polaznu tačku za dalja istraživanja. Iz navedenih razloga vršena su dalja istraživanja uloge ovih faga u lizogenoj konverziji bakterija.

6.11. INTEGRACIJA FAGA I LIZOGENA KONVERZIJA BAKTERIJE

Integraza je enzim koji katališe rekombinaciju tj. direkcionu reakciju DNK razmene između kratkih, ciljnih sekvenci, odnosno att (attachment) mesta faga (*attP*) i att mesta bakterije (*attB*). Integreze su na osnovu katalitičkog modula grupisane u dve velike familije: tirozin rekombinaze i serin rekombinaze. Tirozin familija integraza, kao što je integraza lambda faga, koriste katalitički tirozin u sečenju lanca i prepoznaju dugačke attP sekvence. Ove rekombinaze zahtevaju prisustvo drugih proteina kodiranih od strane faga ili bakterije domaćina. Integreze iz serin familije su veće i koriste katalitički serin za sečenje lanca. Ovi enzimi prepoznaju kratke attP sekvence i ne zahtevaju bakterijske kofaktore. Uzimajući u obzir činjenicu da integreze *B. bronchiseptica* faga pokazuju veliki procenat sličnosti u DNK sekvenci sa integrazom

okarakterisanog *Pseudomonas* Yua faga, najverovatnije je da ovi enzimi pripadaju istoj familiji rekombinaza. Ceysens i sar. (2008) su utvrdili da se integraza *Pseudomonas* Yua faga po svojim karakteristikama značajno razlikuje od integraza iz familije serin i tirozin rekombinaza, što ukazuje da integraze *B. bronchiseptica* faga mogu posedovati slične karakteristike.

Pošto inficiraju bakteriju, umereni fagi, u zavisnosti od uslova sredine, ulaze u litički ili lizogeni ciklus koji je praćen integracijom faga na određeno mesto u bakterijskom genomu. Ovakav fag je označen kao profag i kao takav nastavlja da perzistira u latentnoj formi, koja ne dovodi do ćelijske smrti ili produkcije novih viriona. Profagi se zajedno replikuju sa bakterijskim hromozomom, a lizogeno stanje se održava represijom litičkih gena faga. Kod nekih umerenih faga koji se integrišu u bakterijski genom zabeležena je spontana indukcija i ulazak u litički ciklus u odsustvu vidljivih stresora (Lwof, 1952, Nanda et al, 2015). Još jedna grupa faga su oni koji formiraju pseudolizogene. Ovi fagi ne ulaze ni u litički niti lizogeni ciklus već njihov genom perzistiraju u vidu epizoma kao neintegrisani i nereplikativni profagi (Miller i Ripp, 2001; Baes, 1971). Formiranje pseudolizogena najčešće se dešava kada se bakterija nalazi u nepovoljnim uslovima sredine, sa ograničenom dostupnošću hranljivih materija i sl. Kada se bakterija ponovo nađe u uslovima sa dostupnim hranljivim materijama, fagi mogu da se aktiviraju i liziraju bakteriju (Miller i Day, 2008). Najpoznatiji primeri ovakvih faga su *E. coli* fag P1 iz familije *Myoviridae* i *Mycobacterium* N15 fag iz familije *Siphoviridae* (Edlin i Bitner, 1977; Ravin et al, 2000). S obzirom da je u prethodnom poglavlju dokazano da *B. bronchiseptica* fagi poseduju oba, gen za integrazu i gen za represor, jasno je da su u pitanju umereni fagi sa potencijalom za uspostavljanje lizogene konverzije domaćina. U radu je takođe utvrđeno da LK3 fag *B. bronchiseptica* može da formira relativno stabilne lizogene osetljivih sojeva (ATCC 10580, Bbchiot i Bbr3416). Naime, plazmidna i genomska DNK inficirane bakterije dale su očekivani produkt PCR metodom i time potvrdile infekcije sojeva fagom. Prisustvo genoma faga u plazmidnoj DNK ukazuje na moguće formiranje pseudolizogena, ili pre na spontanu aktivaciju litičkog ciklusa i prisustvo replikativnih formi genoma faga u bakterijskim ćelijama. RFLP metodom dodatno je potvrđeno prisustvo genoma LK3 faga u bakteriji. U tu svrhu, korišćen je enzim Sall koji je izvršio digestiju bakterijske DNK na velikom broju mesta, što se na gelu

uočavalo kao smir, dok je DNK faga ostala netaknuta i na gelu se izdvojila kao jedna znatno veća traka.

Stabilnost bakterijskih lizogena prvenstveno zavisi od fiziološkog stanja domaćina. Da bi došlo do prelasaka faga iz lizogenog u litički ciklus neophodna je da se desi inaktivacija gena koji kodiraju represor (Luo et al, 2012). Okidač koji inicira prelazak faga u litički ciklus najčešće je povezan sa oštećenjem DNK domaćina, koje izaziva indukciju faga, multiplikaciju i na kraju bakterijsku lizu (Lwolf, 1953). Stabilnost *B. bronchiseptica* LK3 lizogena testirana je kontinuiranim presejavanjem inficiranih sojeva i PCR proverom perzistencije infekcije. S obzirom da su inficirani sojevi Bbchiot i Bbr3416 dali očekivani produkt i nakon četvrtog presejavanja inficiranog soja, može se zaključiti da su ovi lizogeni stabilni. Za razliku od njih, referentni soj ATCC 10580 inficiran fagom LK3 nije pokazao jednaku perzistenciju faga u ćeliji: PCR metodom nije detektovan genom faga nakon trećeg presejavanja bakterije, što ukazuje da LK3 fag ne formira stabilne lizogene. Uzimajući u obzir činjenicu da *B. bronchiseptica* fagi pokazuju veliki procenat sličnosti kako u morfološkom, tako i u genetičkom smislu sa *Yua* fagom, pretpostvaljeno je da će rezultati izolacije lizogena takođe biti slični. Međutim, za razliku od *B. bronchiseptica* faga za koji je pokazano da formiraju relativno stabilne lizogene, Ceysens i sar. (2008) nisu uspeli da izoluju stabilne lizogene *P. aeruginosa* PAO1 soja inficiranog *Yua* fagom. Ovi autori su pokušali da PCR analizom i restrikcionom digestijom endonukleazama utvrde prisustvo faga u kolonijama PAO1 soja, koje su izolovane iz mutnih plaka i koje su se pokazale rezistentne na delovanje *Yua* faga. Nijedna metoda nije potvrdila prisustvo stabilnog integrisanog ili neintegrisanog genoma faga u bakteriji. Slične rezultate, tj. bezuspešnu izolaciju lizogenih bakterija dobili su i drugi autori za fage ϕ JL001 i *Vibrio parahaemolyticus* fage VP16T i VP16C iz familije *Siphoviridae* (Lohr et al, 2005; Seguritan et al, 2003). Autori smatraju da *Yua* integraza zahteva specifične fiziološke uslove ili alternativnog domaćina za uspostavljanje stabilnih lizogena (Ceysens et al, 2008). Druga grupa autora dokazala je da neki sifovirusi, kao što su *Staphylococcus epidermidis* fagi H15 i CNPH82, mogu da formiraju stabilne lizogene, ali podaci o ulozi ovih faga u patogenosti bakterije nisu detaljnije okarakterisani (Daniel et al, 2006). Stabilne lizogene takođe formira jedan od najpoznatijih i najbolje okarakterisanih sifovirusa, odnosno λ fag (Santillan et al, 2004). Uzimajući u obzir iznete tvrdnje, kao i činjenicu

da *B. bronchiseptica* fagi formiraju relativno stabilne lizogene, jasno je da ovi fagi ne mogu biti primenjeni u terapijske svrhe. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da se LK3 fag verovatno integriše u bakterijski hromozom, ali se u nekim ćelijama spontano multiplicira, zbog čega se detektuje u plazmidnoj DNK. Nestabilnost lizogena ATCC 10580 i prisustvo *pac* mesta u genomima *B. bronchiseptica* faga ukazuju na moguću ulogu faga u horizontalnom transferu gena između bakterija. S obzirom da profagi gotovo uvek utiču na bakterijski fenotip, rezultati ovog rada takođe jasno ukazuju na ulogu *B. bronchiseptica* faga u lizogenoj konverziji.

6.12. PRODUKCIJA BIOFILMA INFICIRANIH I NEINFICIRANIH *B. bronchiseptica*

Biofilmovi predstavljaju kompleksne bakterijske zajednice pričvršćene za neku površinu, koje se suštinski razlikuju od slobodnoživećih planktonskih bakterijskih ćelija. Početak formiranja biofilma podrazumeva adheziju planktonske ćelije za površinu, koja je praćena formiranjem složene strukture u kojoj su pojedinačne bakterijske ćelije okružene ekstracelularnim matriksom (Moorthy i Watnick, 2004; Tolker-Nielsen et al, 2000; Sauer et al, 2002). Uloga biofilma je važna u patogenezi velikog broja bakterijskih infekcija i to posebno onih sa hroničnim tokom, kao što su *P. aeruginosa* infekcije kod obolelih od cistične fibroze, endokarditis i periodontitis (Costertzon et al, 1999; Parsek i Singh, 2003). Dobro je poznato da je regulacija formiranja biofilma kod različitih bakterijskih vrsta zavisna od ekspresije različitih površinskih struktura na ćeliji (O'Toole et al, 2000). Pored toga, specifični signalni putevi, komunikacija među ćelijama biofilma, kao i dinamički ekvilibrijum za koji se smatra da postoji između planktonskih ćelija i onih u biofilmu, predstavljaju važne mehanizme odgovorne za formiranje mnogih do sada proučenih biofilmova (Irie et al, 2004).

Potencijal roda *Bordetella* da formira biofilm opisana je od strane nekoliko autora. Prvi podaci vezani za biofilm ovog roda odnose se na regulaciju biofilma putem dvokomponentnog BvgAS sistema (Irie et al, 2004; Mishra et al, 2005). Prema Mishra i sar. (2005), najbolji uslovi za formiranje i perzistenciju *B. bronchiseptica* biofilma na abiotičkim površinama predstavljaju pre svega statičan rast i prisustvo intermedijernih koncentracija nikotinske kiseline (0.2-1.6 mM). Ovi autori su takođe istakli da *Bordetella* biofilmovi pokazuju izuzetnu otpornost na veliki broj

antimikrobnih agenasa, uključujući i one koji se koriste u medicini i veterini za lečenje infekcija izazvanih bakterijama ovog roda. Kao i u slučaju drugih biofilmova, ekstracelularna DNK i egzopolisaharidi su važni za formiranje biofilma kod *B. bronchiseptica* (Conover et al, 2011). Sloan i sar. (2007) su čak demonstrirali da divlji sojevi mogu da formiraju snažan biofilm na nazalnom epitelu miševa, kao i to da ovi biofilmovi pokazuju strukturne karakteristike koje su slične biofilmovima drugih bakterija.

Rezultati formiranja biofilma dobijenih u ovoj studiji jasno ukazuju da svi ispitivani sojevi vrste *B. bronchiseptica* formiraju biofilm. Pored toga, u ovoj studiji je analizirana produkcija biofilma neinficiranih i fagima inficiranih sojeva. Rezultati eksperimenta jasno ukazuju na postojanje razlika u potencijalu formiranja biofilma između inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva i na ulogu faga u produkciji biofilma ove vrste. Naime, sve inficirane bakterije su pokazale statistički značajno veću produkciju biofilma u odnosu na neinficirane. Inficirani sojevi Bbchiot i Bbr3416 produkovali su čak 2-4 puta više biofilma u odnosu na neinficirane sojeve.

Rezultati ove studije ukazuju da *B. bronchiseptica* sojevi formiraju veoma adherentan biofilm u uslovima u kojima se eksprimira Bvg⁺ fenotip. Pored toga, ispitivanjem pokretljivosti *B. bronchiseptica* sojeva utvrđena je povećana pokretljivost inficiranog Bbchiot/LK3 soja, koja ukazuje na ulogu faga u inicijalnoj fazi formiranja biofilma. Naime, iako su prethodne studije pokazale da je Bvg⁺ faza neophodna u kolonizaciji respiratornog trakta (Akerlez et al, 1995; Cotter i Miller, 1994; Merkel et al, 1998), a Bvg⁻ u preživljavanju ove bakterije van domaćina (Cotter i Miller, 1997), Nicholson i sar. (2012) su utvrdili da je regulatorni mehanizam tokom formiranja biofilma ove vrste rezultat ekspresije klasičnog Bvg⁻ fenotipa pod uslovima u kojim se inače eksprimira Bvg⁺ fenotip. Naime, ovi naučnici su otkrili da su flagele, inače karakteristične za Bvg⁻ fazu, neophodne u inicijalnoj fazi formiranja *B. bronchiseptica* biofilma.

Novija istraživanja o biofilmu *B. bronchiseptica* vezana su za molekularne mehanizme regulacije biofilma. Signalni molekul bis-(3'-5')-ciklični guanozin monofosfat je glavni regulator velikog broja ćelijskih funkcija, uključujući pokretljivost, formiranje biofilma i virulenciju bakterija. Proteini sa diguanilat-ciklaznim i fosfodiesteraznim domenom (skrać. GGDEF i EAL domen) moduliraju nivo c-di-GMP, sekundarnog glasnika. c-di-GMP nastaje sintezom od dva

molekula GTP delovanjem enzima koji sadrže GGDEF domen, a degradira se posredstvom enzima sa EAL domenom (Romling et al, 2013). Visoke koncentracije cGMP dovode do formiranja biofilma, dok niske koncentracije favorizuju planktonski način života. Tako npr. pojačana ekspresija gena koji kodiraju enzime uključene u produkciju ili degradaciju c-di-GMP-a dovode do statistički značajnog povećanja, odnosno smanjenja produkcije biofilma kod vrste *B. bronchiseptica* (Sisti et al, 2013). S obzirom da je u genomu *B. bronchiseptica* faga detektovan protein sa potencijalnom funkcijom diguanilat-ciklaze sa konzervativnim GGDEF domenom ($E=4e^{-66}$), ovi rezultati ukazuju na mogući mehanizam umešanosti faga u proces formiranja *B. bronchiseptica* biofilma. Proteini sa GGDEF domenom detektovani su i u genomima srodnih *Pseudomonas* faga, Yua i MP141, ali s obzirom da ne postoje podaci o stabilnim lizogenima koje formiraju ovi fagi, njihova uloga u formiranju biofilma *P. aeruginosa* za sada je nepoznata (Ceysens et al, 2007; Bae et al, 2012). Studija iz 2013. godine ukazala je da plazmidom posredovana ekspresija gena, koji kodiraju potencijalnu diguanilat-ciklazu, dovodi do povećanja produkcije biofilma kod *B. bronchiseptica*, ali i do upotpunjavanja biofilm-defektnog fenotipa kod *P. fluorescens*, kojima nedostaju geni za diguanilat-ciklazu (Sisti et al, 2013). Slično bakteriji *B. bronchiseptica*, mutantni soj *B. pertussis* kome nedostaje gen za diguanilat-ciklazu pokazao je značajno manju produkciju biofilma (Wan et al, 2009). Poznato je da *B. bronchiseptica* kodira 4 hipotetička proteina sa EAL, deset sa GGDEF domenom i pet koji sadrže oba domena, dok *B. pertussis* kodira pet sa GGDEF i četiri hipotetička proteina sa EAL domenom (Sisti et al, 2013; Wan et al, 2009). Prisustvo nekoliko gena koji kodiraju proteine sa GGDEF ili EAL domenom ukazuje na multigenisku kontrolu c-di-GMP u procesu formiranja biofilma (Matto et al, 2005). Važno je naglasiti da pored molekularnih mehanizama regulacije biofilma i pokretljivosti i drugi faktori kao što su hemaglutinin, fimbrije i proteini spoljašnje membrane itd. igraju važnu ulogu u formiranju biofilma vrste *B. bronchiseptica*. Naime, Irie i sar. (2004) su potvrdili da filamentozni hemaglutinin i fimbrije doprinose boljem razvoju biofilma, dok bifunkcionalna adenilata-ciklaza deluje inhibitorno na razvoj *B. bronchiseptica* biofilma. Druga grupa autora (Cattelan et al, 2016) ukazuje na važnost OmpQ proteina spoljašnje membrane u formiranju *B. bronchiseptica* biofilma. Ovaj protein spada u porine, a eksprimira se pod uticajem BvgAS sistema. Smanjena ekspresija OmpQ ne utiče značajno na kinetiku rasta i finalnu biomasu

B. bronchiseptica u slučaju slobodnoživećih bakterija. Isto tako, $\Delta ompQ$ mutantni soj ne pokazuje razlike u adheziji i ranim fazama formiranja biofilma. Međutim, delecijom *ompQ* gena dolazi do značajne redukcije sposobnosti *B. bronchiseptica* da formira zero biofilm.

Tačan mehanizam kojima *B. bronchiseptica* fagi doprinose boljem formiranju biofilma kod inficiranih u odnosu na neinficirane bakterije nije utvrđen. Kao što je već ranije naglašeno, jedan od najznačajnijih faktora neophodnih za formiranje biofilma jeste svakako ćelijska pokretljivost, koja je neophodna u adsorpciji bakterija za površinu, ali i u disperziji bakterija u ovom procesu (O'Toole i Kolter, 1998). Kirby i sar. (1994) su opisali regulaciju biofilma posredovanu fagima koja je detektovana kod vrste *E. coli*. Ovi autori su utvrdili da genom soja *E. coli* K-12 poseduje kriptičnog faga (CP4-57), koji sadrži gene za funkcionalnu integrazu, ali mu nedostaju geni za lizu ćelije. Iako profag nije direktno integrisan u bakterijski okvir čitanja, isecanjem CP5-57 dolazi do pojačane ekspresije flagela tokom inicijalne faze formiranja biofilma, koja dovodi do uspostavljanja zajednice biofilma (Wang et al, 2009).

Na kraju, moguće je zaključiti da *B. bronchiseptica* bakteriofagi posredno učestvuju u formiranju biofilma preko sinteze cGMP i povećavanja pokretljivosti bakterije putem lizogene konverzije, a što je neophodno potvrditi u budućim istraživanjima.

6.13. KINETIKA HEMOLIZE INFICIRANIH I NEINFICIRANIH *B. bronchiseptica*

Jedan od najvažnijih faktora virulcije vrste roda *Bordetella* jeste svakako bifunkcionalni protein sa adenilat ciklaznom i hemolitičkom aktivnošću (ACY). Ovaj polipeptid pripada familiji RTX bakterijskih citolizina i citotoksina, a njegova funkcija je da katališe pojačanu produkciju cAMP (cikličnog adenzin monofosfata), koja je stimulirana kalmodulinom prisutnim u eukariotskim ćelijama (Sakamoto i sar.1992; Issartel et al, 1991; Hewlett et al, 1989). Posledice koje se javljaju usled intoksikacije ovim sekundarnim glasnikom jesu supresija normalnih funkcija eukariotskih ćelija, pre svega fagocita. *In vitro* ispitivanjima pokazano je da cAMP izaziva niz toksičnih efekata koji uključuju inhibiciju fagocitoze, oksidativni stres i sposobnost neutrofila da indukuju ćelijsku smrt u makrofagima (Confer i Eaton, 1982; Pearson et al, 1987;

Galgiani et al, 1988). ACY toksin je kalcijum-vezujući protein, a interakcije kalcijuma sa toksinom dovode do značajnih konformacionih promena, koje su neophodne za ulazak i delovanje toksina unutar eukariotskih ćelija (Hewlett et al, 1983). Ovaj toksin takođe pokazuje i hemolitičku aktivnost, tj. sposobnost da lizira eritrocite (Ehrman et al, 1991; Belallou et al, 1990). Weiss i sar. (1983) su pokazali da su *B. pertussis* mutanti koji nemaju gen za ACY toksin izgubili sposobnost hemolize eritrocita. Strukturni gen ACY toksina, *cyaA* je kloniran i sekvenciran od strane Glaser i sar. (1988). Ovi naučnici su utvrdili postojanje homologije u sekvenci sa genom za hemolizin vrste *E. coli*, dok su Betsou et al, (1995) pokazali da *B. bronchiseptica* i *B. pertussis* dele 98% sličnosti u sekvenci *cyaA* gena koji kodira ACY toksin.

Kako bi ispitali da li dolazi do promene fenotipa bakterije nakon infekcije fagom, tačnije povećanja hemolitičke sposobnosti, utvrđena je kinetika hemolize tokom 48 časa. Iako vidljiva razlika u hemolizi inficiranih i neinficiranih sojeva nije primećena na krvnom agaru, kinetika ovog procesa je pružila bolji uvid u ulogu faga u ovom procesu. Utvrđena je statistički značajna razlika u hemolizi ovčijih eritrocita između inficiranog i neinficiranog referentnog soja 10580 nakon 48 h, dok značajna razlika nije uočena u hemolizi goveđih i pacovskih eritrocita. Faktori koji utiču na hemolizu kod *B. bronchiseptica* su ispitivani ranije u istraživanju Akerley i sar. (1992). Tada je utvrđeno da na hemolizu mogu uticati mnogi faktori, uključujući spoljašnje faktore, pH, i kvalitet samih eritrocita. Kako su u ovom eksperimentu spoljašnji faktori i pH (oko 6) bili strogo kontrolisani, rezultati ukazuju da je odsustvo razlike u hemolizi pacovskih i goveđih eritrocita posledica razlike u osobinama eritrocita ili afinitetu hemolizina prema eritrocitima različitih životinja.

Uzimajući u obzir prethodno iznete tvrdnje kao i činjenicu da gp2 pokazuje sličnosti sa kanalnim proteinom, koji spada u hemolizin III familiju proteina, može se pretpostaviti da fag LK3 ima efekat na promenu hemolitičke aktivnosti referentnog ATCC 10580 *B. bronchiseptica* soja.

6.14. ANTIBIOGRAM INFICIRANIH I NEIFICIRANIH *B. bronchiseptica*

Terapija antibioticima predstavlja jednu od najvećih prednosti medicine 20. veka kojom su mnoge infektivne bolesti stavljene pod kontrolu. Međutim, nekontrolisana upotreba i povećana stopa razvoja bakterija rezistentnih na antibiotike predstavlja jedan od najvećih problema s kojima se susreće savremena medicina. Brojne studije ukazale su na prirodne mehanizme pomoću kojih bakterije postaju rezistentne na antibiotike, kao što su mutacije i/ili horizontalni transfer gena. Horizontalni transfer gena, koji se odigrava putem konjugacije, transformacije i transdukcije, predstavlja mehanizam koji je najvećim delom, mada ne i isključivo, odgovoran za razvoj antibiotske rezistencije (Marti et al, 2014). Iako je sticanje antibiotske rezistencije putem transdukcije demonstrirano kod klinički relevantnih bakterija, funkcionisanje samog mehanizma u prirodnim sredinama nije u potpunosti razjašnjeno. Postoji nekoliko primera gde geni faga obezbeđuju Gram negativnim bakterijama rezistenciju na antibiotike: P1 i P22-slični fagi mogu biti nosioci gena koji kodiraju β -laktamazu kod *E. coli* i vrsta roda *Salmonella* (Billard-Pomares et al, 2014; Schmieger i Schicklmaier, 1999).

Rezultati antibiograma dobijenih u ovoj studiji ukazuju da su *B. bronchiseptica* sojevi uglavnom osetljivi na antibiotike iz grupe tetraciklina, aminoglikozida, hloramfenikola, karbapenema i fluorohinolona. Smanjena osetljivost *B. bronchiseptica* sojeva je zabeležena na antibiotike iz grupe beta laktama, cefalosporina i makrolida, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. U postojećoj literaturi dostupni su rezultati nekoliko studija antibiotske rezistencije vrste *B. bronchiseptica* i molekularnih mehanizama. U ovim istraživanjima, osetljivost na antibiotike se najviše ispitivala na sojevima izolovanim od svinja, pasa i ljudi (Hodges i Youns, 1984; Mengelers et al, 1989; Pedersen et al, 1970). Antimikrobni agensi koji se najčešće koriste u slučaju infekcija sa *B. bronchiseptica* su tetraciklini, ampicilin i sulfametaksazol/trimetoprim. Međutim, brojne studije su pokazale da *B. bronchiseptica* ispoljava rezistenciju na ampicilin, sulfonamide i streptomycin i da je ova rezistencija kodirana genima na plazmidima (Terakado et al, 1973; Hedges et al, 1974; Shimizu et al, 1981; Graham et al, 1982). Kadlec i sar. (2005) su ispitivali molekularnu osnovu rezistencije izolata poreklom od svinja na trimetoprim, hloramfenikol i sulfonamid. Rezultati njihove studije su utvrdili

postojanje klase 1 integrona sa dve genske kasete, jedna koja kodira rezistenciju na sulfonamide i druga koja kodira rezistenciju na trimetoprim. Na većini izolata geni za rezistenciju su se nalazili na konjugativnom plazmidu, sem u slučaju jednog izolata gde su ovi geni bili smešteni na bakterijskom hromozomu. Dodatno, smanjena osetljivost na β -laktamske i cefalosporinske antibiotike usled produkcije β -laktamaza i smanjene propustljivosti membrane za cefalosporine detektovana je kod velikog broja *B. bronchiseptica* izolata (Kadlec et al, 2004; Kadlec et al, 2007; Burton et al, 1996). Kadlec i sar. (2007) opisali su efluksom-posredovanu rezistenciju *B. bronchiseptica* sojeva na nalidiksičnu kiselinu usled prisustva FloR ili CmlB1 eksportera, koji pored nalidiksične kiseline mogu da eksportuju i hloramfenikol.

Sekvencioniranje genoma velikog broja faga i bakterija dovelo je značajnog razumevanja uloge faga u širenju gena odgovornih za antibiotiku rezistenciju (ARG, eng. *antibiotic resistance genes*). Nedavne metagenomske studije otkrile su da virusni metagenomi (viromi) miševa tretiranih antibiotikom, sadrže mnogo više ARG-a u odnosu na netretirane kontrolne miševe (Modi et al, 2013). Takođe, veliki broj metagenomskih studija ukazao je na prisustvo i značaj ARG-sličnih gena u viromima aktivnog mulja, koji mogu biti u vezi sa rezistencijom na nekoliko antibiotika uključujući tetraciklin, ampicilin i bleomicin. Do sada je sekvencirano preko hiljadu metgenoma koji su danas dostupni preko javnih platformi (Meyer et al, 2008; Markowitz et al, 2012). Rezultati dobijeni komparacijom 27 metagenomskih sekvenci pomoću MG-RAST platforme ukazali su na prisutnost velikog broja sekvenci tipa MGE (eng. *mobile genetic elements*), uključujući i fage, među mikrobnim zajednicama različitog porekla (Meyer et al, 2008). Rezultati navedenih studija ukazuju na značajnu ulogu faga u širenju antibiotske rezistencije (Balcazar, 2014).

S obzirom da fagi predstavljaju važne vektore koji učestvuju u genetskoj razmeni putem generalizovane ili specijalizovane transdukcije, kao i to da se određeni mobilni genetski elementi mogu naći u genomu faga, ali i da proteini samih faga mogu doprineti rezistenciji bakterije, u ovom radu je analiziran antibiogram neinficiranih i fagima inficiranih sojeva. Kada je u pitanju transdukcija, važno je naglasiti da je generalizovana transdukcija zabeležena kako kod litičkih, tako i kod umerenih faga, dok je specijalizovana transdukcija karakteristična samo za umerene fage (Balcazar, 2014). Ne treba izgubiti iz vida činjenicu da mehanizam pakovanja DNK faga je u

vezi sa tipom transdukcije. Naime, fagi čiji genomi poseduju lepljive *cos* krajeve učestvuju u specijalizovanoj transdukciji, dok fagi koji poseduju *pac* mesto i *headfull* mehanizam pakovanja DNK učestvuju u generalizovanoj transdukciji (Casjens i Glicrease, 2009). Pored toga, važno je istaći da je specijalizovana transdukcija u tesnoj vezi sa fenomenom lizogene konverzije. S obzirom da *B. bronchiseptica* fagi poseduju *pac* mesto i *headfull* mehanizam pakovanja DNK, postoji mogućnost da ovi fagi učestvuju u generalizovanoj transdukciji bakterije i to putem prenosa gena sa referentnog soja *B. bronchiseptica* ATCC 10580 na druge sojeve osetljive na ove fage. Naime, kao što je ranije naglašeno, pojedini umereni fagi mogu da indukuju promene u bakterijskom fenotipu, najčešće povećavajući njen fitness, putem procesa koji se naziva lizogena konverzija (Brabban i Callaway, 2005).

Rezultati analize antibiograma fagom inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva, korišćenjem disk-difuzione metode ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika za četiri antibiotika: amoksicilin/klavulanska kiselina, ceftazidim, doksiciklin i sulfametaksazol/trimetoprim. Naime, statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između inficiranog (ATC10580/LK3) i neinficiranog (ATCC 10580) soja utvrđena je u osetljivosti na amoksicilin/klavulansku kiselinu, doksiciklin i trimetoprim/sulfametaksazol, dok je razlika između inficiranog (Bbchiot/LK3) i neinficiranog (Bbchiota) bila statistički značajna jedino u slučaju osetljivosti na amoksicilin/klavulansku kiselinu i ceftazidim. S obzirom na to da su rezultati MIC-a potvrdili razlike u rezistenciji na amoksicilin/klavulansku kiselinu (u slučaju referentnog soja ATCC 10580) i ceftazidim (u slučaju Bbchiot soja) i s obzirom na to da inficirani sojevi pokazuju intermedijarnu osetljivost na navedene antibiotike u odnosu na osetljive neinficirane, jasno je da *B. bronchiseptica* fagi iz familije *Siphoviridae* doprinose bakterijskoj rezistenciji na antibiotike i to najverovatnije preko efluksnih pumpi i promene propustljivosti ćelije. Rezultati drugih autora takođe ukazuju na značajnu ulogu faga u antibiotskoj rezistenciji. Naime, kod faga izolovanih iz otpadnih voda i reka otkriveno je real-time PCR metodom prisustvo dva gena (*bla_{TEM}* i *bla_{CTX-M}*), koji kodiraju β -laktamaze i jednog gena (*mecA*), koji kodira penicilin-vezujući protein (Parsley et al, 2010). U drugoj studiji koju su sproveli Marti i sar. (2014), qPCR esejom virusne i bakterijske frakcije poreklom iz prirodne sredine potvrđeno je prisustvo visokih koncentracija gena odgovornih za rezistenciju na β -laktamske antibiotike (*bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* i

bla_{SHV}) i antibiotike iz grupe fluorohinolona (*qnrA*, *qnrB* i *qnrS*) u gradskim i bolničkim otpadnim vodama. Ovi autori su utvrdili i da gradske otpadne vode tretirane helirajućim agensima, kao što je EDTA ili natrijum-citrat, pokazuju značajno povećanje kopija ARG u DNK sekvencama faga u odnosu na netretirane uzorke (Colomer-Lluch et al, 2014).

Konačno, postojanje značajnih razlika u antibiogramu između inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva, kao i prisustvo proteina koji su uvezi sa rezistencijom na antibiotike, jasno ukazuje na moguću ulogu faga u antibiotskoj rezistenciji ove bakterije. Dalja ispitivanja bi trebalo usmeriti na mehanizam rezistencije i definisanje gena odgovornih za ovaj fenomen.

6.15. POKRETLJIVOST PILIMA I FLAGELAMA, PRODUKCIJA FIMBRIJA I LIKVEFAKCIJA ŽELATINA INFICIRANIH I NEINFICIRANIH *B. bronchiseptica* SOJEVA

Pokretljivost je u tesnoj vezi sa hemotaksijama, odnosno sposobnošću bakterije da se orijentiše duž gradijenta nekog hemijskog agensa (Josehans i Suerbaum, 2001). Kombinovana pokretljivost i hemotaksije omogućavaju bakteriji detekciju i iskorišćavanje nutrijenta, kao i mogućnost kolonizacije novih niša. Postoje nekoliko tipova kretanja kod bakterija, od kojih se najčešće sreću kretanje pomoću flagella, trzajuće i klizeće kretanje (Conard et al, 2012). Bradley (1980) je prvi opisao trzajuće kretanje kod bakterija čija pokretačka sila je retrakcija pila. Ovaj naučnik je pokazao da je retrakcija pila neophodna, kako za infektivnost nekih faga, tako i za trzajuće kretanje bakterije. Postoji nekoliko tipova pila od kojih su najvažniji pili tipa IV i fimbrije. Jedna od najvažnijih uloga ovih pila je adhezija i kolonizacija bakterija za površinu i uloga u maturaciji biofilma.

Rezultati pokretljivosti pilima na 37 °C dobijeni u ovoj studiji ukazuju na smanjenu pokretljivost kod dva inficirana soja, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3. S obzirom da pili predstavljaju receptore za Yua-slične viruse sa kojima, kao što je ranije navedeno, *B. bronchiseptica* fagi dele veliki procenat sličnosti, smanjena produkcija pila koja je zabeležena kod inficiranih sojeva može se objasniti zaštitom profaga od infekcije drugim fagima, tj. superinfekcije. Isključivanje superinfekcije predstavlja jedan od glavnih mehanizama gde postojeći profagi blokiraju infekciju

drugim fagom. Isključivanje superinfekcije može biti posredovano represorima faga, ali postoje slučajevi gde su fagi razvili represor nezavisni imuni sistem koji blokira superinfekcije (Hyman i Abedon, 2010). Tako su npr. Heo i sar. (2007) ustanovili da *P. aeruginosa* umereni fagi D3112 i MP22 zahtevaju prisustvo tip IV pila za bakterijsku infekciju, ali i da fag D3112 može da blokira infekciju drugog MP22 faga, dok MP22 fag nije mogao da blokira infekciju D3112 faga. Druga grupa naučnika, Young i sar. (2014) utvrdili su postojanje proteina kodiranog fagima, koji inhibira bakterijsku ATP-azu uključenu u biogenezu i funkciju pila tipa IV. Drugačije rezultate su dobili Karaolis i sar. (1999) koji su dokazali da se $\text{VPI}\phi$ filamentozni fag prenosi između sojeva vrste *Vibrio cholerae* kodirajući pile tipa IV koje mogu predstavljati receptore za druge fage. Razlike u produkciji pila nisu detektovane u slučaju inficiranog i neinficiranog referentnog *B. bronchiseptica* soja ATCC 10580. Ovakve rezultate, tj. odsustvo razlika u produkciji pila između ova dva soja, moguće je objasniti činjenicom da referentni soj formira nestabilne lizogene. Pokazano je da inficirana bakterija (ATCC 10580/LK3) gubi faga već nakon treće subkultivacije. Za izradu ovog eksperimenta korišćen je inficirani ATCC 10580/LK3 soj koji je nekoliko puta presejan što dodatno potvrđuje prethodno iznetu tvrdnju. Pored toga, rezultati produkcije fimbrija dobijeni modifikovanom metodom sa kongo redom kod inficiranih i neinficiranih *B. bronchiseptica* sojeva ukazuju na postojanje razlika između navedenih sojeva. S obzirom da je u slučaju ATCC 10580/CN1 soja zabeležena veća produkcija fimbrija u odnosu na neinficirani soj, a u slučaju Bbr3416/LK3 obrnuto (produkcija je bila veća kod neinficiranog), može se pretpostaviti da je regulacija ekspresije fimbrija regulisana aktivnim lizogenim procesom, tj. isecanjem faga iz bakterijskog genoma u određenim uslovima sredine.

Jedan od najrasprostranjenijih načina kretanja kod bakterija je svakako kretanje pomoću flagela, helikalnih propelera koji se pokreću uz pomoć obrtnih rotacionih motora koji pokreću ćelije (Chen et al, 2011; Jarrell i McBride, 2008). Razlikuju se dva tipa kretanja pomoću flagela-plivajuće kretanje, gde se pojedinačne ćelije kreću kroz tečni ili polutečni medijum i tzv. rojenje, koje predstavlja koordinisano kretanje grupe ćelija kroz polutečni medijum (Gomez-Gomez et al, 2007). Kretanje pomoću flagela predstavlja jedanu od ključnih karakteristika u patogenezi mnogih bakterija, uključujući *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Bordetella spp*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter spp*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Borrelia burgdorferi i *Treponema spp.* (Josenhans and Suerbaum, 2002). Ranije se smatralo da je jedina funkcija flagela kod bakterija omogućavanje pokretljivosti. Međutim, mnogobrojne studije su dokazale da flagele igraju važnu ulogu u mnogim procesima infekcije, kao što su adhezija, kolonizacija, formiranje biofilma i modulacija imunog sistema domaćina (Duan et al., 2013). Rezultati pokretljivosti flagela na 37 °C dobijenih u ovom radu ukazali su da se jedino u slučaju inficirang soja Bbchiot/LK3 pokretljivost bakterije značajno povećava. Uzimajući u obzir ranije obrazložene rezultate produkcije biofilma kod inficiranih sojeva, kao i činjenicu da su flagele neophodne u inicijalnoj fazi formiranja biofilma vrste *B. bronchiseptica* (Nicholson et al, 2012), jasno je da kod nekih sojeva *B. bronchiseptica* fagi doprinose boljem formiranju biofilma povećavajući pokretljivost bakterija, tj. njihovih flagela. Najveća produkcija biofilma detektovana u slučaju Bbchiot/LK3 najverovatnije je posledica i pojačane ekspresije ili pokretljivosti postojećih flagela kod ovog soja. Nekolicina drugih studija takođe je ukazala na uticaj faga na sintezu i funkciju flagela kod pokretnih bakterija. Su i sar. (2009) su pokazali da lizogena konverzija vrste *E. coli* fagom Stx2 povećava pokretljivost inficirane bakterije. Ovi autori su dokazali povećanu transkripciju nekoliko gena koji učestvuju u sintezi flagela kod sojeva inficiranih fagima, ukazujući da takve ćelije sintetišu više flagela u odnosu na neinficirane ćelije. Druga grupa autora, Chao i sar. (2014,) utvrdili su da filamentozni fag f327 vrste *Pseudoalteromonas* izolovane iz Arktičkog mora, dovodi do smanjenja rasta i tolerancije bakterije na natrijum-hlorid i vodonik-peroksid s jedne, i povećanja pokretljivosti flagelama i hemotaksija s druge strane. Jian i sar. (2013) su dokazali suprotan efekat filamentoznog bakteriofaga SW3 na pokretljivost soja WP3 vrste *Shewanella piezotolerans*. Naime, isecanje faga iz bakterijske DNK proizvodi pojačanu ekspresiju gena koji kodiraju lateralne flagele i pojačano rojenje na polutečnoj podlozi na 4 °C. Ne treba izgubiti iz vida činjenicu da je je pokretljivost kod *B. bronchiseptica* regulisana BvgAS transdukcionim sistemom, kao i to da je pojačana pokretljivost inficiranog Bbchiot/LK3 soja zabeležena na 37°C, pod uslovim u kojima se inače ekspirira Bvg+ fenotip što ukazuje na moguću ulogu faga u modulaciji Bvg fenotipa. Pojačana pokretljivost koja je detektovana kod inficiranog *B. bronchiseptica* Bbchiot/LK3 soja u Bvg+ virulentnoj fazi ukazuje na značaj faga u formiranju biofilma/uspostavljanju infekcije, odnosno adheziji i kolonizaciji abiotičkih i biotičkih površina (Nicholson et al, 2012).

Konačno, rezultati ovog rada ukazuju na moguću umešanost faga u pokretljivost, ekspresiju Bvg fenotipa, a posredno i formiranje biofilma vrste *B. bronchiseptica*, adheziju i kolonizaciju. Pored toga, utvrđeno je da nakon infekcije fagima dolazi do smanjenja broja receptora, tj. pila na površini ćelije, najverovatnije u cilju sprečavanja superinfekcije drugim sličnim fagima.

6.16. MOGUĆNOST PRIMENE FAGA FAMILIJE *Siphoviridae* KAO ANTI - *B. bronchiseptica* AGENASA

Na osnovu rezultata litičkog spektra, efikasnosti formiranja plaka na alternativnim homolognim domaćinima, litičke efikasnosti i efekta faga na biofilm jasno je *B. bronchiseptica* fagi poseduju dobar antimikrobni potencijal. Ipak, zbog svoje umerene prirode nisu preporučljivi za primenu u terapiske svrhe, zbog čega je važno ispitati mogućnosti primene njihovih endolizina u *B. bronchiseptica* kontroli.

6.16.1. INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE

Još ranih 20-ih godina prošlog veka, naučnici su ukazali na potencijal primene bakteriofaga u biokontroli patogenih bakterija, pre svega zbog njihove uske specifičnosti za određene bakterije, ali i efikasnog uklanjanja bakterija rezistentih na konvencionalne antimikrone agense (Thomas et al, 2002; Zhang et al, 2010). Pored toga, bakteriofagi predstvaljaju samoreplikujuće mikroorganizme čija je brojnost u nekom sistemu održiva u funkciji vremena, što omogućava kontinuiranu inhibiciju rasta bakterije (Mizoguchi et al, 2003). Iako postoji veliki broj studija koje pokazuju efikasnost faga u kontroli patogenih bakterija, terapija fagima se u velikom delu sveta još uvek ne primenjuje, a razlozi za to su mnogobrojni i odnose se pre svega na nedovoljna saznanja vezana za biologiju faga (Chan et al, 2012; Viazis et al, 2011; Merril et al, 1996; Eaton i Bayne-Jones, 1934). Zbog toga je potrebno identifikovati uslove u kojima je moguća njihova najuspešnija primena.

B. bronchiseptica fagi su se pokazali veoma efikasnim u inhibiciji bakterijskog rasta. Od ukupno pet ispitivanih faga, bakteriofag MW2 pokazao je najbolji efekat u inhibiciji i kontroli rasta referentnog *B. bronchiseptica* ATCC 10580, s obzirom da je inhibirao bakterijski rast za čak 99,7 %. Rezultati nisu iznenađujući, s obzirom da je poznato da fagi izolovani iz otpadnih voda, kao što je to slučaj sa MW2 fagom, pokazuju širok litički spektar i specifičnost i infektivnost za određene bakterije (Hantula et al, 1991; Jensen et al, 1998; Khan et al, 2002). Uzimajući u obzir činjenicu da na efikasnost terapije fagima mogu uticati različiti faktori, pre svega multilicitet infekcije (MOI) (Abedon, 2009), u ovoj studiji je ispitivana litička efikasnost *B. bronchiseptica* faga primenom nekoliko različitih MOI-a (0,0001-10) kako bi se utvrdilo pri kojim vrednostima MOI-a se postiže najbolji efekat faga u inhibiciji ove bakterije. Svi ispitivani fagi su pokazali najbolju litičku efikasnost pri MOI 1, ali nijedan fag nije pokazao apsolutnu inhibiciju rasta, što ukazuje na moguću integraciju faga u bakterijski genom (Broussard et al, 2013). Međutim, za postizanje uspešnog terapijskog efekta fagima Abedon (2009) i Jin i saradnici (2012) smatraju da je MOI 10 najbolji. Slično su ustanovili i Knezevic i sar. (2011), koji su pokazali da *P. aeruginosa* specifični fagi poseduju veoma dobru sposobnost inhibicije bakterijskog rasta pri vrednostima MOI-a 1 i 10, pri čemu je najbolju litičku efikasnost pokazao δ fag koji je redukovao čak 95% bakterijskog rasta. Ovi autori su preporučili da se litička efikasnost faga procenjuje pri MOI 10. Značajno je spomenuti i rezultate koje su dobili Silankorva i sar. (2011) proučavajući *in vitro* inhibiciju rasta i efikasnost lize specifičnih *E. coli* faga u statičkim i dinamičkim uslovima (uz konstantno mešanje). Ovi autori su utvrdili da su rezultati inhibicije rasta nakon 2 h tretmana fagima bili veoma slični u slučaju MOI 0,1 i 1, s obzirom da su obe koncentracije faga pokazale sličan procenat redukcije bakterijskog rasta (45%). Oni su takođe utvrdili da T1 fag bolje inficira *E. coli* prilikom konstantnog mešanja bakterijske kulture i faga, ističući da je razlog tome najverovatnije bolji kontakt koji se uspostavlja između faga i ćelija usled mešanja. Druga grupa autora (Golding, 2011; Zeng et al, 2010) je ukazala na poseban značaj MOI-a na terapijski ishod u slučaju primene umerenih faga u kontroli bakterija. Na najpoznatijem primeru lambda faga, utvrđeno je da ograničene hranljive materije i niske temperature favorizuju ulazak faga u lizogeni ciklus (Arkin et al, 1998). Pored toga, poznato je da aktivnost integraze faga direktno zavisi od koncentracije ćelijskih proteaza i MOI vrednosti: niske koncentracije proteaza i/ili

visoke vrednosti MOI pojačavaju aktivnost integraze čime se favorizuje ulazak faga u lizogeni cklus. U suprotnom, tj. pri niskim MOI vrednostima, aktivnost integraze je svedena na minimum zbog čega ne dolazi do integracije faga u genom bakterije, nego fagi ulaze u litički ciklus (Broussard et al, 2013). Uzimajući u obzir činjenicu da su *B. bronchiseptica* umereni sifovirusi, kao i lambda, manja litička efikasnost koja je zabeležena pri većim MOI vrednostima (MOI 10), najverovatnije je posledica integracije faga u genom domaćina i ulazak u lizogeni ciklus.

Uzimajući u obzir rezultate litičkog spektra, efikasnosti formiranja plaka na alternativnim homolognim domaćinima i litičke efikasnosti, jasno je *B. bronchiseptica* fagi poseduju dobar antimikrobni potencijal. Ipak, ovi fagi su umereni, zbog čega nisu preporučljivi za primenu bez prethodne genetičke manipulacije (npr. uklanjanje integraze, represora i drugih gena) ili dobijanja spontanih obligatno litičkih mutanata. Pored toga, u budućim istraživanjima potrebno je proučiti mogućnost primene njihovih endolizina u kontroli *B. bronchiseptica* infekcije.

6.16.2. EFEKAT FAGA NA *B. bronchiseptica* BIOFILM

Biofilmovi, kompleksne bakterijske zajednice bakterija, predstavljaju rezervoar infekcije i kontaminacije u vodi za piće, na medicinskim uređajima i u postrojenjima za proizvodnju hrane (Kolter i Greenberg, 2006; Richards i Melander, 2009). Tradicionalne fizičko/hemijske metode kao što su ispiranje, hlorisanje vode i UV dezinfekcija koriste se u kontroli i uklanjanju biofilmova. Međutim, ove metode su često neefikasne, a razlog tome je razvijanje rezistencije bakterija unutar biofilma na tradicionalne dezinficijense (Srinivasan et al, 2008) i konvencionalne antimikrobne agense (Ito et al, 2009). Novije metode, kao što su inhibicija kvorum senzinga (eng. *quorum sensing*), enzimska disrupcija biofilma i kombinovana upotreba antibiotika i enzima predstavljaju obećavajuće metode u kontroli i uklanjanju biofilmova (Yeon et al, 2009; Caro et al, 2009; Leroy et al, 2008; Ammons et al, 2011; Mikuniya et al, 2007). Bakteriofagi takođe predstavljaju jedan od pristupa kontrole i uklanjanju formiranog biofilma (Knezevic i Petrovic, 2008; Azeredo and Sutherland, 2008; Harper and Enright, 2011). Zahvaljujući svojim izuzetno malim dimenzijama (nanopartikule), bakteriofagi

mogü da penetriraju unutar biofilma i inficiraju bakterije ili da proizvode enzime za degradaciju egzopolisaharida (EPS), koji čine zaštitni matriks biofilma (Donlan, 2009; Hanlon et al, 2001). Posebno su interesantni fagi izolovani iz otpadnih voda, koji su se u kombinaciji sa drugim fagima pokazali efikasnim u prevenciji i suzbijanju biofilma na površinama katetera i drugih medicinskih uređaja (Fu et al, 2010).

Rezultati inhibicije formiranja biofilma dobijeni u ovom radu ukazuju da *B. bronchiseptica* fagi inhibiraju formiranje biofilma u relativno visokom procentu. U zavisnosti od multipliciteta infekcije, procenat inhibicije formiranja biofilma kretao se od 60 % do preko 90 %. S obzirom da je ranije dokazano da lizogena konverzija *B. bronchiseptica* LK3 fagom dovodi do povećanja formiranja biofilma, visok procenat inhibicije formiranja biofilma zabeležen u ovom eksperimentu verovatno rezultat lize ćelije od strane faga, pre nego integracije faga u bakterijski genom. Ne treba izgubiti iz vida činjenice da je sposobnost inhibicije formiranja biofilma ispitana samo na referentnom soju, koji formira nestabilne lizogene, kao i to da je efekat faga na formiranje biofilma ispitivan nakon 24 h, dok je produkcija biofilma kod inficiranih ćelija očitavana nakon 48 h (Conover et al, 2011), kada *B. bronchiseptica* formira zreo biofilm, što može objasniti razlike u rezultatima. Rezultati inhibicije formiranja biofilma su u skladu sa rezultatima inhibicije rasta bakterije. Naime, najveća inhibicija formiranja biofilma zabeležena je, kao i u slučaju inhibicije rasta bakterije, pri multiplicitetu 1 (MOI 1), a s obzirom da apsolutna inhibicija formiranja biofilma nije zabeležena, može se pretpostaviti da je razlog tome integracija faga u bakterijski genom. Slično su ustanovili Knezevic i sar. (2011) koji su utvrdili da *P. aeruginosa* specifični fagi inhibiraju biofilm ove vrste u relativno visokom procentu. Ovi autori su takođe istakli potencijal δ faga u kontroli biofilma *P. aeruginosa*, s obzirom da je kod ovog faga zabeležen visok procenat inhibicije biofilma (>95%). Interesantno je primetiti da su *B. bronchiseptica* fagi pokazali nešto manji procenat inhibicije formiranja biofilma (70-80%) pri najvećoj ispitivanoj vrednosti MOI (10), što ukazuje na moguću integraciju faga u bakterijski genom i ulazak u lizogeni ciklus u slučaju viših vrednosti MOI-a.

Rezultati redukcije formiranog biofilma od strane *B. bronchiseptica* faga su nešto drugačiji. Naime, dobijeni rezultati ukazuju da fagi ispoljavaju slabiji efekat na već formirani biofilm u odnosu na biofilm koji je u procesu formiranja. Interesantno je da je najveća

efikasnost u uklanjanju formiranog biofilma zabeležena kod LK3 faga i to pri malim vrednostima MOI-a (0,0001-0,1). Smanjeni procenat redukcije formiranog biofilma od strane faga može se objasniti činjenicom da sam biofilm po sebi predstavlja kompleksnu strukturnu zajednicu u kojoj ekspresija gena, pa samim tim i receptora za fage, kvantitativno i kvalitativno različita u odnosu na ekspresiju kod planktonskih ćelija (Sutherland et al, 2004). Važna je i činjenica da su bakterije u biofilmu manje metabolički aktivne i da se nakon infekcije fagi pre integrišu u genom bakterije, nego što vrše njenu lizu. Takođe, ćelije u biofilmu su zaštićene matriksom, a u genomu faga nisu detektovani geni koji kodiraju enzime za njihovu razgradnju. Kao što je ranije naglašeno, Irie i sar. (2004) su ukazali na značaj pila u inicijalnim fazama formiranja biofilma, iako sam mehanizam njihovog delovanja do sada nije objasnjen. S obzirom da *B. bronchiseptica* fagi pokazuju veliki procenat DNK sličnosti sa *Pseudomonas* fagom Yua, čiji receptori su bakterijski pili (Ceysens et al, 2007), najverovatnije je da i *B. bronchiseptica* fagi takođe koriste ove površinske strukture u procesu adhezije za domaćina. Uzimajući u obzir činjenicu da su pili značajni samo u inicijalnim fazama formiranja biofilma, jasno je da je smanjena efikasnost faga u redukciji formiranog biofilma najverovatnije posledica smanjene ekspresije pila u kasnijim fazama formiranja biofilma. Bez obzira na manju efikasnost faga koja je detektovana u redukciji biofilma u odnosu na procenat inhibicije formiranja biofilma, *B. bronchiseptica* fagi generalno pokazuju zadovoljavajući efekat kada je u pitanju prevencija i kontrola rasta biofilma. Važno je napomenuti da na rezultate inhibicije i redukcije formiranog biofilma može uticati dužina inkubacije bakterije. Naime, dobro je poznato da eDNK (ekstracelularna DNK) predstavlja važnu komponentu matriksa biofilma mnogih vrsta bakterija, koja vrši različite funkcije, među kojima je najvažnija održavanje stabilnosti zrelog biofilma (Karatan i Watnick, 2009). Kada je u pitanju produkcija eDNK u biofilmu vrste *B. bronchiseptica*, Conover i sar. (2011) su utvrdili da je produkcija eDNK u biofilmu ove vrste zabeležena tek nakon 48 h inkubacije. Ova činjenica može objasniti relativno visok procenat inhibicije i redukcije biofilma koji je detektovan u ovom radu, s obzirom da je dužina inkubacije bakterije u oba slučaja bila 24 h, a ne 48 h, kada dolazi do produkcije eDNK.

Korišćeni fagi su umereni, što ih sa aspekta terapije čini nepoželjnim. U cilju poboljšanja efikasnosti faga u redukciji biofilma moguće je genetičkim manipulacijama ukloniti gene

odgovorne za integraciju faga u bakterijski genom i lizogenu konverziju bakterije. Takođe, insercijama u genom faga moguće je integrisati gene od značaja, kao što su depolimeraze koje razgrađuju EPS u bakterijskom biofilmu. S tim u vezi, Lu i Collins (2007) su genetički modifikovali specifičan *E. coli* T7 fag, zahvaljujući čemu je ovaj fag dobio sposobnost produkcije enzima depolimeraze i time je pojačana njegova efikasnost u uklanjanju biofilma. Druga grupa naučnika, Zhang i sar. (2013) modifikovali su umereni pE11 *Enterococcus faecalis* fag delecijom modula koji je sadržao gene za lizogeni ciklus, pri čemu fag nije izgubio sposobnost da inficira bakteriju. Značajno je spomenuti i mogućnost primene faga kao vektora u prenošenju specifičnih enzima, kao što su funkcionalne DNK nukleaze. Ovi enzimi predstavljaju deo CRISPR-Cas sistema (eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), koji kad se prenesu u genom bakterija rezistentnih na antibiotike dovode do gubitka rezistencije, pa samim tim i zaustavljanja transfera gena za rezistenciju između bakterija. Ovako genetski modifikovane bakterije postaju osetljive na antibiotike (Kiro et al, 2014; Yosef et al, 2015). CRISPR sistem ili grupisani regulatorni kratki palindromski ponovci i CRISPR proteini predstavljaju imuni ili zaštitni sistem prokariota protiv napada faga i nepoželjnih replikacija plazmida usled ulaska strane DNK ili RNK. Ovaj obećavajući sistem selektuje nukleinsku kiselinu na osnovu kratkih DNK sekvenci (spejsera), koji postoje između ponovaka u CRISPR sistemu. Transkribovani spejseri vode Cas protein do homolognih sekvenci unutar strane nukleinske kiseline (protospejsera), koji se potom cepaju i dolazi do gubitka funkcije proteina. U budućim istraživanjima važno je ispitivanje mogućnosti kombinovane upotrebe CRISPR-cas sistema i faga u antimikrobnoj terapiji.

Uzimajući u obzir iznete činjenice, evidentno je da *B. bronchiseptica* bakteriofagi pokazuju zadovoljavajući antibakterijski potencijal, koji bi uz odgovarajuće genetičke modifikacije mogao biti iskorišćen kako u prevenciji, tako i u kontroli formiranog *B. bronchiseptica* biofilma.

6.16.3. *In silico* KARAKTERIZACIJA ENDOLIZINA

Prilikom infekcije bakterija, bakteriofagi moraju dva puta da prođu peptidoglikansku (PG) barijeru: prilikom ulaska u ćeliju tokom infekcije i prilikom izlaska novosintetisanih viriona iz ćelije. U prvom slučaju dolazi do lokalne disrupcije PG od strane lizina koji se nalaze u sastavu

viriona, kako bi se omogućio ulazak nukleinske kiseline u bakteriju. Endolizini su enzimi bakteriofaga koji se sintetišu na kraju replikacionog ciklusa. Oni omogućavaju oslobađanje novoformiranih viriona putem procesa lize ćelijskog zida bakterije (Borysowski et al, 2006). Bez obzira na činjenicu što su površinski lizini faga (u daljem tekstu lizini), pokazali veći stepen termorezistencije i jonsku snagu, brojnim studijama je potvrđeno da endolizini poseduju mnogo veći litički i antimikrobni potencijal (Rodríguez-Rubio et al, 2013). Tako npr. endolizin *Pseudomonas* φKZ faga pokazuje i do osam puta veću aktivnost u odnosu na lizin istog faga (Briers et al, 2007; Briers et al, 2008).

S obzirom da se sekvence endolizina litičkih, ali i umerenih faga i profaga mogu koristiti kao izvor endolizina (Briers et al, 2015), u ovom radu je izvršena parcijalna *in silico* karakterizacija endolizina umerenih *B. bronchiseptica* faga iz familije *Siphoviridae* u cilju razmatranja njegove moguće primene u kontroli bakterija. U literaturi postoje brojni primeri endolizina umerenih faga, koji su pokazali dobru antibakterijsku aktivnost. Tako npr. endolizin umerenog *Lactobacillus helveticus* φ-0303 faga ima širok litički spektar i efikasno ubija različite vrste bakterija, prvenstveno termofilne laktobacile, pediokoke, *Bacillus subtilis* i *Brevibacterium linens* (Deutsch et al, 2004). Značajno je spomenuti i rezultate koje su dobili Lim i sar. (2014) proučavajući aktivnost endolizina umerenog *Salmonella* SPN9CC faga. Ovi autori su ukazali da endolizin poseduje dobru aktivnost i može da redukuje intaktne ćelije *E. coli* za 2 logaritma tokom 1 h inkubacije pri koncentraciji od 300 µg/ml. Druga grupa autora, Wang i sar. (2008) ispitivali su mogućnost primene endolizina Lyb5, *Lactobacillus fermentum* umerenog faga uPYB5 u terapeutske svrhe. Lyb5 endolizin produkovan u *E. coli* je pokazao širok litički spektar protiv Gram pozitivnih bakterija uključujući *Staphylococcus aureus*, kao i Gram negativnih sojeva *Salmonella* Typhi, čime su ukazali na mogućnost primene endolizina faga koji inficiraju Gram negativne bakterije kao antimikrobnih agenasa.

U prošloj deceniji, nekoliko endolizina faga koji inficiraju Gram pozitivne bakterije je okarakterisano, a njihova primena u kontroli *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus* i *Bacillus anthracis* infekcija se pokazala veoma uspešnom (Loeffler et al, 2001; Nelson et al, 2001; Schmelcher et al, 2012; Schuch et al, 2002). S obzirom da je *B. bronchiseptica* Gram negativna bakterija, ne treba izgubiti iz vida činjenicu da je glavna prepreka u primeni endolizina u kontroli

Gram negativnih bakterija njihova spoljašnja membrana. Ova bakterijska struktura je nepropusna barijera za mnogo manje hidrofилne molekule od endolizina, štiteći pri tom PG sloj od litičke aktivnosti ovih enzima. Ipak, PG Gram negativnih bakterija je mnogo tanji u odnosu na PG Gram pozitivnih bakterija i ako endolizini prođu spoljašnju membranu, manje koncentracije endolizina bi uspešno izvršile degradaciju PG-a. Jedni od prvih koji su uspešno prevazišli ovu prepreku bili su Gerstmans i sar. koji su 2016. godine patentirali Artilizin, proteinski-modifikovan endolizin, koji prolazi kroz spoljašnju membranu i ubija ćelije putem degradacije PG i dovodi do bakterijske lize. Ovi autori su bili prvi koji su pokazali da je efikasnost ubijanja Gram negativnih bakterija putem endolizina jednako uspešna onoj koja je zabeležena u slučaju endolizina Gram pozitivnih bakterija.

Bez obzira na njihovu visoko konzervativnu biološku funkciju, endolizini pokazuju varijabilnost, kada je u pitanju struktura, katalitička specifičnost i litički potencijal (Callewaert et al, 2011). Oni mogu imati globularnu ili modularnu strukturu, s tim da većina endolizina faga koji inficiraju Gram negativne bakterije poseduje globularnu strukturu sa transglikolazno-muralitičkom aktivnošću (Fishetti, 2010; Walmagh et al, 2012). Rezultati *in silico* analize dobijeni u ovom radu ukazali su da *B. bronchiseptica* bakteriofagi poseduju upravo takve endolizine, globularne strukture sa transglikolazno-muralitičkom aktivnošću. Pored toga, filogenetskim i komparativnim strukturnim analizama sekvenci endolizina *B. bronchiseptica* bakteriofaga utvrđeno je da endolizini svih testiranih faga poseduju veoma sličnu strukturu, koja se sastoji od jednog katalitički aktivnog domena (EAD- *enzymatically active domain*). Za razliku od globularnih endolizina, koji poseduju samo jedan aktivni domen, modularni endolizini poseduju dva domena- domen koji se vezuje za ćelijski zid (CBD- *cell wall binding domain*) i katalitički domen (EAD) (Schmelcher et al, 2012). Nekada se smatralo da svi endolizini faga koji su specifični za Gram negativne bakterije pokazuju globularnu strukturu. Međutim, nekoliko studija sprovedenih u poslednjih desetak godina ukazalo je da veliki broj faga koji inficiraju Gram negativne bakterije poseduju modularne endolizine. Ovo ukazuje na veliki diverzitet ovih enzima sa istom litičkom aktivnošću (Briers et al. 2007a; Payne and Hatfull 2012; Walmagh et al. 2012). Iako se do nedavno smatralo da modularni enzimi ispoljavaju bolju enzimsku aktivnost u odnosu na globularne, pre svega zbog prisustva dodatnog PG vezujućeg domena koji drži enzim

u neposrednoj blizini PG-a, Oliveira i sar. su u svojoj studiji iz 2016. godine dokazali da globularni endolizin Abgp46 izolovan iz *Acinetobacter baumannii* faga vB_AbaP_CEB1 iz familije *Podoviridae*, ispoljava visoku antibakterijsku aktivnost. Ovaj endolizin pokazuje antibakterijsku aktivnost na različitim vrstama Gram negativnih bakterija, te autori ove studije preporučuju njegovo korišćenje u humanoj i veterinarskoj medicini.

Analizom sekvenci *B. bronchiseptica* endolizina utvrđeno je postojanje signalne peptidne sekvence u sekvencama endolizina odabranih faga. Smatra se da je uloga ove signalne sekvence u holin–nezavisnom eksportu endolizina. S obzirom da je u genomu *B. bronchiseptica* faga detektovana sekvenca koja kodira holin, tačna funkcija ovog proteina za sada nije utvrđena. Jedna od pretpostavki je da postojeći holin doprinosi litičkom procesu na taj način što ubrzava sam proces lize i pojačava litički efekat (Briers et al, 2011). U literaturi su dostupni podaci svega nekoliko endolizina iz reda *Caudovirales* u kojima je detektovana signalna peptidna sekvenca (Loessner et al, 1997; Sao-Jose et al, 2000). Tako npr. signalna peptidna sekvenca je prisutna u slučaju endolizina faga vrste *Oenococcus oeni* i *Lactobacillus plantarum* faga Øg1e (Sao-Jose et al, 2001; Kakikaw et al, 2000). Endolizin ovih faga zahteva funkcije bakterijskog sekretornog sistema (*Sec* translokona) u cilju eksporta do PG-a. Posebno je interesantan slučaj sa endolizinom *E. coli* faga P1, koji poseduje N-terminalnu SAR (eng. *signal arrest release*) sekvencu. Ovim signalom, enzim se eksportuje do membrane gde najpre biva zarobljen i potom procesuiran putem disulfidne izomerizacije, dok holin ovog faga služi kao okidač i aktivator enzima u membrani (Xu et al, 2005).

Rezultati filogenetske analize, kao i sličnosti u DNK sekvenci, pokazali su da endolizini *B. bronchiseptica* faga (CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1) pokazuju najveću sličnost sa endolizinom Yua faga ($E < 1e-147$). S obzirom da dele veliki procenat sličnosti u DNK sekvenci sa Yua fagom, nije iznenađujuće što je struktura endolizina *B. bronchiseptica* faga dobijena *in silico* analizom veoma slična opisanoj strukturi endolizina Yua faga (Ceyssens et al, 2007). Rezultati analize litičke kasete *B. bronchiseptica* faga ukazuju na postojanje četiri preklapajuća gena koji kodiraju endolizin, holin i dve subjedinice spanina (Rz i Rz1). Ovakva struktura litičke kasete je karakteristična za lambda, P22 fage i srodnog B3 faga (Young et al, 2000). Genomska lokacija litičke kasete *B. bronchiseptica* faga nalazi se između gena koji kodiraju proteine glave i onih koji

kodiraju proteine repa. Poređenjem gena litičke kasete lambda faga sa genima Yua i *B. bronchiseptica* faga utvrđen je drugačiji raspored gena. Naime, kod *B. bronchiseptica* i Yua faga, geni koji kodiraju spanine (Rz i Rz1) prethode endolizinu i holinu (Zhang i Young, 1999). S obzirom da endolizin Yua faga nije detaljnije okarakterisan, tačan mehanizam delovanja proteina uključenih u proces lize kod ovih faga ostaje nepoznat.

S obzirom da se dosadašnja primena endolizina faga Gram negativnih bakterija pokazala uspešnom, neophodna je dalja karakterizacija endolizina *B. bronchiseptica* faga koja pre svega podrazumeva *in vitro*, a zatim i *in vivo* ispitivanje antimikrobnog potencijala endolizina. Ne treba izgubiti iz vida činjenicu da izuzetno male razlike u sekvencama endolizina mogu uzrokovati velike razlike u litičkoj aktivnosti istih (Briers et al, 2007). S obzirom na detektovane razlike u primarnoj strukturi endolizina pet *B. bronchiseptica* faga, potrebna su dalja istraživanja, kako bi se utvrdilo koji od njih poseduje najbolji anti-*Bordetella bronchiseptica* efekat.

7. ZAKLJUČCI

U ovom radu je primenom referentnog *B. bronchiseptica* ATCC 10580 soja kao domaćina izolovano ukupno 29 *B. bronchiseptica* specifičnih faga iz 66 uzoraka voda različitog porekla. Izolacija je bila najuspešnija pre svega iz komunalnih otpadnih voda, ribnjaka, voda poreklom iz jezera, močvara, potoka i irigacionih kanala, dok je najmanji broj pozitivnih uzoraka zabeležen iz životinjskih pojila. Ni jedan bakteriofag nije izolovan iz otpadnih voda svinjarskih farmi. S obzirom na to da su *B. bronchiseptica* fagi po prvi put izolovani iz površinskih voda i da je njihovo poreklo višestruko potvrđeno klasičnim i molekularno-biološkim metodama (termičkom obradom uzorka, PCR i RFLP metodom), jasno je da su fagi specifični za ovu vrstu prisutni u spoljašnjoj sredini. Na osnovu dobijenih rezultata i u skladu sa postavljenim ciljevima mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Litički spektar faga na homolognim domaćinima je bio uzak i umeren, s obzirom na to da su fagi inficirali 3 do 5 od ukupno 12 sojeva *B. bronchiseptica*. Litički spektar faga se razlikuje na 25 i 37 °C, pri čemu se na prvoj temperaturi razlikuje šest litičkih grupa, a na drugoj tri litičke grupe faga. Širi spektar lize na 25 °C u skladu je sa poreklom faga iz spoljašnje sredine.
2. Efikasnost formiranja plaka (EOP) na homolognim alternativnim domaćinima većine faga je bila niža u odnosu na originalnog domaćina (EOP 0,001 do 0,1). Značajan broj faga je pokazao jednaku EOP na originalnom i dva alternativna domaćina, dok je EOP nekih faga bila veća na alternativnim domaćinima (EOP 10). Fagi su pokazali zadovoljavajuću efikasnost formiranja plaka na osetljivim alternativnim domaćinima.
3. Kriva multiplikacije CN1 faga je ukazala da se svega nekoliko faga oslobodi po jednom ciklusu: duplo više faga se oslobodi na 37 °C (oko 13) u odnosu na 26 °C (oko 6). Razlike u rezultatima se mogu objasniti nepovoljnijim uslovima za rast domaćina na 26 °C, a kriva multiplikacije ukazuje da fagi u eksperimentalnim uslovima ulaze u lizogeni, a ne u litički ciklus.
4. Na osnovu rezultata transmisiona elektronske mikroskopije faga, izolovani *B. bronchiseptica* fagi poseduju relativno uniformne morfološke karakteristike (B2

- morfotip) i svi pripadaju porodici *Siphoviridae*. Rezultati stoga predstavljaju prvu karakterizaciju *B. bronchiseptica* specifičnih faga iz porodice *Siphoviridae*.
5. Restrikcionska digestija genomske DNK faga, ukazala je da su *B. bronchiseptica* fagi u genetičkom smislu relativno slični, a varijacije RFLP profila ukazale su na klonalnu različitost većine ispitivanih faga. Fragmenti dobijeni restrikcionskom digestijom DNK faga, primenom EcoRV enzima, ukazuju na postojanje *pac* mesta u genomu faga i na pakovanje DNK u kapsid "headfull" mehanizmom. S obzirom na to da su fagi sa ovakvim načinom pakovanja DNK odgovorni za generalizovanu transdukciju, ispitivani fagi imaju ograničenu upotrebnu vrednost kao anti- *B. bronchiseptica* agensi.
 6. Sekvence genoma odabranih faga (CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1) potvrdile su sličnost izolata, kao i to da fagi poseduju dvostruku linearnu DNK sa veličinom genoma koja se kreće od 59.779 do 62.030 bp. Procenat zastupljenosti GC parova kretao se između 63,97 % i 64,07 %, dok je broj kodirajućih sekvenci u genomima između 79 i 82. U genomima svih sekvenciranih faga utvrđeno je prisustvo gena koji kodiraju integrazu i represor, što potvrđuje umerenu prirodu ovih faga.
 7. Metodama komparativne genomike utvrđeno je da su *B. bronchiseptica* fagi CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1 međusobno veoma slični na nivou DNK sekvence, ali i da pokazuju značajnu sličnost sa *Pseudomonas* fagima iz roda *Yuavirus*. Na osnovu analiza i utvrđene razlike u DNK sekvencama genoma ovih faga (<95% sličnosti) predlaže se klasifikacija *B. bronchiseptica* faga u rod *Yuavirus*, sa četiri nove vrste: *Bordetella virus LK3* (sa sojevima *Bordetella* fag LK3 i *Bordetella* fag CN1, koji dele 96% genomske sekvence), *Bordetella virus CN2*, *Bordetella virus MW2* i *Bordetella virus FP1*.
 8. PCR metodom utvrđeno je prisustvo genoma faga kako u genomskoj, tako i u plazmidnoj DNK inficiranih bakterija. PCR i RFLP metodom je utvrđeno da LK3 fag *B. bronchiseptica* može da formira relativno stabilne lizogene osetljivih sojeva. Inficirani sojevi Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3 dali su očekivani produkt i nakon šestog

- presejavanja inficiranog soja, dok je lizogeni status ATCC 10580 soja izgubljen nakon drugog presejavanja. Ovi podaci ukazuju na umerenu prirodu bakteriofaga i mogućnost formiranja nestabilnih i stabilnih lizogena, u zavisnosti od inficiranog soja. Dobijeni rezultati su od izuzetne važnosti sa aspekta lizogene konverzije *B. bronchiseptica*.
9. Proteinski profil faga CN1, CN2, LK3 i MW2 je sličan, sa 8 karakterističnih traka i glavnim proteinom kapsida veličine oko 33 kDa. Ovo je još jedna potvrda da su ispitivani fagi veoma srodni. Rezultati su u skladu sa morfologijom i karakteristikama genoma faga, ali i sa proteinskim profilom *Pseudomonas* faga Yua, sa kojima *B. bronchiseptica* fagi dele veliki procenat DNK sličnosti.
 10. *B. bronchiseptica* fagi pokazuju visok stepen otpornosti na nepovoljne uslove sredine. Oni zadržavaju infektivnost pri širokom temperaturnom (4 – 65 °C) i pH opsegu (3-11) u toku 30 minuta. Bakteriofagi CN2 i LK3 ostaju stabilni pri temperaturi pasterizacije (65 °C, 30 min), dok su svi ispitivani fagi (CN2, LK3, MW2 i FP1) pokazali dobru stabilnost pri gotovo svim testiranim pH vrednostima, sa izuzetkom pH 1,5. Ove karakteristike su od izuzetne važnosti sa aspekta temperaturnog tretmana namirnica (pasterizacija) i dezinfekcije sredstvima baziranim na kiselinama, u postrojenjima sa namirnicama poreklom od životinja. S obzirom na to da se u ovim uslovima fagi ne inaktiviraju u potpunosti, omogućeno je širenje virulencije i lizogena konverzija novih domaćina. Bakteriofagi su pokazali visok stepen stabilnosti u veoma širokom opsegu koncentracija NaCl-a (i do 7,5-10 %) i uree (do 7,5 M). S obzirom na visok stepen rezistencije na nepovoljne uslove sredine, ispitivani fagi mogu poslužiti kao model virusi pri ispitivanju virucidnog efekta različitih agenasa.
 11. Analiza proteinskih sekvenci na osnovu genoma LK3 faga, pokazala je da su produkti ORF4, ORF9 i ORF40 slični kolera enterotoksinu ($E=4,8e-21$; $E=1e-13$; $1,3e-130$). Drugi proteini pokazali su sličnost sa odgovarajućim egzotoksinima, što ukazuje na moguću ulogu LK3 faga u hemolizi, citotoksičnosti, metabolizmu lipida vrste *B.*

- bronchiseptica*, kao i ulogu u rezistenciji na antibiotike (ORFs 2, 3, 24, 67, 17, 18, 25, 28, 33, 37, 48, 64, 69, 72, 74 i 77).
12. Značajna razlika u hemolizi ovčijih eritrocita utvrđena je između inficiranog i neinficiranog soja *B. bronchiseptica* ATCC 10580, dok značajna razlika nije uočena u hemolizi goveđih i pacovskih eritrocita. Ovi podaci ukazuju na doprinos faga hemolitičkoj aktivnosti *B. bronchiseptica*.
 13. Utvrđena je statistički značajna razlika u osetljivosti inficiranih i neinficiranih sojeva bakterija na dva antibiotika: veća rezistencija na amoksisilin/klavulansku kiselinu detektovana je kod inficiranog ATCC 10580/LK3 u odnosu na neinficirani ATCC 10580 soj, dok je soj Bbchiot/LK3 pokazao veću rezistenciju na ceftazidim u odnosu na neinficirani soj Bbchiot. Rezultati ukazuju na ulogu faga u antibiotskoj rezistenciji *B. bronchiseptica*, što je na osnovu umerene osetljivosti i sekvence genoma najverovatnije posledica efluksnih sistema kodiranih genomom faga.
 14. Inficirani Bbchiot/LK3 soj je pokazao značajno veću zonu flagelarne pokretljivosti, tj. plivajućeg kretanja, u odnosu na neinficirani Bbchiot soj. S druge strane, pokretljivost pilima bila je manja kod dva inficirana soja (Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) u odnosu na neinficirane. Statistički značajna redukcija kongo-crvenog uočena je kod dva soja: inficirani ATCC 10580/CN2 soj je više redukovao boju u odnosu na neinficirani soj ATCC 10580, dok je suprotan slučaj zabeležen kod neinficiranog Bbr3416 soja, koji je znatno više redukovao boju u odnosu na inficirani soj Bbr3416/LK3. Ovo ukazuje na potencijalnu ulogu faga u procesima pokretljivosti (flagele i pili) i adhezije i kolonizacije (fimbrije).
 15. Bakteriofagi imaju ulogu u povećanju produkcije biofilma vrste *B. bronchiseptica*. Statistički značajano veći potencijal u formiranju biofilma nakon 24 h i 48 h inkubacije pokazale su sve tri inficirane bakterije (ATCC 10580/LK3, Bbchiot/LK3 i Bbr3416/LK3) u odnosu na neinficirane. Takođe, u genomu *B. bronchiseptica* faga detektovan je gen za diguanilat-ciklazu, za koju je prethodno utvrđeno da utiče na formiranje biofilma.

16. Bakteriofagi su pokazali veoma dobru litičku efikasnost na originalnom domaćinu, pri čemu je MW2 fag pokazao najbolju inhibiciju rasta bakterije (inhibirao je 99.7% bakterijskog rasta).
17. Inhibicija formiranja biofilma i efekat faga na formirani biofilm bile su značajne primenom *B. bronchiseptica* faga na originalnom domaćinu. Najbolji efekat na formiranje biofilma pokazao je fag CN2, koji je inhibirao oko 92 % bakterijskog rasta u okviru biofilma, dok je LK3 fag redukovao oko 80 % formiranog biofilma. Najbolja inhibicija rasta bakterije i najbolji efekat faga na formiranje i formirani biofilm zabeležen je pri MOI 1, ali apsolutna inhibicija rasta nije zabeležena. Ovo ukazuje na moguću integraciju faga u genom bakterije i odsustvo lize pri većim vrednostima MOI. Bakteriofagi su pokazali zadovoljavajući antibakterijski potencijal na originalnom domaćinu, najverovatnije zbog nestabilnosti lizogena. Ovo bi moglo biti iskorišćeno kako u prevenciji, tako i u kontroli formiranog *B. bronchiseptica* biofilma, ako bi se fagi genetički modifikovali u cilju sprečavanja integracije u genom.
18. *In silico* parcijalna karakterizacija endolizina pet *B. bronchiseptica* faga (CN1, CN2, LK3, MW2 i FP1) ukazuju da su u pitanju enzimi globularne građe sa transglikolazno-muralitičkom aktivnošću. Takođe, endolizin ispitivanih faga poseduje signalnu peptidnu sekvencu, što ukazuje na holin-nezavisan transport endolizina u procesu lize. Endolizini ispitivanih faga imaju potencijalnu antimikrobnu aktivnost i potrebno ih je dalje ispitati.

Detektovane promene u fenotipu bakterije i nalazi genoma jasno ukazuju na ulogu faga u lizogenoj konverziji bakterije. Dobijeni rezultati su od izuzetnog značaja s obzirom da predstavljaju prve podatke o ulozi faga u patogenosti vrste *B. bronchiseptica*, zbog čega su neophodna dalja istraživanja na ovom polju, a koja se pre svega odnose na mehanizme kojima fagi utiču na bakterijski fenotip. Pored toga, bakteriofagi su takođe pokazali dobru litičku efikasnost i efekat na biofilm na originalnom domaćinu, što ih potencijalno, uz određene genetičke manipulacije, čini dobrim kandidatima u anti-*B. bronchiseptica* kontroli. Ipak,

prisustvo gena za integraciju u bakterijski genom kod faga i prisustvo *pac* mesta koje ukazuje na potencijal faga da vrše generalizovanu transdukciju umanjuje njihovu upotrebnu vrednost. Neophodno je u daljim istraživanjima ispitati antimikrobnu aktivnost endolizina ovih faga u *in vitro* i *in vivo* uslovima, a u zavisnosti od dobijenih rezultata sprovesti i odgovarajuće kliničke studije.

8. LITERATURA

- Ackermann, H. W., Eisenstark, A. (1974) The present state of phage taxonomy. *Intervirology*. 3(4):201-19.
- Ackermann, H. W. (1998) Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales*. *Adv Virus Res.* 51:135-201.
- Ackermann, H. W., DuBow, M. S. (1987) *Viruses of Prokaryotes. Vol. I. General Properties of Bacteriophages.* CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL.
- Ackermann, H. W. Phage classification and characterization. *Methods Mol. Biol.* 501, 127–40 (2009).
- Adams, M. H. (1949) The stability of bacterial viruses in solutions of salts. *J Gen Physiol* 32:579–594.
- Adriaenssens, E. M., Edwards, R., Nash, J. H., 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*. 477:144-54.
- Akerley, B. J., Monack, D. M., Falkow, S., Miller, J. F. (1992) The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 174(3):980-90.
- Akerley, B. J., Cotter, P. A., Miller, J. F. (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell.* 80(4):611-20.
- Al-Jumaili, I., D. A. Burke, S. M. Scotland, H. M. Al-Mardini, and C. O. Record. (1992) A method of enhancing verocytotoxin production by *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 93:121-126.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-10.
- Ashelford, K. E., Fry, J.C., Bailey, M. J., Jeffries, A. R., Day, M.J. (1999) Characterization of six bacteriophages of *Serratia liquefaciens* CP6 isolated from the sugar beet phytosphere *Appl Environ Microbiol.* 65(5):1959-65.
- Atamer, Z., Dietich, J., Müller-Merbach, M., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J. (2008) Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int Dairy J.* 19:228–235.
- Avrani, S., Wurtzel, O., Sharon, I., Sorek, R., Lindell, D. (2011) Genomic island variability facilitates *Prochlorococcus*-virus coexistence. *Nature.* 474:604–608.
- Aziz, R. A., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Elizabeth, M. G., Kubal, M., Meyer, F., Gary, J. O., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A, Zagnitko, O. (2008) The RAST server: rapid annotation using subsystems technology. *BMC Genomics.* 9(75): 1-15.

- Baross, J. A., Liston, J., Morita, R. Y. (1978) Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples Appl Environ Microbiol. 36(3): 492–499.
- Bae, J. Y., Wu, J., Lee, H. J. Jo. E.J., Murugaiyan, S., Chung, E., Lee, S. W. (2012) Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. J Microbiol Biotechnol. 22(12):1613-20.
- Beer, C., Meyer, A, Müller, K., Wirth, M. (2003) The temperature stability of mouse retroviruses depends on the cholesterol levels of viral lipid shell and cellular plasma membrane. Virology. 308(1):137-46.
- Bellalou, J., Ladant, D., Sakamoto, H. (1990) Synthesis and secretion of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase as a 200-kilodalton protein. Infect Immun 58:1195–1200.
- Belen, O., Campos, J. M., Cogen, P. H., Jantausch, B. A. (2003) Postsurgical meningitis caused by *Bordetella bronchiseptica*. Pediatr Infect Dis J 22: 380-381.
- Bemis, D. A., Plotkin, B. J. (1982) Hemagglutination by *Bordetella bronchiseptica*. Journal of Clinical Microbiology 15:1 120- 1127.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol. 16;340(4):783-95.
- Bensing, B. A., C. E. Rubens, P. M. Sullam. (2001) Genetic loci of *Streptococcus mitis* that mediate binding to human platelets. Infect. Immun. 69:1373-1380.
- Bensing, B. A., I. R. Siboo, and P. M. Sullam. (2001) Proteins PblA and PblB of *Streptococcus mitis*, which promote binding to human platelets, are encoded within a lysogenic bacteriophage. Infect. Immun.69:6186-6192.
- Berchieri, A., Lovell, M. A., Barrow, P. A. (1991) The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. Res. Microbiol. 142, 541–549.
- Bergh, O., Børsheim, K. Y., Bratbak, G., Heldal, M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments, Nature. 340(6233):467-8.
- Bertrand, I., Schijven, J. F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T, Muscillo M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A. M., Myrmet, M., Sellwood, J., Cook, N., Gantzer, C. (2012) The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. J Appl Microbiol. 112(6):1059-74.
- Besemer J, Lomdsadze A, Borodovsky M (2001) GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. Nucleic Acids Res 29: 2607-18.

Betsou, F., Sebo, P., Guiso N. (1995) The C-terminal domain is essential for protective activity of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 63, 3309–3315.

Billard-Pomares, S., Fouteau, M.E., Jacquet, D., Roche, V., Barbe, M., Castellanos, i sar. (2014) Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum β -lactamase from an *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58:6550–6557.

Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A. N., Powell, B., Carlton, R., Merril, C. R. (2002) Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* 70, 204–10.

Bishai, W. R., Murphy, J. R. (1988) Bacteriophages gene products that cause human disease. In: Calendar R, editor. *The Bacteriophages*. New York: Plenum. 683–724.

Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B., Górski, A. (2006) Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med (Maywood)*. 231(4):366-77.

Bose, A., Javaid, W., Ashame, E., Kiska, D., Riddell, S., Blair, D. (2008) *Bordetella bronchiseptica*: an emerging nosocomial pathogen in immunocompromised patients. *Clin Micro News*. 30:117–119.

Bourret, R. B., Fox, M. S. (1988) Lysogenization of *Escherichia coli* him+, himA, and himD hosts by bacteriophage Mu. *J Bacteriol* 170, 16c72–1682.

Boyd, E.F. (2012): Bacteriophage-encoded bacterial virulence factors and phage pathogenicity island interactions. *Adv. Virus. Res.* 82:91-118.

Bozzola, J.J. and Russell, L.D. (1998) *Electron microscopy—principles and techniques for biology*, 2nd edn. Jones and Bartlett Publishers, Sundbury, Massachusetts, p 670.

Breitbart, M., Wegley, L., Leeds, S., Schoenfeld, T., Rohwer, F. (2004) Phage community dynamics in hot springs. *Appl Environ Microbiol.* 70:1633–1640.

Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edition. Vol. 2. The Proteobacteria. USA: Springer.

Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C. W., Hertveldt, K., et al. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. *Mol. Microbiol.* 65, 1334–1344.

Briers, Y., Cornelissen, A., Aertsen, A., Hertveldt, K., Michiels, C. W., Volckaert, G., i sar. (2008). Analysis of outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa* and bactericidal activity of endolysins KZ144 and EL188 under high hydrostatic pressure. *FEMS Microbiol. Lett.* 280, 113–119.

Briers, Y., Walmagh, M., Lavigne, R. (2011) Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa*. J Appl Microbiol. 110(3):778-85.

Briers, Y., Walmagh, M., Grymonprez, B., Biebl, M., Pirnay, J. P., Defraigne, V., i sar. (2014a). Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persisters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3774–3784.

Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A. i sar. (2014b). Engineered endolysin-based “artilysins” to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio* 5, e01379–14.

Briers, Y., Lavigne, R. (2015) Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiol.* 10(3):377-90.

Brockmeier, S. L., Register, K. B., Nicholson, T. L., Loving, C. L. (2012) *Bordetellosis*. U: Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G.W., editori. *Diseases of swine*. 10th ed. Wiley-Blackwell. pp. 670–679.

Brussow, H., Canchaya, C., Hardt, W.D. (2004): Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(3):560-602.

Brüssow, H., Desiere, F. (2001) Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol Microbiol.* 39(2):213-22.

Burns, E. H., Norman, J. M., Hatcher, M. D., Bemis, D.A., (1993): Fimbriae and determination of host species specificity of *Bordetella bronchiseptica*. *J. Clin. Microb.* 31: 1939-1844.

Burton, P. J., Thornsberry, C., Cheung Yee, Y., Watts, J. L., Yancey, R. J. (1996) Interpretive criteria for antimicrobial susceptibility testing of ceftiofur against bacteria associated with swine respiratory disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 464–8.

Bushman, F. (2002) A new cellular system opposing HIV infection: implications for gene transfer? *Mol Ther.* 6:441–442.

Buzrul, S., Öztürk, P., Alpas, H., Akcelik, M. (2007) Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages. *LWT* 40:1671–1677.

Buzzell, A. (1962) Action of Urea on Tobacco Mosaic Virus. *Biophys J.* 2(2 Pt 1): 223–233.

Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C. W., Lavigne, R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:164–171.

Catalano, C. E., Cue, D., Feiss, M. (1995) Virus DNA packaging: the strategy used by phage lambda. *Mol Microbiol.* 16(6):1075-86.

Catalão M. J., Gil, F., Moniz-Pereira, J., São-José, C., Pimentel, M. (2013) Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiol.*

- Casjens, S. R., Gilcrease, E. B. (2009) Determining DNA packaging 656Q4 strategy by analysis of termini of the chromosomes in tailed bacte- 657 riophage virions. *Methods Mol Biol* 502:91–111.
- Cattelan, N., Dubey, P., Arnal, L., Yantorno, O. M¹., Deora, R. (2016) *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog Dis.* 74(1):ftv108.
- Ceyssens, P.J., Mesyanzhinov, V., Sykilinda, N., Briers, Y., Roucourt, B., Lavigne, R., Robben, J., Domashin, A., Miroshnikov, K., Volckaert, G., Hertveldt, K. (2008) The genome and structural proteome of YuA, a new *Pseudomonas aeruginosa* phage resembling M6. *J Bacteriol.* 190(4):1429-35.
- Chakraborty, A., Ghosh, S., Chowdhary, G., Maulik, U., Chakrabarti S., (2012) DBETH: A Database of Bacterial Exotoxins for Human Nucleic Acids Res. 40: D615–D620.
- Chan, B. K., Abedon, S. T., Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol* 8(6): 769–783.
- Chang, H. C., Chen, C. R., Lin, J.W., Shen, G. H., Chang, K. M., Tseng, Y. H., Weng, S.F. (2005) Isolation and characterization of novel giant *Stenotrophomonas maltophilia* phage phiSMA5. *Appl Environ Microbiol.* 71(3):1387-93.
- Chanishvili, N. (2009) A literature review of the practical application of bacteriophage research. Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology, Tbilisi.
- Chao, Y., Marks, L. R., Pettigrew, M. M., Hakansson, A. P. (2014) *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 194.
- Chow, T. Y., Lin, Y. T, Kuo, T. T. (1971) Stability of phage Xp12. *Bot Bull Academia Sinica* 12:57–65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2007): Seventh Informational Supplement CLSI document M100-S17, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA, 19087-1898.
- Cohen, S. S. (1948) The synthesis of bacterial viruses. I. The synthesis of nucleic acid and protein in *Escherichia coli* B infected with T2r+ bacteriophage. *J. Biol. Chem.* 174, 281-293.
- Confer, D. L., J. W. Eaton. (1982) Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 217:948-950.
- Conover, M. S., Mishra, M. & Deora, R. (2011). Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS ONE* 6, e16861.
- Cooper, P. D. (1962) Studies on the structure and function of the poliovirion: effect of concentrated urea solutions. *Virology.* 16:485-95.

- Coote, G. (1992) Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 88, 137-162.
- Cotter, P. A., J. F. Miller. (1994) BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect. Immun.* 62:3381-3390.
- Cowart, R. P., Backstrom, L., Brim, T. A. (1989) *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis and pneumonia in swine. *Can. J. Vet. Res.* 53:295-300.
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., Perna, N. T. (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14, 1394–1403.
- Dayao, D. A. E., Gibson, J. S., Blackall, P. J., Turni, C. (2014) Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. *Vet. Microbiol.* 171, 232–5.
- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L., Borriello, S. P. (2014) Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec.* 174: 325.
- Deeb, B. J., Giacomo R. F., Bernard B. L. (1990) *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. *J Clin Microbiol.* 28: 70–75.
- Delbrück, M., Luria, S. E. (1942) Interference between bacterial viruses. *Arch. Biochem.* 1: 111-141.
- Delcher, A. L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., Salzberg, S. L. (1999) Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res* 27(23): 4636-41.
- Denes, A. L., Rapuntean, G. H., Cosmina, C., Fi, N. N., Nadas, G., Calina, D. (2006). Biochemical tests used for identification of *Bordetella bronchiseptica*. *Buletinul USAMV–CN.* 63: 67–70.
- Deutsch, S. M., Guezenec, S., Piot, M., Foster, S., Lortal. (2004) Mur-LH, the Broad-Spectrum Endolysin of *Lactobacillus helveticus* Temperate Bacteriophage ϕ -0303 *Appl. Environ. Microbiol.* 70(1):96-103.
- Ehrmann, I. E., Gray, M. C., Gordon, V. M., Gray, L. S., Hewlett, E. L. (1991) Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett.* 278:79–83.
- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B. (2015) Bacteriophages and phage-derived proteins--application approaches. *Curr Med Chem.* 22(14):1757-73.
- Elias, B., Boros, G., Albert, M., Tuboly, S., Gergely, P., Papp, L., Vetro, I. B., Rafai, P., Molnar, E. (1990) Clinical and pathological effects of the dermonecrotic toxin of

Bordetella bronchiseptica and *Pasteurella multocida* in specific-pathogen- free piglets. Jpn. J. Vet. Sci. 52, 677-688.

Emmoth, E., Ottoson, J., Albihn, A., Belák, S., Vinnerås, B. (2011) Ammonia disinfection of hatchery waste for elimination of single-stranded RNA viruses. Appl Environ Microbiol. 77(12):3960-6.

Fennema, O. R. Food Chemistry. (1996) 3rd edn. New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc.

Ferrari, S., Costi, P. M., Wade, R. C. (2003) Inhibitor specificity via protein dynamics: insights from the design of antibacterial agents targeted against thymidylate synthase. Chem Biol. 10(12):1183-93.

Ferry, N. (1912) *Bacillus bronchisepticus* (bronchicanis): the cause of distemper in dogs and a similar disease in other animals. Vet. J. 68:376–391

Fiizi, M. 1973. Selective isolation of *Bordetella bronchiseptica*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. 224:270272

Fischetti, V. A. (2003) Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. Annals of the New York Academy of Sciences. 987:207–214.

Fischetti, V. A. (2010) Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control gram-positive pathogens. International Journal of Medical Microbiology 300(6):357–362.

Fowler, C. B., Cohen, S. S. (1948) Chemical studies in host-virus interactions. IV. A method of determining nutritional requirements for bacterial virus multiplication. J. Exp. M. 87, 259-274.

Frobisher, M., Brown, J. (1927) Transmissible toxicogenicity of streptococci. Bull. Johns Hopkins Hosp. 41:167-173.

Fu, W., Forster, T., Mayer, O., Curtin, J. J., Lehman, S. M., Donlan, R.M. (2010) Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an *in vitro* model system. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 397–404.

Fujioka, R, Kurtz, H., Ackermann, W. W. (1969) Effects of cations and organic compounds on inactivation of poliovirus with urea, guanidine, and heat. Proc Soc Exp Biol Med. 132(3):825-9.

Fuzi, M. (1975) Nitrofurantoin-test for the differentiation of *Bordetella bronchiseptica*. Zentralbl Bakteriol Orig A. 1975 May;231(4):466-70.

Gadakar, R., Gopinathan, K. P. (1980) Bacteriophage burst size during multiple infections. J Biosci 2: 253–259.

Galgiani, J. N., Hewlett, E. L., Friedman, R. L. (1988) Effects of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil interactions with *Coccidioides immitis* and *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 56(4): 751–755.

- Garcia-Cantu, M. C., Hartmann, F. A., Brown, C. M. (2000) *Bordetella bronchiseptica* and equine respiratory infections: a review of 30 cases. *Equine Vet Educ.* 12: 45–50.
- Garcia-de-la-Fuente, C., Guzman, L., Eliecer-Cano, M., Agüero, J., Sanjuan, C. (2015) Microbiological and clinical aspects of respiratory infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 82(1):20-5.
- Gerstmans, H., Rodríguez-Rubio, L., Lavigne, R., Briers, Y. (2016) From endolysins to Artilysin®s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochem Soc Trans* 44(1):123-8.
- Gašić, K., Ivanovic, M. M., Ignjatov, M., Calić, A., Obradovic, A. (2011): Isolation and characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages. *Journal of Plant Pathology.* 93(2): 415-423.
- Gjurić, A. (1985) Kuničarstvo. Nakladni Zavod Znanje, Zagreb. 444-446 pp.
- Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A., Danchin, A. (1988) The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2, 19–30.
- Goh, S., Riley, T., Chang, B. (2005b) Isolation and characterization of temperate bacteriophages of *Clostridium difficile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1079–1083.
- Goodnow, R.A. (1980): Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev.* 44: 722–738.
- Grabow, W. O. K., Coubrough, P. (1968) Practical Direct Plaque Assay for Coliphages in 100-ml Samples of Drinking Water. *Appl Environ Microbiol.* 52(3):430-433.
- Gueirard, P., Weber, C., Le Coustumier, A., Guiso, N. (1995) Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals and persistence of bacteria in host. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2002–2006.
- Guex, N., Peitsch, M. C., Schwede, T. (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis. Suppl* 1:S162-73.
- Gupta, K., Yin, J. (1995) Metal recognition by *in-vitro* selection. *Biotechnol Bioeng* 45:458.
- Guttman, B., Raya, R., Kutter, E. (2005) Basic phage biology, p. 29-66. U: Kutter, E., Sulakvelidze, A., editori. *Bacteriophages: Biology and Application.* CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hatfull, G. F. (2008) Bacteriophage Genomics *Curr Opin Microbiol.* 11(5): 447–453.
- Hatfull, G. F., Jacobs-Sera, D., Lawrence, J. G., Pope, W. H., Russell, D. A., Ko, C. C., Weber, R.J., Patel, M. C., Germane, K. L., Edgar, R. H., Hoyte, N. N., Bowman, C. A., Tantoco, A. T., Paladin, E. C., Myers, M. S., Smith, A. L, Grace, M. S., Pham, T. T., O'Brien,

- M. B., Vogelsberger, A. M., Hryckowian, A. J., Wynalek, J. L., Donis-Keller, H., Bogel, M. W., Peebles, C. L., Cresawn, S. G., Hendrix, R. W. (2010) Comparative genomic analysis of 60 Mycobacteriophage genomes: genome clustering, gene acquisition, and gene size. *J Mol Biol.* 19;397(1):119-43.
- Hendrix, R., W. (2002) Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol.* 61(4):471-80.
- Hewlett, E. L., D. L., Smith, G. A., Myers, R. D., Pearson, H. D., Kay. (1983) *In vitro* inhibition of human natural killer (NK) cell cytotoxicity by *Bordetella* cyclase and pertussis toxin. *Clin. Res.* 31:365A.
- Hewlett, E. L., Gordon, V. M., McCaffery J. D., Sutherland, W M., Gray, M. C. (1989) Adenylate cyclase toxin from *Bordetella perttssis*: identification of the holotoxin molecule. *J. Biol. Chem.* 264: 19379-19384.
- Hodges, R. T., Young, G. W. (1984) Prevalence and in-vitro antimicrobial sensitivity of *Bordetella bronchiseptica* in the nasal cavity of pigs. *N Z Vet J.* 32(7):111-4.
- Huang, H., Masters, M. (2014) Bacteriophage P1 pac sites inserted into the chromosome greatly increase packaging and transduction of *Escherichia coli* genomic DNA. *Virology.* 468-470:274-82.
- Huebner, E. S., Christman, B., Dummer, S., Tang, Y. W. (2006) Hospital-acquired *Bordetella bronchiseptica* infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Microbiology,* 44:2581-2583.
- Hueck, C. J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:379-433
- Hyder, S. L., Streitfeld, M. M. (1978) Transfer of erythromycin resistance from clinically isolated lysogenic strains of *Streptococcus pyogenes* via their endogenous phage. *J Infect Dis.* 138(3):281-6.
- Inal, J.M. (2003) Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp* 51, 237–244.
- Irie, Y., Matto, S., Yuk, M. H. (2004) The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 186:5692–5698.
- Issartel, J. P., Koronakis, V., Hughes, C. (1991) Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature.* 351(6329):759-61.
- Jado, I., Lopez, R., Garcia, E., Fenoll, A., Casal, J., Garcia, P. (2003) Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:967–973.
- Jain, S., Chen, J. (2007) Attachment and biofilm formation by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. *J Food Prot.* 70(11):2473-9.

- Jian, H., Xiao, X., Wang, F. (2013) Role of filamentous phage SW1 in regulating the lateral flagella of *Shewanella piezotolerans* strain WP3 at low temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Nov;79(22):7101-9.
- Jamal, M., Chaudhry, W. N., Hussain, T., Das, C. R., Andleeb, S. (2015) Characterization of new Myoviridae bacteriophage WZ1 against multi-drug resistant (MDR) *Shigella dysenteriae*. *J Basic Microbiol.* 55(4):420-31.
- Janda, J. M., Abbott, S. L. (1993) Expression of Hemolytic Activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J Clin Microbiol.* 1993 May; 31(5): 1206–1208.
- Jensen, E. C., Schrader, H. S., Rieland, B., Thompson, T. L., Lee, K. W., Nicerson, K. W., Kokjohn, T. A. (1998) Prevalence of broad-host-range lytic phages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 64:575–580.
- Jepson, C.D., March, J. B. (2004) Bacteriophage lambda is highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine.* 22:3413–1419.
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., Górski, A. (2011) The influence of external factors on bacteriophages-review *Folia Microbiol (Praha).* 56(3): 191–200.
- Kadlec, K., Kehrenberg, C., Wallmann, J. (2004) Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from porcine respiratory tract infections. *Antimicrob Agents and Chemother.* 48: 4903–4906.
- Kadlec, K., Kehrenberg, C., Schwarz, S. (2005) Molecular basis of resistance to trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 485–90.
- Kadlec, K., Wiegand, I., Kehrenberg, C., Schwarz, S. (2007) Studies on the mechanisms of beta-lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 396–402 (2007).
- Kakikawa, M., Ohkubo, S., Syama, M., Taketo, A., Kodaira, K.I. (2000) The genetic switch for the regulatory pathway of *Lactobacillus plantarum* phage (phi)g1e: characterization of the promoter P(L), the repressor gene cpg, and the cpg-encoded protein Cpg in *Escherichia coli*. *Gene* 242,155–166.
- Katsura, I. (1983) Tail assembly and injection. In *Lambda II*, Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W., and Weisberg, R. A., eds., Cold Spring Harbor, N.Y., pages 331–346.
- Katzenstein, D. A., Ciofalo, L., Jordan, M. C. (1984). *Bordetella bronchiseptica* bacteremia. *West J Med* 140: 96-98.
- Kim, M., Yim, J. H., Kim, S. Y., Kim, H. S., Lee, W. G., Kim, S. J., Kang, P. S., Lee, C. K. (2012) *In vitro* inhibition of influenza A virus infection by marine microalga-derived sulfated polysaccharide p-KG03. *Antiviral Res.* 93(2):253-9.

- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (2012) Virus taxonomy. In: Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses, London, Elsevier, pp 39-96.
- Kirby, J. E., Trempey, J. E., Gottesman, S. (1994) Excision of a P4-like cryptic prophage leads to Alp protease expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 176:2068–2081
- Knezevic, P., Petrovic, O. (2008) A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. J Microbiol Methods. 74(2-3):114-8.
- Knezevic, P., Kostanjsek, R., Obreht, D., Petrovic, O. (2009) Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* Specific Phages with Broad Activity Spectra. Curr Microbiol 59:173–180.
- Knezevic, P., Obreht, D., Curcin, S., Petrusic, M., Aleksic, V., Kostanjsek, R., Petrovic, O. (2011) Phages of *Pseudomonas aeruginosa*: response to environmental factors and in vitro ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation. J Appl Microbiol. 111(1):245-54.
- Knežević P. (2012) Bakteriofagi – alternativni antimikrobni agensi, Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Knezevic, P., Curcin, S., Aleksic, V., Petrusic, M., Vlaski, Lj. (2013) Phage-antibiotic synergism: a possible approach to combatting *Pseudomonas aeruginosa*. Res Microbiol. 164(1):55-60.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33:1870-1874.
- Kutter i Sulakvelidze (2004) Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton, FL: CRC.
- Kutter, E. (2009) Phage host range and efficiency of plating, Bacteriophages, Methods and Protocols, Vol 1: Isolation, Characterization and Interactions, pp. 141-149.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P., Pelletier, J. (2005) The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. Proc Natl Acad Sci USA 102:5174-5179.
- Kwan, T., Liu, J., Dubow, M., Gros, P., Pelletier, J. (2006) Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. J Bacteriol.
- Lark, K. G., Adams, M. H. (1953) The stability of phages as a function of the ionic environment. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 18:171–183.
- Lautrop, H., Lacey, B. W. (1960) Laboratory diagnosis of whooping cough of *Bordetella* infections. Bull. W.H.O. 23:15-35.

- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
- Lariviere, S., Leblanc, L., Mittal, K. R., Martineau, G. P., (1992) Characterization of *Pasteurella multocida* from nasal cavities of piglets from farms with or without atrophic rhinitis. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1398–1401.
- Leibo, S. P., Mazur, P. (1969) Effect of osmotic shock and low salt concentration on survival and density of bacteriophages T4B and T4o₁. *Biophys J.* 6:747–772.
- Leibo, S. P., Kellenberger, E., Kellenberger-van der Kamp, C., Frey, T. G., Steinberg, C. M. (1979) Gene 24-controlled osmotic shock resistance in bacteriophage T4: probable multiple gene functions. *J Virol.* 30(1):327–338.
- Lengyel, J. A., Goldstein, R. N., Marsh, M., Calendar, R. (1974) Structure of the bacteriophage P2 tail. *Virology.* 62(1):161–174.
- Lillehaug, D., Lindqvist, B., Birkeland, N. K. (1991) Characterization of phiLC3, a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* temperature bacteriophage with cohesive single-stranded DNA ends. *Appl Environ Microbiol.* 57(11):3206–3211.
- Lim, J. A., Shin, H., Heu, S., Ryu, S. (2014) Exogenous lytic activity of SPN9CC endolysin against gram-negative bacteria. *J Microbiol Biotechnol.* 28;24(6):803-11.
- Liu, M., Deora R., Doulatov, S.R., Gingery, M., Eiserling, F.A., Preston, A., Maskell, D.J., et al. (2002) Reverse transcriptase-mediated tropism switching in Bordetella bacteriophage, *Science* 295 (5562): 2091-20194.
- Liu, M., Gingery, M., Doulatov, S.R., Liu, Y., Hodes, A., Baker, S., et al. (2004) Genomic and genetic analysis of Bordetella bronchiseptica encoding reverse transcriptase-mediated tropism-switching cassettes. *J Bacteriol* 186(5): 1503-1517.
- Loc-Carrillo, C., Abedon, S. T. (2011) Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 1, 111–114.
- Loeffler, J. M., Nelson, D., Fischetti, V. A. (2001) Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294, 2170-2172.
- Loeffler, J. M., Djurkovic, S., Fischetti, V. A. (2003) Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia *Infect Immun.* 71(11): 6199–6204.
- Loessner, M.J., Maier, S.K., Ubek-Puza, H., Wendlinger, G., and Scherer, S. (1997) Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *J Bacteriol* 179: 2845–2851.
- Lohr, J. E., Chen, F., Hill, R. T. (2005) Genomic analysis of bacteriophage phiJL001: insights into its interaction with a sponge-associated alpha-*Proteobacterium*. *Appl Environ Microbiol.* 71:1598–1609.

- Lorenzo-Pajuelo, B., Villanueva, J. L., Rodriguez-Cuesta, J. et al. (2002) Cavitory pneumonia in an AIDS patient caused by an unusual *Bordetella bronchiseptica* variant producing reduced amounts of pertactin and other major antigens. *J Clin Microbiol* 40: 3146–3154.
- Lubbers, M. W., Waterfield, N. R., Beresford, T. P., Le Page, R.W., Jarvis, A. W. (1995) Sequencing and analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2 genome and identification of the structural genes. *Appl Environ Microbiol.* 61(12):4348-56.
- Luiz, L. M., Chuat, V., Madec, M. N., Araújo, E. A., de Carvalho, A. F., Valence, F. (2016) Mesophilic lactic acid bacteria diversity encountered in brazilian farms producing milk with particular interest in *Lactococcus lactis* strains. *Curr Microbiol.* 73(4):503-11.
- Maramorosch, K., Shatkin, A., J. (2012) *Bacteriophages, Part A.* USA: Academic Press.
- Marjanović D., Primorac D. (2009) *Molekularna forenzična genetika.* Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju (INGEB), Sarajevo, ISBN 978-9958-9344-6-9.
- Marphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L. et al (1995) *Virus taxonomy.* In: *Virus taxonomy: sixth report of the international committee on taxonomy of viruses,* Wien, Springer, pp 1–60.
- Marti, E., Variatza, E., Balcázar, J. L. (2014) Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin Microbiol Infect.* 20(7):O456-9.
- Mattoo S., Cherry J. D. (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 18: 326–382.
- McLaughlin, M. R. (2007): Simple colorimetric microplate test of phage lysis in *Salmonella enterica*. *J. Microbiol. Methods* 69(2):394–398
- Mebel, S., Rustenbach, S., Lapaeva, I. A. (1985) Isolierung von *Bordetella*-Phagen aus Bakterienstämmen der Impfstoffproduktion. *Acta Biotechnologica* 5(4): 329-332.
- Mekalanos J. J. (1983) Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 35, 253–263.
- Mengellers, M. J., van Klingeren, B., van Miert, A. S. (1989) *In vitro* antimicrobial activity of sulfonamides against some porcine pathogens. *Am J Vet Res.* 50(7):1022-8.
- Merkel, T. J., Stibitz, S., Keith, J. M., Leef, M., Shahin, R. (1998) Contribution of regulation by the *bvg* locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 66(9):4367-73.

- Meslier, V., Loux, V., Renault, P. (2012a) Genome sequence of *Leuconostoc pseudomesenteroides* strain 4882, isolated from a dairy starter culture. J Bacteriol 194: 6637.
- Meslier, V., Loux, V., Renault, P. (2012b) Genome sequence of *Lactococcus raffinolactis* strain 4877, isolated from natural dairy starter culture. J Bacteriol 194: 6364.
- Miklič, A., Rogelj, I. (2003). Characterization of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies. Int. J. Food Sci. Technol. 38 305–311
- Mills, S., Shanahan, F., Stanton, C., Hill, C., Coffey, A., Ross, R. P. (2013) Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. Gut Microbes 4:4–16.
- Mirold, S., Rabsch, W., Tschäpe, H., Hardt, W. D. (2001) Transfer of the *Salmonella* type III effector sopE between unrelated phage families. J Mol Biol. 7;312(1):7-16.
- Mishra, M., G. Parise, K. D. Jackson, D. J. Wozniak, and R. Deora. (2005) The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. J. Bacteriol. 187:1474-1484.
- Moorthy, S., P. I. Watnick. (2004) Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. Mol. Microbiol. 52:573-587.
- Moynet, D. J., Colon-Whitt, A. E., Calandra, G. B., Cole, R. M. (1985) Structure of eight streptococcal bacteriophages. Virology. 30;142(2):263-9.
- Murphy, J., Bottacini, F., Mahony, J., Kelleher, P., Neve, H., Zomer, A., Nauta, A., van Sinderen, D. (2016) Comparative genomics and functional analysis of the 936 group of lactococcal *Siphoviridae* phages | 6:21345 | DOI: 10.1038/srep21345.
- Nagayoshi, Y., Kumagae, K., Mori, K., Tashiro, K., Nakamura, A., Fujino, Y., Yasuaki, H., Iwamoto, T., Kuhara, S., Ohshima, T., Katsumi, T. (2016) Physiological properties and genome structure of the hyperthermophilic filamentous phage ϕ OH3 which infects *Thermus thermophilus* HB8. Front Microbiol 7:50.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2003): Methods for dilution susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved standard M7-A6, NCCLS, Wayne, Pa.
- Nelson, D., Loomis, L., Fischetti, V.A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences. 98 (7): 4107–12.
- Nguyen, H. M., Kang, C. (2014). Lysis delay and burst shrinkage of coliphage T7 by deletion of terminator TQ reversed by deletion of early genes. J Virol 88, 2107–2115.

- Oliveira, H., Vilas Boas, D., Mesnage, S., Kluskens, L. D., Lavigne, R., Sillankorva, S., Secundo, F., Azeredo, J. (2016) Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-gram-negative bacterial activity. *Front Microbiol.* 7: 208.
- Olson, M. R., Axler, R. P., Hicks, R. E. (2004) Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *J Virol Meth.* 2004;122:147–152.
- Othman, B. A., Askora, A., Abo-Senna, A. S. (2015) Isolation and characterization of a *Siphoviridae* phage infecting *Bacillus megaterium* from a heavily trafficked holy site in Saudi Arabia. *Folia Microbiol (Praha).* 60(4):289-95.
- O'Toole, G. A., and R. Kolter. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30:295-304.
- Parkhill, J. i sar. (2003) Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* 35, 32–40.
- Parker, M. L., Eiserling, F. A. (1983) Bacteriophage SPO1 structure and morphogenesis. I. Tail structure and length regulation. *J. Virol.* 46:239-249.
- Parsek, M. R., Singh, P. K. (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57:677–701.
- Payne, K. M., Hatfull, G. F. (2012) Mycobacteriophage endolysins: diverse and modular enzymes with multiple catalytic activities. *PLoS One.* 7(3):e34052.
- Pearson, R. D., P. Symes, M. Conboy, A. A. Weiss, E., Hewlett, L. (1987) Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J. Immunol.* 139:2749-2754.
- Pedersen, M. M., E. Marso, and M. J. Pickett. (1970) Nonfermentative bacilli associated with man. III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Am. J. Clin. Pathol.* 54:178-192.
- Petrović O., Knežević P., Simeunović J. (2007) Mikrobiologija. Skripta - WUS Austrija, Novi Sad.
- Pires, D. P., Sillankorva, S., Kropinski, A. M., Lu, T. K., Azeredo, J. (2015) Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Phage vB_PaeM_CEB_DP1 *Genome Announc.*3(5): e00918-15.
- Priebe S, Schwarz S. (2003) *In vitro* activities of florfenicol against bovine and porcine respiratory tract pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 2703–2705.
- Poole, K. (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med.* 39:162–176.
- Porter, J. F., Parton, R., Wardlaw, A. C. (1991) Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. *Appl Environ Microbiol.* (4):1202–1206.

- Prüller, S., Rensch, U., Meemken, D., Kaspar, H., Kopp, P. A., Klein, G., Kehrenberg, C. (2015) Antimicrobial Susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* Isolates from Swine and Companion Animals and Detection of Resistance Genes, PLoS One. 10(8).
- Rashel, M., Uchiyama, J., Ujihara, T., Uehara, Y., Kuramoto, S., Sugihara, S., Yagyu, K., Muraoka, A., Sugai, M., Hiramatsu, K., Honke, K., Matsuzaki, S. (2007) Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. J Infect Dis. 196(8):1237-47.
- Rath, B. A., Register, K. B., Wall, J., Sokol, D. M., Van Dyke, R. B. (2008) Persistent *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in an immunocompetent infant and genetic comparison of clinical isolates with kennel cough vaccine strains. Clin Infect Dis. 46:905–908.
- Rauch, H.M., and Pickett, J. (1961) *Bordetella bronchiseptica* bacteriophage. Canadian Journal of Microbiology 7(2): 125-133.
- Regan, J., Lowe, F. (1977) Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. J. Clin. Microbiol. 6, 303–9.
- Register, K. B. & Nicholson, T. L. Misidentification of *Bordetella bronchiseptica* as *Bordetella pertussis* using a newly described real-time PCR targeting the pertactin gene. J. Med. Microbiol. 56, 1608–10 (2007).
- Riipinen, K. A., Räsänen, L., Alatossava, T. (2007) Integration of the group c phage JCL1032 of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis and complex phage resistance of the host. J Appl Microbiol. 103(6):2465-75.
- Roberts, P. L., Lloyd, D. (2007) Virus inactivation by protein denaturants used in affinity chromatography. Biologicals. 35:343e347.
- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. (2015): REBASE-a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. Nucleic Acids Res. 43: D298-D299.
- Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Donovan, D. M., Götz, F., García, P. (2013) The Phage Lytic Proteins from the *Staphylococcus aureus* Bacteriophage vB_SauS-phiPLA88 Display Multiple Active Catalytic Domains and Do Not Trigger Staphylococcal Resistance PLoS One. 8(5): e64671.
- Rohwer, W (2003) Global Phage Diversity. Cell. Volume 113, Issue 2, 18:141.
- Roizman, B., Sears, A. E. (1996) in Fields Virology, editor, Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P., Chanock, R. M., Hirsch, M. S., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B. (Lippincott-Raven, Philadelphia), 3rd Ed., pp. 2231-2295.
- Römling, U., Galperin, M. Y., Gomelsky, M. (2013) Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. Microbiol Mol Biol Rev. 2013 Mar; 77(1): 1–52.

Roop, R. M., 2nd, Veit, H. P., Sinsky, R. J., Veit, S. P., Hewlett, E. L., Kornegay, E. T. (1987) Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. *Infect Immun.* 55(1):217-22.

Ryan, E. M., Alkawareek, M. Y., Donnelly, R. F., Gilmore, B.F. (2012) Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Jul;65(2):395-8.

Sabour PM, Griffiths MW. (ed). 2010. Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens. ASM Press, Washington, DC.

Sacco, R. E., Register, K. B., Nordholm, G. E. (2000) Restriction enzyme analysis and ribotyping distinguish *Bordetella avium* and *Bordetella hinzii* isolates. *Epidemiology and Infection* 124: 83– 90.

Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P., Ladant, D. (1992) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem.* 267(19):13598-602.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sao-Jose, C., Parreira, R., Vieira, G. & Santos, M. A. (2000). The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a cis-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. *J Bacteriol* 182, 5823-5831.

Sarkar, B. L., Chakrabarti, A. K., Koley, H., Chakrabarti, M. K., De, S. P. (1996) Biological activity and interaction of *Vibrio cholerae* bacteriophages in rabbit ileal loop. *Ind J Med Res.* 104:139–141.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* 184(4):1140-54.

Schmelcher, M., Shabarova, T., Eugster, M. R., Eichenseher, F., Tchang, V. S., Banz, M., i sar. (2010) Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 5745–5756.

Schmelcher, M., Donovan, D. M., Loessner, M. J. (2012) Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 7(10):1147-71.

Schmieger, H., Schicklmaier, P. (1999) Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 170(1):251-6.

Schneider, B., Gross, R., Haas, A. (2000) Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *B. Bronchiseptica* 68(12):7039–7048.

Schuch, R., Nelson, D., Fischetti, V. A. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418, 884–889.

Seaman, P. F., Day, M. J. (2007) Isolation and characterization of a bacteriophage with an unusually large genome from the Great Salt Plains National Wildlife Refuge, Oklahoma, USA. *FEMS Microbiol Ecol.* 60:1–13.

Sekaninová, G., Hofer, M., Rychlík, I., Pillich, J., Kolárová, M., Zajícová, V., Kubícková, D. (1994) A new phage typing scheme for *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* strains. Morphological analysis. *Folia Microbiol (Praha)*. 39(5):381-6.

Sharp, D. G., Hock, A., Taylor, A. E., Beard, D., Beard, J. W. (1946) Sedimentation characters and pH stability of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 165:259–270.

Sisti, F., Ha, D. G., O'Toole, G. A., Hozbor, D., Fernández, J. (2013) Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology.* 159(Pt 5):869-79.

Sloan, G. P., Love, C. F., Sukumar, N., Mishra, M. & Deora, R. (2007). The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol* 189, 8270–8276.

Smith, K. C., Castro-Nallar, E., Fisher, J. N., Breakwell, D. P., Grose, J. H., Burnett, S. H. (2013) Phage cluster relationships identified through single gene analysis. *BMC Genomics.* 19;14:410.

Soto, S. M. (2013) Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence.* 1;4(3):223-9.

Speakman, A. J., Binns, S. H., Dawson, S., Hart, C. A., Gaskell, R. M. (1997) Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from cats and a comparison of the agar dilution and E-test methods. *Vet Microbiol.* 54: 63–72.

Speakman, A. J., Dawson, S., Corkill, J. E., Binns, S. H., Hart, C. A., Gaskell, R. M. (2000) Antibiotic susceptibility of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Vet Microbiol.* 71(3-4):193-200.

Stenholm, A. R., Dalsgaard, I., Middelboe, M. (2008) Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4070–8.

Steinfeld, A., Prenger-Berninghoff, E., Bauer, N., Weiß, R., Moritz, A. (2012) Bacterial susceptibility testings of the lower airways of diseased dogs. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* 40, 309–1.

- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* .40:175-179.
- Stolt, P., Zillig, W. (1994) Transcription of the halophage Φ H repressor gene is abolished by transcription from an inversely oriented lytic promoter Volume 344, Issues 2–3, 16 pp. 125-128.
- Stepniewska, K., Urbaniak, K. & Markowska-Daniel, I. Phenotypic and genotypic characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from pigs in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 17, 71–7 (2014).
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Y., and Morris, J.G. (2001) Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 3:649-659.
- Šamanc, H. A. (2009) *Bolesti svinja*. Treće izmenjeno i dopunjeno izdanje. Naučna KMD, Beograd.
- Tabor, E., Buynak, E., Smallwood, L. A., Snoy, P., Hilleman, M., Gerety, R. J. (1983) Inactivation of hepatitis B virus by three methods: treatment with pepsin, urea, or formalin. *J Med Virol.* 11(1):1-9.
- Tey, B. T., Ooi, S. T., Yong, K. C., Tan, N. M., Ling, T.C., Tan, W. S. (2009) Production of fusion m13 phage bearing the disulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. *Journal of African Biotechnol* 8:268–273.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J.B., Jacobsen, C. S., Molin, S. (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* biofilms. *J Bacteriol.* 182(22):6482-9.
- Tuomanen, E., Towbin, H., Rosenfelder, G., Braun, D., Larson, G., Hansson, G. C., Hill, R. (1988) Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J Exp Med.* 168:267–277.
- Ubukata K, Konno M, Fujii R. (1975) Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *J Antibiot (Tokyo).* 28(9):681-8.
- USEPA (2001) Method 1602: Detection of Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. EPA 821-R-01-029. Office of Water, Engineering and Analysis Division, Washington, DC.
- Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. (1994) Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging, *Q. Rev. Biophys.* 27, 107–155.
- Veesler, D., Cambillau, C. A. (2011) Common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Sep;75(3):423-33.

- Vergara-Irigaray, N. (2005) Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun.* 73:748–760.
- Viitanen, S. J., Lappalainen, A. (2015) Rajamäki, M. M. Co-infections with respiratory viruses in dogs with bacterial pneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 544–51.
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Brabban, A. D., Diez-Gonzalez F. (2011) Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol.* 110(5):1323-31.
- Viscardi, M., Perugini, A. G., Auriemma, C., Capuano, F., Morabito, S., Kim, K. P., Loessner, M. J., & Iovane, G. (2008). Isolation and characterisation of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC). *Int J of Antimicrob Agents.* 31(2):152-157.
- Walmagh, M., Briers, Y., dos Santos, S. B., Azeredo, J., Lavigne, R. (2012). Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201phi2-1 and PVP-SE1. *PLoS One* 7, e36991.
- Walmagh, M., Boczkowska, B., Grymonprez, B., Briers, Y., Drulis-Kawa, Z., Lavigne R. (2013). Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 4369–4375.
- Wagner, D.W.K. Acheson, M.K. Waldor (2001) Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 69 (2001), pp. 1934–1937.
- Wagner, P. L., Livny, J., Neely, M. N. i sar. (2002) Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*
- Wan X., Tuckerman J. R., Saito J. A., Freitas T. A., Newhouse J. S., Denery J. R., Galperin M. Y., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A., Alam M. (2009). Globins synthesize the second messenger bis-(3'–5')-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. *J Mol Biol* 388, 262–270.
- Wang, S., Kong, J., Zhang, X. (2008). Identification and characterization of the two-component cell lysis cassette encoded by temperate bacteriophage phiPYB5 of *Lactobacillus fermentum*. *J Appl Microbiol* 105, 1939-1944.
- Wang, X., Kim, Y., Wood, T.K. (2009) Control and benefits of CP4-57 prophage excision in *Escherichia coli* biofilms. *ISME J.*, 3 (2009), pp. 1164–1179
- Warren, R. A. (1980) Modified bases in bacteriophage DNAs. *Annu Rev Microbiol.* 34:137–158.
- Weiss, A. A., Hewlett, E. L., Myers, G. A., Falkow. S. (1983) Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* (1):33-41.

- Weiss, A. A. (1992). The genus *Bordetella*. In *The Prokaryotes*, 2nd edn, pp. 2530–2543. Urednici: A. Balows, H. G., Trušper, M., Dworkin, W., Harder, K. H., Schleifer. New York: Springer.
- Wernli, D., Emonet, S., Schrenzel, J., Harbarth, S. (2011) Evaluation of eight cases of confirmed *Bordetella bronchiseptica* infection and colonization over a 15-year period. *Clin Microbiol Infect.* 17(2):201-3.
- Wilson, C., Caton, T. M., Buchheim, J. A., Buchheim, M. A., Schneegurt, M. A., Miller, R. V. (2004) DNA-repair potential of *Halomonas* ssp. from the Salt Plains Microbial Observatory of Oklahoma. *Microb Ecol.* 48:541–549.
- Whang, T., Daly, B., Yin, J. (1996) Metal-ion discrimination by phage T7. *J Inorg Biochem* 63:1–7.
- Whittaker, C. A., Hynes, R. O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell.* 13(10):3369-87.
- Whitman, P.A., Marshall, R.T. (1971) Isolation of psychrophilic bacteriophage-host systems from refrigerated food products. *Appl Microbiol.* 22(2):220–223.
- Woolfrey, B. F., Moody, J. A., (1991) Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev.* 4(3): 243–255.
- Xu, M., Arulandu, A., Struck, D. K., Swanson, S., Sacchettini, J. C., Young, R. (2005) Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science* 307, 113–117.
- Yamamoto, N., Fraser, D., Mahler, H. R. (1968) Chelating agent shock of bacteriophage T5. *J Virol.* 2:944–950.
- Yang, H., Liang, L., Lin, S. Jia, S. (2010) Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 10: 131.
- Yates, M. V., Gerba, C. P., Kelley, L. M. (1985) Virus persistence in ground water. *Appl Environ Microbiol.* 31:778–781.
- Yuk, M. H. (2000) Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-κB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol.* 35:991–1004.
- Young, R., Wang, I. N., Roof, W. D. (2000) Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* 8:120-126.
- Zarrouk, H., Karibian, S., Perry, M. B. Richards, J. C., Caroff, M. (1997) Structural characterization of lipids A of three *Bordetella bronchiseptica* strains: variability of fatty acid substitution. *J Bacteriol.* 179(11): 3756–3760.

Zhang, N., Young, R. (1999) Complementation and characterization of the nested *Rz* and *Rz1* reading frames in the genome of bacteriophage lambda. *Mol Gen Genet.* 262:659–667.

Zhong, H. Q., Zhang, S., Pan, H., Cai. (2013) Influence of induced ciprofloxacin resistance on efflux pump activity of *Klebsiella pneumoniae*. *J Zhejiang Univ Sci B.* 14(9):837-43.

Zhou, Y., Liang, Y., Lurch, K., Dennis, J. J., Wishart, D. S. (2011) PHAST: A fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* 39: W347–W352.

www.viralzone.expasy.org

<http://www.slideshare.net/Ghenghesh/lecture>

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/4737.html

<https://sites.google.com/site/bacteriophage4>

<http://biology-forums.com/index>

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/>

<http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=5152>

http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/3965.html

<http://phast.wishartlab.com/>

<http://tools.neb.com/REBsites/index.php>

<http://www.hpppi.iicb.res.in/btox/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://rast.nmpdr.org/>

<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>

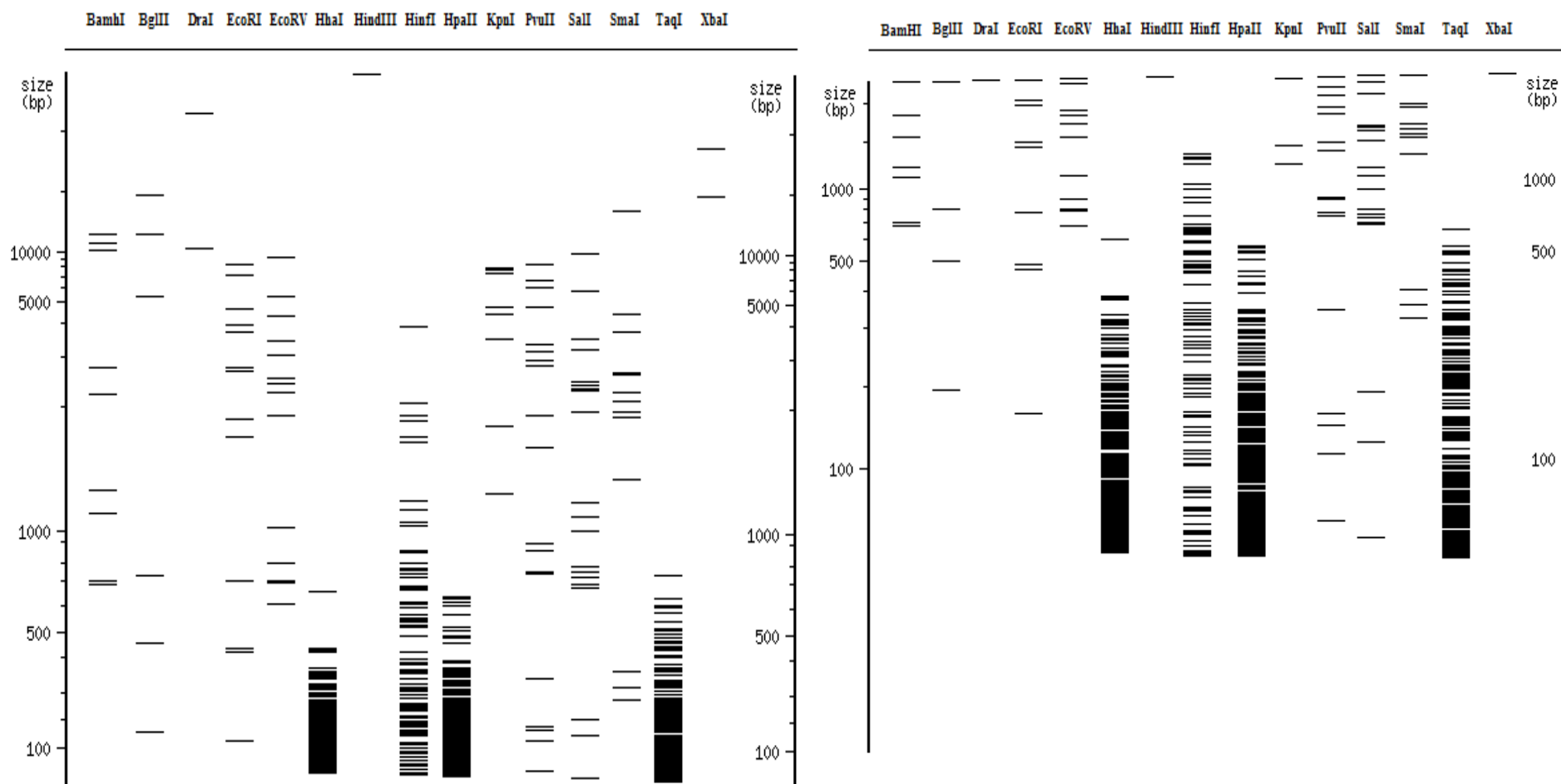
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

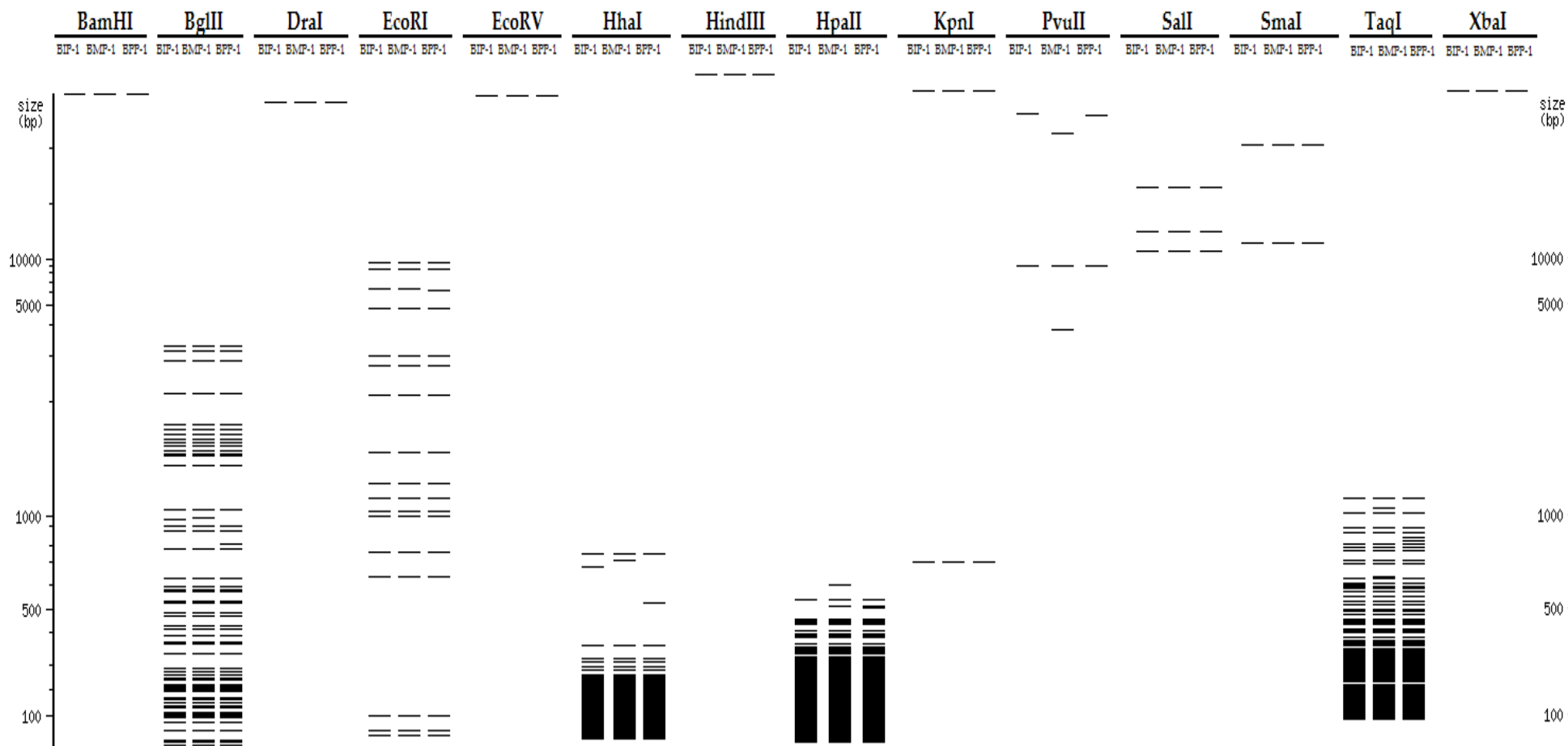
<https://swissmodel.expasy.org/>

http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html

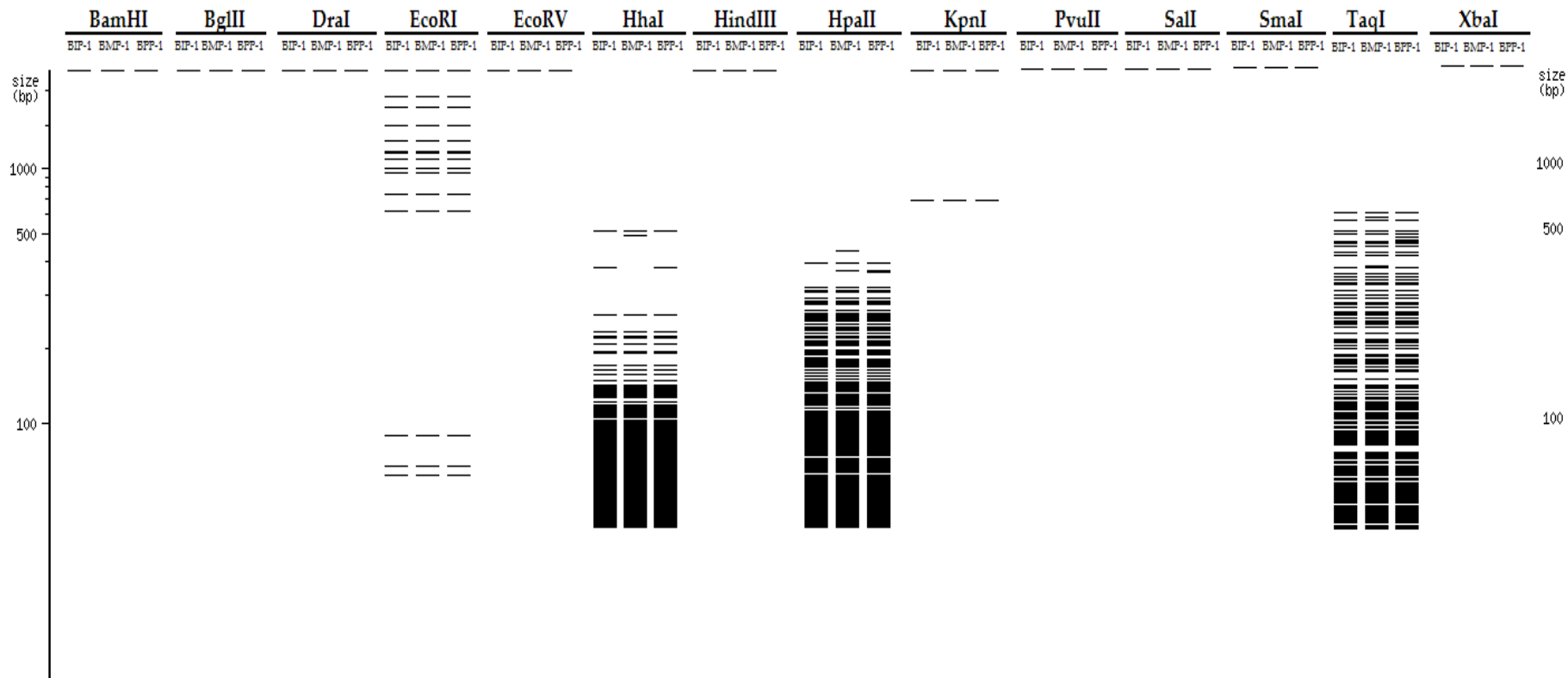
9. PRILOZI



Prilog 9.1. A) *In silico* RFLP profil profaga u soju *B. bronchiseptica* ATCC 10580 na 0,7 % agaroze i B) na 2 % agaroze



Prilog 9.2. *In silico* RFLP profil *B. bronchiseptica* bakteriofaga BIP-1, BMP-1 i BPP-1 iz familije *Podoviridae* na 0.7 % agaroze



Prilog 9.3. *In silico* RFLP profil *B. bronchiseptica* bakteriofaga BIP-1, BMP-1 i BPP-1 iz familije *Podoviridae* na 2 % agaroze

Prilog 9.4. Proteinske sekvence gena koji kodira glavni protein kapsida *B. bronchiseptica* faga

>gp59 [protein=major structural protein] Bordetella phage CN1

MSSVTLAESAKLAQDELVAGVIENIITVNRFFDVLPDFGIEGNSLAYNRENVLGDVINAGVGTTFSAAGAGKNPATFTRVNSNLTTIMGDAE
VNGLIQATRSGDGDNDQTAVQIASKAKSAGRQYQNQLINGTGTNNEFAGLLQLVASGQTLTPQTNGQALSFEILDELMDRVVDKDGQVDYI
TMHARTLSYKALLRNLGGASINEVVELPSGAEVPAYSGVPIFRNDYIPTNQTQGNVSTATTIFAGTLDDGSRTHGIAGLTATTAAGIQVVDV
GESEDADEHIWRVKWYCGLALFSEKGLAAAPGITN

>gp61 [protein=major structural protein] Bordetella virus CN2

MSSVTLAESAKLAQDELVAGVIENIITVNRFFDVLPDFGIEGNSLAYNRENVLGDVINAGVGTTFSGAGAGKNPATFTRVNSNLTTIMGDAE
VNGLIQATRSGDGDNDQTAVQIASKAKSAGRQYQNQLINGTGTNNEFAGLLQLVASGQTLTPQTNGQALSFEILDELMDRVVDKDGQVD
YITMHARTLSYKALLRNLGGASINEVVELPSGAEVPAYSGVPIFRNDYIPTNQTQGSTSNATTIFAGTLDDGSRTHGIAGLTATTAAGIQVVD
VGESEDADEHIWRVKWYCGLALFSEKGLAAAPGITN

>gp58 [protein=major structural protein] Bordetella virus LK3

MSSVTLAESAKLAQDELVAGVIENIITVNRFFDVLPDFGIEGNSLAYNRENVLGDVINAGVGTTFSSAGAGKNPATFTRVNSNLTTIMGDAE
VNGLIQATRSGDGDNDQTAVQIASKAKSAGRQYQNQLINGTGTNNEFAGLLQLVASGQTLTPQTNGQALSFEILDELMDRVVDKDGQVD
YITMHARTLSYKALLRNLGGASINEVVELPSGAEVPAYSGVPIFRNDYIPTNQTQGNVSTATTIFAGTLDDGSRTHGIAGLTATTAAGIQVV
DVGESEDADEHIWRVKWYCGLALFSEKGLAAAPGITN

>gp60 [protein=major structural phage protein] Bordetella virus MW2

MSSVTLAESAKLAQDELVAGVIENIITVNRFFDVLPDFGIEGNSLAYNRENVLGDVINAGVGTTFSGAGAGKNPATFTRVNSNLTTIMGDAE
VNGLIQATRSGDGDNDQTAVQIASKAKSAGRQYQNQLINGTGTNNEFAGLLQLVAAGQTLTPQTNGQALSFEILDELMDRVVDKDGQVD
YITMHARTLSYKALLRNLGGASINEVVELPSGAEVPAYSGVPIFRNDYIPTNQTQGSTSNATTIFAGTLDDGSRTHGIAGLTATTAAGIQVVD
VGESEDADEHIWRVKWYCGLALFSEKGLAAAPGITN

>gp60 [protein=major capsid protein] Bordetella virus FP1

MSSVTLAESAKLAQDELVAGVIENIITVNRFFDVLPDFGIEGNSLAYNRENVLGDVINAGVGTTFSGAGAGKNPATFTRVNSNLTTIMGDAE
VNGLIQATRSGDGDNDQTAVQIASKAKSAGRQYQNQLINGTGTNNEFAGLLQLVAGGQTLTPQTNGQALSFEILDELMDRVVDKDGQVD
YITMHARTLSYKALLRNLGGASINEVVELPSGAEVPAYSGVPIFRNDYIPTNQTQGNVSTATTIFAGTLDDGSRTHGIAGLTATTAAGIQVV
DVGESEDADEHIWRVKWYCGLALFSEKGLAAAPGITN

Prilog 9.5. Proteinske sekvence gena koji kodira proteinsku mernu traku dužine repa *B. bronchiseptica* faga

>gp73 [protein=tail length tape measure protein] Bordetella phage CN1

MAEERIDIVITERGSRVVKRNLEDIGGSARKSAGGVDFLKNALKGLAAYVSTRELLGLMDTYTNLTNRLRATGLEAQNLTAVYRELLGVANST
 RQSFEGTIELYARTAGAAKDLGVSSQELIDFTRSLNQAVALSGASATEQAAMIQLSQGLAAGALRGEELNSVLEQTPIVADVIAKELGVTRG
 QLRALGADGKITADIVLNAFNAREELEERFGKSVPTVSQSFQILRNLDLGVGGFDQATGVSAALSALMFMANNLDIAKLAISAAAAGLAL
 IGGTSSAINMATKAVLALNAAIAANPIGFLVLTSVITALTLFRDQIKLGSDEVTTGLDLMRAFGETVGAVFGAIWQWAKDTFGPLVDLIKD
 WVGEVDISLVGILRFVAKAVDSYYGAWRGAIMAVIELFKSLPAVLGDLMTRALNVLLGKIGDFVNGAGRLLSTVTEFVGLGQIAAVDFKLTN
 ENAGAAAELGKNVKGAFMDGFESTTFAQDFLEDRIKRAQEIGAERLRNQQTGEVDLTGSGSPRNVVDPNAAKEAQKLDALDALIGSYDK
 VWAAQQEYAEGEKLLNRAVAAGLITAERRAEVLGLMTAQLRDALDPMGAVNRELDEERRLLGMLSDAREIETQLKAIELDLMNQGVILGA
 EELEQLRERLRLIQEETRAAARQSVYDAIIGQQRDFTAQLQAINELTASGAITREQANAFVQQNSDLLAGTIEAQQAQITATEQMYARIDE
 LRQADLISEQTAQQLKARAQAETNAQRLATAQAFFGNLSVLARSENRELAIGKAAAVTQATIDGVLAVQKALASAPPPANYALAAAVGVA
 AAANVAQILAANTNGYAFGGNFEVGGTGGTDSQLVAFRATPGEKVSISTPQQERDREREARRGNGGGEGAGATNVINVLDPALLQDYLT
 PEGERVLVNVIRRRNSIGLR

>gp75 [protein=tail length tape measure protein] Bordetella virus CN2

VAEERIDIVITERGSRVVKRNLEDIGGSARKSAGGVDFLKNALKGLAAYVSTRELLGLMDTYTNLTNRLRATGLEAQNLTAVYRELLGVANST
 RQSFEGTIELYARTAGAAKDLGVSSQELIDFTRSLNQAVALSGASATEQAAMIQLSQGLAAGALRGEELNSVLEQTPIVADVIAKELGVTRG
 QLRALGADGKITADIVLNAFNAREELEERFGKSVPTVSQSFQILRNLDLGVGGFDQATGVSAALSALMFMANNLDIAKLAVSAAAAGLA
 LIGGTSSAINMATKAVVALNAVIAANPIGFLVLTSVITALTLFRDQIKLGSDEVTTGLDLMRAFGETVGAVFGAIWQWAKDTFGPLVDLIK
 DWVGEVDISLVGILRFVAKAVDSYYGAWRGAIMAVIELFKSLPAVLGDLMTRALNVLLGKIGDFVNGAGRLLSTVTEFVGLGQIAAVDFKLT
 NENAGAAAELGKNVKGAFMDGFESTTFAQDFLEDRIKRAQEIGAERLRNQQTGEVDLTGSGSPRNVVDPNAAKEAQKLDALDALIGSYD
 KVWAAQQEYAEGEKLLNRAVAAGLITAERRAEVLGLMTAQLRDALDPMGAVNRELDEERRLLGMLSDAREIETQLKAIELDLMNQGVILG
 AEELEQLRERLRLIQEETRAAARQSVYDAIIGQQRDFTAQLQAINELTASGAITREQANAFVQQNSDLLAGTIEAQQAQITATEQMYARI
 DELRQADLISEQTAQQLKARAQAETNAQRLATAQAFFGNLSVLARSENRELAIGKAAAVTQATIDGVLAVQKALASAPPPANYALAAAVG
 VAAAANVAQILAANTNGYAFGGNFEVGGTGGTDSQLVAFRATPGEKVSISTPQQERDREREARRGDGGGEGGGTNNVINVLDPALLQDY
 LTTPEGERVLVNVIRRRNSIGLR

>gp72 [protein=tail length tape measure protein] Bordetella virus LK3

MAEERIDIVITERGSRVVKRNLEDIGGSARKSAGGVDFLKNALKGLAAYVSTRELLGLMDTYTNLTNRLRATGLEAQNLTAVYRELLGVANST
 RQSFEGTIELYARTAGAAKDLGVSSQELIDFTRSLNQAVALSGASATEQAAMIQLSQGLAAGALRGEELNSVLEQTPIVADVIAKELGVTRG
 QLRALGADGKITADIVLNAFNAREELEERFGKSVPTVSQSFQILRNLDLGVGGFDQATGVSAALSALMFMANNLDIAKLAISAAAAGLAL
 IGGTSSAINMATKAVLALNAAIAANPIGFLVLTSVITALTLFRDQIKLGSDEVTTGLDLMRAFGETVGAVFGAIWQWAKDTFGPLVDLIKD
 WVGEVDISLVGILRFVAKAVDSYYGAWRGAIMAVIELFKSLPAVLGDLMTRALNVLLGKIGDFVNGAGRLLSTVTEFVGLGQIAAVDFKLTN
 ENAGAAAELGKNVKGAFMDGFESTTFAQDFLEDRIKRAQEIGAERLRNQQTGEVDLTGSGSPRNVVDPNAAKEAQKLDALDALIGSYDK
 VWAAQQEYAEGEKLLNRAVAAGLITAERRTEVLGLMTAQLRDALDPMGAVNRELDEERRLLGMLSDAREIETQLKAIELDxMNQGVIVSA
 VELEQLRERLRLIQEETRAAARQSVYDAIIGQQRDFTTQLQAINELVSGAITQQANAFVQQNSDLLAGTIEAQQAQITATEQMYARID
 ELRQADLISEQTAQQLKARAQAETNAQRLATAQAFFGNLSVLARSENRELAIGKAAAVTQATIDGVLAVQKALASAPPPANYALAAAVGV
 AAAANVAQILAANTNGYAFGGNFEVGGTGGTDSQLVAFRATPGEKVSISTPQQERDREREARRGDGGGEGGGTNNVINVLDPALLQDYLT
 TTPGERVLVNVIRRRNSIGLR

>gp74 [protein=tail length tape measure protein] Bordetella virus MW2

MAEERIDIVITERGSRVVKRNLEDIGGSARKSAGGVDFLKNALKGLAAYVSTRELLGLMDTYTNLTNRLRATGLEAQNLTAVYRELLGVANST
 RQSFEGTIELYARTAGAAKDLGVSSQELIDFTRSLNQAVALSGASATEQAAMIQLSQGLAAGALRGEELNSVLEQTPIVADVIAKELGVTRG
 QLRALGADGKITADIVLNAFNAREELEERFGKSVPTVSQSFQILRNLDLGVGGFDQATGVSAALSALMFMANNLDIAKLAVSAAAAGLA
 LIGGTSSAINMATKAVLALNAAIAANPIGFLVLTSVITALTLFRDQIKLGSDEVTTGLDLMRAFGETVGAVFGAIWQWAKDTFGPLVDLIK
 DWVGEVDISLVGILRFVAKAVDSYYGAWRGAIMAVIELFKSLPAVLGDLMTRALNVLLGKIGDFVNGAGRLLSTVTEFVGLGQIAAVDFKLT
 NENAGAAAELGKNVKGAFMDGFESTTFAQDFLEDRIKRAQEIGAERLRNQQTGEVDLTGSGSPRNVVDPNAAKEAQKLDALDALIGSYD
 KVWAAQQEYAEGEKLLNRAVAAGLITAERRAEVLGLMTAQLRDALDPLGAVNRELDEERRLLGMLSDAREIETQLKAIELDLMNQGVILGA
 EELEQLRERLRLIQEETRAAARQSVYDAVIGQQRDFTAQLQAINELTASGAITREQANAFVQQNSDLLAGTIEAQQAQITATEQMYARID
 ELRQADLISEQTAQQLKARAQAETNAQRLATAQAFFGNLAVLARSENRELAIGKAAAVTQATIDGVLAVQKALASAPPPANYALAAAVGV
 AAAANVAQILAANTNGYAFGGNFEVGGTGGTDSQLVAFRATPGEKVSISTPQQERDREREARRGNGGGEGAGATNVINVLDPALLQDYLT

TPEGERVLNVVIRRRNSIGLR

>gp74 [protein=tail length tape measure protein] Bordetella virus FP1

MAEERIDIVVTERGSRVVKRNLEDIGGTATKSANSVDFLKRALGTLGAAFGLQQIIRLTSAWSDLTSRVNIAAGSVENAAVMDRLQSIARRT
YAELGSTAEIYLSNSSALKELGYSTQQQLDFTEAMTNALVISGAKQERAATVINALSKAMMAGKLSGENWNTVLQQGGRIVDALAEGTGKS
ISELRAMAAAGTLTSDTVFTALTGQLEKLQEQEADSMPATITDALVVLRNRFMEVIGTFDQAGGFDDVIVRGLDLLSEHLETIIKLTAGVAAGF
VLIGGASKAIDIARGAVIALNAAIAANPIGFLTLVLTSVIATLTIFRDEIKLGTDELTTLGDLMRAFGETVGAVFSAIWEWAQNTFGPLVDLIKD
WVGEVDLSLVGILRFVAKAVDSYYGAWYGAILAVIELFKGLPAALGDLMTRALNVLLGKITDFVNAAGRILSTITEFVGLGQINAVDLTSLNQ
HEGAARKLGENVGSFMTGFNSTTFASDFLEGRIKRAQEIAAERAGAATAQADLNVRGPAATIVDPNAEKEAKKLDALDALIGSYDKVWA
AQQQYAEGEKLLNRAVAAGLITAERREEVLGLMSAQLRDALDPMGAVNRQLDEERRLLGMLSDAREIETQLKAIELDMNQGVILGAELE
QLRERLRLIQEETKAAQARQSVYDAIIGQQRDFTSQLQAINELTASGAIETREQANAFVQVNSDLLAGTIEAQQAQITATEQMYARIDELRQ
ADLISEQTAQQLKARAQAETNAQRLATAQQFFGNLAVLARSENRELAAGKAAAVTQATIDGVLAVQKALASAPPPANYALAAAVGVAAA
ANVAQILAANTNGYAFGGNFEVGGTGGTDSQLVAFRATPGEKVSISTPQQERDREREARRGNGGGEGAGATNVINVLDPALLQDYLTTP
GERVLNVVIRRRNSIGLR

Prilog 9.6. Proteinske sekvence gena koji kodira endolizin *B. bronchiseptica* faga

>gp65 [protein=endolysin] Bordetella phage CN1

MGKSLIHLLLALCAWALGSLPALAQDVRTFVPSGAEVYAPVLVEKQRAVWPAAPEPWTLAGLVEQESCISLTHSRCWNPRAELRTSR
EYGFQFGQITVAYNANGTVRFNKFEELRAAHDSLRAWSWANRYDPGYQLTAVVEMNLDLWRRVAAAAPGATVTDQWAFVLASYNG
GLGSLVLDLRRRLCSNTRGCDPARWFGHVENTSLKSRTQPQGYGGRSWFDINRSHVSNVINLRRSKYEPFWPEATWP

>gp67 [protein=endolysin] Bordetella virus CN2

MGKSLIHLLPALCAWALGSLPALAQDVRTFVPSGAEVYAPVLVEKQRAVWPAAPEPWTLAGLVEQESCISLTHSRCWNPRAELRTSR
EYGFQFGQITVAYNANGTVRFNKFEELRAAHDSLRAWTWANRYDPGYQLTAVVEMNLDLWRRVAAAAPGATVKDQWAFVLSSYNG
GLGSLVLDLRRRLCSNTRGCDPARWFGHVENTSLKSRTQPQSGYGGRSWFDINRSHVSNVINLRRSKYEPFWPEATWP

>gp64 [protein=putative endolysin] Bordetella virus LK3

MGKSLIHLLLALCAWAFGSLPALAQDVRTFVPSGAEVYAPMLVEKQRAIWPAAPEPWTLAGLVEQESCISLTHSRCWNPRAELRTSR
EYGFQFGQITVAYNAXGTVRFNKFEELRAAHESLRAWSWANRYDPGYQLTAVVEMNLDLWRRVAAAAPGATVTDQWAFVLASYNG
GLGSLVLDLRRRLCSNTRGCDPARWFGHVENTSLKSRTQPQGYGGRSWFDINRSHVSNVINLRRSKYEPFWPEATWP

>gp66 [protein=endolysin] Bordetella virus MW2

MGKSLIRLLALCAWAIGSLPALAQDVRTFVPSGAEVYAPVLVEKQRAVWPAAPEPWTLAGLVEQESCISLTHSRCWNPRAELRTSRE
YGFQFGQVTVAYNANGTVRFNKFEELRAAHDSLRAWTWANRYDPGYQLTAVVEMNLDLWRRVAAAAPGATVKDQWAFVLASYNG
GLGSLVLDLRRRLCSNTRGCDPARWFGHVENTSLKSRLVQPQGYGGRSWFDINRSHVRNVINLRRSKYEPFWPEATWP

>gp66 [protein=endolysin] Bordetella virus MW2

MGKSLIRLLALCAWAIGSLPALAQDVRTFVPSGAEVYAPVLVEKQRAVWPAAPEPWTLAGLVEQESCISLTHSRCWNPRAELRTSRE
YGFQFGQVTVAYNANGTVRFNKFEELRAAHDSLRAWTWANRYDPGYQLTAVVEMNLDLWRRVAAAAPGATVKDQWAFVLASYNG
GLGSLVLDLRRRLCSNTRGCDPARWFGHVENTSLKSRLVQPQGYGGRSWFDINRSHVRNVINLRRSKYEPFWPEATWP

Biografija



Aleksandra Petrović je rođena 20.01.1988. godine u Sremskoj Mitrovici gde je završila srednju medicinsku školu. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu je upisala 2007. godine. U toku studija bila je dobitnik stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i Izuzetne nagrade Univerziteta u Novom Sadu za naučni i stručni rad u školskoj 2010/11. godini. Tokom studija bila je aktivni član Naučno-istraživačkog društva Josif Pančić (sekcija ornitologija), Društva za zaštitu i proučavanje ptica Srbije i Centra za zaštitu sova Srbije. U 2012. godini je kao član projektnog tima učestvovala u realizaciji projekta pod nazivom „Novosadska škola ornitologije“ koji je finansirala Gradska uprava za omladinu i sport

grada Novog Sada. Na Departmanu za biologiju i ekologiju je diplomirala u septembru 2011. godine i stekla zvanje Diplomirani biolog. Iste godine upisala je master akademske studije takođe na Departmanu za biologiju i ekologiju, smer Mikrobiologija. U julu 2012. godine je stekla zvanje Diplomirani biolog-master a iste godine je upisala doktorske akademske studije, smer Doktor bioloških nauka kada je i izabaran u zvanje istraživača-pripravnik.

Od 2013. godine je kao Stpendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije priključena na projekat pod nazivom “Praćenje zdravstvenog stanja divljači i uvođenje biotehnoških postupaka u detekciji zaraznih zoonoznih agenasa – analiza rizika za zdravlje ljudi, životinja i kontaminaciju životne sredine“ čiji rukovodilac je dr Tamaš Petrović. Godine 2015. Je izabrana u zvanje istraživača-saradnika za užu naučnu oblast Mikrobiologija na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

U toku doktorskih studija je učestvovala u izvođenju praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju u okviru predmeta Osnove mikrobiologije i Opšta mikrobiologija za studenta osnovnih akademskih studija, kao i na predmetima Bakteriologija, Biofilmovi, Patogeni mikroorganizmi i Biologija bakteriofaga za studente master akademskih studija.

Godine 2015. boravila je u Bragi (Portugal) gde je pohađala kurs iz oblasti biotehnologije bakteriofaga. Iste godine je bila na jednomesečnom studijskom boravku u Bratislavi (Slovačka) u okviru međunarodnog SCOPES projekta pod nazivom “The role of metal homeostasis, reduction and sporulation in the metal resistance of Gram-positive bacteria” čiji finansijer je SCOPES Joint Research Projects and Institutional Partnerships, Švajcarska.

Učestvovala je u realizaciji 2 nacionalna i 3 međunarodna projekta. Koautor je dva rada u vodećim međunarodnim časopisima (M21a), a takođe je koautor preko 15 saopštenja na međunarodnim skupovima i skupovima nacionalnog značaja.

Od 2013. godine član je Društva mikrobiologa Srbije i Evropskog društva mikrobiologa (The Federation of European Microbiological Societies - FEMS)



KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj, RBR:	
Identifikacioni broj, IBR:	
Tip dokumentacije, TD:	Monografska dokumentacija
Tip zapisa, TZ:	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada, VR:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora, AU:	MSc Aleksandra Petrović Fabijan
Mentor, MN:	Prof. dr Petar Knežević
Naslov rada, NR:	Uloga bakteriofaga familije <i>Siphoviridae</i> u lizogenoj konverziji vrste <i>Bordetella bronchiseptica</i> i njihov antimikrobni potencijal
Jezik publikacije, JP:	Srpski (latinica)
Jezik izvoda, Jl:	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja, ZP:	Republika Srbija
Uže geografsko područje, UGP:	AP Vojvodina
Godina, GO:	2016
Izdavač, IZ:	Autorski reprint
Mesto i adresa, MA:	Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 2
Fizički opis rada, FO:	Poglavlja (9), strana (230), literaturnih citata (287), tabela (19), slika (44), grafikona (11), priloga (6)
Naučna oblast, NO:	Biologija
Naučna disciplina, ND:	Mikrobiologija
Predmetna odrednica/ključne reči, PO:	<i>Bordetella bronchiseptica</i> , bakteriofagi, <i>Siphoviridae</i> , lizogena konverzija, antimikrobni potencijal
Univerzalna decimalna klasifikacija, UDK:	
Čuva se, ČU:	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, PMF Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad
Važna napomena, VN:	
Izvod, IZ:	U ovom radu su izolovani specifični <i>Bordetella bronchiseptica</i> bakteriofagi iz iz prirodne sredine koji pripadaju familiji <i>Siphoviridae</i> . Bakteriofagi su okarakterisani u cilju razmatranja njihove uloge u lizogenoj konverziji bakterije i mogućnosti primene u kontroli vrste <i>B. bronchiseptica</i> . U tu svrhu ispitivane su morfološke karakteristike odabranih faga, litički spektar faga, i karakteristike genoma i proteina faga. Takođe, ispitivana je i stabilnost faga u različitim uslovima sredine, njihova litička efikasnost i efekat na formiranje i vec formirani biofilm. U radu je ispitana i uloga faga u produkciji biofilma, rezistenciji na antibiotike, procesu hemolize i pokretljivosti kod vrste <i>B. bronchiseptica</i> . Rezultati ovog rada jasno ukazuju na ulogu faga u lizogenoj konverziji vrste <i>B. bronchiseptica</i> kao i mogućnost njihove primene, uz određene modifikacije, kao anti- <i>B. bronchiseptica</i> agenasa.
Datum prihvatanja teme od strane NN veća, DP:	31.03.2016.
Datum odbrane, DO:	
Članovi komisije, KO:	
Predsednik:	Dr Dragan Radnović, redovni profesor, PMF, Novi Sad
Mentor:	Dr Petar Knežević, vanredni profesor, PMF Novi Sad
Član:	Dr Vesna Milošević, redovni profesor, Medicinski fakultet, Novi Sad
Član:	Dr Tamaš Petrović, viši naučni savetnik, NIV, Novi Sad



KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Dokument type, DT:	Monograph type
Type of record TR:	Printed text
Contents code, CC:	PhD thesis
Author, AU:	Aleksandra Petrovic Fabijan, MSc
Mentor, MN:	Prof. dr Petar Knezevic
Title, TI:	Role of bacteriophages from family <i>Siphoviridae</i> in lysogenic conversion of <i>Bordetella bronchiseptica</i> and their antimicrobial potential
Language of text, LT:	Serbian (latin)
Language of abstract, LA:	Serbian/English
Country of publication, CP:	Republic of Serbia
Locality of publication, LP:	AP of Vojvodina
Publication year, PY:	2016
Publisher, PB:	Author's reprint
Publication place, PP:	Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Trg Dositeja Obradovica 2
Physical description, PD:	Chapters (9), pages (230), references (287), tables (19), figures (44), graphs (11), additional lists (6)
Scientific field, SF:	Biology
Scientific discipline, SD:	Microbiology
Subject/key words, S/KW:	<i>Bordetella bronchiseptica</i> , bacteriophages, <i>Siphoviridae</i> , lysogen conversion, antimicrobial potential
Universal decimal classification, UDC:	
Holding data, HD:	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovica 2, 21000 Novi Sad, Serbia
Note, N:	
Abstract, AB:	In this paper <i>Bordetella bronchiseptica</i> specific phages belonging to family <i>Siphoviridae</i> were isolated from environment. Bacteriophages were characterized to determine their role in the lysogenic conversion of bacteria and their possible usage in <i>B. bronchiseptica</i> control. For this purpose, morphological characteristics of the selected phages, the phage lytic spectrum, and the characteristics of phage genome and the proteins were examined. Also, the stability of phage in different environmental conditions was studied as well as their lytic efficiency, effect on the biofilm formation and formed biofilm. The paper also examined the role of phages in the production of biofilm, resistance to antibiotics, the process of hemolysis and the motility of <i>B. bronchiseptica</i> species. The results of this study clearly indicate the role of phage in lysogenic conversion in <i>B. bronchiseptica</i> as well as their potential for <i>B. bronchiseptica</i> control.
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	31.03.2016.
Defended on, DE:	
Defended Board, DB:	
President:	Dr Dragan Radnović, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Mentor:	Dr Petar Knezevic, assistant professor, Faculty of Sciences Novi Sad
Member:	Dr Vesna Milošević, full professor, Faculty of Medicine, Novi Sad
Member:	Dr Tamas Petrovic, senior research fellow, Scientific Veterinary Institute, Novi Sad