



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



Msc Milivoje Petrušić

PRISUSTVO BAKTERIJE *Plesiomonas shigelloides* U POVRŠINSKIM VODAMA
PANONSKE NIZIJE I IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA NJENIH SPECIFIČNIH FAGA

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

Novi Sad, 2017

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Draganu Radnoviću i dr Savi Laziću na sugestijama, savetima i pomoći prilikom izrade doktorske teze. Takođe, zahvaljujem se i članovima komisije prof. dr Maji Karaman i dr Ivici Tamašu na korisnim predlozima i uputstvima.

Analize u okviru ove doktorske disertacije deo su projekata:

„Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“ (broj OI 172058), koji je podržan od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

„Izolacija i karakterizacija *Acinetobacter baumannii* specifičnih bakteriofaga“ koji je podržan od strane Ministarstva nauke Republike Srbije i Ministarstva za visoko obrazovanje, nauku i tehnologiju Republike Slovenije

„Novel natural antimicrobial agents“ (HUSRB2103/214/250; NNA), projekat u okviru IPA programa prekogranične saradnje između Srbije i Mađarske

i ovom prilikom se zahvaljujem prof. dr Nedi Mimici-Dukić, prof. dr Petru Kneževiću i prof. dr Olgi Petrović na ukazanoj mogućnosti da budem deo istraživačkog tima koji je učestvovao u realizaciji pomenutih projekata kao i na pomoći prilikom izrade teze.

Veliku zahvalnost dugujem rukovodiocima Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta prof. dr Goranu Anačkovu i prof. dr Ružici Igić kao i svim zaposlenima na pomoći, razumevanju i bezrezervnoj podršci koju su mi ukazali.

Veliko hvala prof. dr Dragani Obreht Vidaković na savetima i pomoći prilikom interpretacije rezultata vezanih za molekularne analize u okviru teze.

Srdačno se zahvaljujem dr Branki Vidić i dr Milošu Vidiću na iskrenoj podršci i optimizmu za vreme doktorskih studija.

Izuzetnu zahvalnost upućujem prof. dr Mariji Kraljević Balalić za iskrenu podršku, vreme i energiju koji su doprineli izradi ove disertacije.

Veliko hvala prof. dr Tomki Miljanović na pomoći i podršci prilikom pisanja teze.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Milanu Matavulju, prof. dr Milici Matavulj i prof. dr Zorici Svirčev na pomoći i podršci tokom studija.

Deo istraživanja u okviru doktorske disertacije obavljen je u saradnji sa drugim laboratorijama. Stoga se zahvaljujem dr Aleksandru Milovanoviću, dr Tomislavu Barni i dr Igoru Stojanovu iz Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“, zatim prof. dr Roku Kostanjšek sa Biotehničkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani kao i Bojanu Živaniću i Snežani Marković iz JKP Vodovod i Kanalizacija iz Novog Sada.

Zahvaljujem se master studentima Marini Tomić, Živani Pantić, Timei Hallai i Ivani Klašnji na pomoći u eksperimentalnom radu.

Veliko hvala prof. dr Jelici Simeunović i Sandi Savić kao i kolegicama dr Aleksandri Petrović Fabijan, dr Verici Aleksić Sabo, Ljiljani Janjušević, Dajani Kovač, Oliveri Babić, Dragani Čučak, Milani Rakić, Kristini Tešanović, Eleonori Bošković i dr Varji Knežević na pomoći i podršci.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na razumevanju, strpljenju, bezrezervnoj podršci i ljubavi koju su mi ukazali tokom godina, bez kojih ne bi ni bilo moguće da se bavim naukom.

Milivoje Petrušić

SADRŽAJ

UVOD.....	i
1. OPŠTI DEO	1
1.1 Taksonomski status vrste <i>Plesiomonas shigelloides</i>	1
1.2 Morfološke, kulturelne i biohemijske karakteristike vrste <i>Plesiomonas shigelloides</i>	2
1.3 Ekologija vrste <i>Plesiomonas shigelloides</i>	4
1.4 <i>Plesiomonas shigelloides</i> kao patogen ljudi i životinja.....	5
1.5 Izolacija i diferencijacija vrste <i>Plesiomonas shigelloides</i>	8
1.6 Komercijalni testovi u identifikaciji vrste <i>Plesiomonas shigelloides</i>	9
1.7 Molekularne metode u identifikaciji i genotipizaciji vrste <i>Plesiomonas shigelloides</i>	10
1.8 Osetljivost vrste <i>Plesiomonas shigelloides</i> na antibiotike i problem rezistencije	10
1.9 Otkriće bakteriofaga i koncept „živog leka“	12
1.10 Građa i morfologija bakteriofaga	14
1.11 Taksonomija bakteriofaga	16
1.11.1 Red <i>Caudovirales</i>	17
1.11.1.1 Familija <i>Myoviridae</i>	17
1.11.1.2 Familija <i>Siphoviridae</i>	18
1.11.1.3 Familija <i>Podoviridae</i>	18
1.11.2 Familije bakterijskih virusa van reda <i>Caudovirales</i>	19
1.12 Životni ciklusi bakteriofaga.....	21
1.14 Ekologija i značaj bakteriofaga u prirodi	26
1.15 Metode izolacije, određivanja brojnosti i karakterizacije bakteriofaga.....	29
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	32
3. MATERIJAL I METODE.....	33
3.1 Izolacija sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> i identifikacija na osnovu morfoloških, kulturelnih i biohemijskih karakteristika	33
3.2 Ekstrakcija bakterijske DNK i potvrda identifikacije sojeva primenom PCR tehnike korišćenjem specifičnih prajmera	37
3.3 Određivanje genetičke bliskosti izolovanih sojeva metodom RAPD-PCR	37
3.4 Testiranje sposobnosti formiranja biofilma sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i>	38
3.5 Određivanje hemolitičke aktivnosti sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> na krvnom agaru i kinetike hemolize, enzimske aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNase agaru	40
3.6 Pokretljivost sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i>	41
3.6.1 Test pokretljivosti u dubokom agaru	41

3.6.2	Određivanje stepena pokretljivosti.....	41
3.7	Detekcija histidin dekarboksilazne aktivnosti sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i>	42
3.8	Praćenje rasta sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> u podlozi sa različitim koncentracijama NaCl	43
3.9	Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> na antibiotike	43
3.10	Izolacija bakteriofaga	44
3.11	Umnožavanje, prečišćavanje i koncentrovanje izolovanih bakteriofaga	46
3.12	Utvrđivanje litičkog spektra bakteriofaga	49
3.13	Karakterizacija odabranih bakteriofaga	50
3.13.1	Ispitivanje <i>in vitro</i> efikasnosti faga	50
3.13.2	Određivanje efikasnosti stvaranja virusnih plaka	51
3.13.3	Efikasnost adsorpcije faga na različitim temperaturama.....	51
3.13.4	Uticaj različitih pH vrednosti na vijabilnost bakteriofaga	52
3.13.5	Efekat visokih temperatura na vijabilnost bakteriofaga	52
3.13.6	Kriva multiplikacije bakteriofaga „ <i>One step growth curve</i> “	53
3.13.7	Transmisiona elektronska mikroskopija bakteriofaga	53
3.13.8	Ekstrakcija nukleinske kiseline bakteriofaga	54
3.13.9	Digestija virusne DNK restrikcijom enzimima – RFLP analiza.....	54
3.13.10	Analiza strukturnih proteina bakteriofaga metodom SDS-PAGE	55
3.14	Detekcija izolovanih bakteriofaga protočnom citometrijom	56
4.	REZULTATI	57
4.1	Izolacija sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> i identifikacija na osnovu morfoloških, kulturelnih i biohemijskih karakteristika	57
4.2	Identifikacija izolata <i>Plesiomonas shigelloides</i> primenom PCR (Polymerase chain reaction) tehnike	58
4.3	Određivanje genetičke bliskosti izolovanih sojeva metodom RAPD-PCR	60
4.4	Testiranje sposobnosti formiranja biofilma sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i>	62
4.5	Određivanje hemolitičke aktivnosti sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> na krvnom agaru, enzimske aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNase agaru.....	63
4.6	Pokretljivost sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i>	66
4.7	Detekcija histidin dekarboksilazne aktivnosti sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i>	67
4.8	Praćenje rasta sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> u podlozi sa različitim koncentracijama NaCl	67
4.9	Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> na antibiotike	67
4.10	Izolacija bakteriofaga	69

4.11 Umnožavanje, prečišćavanje i koncentrovanje izolovanih bakteriofaga	71
4.12 Utvrđivanje litičkog spektra bakteriofaga	73
4.13 Karakterizacija odabranih bakteriofaga	74
4.13.1 Ispitivanje <i>in vitro</i> efikasnosti faga	74
4.13.2 Određivanje efikasnosti stvaranja virusnih plaka	77
4.13.3 Efikasnost adsorpcije faga na različitim temperaturama.....	79
4.13.4 Uticaj različitih pH vrednosti na vijabilnost bakteriofaga	80
4.13.5 Efekat visokih temperatura na vijabilnost bakteriofaga	81
4.13.6 Kriva multiplikacije bakteriofaga „ <i>One step growth curve</i> “	82
4.13.7 Transmisiona elektronska mikroskopija bakteriofaga	83
4.13.8 Ekstrakcija nukleinske kiseline bakteriofaga	84
4.13.9 Digestija virusne DNK restrikcijom enzimima	84
4.13.10 Analiza strukturnih proteina bakteriofaga metodom SDS-PAGE	86
4.14 Detekcija izolovanih bakteriofaga protočnom citometrijom	86
5. DISKUSIJA	90
5.1 Izolacija sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> i identifikacija na osnovu morfoloških, kulturelnih i biohemijskih karakteristika	90
5.2 Ekstrakcija bakterijske DNK i potvrda identifikacije sojeva primenom PCR tehnike	92
5.3 Određivanje genetičke bliskosti izolovanih sojeva metodom RAPD-PCR	92
5.4 Testiranje sposobnosti formiranja biofilma sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i>	93
5.6 Pokretljivost sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i>	97
5.7 Detekcija histidin dekarboksilazne aktivnosti sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i>	97
5.8 Praćenje rasta sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> u podlozi sa različitim koncentracijama NaCl	98
5.9 Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva <i>Plesiomonas shigelloides</i> na antibiotike	99
5.10 Izolacija bakteriofaga	102
5.11 Utvrđivanje litičkog spektra bakteriofaga	103
5.12 Karakterizacija odabranih bakteriofaga	105
5.13 Detekcija izolovanih bakteriofaga protočnom citometrijom	109
6. ZAKLJUČCI.....	111
7. LITERATURA.....	115
8. PRILOZI	141
BIOGRAFIJA	151

LISTA TABELA

Tabela 1.3 Životinjske vrste kod kojih je potvrđeno prisustvo vrste <i>P. shigelloides</i>	5
Tabela 1.5 Podloge namenjene za izolaciju vrste <i>P. shigelloides</i>	8
Tabela 1.8 Antibiotiska osetljivost sojeva <i>P. shigelloides</i>	11
Tabela 3.1.1 Poreklo uzoraka i način zasejavanja.....	34
Tabela 3.1.2 Preliminarni testovi korišćeni prilikom izolacije sojeva <i>P.shigelloides</i>	36
Tabela 3.3 Prajmeri korišćeni u preliminarnom testu RAPD-PCR metode.....	38
Tabela 3.7 Procentualni sastav podloge za utvrđivanje histidin dekarboksilazne aktivnosti među entero i laktobakterijama.....	42
Tabela 3.10.1 Uzorci površinskih voda korišćeni u cilju izolacije bakteriofaga specifičnih za vrstu <i>P. shigelloides</i>	45
Tabela 3.10.2 Spisak i poreklo sojeva koji su korišćeni u cilju izolacije bakteriofaga specifičnih za vrstu <i>P. shigelloides</i>	45
Tabela 3.11 Način pripreme rasvora CsCl različitih koncentracija.....	48
Tabela 3.12 Sojevi bakterija korišćeni kao heterologi domaćini prilikom utvrđivanja litičkog spektra bakteriofaga izolovanih na vrsti <i>P. shigelloides</i>	49
Tabela 3.13.9 Restrikcioni enzimi korišćeni u RFLP analizi.....	55
Tabela 4.1. Lista izolovanih sojeva sa lokalitetima uzorkovanja kao i procedure i podloge korišćene prilikom izolacije.....	58
Tabela 4.2. Srednje vrednosti merenja koncentracije i čistoće genomske DNK kod izolovanih sojeva <i>P. shigelloides</i> , referentnih sojeva <i>P. shigelloides</i> ATCC51903, ATCC14029 i <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966.....	59
Tabela 4.4. Kvalitativna procena sposobnosti produkcije biofilma sojeva <i>P. shigelloides</i> na površini od borosilikata.....	63
Tabela 4.5. Rezultati ispitivanja hemolitičke aktivnosti, enzimske aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNAze agaru sojeva <i>P. shigelloides</i>	64
Tabela 4.8. Praćenje rasta sojeva <i>P. shigelloides</i> na podlozi sa različitim koncentracijama NaCl.....	68
Tabela 4.10 Bakteriofagi vrste <i>P. shigelloides</i> izolovani iz površinskih voda.....	70
Tabela 4.11 Metode koje su primenjene u cilju prečišćavanja i koncentrovanja bakteriofaga i brojnost faga na kraju postupka.....	72
Tabela 4.12 Litički spektar prečišćenih i koncentrovanih bakteriofaga na homologom domaćinu <i>P. shigelloides</i>	73
Tabela 4.13.2 Relativna efikasnost stvaranja plaka (rEOP) virusa Psh 10, Psh-AB1 i Psh-PP1 na test domaćinima, sojevima <i>P. shigelloides</i>	77
Tabela 4.13.7 Podaci dobijeni na osnovu elektronskih mikrografija bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1.....	84
Tabela 4.13.8 Srednje vrednosti merenja koncentracije i čistoće DNK kod izolovanih virusa Psh-10, PshAB1 i Psh-PP1.....	84
Tabela 4.13.9 Veličine fragmenata/traka dobijenih enzimskom Dra I digestijom genoma virusa Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1.....	85

LISTA ILUSTRACIJA I GRAFIKA

Slika 1.2 Elektromikrografije ćelija <i>P. shigelloides</i>	3
Slika 1.4 Primerak jedinke tilapije kod koga je peritonealno ubrizgan soj <i>P. shigelloides</i> PYS1 sa karakterističnim manifestacijama i primerak neinficirane jedinke tilapije.....	7
Slika 1.6 Test API®20E sa karakterističnim reakcijama za vrstu <i>P. shigelloides</i>	9
Slika 1.9 Preparati bakteriofaga koji se koriste za suzbijanje infekcija izazvanih različitim bakterijama	14
Slika 1.10.1 Bakteriofagi kompleksne, kubične, filamentozne i pleomorfne građe (D).	15
Slika 1.10.2 Klasifikaciona šema morfotipova bakteriofaga.....	16
Slika 1.11.1.1 Građa i taksonomija bakteriofaga iz familije <i>Myoviridae</i> , primer <i>Enterobacteria fag T4</i>	17
Slika 1.11.1.2 Građa i taksonomija bakteriofaga iz familije <i>Siphoviridae</i> , primer <i>Enterobacteria fag Lambda</i>	18
Slika 1.11.1.3 Građa i taksonomija bakteriofaga iz familije <i>Podoviridae</i> , primer <i>Enterobacteria fag T7</i>	19
Slika 1.11.2 Familije bakteriofaga koje ne pripadaju redu <i>Caudovirales</i> sa svojim predstavnicima.	20
Slika 1.12.1 Litički ciklus bakteriofaga. Adsorpcija, penetracija, multiplikacija, maturacija i oslobađanje bakteriofaga.....	22
Slika 1.12.2 Kriva multiplikacije bakteriofaga T2 koji inficira <i>E. coli</i>	23
Slika 1.12.3 Lizogeni ciklus bakteriofaga.	24
Slika 1.13 Mehanizmi odbrane bakterija od bakteriofagnih infekcija.....	27
Slika 3.1.1 Lokaliteti uzorkovanja na teritoriji Republike Srbije i Republike Mađarske u cilju izolacije bakterije <i>P. shigelloides</i>	33
Slika 3.1.2 Uzorkovanje vode iz jezera Vranjaš u cilju izolacije sojeva <i>P. shigelloides</i>	35
Slika 3.1.3 Testovi fermentacije šećera, hidrolize želatina i usvajanja citrata, mikroskopski preparat bojen po Grammu i izgled i veličina kolonija <i>P. shigelloides</i> na modifikovanoj podlozi Plesiomonas Diferencijalni Agar (PDA).....	36
Slika 3.11 Kiveta pripremljena za centrifugiranje bakteriofaga u gradijentu gustine CsCl.....	48
Slika 3.13.1 Ispitivanje in vitro efikasnosti faga u mikrotitar ploči.....	50
Slika 3.13.10 Elektroforetsko razdvajanje proteina izolovanih bakteriofaga.....	56
Slika 4.1. Geografska rasprostranjenost lokaliteta/uzoraka pozitivnih na prisustvo vrste <i>P. shigelloides</i> kao i procentualna zastupljenost pozitivnih uzoraka	57
Slika 4.2. Identifikacija bakterije <i>P. shigelloides</i> PCR tehnikom korišćenjem specifičnih prajmera za 23S rRNA, sa pozitivnim kontrolama <i>P. shigelloides</i> ATCC51903, <i>P. shigelloides</i> ATCC14029 i negativnom kontrolom <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966	59
Slika 4.3 Dendrogram konstruisan na osnovu RAPD-PCR i RAPD profil sojeva <i>P. shigelloides</i>	61
Grafik 4.4 Vrednosti optičkih gustina (OD 595 nm) dobijene nakon testiranja sposobnosti formiranja biofilma sojeva <i>P. shigelloides</i> na površini od polistirena.....	62
Slika 4.4 Kvalitativna procena sposobnosti produkcije biofilma sojeva <i>P. shigelloides</i> na površini od borosilikata.....	62
Slika 4.5. Određivanje enzimske aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNase agaru i hemolitičke aktivnosti sojeva <i>P. shigelloides</i> na krvnom agaru.....	64

Grafik 4.5 Kinetika hemolize za odabrane sojeve <i>P. shigelloides</i>	65
Grafik 4.6 Vrednosti za pokretljivost izražene u mm za sojeve <i>P. shigelloides</i>	66
Slika 4.6 Određivanje pokretljivosti sojeva <i>P. shigelloides</i> u dubokom agaru i stepena pokretljivosti na swim agaru	66
Slika 4.7 Detekcija histidin dekarboksilazne aktivnosti sojeva <i>P. shigelloides</i> na podlozi za utvrđivanje dekarboksilazne aktivnosti bakterija	67
Grafik 4.9 Osetljivost sojeva <i>P. shigelloides</i> na ampicilin (AM), amoksisicilin (AX), amoksisicilin/klavulansku kiselinu (AMC), cefoksitin (FOX), cefotaksim (CTX), ceftazidim (CAZ), imipenem (IPM), streptomycin (S), neomicin (N), kanamicin (K), gentamicin (CN), netilmicin (NET), tobramicin (TOB), amikacin (AK), tetraciklin (TE), doksiciklin (DO), aztreonam (ATM), ciprofloksacin (CIP), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), hloramfenikol (C)	68
Slika 4.10 Izgled plaka 25 virusa izolovanih iz uzoraka otpadnih i površinskih voda na domaćinu <i>P. shigelloides</i>	71
Slika 4.11 Kivete sa virusima Psh-AB1 i Psh-10 nakon završenog postupka koncentrovanja i prečišćavanja u gradijentu i ekvilibrijumu CsCl.....	72
Slika 4.12 Utvrđivanje litičke efikasnosti <i>SPOT</i> metodom.....	74
Grafik 4.13.1.1 In vitro efikasnost faga Psh-10 pri različitim multiplicitetima infekcije na soju <i>P. shigelloides</i> DBPM-2.....	75
Grafik 4.13.1.2 In vitro efikasnost faga Psh-AB1 pri različitim multiplicitetima infekcije na soju <i>P. shigelloides</i> DBPM-2.....	76
Grafik 4.13.1.3 In vitro efikasnost faga Psh-PP1 pri različitim multiplicitetima infekcije na soju <i>P. shigelloides</i> 1PAD	76
Slika 4.13.2 Relativna efikasnost stvaranja plaka. Očitavanje rezultata i relativna efikasnost stvaranja plaka virusa Psh 10 na test domaćinima <i>P. shigelloides</i> 5DD, 2DD i 2JD.....	78
Grafik 4.13.3 Adsorpcija bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 na različitim temperaturama u toku 30 minuta	79
Grafik 4.13.4 Vijabilnost bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 pri različitim pH vrednostima u trajanju od 60 minuta.....	80
Grafik 4.13.5 Vijabilnost bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 pri različitim temperaturama (40°C, 50°C i 60°C) u trajanju od 60 minuta	81
Grafik 4.13.6 Krive multiplikacije bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 sa označenim latentnim periodima i brojem oslobođenih viriona po jednom ciklusu sa trajanjem ciklusa	82
Slika 4.13.7 Transmisiona elektronska mikrografija bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1	83
Slika 4.13.9 Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata genoma bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1. DNK bakteriofaga podvrgnuta digestiji od strane enzima Dral, Sall i Smal.....	85
Slika 4.13.10 SDS-PAGE analiza strukturnih proteina bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1	86
Slika 4.14 Detekcija bakteriofaga na protočnom citometru	87
Slika 4.14 Detekcija bakteriofaga na protočnom citometru (nastavak).....	88
Grafik 4.14. Brojnost bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 određena agar overlayer metodom (PM) i protočnom citometrijom (FC).....	89

LISTA SKRAĆENICA

AFLP – polimorfizam dužine amplificiranih fragmenata (Amplified Fragment Length Polymorphism)

APW – alkalna peptonska voda (Alkaline peptone water)

CRISPR - Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

EPS - egzopolisaharidi

ERIC – PCR – umnožavanje enterobakterijskih ponavljajućih međugenskih palindromskih sekvenci metodom lančane reakcije polimeraze (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR)

kbp – kilobazni par

LPS - lipopolisaharidi

mL – mililitar

MPN - tehnika najverovatnijeg broja (Most Probable Number)

MLST - multilocus sequence typing

nm – nanometar

O/129 - 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridin

DNAzna aktivnost – hidroliza molekula DNK

PCR - lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction)

PDA – Plesiomonas diferencijalni agar (Plesiomonas Differential Agar)

PFGE – elektrofereza u pulsirajućem polju (Pulsed field gel electrophoresis)

PFU – plak (Plaque Forming Unit)

PIB – Pepton inositol bile (broth)

RAPD PCR – nasumična amplifikacija polimorfne DNK (Random Amplification of Polymorphic DNA)

REP – PCR – metoda amplifikacije ponavljajućih vngenskih palindromskih sekvenci (Repetitive element sequence-based PCR)

SDS – PAGE – natrijum dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SSB – single-strand binding protein

UV – ultraljubičasto (zračenje)

XLD – Ksiloza lizin deoksiholat agar (Xylose lysine deoxycholate agar)

UVOD

Bakterija *Plesiomonas shigelloides* se primarno pronalazi u slatkovodnim površinskim vodama u tropskim oblastima, mada je njeno prisustvo potvrđeno i u područjima sa hladnom klimom. Mnogi vodeni životinjski organizmi su nosioci vrste *P. shigelloides* i to prvenstveno ribe, rakovi i školjke. Pored toga bakterija je detektovana i kod organizama koji nisu striktno vezani za vodu poput kornjača, žaba, pasa, mačaka, ovaca, krava, koza, svinja, majmuna i ptica. Kod ljudi može da izazove crevne infekcije i ređe ekstraintestinalne infekcije pri čemu najugroženiju populaciju čine deca i imunokompromitovane osobe. Pojava infekcija je češća u tropskim i subtropskim regionima, kao što su Indijski potkontinent i jugoistočna Azija, dok je pojava u Evropi, SAD-u i Kanadi uglavnom povezana sa putovanjima u toplije krajeve. Oboljenja uzrokovana vrstom *P. shigelloides* se najčešće javljaju nakon konzumiranja termički neobrađene ribe i tzv. morskih plodova (ostriga i mesa krabe). Pored toga zabeleženi su i slučajevi oboljevanja nakon konzumacije kontaminirane vode za piće, povrća kao i prilikom kontakta sa vodozemcima i gmizavcima. Bakterija *P. shigelloides* izaziva oboljenja i kod riba. Ispitivanja vezana za osetljivost bakterije *P. shigelloides* na antibiotike pokazuju da je pomenuta bakterija otporna na peniciline. Jedan od mogućih načina kontrole brojnosti pomenute bakterije, pored antibiotika, jeste i upotreba bakteriofaga odnosno virusa bakterija.

Bakteriofagi su sveprisutni u životnoj sredini i igraju ključnu ulogu u kontroli brojnosti i transferu gena kod bakterijskih ćelija. Odlikuju ih dva osnovna tipa životnih ciklusa: lizogeni i litički. U toku lizogenog životnog ciklusa ubačena nukleinska kiselina virusa integriše se u genom bakterije domaćina ili ostaje u formi epizoma replicirajući se zajedno sa ćelijom domaćina. Litička infekcija odnosno litički fagi su naročito interesantni sa stanovišta kontrole brojnosti bakterija budući da se ovaj vid infekcije završava destrukcijom bakterijske ćelije. Kako izolacija faga specifičnih za vrstu *Plesiomonas shigelloides* do sada nije objavljena u literaturi, njihova izolacija i karakterizacija bi mogla da bude prvi korak u okviru istraživanja vezanih za regulaciju brojnosti ove oportunistički patogene bakterije.

1. OPŠTI DEO

1.1 Taksonomski status vrste *Plesiomonas shigelloides*

Trenutni taksonomski položaj vrste *Plesiomonas shigelloides* je sledeći (Brenner, 2005):

Regnum (Carstvo): *Procariotae*

Phylum (Razdeo): *Proteobacteria*

Classis (Klasa): *Gammaproteobacteria*

Ordo (Red): *Enterobacteriales*

Familia (Familija): *Enterobacteriaceae*

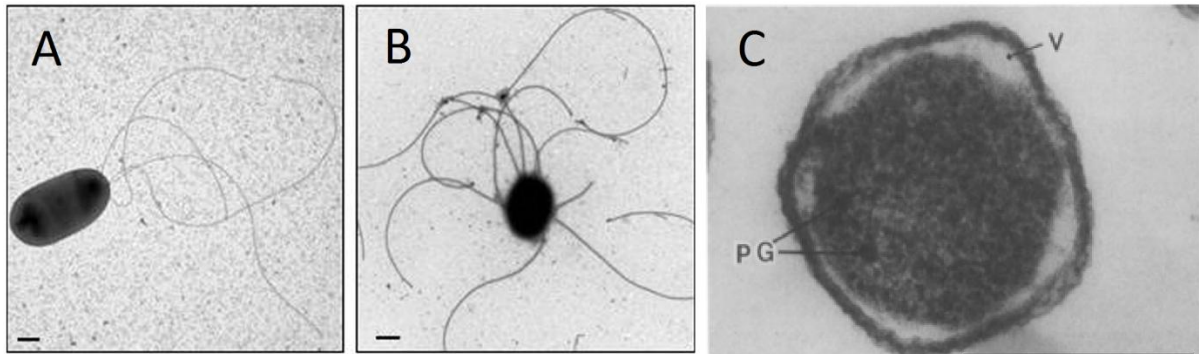
Taksonomski status vrste *Plesiomonas shigelloides* dugo vremena je bio sporan. Prvi podaci o ovoj bakteriji datiraju iz 1947. godine kada je izolovana iz fecesa pacijenta sa nepoznatom kliničkom slikom u gradu Lansingu u američkoj saveznoj državi Mičigen. Izolovani mikroorganizam dobija naziv Paracolon C27 i zbog svojih biohemijskih karakteristika se dovodi u vezu sa predstavnicima familije *Enterobacteriaceae* (Ferguson i Henderson, 1947). Godine 1954. Bader predlaže uvrštavanje bakterije Paracolon C27 u rod *Pseudomonas*, a kao glavne argumente navodi činjenice da su u pitanju Gram negativni štapići tipa lofotriha koji fermentišu glukozu, ne fermentišu laktozu i imaju sposobnost redukcije nitrata do nitrita. Zbog postojanja antigena karakterističnog za vrstu *Shigella sonnei* koji je detektovan kod pojedinih sojeva isti autor predlaže naziv *shigelloides* za vrstu. Sakazaki i saradnici su 1959. godine u studiji koja je ispitivala prisustvo i raspored flagela i koja je obuhvatila 22 soja uključujući i originalni C27 predložili naziv *Pseudomonas michigani* kako bi istakli lokaciju sa koje je bakterija prvi put izolovana. U međuvremenu, još jedan pokušaj klasifikacije novootkrivenog organizma, ali bez velikog odjeka u naučnoj javnosti, usledio je 1956. godine kada je Cowan predložio svrstavanje novog organizma u rod *Escherichia*. Otkriće citohrom oksidaze u ćelijama i rezultati analiza vezanih za morfologiju flagela dovode do novih promena taksonomskog statusa i Ewing i saradnici 1961. godine svrstavaju bakteriju u rod *Aeromonas* u okviru familije *Vibrionaceae*. Nakon niza novih saznanja o predstavnicima roda *Aeromonas* i ne podudaranja osobina bakterije C27 sa pomenutim organizmima Habs i Schubert 1962. godine predlažu formiranje novog roda u okviru familije *Vibrionaceae*, pod nazivom *Plesiomonas* (Plesio grčki πλήσιος, blizu; blizak monadama, rodu *Aeromonas*). Gotovo istovremeno, formiranje novog roda pod nazivom *Fergusonia* u okviru familije *Vibrionaceae* predložili su Sebald i Véron koji su ispitivanjem GC sadržaja kod velikog broja predstavnika rodova *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* i *Moraxella* dokazali da postoji velika razlika u

GC sadržaju između sojeva organizma Paracolon C27 i sojeva koji su pripadali rodovima *Pseudomonas* i *Aeromonas*. Na osnovu fenetičkih analiza na velikom broju predstavnika roda *Aeromonas* i organizama pod nazivom Paracolon C27, Eddy i Carpetner 1964. godine potvrđuju rezultate do kojih su došli Habs i Schubert i zaključuju da je formiranje novog roda bilo sasvim opravdano. Pored toga, pomenuti autori smatraju da novoformirani rod treba da nosi naziv *Scatomonas*. Hendrie i saradnici 1971. godine predlažu uvrštavanje bakterije u rod *Vibrio*, a na osnovu pojedinih fenotipskih sličnosti sa predstavnicima pomenutog roda. Međutim, predlog za naziv roda koji su dali Sebald i Véron 1963. godine, Eddy i Carpetner 1964. godine kao i predlog koji je izneo Hendrie i saradnici nisu bili prihvaćeni i organizam Paracolon C27 u okviru familije *Vibrionaceae* ostaje pod nazivom *Plesiomonas shigelloides*. Kasnija istraživanja koja su obuhvatila sekvenciranje 5S rRNK, 16S rRNK/rDNK i 23S rRNK ukazala su na filogenetsku bliskost vrste *Plesiomonas shigelloides* sa predstavnicima familije *Enterobacteriaceae* a naročito sa vrstama u okviru roda *Proteus* (MacDonell i sar., 1986; East i sar., 1992; Martinez-Murcia i sar., 1992; Ruimy i sar., 1994). Pored toga, Huys i Sings su 1999. godine prilikom genotipizacije predstavnika roda *Aeromonas* metodom AFLP-a potvrdili genetičku udaljenost vrste *Plesiomonas shigelloides* i predstavnika roda *Aeromonas*. Tako je rod *Plesiomonas* ponovo svrstan u familiju *Enterobacteriaceae* kao jedini oksidaza pozitivan član (Garrity i sar., 2001).

1.2 Morfološke, kulturelne i biohemijske karakteristike vrste *Plesiomonas shigelloides*

Plesiomonas shigelloides je Gram negativna, fakultativno anaerobna nesporogena bakterija štapićastog oblika dimenzija 0,8 – 1,0 x 3,0 µm. Pokretna je i ćelije mlade kulture gajene u tečnoj podlozi poseduju kraće flagele dužine 1,3 – 1,7 µm koje su raspoređene po čitavoj ćelijskoj površini dok se u starijim kulturama javlja snop flagela dužine 3,5 – 4,0 µm (Ewing i sar., 1961). Kada raste na čvrstim hranljivim podlogama *P. shigelloides* formira flagele po čitavoj površini ćelije nezavisno od starosti kulture (slika 1.2) (Merino i sar., 2015). Detaljnijom analizom ćelija *P. shigelloides* potvrđeno je da ultrastrukturu čine komponente karakteristične za Gram negativne bakterije iako fimbrije nisu detektovane (Brenden i sar., 1988). Elektronskom mikroskopijom je zabeleženo i prisustvo mukopolisaharidne supstance na površini ćelija u debljini od 35 nm (Brenden i sar., 1988). Pored toga, detektovana su inkluziona tela, od strane Brenden i sar. (1988) označena kao vakuole, prečnika 50 do 150 nm (slika 1.2) za koja su pojedini autori smatrali da su karakteristična samo za rani stadijum rasta bakterije (Pastian i Bromel, 1984). Daljim analizama potvrđeno je da se ove strukture pojavljuju nezavisno od stadijuma rasta bakterije i da u svom sastavu sadrže visoke koncentracije

fosfora i kalijuma, dok se magnezijum i silicijum pojavljuju samo u log fazi ćelijskog rasta (Ogawa i Amano, 1987). Smatra se da ova inkluziona tela imaju ulogu u zaštiti ćelija od nepovoljnih uslova sredine (González-Rey, 2003).



Slika 1.2 Elektromikrografije ćelija *P. shigelloides*. Ćelija gajena u tečnoj (A) i na čvrstoj podlozi (B) (Merino i sar., 2015). Granule (PG) i vakuola (V) u ćeliji *P. shigelloides* (C) (Brenden i sar., 1988). Bar=0,5 μ m

U tečnoj kulturi *P. shigelloides* formira ravnomerno zamućenje bez opne. Na podlozi hranljivi agar *P. shigelloides* formira glatke sive konveksne kolonije sa ravnim ivicama prečnika 1 do 2 mm. Isti tip kolonija javlja se i na podlozi Krvni agar, a u literaturi postoje oprečni podaci o hemolitičkoj aktivnosti vrste *P. shigelloides* (Ramalivhana i Obi, 2009; Janda i Abbott, 1993). Prozirne ravne kolonije prečnika 1 do 2 mm bakterija formira na podlogama MacConkey agar, Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar, Hektoen enteric agar i Desoxycholate agar (Brenden i sar., 1988). Za većinu sojeva *P. shigelloides* rast se odvija u širokom temperaturnom opsegu od 8°C do 45°C sa optimalnom temperaturom od oko 37°C (Schubert, 1981; Miller i Koburger, 1986a). Koncentracija NaCl u podlogama koja omogućava optimalan rast ćelija *P. shigelloides* iznosi od 1 do 4%, a rast je potpuno inhibisan pri koncentraciji NaCl od 6% (Miller i Koburger, 1986a; Bose, 2006). Opseg pH vrednosti pri kojem je registrovan rast većine sojeva je od 4 do 9, a potpuna inhibicija rasta zabeležena je u ekstremno kiseloj (pH<3) ili izuzetno alkalnoj sredini (pH>9.5) (Schubert, 1984; Miller i Koburger, 1986a).

Prema tipu metabolizma *Plesiomonas shigelloides* pripada grupi hemoorganotrofa. Biohemijske karakteristike od značaja za identifikaciju vrste su pozitivne reakcije razgradnje ugljenih hidrata, kao što su glukoza, inozitol, maltoza i trehaloza pri čemu se kao produkt reakcije stvara kiselina bez produkcije gasa. Za razliku od navedenih ugljenih hidrata, manitol, sorbitol, saharoza, arabinoza, ramnoza i melibioza ne podležu procesu razgradnje. Osim pomenutih procesa, za identifikaciju vrste se koriste i drugi biohemijski testovi, kao što su produkcija indola, koja je u ovom slučaju pozitivna, redukcija nitrata, oksidaza i katalaza test koji su takođe pozitivni, dok su testovi

usvajanja citrata, produkcije vodonik sulfida, razgradnja uree i produkcija acetoina negativni. Sposobnost degradacije i hidrolize želatina, kazeina, fibrinogena, poligalakturonata, skroba, tirozina i polisorbata (Twen 80®) nije detektovana, dok se za hidrolizu DNK od strane *P. shigelloides* u literaturi mogu pronaći oprečni podaci (Janda, 2005; Salerno i sar., 2010). Pored toga detektovano je prisustvo β -galaktozidaze, arginin dihidrolaze, ornitinin dekarboksilaze, ali ne i β -D-glukuronidaze. Ostale biohemijske karakteristike (prilog 1), poput produkcije trehalaze i produkcije hitinaze nisu od značaja za identifikaciju bakterije, a našle su primenu u industrijske svrhe (Yoshida i sar., 1998; Ramaiah i sar., 2000).

Vrstu *Plesiomonas shigelloides* karakteriše prisustvo zajedničkog enterobakterijskog antigena (ECA, eng. *enterobacterial common antigen*) (Whang i sar., 1972; Ramia i sar., 1982) čiju heteropolimernu strukturu čine N-acetilovani amino šećeri povezani sa lipopolisaharidnom komponentom (Mäkela i Mayer, 1976). Antigenska šema za *P. shigelloides* trenutno sadrži 102 somatska i 51 flagelarni antigen (Aldova i Shimada, 2000). Pojedini sojevi *P. shigelloides* pokazuju delimičnu ili potpunu sličnost sa *Shigella* somatskim antigenima (Albert i sar., 1993). Tako serogrupa O17 koja preovladava u vodenim sredinama vrši aglutinaciju antiseruma *S. sonnei* i identična je njenom O antigenu (Stock, 2004; Shepherd i sar., 2000). Pored toga otkrivena je velika sličnost serogrupa O5, O14, O15 i O22 vrste *P. shigelloides* sa O antigenim grupama O13, O29, O19 i O28 vrste *Aeromonas hydrophila* (Shimada i Sakazaki, 1985).

1.3 Ekologija vrste *Plesiomonas shigelloides*

Primarno stanište vrste *P. shigelloides* su slatkovodni sistemi, ali prisustvo ove bakterije se učestalo beleži i u brakičnoj (Islam i sar., 1991; Schubert i Beichert, 1993; De Mondino i sar., 1995; Alodova i sar., 1999) i slanoj vodi (Zakhariev, 1971; De Mondino i sar., 1995; Pasquale i Krovacek, 2001). Postoje podaci koji ukazuju na sezonsko pojavljivanje ove bakterije. Tako se u predelima sa umerenom klimom njena brojnost uvećava u toplijem periodu godine, a njeno odsustvo beleži tokom hladnijeg perioda (Schubert, 1981). Najveći broj slučajeva izolacije *P. shigelloides* beleži se u zemljama koje se nalaze u tropskom i subtropskom klimatskom pojasu, a zbog velike učestalosti izolacije u Japanu i na Tajlandu ovu bakteriju još nazivaju i azijskom bakterijom (González-Rey, 2003). Međutim, *P. shigelloides* nije ograničen samo na Azijski kontinent, već i na Afriku, što potvrđuju brojne studije sprovedene u afričkim zemljama (Ramalivhana i Obi, 2009; Alabi i Odugbemi, 1990a; Kwaga i sar., 1988). Pored toga, postoje izveštaji o izolaciji vrste *P. shigelloides* iz akvatičnih ekosistema u centralnoj Evropi (Medema i Schets, 1993). Najviše iznenađuju pozitivni nalazi ove

bakterije u jezerima krajnjeg severa Evrope (Krovacek i sar., 2000), naročito ako se uzme u obzir da je bakterija karakteristična za tropske i umerene klimate.

Mnogi vodeni životinjski organizmi su nosioci vrste *P. shigelloides* i to prvenstveno ribe (jegulja, som, deverika), rakovi i školjke (Joh i sar., 2013; DePaola i sar., 1993; Miller i Koburger, 1986b) (tabela 1.3). Pored toga bakterija je detektovana i kod organizama koji nisu striktno vezani za vodu poput kornjača, žaba, pasa, mačka, ovaca, krava, koza, svinja, majmuna i ptica (Miller i Koburger, 1986b; Tippen i sar., 1989; Bardon, 1999; Bauwens i sar., 1983). Ipak, status *P. shigelloides* kao komensala je još uvek sporan, a povremeno pojavljivanje ove bakterije u fecesu životinja može biti posledica prolazne kolonizacije nakon konzumiranja ribe, vode ili vodom kontaminirane hrane (González-Rey, 2003). Bakterija *P. shigelloides* nije fiziološki prisutan član crevne bakterijske zajednice čoveka, mada postoje podaci koji ukazuju na prisustvo bakterije u digestivnom traktu osoba koje nemaju simptome infekcije (Arai, 1980).

Tabela 1.3 Životinjske vrste kod kojih je potvrđeno prisustvo vrste *P. shigelloides* (Janda i sar., 2016)

Kategorija	Organizmi*
beskičmenjaci	Dagnje, kozice
ribe	algari, azijska arovana, bas (pastrmski grgeč), plavoškruga sunčanica, kanalski som, beli amur, ciklide, zlatni karaš, kirnja, halibut, japanska jegulja, bodorka, tilapija, pastrmka
marinski sisari	delfin, južnoamerički morski lav, kalifornijska morska vidra
ptice plovuše	kormoran, patka dupljašica, galeb, čaplja, pingvin, crna roda, žutokljuni labud
ostali	aligator, mačka, pas, lisica, zec, gušter, vuk

*Podaci od 2000. godine

1.4 *Plesiomonas shigelloides* kao patogen ljudi i životinja

Plesiomonas shigelloides je oportunistička enteropatogena bakterija. Niska incidenca oboljenja izazvana ovom bakterijom u odnosu na bolesti koje su uzrokovane drugim enteropatogenima, kao i odsustvo rutinskih analiza koje bi se koristile za potvrdu prisustva vrste *P. shigelloides* u patološkom materijalu razlozi su zbog kojih je bakterija retko detektovana a njen status kao oportunističkog patogena dugo vremena bio sporan (Chan i sar., 2003). Bakterija kao faktore virulencije produkuje termolabilne i termostabilne enterotoksine, toksine slične kolera toksinu, hemolizin i citotoksine (Levin 2008). Potencijalni faktori virulencije kao što su plazmidi,

elastin, sposobnost adhezije odnosno stvaranja biofilma, ćelijska invazivnost i apoptoza na Caco-2 ćelijama su takođe detektovani, ali njihov patogeni značaj još uvek nije dovoljno istražen (Čižnár i sar., 2004; Levin 2008; Herrington i sar., 1987; Rust i sar., 1994). U etiološke faktore ubrajaju se još i sposobnost bakterije da produkuje histamin i tetrodotoksin (González-Rey, 2003).

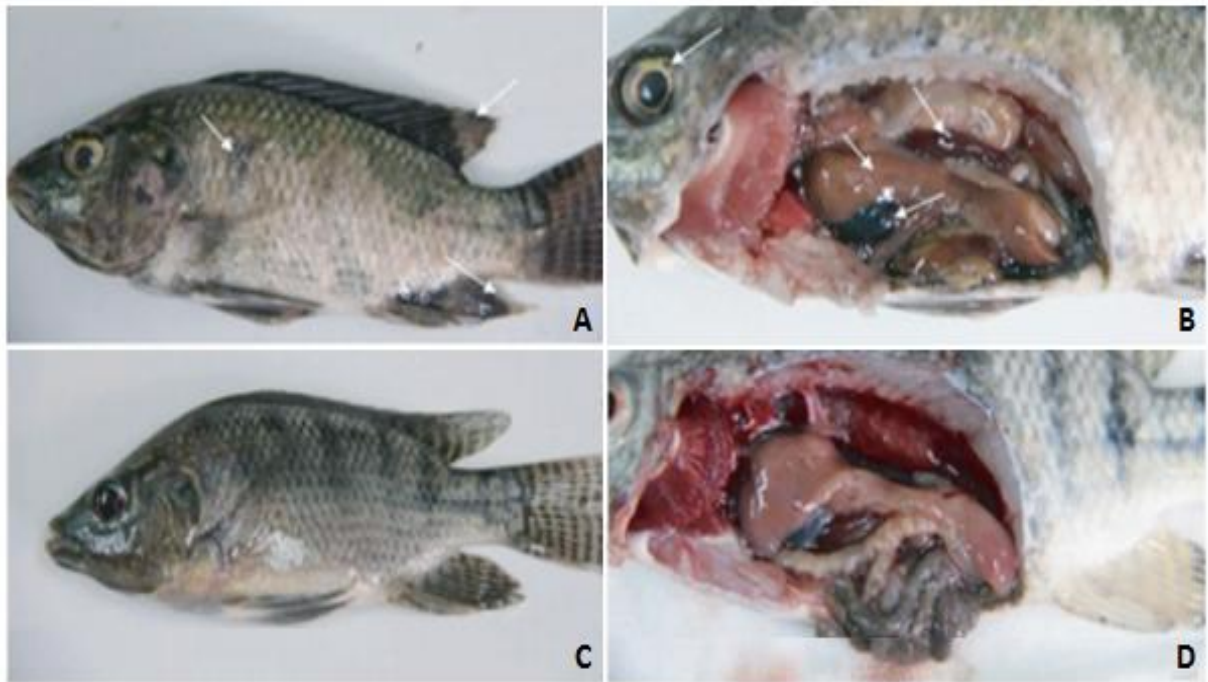
Infekcije koje izaziva *P. shigelloides* kod ljudi se mogu podeliti na infekcije gastrointestinalnog trakta i ekstraintestinalne infekcije (Brenden i sar., 1988). Infekcije gastrointestinalnog trakta praćene su dijarejama koje se različito manifestuju. Najčešći je tzv. sekretorni oblik dijareje koji je praćen pojačanom peristaltikom creva. Drugi tip infekcije gastrointestinalnog trakta manifestuje se tzv. invazivnim dijarejama praćenim bolovima u stomaku i pojavom krvi u stolici. Poslednji, treći tip infekcija gastrointestinalnog trakta praćen je dijarejama kakve se javljaju kod obolelih od kolere, a u ovom slučaju pored *P. shigelloides*, pacijent je istovremeno zaražen i bakterijom *Aeromonas spp.* (Sawle i sar., 1986). Period inkubacije u sva tri slučaja iznosi od 24 do 50 časova, a simptomi obično traju 1 do 9 dana, sa izuzetkom najtežeg oblika kada mogu potrajati i do 3 meseca (Clark i Janda, 1991).

Ekstraintestinalne infekcije čiji je uzročnik *P. shigelloides* su ređe, a obuhvataju septikemije, septični artritis, meningitis, meningoencefalitis, holecistitis, celulitis, endoftalmitis, osteomijelitis i peritonitis (Clark i sar., 1991; Cohen i sar., 1983; Ingram i sar., 1987; Woo i sar., 2004; Terpeluk I sar., 1992). Iako su ove infekcije retke, stopa smrtnosti može iznositi 62%, a najugroženija populacija su odojčad, deca i imunokompromitovane osobe (Lee i sar., 1996).

Najčešći način unošenja vrste *P. shigelloides* u organizam je preko kontaminirane vode (Islam i sar., 1991). Tako je nedovoljno tretirana voda za piće dovela do epidemije gastroenteritisa u Japanu, kada je obolelo 978 ljudi (Tsukamoto i sar., 1978). Infekcija se takođe može javiti kao posledica konzumiranja ribe, školjki, rakova i kontaminiranog povrća kao i neadekvatnog čuvanja ili termičke obrade hrane (Holmberg i sar., 1986; Ingram i sar., 1987; Martin i Gustafson, 1985; Monge i sar., 1998). Pored toga zabeležene su i transmisije prilikom kontakta sa vodozemcima i gmizavcima (Kolle i Hoffmann, 1998). Pojava infekcije je češća u tropskim i subtropskim regionima kao što su indijski potkontinent i jugoistočna Azija, dok je u Evropi i Severnoj Americi uglavnom povezana sa putovanjima u toplije predele (Kain i Kelly, 1989a).

Oportunističke infekcije čiji je uzročnik *P. shigelloides* zabeležene su i kod životinja. U literaturi se spominje više slučajeva nastanka oboljenja kod riba. Vladík i Vítovec (1974) su prijavili septikemiju kod pastrmke (*Oncorhynchus mykiss*) kada su pored *P. shigelloides* izolovani i *Flavobacterium sp.* i *Aeromonas hydrophila*. Masovno uginuće iste vrste ribe izazvano bakterijom *P. shigelloides* zabeleženo je i u 2 ribnjaka na severu Portugalije. Stopa smrtnosti iznosila je oko 40%, a kao simptomi bolesti navedeni su mršavljenje, crvenilo oko anusa praćeno eksudacijom, tačkasto

krvarenje zida creva i nagomilavanje tečnosti u peritonealnoj šupljini (Cruz i sar., 1986). Masovni pomor tilapije (*Oreochromis niloticus*) u ribnjaku u kineskoj provinciji Guandong zabeležili su Liu i saradnici (2015) i kao jedinog uzročnika izolovali su vrstu *P. shigelloides*. Izolovani soj *P. shigelloides* sa oznakom PYS1 iskorišćen je za inficiranje zdravih jedinki tilapije nakon čega su kod pomenutih jedinki primećeni slični simptomi bolesti (tamnija boja krljušti i otpadanje krljušti, površinska krvarenja, truljenje peraja, jetra žute boje, slezina tamno crvene boje, uvećanje žučne kese i nakupljanje tečnosti u trbušnoj duplji) (slika 1.4).



Slika 1.4 Primerak jedinke tilapije kod koga je peritonealno ubrizgan soj *P. shigelloides* PYS1 (A i B) sa karakterističnim manifestacijama (u tekstu) i primerak neinficirane jedinke tilapije (C i D) (Liu i sar., 2015)

Slučaj uginuća azijske arovane (*Scleropages formosus*) gajene u izložbenom akvarijumu u Seulu u Južnoj Koreji zabeležili su Jun i saradnici (2011). Iz bubrega uginule ribe izolovana je bakterija *P. shigelloides*, a pregledom je ustanovljena protruzija creva, prisustvo žućkaste tečnosti u trbušnoj duplji kao i bleđa i uvećana jetra.

Osim oboljenja kod riba, prijavljen je slučaj sepse kod lemura grivnaša (*Varecia variegata*) (Bardoň, 1994), dijareje kod pasa i mačaka (Klimeš i Čížek, 1996), sepse sa fatalnim ishodom kod mladunaca kraljevskog (*Aptenodytes patagonicus*) i afričkog pingvina (*Spheniscus demersus*) (Nimmervoll i sar., 2011).

1.5 Izolacija i diferencijacija vrste *Plesiomonas shigelloides*

U cilju izolacije i detekcije vrste *P. shigelloides* iz različitih uzoraka korišćen je veliki broj podloga namenjenih enterobakterijama (MacConkey agar, Salmonella-Shigella agar, modifikovani Salmonella-Shigella agar, Deoksiholat citrat agar, Ksilozna-Lizindeoksiholat agar, Hektoen enteric agar, Deoksiholat laktoza agar i Endo agar) (González-Rey, 2003). Zbog nedovoljno dobre diferencijacije kolonija *P. shigelloides* na podlogama za enterobakterije uporedo su razvijane posebne podloge namenjene isključivo za ovu vrstu (tabela 1.5).

Tabela 1.5 Podloge namenjene za izolaciju vrste *P. shigelloides* (Perales, 2012)

Podloga	Prvobitna namena	Diferencijalna komponenta	Selektivna komponenta	Navod
Inositol brilliant green bile agar (IBB) (PDA)	Izolacija bakterije iz fecesa	inozitol	brilijant zeleno, žučne soli	Schubert, 1977
Bile salts brilliant green agar	Izolacija bakterije iz fecesa	oksidaza test na petri ploči	brilijant zeleno, žučne soli	Millership i Chattopadhyay, 1984
<i>Plesiomonas</i> agar	Izolacija bakterije iz uzoraka hrane i vode	manitol, arabinoza, lizin, fenol crveno	žučne soli	Miller i Koburger, 1985

Plesiomonas Diferencijalni agar (PDA) poznat i pod nazivom Inositol Brilliant Green Bile agar (IBB) (Schubert, 1977) je najefikasnija podloga opisana do danas, a koristi se i za izolaciju bakterija roda *Aeromonas* (Janda i Abbott, 1998; Janda, 2005; von Graevenitz i Bucher, 1983). Selektivnost podloge obezbeđuju žučna so i brilijant zeleno koji inhibiraju rast gram pozitivnih bakterija, a diferencijalna komponenta je mezo-inozitol. Kolonije vrste *P. shigelloides* su ružičasto obojene, dok predstavnici roda *Aeromonas* formiraju prozirne kolonije. Kako pojedini sojevi koliformnih bakterija takođe mogu formirati ružičasto obojene kolonije, neophodno je sprovesti dodatne testove kako bi se potvrdilo da je reč o vrsti *P. shigelloides* (von Graevenitz i Bucher, 1983). Millership i Chattopadhyay (1984) modifikuju PDA podlogu izbacujući inozitol kao diferencijalnu komponentu kako bi oksidaza test mogao da bude izvođen direktno na petri ploči sa izraslim kolonijama. Modifikovanu podlogu nazivaju Bile salts brilliant green agar. Diferencijalne karakteristike XLD agara koriste Miller i Koburger (1986b) i tako razvijaju novu podlogu pod nazivom *Plesiomonas* agar (PA). U sastav pomenute podloge kao diferencijalna komponenta ulaze lizin, manitol, arabinoza i indikator fenol crveno. Usled dekarboksilacije lizina i fermentacije vrlo male količine inozitola koji je takođe prisutan u podlozi, *P. shigelloides* formira svetlo roze kolonije, dok kontaminantne bakterije vršeći fermentaciju manitola i arabinoze obrazuju crvenkaste kolonije. Ipak, svetlo roze kolonije, mada

nešto prozirnije u odnosu na kolonije *P. shigelloides*, na PA podlozi mogu formirati i vrste roda *Pseudomonas* pa su neophodni dodatni testovi kako bi se potvrdilo da je reč o vrsti *P. shigelloides*.

Za obogaćenje uzoraka radi izolacije vrste *P. shigelloides*, najčešće se koristi alkalna peptonska voda (APW) koja se pokazala i kao najefikasnija kod uzoraka sa većom brojnošću koliformnih bakterija (von Graevenitz i Bucher, 1983). U upotrebi su još i Tetratonat bujon sa i bez dodatka joda, Gram-negativni (GN) bujon i bujon sa peptonom i žuči (Bile peptone broth) (Janda i sar., 2016; González-Rey, 2003).

Pored izolacije na specifičnim hranljivim podlogama, za uspešnu identifikaciju vrste *P. shigelloides* klasičnim biohemijskim metodama značajne su sledeće osobine: prisustvo enzima citohrom oksidaze, fermentacija glukoze bez produkcije gasa, dekarboksilacija lizina i ornitina kao i pozitivan test dihidrolaze arginina. Navedene osobine diferenciraju vrstu *P. shigelloides* od drugih vrsta iz familije *Enterobacteriaceae* kao i od oksidaza pozitivnih bakterija koje pripadaju rodovima *Aeromonas* i *Vibrio* (Janda, 2005).

1.6 Komercijalni testovi u identifikaciji vrste *Plesiomonas shigelloides*

U cilju identifikacije vrste *P. shigelloides* pored klasičnih biohemijskih metoda u upotrebi su i komercijalni API testovi API®20E, API®10S, RAPID 20E™, API 50CHE, ID 32E i RAPID ID32E (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francuska) (slika 1.6). Pre primene API testa na karakterističnim kolonijama se sprovode tzv. orijentacioni testovi koji podzumevaju utvrđivanje morfologije ćelije, bojenje po Gramu, oksidaza test i oksidativno fermentativni test (Anon, 2016). Određeni broj sojeva *P. shigelloides* je identifikovan korišćenjem automatizovanih identifikacionih sistema poput Vitek 2 sistema (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francuska) (Ling i sar., 2001), MicroScan Walk/Away 96 sistema (DadeBehring, Inc., West Sacramento, SAD) (O’Hara i Miller, 2002) i Phoenix 100 ID/AST sistema (Becton Dickinson, Sparks, SAD) (O’Hara, 2006).



Slika 1.6 Test API®20E sa karakterističnim reakcijama za vrstu *P. shigelloides* (Nilsson, 2006)

1.7 Molekularne metode u identifikaciji i genotipizaciji vrste *Plesiomonas shigelloides*

U cilju identifikacije i detekcije vrste *P. shigelloides* osmišljeni su PCR testovi kod kojih se oligonukleotidni prajmeri koriste za umnožavanje visoko specifičnog regiona 23S rRNK gena (González-Rey i sar., 2000; Gu i Levin, 2006) i gena koji kodira receptor na površini ćelije *P. shigelloides* odgovoran za transport hem-gvožđa (*hugA*) (Herrera i sar., 2006). Pored toga, Meng i saradnici (2012) su osmislili test za detekciju *hugA* gena metodom izotermalne amplifikacije nukleinskih kiselina (eng. Loop mediated isothermal amplification – LAMP). Za identifikaciju vrste *P. shigelloides* pored tehnika PCR-a koristi se tehnika sekvenciranja gena 16S rRNK i gena koji kodira ATPazno mesto na DNK žirazi (*gyrB*) (Janda i Abbott, 2007; Nisha i sar., 2014; Wang i sar., 2013).

U cilju određivanja genetičke varijabilnosti odnosno genetičke bliskosti i udaljenosti sojeva *P. shigelloides* do sada su korišćene tehnike nasumične amplifikacije polimorfne DNK (RAPD-PCR), enterobakterijskih ponavljajućih međugenskih palindromskih sekvenci (ERIC-PCR), ponavljajućih vangenskih palindromskih sekvenci (REP-PCR) i gel elektroforeze u pulsirajćem polju (PFGE) (González-Rey i sar., 2011; Gu i sar., 2006).

1.8 Osetljivost vrste *Plesiomonas shigelloides* na antibiotike i problem rezistencije

Velika većina sojeva *P. shigelloides* ispoljava osetljivost na hloramfenikol, kotrimoksazol, hinolone, cefalosporine, aztreonam i imipenem (Auckenthaler i sar., 1986; Clark i sar., 1990; Kain i Kelly, 1989b; Reinhardt i George, 1985; Stock i Wiedemann, 2001; Visitsunthorn i Komolpis, 1995; von Graevenitz i Bucher, 1982). Rezultati variraju kada su u pitanju tetraciklin i aminoglikozidi. Tako se procenat sojeva *P. shigelloides* osetljivih na tetraciklin kreće od 33% do 100% (Chen i sar., 2013; Wong i sar., 2000; Stock i Wiedemann, 2001). Jun i saradnici (2011) su kod multiplerezistentnog soja *P. shigelloides* izolovanog iz azijske arovane (*Scleropages formosus*) dokazali prisustvo *tetA* gena koji je odgovoran za rezistenciju bakterija na tetraciklin. Među aminoglikozidima, osetljivost na gentamicin je u rasponu od 63% do 100% (Chen i sar., 2013; Stock i Wiedemann, 2001), na tobramicin od 36% do 97% (Clark i sar., 1990; Kain i Kelly, 1989b; Stock i Wiedemann, 2001), na amikacin od 54% do 99% (Chen i sar., 2013; Stock i Wiedemann, 2001; Bravo i sar., 2009) i na netilmicin od 94% do 100% (Kain i Kelly, 1989b; Stock i Wiedemann, 2001; Visitsunthorn i Komolpis, 1995). Smatra se da su za rezistenciju na aminoglikozide kod *P. shigelloides* odgovorni tzv. aminoglikozid modifikujući enzimi koji posredstvom enzimske inaktivacije blokiraju dejstvo pomenutih jedinjenja (Shaw i sar., 1993).

Tabela 1.8 Antibiotička osetljivost sojeva *P. shigelloides* (Janda i sar., 2016)

Antibiotik	% rezistentnih sojeva	Navod
Ampicilin	72-92	Chen i sar., 2013; Wong i sar., 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Piperacilin	8	Stock i Wiedemann, 2001
Amoksicilin/ klavulanska kiselina	0-3	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Cefoperazon/sulbaktam	0	Chen i sar., 2013
Ampicilin/sulbaktam	0	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Piperacilin/tazobaktam	0	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Cefazolin	0-16	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Kefuroksim	0-3	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Ceftazidim	0-31	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann; Bravo i sar., 2009
Cefotaksim	0-1	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Cefepim	2-8	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Cefoksitin	0-6	Chen i sar., 2013; Bravo i sar., 2009
Ceftriakson	0	Wong i sar., 2000; Stock i Wiedemann, 2001; Bravo i sar., 2009
Cefoperazon	0-22	Stock i Wiedemann, 2001; Bravo i sar., 2009
Aztreonam	4-7	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann; Bravo i sar., 2009
Imipenem	0	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Meropenem	0	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Amikacin	1-46	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann; Bravo i sar., 2009
Gentamicin	0-37	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Ciprofloksacin	0-9	Chen i sar., 2013; 2013; Stock i Wiedemann, 2001
Levofloksacin	0-3	Chen i sar., 2013; Wong i sar., 2000
Ofloksacin	0	Wong i sar., 2000; Stock i Wiedemann, 2001
Trimetropim /sulfametoksazol	2-47	Chen i sar., 2013; Wong i sar., 2000; Stock i Wiedemann, 2001; Bravo i sar., 2009
Tetraciklin	0-67	Chen i sar., 2013; Wong i sar., 2000; Stock i Wiedemann, 2001; Bravo i sar., 2009
Hloramfenikol	0-5	Wong i sar., 2000; Stock i Wiedemann, 2001
Nitrofurantoin	0	Stock i Wiedemann, 2001; Bravo i sar., 2009
Eritromicin	19-58	Stock i Wiedemann, 2001; Bravo i sar., 2009

Kao i ostali članovi familije *Enterobacteriaceae* sa izuzetkom vrsta roda *Salmonella*, velika većina sojeva *P. shigelloides* poseduje β -laktamazu i ispoljava rezistenciju na širok spektar penicilina (ampicilin, piperacilin, tikarcilin, mezlocilin, karbencilin, azlocilin) (Stock i Wiedemann, 2001; Avison i sar., 2000). Međutim, osetljivost bakterije se registruje prilikom primene kombinacije β -laktamskih

antibiotika amoksicilina, cefoperazona, ampicilina i piperacilina sa inhibitorima β -laktamaze klavulanskom kiselinom, sulbaktamom i tazobaktamom (tabela 1.8) (Stock i Wiedemann, 2001; Chen i sar., 2013). Kod primene mikrodilucione metode uočena je smanjena osetljivost sojeva *P. shigelloides* na cefalosporine pri većoj brojnosti ćelija u inokulumu (Wiegand i Burak, 2004; Stock i Wiedemann, 2001). Iako mehanizam rezistencije sojeva *P. shigelloides* na β -laktamske antibiotike još uvek nije dovoljno istražen pretpostavlja se da je pomenuta pojava posledica formiranja filamentoznih formi veličine od 100 μ m do 2 mm na dnu velova mikrotitar ploče (Wiegand i Burak, 2004).

Pojava multirezistentnih sojeva *P. shigelloides* sve češće se beleži u literaturi. Bravo i saradnici (2009) su registrovali multirezistenciju kod 12 od ukupno 54 soja (22,2%) poreklom iz fecesa pacijenata sa akutnom dijarejom. Otpornost je u ovom slučaju najčešće bila ispoljena na grupu antibiotika ampicilin/tetraciklin/kanamicin. Gore pomenuti soj kod koga su Jun i saradnici (2011) ustanovili prisustvo *tetA* gena pored tetraciklina ispoljio je rezistenciju i na amoksicilin/klavulansku kiselinu, ampicilin, hloramfenikol i trimetropim/sulfametoksazol. Najdrastičniji primer prijavili su Liu i saradnici (2015) kada je kod soja *P. shigelloides* PYS1 registrovana rezistencija na čak 20 od 31 antibiotika iz grupe makrolida (acetilspiramicin, midekamicin, roksitromicin), β -laktamskih antibiotika (amoksicilin, oksacilin, penicilin, ampicilin), tetraciklina (tetraciklin), hinolona (norfloksacin, enflofloksacin, nalidiksinska kiselina, lomefloksacin, enoksacin), aminoglikozida (spektinomycin, amikacin, neomicin, tobramicin, gentamicin), glikopeptida (vankomicin) i linkozamida (linkomicin).

Zbog sve učestalije rezistencije bakterija na antibiotike u poslednje vreme se sve više ističe mogućnost primene alternativnih metoda u kontroli brojnosti bakterija. Probiotici, bakteriocini, nano antimikrobni materijali, antimikrobni peptidi, etarska ulja i predatorske vrste bakterija samo su neka od mogućih rešenja. Pored toga, upotreba bakteriofaga kao antimikrobnih agenasa je ponovo u žiži interesovanja naučne javnosti posle jednog veka od njihovog otkrića i rađanja ideje o njihovoj upotrebi protiv patogena.

1.9 Otkriće bakteriofaga i koncept „živog leka“

Otkriće posebne grupe virusa koja parazitira na bakterijskim ćelijama vezuje se za imena nekoliko naučnika i lekara koji su krajem XIX i početkom XX veka opisali antibakterijsku aktivnost od strane tada nepoznatih činilaca. Britanski bakteriolog Ernest Hankin je 1896. godine ispitivao uzorke vode reka Gang i Jamuna u Indiji i otkrio prisustvo neidentifikovanih termolabilnih supstanci koje

prolaze kroz porcelanske filtere i ispoljavaju antibakterijsku aktivnost prema vrsti *Vibrio cholerae* (Sulakvelidze i sar., 2001). Sličan fenomen prilikom istraživanja bakterije *Bacillus subtilis* primećuje dve godine kasnije ruski lekar i bakteriolog Nikolaj Fjodorovič Gamaleja (Sulakvelidze i sar., 2001). Pretpostavku da je fenomen izazvan virusima, prvi iznosi engleski bakteriolog Frederik Tvort (1915) koji je ustanovio da neidentifikovani agens za svoje umnožavanje zahteva prisustvo bakterija. Dve godine kasnije francusko-kanadski mikrobiolog Feliks d’Herelle uočava da dodatak filtrata poreklom iz fecesa pacijenata obolelih od dizenterije izaziva lizu bakterija u tečnoj podlozi i stvaranje prozirnih zona na čvrstim hranljivim podlogama inokulisanim bakterijskim kulturama. D’Herelle je bio ubeđen da su za pomenute pojave odgovorni nevidljivi mikroorganizmi koje kasnije naziva bakteriofagima (Sulakvelidze i sar., 2001).

Nedugo posle otkrića bakteriofaga D’Herelle sa saradnicima koristi bakteriofage u tretiranju tifusa živine, hemoragične septikemije goveda i šigeloze i kuge kod ljudi (d’Herelle, 1926; Summers, 1999), a uspeh koji postiže podstiče komercijalnu proizvodnju preparata bakteriofaga koji se koriste protiv različitih infekcija kako u Evropi tako i u Sjedinjenim Američkim Državama (Summers, 2001). Međutim, otkriće penicilina i uspeh antibiotske terapije u godinama za vreme i posle Drugog svetskog rata smanjuju interesovanje za primenu faga u lečenju bakterijskih infekcija (Sulakvelidze i sar., 2001). Danas postoji veliki broj radova na temu upotrebe faga u cilju kontrole brojnosti bakterija (Wang i sar., 2006; Heo i sar., 2009; Knezevic i sar., 2009; Seed i Dennis, 2009; Carmody i sar., 2010; Debarbieux i sar., 2010; Fukuda i sar., 2012; Han i sar., 2013), ali i pored dobrih rezultata i dalje ne postoji jedinstven stav naučne javnosti o njihovoj široj primeni kao antimikrobnih agenasa. Ohrabruje činjenica da se u pojedinim zemljama istočne Evrope proizvode i primenjuju preparati bakteriofaga protiv različitih infektivnih bolesti. Tako farmaceutska kompanija „Microgen“ (НПО Микроген) sa sedištem u Moskvi proizvodi preparate koji se primenjuje protiv infekcija izazvanih bakterijama *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *K. pneumonia*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus spp.* i *Enterococcus sp.* (slika 1.9) (Microgen.ru, 2016). Pored toga, Američka agencija za hranu i lekove (FDA – eng. Food and Drug Administration) odobrila je preprat za ograničavanje rasta i kontaminacije hrane bakterijom *Listeria monocytogenes* (ListShield™), preprat za dekontaminaciju domaćih životinja protiv bakterija *E. coli* (EcoShield™) i *Salmonella spp.* (SalmoFresh™) kao i preprat za tretiranje plodova biljaka u cilju sprečavanja kvarenja uzrokovanog bakterijama (Agryphage™). Preprat bakteriofaga predviđen kao dodatak organskom uzgoju hrane (LISTEX™) nedavno je odobren i od strane Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA - eng. European Food and Safety Authority) kao i od sličnog regulatornog tela Australije i Novog Zelanda (Klinčić, 2016).



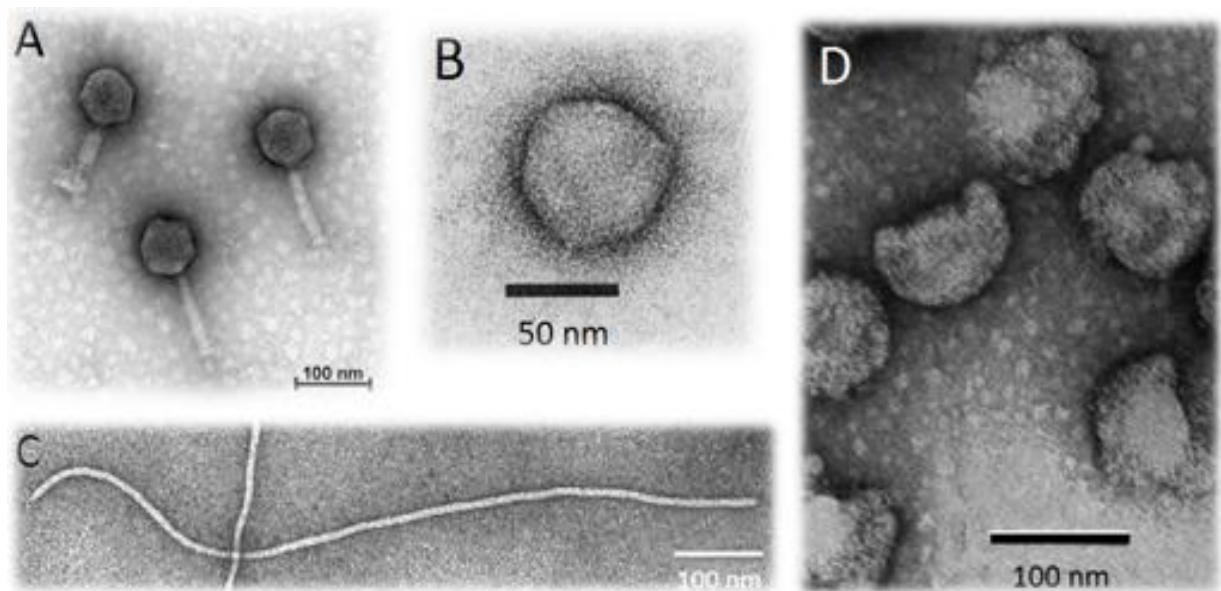
Slika 1.9 Preparati bakteriofaga koji se koriste za suzbijanje infekcija izazvanih različitim bakterijama

Neke od glavnih prednosti upotrebe bakteriofaga u odnosu na upotrebu antibiotika jesu ređa pojava rezistencije kod bakterija, njihova visoka selektivnost, umnožavanje i perzistencija samo u prisustvu bakterije domaćina, jeftinija i jednostavnija proizvodnja. Sa druge strane javljaju se i nedostaci poput neophodne provere litičke efikasnosti bakteriofaga na odgovarajućem izolatu bakterije pre same aplikacije, mogućnosti lizogene konverzije bakterije, oslobađanja visokih koncentracija bakterijskih endotoksina nakon lize bakterijskih ćelija, problema vezanih za aplikaciju faga itd. (Payne i Jansen, 2001; Bull i sar., 2002; Payne i Jansen, 2003). Endolizini, holini i drugi proteini kodirani u genomu bakteriofaga danas se takođe intenzivno ispituju kao mogući antibakterijski agensi a u cilju produženja roka trajanja namirnica, unapređenja razvoja domaćih životinja i zaštite bilja (Jassim i Limoges, 2014; O'Flaherty i sar., 2009; Schmelcher i sar., 2012). Pored primene faga kao alternativnih antimikrobnih agenasa sve više se govori i o njihovoj upotrebi u dijagnostičke svrhe. Tako specifičnost faga za pojedine domaćine omogućava njihovo korišćenje za tipizaciju bakterijskih vrsta i detekciju patogenih bakterija (Ronner i Cliver, 1990; Schofield i sar., 2012).

1.10 Građa i morfologija bakteriofaga

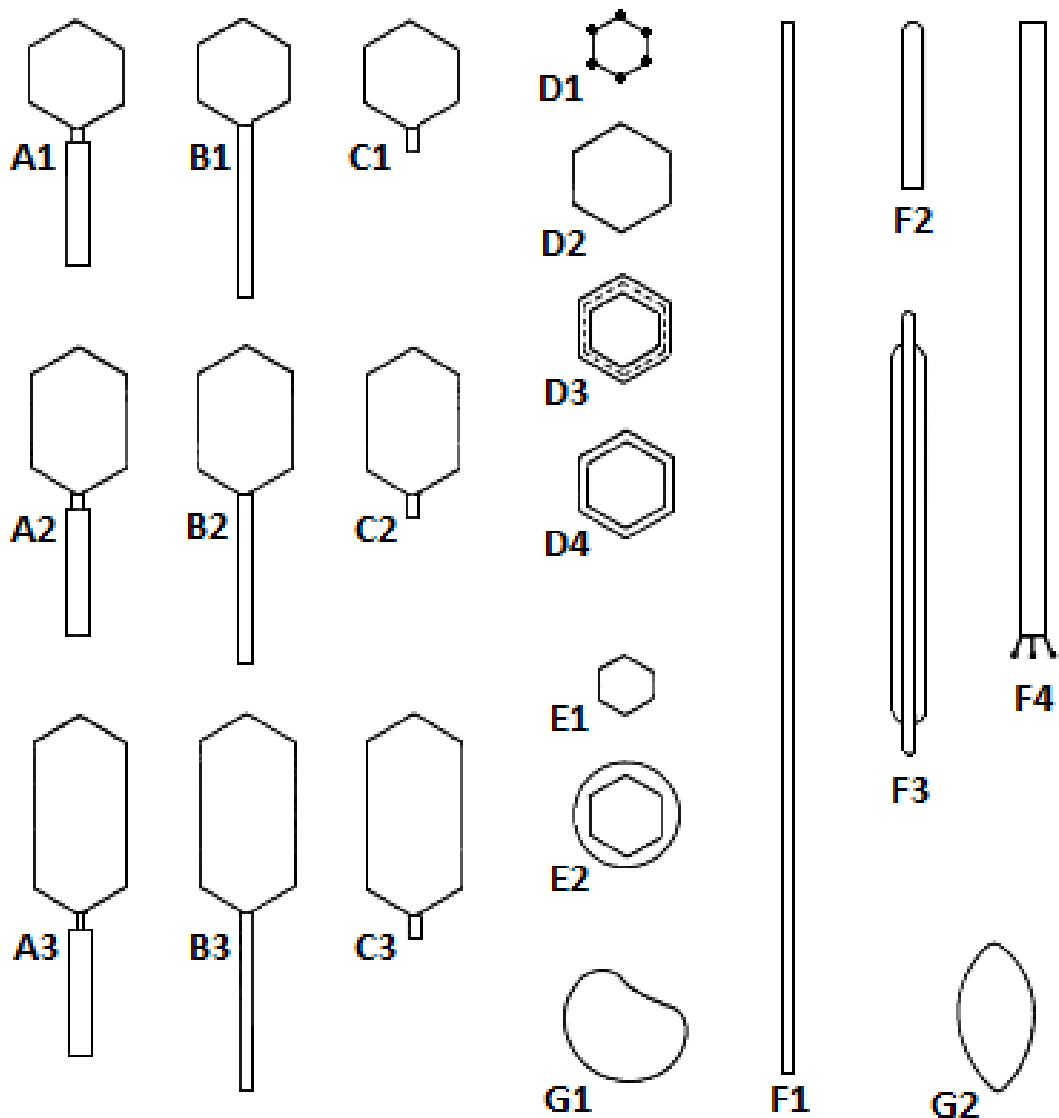
Zajednički plan građe za sve zrele infektivne čestice bakteriofaga podrazumeva prisustvo nukleinske kiseline okružene proteinskim omotačem. Nukleinski materijal bakteriofaga može biti u

obliku DNK ili RNK koje mogu biti jednolančane ili dvolančane. Proteinski omotač (kapsid) je izgrađen iz proteinskih subjedinica, kapsomera. Pored kapsida fagi mogu posedovati i dodatni lipidni omotač. Velika većina bakteriofaga koji su do danas izolovani i opisani imaju kompleksnu građu viriona kod kojih se razlikuju strukture označene kao glava i rep. Pored toga opisani su fagi kubične, filamentozne i pleomorfne građe (slika 1.10.1).



Slika 1.10.1 Bakteriofagi kompleksne (A) (Merabishvili i sar., 2014), kubične (B) (Nagy, 1974), filamentozne (C) (Gray i sar., 1981) i pleomorfne građe (D) (Poddar i sar., 1985).

Dugo vremena je klasifikacija bakteriofaga bila bazirana isključivo na morfologiji viriona. Klasifikaciona šema koju je predložio Bradley (1967) razlikovala je šest morfotipova bakteriofaga. Nešto izmenjena i dopunjena šema zasnovana na morfologiji i danas je u upotrebi, a pored sedam osnovnih morfotipova (A-G) sadrži i određen broj podtipova (slika 1.10.2). Prema pomenutoj šemi svi fagi sa repom su svrstani u morfotipove A (dug i kontraktilan rep), B (dug i nekontraktilan fleksibilan rep) i C (kratak rep) i odgovarajuće podtipove u zavisnosti od oblika glave. Morfotipovima D i E su označeni fagi sa kubičnom simetrijom od kojih neki poseduju kompleksne kapside sa lipidnim komponentama i dodatnim lipidnim omotačem. Pored toga, nukleinski materijal kod faga iz grupe D je u obliku DNK za razliku od faga iz grupe E čiji kapsidi sadrže RNK. Fagi sa spiralnom simetrijom odgovaraju morfotipu F kod koga se takođe javljaju fagi sa lipidnim komponentama i dodatnim omotačem. Fagi sa lipidnom ovojnicom i bez kapsida pleomorfne građe predstavljaju morfotip G (Ackermann, 2001).



Slika 1.10.2 Klasifikaciona šema morfortipova bakteriofaga (Ackermann, 2001)

1.11 Taksonomija bakteriofaga

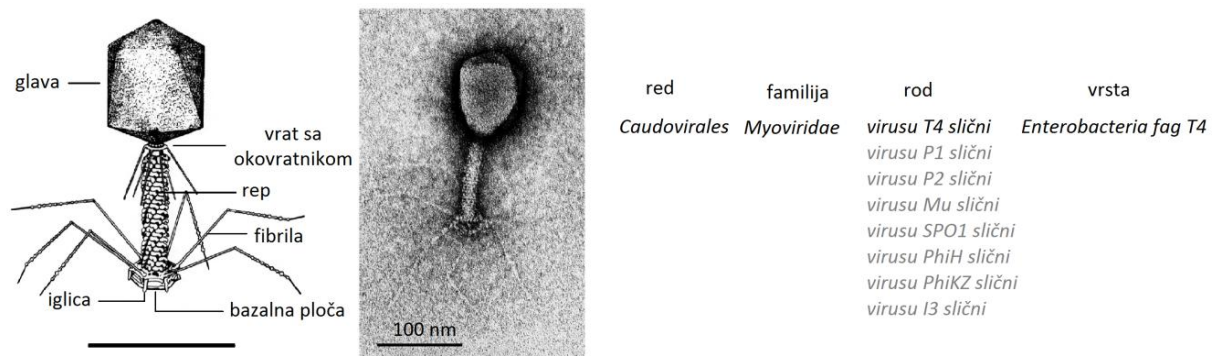
U taksonomiji bakteriofaga danas se pored morfologije i tipa nukleinske kiseline koriste i drugi kriterijumi poput fizičko-hemijskih osobina nukleinskog materijala i kapsida, testova inaktivacije, specifičnosti za pojedinu bakterijsku vrstu (Ackermann, 2009). Prema devetom izveštaju Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa svi virusi bakterija su organizovani u okviru jednog reda (*Caudovirales*) i 7 posebnih familija (King i sar., 2012).

1.11.1 Red *Caudovirales*

Fagi u okviru reda *Caudovirales* imaju kompleksnu građu viriona sa strukturama označenim kao glava i rep (*Cauda*, lat. rep). Glavu čini kapsid pravilnog ili izduženog ikozaedarnog oblika u kome je smeštena linearna dvolančana DNK. Veličina genoma iznosi od 18 do 500 kbp. Broj kapsomera u okviru kapsida varira između 42 i 522. Kod izometričnih kapsida prečnik iznosi od 45 do 170 nm, a maksimalna izmerena dužina kapsida izduženog ikozaedarnog oblika je 230 nm. Rep je proteinske prirode u formi spirale, šestozračne ili ređe trozračne simetrije, a njegova dužine iznosi od 3 do 825 nm. Distalni deo repa je odgovoran za vezivanje za površinske receptore na površini bakterijske ćelije i obično sadrži bazalnu ploču sa terminalnim iglicama ili fibrilima. Pojedini virusi mogu sadžati i strukturu označenu kao okovratnik sa različitim dodacima. Broj strukturnih proteina faga varira između 7 i 49, a pored proteina kod malog broja faga iz reda *Caudovirales* su detektovani i glikoproteini, glikolipidi i heksozamini i polisaharidi. Red obuhvata familije *Myoviridae*, *Siphoviridae* i *Podoviridae* (King i sar., 2012).

1.11.1.1 Familija *Myoviridae*

Bakteriofagi u okviru familije *Myoviridae* poseduju dugačak kontraktilan rep (myo, grč. $\mu\upsilon\omicron$ – mišić, odnosi se na rep koji ima mogućnost kontrakcije) (slika 1.11.1.1). Rep se sastoji iz jezgra koje je građeno od naslaganih prstenova sa po šest subjedinica i spoljašnjeg kontraktalnog helikoidnog omotača. Za vreme kontrakcije subjednice omotača klize jedna preko druge, omotač se skraćuje i širi, što jezgro repa dovodi u kontakt sa plazma membranom bakterijske ćelije.

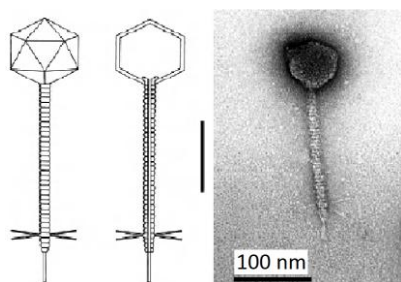


Slika 1.11.1.1 Građa i taksonomija bakteriofaga iz familije *Myoviridae*, primer *Enterobacteria fag T4* (modifikovano King i sar., 2011)

Gradivne komponente glave i repa čine dve zasebne celine. U poređenju sa bakteriofagima koji pripadaju familijama *Siphoviridae* i *Podoviridae*, fagi familije *Myoviridae* imaju krupniji glaveni deo, gradivne molekule veće molekulske mase i veći genom. Pored toga ispoljavaju veću osetljivost na zamrzavanja i osmotski šok. U okviru familije *Myoviridae* nalazi se osam rodova sa preko 90 vrsta bakteriofaga koji su klasifikovani na osnovu razlika u organizaciji genoma, mehanizmu pakovanja DNK, prisustvu ili odsustvu neuobičajnih baza i DNK polimeraza (King i sar, 2012).

1.11.1.2 Familija *Siphoviridae*

Bakteriofagi familije *Siphoviridae* imaju dugačak nekontraktilni rep (65 – 570 nm x 7-10 nm) koji je kod velikog broja predstavnika savitljiv (syphon, grč. σιφόνι – cev, odnosi se na dugačak rep oblika cevi) (slika 1.11.1.2). Rep je građen iz naslaganih diskova koji su građeni iz šest subjedinica. Glava i rep se sklapaju odvojeno. U okviru familije *Siphoviridae* nalazi se devet rodova sa preko 300 vrsta bakteriofaga, a klasifikacija je zasnovana na razlikama u organizaciji genoma, mehanizmu pakovanja DNK, prisustvu ili odsustvu DNK polimeraza (King i sar., 2012).

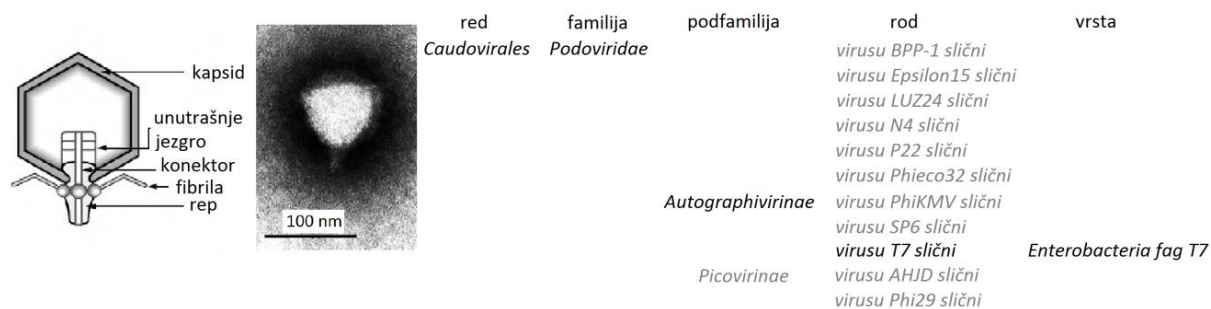


red	familija	rod	vrsta
<i>Caudovirales</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>virusu Lambda slični</i>	<i>Enterobacteria fag Lambda</i>
		<i>virusu T1 slični</i>	
		<i>virusu T5 slični</i>	
		<i>virusu L5 slični</i>	
		<i>virusu c2 slični</i>	
		<i>virusu PsiM1 slični</i>	
		<i>virusu PhiC31 slični</i>	
		<i>virusu N15 slični</i>	
		<i>virusu SPbeta slični</i>	

Slika 1.11.1.2 Građa i taksonomija bakteriofaga iz familije *Siphoviridae*, primer *Enterobacteria fag Lambda* (King i sar., 2011)

1.11.1.3 Familija *Podoviridae*

Bakteriofagi u okviru familije *Podoviridae* imaju kratak i nekontraktilan rep čije dimenzije iznose oko 20 x 8 nm (podos, grč. πους – stopalo, odnosi se na kratak rep koji izgledom podseća na stopalo) (slika 1.11.1.3). Familija *Podoviridae* trenutno obuhvata dve podfamilije (*Autographivirinae* i *Picovirinae*) i 6 zasebnih rodova sa preko 40 vrsta, a klasifikacija je obavljena na osnovu dostupnih proteomskih podataka povezanih sa biološkim svojstvima virusa koji uključuju morfologiju, organizaciju genoma, mehanizam pakovanja DNK i prisustvo ili odsustvo gena za DNK ili RNK polimerazu (King i sar., 2012).



Slika 1.11.1.3 Građa i taksonomija bakteriofaga iz familije *Podoviridae*, primer *Enterobacteria fag T7* (modifikovano King i sar., 2012)

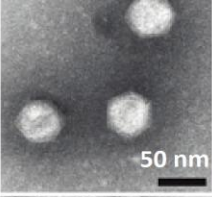
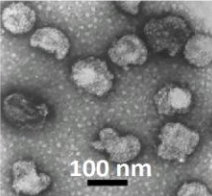
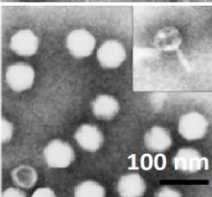

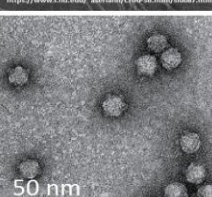
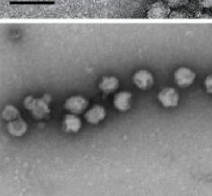

1.11.2 Familije bakterijskih virusa van reda *Caudovirales*

Manji broj bakteriofaga razvrstan je u okviru familija *Corticoviridae* (1 rod sa jednom vrstom), *Plasmaviridae* (1 rod sa jednom vrstom), *Tectiviridae* (1 rod sa četiri vrste i jednom vrstom bez kategorije roda), *Inoviridae* (2 roda sa preko 40 vrsta), *Microviridae* (1 rod sa 5 vrsta i jedna podfamilija sa 3 roda i 7 vrsta), *Cystoviridae* (1 rod sa jednom vrstom) i *Leviviridae* (2 roda sa 4 vrste) (slika 1.11.2). Zajednička karakteristika bakteriofaga navedenih familija je odsustvo strukture označene kao rep.

Familiji *Corticoviridae* pripadaju ikozaedarni fagi sa kompleksnim kapsidom prečnika oko 60 nm. Kapsid je izgrađen iz dva sloja proteina između kojih se nalazi sloj lipida. Lipidi koji se nalaze između dva sloja proteina grade lipidni dvosloj i čine oko 14% mase viriona. Na temenima ikozaedarnog kapsida nalaze se iglice koje imaju ulogu u vezivanju viriona za receptore na ćelijskom zidu bakterije. Genom ovih faga je u obliku cirkularne dvolančane nesegmentisane DNK (Männistö i sar., 1999; King i sar., 2012).

Bakteriofagi u okviru familije *Plasmaviridae* su pleomorfne građe. Poseduju dodatni omotač lipoproteinske prirode. Veličina viriona varira između 50 i 125 nm. Genom je kondenzovan, nesegmentisan i u obliku cirkularne dvolančane super zavojnice DNK (Büchen-Osmond, 2003). Virion grade najmanje 4 proteina (približno 64, 61, 58 i 19 kDa). Omotač virusa je vrlo sličnog sastava sa membranom bakterijske ćelije i ispitivanja ukazuju da je u formi lipidnog dvosloja (King i sar., 2012).

Familiji *Tectiviridae* pripadaju bakteriofagi ikozaedarnog oblika sa dvoslojnim kapsidom prečnika oko 60 nm. Unutrašnji sloj kapsida građen je iz proteina i lipida. Na površini kapsida nalaze se savitljive iglice proteinske prirode koje su odgovorne za vezivanje viriona za receptore na površini bakterijske ćelije. Nukleinski materijal je u obliku linearne dvolančane DNK. Nakon adsorpcije virioni formiraju strukturu nalik repu za koju se veruje da ima ulogu u ubacivanju nukleinskog materijala u ćeliju domaćina (San Martín i sar., 2002).

	familija <i>Corticoviridae</i>	rod <i>Corticovirus</i>	vrsta <i>Pseudoalteromonas fag PM2</i>
izvor fotografije: Harrison i sar., 1971			
	familija <i>Plasmaviridae</i>	rod <i>Plasmavirus</i>	vrsta <i>Achleplasma fag L2</i>
izvor fotografije: Poddar i sar., 1985			
	familija <i>Tectiviridae</i>	rod <i>Tectivirus</i>	vrsta <i>Enterobacteria fag PRD1</i>
izvor fotografije: Olsen i sar., 1974			
	familija <i>Inoviridae</i>	rod <i>Inovirus</i> <i>Plectrovirus</i>	vrsta <i>Enterobacteria fag M13</i>
izvor fotografije: https://www3.nd.edu/~aseriann/CHAP5B.html/sld087.htm			
	familija <i>Microviridae</i>	subfamilija <i>Gokushovirinae</i>	rod <i>Microvirus</i> <i>Chlamydiamicrovirus</i> <i>Bdellomicrovirus</i> <i>Spiromicrovirus</i>
izvor fotografije: Hayashi, 1978			
	familija <i>Cystoviridae</i>	rod <i>Cystovirus</i>	vrsta <i>Pseudomonas fag phi6</i>
izvor fotografije: https://phageiary.com/phage/phi6			
	familija <i>Leviviridae</i>	rod <i>Levivirus</i> <i>Allolevivirus</i>	vrsta <i>Enterobacteria fag MS2</i>
izvor fotografije: Rohrmann i Krueger, 1970			

Slika 1.11.2 Familije bakteriofaga koje ne pripadaju redu *Caudovirales* sa svojim predstavnicima

Familiju *Inoviridae* čine filamentozni fagi prečnika 7 nm i dužine od 700 do 2000 nm (ino, grč. ίνα – vlakno). Nukleinski materijal je pozitivna jednolančana DNK u cirkularnoj formi. Nukleokapsid gradi veliki broj spiralno raspoređenih kapsomera (glavni protein) i manji broj proteina koji su raspoređeni na krajevima. Na virionima se razlikuje zaravnjeni kraj i suženi kraj sa nastavcima koji imaju ulogu u adsorpciji. Fagi u okviru familije *Inoviridae* se vezuju za bakterijsku ćeliju preko F pila.

Replikacija DNK se odvija preko dvolančane cirkularne forme. Novosintetisani genomi se pakuju u proteinske kapside u zoni ćelijske membrane nakon čega se fagi oslobađaju ekstruzijom. Na taj način biva oslobođeno preko 300 generacije virusa pri čemu ne dolazi do lize bakterijske ćelije (Kutter i Sulakvelidze, 2005).

Bakteriofagi u okviru familije *Microviridae* poseduju virione sfernog oblika, ikozaedarne simetrije, prečnika oko 30 nm. Nukleinski materijal je pozitivna jednolančana DNK u cirkularnoj formi (King i sar., 2012).

Familija *Cystoviridae* obuhvata fage sfernog oblika sa dodatnim omotačem i iglicama kojima se fagi vezuje za receptore na površini bakterijske ćelije. Prečnik viriona iznosi oko 85 nm. Genom se sastoji iz tri segmenta linearne dvolančane RNK (King i sar., 2012).

Bakteriofagi u okviru familije *Leviviridae* su sfernog oblika, ikozaedarne simetrije. Bez spoljašnjeg su omotača slični po građi polivirusima. Prečnik viriona iznosi oko 26 nm. Nukleinski materijal faga je pozitivna jednolančana RNK u linearnoj formi koja kodira četiri prepoklapajuća gena. Svi fagi u okviru familije za vezivanje i infekciju bakterijske ćelije zahtevaju prisustvo pila (King i sar., 2012, Kutter i Sulakvelidze, 2005).

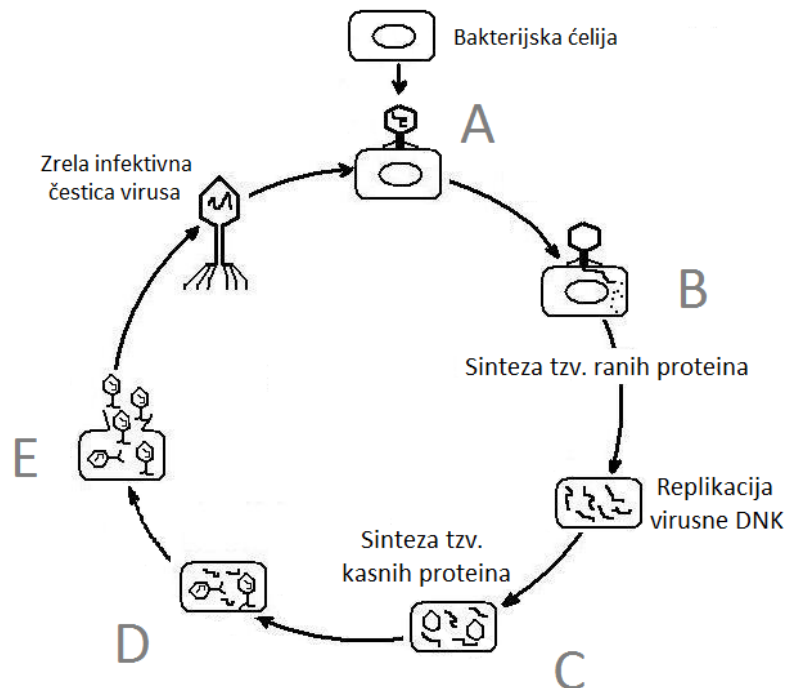
1.12 Životni ciklusi bakteriofaga

Bakteriofagi pokazuju dva osnovna tipa životnih ciklusa, litički i lizogeni. Litički ciklus podrazumeva multiplikaciju bakteriofaga unutar bakterijske ćelije, a potom lizu i smrt bakterijske ćelije nakon oslobađanja bakteriofaga. Na hranljivim podlogama sa konfluentnim bakterijskim rastom litička infekcija se manifestuje prozirnim plakama. Bakteriofagi koji ulaze isključivo u litički ciklus nazivaju se virulentnim.

Ciklus započinje adsorpcijom (slika 1.12.1 A) koja podrazumeva vezivanje bakteriofaga za površinu bakterijske ćelije. U vezivanju učestvuju proteini bakteriofaga koji prepoznaju specifične receptore na površini bakterijske ćelije (lipopolisaharidi, membranski proteini, fimbrije, flagele) (Guttman i sar., 2005). Kod nekih bakteriofaga proces vezivanja zahteva prisustvo dve vrste receptora i protiče u dve faze. Tako se fag T4 i njemu slični vezuju fibrilama za membranske proteine koji predstavljaju tzv. primarne receptore što dovodi do transformacije bazalne ploče i vezivanja iglica faga za lipopolisaharide ili sekundarne receptore na površini bakterijske ćelije (Lindberg, 1973). Pored toga, za uspešnu adsorpciju kod mnogih bakteriofaga je neophodno prisustvo kofaktora poput jona Ca^{2+} , Mg^{2+} ili nekih drugih dvovalentnih katjona (Rountree, 1951; Luria i Steiner, 1954; Rountree, 1955).

Nakon adsorpcije dolazi do ubacivanja nukleinskog materijala bakteriofaga u ćeliju domaćina i ovaj proces se označava kao penetracija (slika 1.12.1 B). Ubačeni nukleinski materijal faga je zaštićen na različite načine od nukleaza i restrikcionih enzima unutar bakterijske ćelije. Tako mnogi bakteriofagi imaju sposobnost cirkularizacije DNK pomoću lepljivih krajeva i terminalnih ponovaka. Pored toga, kao strategije zaštite nukleinskog materijala javljaju se i inhibicija nukleaza bakterija, neuobičajeni nukleotidi u genomu faga, gubitak mesta u genomu koje prepoznaju restrikcioni enzimi bakterija (Guttman i sar., 2005).

Nakon penetracije sledi faza multiplikacije (slika 1.12.1 C) u kojoj nukleinski materijal bakteriofaga služi kao matrica za sintezu virusnih proteina i replikaciju virusne nukleinske kiseline. Za procese replikacije i transkripcije DNK, fagi sa manjim DNK genomom koriste DNK i RNK polimeraze bakterije domaćina, dok fagi sa većom DNK poseduju gene koji kodiraju vlastite DNK i RNK polimeraze. Bakteriofagi koji nasledni materijal imaju u formi RNK, poseduju gene koji kodiraju RNK zavisnu RNK polimerazu (replikazu) (Fiers et al., 1976). Kod faga sa malim genomima (fam. *Microviridae*) ne postoji vremenska regulacija genske ekspresije i procesi transkripcije i translacije počinju ubrzo nakon penetracije nukleinske kiseline virusa (Fane i sar., 2010).



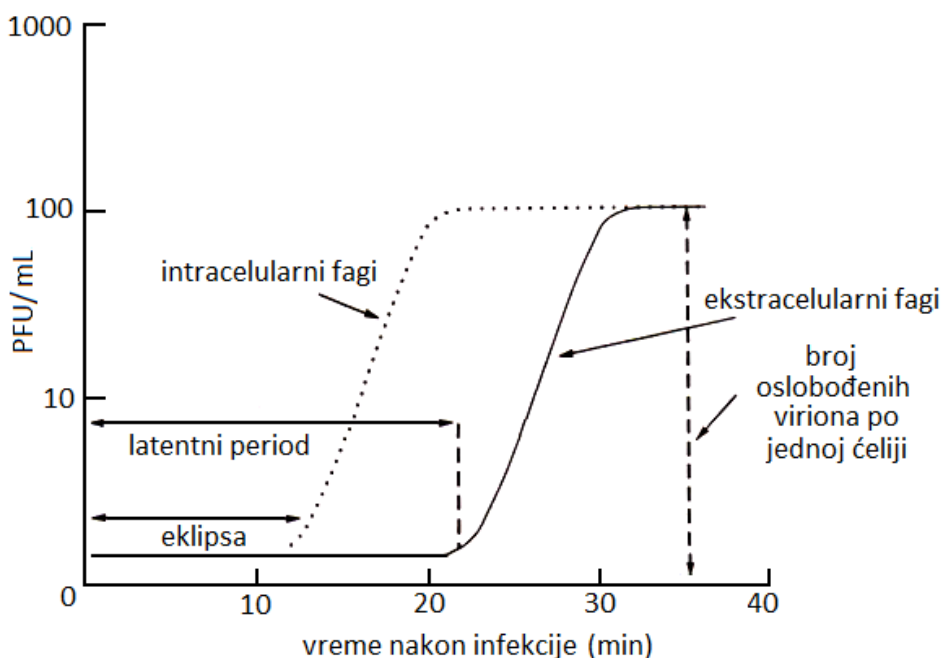
Slika 1.12.1 Litički ciklus bakteriofaga. Adsorpcija (A), penetracija (B), multiplikacija (C), maturacija (D) i oslobađanje bakteriofaga (E). Modifikovano (Peoi.org, 2016)

Nasuprot tome, multiplikacija faga koji poseduju veći genom odvija se u tri etape. Prva etapa podrazumeva produkciju enzima koji inhibiraju metaboličke procese bakterije (DNK replikaciju, RNK transkripciju i sintezu proteina) i započinju replikaciju virusne DNK koja se nastavlja i u drugoj etapi.

U trećoj ili poslednjoj etapi multiplikacije bakteriofaga odvija se sinteza strukturnih proteina i proteina koji učestvuju u sklapanju (tzv. *scaffold* proteini) i oslobađanju viriona iz bakterijske ćelije (Dokland, 1999).

Nakon multiplikacije sledi faza maturacije (slika 1.12.1 D) koja kod većine bakteriofaga podrazumeva pakovanje nukleinske kiseline u nepotpuno formirani kapsid na koji se zatim dodaju rep i fibrile (Aksyuk i Rossmann, 2011). Kod nekih bakterijskih virusa kapsid se formira naknadno oko nukleinskog materijala ili proces pakovanja nukleinskog materijala teče sinhronizovano sa formiranjem kapsida (Ackermann, 2006).

Poslednja faza litičkog ciklusa podrazumeva oslobađanje zrelih viriona (slika 1.12.1 E) i javlja se kao posledica liziranja bakterijske ćelije. U litičkom ciklusu bakteriofaga koji kao nasledni materijal imaju dvolančanu DNK do lize bakterijske ćelije dolazi usled aktivnosti virusnih endolizina koji vrše razgradnju mureina i holina koji su aktivatori pomenutog enzima. Nedavno je otkrivena i treća komponenta koja participira u razgradnji ćelijskog zida bakterija. Reč je o tzv. spanin kompleksu koji narušava integritet spoljašnje membrane Gram negativnih bakterija (Berry i sar., 2012). Drugačiji model lize javlja se u litičkom ciklusu faga sa malim jednolančanim genomima (*Enterobacteriophage phiX174*, *Enterobacteria phage Qbeta*) i zasniva se na inhibiciji biosinteze mureina od strane proteina faga (Young i sar., 2000).

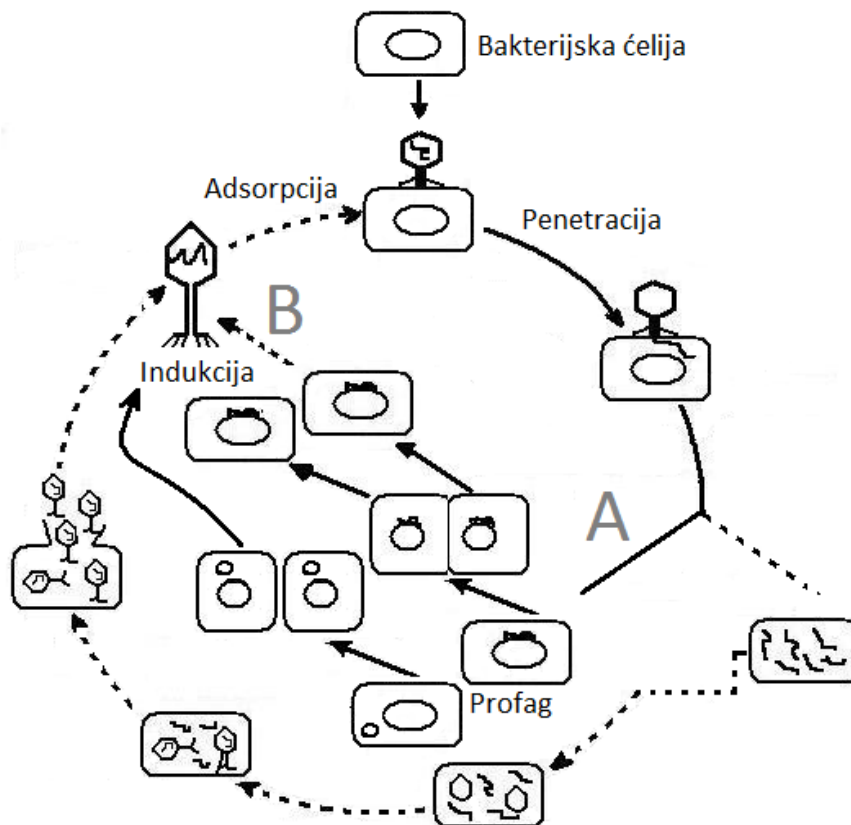


Slika 1.12.2 Kriva multiplikacije bakteriofaga T2 koji inficira *E. coli*. Modifikovano (Biology Discussion, 2016)

Period u životnom ciklusu koji počinje sa adsorpcijom faga za bakterijsku ćeliju i traje do momenta njihovog oslobađanja odnosno lize bakterijske ćelije naziva se latentni period. U okviru

latentnog perioda se izdvaja faza eklipse koja obuhvata vreme koje protekne od momenta adsorpcije do pojave prvih zrelih viriona. Tokom eklipse viruse nije moguće detektovati u ćeliji i izvan nje, a nakon eklipse, a pre završetka latentnog perioda virusi se detektuju intracelularno. Ciklus umnožavanja bakteriofaga predstavlja se krivom multiplikacije (tzv. *one step growth* kriva) na osnovu koje je moguće odrediti period eklipse, latencije i broj oslobođenih viriona iz jedne bakterijske ćelije (Ellis i Delbrück, 1939) (slika 1.12.2).

Bakteriofagi nakon adsorpcije i penetracije mogu ugraditi svoj genom u genom inficirane bakterije ili genom bakteriofaga može nastaviti da perzistira u formi plazmida u citoplazmi bakterijske ćelije. Takav ciklus se označava kao lizogeni (slika 1.12.3 A) i ostvaruju ga umereni fagi (Campbell, 2006). Ugradnja genoma faga u genom bakterije realizuje se transpozicijom ili rekombinacijom specifičnom za mesto (eng. *site-specific recombination*). Ugrađeni genom faga (profag) replicira se kao deo bakterijskog hromozoma, ili nezavisno od njega kakav je slučaj kod plazmida, a bakterijska ćelija, koja se označava kao lizogena, može da stekne nova svojstva kodirana genima profaga (lizogena konverzija) (Brussow i sar., 2004).



Slika 1.12.3 Lizogeni ciklus bakteriofaga. Nakon penetracije genom faga se ugrađuje bakterijski hromozom ili nastavlja da perzistira u formi plazmida (A). Indukcija profaga i njegov ulazak u litički ciklus (B). Modifikovano (Peoi.org, 2016)

U lizogenoj bakteriji geni koji su odgovorni za litički ciklus bakteriofaga su isključeni zahvaljujući represoru koji se jedino eksprimira i koji sprečava početak transkripcije ključnih virusnih promotora. Geni koji se kasnije ekspimiraju u toku litičkog ciklusa su takođe isključeni kao rezultat odsustva produkata ranoekspimirajućih gena koji su neophodni za njihovu aktivaciju (Campbell, 2006). Stres izazvan UV zračenjem i mutagenim agensima može da dovede do indukcije profaga i ulaska bakteriofaga u litički ciklus (slika 1.12.3 B). Pomenuti proces se javlja kao posledica oštećenja DNK bakterije odnosno iniciranog SOS odgovora ćelije u kome dolazi do inaktivacije represornog proteina faga. Prilikom indukcije moguće je da isecanje profaga obuhvati i deo bakterijske DNK. Ovaj fenomen se označava kao transdukcija i jedan je od mehanizama horizontalnog transfera gena. Ipak, lizogeno stanje je prilično stabilno, a spontani prelazak faga u litički ciklus događa se kod jedne od 10 000 ćelije (Campbell, 2006). Na hranljivim podlogama sa konfluentnim bakterijskim rastom umereni fagi stvaraju mutne plake.

Pored litičkog i lizogenog ciklusa u literaturi su opisani i pseudolizogeni ciklus i hronična infekcija bakteriofagima. Kod pseudolizogene infekcije nukleinska kiselina bakteriofaga, koja se označava kao preprofag, nakon uspešne penetracije u bakterijsku ćeliju nastavlja da perzistira zasebno, ali kao neaktivna forma (genom faga se ne replikuje) (Baess, 1971; Miller i Ripp, 2002; Miller i Day, 2008; Łoś i Węgrzyn, 2012). Pretpostavlja se da je pseudolizogena infekcija, odnosno inertnost nukleinske kiseline faga, posledica gladovanja bakterijske ćelije koja nema mogućnost da obezbedi neophodnu energiju i supstrat za ulazak faga u lizogeni ili litički ciklus. U prilog ovoj činjenici idu rezultati ispitivanja sprovedenih na virulentnom bakteriofagu UT1 (Ogunseitan i sar., 1990) koji su pokazali da je učestalost pseudolizogenije obrnuto srazmerna količini hranljivih materija dostupnih bakterijskoj ćeliji. Pored toga, primećeno je da do prelaska pseudolizogena u lizogeni ili litički ciklus dolazi usled poboljšanje nutritivnog statusa okruženja (Ripp i Miller, 1997; Ripp i Miller, 1998).

Postepeno oslobađanje zrelih viriona koje je opisano kod pojedinih filamentoznih bakteriofaga označeno je kao hronična ili kontinualna infekcija (Russel i Model, 2006). Hronična infekcija ne dovodi do lize i smrti bakterijske ćelije. Prekursori zrelih viriona odnosno jednolančane DNK sa SSB proteinima (eng. *single-strand binding protein*) se pakuju u zrele virione i nakon zamene SSB proteina proteinima omotača oslobađaju iz bakterijske ćelije ekstruzijom (Ackermann i Dubow, 1987). Proces sazrevanja i ekstruzije posredovan je virusnim proteinima koji su lokalizovani u ćelijskoj membrani i koji obezbeđuju očuvanje integriteta bakterijske ćelije (Rakonjac i sar., 1999; Snyder i sar., 2014). Infekcija je permanentna i prenosi se na sledeće generacije, a kao rezultat sporijeg rasta inficiranih bakterijskih ćelija na hranljivim podlogama dolazi do formiranja mutnih plaka (Guttman i sar., 2005).

1.13 Mehanizmi odbrane bakterija od bakteriofagnih infekcija

Neuspešne infekcije bakterija od strane bakteriofaga označene su kao restriktivne infekcije fagima (eng. *phage restriction*) i abortivna infekcija (eng. *phage abortive infection*, *Abi*) (Abedon, 2008).

Restrikcija odnosno restrikciono modifikacioni sistem bakterija (RM) se zasniva na aktivnosti metiltransferaza koje vrše metilaciju specifičnih mesta na DNK i endonukleaza koje prepoznaju ista mesta i prekidaju ih ukoliko nisu metilovana (slika 1.13 A). Na taj način DNK bakterije ostaje neoštećena, a uništavanje virusne nemetilovane DNK sprečava infekciju (Jeltsch, 2002).

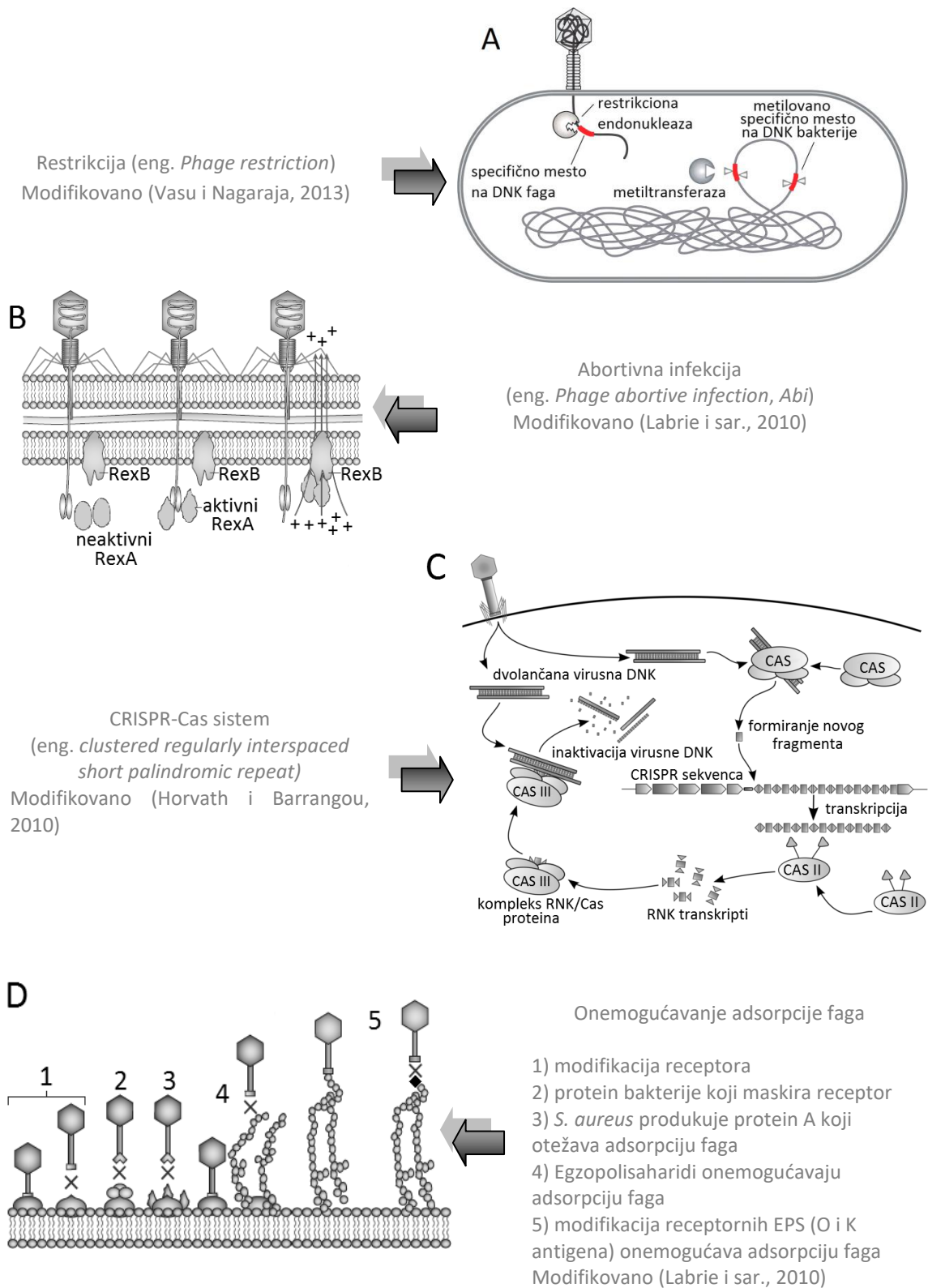
Abortivna infekcija podrazumeva prekid u multiplikaciji faga izazvan apoptozom bakterijske ćelije (Chopin i sar., 2005). Primer za pomenuti vid neuspešne infekcije je aktivacija Rex abortivnog sistema kod sojeva *E. coli* sa integrisanim Lambda fagom. Sistem podrazumeva aktivaciju RexA proteina do koje dolazi nakon ulaska nukleinske kiseline faga u bakterijsku ćeliju. RexA proteini imaju ulogu intracelularnih senzora koji dalje vrše aktivaciju RexB proteina, jonskih kanala koji narušavaju membranski potencijal što dovodi do smrti bakterijske ćelije (slika 1.13 B) (Labrie i sar., 2010).

Još jedan mehanizam registrovan kod bakterija koji deluje na nukleinski materijal bakteriofaga i sprečava infekciju je tzv. CRISPR-Cas sistem (eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*). Pomenuti sistem omogućava bakterijskoj ćeliji koja je bila u kontaktu sa egzogenim genetičkim elementom da sačuva ovu informaciju u svom genomu. Fragmenti DNK bakteriofaga čuvaju se između ponavljajućih palindromskih sekvenci i strukturnih gena za familiju Cas proteina. Transkripcijom navedenih delova genoma nastaju kratki RNK molekuli koji se vezuju za Cas proteine. Nastali kompleks stupa u interakciju sa virusnom DNK i vrši njenu degradaciju (slika 1.13 C) (Horvath i Barrangou, 2010).

Pored pomenutih mehanizama koji deluju nakon penetracije nukleinske kiseline bakteriofaga u bakterijsku ćeliju i koji sprečavaju ulazak virusa u jedan od pomenutih životnih ciklusa, bakterije poseduju niz adaptacija vezanih za onemogućavanje adsorpcije bakteriofaga za njihovu površinu. Bakterije tako mogu postati rezistentne na infekciju fagima usled modifikacije površinskih receptora, produkcije naročitih proteina koji maskiraju receptore i otežavaju adsorpciju kao i usled produkcije i modifikacije egzopolisaharida (slika 1.13 D) (Labrie i sar., 2010).

1.14 Ekologija i značaj bakteriofaga u prirodi

Procenjuje se da ukupna brojnost bakteriofaga na Zemlji iznosi između 10^{30} i 10^{32} , što ih čini najbrojnijim organizmima na planeti. Njihovo prisustvo je povezano sa prisustvom bakterija i beleži



Slika 1.13 Mehanizmi odbrane bakterija od bakteriofagnih infekcija

se u okeanima, slatkim i otpadnim vodama, zemljištu, hidrotermalnim izvorima, pijaćoj vodi i hrani (Kutter i Sulakvelidze, 2005). Zastupljenost bakteriofaga u vodenim sredinama obično varira između 10^4 i 10^8 po mL, a njihova brojnost je često veća u slatkovodnim nego marinskim vodama i kod eutrofnih jezera može iznositi do 10^8 virusnih čestica u mL. Kada je reč o sedimentima, njihov broj varira između 10^7 i 10^{10} po gramu, i po pravilu opada sa povećanjem dubine na kojoj je sediment formiran (Weinbauer i sar., 2007). Za terestrična staništa rezultati određivanja brojnosti bakteriofaga manje variraju i iznose oko 10^9 virusnih partikula po gramu kako za šumska tako i za obradiva zemljišta (Williamson i sar., 2005). Prisustvo virusa bakterija potvrđeno je kod ljudi, životinja i biljaka. Tako su fagi detektovani na koži, u usnoj duplji i crevima čoveka, u crevnom traktu preživara, riba, ptica i insekata (Furuse, 1987; Chibani-Chennoufi i sar., 2004; Brussow i Kutter, 2005; Woods i sar., 1981), kao i u asocijaciji sa pupoljcima, listovima, korenskim kvržicama, korenjem, stabljikama i tumorima biljaka (Gill i Abedon, 2003). Prisustvo bakteriofaga u hrani se vezuje uglavnom za mlečne proizvode (Brüssow i sar., 1994), ali i fermentisane namirnice poput kupusa (Lu i sar., 2003a), krastavaca (Lu i sar., 2003b) i salama (Chibani-Chennoufi i sar., 2004).

Kao predatori bakterija, bakteriofagi utiču na globalne biogeohemijske cikluse. Tako liza bakterijskih ćelija dovodi do povećanja količine rastvorenih neorganskih i organskih materija, zatim rastvorena organska materija utiče na povećanje obima respiracije, oslobađanja ugljendioksida i kruženja nutrijenata (Rohwer i sar., 2009). Sa druge strane, ulazak bakteriofaga u lizogeni ciklus bakterijama može obezbediti nove karakteristike. Jedan od primera pomenutog fenomena su infekcije bakterije *E. coli* od strane bakteriofaga P1, P2, Mu i Lambda nakon kojih se pomenuta bakterija brže reprodukuje u aerobnim uslovima bez prisustva glukoze (Edlin i sar., 1977; Lin i sar., 1977). Pored toga, eksprimiranje gena profaga inficiranoj bakteriji može obezbediti rezistenciju na antibiotike (Colomer-Lluch i sar., 2002) i faktore virulencije poput toksina (Waldor i Mekalanos, 1996), faktora invazivnosti (Beutin i sar., 1993) i adherencije (Bensing i sar., 2001).

Velika većina bakteriofaga inficira sojeve u okviru jedne vrste (Hyman i Abedon, 2010; Duplessis i Moineau, 2001). Izuzeci su fagi poput *Enterobacteria fag P1* i *Enterobacteria fag Mu* koji pomoću različitih mehanizama (vezivanje za LPS receptore i invertibilni G segment odgovoran za prepoznavanje različitih receptora) uspevaju da inficiraju veći broj predstavnika različitih vrsta bakterija (Yarmolinsky i Sternberg, 1988; Harshey, 1988). Značaj faga koji uspešno inficiraju veći broj sojeva i vrsta ogleda se u kontroli sastava i genetičke raznovrsnosti mikrobne zajednice kao i u transferu gena (Jensen i sar., 1998).

Fizički i hemijski faktori poput temperature, aciditeta, saliniteta i prisustva različitih jona određuju prisustvo bakteriofaga u različitim sredinama, utiču na njihovu vijabilnost i određuju način njihovog čuvanja. Pomenuti faktori mogu prouzrokovati oštećenja strukturnih elemenata

bakteriofaga (glave, repa, dodatnog omotača), gubitak lipida kao i strukturne promene nukleinskog materijala (Jończyk i sar., 2011). Bakteriofagi su osetljivi na toplotu kao i većina nesporeliških bakterija, a na njihovu otpornost prema povišenoj temperaturi u značajnoj meri utiče sastav podloge. Tako je inaktivacija najbrža u čistoj vodi i značajno se redukuje u prisustvu proteina ili soli kalcijuma i magnezijuma. Pri sobnoj temperaturi titar bakteriofaga ostaje nedeljama približno isti dok se pri temperaturi od 4°C na godišnjem nivou beleži smanjenje broja vijabilnih viriona za jednu log jedinicu. Fagi su osetljivi na zamrzavanje i odmrzavanje, međutim u zamrznutom stanju pri temperaturama od -20 ili -70°C mogu ostati stabilni dugi niz godina (Douglas, 1975). Svi bakteriofagi pokazuju visok stepen osetljivosti na UV zračenje. Smatra se da je inaktivacija prouzrokovana sunčevim UV zračenjem (posebno UVB, 320 – 290 nm) glavni faktor koji utiče na smanjenje populacije bakteriofaga u životnim sredinama (Paul i Kellogg, 1998). Generalno govoreći, fagi su stabilni pri pH 5-8, a mnogi zadržavaju infektivnost i pri nižim i višim pH vrednostima (pH3 i pH10) (Carlson, 2005). Osmotski šok izaziva oslobađanje nukleinske kiseline iz kapsida bakteriofaga (Adams, 1959), pri čemu naglo smanjenje osmotskog pritiska ima negativniji efekat u odnosu na naglo povećanje (Carlson, 2005). Agensi koji vrše denaturaciju proteina poput uree i uretana u značajnoj meri vrše inaktivaciju viriona, pri čemu na obim inaktivacije utiču koncentracija agensa i temperatura. Osetljivost na deterdžente kod bakteriofaga je u manjoj meri izražena, a veću osetljivost ispoljavaju jedino fagi sa dodatnim lipidnim omotačem. Osetljivost na hloroform kod bakteriofaga bez dodatnog omotača je neznatna (Adams, 1959).

1.15 Metode izolacije, određivanja brojnosti i karakterizacije bakteriofaga

Izolacija bakteriofaga uspešno se obavlja iz različitih sredina korišćenjem čiste kulture bakterije domaćina u ekspanzionalnoj fazi rasta. Iako je preporučljivo da bakterijska kultura bude u ekspanzionalnoj fazi rasta kako bi se omogućila uspešna propagacija virusa u ćeliji, izolacija pojedinih bakteriofaga obavljena je korišćenjem stacionarne kulture (Schradler i sar., 1997; Wommack i Colwell, 2000). U većini slučajeva, uslovi inkubacije poput izbora podloge, vremena inkubacije, temperature i nivoa kiseonika, treba da budu prilagođeni bakterijskoj vrsti na kojoj se vrši izolacija bakteriofaga. Izolacija faga iz tečnih uzoraka obično podrazumeva pripremu serije razređenja uzoraka i njihovo nanošenje na hranljive podloge prethodno inokulisane odgovarajućom bakterijskom vrstom. Čvrsti uzorci zahtevaju prethodnu pripremu koja podrazumeva njihovo rastvaranje i homogenizovanje u tečnoj hranljivoj podlozi ili puferu. Ukoliko uzorak sadrži dovoljan broj bakteriofaga koji ulaze u litički ciklus, nakon perioda inkubacije prisustvo pomenutih virusa na

hranljivim podlogama će se manifestovati pojavom plaka. Na uzorcima u kojima se očekuje mali broj virusa, mogu se primeniti tehnike koncentrovanja (npr. ultrafiltracija, sekvencionalna adsorpcija i elucija) i obogaćenja. U cilju izolacije bakteriofaga iz lizogenih bakterija neophodno je izvesti indukciju i u tu svrhu se sa većim ili manjim uspehom koristi UV zračenje, mitomicin C, jonizujuće zračenje, organski peroksidi ili azotni iperit (Carlson, 2005; Paul i Kellogg, 1998).

U cilju određivanja brojnosti bakteriofaga koriste se indirektna i direktna metode. Indirektna metode se zasnivaju na detekciji i brojanju formiranih plaka na čvrstim podlogama (PFU – eng. *plaque forming unit*) i primeni tehnike najverovatnijeg broja (MPN) (MPN - eng. *most probable number*) kada se koriste tačne podloge. Budući da je za indirektna metode neophodno prisustvo izolovanog domaćina i da većina bakteriofaga inficira mali broj sojeva brojnost dobijena pomenutom metodom predstavlja samo jedan deo ukupne brojnosti bakteriofaga prisutnih u uzorku (Weinbauer, 2004). Detekcija i brojanje formiranih plaka (metod plaka) se takođe koristi kod određivanja bioloških parametara infekcije (latentni period, eklipsa, broj oslobođenih viriona iz jedne bakterijske ćelije, *in vitro* efikasnost faga) kao i kod ispitivanja različitih uticaja na vijabilnost bakteriofaga (Carlson, 2005). Direktna metode određivanja ukupnog broja viriona u uzorcima oslanjaju se na upotrebu transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) (Torrella i Morita, 1979), epifluorescentne mikroskopije (EFM) (Hara i sar., 1991) i protočne citometrije (FCM) (Marie i sar., 1999). Pre primene navedenih tehnika vrši se koncentrovanje uzoraka koje se najčešće izvodi ultracentrifugiranjem ili filtriranjem. Epifluorescentna mikroskopija i protočna citometrija podrazumevaju upotrebu fluorescentnih boja (DAPI, YOPRO, SYBRGreen I i SYBRGold) koje pokazuju afinitet prema nukleinskom materijalu, dok se kod transmisiona elektronske mikroskopije primenjuje tehnika pozitivnog bojenja, najčešće uranil acetatom (Weinbauer, 2004). Primenom direktnih metoda dobijena brojnost bakteriofaga može biti 100 do 1000 veća u odnosu na metod plaka (Wommack i Colwell, 2000).

U cilju vizuelizacije i određivanja morfologije i veličine bakteriofaga najčešće se koristi transmisiona elektronska mikroskopija i tehnika negativnog bojenja uranil acetatom i solima fosfatungstične kiseline (Brenner i Horne, 1959; Ackermann, 2012). Pored pomenute tehnike mikroskopiranja i pripreme uzorka u široj upotrebi su još i krioelektronska i imunoelektronska mikroskopija (Ackermann, 2012).

Karakterizacija bakteriofaga se u značajnoj meri oslanja i na molekularne metode poput digestije virusne DNK restrikcionim endonukleazama, lančane reakcije polimeraze (PCR), sekvenciranja i SDS-gel elektroforeze (Carlson, 2005). Fragmenti DNK bakteriofaga nakon restrikcione digestije analiziraju se korišćenjem agaroz-gel ili poliakrilamid-gel elektroforeze kao i elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) (veliki fragmenti DNK). Dobijene trake pružaju informacije o

veličini genoma bakteriofaga i omogućavaju razlikovanje faga. Lančana reakcija polimeraze našla je primenu u komparativnoj analizi brojnih bakteriofaga, a izvodi se i u svrhu pripreme naročitih regiona DNK faga za sekvenciranje (Tetart i sar, 2001). Zahvaljujući sekvenciranju i analizama genoma bakteriofaga dobijaju se značajni podaci iz oblasti populacione genetike i evolucije bakteriofaga. Pored toga, detaljna analiza genoma faga omogućava podelu genoma u funkcionalne jedinice, tzv. genske module koji su na primeru bakteriofaga iz reda *Caudovirales* odgovorni za pakovanje DNK, morfogenezu, DNK replikaciju, transkripciju i lizu ćelijskog zida bakterije domaćina (Canchaya i sar., 2007). U cilju određivanja proteinskog profila bakteriofaga najčešće se koriste jednodimenzionalna SDS-gel (SDS-PAGE) elektroforeza kao i tehnika koja podrazumeva kombinaciju primena radioaktivno obeleženih aminokiselina nakon infekcije bakterije i jednodimenzionalne i dvodimenzionalne SDS-PAGE elektroforeze. Na pomenute načine vrši se razdvajanja proteina bakteriofaga, određuju se njihove molekulske mase i utvrđuju se razlike među izolovanim fagima (Carlson, 2005).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

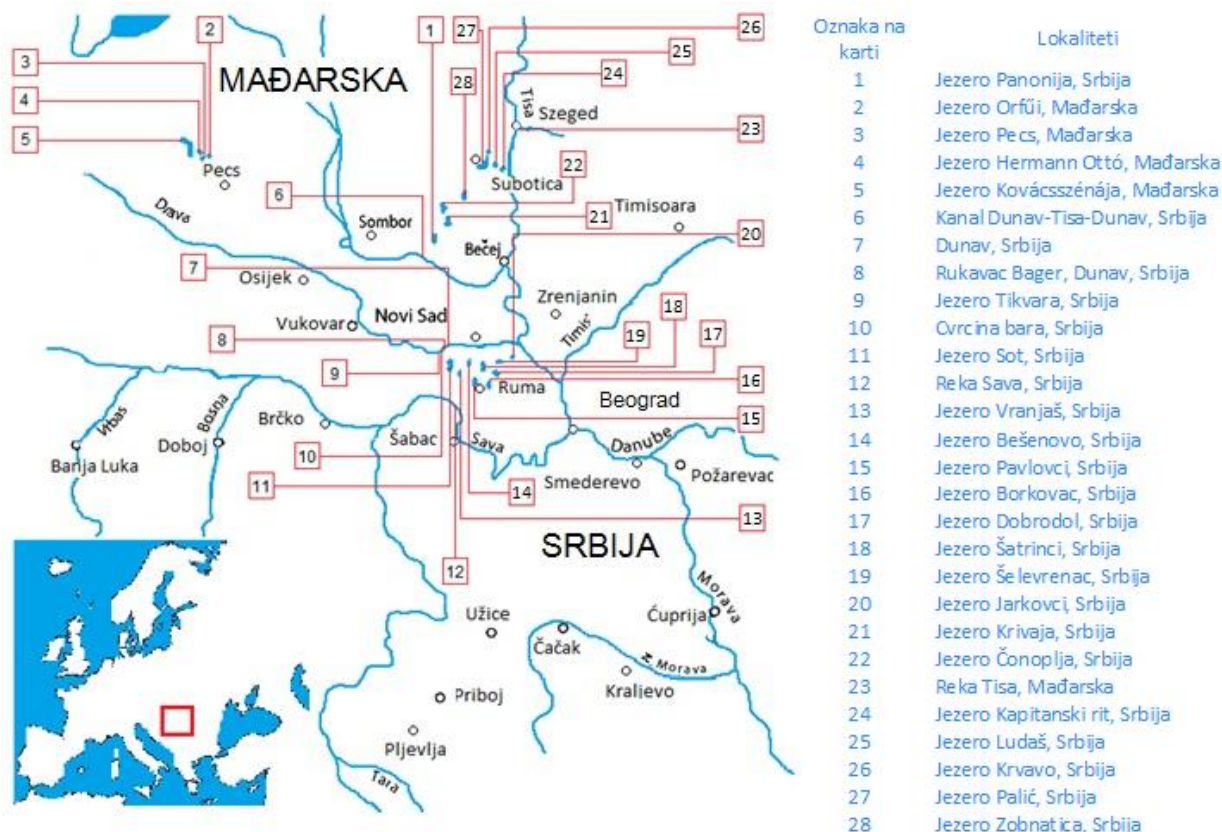
Obzirom da u dosadašnjim istraživanjima manjkaju podaci o prisustvu bakterije *Plesiomonas shigelloides* u površinskim vodama van tropskih i suptropskih oblasti, a s obzirom na njen sve veći značaj kao uzročnika oportunističkih infekcija kod ljudi i životinja cilj ove doktorske disertacije je bio ostvaren kroz nekoliko podciljeva:

1. Izolacija sojeva *P. shigelloides* iz uzoraka površinskih voda sa teritorije Panonske nizije sa ciljem utvrđivanja prevalencije bakterije u ovim sredinama i formiranje kolekcije kultura.
2. Identifikacija bakterijskih izolata primenom klasičnih, biohemijskih i molekularnih testova pomoću kojih je određen stepen njihove fenotipske i genotipske varijabilnosti
3. Karakterizacija faktora virulencije i antibiotske rezistencije izolovanih sojeva *Plesiomonas shigelloides*. U cilju karakterizacije faktora virulencije sojeva *P. shigelloides* ispitivana je sposobnost produkcije biofilma, mogućnost i kinetika hemolize, lipazna i DNAzna aktivnost, kao i sposobnost pokretljivosti. Utvrđivanje antibiotske osetljivosti ispitana je prema antibioticima iz grupe penicilina, tetraciklina, aminoglikozida kao i na ciprofloksacin, hloramfeniol i trimetoprim/sulfametoksazol.
4. Izolacija bakteriofaga specifičnih za vrstu *Plesiomonas shigelloides* iz uzoraka površinskih i otpadnih voda. Izolacija bakteriofaga izvedena je primenom single layer i agar overlay metode nakon čega je obavljena propagacija, prečišćavanje i koncentrovanje virusa. Prečišćene i koncentrovane suspenzije bakteriofaga su korišćene u cilju njihove dalje karakterizacije.
5. Karakterizacija bakteriofaga specifičnih za vrstu *Plesiomonas shigelloides* putem sledećih analiza: utvrđivanje litičkog spektra i litičke efikasnosti, ispitivanje uticaja ekoloških faktora na efikasnost lize, određivanje osnovnih parametara krive rasta, veličine genoma i polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata, određivanje proteinskog profila i utvrđivanje morfologije viriona. Pored toga, ispitana je mogućnost detekcije izolovanih bakteriofaga primenom metode protočne citometrije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Izolacija sojeva *Plesiomonas shigelloides* i identifikacija na osnovu morfoloških, kulturnih i biohemijskih karakteristika

U periodu između aprila i avgusta 2013. godine sakupljen je 51 uzorak vode iz jezera i reka na 28 lokaliteta na području južnog dela Panonske nizije sa teritorije Republike Srbije i Republike Mađarske (slika 3.1.1) (tabela 3.1.1). Uzorci su uzimani u staklene boce 20 cm ispod površine vode (slika 3.1.2), transportovani na temperaturi od 4°C i zasejavani u roku od 6 časova od momenta uzorkovanja (Bordner i Winter, 1978). Zasejavanje je vršeno tehnikom razmazivanja na petri ploče ($\Phi=14$ cm) sa modifikovanom PDA podlogom (1% proteozni pepton, 0,5% mesni ekstrakt, 1% inozitol, 0,85% žučne soli, 0,5% NaCl, 0,0003% brilijant zeleno, 0,005% fenol crveno umesto neutralnog crvenog, 1,35% agar), a količina inokuluma je iznosila 1 mL. Inkubacija je vršena na 37°C u trajanju od 24 časa.



Slika 3.1.1 Lokaliteti uzorkovanja na teritoriji Republike Srbije i Republike Mađarske u cilju izolacije bakterije *P. shigelloides*

Tabela 3.1.1 Poreklo uzoraka i način zasejavanja

Lokalitet uzorkovanja	Ukupan broj uzoraka (n=51)	Način zasejavanja* i broj uzoraka	Korišćene podloge
Šatrinci, Srbija	2	DIR (1)/OBO (1)	PDA/APW+PDA
Ludaš, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Panonija, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Krivaja, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Pecs, Mađarska	2	DIR (2)	PDA
Kapitanski rit, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Pavlovci, Srbija	3	DIR (2) /OBO (1)	PDA/APW+PDA
Kovácsszénája, Mađarska	2	DIR (2)	PDA
Dobrodol, Srbija	2	DIR (1) /OBO (1)	PDA/APW+PDA
Vranjaš, Srbija	1	DIR (1)	PDA
Borkovac, Srbija	2	DIR (1) /OBO (1)	PDA/APW+PDA
<i>Hermann Ottó, Mađarska</i>	2	DIR (2)	PDA
Sot, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Šelevrenac, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Zobnatica, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Palić, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Orfúi, Mađarska	2	DIR (2)	PDA
Jarkovci, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Čonoplja, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Bešenovo, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Krvavo, Srbija	2	DIR (2)	PDA
Tikvara, Srbija	1	DIR (1/2) i OBO (1/2)	PDA/(APW/TTB/BPB)+PDA
Dunav, Srbija	1	DIR (1/2) i OBO (1/2)	PDA/(APW/TTB/BPB)+PDA
Tisa, Mađarska	1	DIR (1/2) i OBO (1/2)	PDA/(APW/TTB/BPB)+PDA
Sava, Srbija	1	DIR (1/2) i OBO (1/2)	PDA/APW+PDA
Cvrcina bara, Srbija	2	DIR (1) i OBO (1)	PDA/(APW/TTB/BPB)+PDA
Bager (rukavac Dunava), Srbija	1	DIR (1/2) i OBO (1/2)	PDA/(APW/TTB/BPB)+PDA
Kanal Dunav-Tisa-Dunav, Srbija	2	DIR (1) i OBO (1)	PDA/(APW/TTB/BPB)+PDA

DIR – direktno zasejavanje

OBO – obogaćenje uzorka



Slika 3.1.2 Uzorkovanje vode iz jezera Vranjaš u cilju izolacije sojeva *P. shigelloides*

Pored toga, pojedini uzorci su podvrgnuti proceduri obogaćenja koja je podrazumevala mešanje uzorka vode (25 mL) sa jednakom količinom dvostruko koncentrovanog tetracionat bujona (0.25% kazein hidrolizata, 0.25% peptona iz mesa, 0.1% žučne soli, 1% CaCO_3 , 3% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, pH 8.4), alkalne peptonske vode (1% pepton, 1% NaCl, pH 8.4) i PIB bujona (1% inozitol, 0.823% Na_2HPO_4 , 0.5% NaCl, 0.5% pepton, 0.15% žučne soli br. 3, 0.12% NaH_2PO_4 , pH 7.6). Erlenmajeri sa obogaćenjima su inkubirani na 37°C u trajanju od 24 časa. Po završetku perioda inkubacije u cilju dobijanja čiste kulture vršeno je zasejavanje sadržaja erlenmajera prebacivanjem i razmazivanjem zapremine zahvaćene omčom eze (~0,01 mL) (Bordner i Winter, 1978) na modifikovanu PDA podlogu nakon čega su inokulisane podloge ostavljene na inkubaciju na 37°C u trajanju od 24 časa (De Mondino i sar., 1995).

Kolonije oko kojih je kao posledica fermentacije inozitola došlo do promene boje podloge iz crvene u žutu su presejane na podlogu hranljivi agar radi daljih analiza vezanih za identifikaciju vrste. Pomenute analize obuhvatile su preliminarne testove: bojenje po Gramu, oksidaza i katalaza test, test produkcije indola, test hidrolize želatina, test korišćenja citrata i test fermentacije ugljenih

hidrata (tabela 3.1). Prilikom testiranja fermentacije ugljenih hidrata korišćeni su sledeći supstrati: glukoza, inozitol, sorbitol, saharoza, maltoza, arabinoza, a u sve epruvete su postavljene Durhamove cevčice radi praćenja produkcije gasa. Svi Gram negativni pleomorfni štapići, koji su bili katalaza i oksidaza pozitivni, koji su produkovali indol, nisu usvajali citrat niti hidrolizovali želatin i koji su fermentisali inozitol, glukozu i maltozu bez produkcije gasa, a ne i arabinozu, saharozu i sorbitol, identifikovani su na osnovu preliminarnih testova kao *P. shigelloides* (slika 3.1) (Janda, 2005).

Tabela 3.1.2 Preliminarni testovi korišćeni prilikom izolacije sojeva *P. shigelloides*

test	Očekivan rezultat/reakcija	test	Očekivan rezultat/reakcija
Bojenje po Gram-u	Gramm -	Fermentacija glukoze	+ / gas-
Prisustvo oksidaze	+	Fermentacija inozitola	+ / gas-
Prisustvo katalaze	+	Fermentacija sorbitola	-
Produkcija indola	+	Fermentacija saharoze	-
Hidroliza želatina	-	Fermentacija maltoze	+ / gas-
Usvajanje citrata	-	Fermentacija arabinoze	-



Slika 3.1.3 Testovi fermentacije šećera, hidrolize želatina i usvajanja citrata (A), mikroskopski preparat bojen po Gramu (B) i izgled i veličina kolonija *P. shigelloides* na modifikovanoj podlozi Plesiomonas Diferencijalni Agar (PDA) (C)

3.2 Ekstrakcija bakterijske DNK i potvrda identifikacije sojeva primenom PCR tehnike korišćenjem specifičnih prajmera

U cilju potvrde identifikacije PCR tehnikom svi sojevi koji su preliminarnim testovima identifikovani kao *P. shigelloides* presejani su na LBA podlogu. Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24 sata vršena je ekstrakcija dezoksiribonukleinske kiseline. Izolacija genomske DNK izolovanih sojeva obavljena je korišćenjem GeneJet Genomic DNA Purification Kit® (Thermoscientific, Litvanija) prema uputstvima proizvođača. Koncentracija i čistoća izolovane DNK je određena spektrofotometrom BioSpec-nano (Shimadzu Cooperation, Japan) nakon čega su uzorci DNK ostavljeni u zamrzivač na -20°C. PCR analiza je obavljena korišćenjem prajmera PS23FW3 (5'-CTC CGA ATA CCG TAG AGT GCT ATC C-3') i PS23RV3 (5'-CTC CCC TAG CCC AAT AAC ACC TAA A-3') koji se vezuju za specifičan region 23S rRNK gena, a prema uputstvima González-Rey i sar., 2000. Ukratko, kivete sa reakcionim smešama za PCR koje su sadržale uzorak DNK, 10x DreamTaq Green pufera sa MgCl₂, 10 mM rastvor dNTP-a, prajmer F, prajmer R, Taq polimerazu i dejonizovanu H₂O su postavljene u aparat za PCR (Biometra, Nemačka). Aparat je podešen na sledeći način: 1 ciklus predenaturacije na 95°C u trajanju od 5 minuta, 35 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 1 minuta, vezivanja prajmera na 68°C u trajanju od 1 minuta i elongacije na 72°C u trajanju od 1 minuta. Finalna elongacija nakon 35 ciklusa se odvijala pri temperaturi od 72°C u trajanju od 10 minuta (González-Rey i sar., 2000). Kao marker je korišćen 100 bp DNK marker (Thermo Scientific, Litvanija). Amplifikovana DNK je elektroforetski razdvojena na 2% agaroznom gelu sa etidijum bromidom, a dobijene trake su vizuelizovane UV svetlom u aparatu za vizuelizaciju gelova BioDocAnalyse (Biometra, Nemačka). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkata očekivane veličine od 284 bp. *Plesiomonas shigelloides* ATCC51903, ATCC14029 i *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 su korišćeni kao pozitivna odnosno negativna kontrola.

3.3 Određivanje genetičke bliskosti izolovanih sojeva metodom RAPD-PCR

Određivanje genetičke bliskosti odnosno udaljenosti izolovanih sojeva bakterije *P. shigelloides* obavljeno je metodom RAPD-PCR. U cilju odabira prajmera koji daju jasno vidljive produkte amplifikacije sprovedeni su preliminarni testovi sa 16 dekamernih prajmera (tabela 3.3). Reakciona smeša je pripremljena u zapremini od 20 µL i sastojala se od 2,5 µL 10xDream Taq Green pufera sa MgCl₂, 1 µL DreamTaq polimeraze (ThermoScientific, Litvanija), 0,5 µL 10 mM rastvora dNTP-a, 25 ng odgovarajućeg prajmera i 100 ng izolovane DNK. Amplifikacija je obavljena u aparatu

za PCR (Biometra, Nemačka) prema sledećem režimu rada: 1 ciklus predenaturacije na 94°C u trajanju od 5 minuta, 40 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 2 minute, vezivanja prajmera na 36°C u trajanju od 1 minuta i elongacije na 72°C u trajanju od 2 minuta. Finalna elongacija nakon 40 ciklusa se odvijala pri temperaturi od 72°C u trajanju od 10 minuta. Kao marker je korišćen 1 kb DNK marker (Thermo Scientific, Litvanija). Dobijeni DNK fragmenti razdvojeni su elektroforetski na 2% agaroznom gelu sa etidijum bromidom, a nakon elektroforeze gel je vizuelizovan korišćenjem UV svetla u aparatu za vizuelizaciju gelova BioDocAnalyse (Biometra, Nemačka). Profili traka su zapisani u binarnom kodu kao prisustvo (1) ili odsustvo (0) određene trake. Na osnovu binarnih podataka izrađena je matrica genetičke sličnosti po Jaccard-u koja je korišćena za UPGMA (Unweighted Paired Group Method with Arithmetic Mean) klaster analizu. Procena pouzdanosti kladograma sprovedena je metodom učitavanja (eng. bootstrap) uz 100 replikacija. Pomenute klaster analize obavljene su korišćenjem D-UPGMA (Garcia-Vallve i sar., 1999) i TreeGraph 2 (Stover i Muller, 2010).

Tabela 3.3. Prajmeri korišćeni u preliminarnom testu RAPD-PCR metode

Broj	RAPD prajmer	Nukleotidna sekvenca	Broj	RAPD prajmer	Nukleotidna sekvenca
1	OPA 02	5' TGCCGCGCTG 3'	9	OPE 09	5' TCCACTCTCTG 3'
2	OPA 07	5' GAAACGGGTG 3'	10	OPM 10	5' TCTGGCGCAC 3'
3	OPA 08	5' GTGACGTAGG 3'	11	OPM 18	5' CACCATCCGT 3'
4	OPB 06	5' TGCTCTGCCC 3'	12	OPN 01	5' CTCACGTTGG 3'
5	OPB 11	5' GTAGACCCGT 3'	13	OPN 02	5' ACCAGGGGCA 3'
6	OPB 12	5' CCTTGACGCA 3'	14	K 01	5' CATTGAGCC 3'
7	OPB 13	5' TTCCCCGCT 3'	15	K 15	5' AGGTGACCGT 3'
8	OPC 04	5' CCGCATCTAC 3'	16	NO 11	5' ACGGCATATG 3'

3.4 Testiranje sposobnosti formiranja biofilma sojeva *Plesiomonas shigelloides*

U cilju kvantifikacije produkcije biofilma sojeva *P. shigelloides* na površini od polistirena prekončne kulture sojeva gajene na LBA podlozi su korišćene za pripremu suspenzija zamućenja 0.5 na Mc Farlandovoj skali u 0.9% fiziološkom rastvoru, tako da je brojnost ćelija u epruvetama iznosila približno 2.00×10^8 CFU/mL. Suspenzije su zatim alikvotirane u mikrotitar ploču (Greiner bio-one, Nemačka) u količini od 20 μ L u tri ponavljanja nakon čega je u svaki otvor dodato po 180 μ L podloge LB (Himedia, Indija) sa dodatkom glukoze (1%). U tri otvora kao kontrola je dodato 20 μ L fiziološkog

rastvora i 180 μL LBB podloge sa dodatkom glukoze. Mikrotitar ploča je ostavljena na inkubaciju na temperaturi od 37 °C u trajanju od 24 h. Nakon perioda inkubacije sadržaj svakog otvora je uklonjen, a otvori su isprani dva puta sa po 250 μL fiziološkog rastvora. Nakon toga su preostale bakterijske ćelije fiksirane sa 200 μL 99,5% metanola (Lachema, Češka Republika) u trajanju od 15 minuta. Nakon odlivanja metanola i sušenja u trajanju od 15 minuta na 44 °C u svaki otvor je dodato po 200 μL 2% rastvora kristal violeta (Merck, Nemačka) radi bojenja biofilma. Posle 15 minuta boja je isprana i u prethodno prosušene otvore je dodato po 160 μL 33% sirćetne kiseline (Zorka Pharma, Srbija). Nakon 20 minuta očitavana je apsorbancija na 570 nm na automatskom mikrotitar čitaču (Thermo Scientific Multiskan GO) (Stepanovic i sar., 2000). Ocena adhezije ćelija za površinu od polistirena vršena je preko OD_c vrednosti, koja predstavlja srednju vrednost optičke gustine negativne kontrole (OD_{ng}) za testiranu mikrotitar ploču uvećanu za tri standardne devijacije (Stepanovic i sar., 2000). Prema predlogu Stepanovic i saradnika (2000) izolati su klasifikovani na sledeći način:

$OD \leq OD_c$ soj se smatra kao neadherentan,
 $OD_c < OD \leq (2 \times OD_c)$ soj se smatra kao slabo adherentan,
 $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$ soj se smatra kao umereno adherentan,
 $(4 \times OD_c) < OD$ soj se smatra kao veoma adherentan (Stepanović i sar., 2000).

Ceo eksperiment je ponavljen tri puta.

Kvalitativna procena sposobnosti produkcije biofilma na staklenim borosilikatnim površinama je određivana metodom po Christensen-u (Christensen i sar., 1982). U borosilikatne epruvete (11 x 74 mm) prethodno napunjene sa 1,8 mL LBB podloge sa 1% glukoze je dodato 0,2 mL bakterijske suspenzije zamućenja 0,5 na Mc Farlandovoj skali, tako da je brojnost ćelija bakterija u epruvetama iznosila približno 2.00×10^7 CFU/mL. Svaki soj je ispitivan u tri ponavljanja. U tri epruvete kao kontrola je dodato 0,2 mL fiziološkog rastvora u 1,8 mL LBB podloge sa dodatkom glukoze. Epruvete su ostavljene na inkubaciji na 37 °C u trajanju od 24 h. Nakon perioda inkubacije sadržaj epruveta je aspiriran i epruvete su isprane fiziološkim rastvorom. Nakon ispiranja epruvete su radi sušenja ostavljene na 60°C u trajanju od 30 minuta a zatim je u svaku epruvetu dodato 1,8 mL 2 % rastvora kristal violeta. Posle 30 minuta epruvete su isprane i ostavljene u obrnutom položaju radi sušenja. Posmatrana je pojava biofilma na zidovima i dnu epruveta. Ocena adhezivnosti ćelija za površinu od borosilikatnog stakla je vršena prema sledećem kriterijumu: odsutna (0), slaba (1), umerena (2) i jaka adhezivnost (3), a praćena je i pojava prstena na granici faza. Ceo eksperiment je ponavljen 3 puta.

3.5 Određivanje hemolitičke aktivnosti sojeva *Plesiomonas shigelloides* na krvnom agaru i kinetike hemolize, enzimske aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNase agaru

U cilju utvrđivanja hemolize korišćen je krvni agar (2% triptozni pepton; ekstrakt kvasca 0,3%; 0,5% NaCl; 1,5% agar; u pripremljen i ohlađen osnovni medijum dodato je 5% ovčije defibrinisane krvi). Kolonije *P. shigelloides* izrasle na LBA podlozi inokulisane su ezom na površinu krvnog agara i nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24 sata posmatrana je pojava i tip hemolize. Ceo eksperiment je ponovljen tri puta (Morgan i sar., 1985).

Određivanje kinetike hemolize je obavljeno korišćenjem 1% rastvora eritrocita defibrinisane ovčije krvi u fiziološkom rastvoru. Rastvori eritrocita mešani su sa jednakom zapreminom bakterijske suspenzije zamućenja 1 na Mc Farland – ovoj skali ($\sim 3 \times 10^8$ CFU/mL) i bakterijskog supernatanta. Prethodno su bakterijska suspenzija i supernatant pripremljeni od prekonocne kulture sojeva *P. shigelloides* (2DD, 2KRD, 4KOVD, 1KD, 9HERD i ATCC51903). Neposredno nakon mešanja rastvora eritrocita i bakterijskih suspenzija odnosno bakterijskog supernatanta, kao i nakon 1, 2, 3, 5, 10 i 24 časova inkubacije na 37°C, sadržaj kiveta je alikvotiran u nove kivete i centrifugiran na 1000 g u trajanju od 5 minuta u cilju spuštanja eritrocita nakon čega je oslobođeni hemoglobin kvantifikovan u supernatantu na 540 nm (Tabatabai i sar., 2010). Kao pozitivna i negativna kontrola korišćeni su 1% SDS lizat odnosno rastvor eritrocita pripremljen u fiziološkom rastvoru. Procenat hemolize je određivan prema sledećem obrascu (Bag i sar., 2012):

$$\% \text{ Hemolize} = \frac{\text{Absorbanca tretmana} - \text{Absorbanca negativne kontrole}}{\text{Absorbanca pozitivne kontrole}} \times 100$$

Statistička analiza je obavljena korišćenjem one way-ANOVA i Tukey post hoc testa, a razlike su smatrane statistički značajne za $p < 0,05$ (Montanuci i sar., 2013).

Lipazna aktivnost je određivana na podlozi sa Tween 80 (0,5% pepton; 0,3% ekstrakt kvasca; 1% Tween 80; 0,01% CaCl₂; 1,5% agar) (Holding i Colee, 1971). Kolonije *P. shigelloides* izrasle na LBA podlozi inokulisane su ezom na pomenutu podlogu i nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24 sata praćena je pojava zamućenja usled nastanka kristala kalcijumovog sapuna. Ceo eksperiment je ponovljen tri puta.

Sposobnost sojeva *P. shigelloides* da hidrolizuju DNK ispitivana je na podlozi za detekciju DNA-zne aktivnosti sa metil zelenim (Smith i sar., 1977). Kolonije *P. shigelloides* izrasle na LBA podlozi inokulisane su ezom na pomenutu podlogu nakon čega su ploče ostavljene na inkubaciju na 37°C u trajanju od 24 časa. Nakon perioda inkubacije praćeno je obezbojavanje podloge oko mesta rasta bakterije koje se javlja kao posledica hidrolize DNK. Ceo eksperiment je ponovljen tri puta.

3.6 Pokretljivost sojeva *Plesiomonas shigelloides*

3.6.1 Test pokretljivosti u dubokom agaru

Analiza pokretljivosti sojeva *P. shigelloides* obavljena je korišćenjem polučvrste podloge za ispitivanje pokretljivosti (Edwards i Ewing, 1972) koja sadrži pepton iz mesa (Kemika, Hrvatska) 1%, mesni ekstrakt (Torlak, Srbija) 0,3%, NaCl (Centrohem, Srbija) 0,5% i agar (Torlak, Srbija) 0,4%. Prekonoćna kultura sojeva *P. shigelloides* gajena na LB podlozi (Himedia, Indija) je inokulisana ubodom bakteriološkom iglom do dna epruvete, a zatim su inokulisane podloge ostavljene na inkubaciju na 37 °C u trajanju od 24 h. Nakon perioda inkubacije kao pozitivne epruvete uzimane su one kod kojih je primećen rast koji se manifestuje kao zamućenje oko mesta uboda ezom.

3.6.2 Određivanje stepena pokretljivosti

U cilju određivanja stepena pokretljivosti sojeva *P. shigelloides* korišćena je podloga za određivanje plivajućeg kretanja tzv. *swim agar* koji sadrži tripton (Torlak, Srbija) 1%, NaCl (Centrohem, Srbija) 0,5%, agar (Torlak, Srbija) 0,25% (Wilhelms i sar, 2012). Nakon razlivanja u petri posude podloge su prosušene u trajanju od 10 minuta. Od prekonoćne kulture sojeva gajenih na LBA podlozi (Himedia, Indija) napravljene su suspenzije zamućenja 0,5 na Mc Farland – ovoj skali u fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl), tako da je brojnost ćelija iznosila približno 2×10^8 CFU/mL. Ovako pripremljene suspenzije su inokulisane ubodom u centar petri posude sa pomenutom podlogom. Nakon inkubacije na 37 °C u trajanju od 24 h vršeno je merenje prečnika halo zona formiranih od strane bakterija koje su migrirale od tačke inokulacije. Određivanje stepena pokretljivosti vršeno je u tri nezavisna ponavljanja.

3.7 Detekcija histidin dekarboksilazne aktivnosti sojeva *Plesiomonas shigelloides*

Prisustvo enzima histidin dekarboksilaze kod sojeva *P. shigelloides* utvrđivano je na podlozi sa histidinom opisanoj od strane Bover-Cid i Holzapfel (1999) (tabela 3.7).

Prekonoćna kultura sojeva *P. shigelloides* na LBA podlozi zasejavana je ubodom na podlogu za utvrđivanje histidin dekarboksilazne aktivnosti. U cilju kontrole paralelno je vršeno zasejavanje svih sojeva na podlogu identičnog sastava bez histidina. Nakon zasejavanja ploče su ostavljene na inkubaciju na 37 °C u trajanju od 12 časova. Pozitivna reakcija je beležena u slučaju promene boje podloge iz žute u ljubičastu oko mesta uboda. Ceo eksperiment je ponovljen 3 puta.

Tabela 3.7 Procentualni sastav podloge za utvrđivanje histidin dekarboksilazne aktivnosti među entero- i laktobakterijama

Komponenta	%
Tripton	0.5
Ekstrakt kvasca	0.5
Mesni ekstrakt	0.5
NaCl	0.25
Glukoza	0.05
Tween 80®	0.1
MgSO ₄	0.02
MnSO ₄	0.005
FeSO ₄	0.004
Amonijum citrat (NH ₄) ₂ C ₆ H ₆ O ₇	0.2
Vitamin B1	0.001
K ₂ HPO ₄	0.2
CaCO ₃	0.01
Vitamin B6	0.005
Histidin	1
Brom krezol purpurno	0.006
Agar	2
pH vrednost pre sterilizacije je podešena na 5.3	

3.8 Praćenje rasta sojeva *Plesiomonas shigelloides* u podlozi sa različitim koncentracijama NaCl

U cilju praćenja rasta sojeva *P. shigelloides* u prisustvu različitih koncentracija NaCl korišćen je LB bujon (1% tripton, 0,5% ekstrakt kvasca) koji je sadržao 3%, 4% i 5% NaCl. Od prekonoćne kulture sojeva gajenih na LBA podlozi (Himedia, Indija) napravljene su suspenzije zamućenja 0,5 na Mc Farland – ovoj skali u fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl), tako da je brojnost ćelija iznosila 2×10^8 CFU/mL. Ovako pripremljene suspenzije su inokulisane u količini od 100 μ L u epruvete koje su sadržale 3 mL LB podloge sa različitim koncentracijama NaCl. Epruvete su nakon inokulisanja ostavljene na inkubaciju na 37°C u trajanju od 24 časa. Nakon perioda inkubacije posmatrano je zamućenje podloge i u cilju poređenja očitavane su vrednosti optičke gustine na turbidimetru na 565 nm talasne dužine (Biosan SIA, Litvanija). Ceo eksperiment je ponovljen tri puta (Diba i sar., 2012).

3.9 Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva *Plesiomonas shigelloides* na antibiotike

Ispitivanje osetljivosti sojeva *P. shigelloides* na antibiotike vršeno je disk-difuzionom metodom prema CLSI standardu (Clinical Laboratory Standard Institute, NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standard Methods, 2011). Ukratko, korišćen je Mueller Hinton agar (Himedia, Indija) na koji su nanošene suspenzije zamućenja 0,5 na Mc Farlandovoj skali. Suspenzije su sterilnim štapićem sa vatom odnosno takozvanim brisom nanošene na podloge na koje su nakon kratkog sušenja aplicirani antibiotski diskovi. Ploče su zatim u obrnutom položaju ostavljene na inkubaciju na 37°C u trajanju od 24 časa. Nakon perioda inkubacije merene su zone inhibicije (mm) oko postavljenih diskova i u zavisnosti od prečnika zona naznačena opisna ocena delovanja antibiotika kao osetljiv (S), intermedijaran (I) i rezistentan (R), a prema uputstvima proizvođača. Za kontrolu testa osetljivosti korišćeni su sojevi *S. aureus* ATCC25923 i *E. coli* ATCC25922. Korišćeni su sledeći antibiogram diskovi (Bioanalyse, Turska): ampicilin (AM, 10 μ g), amoksisilin (AX, 25 μ g), amoksisilin/klavulonska kiselina (AMC, 20/10 μ g), cefoksitin (FOX, 30 μ g), cefotaksim (CTX, 30 μ g), ceftazidim (CAZ, 30 μ g), imipenem (IPM, 10 μ g), streptomycin (S, 300 μ g), neomicin (N, 30 μ g), kanamicin (K, 30 μ g), gentamicin (CN, 10 μ g), netilmicin (NET, 30 μ g), tobramicin (TOB, 10 μ g), amikacin (AK, 30 μ g), tetraciklin (TE, 30 μ g), doksiciklin (DO, 30 μ g), aztreonam (ATM, 30 μ g), ciprofloksacin (CIP, 5 μ g), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT, 1,25/23,75 μ g), hloramfenikol (C, 30 μ g).

3.10 Izolacija bakteriofaga

U cilju izolacije bakteriofaga specifičnih za vrstu *P. shigelloides* sakupljeno je 32 uzoraka površinskih i otpadnih voda sa više lokaliteta na teritoriji Srbije i Mađarske u periodu od 2011 do 2014. godine (tabela 3.10.1). Na lokalitetima je vršeno uzorkovanje na više različitih mesta u više navrata. Uzorci su uzimani u sterilne staklene boce 20 cm ispod površine vode i transportovani na temperaturi od 4°C do laboratorije radi dalje obrade. Svi pristigli uzorci profiltrirani su kroz nitrocelulozni filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemačka) sa porama prečnika 0,45 µm radi uklanjanja bakterijskih ćelija i nečistoća. U cilju izolacije specifičnih bakteriofaga vrste *P. shigelloides* korišćena su dva referentna soja i pet odabranih sojeva koji su izolovani iz površinskih voda. Spisak i poreklo sojeva korišćenih prilikom izolacije bakteriofaga specifičnih za vrstu *P. shigelloides* prikazani su u tabeli 3.10.2.

Svi sojevi *P. shigelloides* koji su korišćeni za izolaciju bakteriofaga iz uzoraka površinskih i otpadnih voda prethodno su indukcijom UV zračenjem provereni na prisustvo profaga u genomu prema protokolu opisanom od strane Raya i Hébert (2009) uz određene modifikacije. U cilju indukcije u sterilne petri posude je dodato 1 mL prekonocne bakterijske kulture nakon čega je sadržaj petri ploča izložen UV svetlu germicidne lampe u trajanju od 60 sekundi na razdaljini od 20 cm. Nakon toga je 0,1 mL sadržaja petri ploča prebačeno u epruvete sa LB podlogom, a epruvete su ostavljene na inkubaciju preko noći na 37°C. Nakon perioda inkubacije u epruvete je dodat hloroform u količini od 10% od ukupne zapremine nakon čega je sadržaj epruveta više puta naizmenično izlagan temperaturama od 4°C i 37°C u trajanju od 10 minuta. Sadržaj svake epruvete je zatim centrifugiran, a supernatant je na prisustvo faga proveravan *SPOT* metodom koja je podrazumevala nanošenje 10 µL sadržaja supernatanta na prethodno inokulisanu LBA podlogu kulturom *P. shigelloides* koja je korišćena prilikom izolacije virusa. Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24 časa posmatrana su mesta na kojima je nanošen supernatant, odnosno prisustvo ili odsustvo zona liziranih bakterijskih ćelija.

Izolacija bakteriofaga iz uzoraka površinskih i otpadnih voda vršena je tzv. *Single layer* i *agar overlay* metodom koje se rutinski koriste za kvantifikaciju bakteriofaga u uzorcima vode (USEPA, 2001; Adams, 1959). Ukratko, *agar overlay* metoda je podrazumevala mešanje profiltriranog uzorka u zapreminama od 1, 0,1 i 0,01 mL sa prekonocnom bakterijskom kulturom (0,1 mL) u rastopljenoj polutečnoj podlozi λ top (1% tripton, 0,5% NaCl, 0,65% agar), nakon čega je sadržaj epruveta razlivan po površini LBA podloge na petri ploči. Ploče su ostavljane na inkubaciju na 37°C u trajanju od 24 časa. Kod *Single layer* metode u erlenmajer posudi je mešana jednaka zapremina (50 mL) profiltriranog uzorka i dvostruko koncentrovanog mekog agara (2% tripton, 0,2% ekstrakt kvasca,

0,2% glukoza, 1,6% NaCl, 0,022% CaCl₂, 1,2% agar). Nakon homogenizacije dodavana je prekonočna bakterijska kultura (2,5 mL) i sadržaj erlenmajera je razlivan u petri ploče koje su ostavljane na inkubaciju na temperaturu od 37°C u trajanju od 24 časa.

Pored toga, jedan broj uzoraka koji je bio obrađen *agar overlay* metodom prethodno je podvrgnut obogaćivanju koje je podrazumevalo mešanje jednakih zapremina profiltriranog uzorka i LB bujona (25mL) uz dodatak prekonočne bakterijske kulture u zapremini od 0,1 mL. Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24 sata uz neprekidno mešanje (150 o/min), u erlenmajere je dodavan hloroform (1 mL) u cilju povećanja prinosa bakteriofaga oslobađanjem faga iz liziranih bakterijskih ćelija. Nakon toga, sadržaj erlenmajera je centrifugiran u trajanju od 2 minute pri brzini od 3000 rpm (Mikro-242 Tehnica, Slovenija) i supernatant je uz dodatak prekonočne kulture bakterije zasejavan u zapreminama od 1, 0,1 i 0,01 mL na opisan način, *agar overlay* metodom.

Tabela 3.10.1 Uzorci površinskih voda korišćeni u cilju izolacije bakteriofaga specifičnih za vrstu *P. shigelloides*.

Poreklo uzoraka	Broj uzoraka n=32	Način zasejavanja	Napomena
Reka Dunav	10	1SL + 9AO(O)	izliv otpadnih voda GC-1, Novi Sad, Srbija
Reka Dunav	3	1SL + 2AO(O)	izliv otpadnih voda GC-2, Novi Sad, Srbija
Reka Dunav	2	2SL	Smederevo, Srbija
Reka Sava	1	1SL	Jarak, Srbija
Reka Tisa	1	1SL	Segedin, Mađarska
Kanal Dunav-Tisa-Dunav	4	1SL + 3AO(O)	Novi Sad, Srbija
Jezero Palić	2	1SL + 1AO(O)	Subotica, Srbija
Jezero Borkovac	3	1SL + 2AO(O)	Ruma, Srbija
Jezero Hermann Ottó	2	2SL	Pečuj, Mađarska
Jezero Kovácsszénája	2	2SL	Pečuj, Mađarska
Jezero Pecs	2	2SL	Pečuj, Mađarska

SL – single layer metoda; AO – agar overlay metoda; O - obogaćenje

Tabela 3.10.2 Spisak i poreklo sojeva koji su korišćeni u cilju izolacije bakteriofaga specifičnih za vrstu *P. shigelloides*

Soj <i>P. shigelloides</i>	Poreklo soja
ATCC51903	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
ATCC14029	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
DBPM1	Reka Dunav
DBPM2	Reka Dunav
1PAD	Jezero Palić
2VD	Jezero Vranjaš
3ŠELD	Jezero Šelevrenac

Nakon perioda inkubacije petri ploče su pregledane i detektovane plake su zajedno sa delom podloge izolovane pomoću sterilisane eze i prebačene u kivete sa SM puferom (0,58% NaCl, 0,2% MgSO₄ x 7H₂O, 50 mL/l 1M Tris-HCl na pH=7,4 i 5mL/l 2% želatina). U kivete sa plakama u SM puferu dodato je nekoliko kapi hloroforma, nakon čega su kivete ostavljene na 4°C.

Nakon 24 časa proveravano je prisustvo faga u kivetama tzv. *SPOT* metodom.

Nakon potvrde prisustva virusa u kivetama sa plakama obavljena je reizolacija virusa. U cilju reizolacije virusa od početnih kiveta sa plakama je napravljena serija desetostepenih razređenja u SM puferu. Iz svakog razređenja uzeto je 10 µL sadržaja i prebačeno u epruvetu sa rastopljenom λ top podlogom u koju je zatim dodata kultura soja *P. shigelloides* koji je korišćen prilikom izolacije. Sadržaj epruveta je razlivan na LBA podlogu i nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24 časa sa odgovarajućih razređenja sterilnom ezom izolovana je pojedinačna plaka. U kivetu sa SM puferom i plakom dodavano je par kapi hloroforma, nakon čega je kiveta ostavljana u frižider. Ceo postupak ponovljen je tri puta.

3.11 Umnožavanje, prečišćavanje i koncentrovanje izolovanih bakteriofaga

Umnožavanje izolovanih bakteriofaga vršeno je agar overlay metodom. Prethodno je pripremljena serija desetostepenih razređenja kivete sa plakom u SM puferu. Iz svakog razređenja uzeto je 10 µL sadržaja i prebačeno u epruvetu sa rastopljenom λ top podlogom u koju je zatim dodata prekonoćna kultura soja *P. shigelloides* koji je korišćen prilikom izolacije. Sadržaj epruveta je razlivan na LBA podlogu i nakon inkubacije od 24 časa na temperaturi od 37°C registrovano je razređenje koje je dalo semikonfluentne plake. Pomenuto razređenje je u cilju propagacije virusa dalje zasejavano *agar overlay* metodom u 50 do 60 ponavljanja. Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24 časa petri ploče sa formiranim semikonfluentnim plakama su prelivene sa po 5 mL SM pufera i ostavljene na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Po isteku 30 minuta petri ploče su ostavljene na 4°C u trajanju od 24 časa, nakon čega je sadržaj ploča aspiriran i prebačen u erlenmajer posudu u koju je dodat hloroform u količini od 0,5% od ukupne zapremine (Kropinski i sar., 2009).

Suspenzija bakteriofaga je dalje prečišćavana i koncentrovana. Prvi korak je podzumevao centrifugiranje sadržaja erlenmajera na 11 000 g (Beckman L8-70M, SAD) u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 4°C nakon čega je dobijeni supernatant profiltriran kroz filtere pora 0,2 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Nemačka). U filtrat je zatim dodavano 58,4 g/l NaCl (Centrohem, Srbija) i 100 g/l polietilen glikola (PEG 6000) (Merck, Nemačka). Ovako pripremljena suspenzija je razlivena u kivete koje su preko noći ostavljene na ledu. Sledećeg dana sadržaj kiveta je centrifugiran na 11 000

g (Beckman L8-70M, SAD) u trajanju od 10 minuta pri temperaturi od 4°C. Nakon odlivanja supernatanta preostali talog faga je resuspendovan u SM puferu koji u svom sastavu nije sadržao želatin. Dobijena suspenzija je prebačena u nove kivete u koje je zatim dodata jednaka zapremina hloroforma. Nakon dodavanja hloroforma sledilo je centrifugiranje pri brzini od 3000 rpm (Damon/IEC Division IEC PR-J, SAD) tokom 15 minuta na temperaturi od 4°C nakon čega je vodena faza sa fagima izdvojena u nove kivete.

Dalje prečišćavanje i koncentrovanje izolovanih bakteriofaga podrazumevalo je centrifugiranje bakteriofaga u gradijentu ili ekvilibrijumu CsCl. Jedan broj bakteriofaga je nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl dodatno koncentrovan i prečišćen u ekvilibrijumu CsCl.

U cilju prečišćavanja i koncentrovanja faga u gradijentu CsCl (Sigma Aldrich, Nemačka) pripremani su rastvori CsCl različitih gustina (1,15 g/mL, 1,33 g/mL, 1,45 g/mL, 1,5 g/mL i 1,7 g/mL) (tabela 3.11) u SM puferu koji u svom sastavu nije sadržao želatin. Kako ne bi došlo do mešanja slojeva, rastvori CsCl različitih gustina pažljivo su prebačeni u kivete tako da je sloj sa najvećom gustinom prvo dodat nakon čega su redom dodavani slojevi manjih gustina. Na ovako formirani gradijent u kiveti dodata je prethodno pripremljena suspenzija faga u rastvoru CsCl gustine 1,15 g/mL sa ili bez PEG-a (slika 3.11). Sadržaj kiveta je centrifugiran u rotoru Beckman SW 30.1 pri brzini od 20 000 rpm u toku 6 časova i 30 minuta na 4°C. Nakon centrifugiranja plavičasta zona sa prečišćenim i koncentrovanim bakteriofagima je izvučena pomoću šprica i prebačena u novu kivetu radi uklanjanja CsCl dijaliziranjem. Dijaliza je vršena u dve etape, 1 sat na 20°C a zatim preko noći na 4°C. Nakon dijalize kivete sa fagima su ostavljene na 4°C (Villafane, 2009).

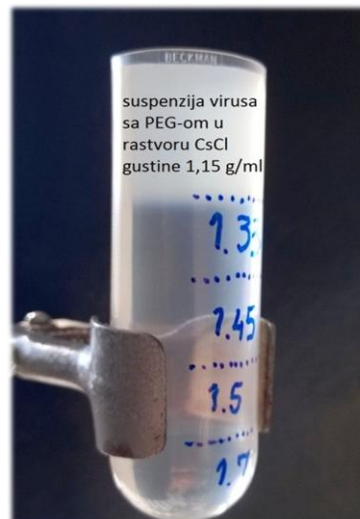
Centrifugiranje u ekvilibrijumu ili izopikničko centrifugiranje suspenzije pojedinih faga obavljeno je nakon postupka oslobađanja od PEG-a. Prethodno je dodato 0,83 g CsCl na 1 mL suspenzije bakteriofaga tako da je konačna gustina iznosila 1,5 g/mL. Tako pripremljena suspenzija je razlivena u kivete koje su postavljene u fiksni rotor Ti50 i centrifugirane u trajanju od 24 časa na 110 000 g na 4°C korišćenjem ultracentrifuge (Beckman L8-70M, SAD). Nakon centrifugiranja koje je dovelo do formiranja gradijenta u kivetama, plavičasta zona sa koncentrovanim i prečišćenim bakteriofagima je izvučena pomoću šprica i prebačena u novu kivetu radi uklanjanja CsCl dijaliziranjem. Dijaliza je vršena na gore opisan način a kivete sa fagima su nakon dijalize ostavljene na 4°C (Villafane, 2009).

Pored toga jedan broj bakteriofaga je nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl dodatno koncentrovan i prečišćen u ekvilibrijumu CsCl. Nakon centrifugiranja u gradijentu CsCl, plavičasta zona sa koncentrovanim i prečišćenim bakteriofagima je izvučena pomoću šprica i prebačena u novu kivetu koja je dopunjena rastvorom CsCl gustine 1,5 g/mL. Sadržaj kivete je centrifugiran u rotoru Beckman Ti50 pri brzini od 110 000 g u toku 24 časa na temperaturi od 4°C. Nakon centrifugiranja

plavičasta zona sa prečišćenim i koncentrovanim bakteriofagima je izvučena pomoću šprica i prebačena u novu kivetu radi uklanjanja CsCl dijaliziranjem. Dijaliza je vršena na gore opisan način a kivete sa fagima su nakon dijalize ostavljene na 4°C (Sambrook i Russell, 2006).

Tabela 3.11 Način pripreme rasvora CsCl različitih koncentracija (Ausubel i sar.,1998)

Rastvori (g/mL)	CsCl (g)	SM pufer (mL)
1,7	56,24	43,76
1,5	45,41	54,59
1,45	42,23	57,77
1,33	33,64	66,36
1,15	17,38	82,62



Slika 3.11. Kiveta pripremljena za centrifugiranje bakteriofaga u gradijentu gustine CsCl. Na vrhu stuba tečnosti nalazi se suspenzija bakteriofaga u rastvoru CsCl gustine 1,15 g/mL u kojoj je prisutan i PEG 6000 (daje suspenziji belu boju) koji ne mora nužno biti uklonjen u prethodnom koraku. Slede rastvori CsCl gustina 1,33 g/mL, 1,45 g/mL, 1,5 g/mL i 1,7 g/mL

U cilju utvrđivanja brojnosti bakteriofaga u suspenziji dobijenoj nakon postupaka prečišćavanja i koncentrovanja napravljena je serija desetostepenih razređenja u SM puferu iz početne kivete. Iz svakog razređenja uzeto je 10 µL sadržaja i prebačeno u epruvetu sa rastopljenom λ top podlogom u koju je zatim dodata prekonoćna kultura soja *P. shigelloides* koji je korišćen prilikom izolacije. Sadržaj epruveta je razlivan na LBA podlogu u tri ponavljanja i nakon inkubacije od

24 časa na temperaturi od 37°C brojane su plake a njihov broj je pomnožen sa odgovarajućim konačnim razređenjem. Brojnost bakteriofaga je izražavana po 1 mL suspenzije.

3.12 Utvrđivanje litičkog spektra bakteriofaga

Litički spektar bakteriofaga ispitivan je *SPOT* metodom na sojevima *P.shigelloides* poreklom iz vodene sredine kao i 2 referentna soja (homologi domaćini). Pored toga ispitivana je mogućnost infekcije sojeva drugih vrsta bakterija (heterologi domaćini) (tabela 3.12). Na prethodno inokulisanu LBA podlogu bakterijskim kulturama nanošeno je po 10 µL prečišćene suspenzije virusa u kojoj je brojnost virusa iznosila približno 10⁸/mL. Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24 časa posmatrana su mesta nanošenja virusne suspenzije, odnosno prisustvo ili odsustvo zona liziranih bakterijskih ćelija. Zone su opisivane kao prozirne i mutne sa ili bez halo regija (Kutter, 2009).

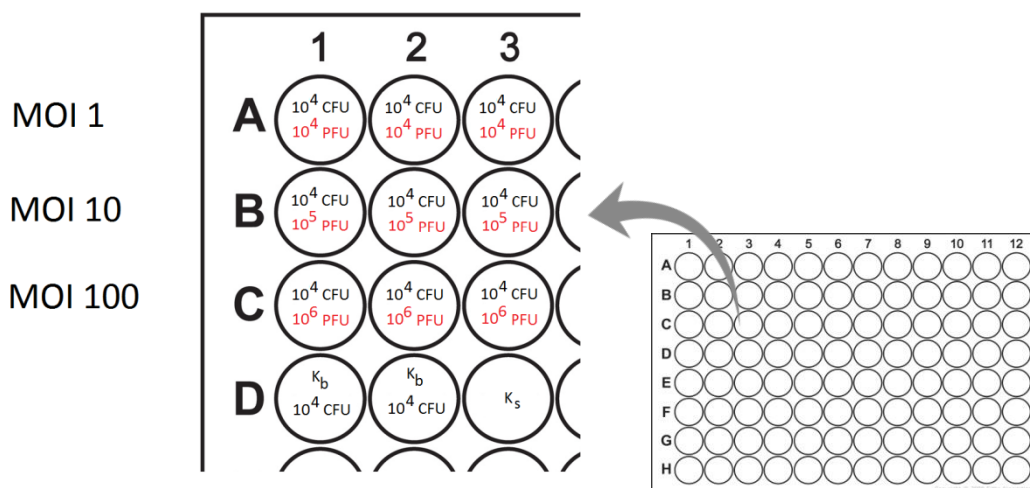
Tabela 3.12 Sojevi bakterija korišćeni kao heterologi domaćini prilikom utvrđivanja litičkog spektra bakteriofaga izolovanih na vrsti *P. shigelloides*

Bakterijski soj	Poreklo soja
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> ZP17	Zapadna Morava, Srbija
<i>Aeromonas hydrophila</i> J13	Jegrička bara, Srbija
<i>Aeromonas hydrophila</i> M10	Reka Tisa, Srbija
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC13706	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 36913	Patološki materijal, Institut za Javno Zdravlje Vojvodine
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC9610	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC10580	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC13076	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCCBAA747	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 34506	Patološki materijal, Institut za Javno zdravlje Vojvodine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Referentni laboratorijski soj
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29219	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Referentni soj, <i>American Type Culture Collection</i>

3.13 Karakterizacija odabranih bakteriofaga

3.13.1 Ispitivanje *in vitro* efikasnosti faga

Litička efikasnost odabranih bakteriofaga na originalnim domaćinima određivana je metodom opisanom od strane Kalatzis i saradnika (2016) uz određene modifikacije. Ukratko, prekonoćne kulture sojeva *P. shigelloides* gajene na LBA podlozi korišćene su za pripremu suspenzija zamućenja 1 na Mc Farlandovoj skali u 0.9% fiziološkom rastvoru, tako da je brojnost ćelija u epruvetama iznosila približno 3.00×10^8 CFU/mL. Nakon pripreme serije desetostepenih razređenja pomenute suspenzije u LB podlozi, otvori mikrotitar ploče (Greiner bio-one, Nemačka) su popunjeni sa 200 μ L saržaja epruvete sa odgovarajućim razređenjem tako da je brojnost bakterija po otvoru ploče iznosila približno 10^4 CFU. Modifikacija metode je podrazumevala dodavanje virusa u otvore ploče odmah nakon dodavanja bakterijske suspenzije za razliku od originalne metode gde su virusi dodavani u eksponencijalnoj fazi rasta bakterije. Multiplicitet infekcije u otvorima je podešen na 1, 10 i 100, odnosno virusi su dodavani tako da je njihova brojnost u otvorima iznosila 10^4 , 10^5 i 10^6 . Za svaki soj korišćeno je 12 otvora mikrotitar ploče tako da je po 3 otvora korišćeno za svaki tretman pri različitom multiplicitetu infekcije (MOI), 2 otvora u koje nisu dodati virusi korišćeno je za kontrolu rasta bakterije i 1 otvor korišćen je kao kontrola sterilnosti podloge (slika 3.13.1).



Slika 3.13.1 Ispitivanje *in vitro* efikasnosti faga u mikrotitar ploči. Za svaki soj korišćeno je 12 otvora. Svi velovi u okviru tretmana sadržali su istu brojnost bakterija, dok je brojnost virusa varirana po redovima. Kontrolni red sadržao je dva otvora sa istom brojnošću bakterija kao u tretmanima i jedan otvor ispunjen neinokulisanim LB podlogom

Ovako popunjena mikrotitar ploča je ostavljena na inkubaciju na 37°C na orbitalnoj mešalici (Thermo Scientific MaxQ 4450) pri brzini od 100 rpm. Na svakih sat vremena očitavana je apsorbancija na 560 nm u periodu od 15 časova. Ceo eksperiment je ponovljen 3 puta a rezultati su predstavljeni grafički (Statistica 13, Dell Inc, 2015).

3.13.2 Određivanje efikasnosti stvaranja virusnih plaka

Određivanje efikasnosti stvaranja virusnih plaka (eng. *Efficiency of Plating*, EOP) obavljeno je metodom koju je opisala Kutter (2009). U eksperimentu su korišćeni sojevi *P. shigelloides* sa kojih su virusi izolovani (originalni domaćini) i sojevi za koje je prethodno potvrđena mogućnost lize od strane virusa SPOT metodom (test domaćini). U cilju određivanja efikasnosti stvaranja virusnih plaka pripremljene su desetostepene serije razređenja u SM puferu prečišćenih i koncentrovanih virusnih suspenzija. Razređenja virusa u količini od 10 µL su nanošena na prethodno inokulisane LBA podloge sojevima *P. shigelloides*. Inokulacija LBA podloge je podrazumevala dodavanje 100 µL prekončne kulture *P. shigelloides* u polutečni λ top medijum kojim je zatim prelivena LBA podloga. Nakon nanošenja virusnih suspenzija petri ploče su ostavljene na inkubaciju na 37°C u trajanju od 24 časa. Po završetku perioda inkubacije vršeno je prebrojavanje plaka sa poslednjeg pozitivnog razređenja. Relativna vrednost efikasnosti stvaranja virusnih plaka je zatim određivana prema sledećem obrascu:

$$\text{rEOP} = \frac{\text{broj plaka na test domaćinu}}{\text{broj plaka na originalnom domaćinu}}$$

Ceo eksperiment je ponovljen tri puta.

3.13.3 Efikasnost adsorpcije faga na različitim temperaturama

Efikasnost adsorpcije faga na različitim temperaturama određivana je metodom opisanom od strane Capra i sar. (2006). Ukratko, od prekončne kulture originalnih domaćina *P. shigelloides* gajenih na LBA podlozi napravljene su suspenzije zamućenja 0,5 na Mc Farland–ovoj skali u fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl). Tako pripremljena suspenzija je dodata u kivetu koja je sadržala istu količinu dvostruko koncentrovane LB podloge tako da je brojnost ćelija iznosila ~10⁸ CFU/mL. U kivetu je zatim dodata suspenzija faga (~10⁸ PFU/mL) u količini od 100 µL (MOI 0,1). Kao kontrole

korišćene su kivete bez bakterijskih ćelija. Kivete su ostavljene na inkubaciju u trajanju od 30 minuta na temperaturama od 8°C, 22°C, 37°C i 44°C. Nakon perioda inkubacije ćelije sa adsorbovanim fagima su spuštene centrifugiranjem (Eppendorf 5424 R) na 10 000 g u trajanju od 5 minuta. Dobijeni supernatant je prebačen u nove kivete i pripremljena je serija desetostepenih razređenja u SM puferu. Razređenja su dalje korišćena za određivanje broja neadsorbovanih faga *agar overlay* metodom. Procenat adsorbovanih faga računat je prema sledećem obrascu:

$$\% \text{ Adsorpcije} = \frac{\text{Titar faga u kont. kivetama} - \text{Titar faga u supernatantu}}{\text{Titar faga u kont. kivetama}} \times 100$$

Rezultati su predstavljeni grafički (Statistica 13, Dell Inc, 2015) kao srednje vrednosti tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

3.13.4 Uticaj različitih pH vrednosti na vijabilnost bakteriofaga

U cilju provere uticaja različitih pH vrednosti na vijabilnost bakteriofaga specifičnih za vrstu *P. shigelloides* pripremljen je SM pufer koji je pomoću 1M HCl i 1M NaOH podešen na pH vrednosti u opsegu od 2 do 11. U ovako pripremljene pufere u epruvetama dodata je suspenzija virusa tako da je brojnost iznosila približno 10^8 PFU/mL. Nakon 60 minuta inkubacije na temperaturi od 25°C iz sadržaja epruveta pripremljena su desetostepena razređenja u SM puferu. Brojnost vijabilnih faga je zatim određivana *agar overlay* metodom. Ceo eksperiment je ponovljen tri puta (Di Lallo i sar., 2014). Rezultati su predstavljeni grafički (Statistica 13, Dell Inc, 2015) kao srednje vrednosti % vijabilnih faga \pm standardna devijacija.

3.13.5 Efekat visokih temperatura na vijabilnost bakteriofaga

U cilju provere uticaja visokih temperatura na vijabilnost bakteriofaga specifičnih za vrstu *P. shigelloides* suspenzija virusa je dodata u SM pufer ($\sim 10^8$ PFU/mL) i inkubirana na 25°C (kontrola), 40°C, 50°C i 60°C u trajanju od 10, 20, 40 i 60 minuta. Nakon perioda inkubacije pripremljena je serija desetostepenih razređenja sadržaja kiveta nakon čega je broj vijabilnih faga određivan *agar overlay*

metodom. Ceo eksperiment je ponovljen 3 puta (Di Lallo i sar., 2014). Rezultati su predstavljeni grafički (Statistica 13, Dell Inc, 2015) kao srednje vrednosti % vijabilnih faga \pm standardna devijacija.

3.13.6 Kriva multiplikacije bakteriofaga „One step growth curve“

Kriva multiplikacije bakteriofaga, tzv. „One step growth curve“, određivana je metodom opisanom od strane Bao i sar., (2011). Ukratko, prekonoćne kulture sojeva *P. shigelloides* gajene na LBA podlozi korišćene su za pripremu suspenzija zamućenja 0,5 na Mc Farlandovoj skali u 0,9% fiziološkom rastvoru, tako da je brojnost ćelija iznosila približno $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Sadržaj epruveta je zatim centrifugiran na 7000xg (Eppendorf 5810 R) pri temperaturi od 4°C trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven a talog je resuspendovan u 4,5 mL LB podloge. U kivetu sa odgovarajućim razređenjem početne suspenzije bakterija u LB podlozi dodata je virusna suspenzija (0,5 mL) tako da je multiplicitet infekcije iznosio ~ 10 (MOI ~ 10). Nakon dodavanja virusa suspenzija je dodatno razređena 10 puta u LB podlozi nakon čega je u cilju adsorpcije virusa za površine bakterijskih ćelija sadržaj kiveta inkubiran na 37°C u trajanju od 15 minuta na orbitalnoj mešalici (Thermo Scientific MaxQ 4450) pri brzini od 100 rpm. Po isteku vremena sadržaj kiveta je centrifugiran na 7000xg pri temperaturi od 4°C trajanju od 5 minuta nakon čega je odliven supernatant sa neadsorbovanim fagima. U kivete je zatim dodata nova količina LB podloge (4,5 mL) nakon čega je određivan titar virusa *agar overlay* metodom. Kivete su ostavljene na inkubaciju na 37°C uz agitaciju (100 rpm) a titar je određivan alikvotiranjem 100 μ L sadržaja kiveta sa tretmanima na svakih 15 minuta *agar overlay* metodom u trajanju od 150 minuta. Podaci vezani za brojnost faga su korišćeni za konstruisanje krive (Statistica 13, Dell Inc, 2015) i određivanje parametara krive rasta odabranih bakteriofaga.

3.13.7 Transmisiona elektronska mikroskopija bakteriofaga

U cilju klasifikacije i određivanja morfologije i veličine virusa korišćena je transmisiona elektronska mikroskopija. Visoko prečišćena i koncentrovana suspenzija odabranih virusa nanošena je na bakarnu mrežicu presvučenu Formvar filmom. Nakon 5 minuta višak suspenzije sa neadsorbovanim virusima je uklonjen, a pričvršćeni virusi su negativno bojani 1 % vodenim rastvorom uranil acetata u toku jednog minuta (Bozzola i Russell, 1998). Obojeni uzorci su ostavljeni radi sušenja i posmatrani upotrebom transmisionog elektronskog mikroskopa pri naponu od 60 kV

(CM12 Philips/FEI, Holandija i CM100 Philips, Holandija). Slike su dobijene upotrebom kamera SIS MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Nemačka) i BioScan 792 (Gatan, Velika Britanija). Transmisiona elektron-mikroskopska (TEM) analiza je urađena na Biotehničkom fakultetu Univerziteta u Ljubljani i u Centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.13.8 Ekstrakcija nukleinske kiseline bakteriofaga

Nukleinski materijal odabranih bakteriofaga izolovan je fenol-hloroform metodom opisanom od strane Sambrook i Russell (2001). Prethodno je u 1 mL visoko prečišćene i koncentrovane suspenzije bakteriofaga dodata DNase I (1 μ L, 1U/ μ L, Thermo Scientific) i RNase A (5 μ L, 10 mg/mL, Thermo Scientific) u cilju uklanjanja zaostale bakterijske DNK i RNK. Smeša je inkubirana na 37°C u trajanju od 1 časa nakon čega je izvršena inaktivacija DNase I na 65°C u trajanju od jednog časa. U cilju oslobađanja nukleinske kiseline iz kapsida u suspenziju je zatim dodat 10% SDS (50 μ L, Thermo Scientific), proteinaza K (2,5 μ L, 20mg/mL, Thermo Scientific) i 0,5M rastvor Na₂EDTA (40 μ L). Smeša je inkubirana na 56°C u trajanju od jednog časa, nakon čega je ohlađena do sobne temperature. Sadržaj kivete je podeljen na dve nove kivete u koje je dodata jednaka zapremina ekvilibrisanog fenola (Sigma Aldrich, UK). Kivete su centrifugirane na 5000 rpm na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta nakon čega je izdvojena vodena faza. Postupak je zatim ponovljen sa smešom fenola i hloroforma (1:1), a u poslednjem ciklusu dodat je samo hloroform (POCH SA). Precipitacija DNK je vršena ledenim etanolom (95%) uz dodatak 3M natrijum acetata u trajanju od 30 minuta pri temperaturi od -20°C nakon čega je sadržaj kiveta u cilju razdvajanja DNK centrifugiran 20 minuta na 14000 rpm pri temperaturi od 4°C. Ispiranje DNK je vršeno u 70% etanolu centrifugiranjem na 4°C u trajanju od 5 minuta. Nakon ispiranja dobijeni pelet je ostavljen na sobnoj temperaturi radi sušenja, nakon čega je dodato 20 do 50 μ L elucionog pufera. Koncentracija i čistoća izolovane DNK je određena spektrofotometrom BioSpec-nano (Shimadzu Cooperation, Japan) nakon čega su uzorci DNK ostavljeni u zamrzivač na -20°C.

3.13.9 Digestija virusne DNK restrikcionim enzimima – RFLP analiza

Uzorci DNK virusa podvrgnuti su restrikcionoj digestiji enzimima DraI, Sall i SmaI (tabela 3.13.9) prema uputstvima proizvođača (ThermoFisher Scientific). Produkti digestije razdvojeni su na 2% agaroznom gelu sa etidijum bromidom, a dobijene trake su vizuelizovane UV svetlom u aparatu

za vizuelizaciju gelova BioDocAnalyse (Biometra, Nemačka). U cilju određivanja veličine dobijenih fragmenata i procene veličine genoma odabranih bakteriofaga konstruisana je standardna kriva korišćenjem programa Statistica 13, a na osnovu podataka dobijenih za molekularne markere (1kb, λ DNA/Hind III, ThermoFisher Scientific).

Tabela 3.13.9 Restrikcioni enzimi korišćeni u RFLP analizi

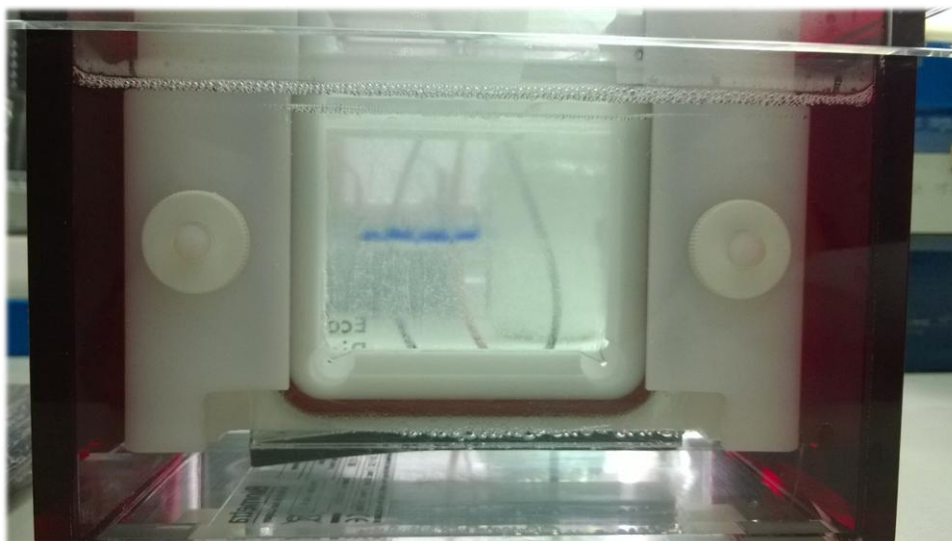
Restrikcioni enzim	Restrikciono mesto
DraI	5' TTT↓AAA 3' 3' AAA↑TTT 5'
Sal I	5' G↓TCGA C 3' 3' C AGCT↑G5'
SmaI	5' CCC↓GGG 3' 3' GGG↑CCC 5'

3.13.10 Analiza strukturnih proteina bakteriofaga metodom SDS-PAGE

Ekstrakcija strukturnih proteina odabranih bakteriofaga vršena je metanol-hloroform metodom opisanom od strane Moak i Molineux (2004). Ukratko, visoko prečišćena i koncentrovana suspenzija bakteriofaga je pomešana sa ledenim metanolom i hloroformom u odnosu 1:1:0,75. Sadržaj kiveta je zatim centrifugiran 10 minuta na 14 000 rpm pri temperaturi od 4°C. Nakon uklanjanja gornjeg sloja dodat je metanol i sadržaj kiveta je centrifugiran 10 minuta na 14 000 rpm pri temperaturi od 4°C.

Dobijeni pelet ostavljen je na sobnoj temperaturi radi sušenja, nakon čega je rastvoren u dvostruko koncentrovanom SDS puferu za lodiranje (1 mL 1M Tris HCl pH 6.8, 4mL 10% SDS, 2mL glicerola, 2,5 mL β -merkaptotetanol, 0,5 mL 1% rastvora Bromfenol plavog, 10 mL dH₂O). Ovako pripremljeni uzorci i proteinski marker (Protein MW Marker, Thermo Scientific, Litvanija) su ostavljeni u ključaloj vodi u trajanju od 10 minuta i lodirani na 12% poliakrilamidni gel. Elektroforetsko razdvajanje obavljeno je pri naponu od 200 V u trajanju od oko 2 časa (slika 3.13.10) nakon čega je gel potopljen u rastvor boje Coomassie blue (0,1% Coomassie blue R250, 10% glacijalne sirćetne kiseline, 40% metanola, 50% dH₂O). Nakon bojenja u trajanju od jednog časa gel je prebačen u rastvor za fiksiranje gelova (50% metanol, 10% glacijalna sirćetna kiselina i 40% dH₂O) gde je ostavljen 2 časa nakon čega je vršeno obezbojavanje preko noći u rastvoru za obezbojavanje gelova (40% metanola, 10% glacijalne sirćetne kiseline, 50% dH₂O). Po završetku postupka obezbojavanja gel je fotografisan fotoaparatom Canon EOS 1100D. U cilju određivanja molekulske mase strukturnih

proteina konstruisana je standardna kriva pomoću programa Statistica 13, a na osnovu podataka dobijenih za proteinski marker.



Slika 3.13.10 Elektroforetsko razdvajanje strukturnih proteina izolovanih bakteriofaga

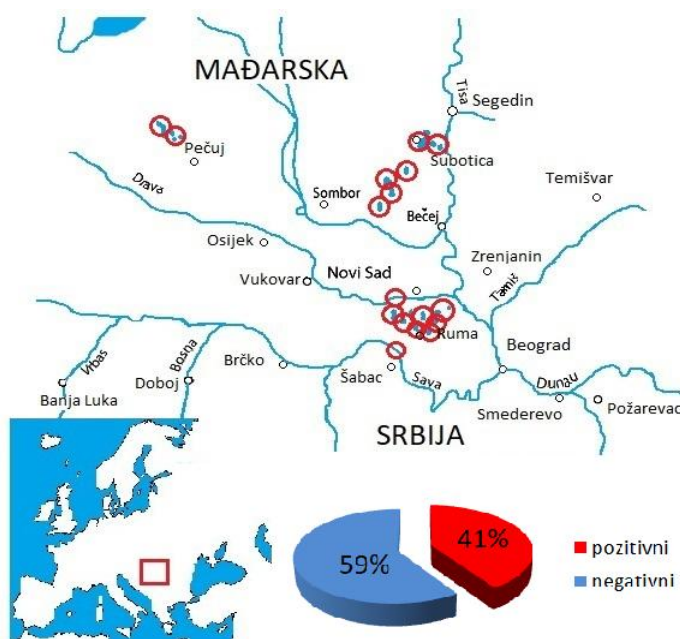
3.14 Detekcija izolovanih bakteriofaga protočnom citometrijom

Priprema i bojenje bakteriofaga u cilju njihove detekcije na protočnom citometru obavljani su metodom opisanom od strane Brussaard (2004). Ukratko, u cilju fiksacije je u 1 mL odgovarajućeg razređenja visoko prečišćene suspenzije bakteriofaga dodat 25% rastvor glutaraldehida tako da je njegova finalna koncentracija iznosila 0,5%. Uzorak je zatim inkubiran 15 - 30 minuta pri temperaturi od 4°C nakon čega je ostavljen na -180°C u trajanju od jednog minuta. Nakon isteka vremena u kivetu sa uzorkom dodato je 5 μ L fluorescentne boje SYBR® Green I (Invitrogen, SAD). Uzorak je zatim inkubiran u vodenom kupatilu (VIMS Elektrik, Srbija) na 80°C u mraku u trajanju od 10 minuta. Nakon perioda inkubacije obavljena je sonikacija u ultrazvučnom kupatilu (Iskra SONIS 3, Slovenija) sadržaja kivete u trajanju od 30 sekundi. Ovako pripremljeni uzorci očitavani su na protočnom citometru (Guava EasyCyte, Guava Technologies Inc, SAD) korišćenjem softvera IMV Technologies (L'Aigle, Francuska). Protočni citometar podešen je na najveću osetljivost na zelenom fluorescentnom kanalu (FL1). Paralelno je brojnost virusa u suspenziji određena *agar overlay* metodom. Rezultati su prikazani grafički (Statistica 13, Dell Inc, 2015) kao srednje vrednosti tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Citometrijska analiza obavljena je na Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu.

4. REZULTATI

4.1 Izolacija sojeva *Plesiomonas shigelloides* i identifikacija na osnovu morfoloških, kulturelnih i biohemijskih karakteristika

Od ukupno analiziranog 51 uzorka poreklom iz različitih vodenih sredina, 22 uzorka (40,7%) su bila pozitivna na prisustvo bakterije *P. shigelloides*. Preliminarnim testovima (bojenje po Gramu, oksidaza i katalaza test, test produkcije indola, test hidrolize želatina, test korišćenja citrata i test fermentacije ugljenih hidrata) bakterija je dokazana u uzorcima vode koji su direktno zasejavani tehnikom razmazivanja na modifikovani PDA podlogu (slika 4.1) (prilog 2), a koji su bili poreklom iz jezera: Ludoš, Panonija, Krivaja, Pecs, Kapetanski rit, Kovácsszénája, Vranjaš, Hermann Ottó, Sot, Šelevrenac, Zobnatica, Palić, Orfúí, Jarkovci i Čonoplja. Pored toga, preliminarni testovi su dokazali prisustvo bakterije u uzorcima poreklom iz 4 jezera (Šatrinci, Pavlovci, Dobrodol i Borkovac) i reka Dunava i Save, kada je korišćena procedura obogaćenja na alkalnoj peptonskoj vodi. U uzorcima vode poreklom iz Bešenovačkog jezera, Krvavog jezera i jezera Tikvara kao i uzorcima poreklom iz reke Tise i rukavca Dunava kod Bačke Palanke nije detektovano prisustvo vrste *P. shigelloides*. Od 37 pozitivnih izolata, 34 su bila poreklom iz jezerske vode, a 3 izolata su izolovana iz reka. Lista izolovanih sojeva sa lokalitetima i podlogama koje su korišćene prilikom izolacije prikazana je u tabeli 4.1.



Slika 4.1. Geografska rasprostranjenost lokaliteta/uzoraka pozitivnih na prisustvo vrste *P. shigelloides* kao i procentualna zastupljenost pozitivnih uzoraka

Tabela 4.1. Lista izolovanih sojeva sa lokalitetima uzorkovanja kao i procedure i podloge korišćene prilikom izolacije

Oznaka soja		Lokalitet uzorkovanja	Procedura zasejavanja i korišćena podloga
2ŠD	Jezera	Šatrinci; 46° 04' 5" N, 19° 55' 0" E	APW → PDA*
1 LD, 2LD		Ludaš; 46° 50' 0" N, 19° 49' 0" E	PDA*
6PAND, 4PAND		Panonija; 45° 44' 1" N, 19° 31' 4" E	PDA
1KD, 8KD		Krivaja; 45° 50' 1" N, 19° 29' 5" E	PDA
1PECD, 4PECD		Pecs; 46° 09' 3" N, 18° 08' 2" E	PDA
2KRD, 5KRD, 6KRD		Kapitanski rit; 46° 02' 2" N, 19° 56' 3" E	PDA
2PD		Pavlovci; 45° 04' 2" N, 19° 47' 5" E	APW → PDA
1KOVD, 4KOVD		Kovácsszénája; 46° 10' 4" N, 18° 06' 5" E	PDA
2DD, 5DD		Dobrodol; 45° 02' 3" N, 19° 56' 4" E	APW → PDA
2VD, 8VD		Vranjaš; 45° 05' 4" N, 19° 35' 5" E	PDA
2BD, 4BD		Borkovac; 45° 02' 3" N, 19° 49' 1" E	APW → PDA
6HERD, 9HERD		Hermann Ottó; 46° 10' 3" N, 18° 07' 5" E	PDA
7SD		Sot; 45° 09' 3" N, 19° 20' 2" E	PDA
3ŠELD		Šelevrenac; 45° 04' 3" N, 19° 59' 5" E	PDA
1ZD, 3ZD, 5ZD		Zobnatica; 45° 50' 2" N, 19° 37' 5" E	PDA
1PAD		Palić; 46° 05' 1" N, 19° 45' 3" E	PDA
2ORFD, 14ORFD		Orfúí; 46° 08' 4" N, 18° 09' 2" E	PDA
2JD, 5JD		Jarkovci; 45° 02' 5" N, 20° 01' 3" E	PDA
4ČD		Čonoplja; 45° 51' 1" N, 19° 17' 5" E	PDA
DBPM1	Reke	Dunav; 45° 14' 2" N, 19° 26' 5" E	APW → PDA
D737A2		Sava; 44° 54' 4" N, 19° 45' 3" E	APW → PDA
DBPM2		Dunav; 45° 14' 2" N, 19° 24' 4" E	APW → PDA

APW → PDA: procedura obogaćenja i nakon obogaćenja uzorka inokulum zasejan na PDA podlogu

PDA: uzorak direktno zasejan na PDA podlogu

4.2 Identifikacija izolata *Plesiomonas shigelloides* primenom PCR (Polymerase chain reaction) tehnike

Trideset sedam sojeva (tabela 4.1) koji su preliminarnim testovima identifikovani kao *P. shigelloides* kao i referentni sojevi *Plesiomonas shigelloides* ATCC51903, *Plesiomonas shigelloides* ATCC14029, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966. Rezultati merenja koncentracije i čistoće genomske DNK dobijene nakon ekstrakcije prikazani su u tabeli 4.2. Poređenjem amplifikovanih fragmenata ispitivanih sojeva, prisustvo fragmenata očekivane veličine od oko 284 bp utvrđen je kod svih izolata (slika 4.2).

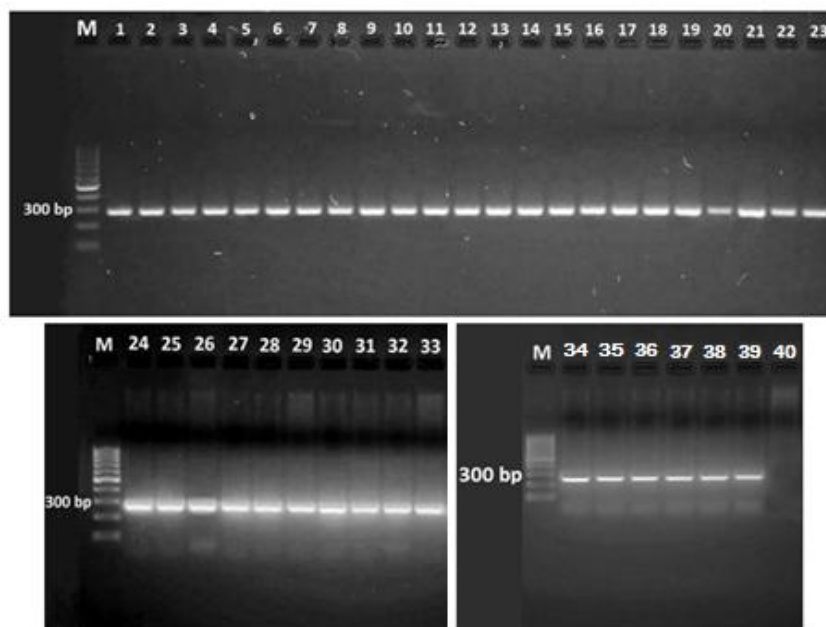
Tabela 4.2. Srednje vrednosti merenja koncentracije i čistoće genomske DNK kod izolovanih sojeva *P. shigelloides*, referentnih sojeva *P. shigelloides* ATCC51903, ATCC14029 i *Aeromonas hydrophila* ATCC7966.

Soj	konc. (ng/μL)	OD 260/280	OD 260/230	Soj	Konc. (ng/μL)	OD ¹ 260/280	OD ² 260/230
2ŠD	30,6	1,6	0,79	4BD	39,3	1,6	0,7
1LD	32,3	1,4	1,2	6HERD	71,1	1,5	0,9
2LD	50	1,8	2,2	9HERD	88,8	1,9	2,2
6PAND	28,5	1,2	0,5	7SD	43,1	1,7	1
4PAND	58	1,9	1,8	3ŠELD	43,4	1,8	1,3
1KD	75,7	1,9	1,9	1ZD	60,9	1,8	2
8KD	25,8	1,4	0,7	3ZD	47,5	1,6	0,9
1PECD	28,2	1,9	2,2	5ZD	50,5	1,8	2
4PECD	34,1	1,4	0,8	1PAD	40,7	1,9	1,1
2KRD	36,4	1,9	2	2ORFD	59,5	1,9	2,1
5KRD	43,5	1,8	1,3	14ORFD	48,6	1,7	1,1
6KRD	44,3	1,8	2,4	2JD	57,9	1,7	1,1
2PD	47,4	1,6	0,7	5JD	62,3	1,9	1,8
1KOVD	61,7	1,8	1,6	4ČD	56,8	1,5	0,6
4KOVD	46,1	1,6	1	DBPM1	43,6	1,6	0,9
2DD	52,3	1,8	2,1	D737A2	48,8	1,7	0,7
5DD	47,9	1,7	0,8	DBPM2	57,7	1,7	0,8
2VD	37,9	1,8	0,8	ATCC51903*	32,6	2,3	1,5
8VD	63,2	1,9	1,9	ATCC14029*	47	1,5	1,1
2BD	51	1,8	1,8	ATCC7966**	32,6	1,9	1,5

* Pozitivna kontrola *P. shigelloides* ATCC51903 i ATCC14029, ** Negativna kontrola *Aeromonas hydrophila* ATCC7966

¹ odnos 260/280 ~ 1,8 za čistu DNK

² odnos 260/230 ~2.0 – 2.2 za čistu DNK



Slika 4.2. Identifikacija bakterije *P. shigelloides* PCR tehnikom korišćenjem specifičnih prajmera za 23S rRNA (1-37), sa pozitivnim kontrolama *P. shigelloides* ATCC51903, *P. shigelloides* ATCC14029 (38,39) i negativnom kontrolom *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 (40)

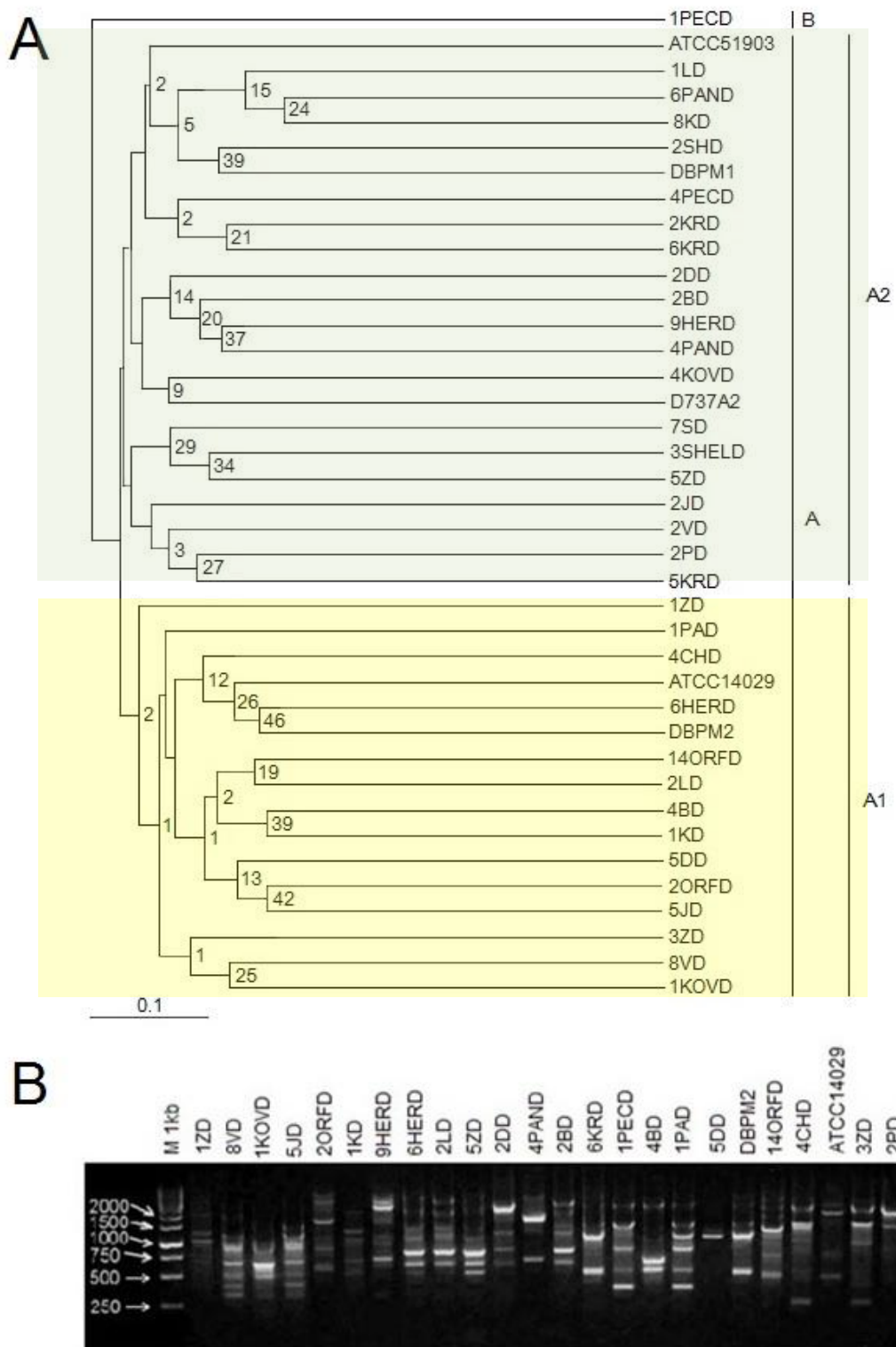
4.3 Određivanje genetičke bliskosti izolovanih sojeva metodom RAPD-PCR

Pet prajmera (OPA07, OPB11, OPM10, OPN02 i K01) od ukupno 16 dekamernih prajmera koliko je preliminarnom analizom testirano dalo je jasno vidljive trake kod većine testiranih sojeva (slika 4.3B). Broj traka po prajmeru za jedan ispitivani soj se kretao od 0 do 14 dok je ukupan broj amplifikovanih produkata iznosio 649. Pojedinačno posmatrano za sojeve *P. shigelloides*, najveći broj produkata registrovan je kod soja 2 BD (n=35) poreklom iz jezera Borkovac, dok je najmanji broj amplifikata zabeležen kod soja 2PD (n=8) poreklom iz jezera Pavlovci (prilog 3). Veličina amplifikovanih produkata je varirala od 150 bp za prajmer OPA07 do 3400 bp koliko je iznosila veličina produkta dobijenog korišćenjem prajmera K01.

Broj različitih RAPD profila posmatrano za pojedinačne prajmere iznosio je 35 (OPN02), 34 (OPB11), 33 (OPM10 i OPA07) i 31 (K01). Najveći broj jedinstvenih RAPD profila, odnosno profila koji su se javljali bez ponavljanja, zabeleženo je prilikom primene prajmera OPN02 (34 jedinstvena profila). Kada su korišćeni prajmeri OPM10 i OPB11 broj jedinstvenih RAPD profila je iznosio 31. Slede prajmeri OPA07 i K01, čijom primenom je uočeno 27 odnosno 25 jedinstvenih rasporeda amplifikata.

Dendrogram konstruisan na osnovu objedinjenih binarnih podataka i matrice genetičke sličnosti po Žakarovu (prilog 4) prikazan je na slici 4.3A. Žakarov koeficijent (J_{t_1,t_2}) iznosio je 0 za 12 parova sojeva pri čemu je dominantan soj u parovima bio poreklom iz jezera Pecs u Mađarskoj (1PECD). Apsolutno poklapanje traka ($J_{t_1,t_2}=1$) među sojevima nije registrovano, a najveća sličnost zabeležena je između sojeva 6PAND i 8KD ($J_{t_1,t_2}=0,357$) poreklom iz jezera Panonija i Krivaja. Vrednosti koje se koriste za procenu pouzdanosti dendrograma (tzv. bootstrap) kretale su se u rasponu od 0 do 46.

Većina izolovanih sojeva *P. shigelloides*, uključujući 2 referentna soja ATCC51903 i ATCC14029 su svrstani u grupu A, dok je soj 1PECD poreklom iz jezera Pecs u Mađarskoj izdvojen u poseban klaster B. Sojevi klastera A grupisani su u dve podgrupe označene kao A1 i A2 koje su dalje podeljene na nekoliko grupa sa niskim vrednostima pouzdanosti (eng. *bootstrap*) (slika 4.3A). U podgrupi A1 grupisani su referentni soj ATCC14029 zajedno sa 14 sojeva koji su većinom iz uzoraka poreklom iz različitih vodenih sredina odnosno lokaliteta. Izuzetak su sojevi 2ORFD i 14ORFD iz vode jezera Orfűi u Mađarskoj i sojevi 3ZD i 1ZD, oba iz uzorka vode jezera Zobnatica u Srbiji. Grupa A2 obuhvata 22 izolata i referentni soj ATCC51903. Sojevi sa oznakama 5KRD, 6KRD i 2KRD izolovani iz vode jezera Kapitanski rit u Srbiji bili su predstavljeni različitim RAPD profilima kao i sojevi 4PAND i 6PAND poreklom iz vode jezera Panonija u Srbiji.

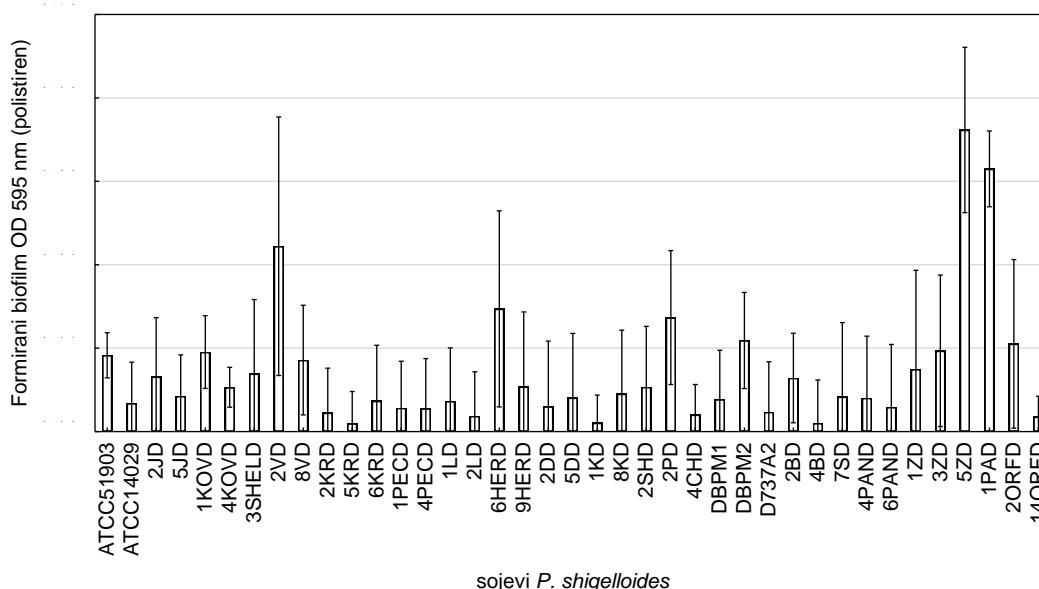


Slika 4.3 Dendrogram konstruisan na osnovu rezultata RAPD-PCR analize. Pouzdanost dendograma na osnovu 100 ponavljanja (eng. *bootstrap*) prikazana je u bazi račvanja (A). RAPD profil sojeva *P. shigelloides* (B)

4.4 Testiranje sposobnosti formiranja biofilma sojeva *Plesiomonas shigelloides*

Na osnovu OD_{ng} (0,1015), SD (0,0058), OD_c (0,1191), $2OD_c$ (0,2382) i $4OD_c$ (0,4764) vrednosti dobijenih prilikom testiranja sposobnosti formiranja biofilma na površine od polistirena, svi izolati *P. shigelloides* su klasifikovani kao neadherentni. Vrednosti optičkih gustina (OD 595 nm) su se kretale u opsegu od 0,002 za soj 5KRD do 0,07 za soj 5ZD (grafik 4.4).

Kvalitativna procena sposobnosti produkcije biofilma sojeva *P. shigelloides* na staklenim borosilikatnim površinama je pokazala odsustvo adhezije kod svih ispitivanih izolata (slika 4.4), a pojava prstena na granici tečne faze i vazduha koju Christensen i sar. (1982) prilikom procene ne uzimaju u obzir registrovana je kod 20 sojeva *P. shigelloides* izolovanih iz površinskih voda kao i referentnog soja ATCC51903 (tabela 4.4).



Grafik 4.4 Vrednosti optičkih gustina (OD 595 nm) dobijene nakon testiranja sposobnosti formiranja biofilma sojeva *P. shigelloides* na površini od polistirena



Slika 4.4 Kvalitativna procena sposobnosti produkcije biofilma sojeva *P. shigelloides* na površini od borosilikata

Tabela 4.4 Kvalitativna procena sposobnosti produkcije biofilma sojeva *P. shigelloides* na površini od borosilikata.

Naziv soja	Pojava/Ocena adhezivnosti ćelija*	Naziv soja	Pojava/Ocena adhezivnosti ćelija*	Naziv soja	Pojava/Ocena adhezivnosti ćelija*
2ŠD	prsten	1KOVD	prsten	3ZD	0
1LD	0	4KOVD	prsten	5ZD	prsten
2LD	0	2DD	0	1PAD	prsten
6PAND	0	5DD	prsten	2ORFD	prsten
4PAND	0	2VD	prsten	14ORFD	0
1KD	0	8VD	prsten	2JD	prsten
8KD	0	2BD	0	5JD	0
1PECD	0	4BD	prsten	4ČD	prsten
4PECD	prsten	6HERD	prsten	DBPM1	prsten
2KRD	0	9HERD	0	D737A2	0
5KRD	prsten	7SD	prsten	DBPM2	prsten
6KRD	0	3ŠELD	prsten	ATCC51903	prsten
2PD	0	1ZD	prsten		

* - odsutna (0), slaba (1), umerena (2) i jaka adhezivnost (3), prsten (adhezivnost ćelija na granici tečne i gasovite faze)

4.5 Određivanje hemolitičke aktivnosti sojeva *Plesiomonas shigelloides* na krvnom agaru, enzimске aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNase agaru

Rezultati ispitivanja hemolitičke aktivnosti, enzimске aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNase agaru sojeva *P. shigelloides* prikazani su u tabeli 4.5 i na grafiku 4.5. Kod svih sojeva registrovana je β hemolitička aktivnost, koja je kod sojeva 5ZD, 2PD i D737A2 bila izrazito slaba.

Prilikom ispitivanja kinetike hemolize uočeno je da je procenat hemolize kod tretmana u kojem su korišćene bakterijske suspenzije bio nizak i za sve ispitivane sojeve nakon 24 časa nije prelazio 10 % (prilog 5), pri čemu je registrovana statistički značajna razlika u procentu hemolize u toku pomenutog vremena između sojeva 2KRD i ATCC51903, 4KOVD i ATCC51903, 1KD i ATCC51903 ($p < 0,05$, One-way ANOVA, Tukey post hoc test). Nakon 24 časa vrednost procenta hemolize bila je najveća za ćelijsku suspenziju referentnog soja ATCC51903 (8,29), dok je prilikom primene ćelijske suspenzije soja 1KD u istom vremenskom periodu zabeležen najmanji procenat hemolize (4,18). Supernatanti ispitivanih sojeva hemolizirali su u većoj meri 1% rastvor eritrocita. Tako je procenat hemolize nakon 24 sata za većinu ispitivanih sojeva iznosio preko 90% (prilog 5). Izuzetak je supernatant soja 4KOVD kod koga je nakon 24 časa procenat hemolize iznosio 67%. Ipak, statistički značajna razlika između sojeva u ovom slučaju nije zabeležena ($p > 0,05$, One-way ANOVA).

Većina ispitivanih sojeva *P. shigelloides* (86,5%) ne poseduje lipaze. Izuzetak su sojevi 1KD, 2DD, 7SD, 14ORFD i DBPM1 kod kojih je registrovano zamućenje usled nastanka kristala kalcijumovog sapuna.

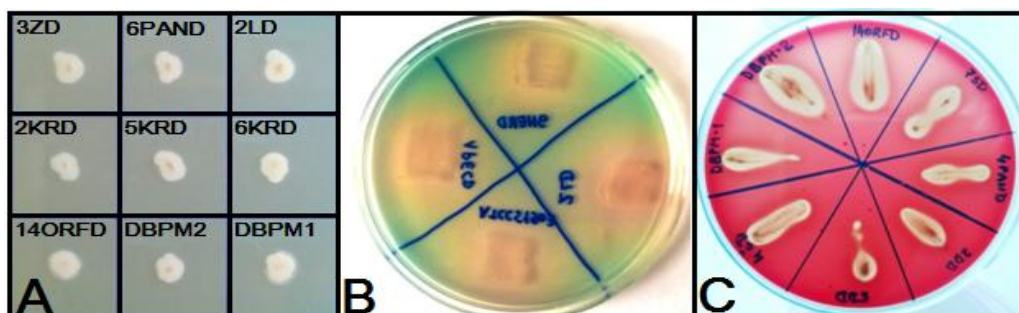
Svi ispitivani sojevi vršili su hidrolizu DNK na podlozi za detekciju DNA-zne aktivnosti sa metil zelenim.

Određivanje hemolitičke aktivnosti sojeva *P. shigelloides* na krvnom agaru, enzimске aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNase agaru prikazani su na slici 4.5.

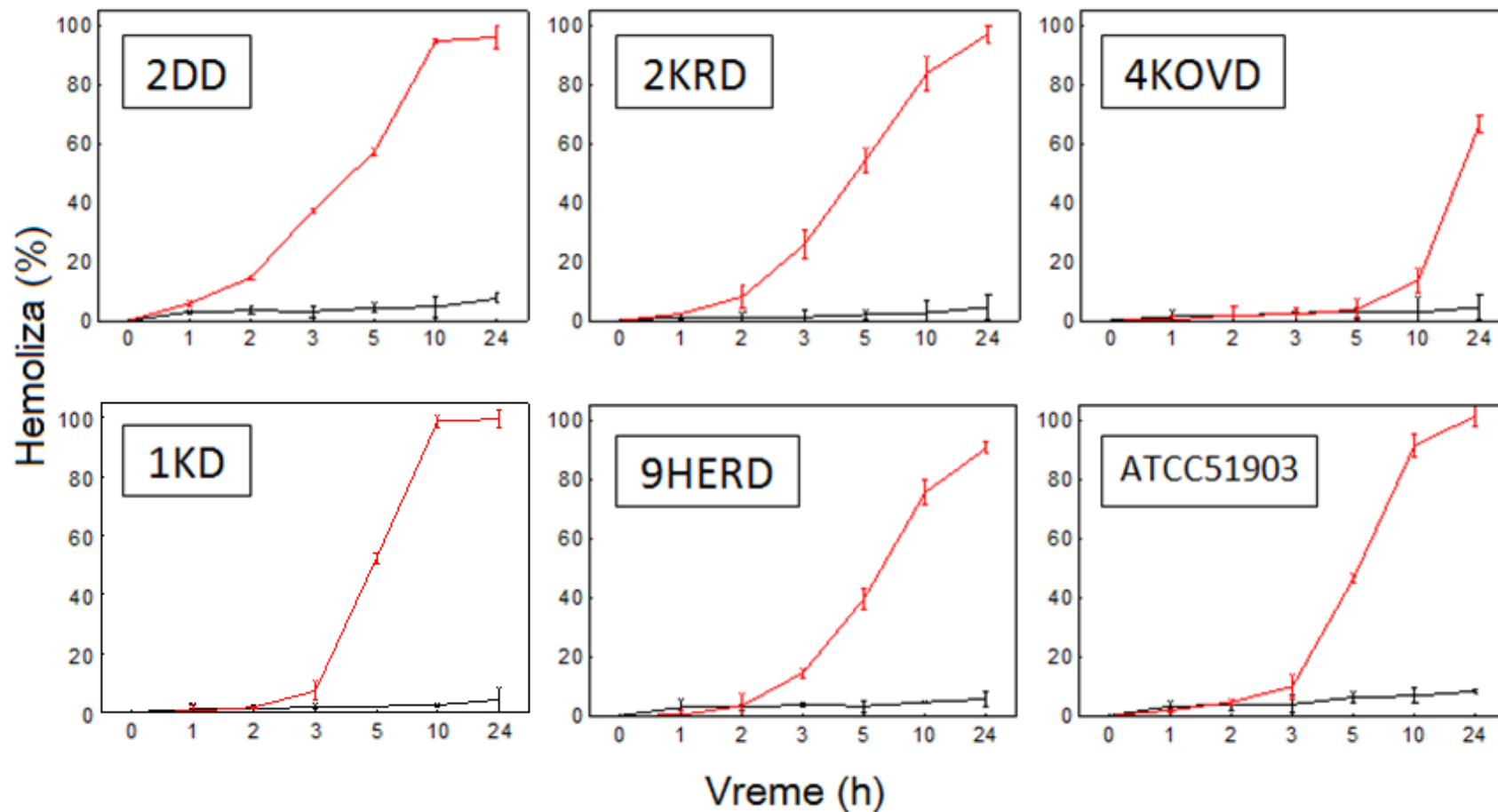
Tabela 4.5. Rezultati ispitivanja hemolitičke aktivnosti, enzimске aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNase agaru sojeva *P. shigelloides*

Oznaka soja	Hemoliza (krvni agar sa 7% ovčije defibrinisane krvi)	Lipaza (Tween 80)	DNAza (podloga se metil zelenim)	Oznaka soja	Hemoliza (krvni agar sa 5% ovčije defibrinisane krvi)	Lipaza (Tween 80)	DNAza (podloga se metil zelenim)
2ŠD	β	-	+	2BD	β	-	+
1LD	β	-	+	4BD	β	-	+
2LD	β	-	+	6HERD	β	-	+
6PAND	β	-	+	9HERD	β	-	+
4PAND	β	-	+	7SD	β	+	+
1KD	β	+	+	3ŠELD	β	-	+
8KD	β	-	+	1ZD	β	-	+
1PECD	β	-	+	3ZD	β	-	+
4PECD	β	-	+	5ZD	β ⁻	-	+
2KRD	β	-	+	1PAD	β	-	+
5KRD	β	-	+	2ORFD	β	-	+
6KRD	β	-	+	14ORFD	β	+	+
2PD	β ⁻	-	+	2JD	β	-	+
1KOVD	β	-	+	5JD	β	-	+
4KOVD	β	-	+	4ČD	β	-	+
2DD	β	+	+	DBPM1	β	+	+
5DD	β	-	+	D737A2	β ⁻	-	+
2VD	β	-	+	DBPM2	β	-	+
8VD	β	-	+	ATCC51903	β	-	+

β⁻ izrazito slaba β hemoliza



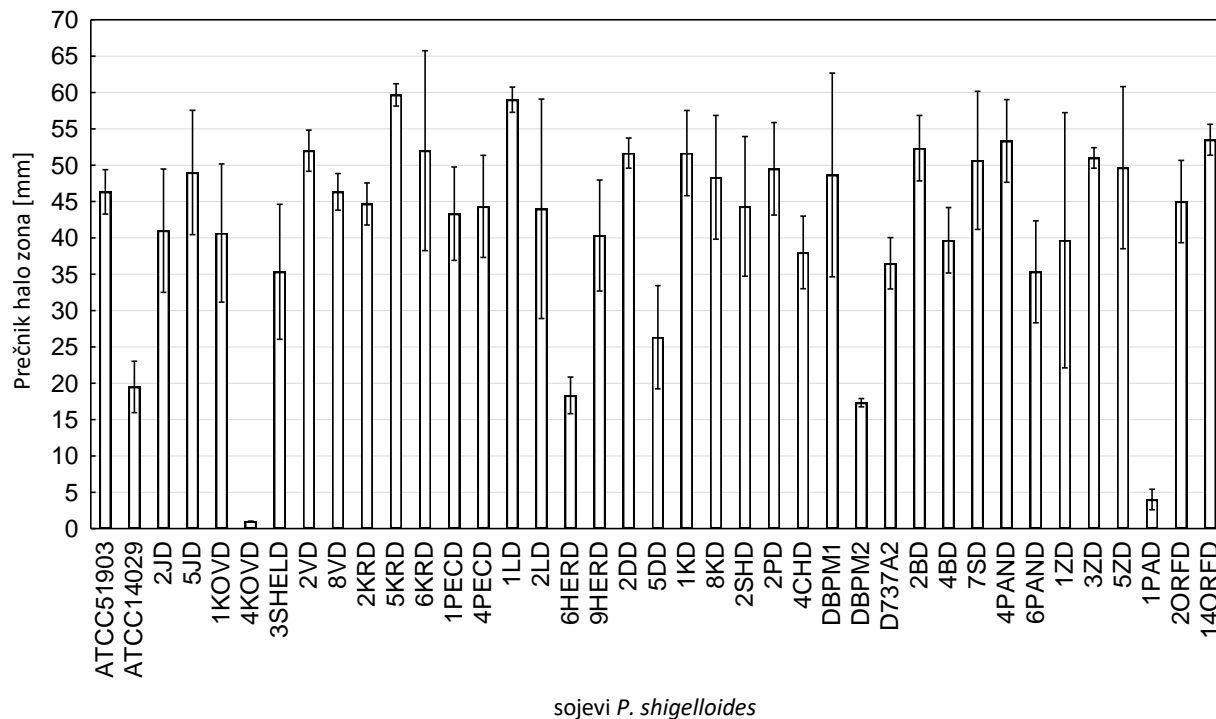
Slika 4.5. Određivanje enzimске aktivnosti na podlozi sa Tween 80 (A) i DNase agaru (B) i hemolitičke aktivnosti sojeva *P. shigelloides* na krvnom agaru (C)



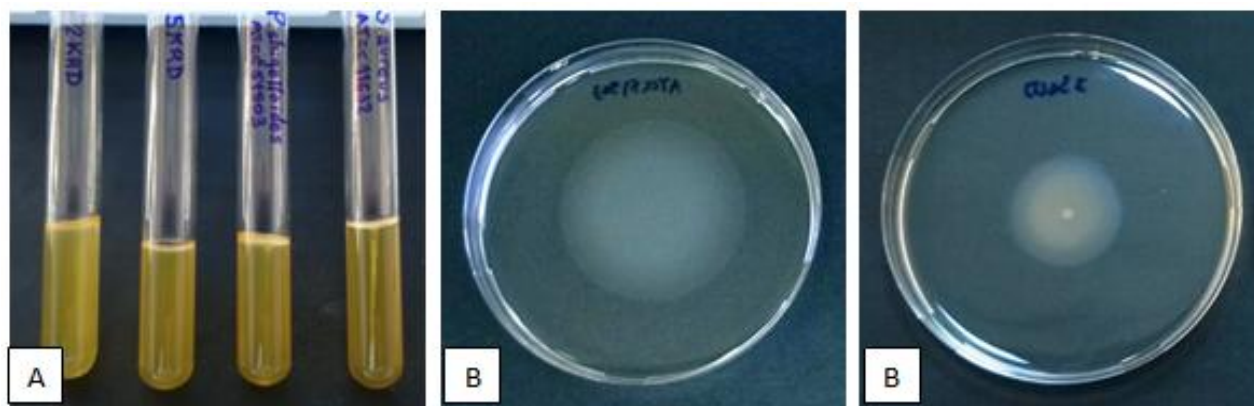
Grafik 4.5 Kinetika hemolize ovčijih eritrocita za odabrane sojeve *P. shigelloides*. — Bakterijska suspenzija — Supernatant.

4.6 Pokretljivost sojeva *Plesiomonas shigelloides*

Analiza pokretljivosti sojeva *P. shigelloides* u dubokom agaru (slika 3.7) pokazala je pozitivne rezultate za sve ispitivane sojeve. Rezultati ispitivanja stepena pokretljivosti prikazani su na grafiku 4.6. Izmerene vrednosti su se kretale od 1 mm za soj 4KOVD do 60 mm koliko je iznosila srednja vrednost za soj 5KRD.



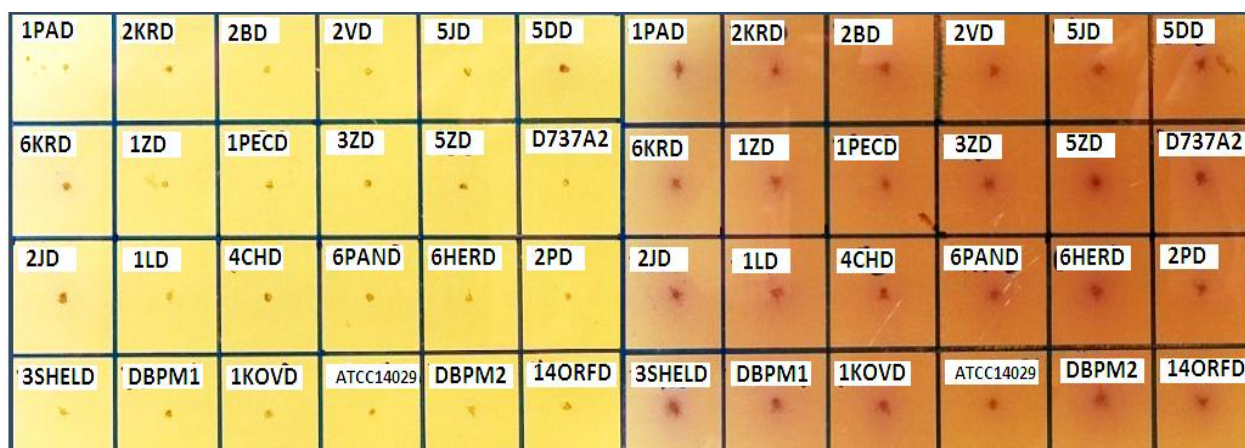
Grafik 4.6 Vrednosti za pokretljivost izražene u mm prečnika zamućene zone nastalih rastom odnosno pokretljivošću bakterijskih sojeva *P. shigelloides*



Slika 4.6 Određivanje pokretljivosti sojeva *P. shigelloides* u dubokom agaru (A) i stepena pokretljivosti na swim agaru (B)

4.7 Detekcija histidin dekarboksilazne aktivnosti sojeva *Plesiomonas shigelloides*

Ispitivanje dekarboksilazne aktivnosti (slika 4.7) pokazalo je pozitivne rezultate za 34 ispitivana soja poreklom iz površinskih voda Panonske nizije. Sojevi 2ŠD, 5KRD i 9HERD su pokazivali pozitivnu reakciju i na podlozi bez histidina u sva tri ponavljanja tako da nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi prisustvo enzima histidin dekarboksilaze.



Slika 4.7 Detekcija histidin dekarboksilazne aktivnosti sojeva *P. shigelloides* na podlozi za utvrđivanje dekarboksilazne aktivnosti bakterija (desno). U cilju kontrole sojevi su zasejavani na podlogu identičnog sastava u koju nije dodat histidin (levo).

4.8 Praćenje rasta sojeva *Plesiomonas shigelloides* u podlozi sa različitim koncentracijama NaCl

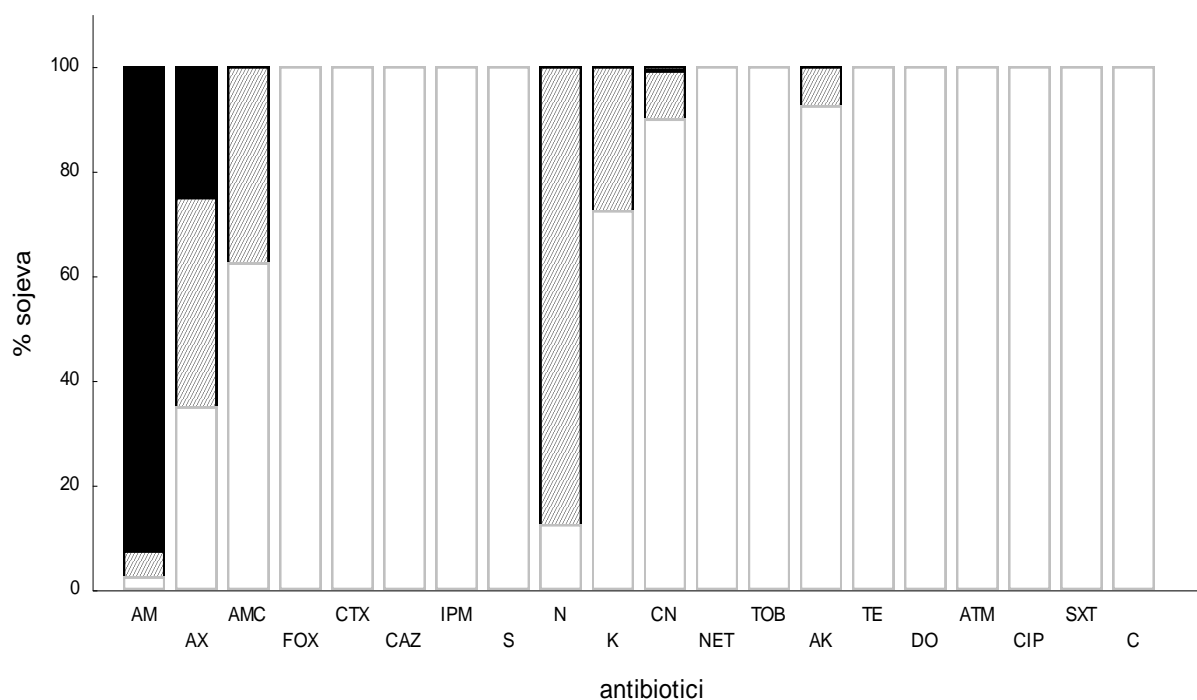
Rezultati ispitivanja tolerancije sojeva *P. shigelloides* na povišene koncentracije NaCl (3%, 4% i 5%) prikazani su u tabeli 4.8. Svi ispitivani sojevi formirali su zamućenje LB podloge koja je sadržala 3% NaCl. Kada je korišćena LB podloga sa 4% NaCl 19 od ukupno 37 ispitivanih sojeva (51%) formiralo je zamućenje LB podloge. Koncentracija NaCl od 5% delovala je inhibitorno na sve ispitivane sojeve.

4.9 Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva *Plesiomonas shigelloides* na antibiotike

Rezultati ispitivanja antibiotske osetljivosti sojeva *P. shigelloides* sa zonama inhibicije rasta izraženim u milimetrima prikazani su u prilogu 6. Zbirni rezultati vezani za ukupan broj rezistentnih, umereno osetljivih i osetljivih sojeva *P. shigelloides* na korišćene antibiotike prikazani su na grafiku 4.9.

Tabela 4.8. Praćenje rasta sojeva *P. shigelloides* na podlozi sa različitim koncentracijama NaCl

Oznaka soja	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl	Oznaka soja	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl
2ŠD	+	+	-	2BD	+	-	-
1LD	+	+	-	4BD	+	-	-
2LD	+	+	-	6HERD	+	+	-
6PAND	+	-	-	9HERD	+	-	-
4PAND	+	+	-	7SD	+	+	-
1KD	+	+	-	3ŠELD	+	-	-
8KD	+	+	-	1ZD	+	-	-
1PECD	+	-	-	3ZD	+	-	-
4PECD	+	+	-	5ZD	+	-	-
2KRD	+	+	-	1PAD	+	-	-
5KRD	+	-	-	2ORFD	+	-	-
6KRD	+	+	-	14ORFD	+	+	-
2PD	+	+	-	2JD	+	-	-
1KOVD	+	-	-	5JD	+	-	-
4KOVD	+	-	-	4ČD	+	+	-
2DD	+	+	-	DBPM1	+	+	-
5DD	+	-	-	D737A2	+	-	-
2VD	+	+	-	DBPM2	+	+	-
8VD	+	+	-	ATCC14029	+	-	-



Grafik 4.9 Osetljivost sojeva *P. shigelloides* na ampicilin (AM), amoksisilin (AX), amoksisilin/klavulansku kiselinu (AMC), cefoksitin (FOX), cefotaksim (CTX), ceftazidim (CAZ), imipenem (IPM), streptomycin (S), neomicin (N), kanamicin (K), gentamicin (CN), netilmicin (NET), tobramicin (TOB), amikacin (AK), tetraciklin (TE), doksiciklin (DO), aztreonam (ATM), ciprofloksacin (CIP), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), hloramfenikol (C)

□ - osetljiv ▨ - umereno osetljiv ■ - rezistentan

Određeni broj *P. shigelloides* sojeva ispoljio je rezistenciju i umerenu osetljivost na antibiotike iz grupe penicilina i aminoglikozida. Kada je reč o antibioticima iz grupe penicilina, od 37 ispitivanih sojeva, 34 soja (92%) je bilo otporno na ampicilin, dok je umerena osetljivost na pomenuti antibiotik registrovana kod 2 soja (5%). Rezistenciju na amoksicilin ispoljilo je 10 od 37 (27%) ispitivanih sojeva, dok se umerena osetljivost ispoljila kod 15 sojeva (41%). Kod testiranja osetljivosti sojeva na amoksicilin/klavulansku kiselinu registrovano je 14 sojeva (38%) koji su umereno osetljivi na pomenuti antibiotik.

Otpornost na antibiotike iz grupe aminoglikozida utvrđena je jedino kod soja sa oznakom 2VD koji je pokazao rezistenciju na gentamicin. Određeni broj sojeva *P. shigelloides* pokazao je umerenu osetljivost na antibiotike iz pomenute grupe. Tako je 31 soj (84%) ispoljio umerenu osetljivost na neomicin, 10 sojeva (27%) na kanamicin, 4 soja (11%) na gentamicin i 2 soja (5%) na amikacin.

Svi ispitivani sojevi bili su osetljivi na antibiotike: cefoksitin, cefotaksim, ceftazidim, imipenem, streptomycin, netilmicin, tobramicin, tetraciklin, doksiciklin, aztreonam, ciprofloksacin, trimetoprim/sulfametoksazol i hloramfenikol.

4.10 Izolacija bakteriofaga

Iz vodenih uzoraka izolovano je 25 bakteriofaga (tabela 4.10) pri čemu je 23 faga (92%) bilo poreklom iz uzoraka koji su uzeti na mestu izlivanja otpadnih voda u reku Dunav kod Novog Sada, dok su dva virusa (8%) izolovana iz uzoraka uzetih iz Dunava kod Smedereva. U uzorcima vode reka Tise i Save, kanala Dunav-Tisa-Dunav i jezera Palić, Borkovac, Hermann Ottó, Kovácsszénája i Pecs nije detektovano prisustvo virusa specifičnih za sojeve *P. shigelloides* koji su korišćeni prilikom izolacije.

Indukcija UV zračenjem nije pokazala prisustvo profaga u genomu ispitivanih sojeva *P. shigelloides*.

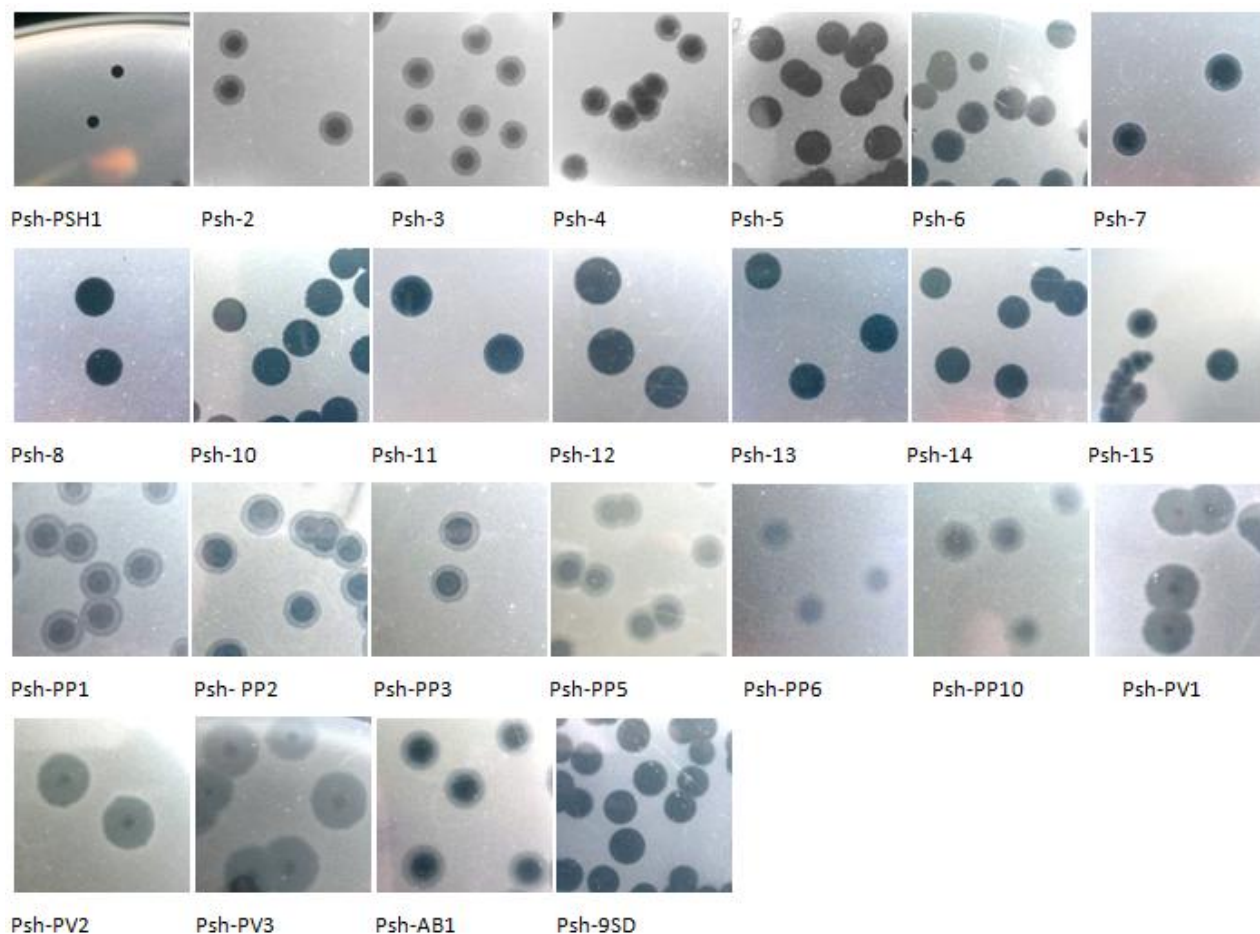
Korišćenjem soja DBPM2 kao domaćina izolovano je 15 virusa primenom obe metode (*Single layer* i *agar overlay*), uključujući i obogaćenje pre zasejavanja tzv. *agar overlay* metodom. Šest virusa je izolovano upotrebom soja 1PAD primenom *Single layer* metode. Soj 2VD kao domaćin je poslužio za izolaciju 3 virusa, dok je upotrebom soja 3ŠELD izolovan jedan virus pri čemu je izolacija kod oba domaćina obavljena primenom *Single layer* metode. Upotreba referentnih sojeva *P. shigelloides* ATCC14029 i ATCC51903 kao i soja DBPM1 poreklom iz Dunava nije dala rezultate u izolaciji bakteriofaga.

Veličina plaka izolovanih virusa kretala se od 1 mm za fag Psh-PSH1 do 9 mm koliko je iznosio prečnik plaka kod virusa PV3. Većina virusa (64%) formirala je na LBA podlozi prozirne plake sa i bez halo zone (tabela 4.10, slika 4.10).

Tabela 4.10 Bakteriofagi vrste *P. shigelloides* izolovani iz površinskih voda

Oznaka izolovanog bakteriofaga	Uzorak/Metoda	Domaćin	Opis plake	
			φ[mm]	Napomena
Psh-PSH1	Dunav, Novi Sad, GC-1/SL	<i>P. shigelloides</i> 3ŠELD	1-2	Prozirne
Psh-2	Dunav, Novi Sad, GC-1/O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	4-5	Prozirne sa haloom
Psh-3	Dunav, Novi Sad, GC-1/O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	4-5	Prozirne sa haloom
Psh-4	Dunav, Novi Sad, GC-1/O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	4-5	Prozirne sa haloom
Psh-5	Dunav, Novi Sad, GC-2/O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	5-6	Prozirne
Psh-6	Dunav, Novi Sad, GC-2/O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	2-5	Prozirne
Psh-7	Dunav, Novi Sad, GC-2/O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	5-6	Prozirne sa haloom
Psh-8	Dunav, Novi Sad, GC-1/O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	5-6	Prozirne
Psh-10	Dunav, Novi Sad, GC-1/O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	5-6	Prozirne
Psh-11	Dunav, Novi Sad, GC-1/O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	5-6	Prozirne
Psh-12	Dunav, Novi Sad, GC-1/ O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	6-7	Prozirne
Psh-13	Dunav, Novi Sad, GC-1/ O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	5-6	Prozirne
Psh-14	Dunav, Novi Sad, GC-1/ O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	5-6	Prozirne
Psh-15	Dunav, Novi Sad, GC-1/ O+DL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	5-6	Prozirne sa haloom
Psh-PP1	Dunav, Novi Sad, GC-2/SL	<i>P. shigelloides</i> 1PAD	5-7	mutne sa haloom
Psh-PP2	Dunav, Novi Sad, GC-2/SL	<i>P. shigelloides</i> 1PAD	5-6	mutne sa haloom
Psh-PP3	Dunav, Novi Sad, GC-2/SL	<i>P. shigelloides</i> 1PAD	5-6	mutne sa haloom
Psh-PP5	Dunav, Novi Sad, GC-1/SL	<i>P. shigelloides</i> 1PAD	5-6	mutne sa haloom
Psh-PP6	Dunav, Novi Sad, GC-1/SL	<i>P. shigelloides</i> 1PAD	4-5	Izrazito mutne sa haloom
Psh-PP10	Dunav, Novi Sad, GC-1/SL	<i>P. shigelloides</i> 1PAD	4-6	Izrazito mutne sa haloom
Psh-PV1	Dunav, Novi Sad, GC-2/SL	<i>P. shigelloides</i> 2VD	6-8	Izrazito mutne sa haloom
Psh-PV2	Dunav, Novi Sad, GC-2/SL	<i>P. shigelloides</i> 2VD	7-8	Izrazito mutne sa haloom
Psh-PV3	Dunav, Novi Sad, GC-2/SL	<i>P. shigelloides</i> 2VD	7-9	Izrazito mutne sa haloom
Psh-AB1	Dunav, Smederevo/SL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	4-6	Prozirne sa haloom
Psh-9SD	Dunav, Smederevo/SL	<i>P. shigelloides</i> DBPM2	5-6	Prozirne

Legenda: DL – agar overlay; SL – Single layer; O – obogaćenje; φ [mm] – opseg prečnika plaka; GC-1 i GC2 – reka Dunav kod mesta izliva otpadnih voda crpnih stanica GC-1 i GC-2



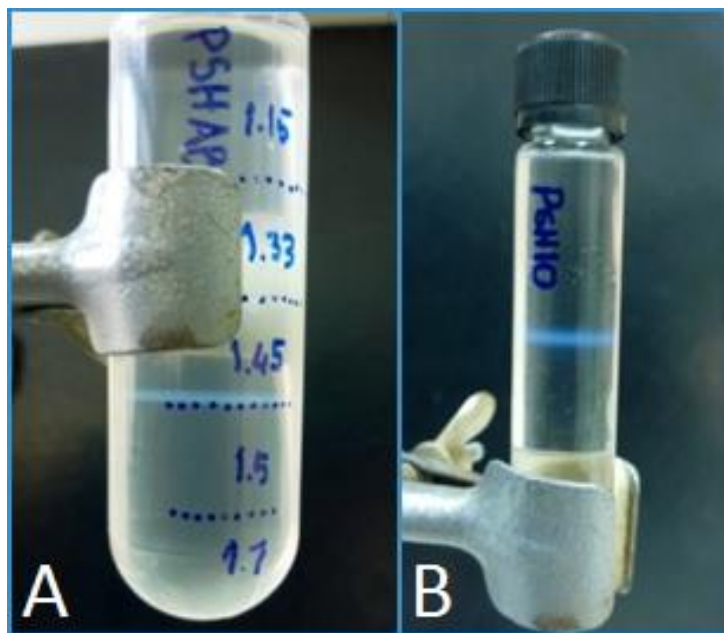
Slika 4.10 Izgled plaka 25 virusa izolovanih iz uzoraka otpadnih i površinskih voda na domaćinu *P. shigelloides* (Veličina plaka izolovanih virusa kretala se od 1 mm za fag Psh-PSH1 do 9 mm koliko je iznosio prečnik plaka kod virusa PV3)

4.11 Umnožavanje, prečišćavanje i koncentrovanje izolovanih bakteriofaga

Bakteriofagi označeni kao Psh-4, Psh-5, Psh-6, Psh-8, Psh-10, Psh-11, Psh-PP1, Psh-PP6 i Psh-AB1 određeni su za dalje analize i u tu svrhu je vršeno njihovo umnožavanje, prečišćavanje i koncentrovanje. Metode koje su korišćene prilikom prečišćavanja i koncentrovanja kao i brojnost faga u suspenziji na kraju primenjenih postupaka prikazani su u tabeli 4.11. Na slici 4.11 prikazane su kivete sa koncentrovanim i prečišćenim fagima nakon centrifugiranja u gradijentu i ekvilibrijumu CsCl.

Tabela 4.11 Prečišćeni i koncentrovani bakteriofagi i njihova brojnost na kraju postupka

Oznaka virusa	Metoda prečišćavanja/koncentrovanja	Brojnost faga/mL suspenzije ± SD
Psh-4	Centrifugiranje u ekvilibrijumu CsCl	$1,17 \times 10^{10} \pm 2,12 \times 10^8$
Psh-5	Centrifugiranje u ekvilibrijumu CsCl	$4,65 \times 10^8 \pm 2,47 \times 10^7$
Psh-6	Centrifugiranje u ekvilibrijumu CsCl	$1,80 \times 10^8 \pm 8,49 \times 10^7$
Psh-8	Centrifugiranje u ekvilibrijumu CsCl	$4,75 \times 10^8 \pm 1,94 \times 10^8$
Psh-10	Centrifugiranje u gradijentu i ekvilibrijumu CsCl	$6,40 \times 10^{10} \pm 1,15 \times 10^{10}$
Psh-11	Centrifugiranje u ekvilibrijumu CsCl	$4,40 \times 10^8 \pm 2,83 \times 10^7$
Psh-PP1	Centrifugiranje u gradijentu i ekvilibrijumu CsCl	$1,72 \times 10^{11} \pm 3,20 \times 10^{10}$
Psh-PP6	Centrifugiranje u gradijentu i ekvilibrijumu CsCl	$1,03 \times 10^8 \pm 1,84 \times 10^7$
Psh-AB1	Centrifugiranje u gradijentu i ekvilibrijumu CsCl	$1,9 \times 10^{10}$










Slika 4.11 Kivete sa virusima Psh-AB1 i Psh-10 nakon završenog postupka koncentrovanja i prečišćavanja u gradijentu (A) i ekvilibrijumu (B) CsCl

4.12 Utvrđivanje litičkog spektra bakteriofaga

Rezultati utvrđivanja litičkog spektra bakteriofaga na homologom domaćinu (*P. shigelloides*) prikazani su u tabeli 4.12. Na slici 4.12 prikazane su podloge inokulisane sojevima *P. shigelloides* na kojima je ispitivan litički spektar bakteriofaga.

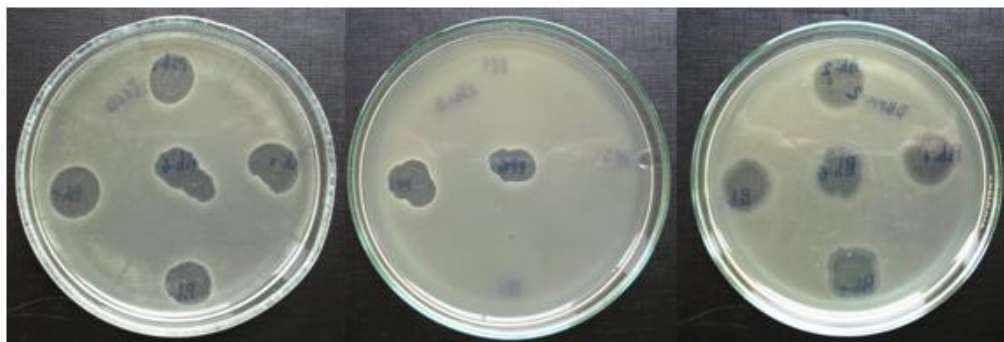
Tabela 4.12 Litički spektar prečišćenih i koncentrovanih bakteriofaga na homologom domaćinu *P. shigelloides*

fagi bakter. sojevi	fagi									fagi bakter. sojevi	fagi								
	Psh-4	Psh-5	Psh-6	Psh-8	Psh-10	Psh-11	Psh-PP1	Psh-PP6	Psh-AB1		Psh-4	Psh-5	Psh-6	Psh-8	Psh-10	Psh-11	Psh-PP1	Psh-PP6	Psh-AB1
2ŠD										4BD									
1LD										6HERD									
2LD										9HERD									
6PAND										7SD									
4PAND										3ŠELD									
1KD										12D									
8KD										3ZD									
1PECD										5ZD									
4PECD										1PAD									
2KRD										2ORFD									
5KRD										14ORFD									
6KRD										2JD									
2PD										5JD									
1KOVĐ	np	np	np	np		np				4ČĐ									
4KOVĐ										DBPM1									
2DD										D737A2									
5DD										DBPM2									
2VD										ATCC14029									
8VD										ATCC51903									
2BD																			

	prozirna zona		mutna zona
	prozirna zona sa halo regijom		mutna zona sa halo regijom
	izrazito mutna zona		odsustvo lizirane zone
	izrazito mutna zona sa halo regijom	np	nema podatka

Litički spektar 9 prečišćenih i koncentrovanih bakteriofaga testiran je na 39 sojeva *P. shigelloides* sa izuzetkom virusa Psh-4, Psh-5, Psh-6, Psh-8 i Psh-11 za koje nedostaju podaci vezani za mogućnost lize soja *P. shigelloides* 1KOVD. Rezultati su pokazali da ispitivani fagi liziraju 29 od 39 (74,4%) ispitivanih sojeva. Pojedinačno gledano, bakteriofag sa oznakom Psh-10 lizirao je najveći broj sojeva, njih 28 (71,8%), dok je najmanji broj sojeva, njih 8 (20,5%), lizirano od strane bakteriofaga Psh-PP1. Testirani virusi su kod najvećeg broja sojeva davali izrazito mutne zone lize. Tako je 6 od 9 ispitivanih virusa formiralo izrazito mutne zone kod 16 sojeva *P. shigelloides*. Mutne zone na mestima nanošenja virusne suspenzije su se javljale kod manjeg broja sojeva, a taj broj je varirao od jednog soja kada je korišćen virus Psh-PP1 do 9 sojeva koliko je zabeleženo primenom virusa Psh-10. Većina ispitivanih virusa formirala je prozirne zone na 3 ispitivana soja domaćina. Izuzetak su virusi Psh-PP1 i Psh-PP6 koji su na mestima nanošenja formirali prozirne zone kod jednog odnosno četiri soja.

Ispitivanje litičkog spektra odabranih bakteriofaga na heterologim domaćinima (*Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella enteritidis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*) pokazalo je odsustvo lize kod svih ispitivanih sojeva.



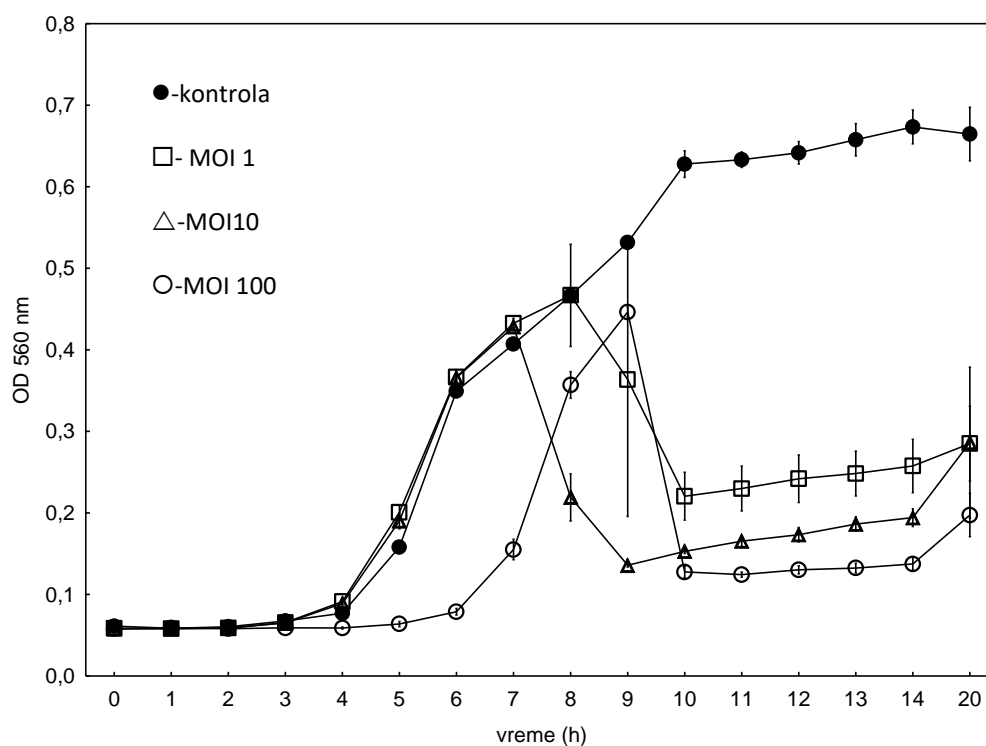
Slika 4.12 Utvrđivanje litičke efikasnosti SPOT metodom

4.13 Karakterizacija odabranih bakteriofaga

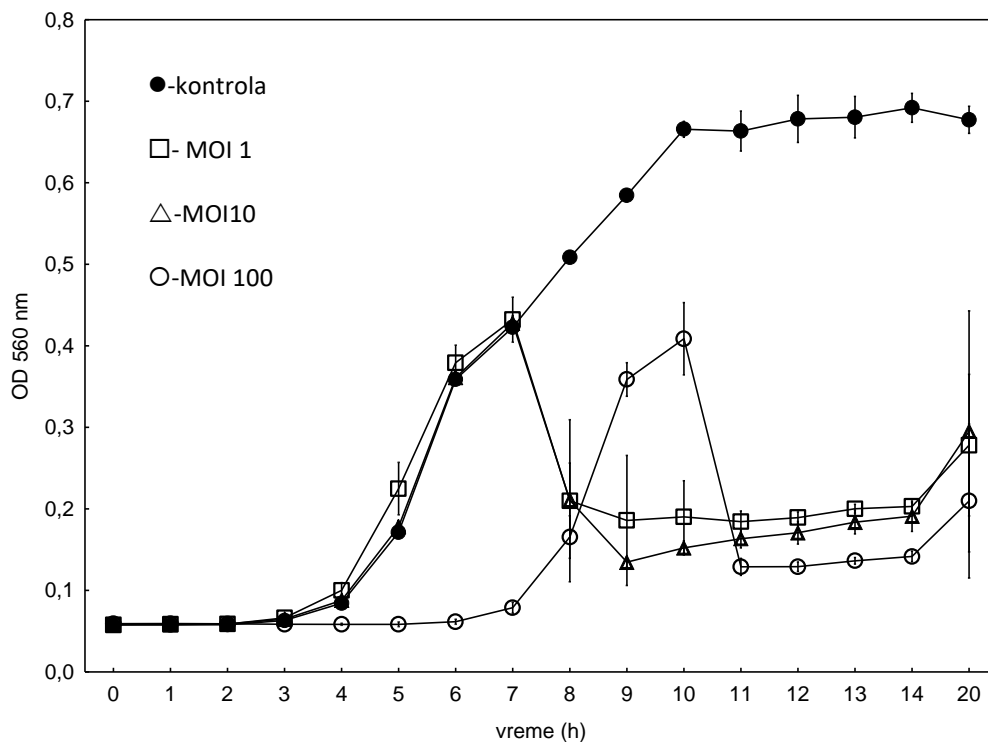
4.13.1 Ispitivanje *in vitro* efikasnosti faga

In vitro litički efekat bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 ispitivan je na bakterijskim sojevima *P. shigelloides* koji su korišćeni za izolaciju pomenutih faga (originalni domaćini) (tabela 3.10). Rezultati

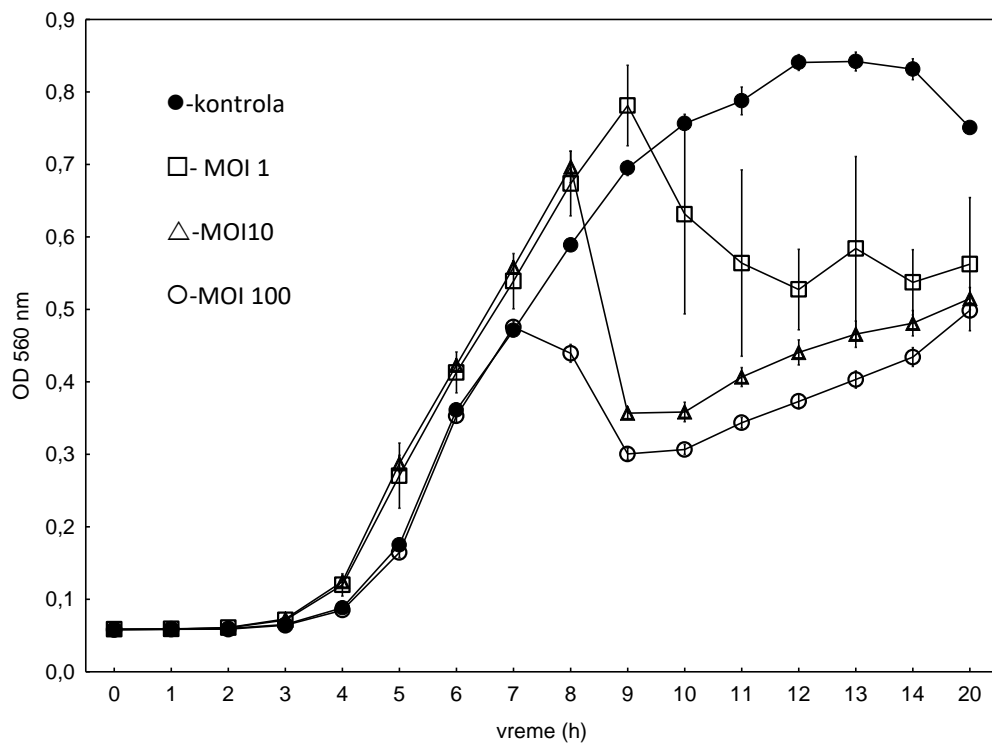
merenja optičke gustine u vremenskom periodu od 20 časova prikazani su na graficima 4.13.1.1, 4.13.1.2 i 4.13.1.3. Najniže vrednosti optičkih gustina registrovane su pri najvećem multiplicitetu infekcije (MOI 100) kod sva tri ispitivana virusa. Kod virusa Psh-10 i Psh-AB1 pri najvećem multiplicitetu infekcije vrednosti optičke gustine ostale su bliske početnim i nakon 5 odnosno 6 časova od momenta započinjanja eksperimenata (prilog 7). Nešto drugačiji rezultati uočavaju se kod virusa Psh-PP1 gde vrednosti optičke gustine u sva tri tretmana ostaju bliske vrednostima kontrole da bi se pad vrednosti uočio nakon 7 (MOI 100), 8 (MOI 10) i 9 časova (MOI 1). Nakon 20 sati kod virusa Psh-10 i Psh-AB1 posmatrano za sve tri vrednosti multipliciteta infekcije uočava se skok OD vrednosti. Skok OD vrednosti registruje se i u slučaju virusa Psh-PP1 i to nakon 10 časova pri multiplicitetima infekcije 10 i 100.



Grafik 4.13.1.1. *In vitro* efikasnost faga Psh-10 pri različitim multiplicitetima infekcije na soju *P. shigelloides* DBPM-2



Grafik 4.13.1.2 *In vitro* efikasnost faga Psh-AB1 pri različitim multiplicitetima infekcije na soju *P. shigelloides* DBPM-2



Grafik 4.13.1.3 *In vitro* efikasnost faga Psh-PP1 pri različitim multiplicitetima infekcije na soju *P. shigelloides* 1PAD

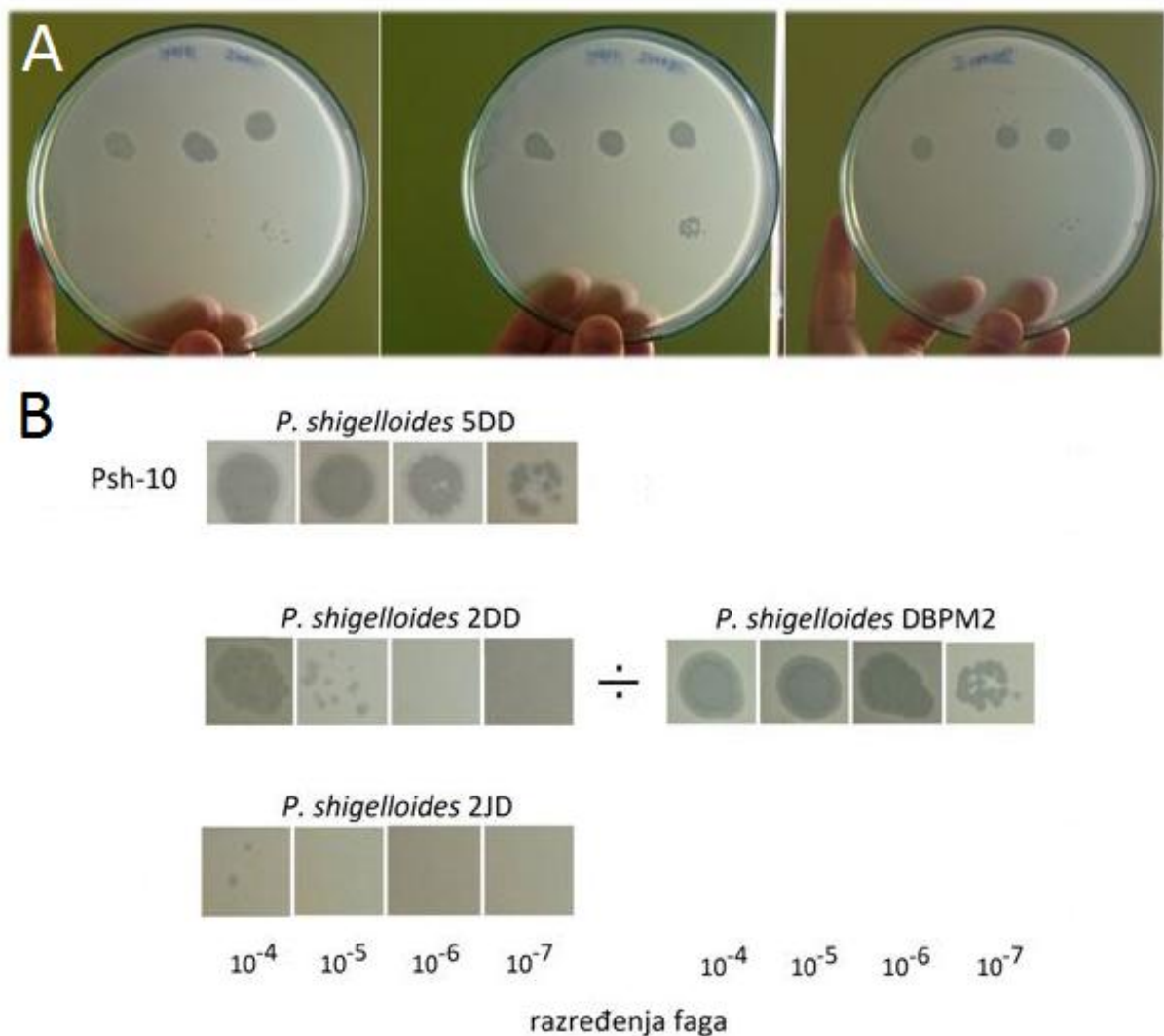
4.13.2 Određivanje efikasnosti stvaranja virusnih plaka

Rezultati određivanja relativne efikasnosti stvaranja plaka bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 na sojevima *P. shigelloides* za koje je prethodno potvrđena mogućnost lize od strane virusa SPOT metodom prikazani su u tabeli 4.13.2. Mesta nanošenja virusnih razređenja i dijagram metode prikazani su na slici 4.13.2.

Tabela 4.13.2 Relativna efikasnost stvaranja plaka (eng. relative Efficiency of Plating, rEOP) virusa Psh 10, Psh-AB1 i Psh-PP1 na test domaćinima, sojevima *P. shigelloides*

Test domaćin	Bakteriofag	EOP		
		<u>Psh-10</u>	<u>Psh-AB1</u>	<u>Psh-PP1</u>
<i>P. shigelloides</i> 2ŠD		8,18 x 10 ⁻⁵	2,2 x 10 ⁻⁵	1,39 x 10 ⁻⁴
<i>P. shigelloides</i> 1LD		5,45 x 10 ⁻⁵	2,44 x 10 ⁻⁵	-
<i>P. shigelloides</i> 1KD		1,36 x 10 ⁻⁴	2,68 x 10 ⁻⁵	-
<i>P. shigelloides</i> 1PECD		1,36 x 10 ⁻⁴	5,37 x 10 ⁻³	-
<i>P. shigelloides</i> 4PECD		1,18 x 10 ⁻⁴	2,68 x 10 ⁻⁵	-
<i>P. shigelloides</i> 6KRD		1,91 x 10 ⁻⁴	-	-
<i>P. shigelloides</i> 2PD		6,36 x 10 ⁻⁴	1,71 x 10 ⁻³	1,8 x 10 ⁻³
<i>P. shigelloides</i> 1KOVD		6,82 x 10 ⁻²	1,54 x 10 ⁻¹	-
<i>P. shigelloides</i> 4KOVD		1,36 x 10 ⁻³	2,68 x 10 ⁻³	-
<i>P. shigelloides</i> 2DD		5,45 x 10 ⁻³	3,9 x 10 ⁻³	-
<i>P. shigelloides</i> 5DD		6,36 x 10 ⁻¹	2,93	-
<i>P. shigelloides</i> 2VD		1,45 x 10 ⁻⁴	3,9 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻¹
<i>P. shigelloides</i> 6HERD		1,27 x 10 ⁻⁴	2,44 x 10 ⁻⁵	4,1 x 10 ⁻¹
<i>P. shigelloides</i> 9HERD		1,45 x 10 ⁻⁴	-	-
<i>P. shigelloides</i> 7SD		4,55 x 10 ⁻⁵	2,44 x 10 ⁻⁵	-
<i>P. shigelloides</i> 3ŠELD		4,55 x 10 ⁻²	4,15	-
<i>P. shigelloides</i> 1ZD		1,36 x 10 ⁻⁴	1,95 x 10 ⁻⁵	-
<i>P. shigelloides</i> 3ZD		5,45 x 10 ⁻⁵	1,22 x 10 ⁻⁵	-
<i>P. shigelloides</i> 1PAD		8,18 x 10 ⁻²	4,63 x 10 ⁻¹	ORIGD
<i>P. shigelloides</i> 2ORFD		4,55 x 10 ⁻⁵	3,9 x 10 ⁻⁵	1,6 x 10 ⁻²
<i>P. shigelloides</i> 14ORFD		2 x 10 ⁻⁴	2,44 x 10 ⁻⁵	-
<i>P. shigelloides</i> 2JD		1 x 10 ⁻³	2,44 x 10 ⁻⁵	-
<i>P. shigelloides</i> 4ČD		1,36 x 10 ⁻⁴	-	1,5 x 10 ⁻⁴
<i>P. shigelloides</i> DBPM1		1,73 x 10 ⁻¹	8,05 x 10 ⁻³	-
<i>P. shigelloides</i> D737A2		1,36 x 10 ⁻³	5,12 x 10 ⁻³	-
<i>P. shigelloides</i> DBPM2		ORIGD	ORIGD	3,6 x 10 ⁻¹
<i>P. shigelloides</i> ATCC14029		6,36 x 10 ⁻³	2,93 x 10 ⁻³	-
<i>P. shigelloides</i> ATCC51903		1,82 x 10 ⁻⁴	4,15 x 10 ⁻⁵	-

- Na osnovu rezultata spot metode ne inficira dati soj; ORIGD originalni domaćin

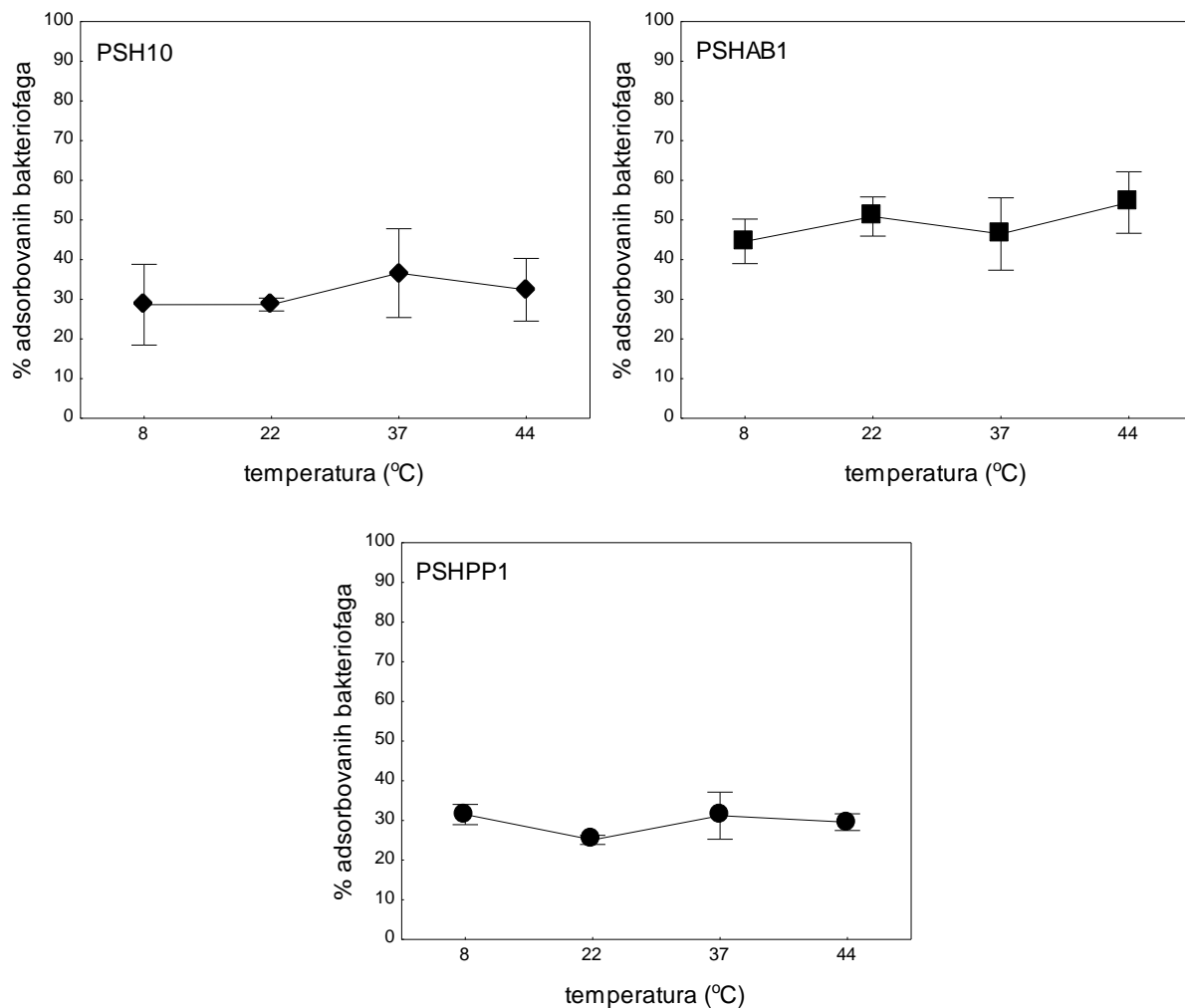


Slika 4.13.2 Relativna efikasnost stvaranja plaka. Očitavanje rezultata (A) i relativna efikasnost stvaranja plaka virusa Psh 10 na test domaćinima *P. shigelloides* 5DD, 2DD i 2JD (B)

Vrednosti relativne efikasnosti stvaranja plaka za virus Psh-10 kretale su se u opsegu od $8,18 \times 10^{-5}$ koliko je registrovano na domaćinu *P. shigelloides* 2ŠD do $6,36 \times 10^{-1}$ kada je kao test domaćin korišćen soj 5DD. Najveća efikasnost stvaranja plaka virusa Psh-AB1 zabeležena je na soju 3ŠELD (4,15), dok je najniža vrednost za isti virus registrovana kod referentnog soja *P. shigelloides* ATCC51903 ($4,15 \times 10^{-5}$). Virus Psh-PP1 najveću efikasnost stvaranja plaka ispoljio je na test domaćinu *P. shigelloides* 6HERD ($4,1 \times 10^{-1}$) dok je najniža vrednost zabeležena na soju *P. shigelloides* 2ŠD ($1,39 \times 10^{-4}$).

4.13.3 Efikasnost adsorpcije faga na različitim temperaturama

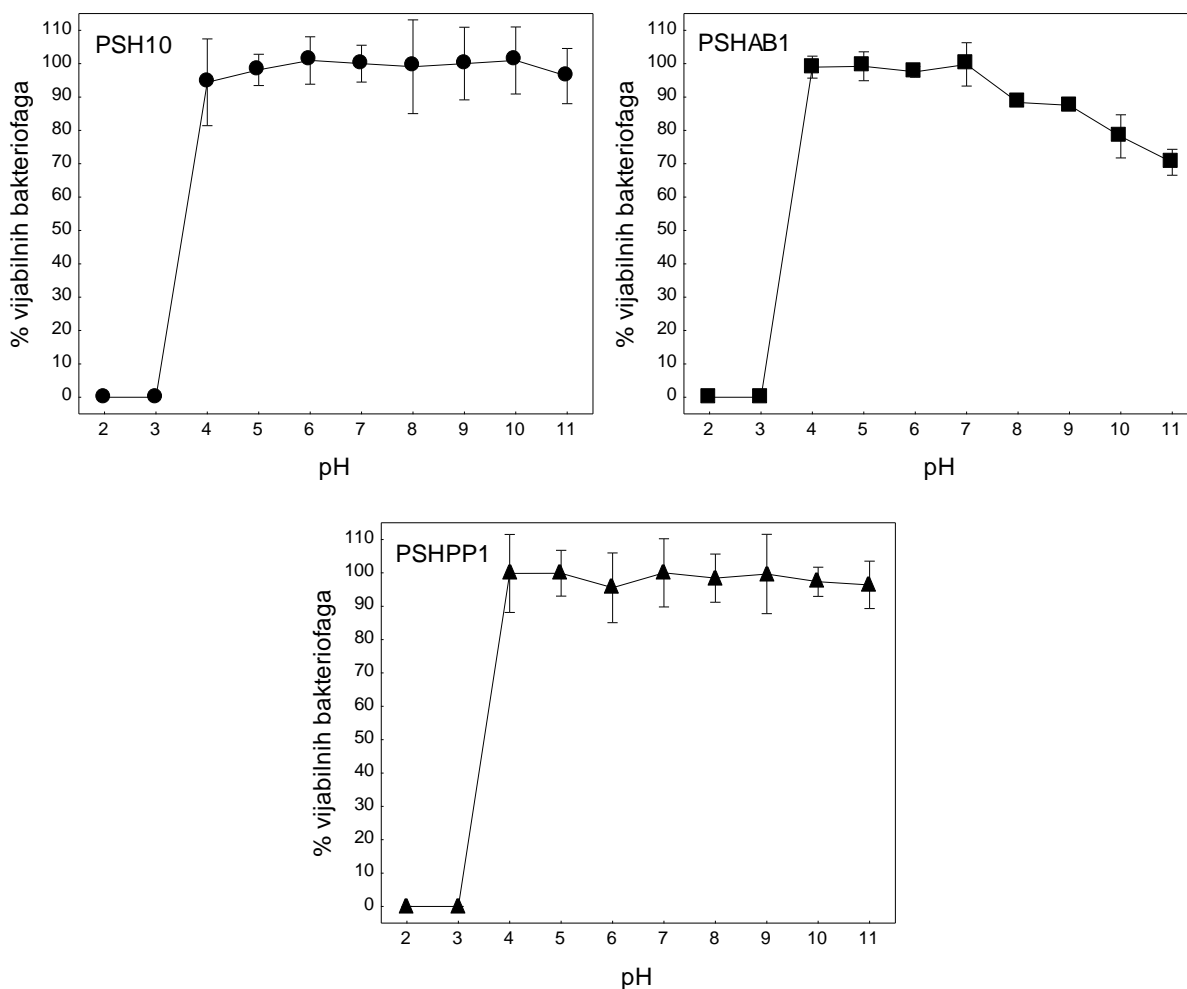
Procenat faga Psh-10 koji je adsorbovao za površinu ćelija domaćina *P. shigelloides* DBPM2 pri temperaturama od 8°C, 22°C, 37°C i 44°C kretao se u opsegu od 28,6 pri temperaturi od 8°C do 36,6 koliko je registrovano pri temperaturi od 37°C. Nešto veće vrednosti procenta adsorpcije uočene su kod bakteriofaga Psh-AB1 gde je adsorbovalo između 44,6 (8°C) i 54,4 (44°C) procenata virusnih čestica za ćelije istog domaćina. U slučaju faga Psh-PP1 i domaćina *P. shigelloides* 1PAD najveći procenat adsorpcije registrovan je pri temperaturi od 8°C i iznosio je 31,5 dok je najniža vrednost procenta adsorpcije (25,1%) uočena pri temperaturi od 22°C (grafik 4.13.4).



Grafik 4.13.3 Adsorpcija bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 u procentima \pm standardna devijacija na različitim temperaturama u toku 30 minuta pri MOI = 0,1

4.13.4 Uticaj različitih pH vrednosti na vijabilnost bakteriofaga

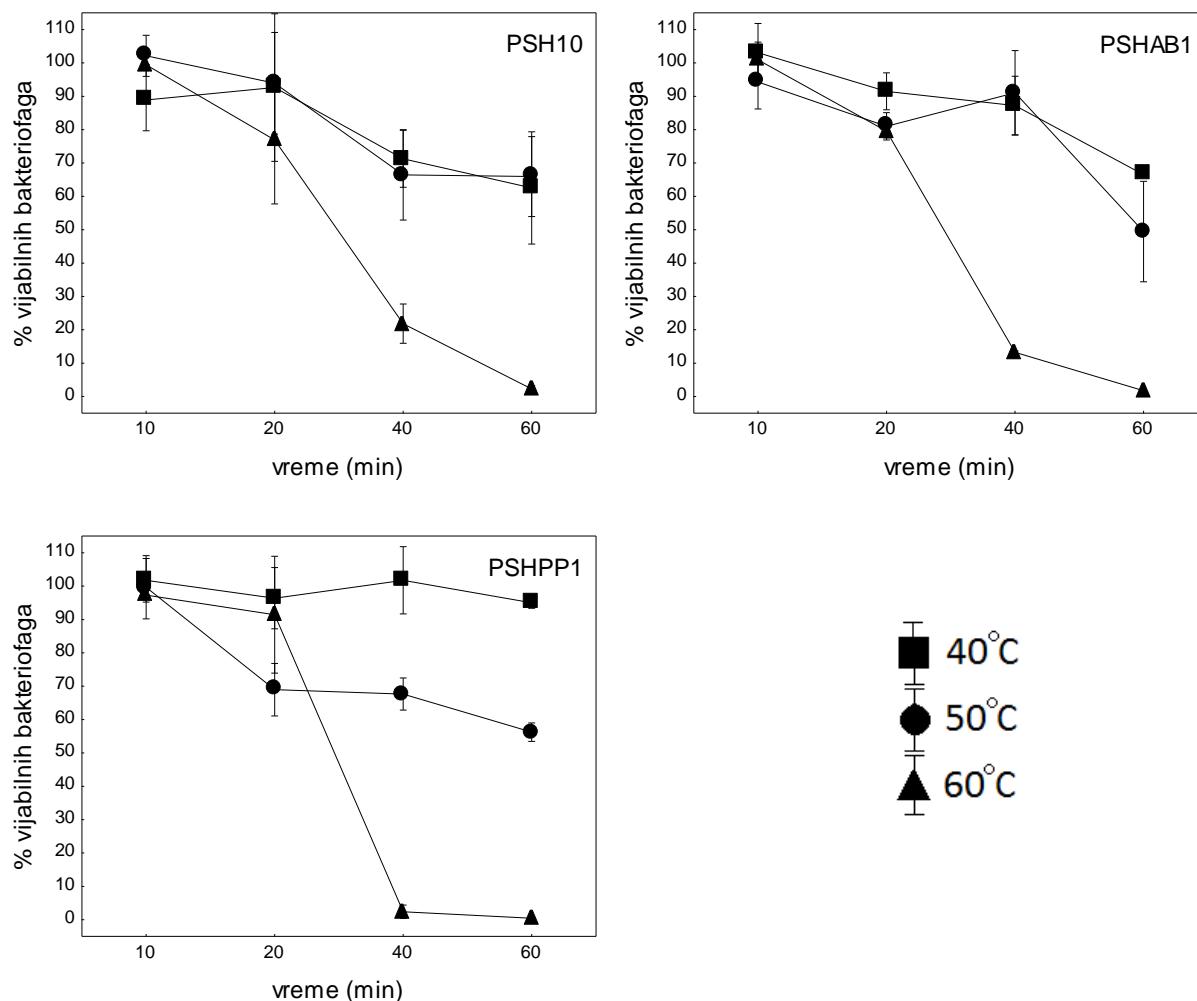
Efekat različitih pH vrednosti na bakteriofage Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 nakon 60 minuta inkubacije prikazan je na grafiku 4.13.4. Posmatrano za sva tri virusa pH vrednosti 2 i 3 potpuno su inaktivisale sva tri bakteriofaga. Vijabilnost bakteriofaga Psh-10 i Psh-PP1 nije se značajno menjala pri povišenim pH vrednostima (pH8, pH9, pH10, pH11), dok je kod bakteriofaga Psh-AB1 registrovano smanjenje procenta vijabilnih faga od 30%.



Grafik 4.13.4 Vijabilnost bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 u procentima \pm standardna devijacija pri različitim pH vrednostima u trajanju od 60 minuta

4.13.5 Efekat visokih temperatura na vijabilnost bakteriofaga

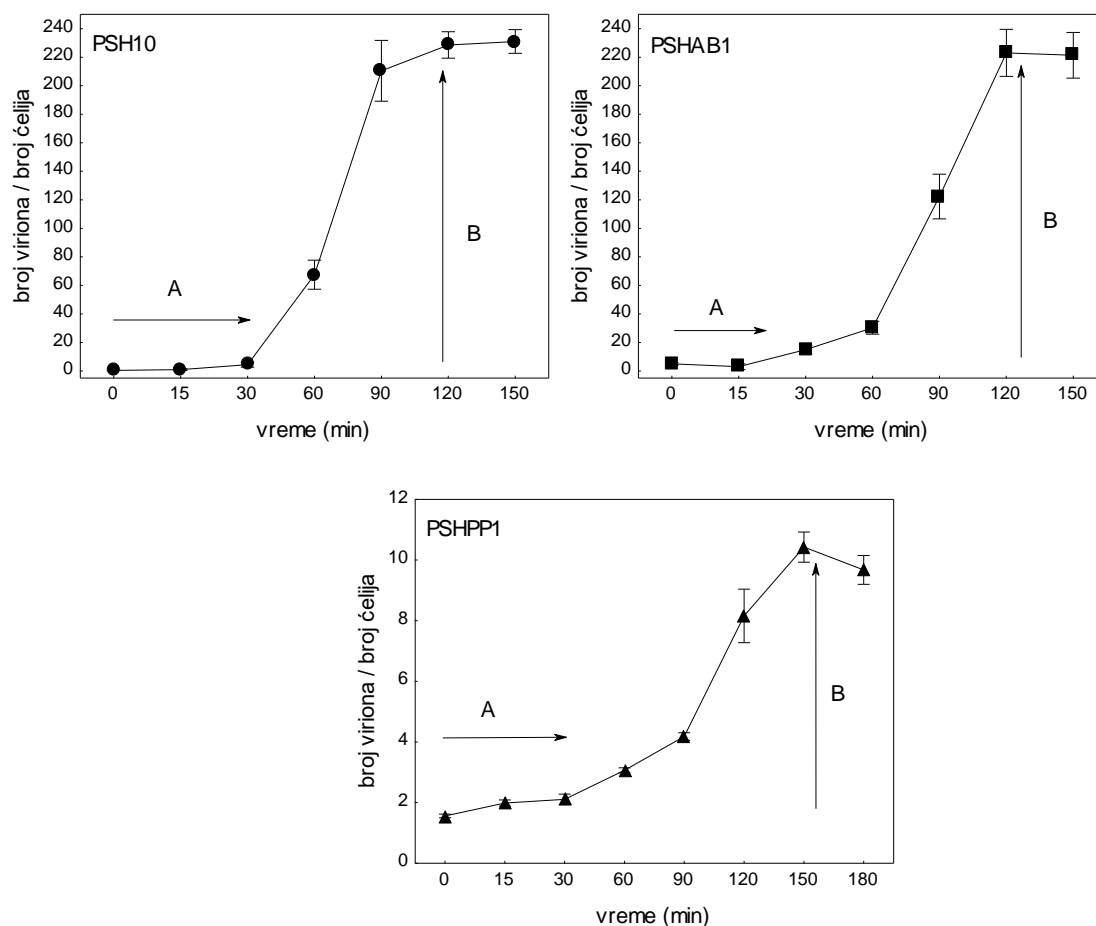
Rezultati ispitivanja uticaja visokih temperatura (40°C, 50°C i 60°C) na vijabilnost bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 prikazani su na grafiku 4.13.5. Očekivano, procenat vijabilnih bakteriofaga posmatran za sva tri virusa bio je najviši pri temperaturi od 40°C, a najniži pri temperaturi od 60°C. Nakon jednog časa inkubacije pri temperaturi od 40°C najveći procenat vijabilnosti zabeležen je kod virusa Psh-PP1 (95% ± 1,65). Pri temperaturama od 50°C i 60°C vijabilnost su u najvećoj meri sačuvali bakteriofagi sa oznakom Psh-10 (65,9% ± 11,9 odnosno 2,27% ± 1).



Grafik 4.13.5 Vijabilnost bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 u procentima ± standardna devijacija pri različitim temperaturama (40°C, 50°C i 60°C) u trajanju od 60 minuta

4.13.6 Kriva multiplikacije bakteriofaga „One step growth curve“

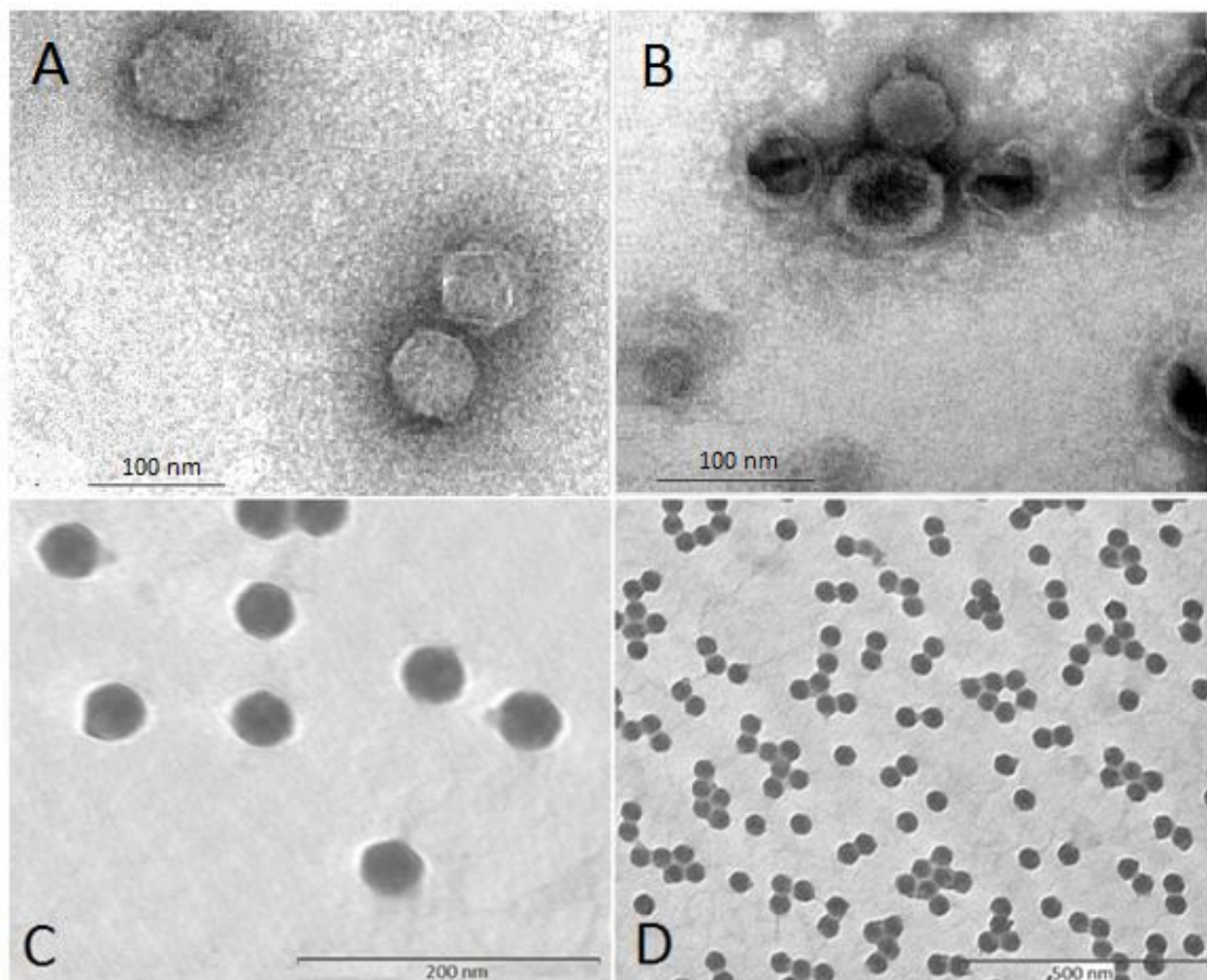
Krive multiplikacije sa parametrima (latentni period, broj oslobođenih viriona po ciklusu i trajanje ciklusa) za viruse Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 prikazane su na grafiku 4.13.6. Na osnovu konstruisane krive multiplikacije za bakteriofag Psh-10 utvrđeno je trajanje latentnog perioda od oko 30 minuta dok se ceo ciklus navršava aproksimativno za 120 minuta. U jednom ciklusu posmatrano za pomenuti fag oslobodi se između 220 i 240 viriona. Kod virusa Psh-AB1 latentni period traje između 15 i 30 minuta, a ceo ciklus se kao i kod virusa Psh-10 navršava nakon 120 minuta. Broj oslobođenih viriona po jednom ciklusu takođe neznatno varira u odnosu na virus Psh-10 i iznosi oko 223. Bakteriofag Psh-PP1 završava ciklus multiplikacije aproksimativno za 150 minuta sa latentnim periodom od oko 30 minuta. Broj oslobođenih viriona je značajno manji u odnosu na viruse Psh-10 i Psh-AB1 i iznosi približno 10.



Grafik 4.13.6 Krive multiplikacije bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 sa označenim latentnim periodima (A) i brojem oslobođenih viriona po jednom ciklusu sa trajanjem ciklusa (B)

4.13.7 Transmisiona elektronska mikroskopija bakteriofaga

Bakteriofagi sa oznakama Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 posmatrani su upotrebom transmisionog elektronskog mikroskopa u cilju njihove morfološke karakterizacije (slika 4.13.7). Na osnovu dobijenih mikrografija sva tri bakteriofaga su svrstana u red *Caudovirales* (bakteriofagi poseduju strukturu nalik repu; lat. *Cauda*, rep), familiju *Podoviridae* (bakteriofagi poseduju strukturu nalik repu koji je izrazito kratak; grč. Πόδι (pódi), stopalo) s obzirom da sva tri faga poseduju kratak kratak rep i izometrični kapsid (morfortip C1) (Ackermann, 2001). Detaljniji opis i dimenzije ispitivanih bakteriofaga prikazani su u tabeli 4.13.7.



Slika 4.13.7 Transmisiona elektronska mikrografija bakteriofaga Psh-10 (A), Psh-AB1 (B) i Psh-PP1 (C i D).

Tabela 4.13.7 Podaci dobijeni na osnovu elektronskih mikrografija bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1

Bakteriofag	Sistematska kategorija		Dimenzije [nm]				Morfofip ^a	Karakteristike genoma ^a
	Red	Familija	Veličina glave	Dužina repa	Širina repa	Ukupna dužina viriona		
Psh-10	<i>Caudovirales</i>	<i>Podoviridae</i>	63,2±1,5	11,8	8,8	~75	C1	dsDNK
Psh-AB1	<i>Caudovirales</i>	<i>Podoviridae</i>	54,4±2,1	8,8	8,8	~63	C1	dsDNK
Psh-PP1	<i>Caudovirales</i>	<i>Podoviridae</i>	41,3±1,4	9,1±1,1	11,4±2,1	49,3±1	C1	dsDNK

^a prema Ackerman, 2001.

4.13.8 Ekstrakcija nukleinske kiseline bakteriofaga

Bakteriofagi sa oznakama Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 podvrgnuti su ekstrakciji dezoksiribonukleinske kiseline fenol-hloroform metodom. Rezultati merenja koncentracije i čistoće genomske DNK dobijene nakon ekstrakcije prikazani su u tabeli 4.13.8.

Tabela 4.13.8 Srednje vrednosti merenja koncentracije i čistoće DNK kod izolovanih virusa Psh-10, PshAB1 i Psh-PP1.

Oznaka bakteriofaga	konc. (ng/μL)	OD 260/280*	OD 260/230**
Psh-10	485,79	1,91	2,26
Psh-AB1	455,09	1,91	2,33
Psh-PP1	1355,3	1,94	2,31

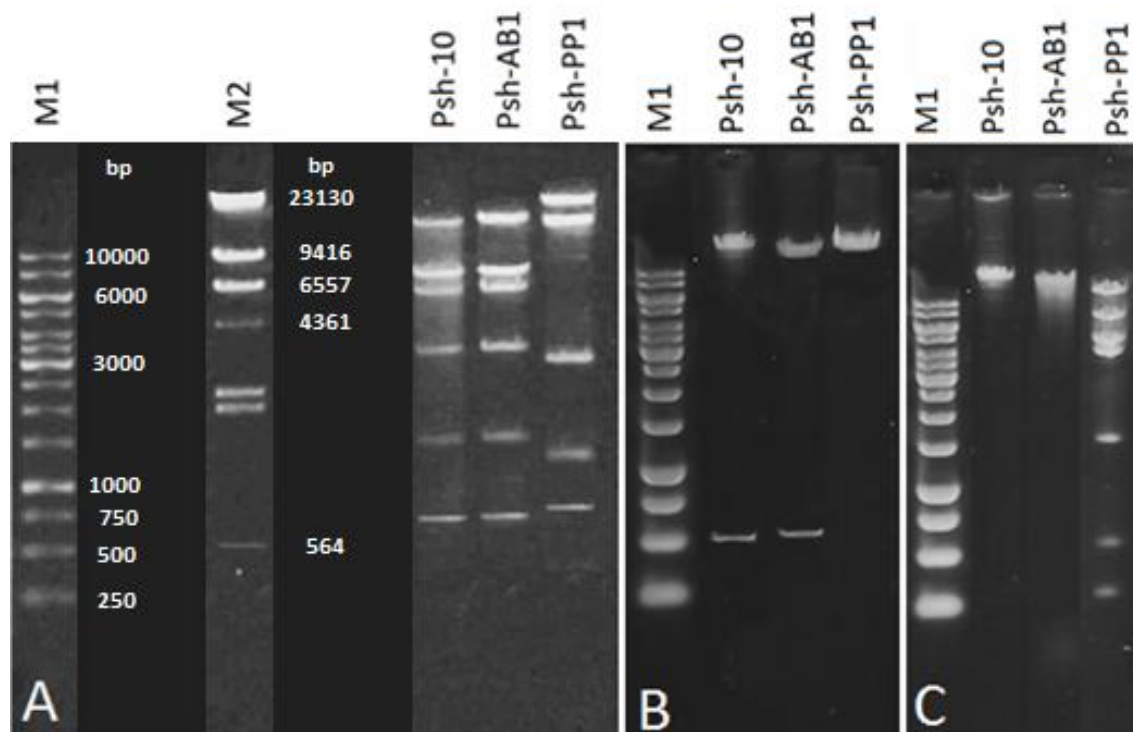
* odnos 260/280 ~ 1,8 za čistu DNK

** odnos 260/230 ~2.0 – 2.2 za čistu DNK

4.13.9 Digestija virusne DNK restrikcionim enzimima

RFLP analiza obavljena na genomu bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 potvrdila je da su genomi sva tri ispitivana bakteriofaga u formi dsDNK. Broj fragmenata dobijenih digestijom korišćenjem enzima Dra I iznosio je 6 za DNK bakteriofaga Psh-10 i Psh-AB1 dok je isti enzim DNK bakteriofaga Psh-PP1 isekao na 5 fragmenata (slika 4.13.9). Korišćenjem enzima Sma I na genomima bakteriofaga Psh-10 i

Psh-AB1 dobijeno je po 2 fragmenta, a jedna traka je uočena prilikom tretiranja genoma virusa Psh-PP1. Korišćenjem enzima Sal I uočena je po jedna traka kod genoma virusa Psh-10 i Psh-AB1 i 7 traka kod virusa Psh-PP1. Na osnovu veličine dobijenih fragmenata (tabela 4.13.9) korišćenjem enzima Dra I procenjena veličina sva tri ispitivana genoma iznosi približno 35 kbp.



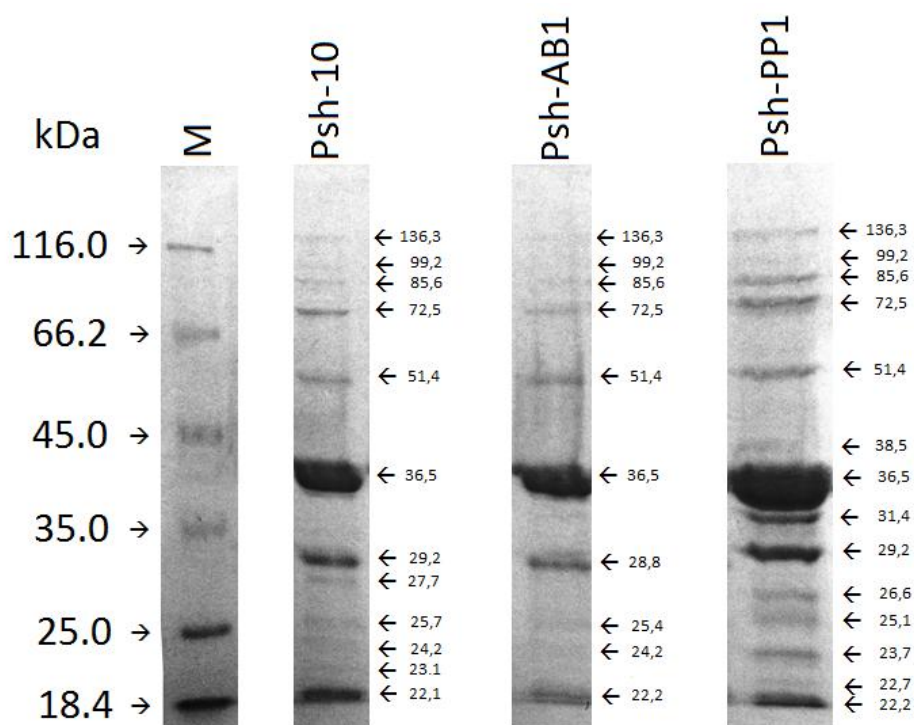
Slika 4.13.9 Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata genoma bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1. DNK bakteriofaga podvrgnuta digestiji od strane enzima Dra I (A), Sal I (B) i Sma I (C). Molekularni markeri: 1 kb (M1) i Lambda DNA/HindIII (M2).

Tabela 4.13.9 Veličine fragmenata/traka dobijenih enzimskom Dra I digestijom genoma virusa Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1.

Broj trake	Veličina fragmenata/traka [bp/kbp]		
	<u>Psh-10</u>	<u>Psh-AB1</u>	<u>Psh-PP1</u>
1	14148	14148	16096
2	8445	8445	13553
3	6811	6811	3279
4	3574	3574	1220
5	1449	1449	668
6	640	640	-
Σ	~35 kbp (35067)	~35 kbp (35067)	~35 kbp (34816)

4.13.10 Analiza strukturnih proteina bakteriofaga metodom SDS-PAGE

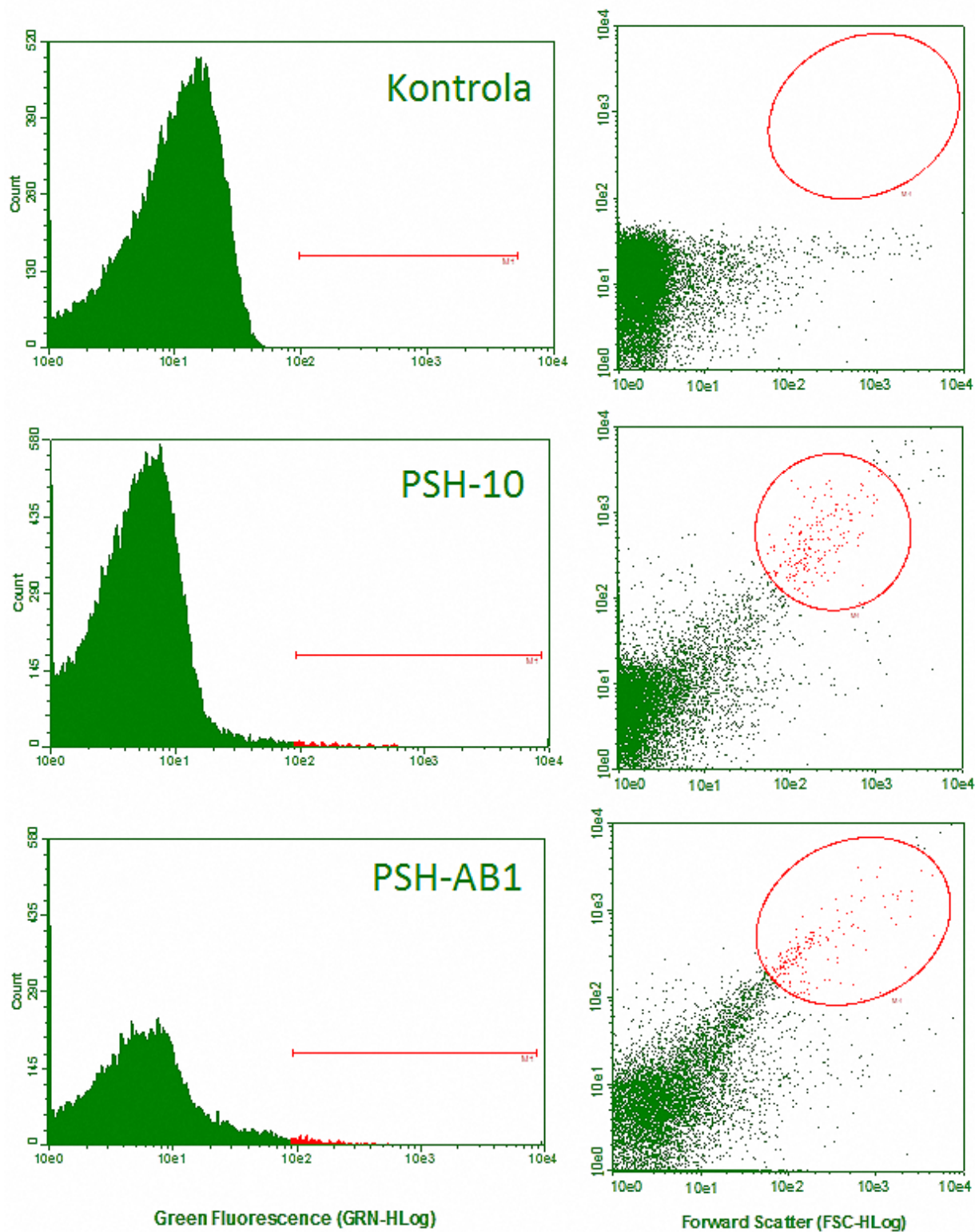
Analiza strukturnih proteina bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 metodom SDS-PAGE pokazala je prisustvo različitog broja traka kod pomenutih virusa (slika 4.13.10). Kod virusa Psh-10 detektovano je 12 strukturnih proteina od kojih su 3 glavna sa molekulskim masama od oko 36,5, 29,2 i 22,1 kDa. Ukupno 10 strukturnih proteina od kojih 3 glavna sa molekulskim masama od približno 36,5, 28,8 i 22,2 kDa detektovano je kod virusa Psh-AB1. Tri glavna proteina sa veoma bliskim vrednostima molekulskih masa u odnosu na pomenute viruse detektovana su i kod virusa Psh-PP1 kod koga je uočeno ukupno 14 traka.



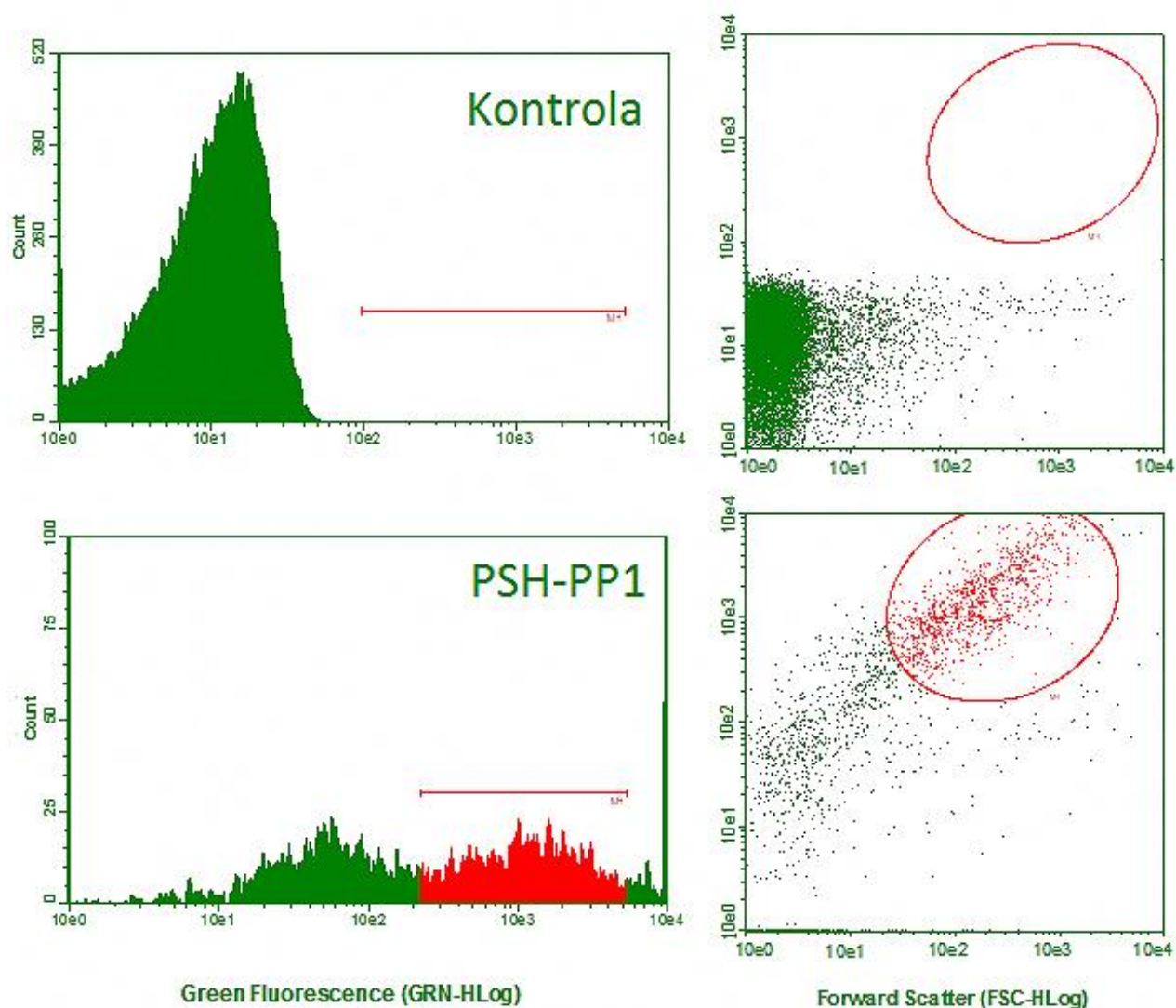
Slika 4.13.10 SDS-PAGE analiza strukturnih proteina bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1. M - Protein MW marker

4.14 Detekcija izolovanih bakteriofaga protočnom citometrijom

Bakteriofagi Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 čije su dimenzije kapsida $63,2 \pm 1,5$, $54,4 \pm 2,1$ i $41,3 \pm 1,4$ i veličine genoma približno 35kb parova uspešno su detektovani korišćenjem protočnog citometra (slika 4.14), a odvojeni pikovi jasno su uočeni pri brojnosti od oko 10^5 viriona/mL.



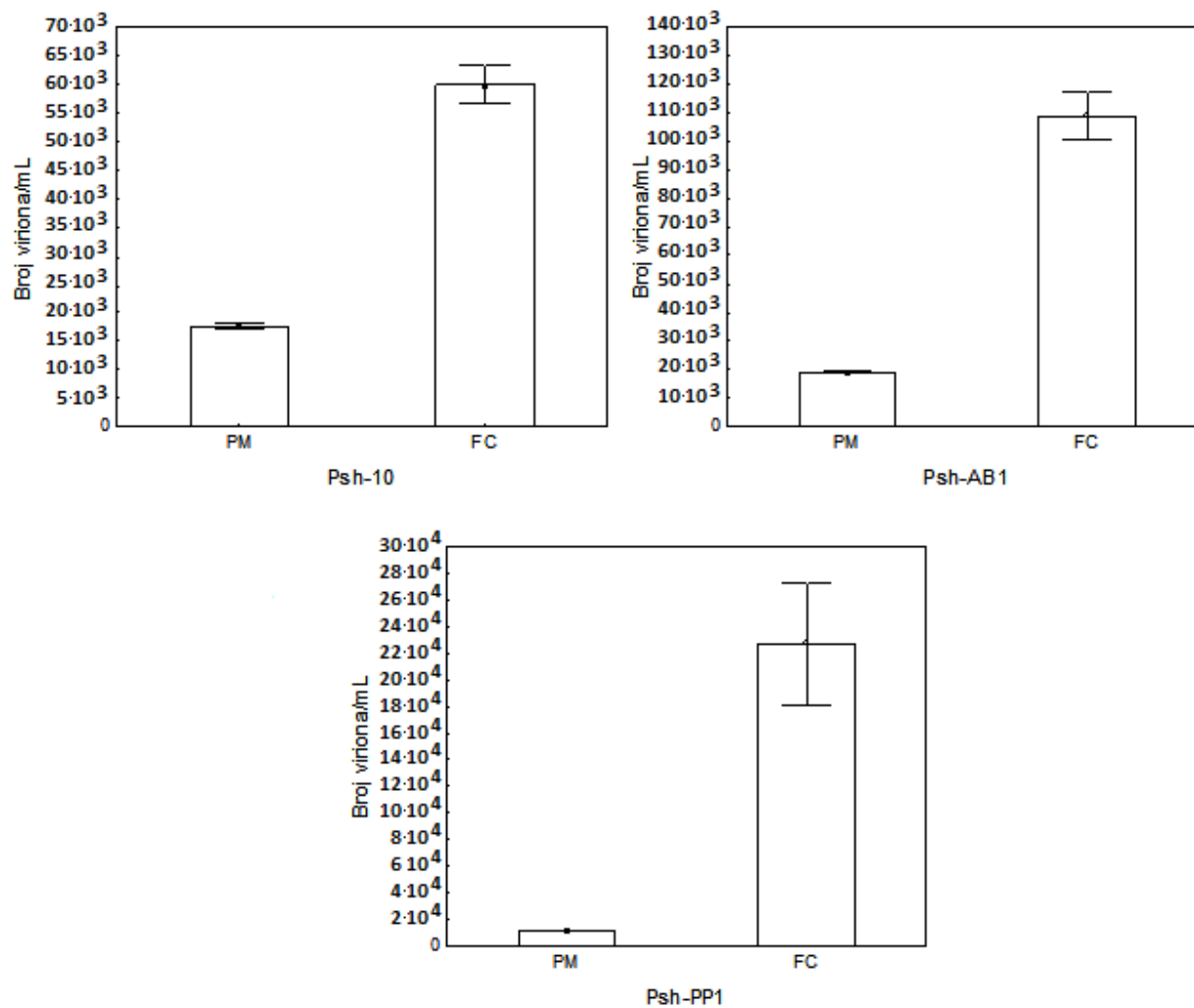
Slika 4.14 Detekcija bakteriofaga na protočnom citometru



Slika 4.14 Detekcija bakteriofaga na protočnom citometru (nastavak)

Brojnosti detektovanih faga korišćenjem protočnog citometra i brojnosti faga iz istog razređenja dobijene nakon agar overlay metode prikazane su na grafiku 4.14 i slici 4.14. Za sva tri virusa korišćenjem protočnog citometra registrovane su veće brojnosti viriona u jedinici zapremine u odnosu na *agar overlay* metodu. Tako je kod virusa Psh-10 protočnom citometrijom detektovano 3,4 puta više viriona u poređenju sa agar overlay metodom. Za virus Psh-AB1 odnos je nešto veći i iznosi 5,7, dok je

kod virusa Psh-PP1 protočnom citometrijom detektovano čak 19,9 puta više viriona u odnosu na *agar overlay* metodu.



Grafik 4.14. Brojnost bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 određena agar overlay metodom (PM) i protočnom citometrijom (FC) sa \pm SD

5. DISKUSIJA

5.1 Izolacija sojeva *Plesiomonas shigelloides* i identifikacija na osnovu morfoloških, kulturelnih i biohemijskih karakteristika

Brojne studije su potvrdile prisustvo bakterije *P. shigelloides* u vodama tropskih i subtropskih oblasti. Tako je izolacija ove bakterije potvrđena u Turskoj (Dülger, 2004), Brazilu (De Mondino i sar., 1995; Gibotti i sar., 2000), Bangladešu (Islam i sar., 1991), Nigeriji (Kwaga i sar., 1988), SAD-u (Miller i Koburger, 1986b) i Japanu (Arai i sar., 1980), a procenat pozitivnih uzoraka se kretao u rasponu od 7,4 do 83. U cilju izolacije korišćene su brojne podloge za direktnu izolaciju (PDA, SS agar, XLD agar, MacConkey agar, DHL agar) i obogaćenje uzoraka (APW, GN bujon, Peptonski bujon) pri čemu su primenjene i tehnike centrifugiranja i filtracije uzoraka. Manji broj radova se bavio ispitivanjem prisustva vrste *P. shigelloides* u akvatičnim ekosistemima umerenog i hladnog pojasa. Tako su Krovacek i saradnici (2000) analizirajući uzorke vode poreklom iz dva jezera i reke u Švedskoj (po jedan uzorak jezerske vode i dva uzorka rečne vode sa različitih lokaliteta) potvrdili prisustvo bakterije u sva 4 ispitivana uzorka. U cilju izolacije autori su 400 mL uzorka dodali u Alkalnu peptonsku vodu u cilju obogaćenja, nakon čega je uzorak zasejavan na Krvni, Endo, MacConkey i Deoksiholat citratni agar. Iste podloge i metode koristili su Gonzáles-Rey i saradnici (2003) kada je *P. shigelloides* detektovan u uzorku vode jednog od šest ispitivanih jezera na severu Švedske. U cilju obogaćenja uzoraka alkalna peptonska voda (APW) je korišćena i prilikom ovog istraživanja, a izolacija vrste *P. shigelloides* bila je uspešna iz 7 od 11 uzoraka (63,6%) i pored značajno manjih zapremina rečne i jezerske vode koje su podvrgnute obogaćenju. Podloge za obogaćenje, pepton inozitol žučni bujon (PIBB) i tetratonat bujon (TTB), se nisu pokazale kao pogodne i pored inhibitornih komponenti poput brilijant zelenog i žučnih soli u svom sastavu. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima istraživanja Freund i saradnika (1988) koji su ustanovili superiornost TTB-a prilikom izolacije vrste *P. shigelloides* iz uzoraka voda. Veći broj uzoraka u okviru ovog istraživanja zasejavan je direktno na modifikovanu PDA podlogu, a izolacija vrste *P. shigelloides* je bila uspešna iz 15 od 45 uzoraka (33,3%). Uspeh u izolaciji koji je postignut prilikom direktnog zasejavanja mogao bi biti rezultat modifikacije PDA podloge. Modifikacija koja je podrazumevala zamenu indikatora neutralnog crvenog za indikator fenol crveno omogućila je jasniju diferencijaciju kolonija *P. shigelloides*, budući da je transformacija inozitola do kiselih produkata od strane pomenute vrste dovela do stvaranja upadljivih jarko žutih kolonija na podlozi. Ipak, dodatni testovi bili su neophodni budući da

pojedine vrste koje naseljavaju vodene sredine takođe imaju sposobnost fermentacije inozitola (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*) (Brisse i sar., 2006; Grimont i Grimont, 2006). Uspeh prilikom izolacije vrste *P. shigelloides* iz uzoraka poreklom iz vodenih sredina umerenog pojasa koji je postignut u okviru ovog istraživanja, pored modifikacije podloge, mogao bi se pripisati i fenomenu globalnog zagrevanja. Uočeno je da produženi periodi povišenih temperatura mogu dovesti do povećanja temperature vodenih sredina, a samim tim i ubrzane reprodukcije i širenja areala mikroorganizama (Harvell i sar., 2002; Wu i sar., 2016). Tako Frank i saradnici (2006) navode slučajevne infekcija kod kupaca na Baltiku izazvanih bakterijama karakterističnim za tropska i umerena mora (*Vibrio vulnificus* i *Vibrio vulnificus*). Isti autori kao razlog navode povećanje temperature morske vode koja u mnogim delovima Baltičkog mora prelazi 20°C (Frank i sar., 2006). U ovom radu su nakon utvrđivanja morfologije ćelija i reakcije po Gramu obavljene preliminarnе biohemijske analize koje su obuhvatile oksidaza i katalaza testove, testove produkcije indola, hidrolize želatina, korišćenja citrata i fermentacije ugljenih hidrata (glukoze, sorbitola, saharoze, maltoze i arabinoze). Među autorima ne postoji jedinstven stav o broju i vrsti preliminarnih biohemijskih testova neophodnih za diferencijaciju vrste *P. shigelloides*. Ipak, dokazivanje prisustva enzima oksidaze je nezaobilazni početni korak svakog postupka identifikacije, budući da je bakterija jedini oksidaza pozitivni član familije *Enterobacteriaceae*. Pored pomenutog testa, prilikom izolacije bakterije iz vodene sredine i njene preliminarnе identifikacije ispitivana su njena fermentativna svojstva (Gibotti i sar., 2000; Krovacek i sar., 2000; De Mondino i sar., 1995; Miller i Koburger, 1986b; Arai i sar., 1980; Gonzáles-Rey i sar., 2003), prisustvo enzima triptofanaze (Krovacek i sar., 2000; Gonzáles-Rey i sar., 2003; Arai i sar., 1980), mogućnost hidrolize želatina (Miller i Koburger, 1986b), osetljivost na vibriostatski agens O/129 (Dülger, 2004; De Mondino i sar., 1995), prisustvo enzima lizin i ornitin dekarboksilaze (Gibotti i sar., 2000; Arai i sar., 1980) i arginin dihidrolaze (Gibotti i sar., 2000). Od fermentativnih supstrata, pored inozitola najčešće je dokazivana mogućnost degradacije glukoze bez produkcije gasa, odnosno osobina koja diferencira *P. shigelloides* od oksidaza pozitivnih predstavnika rodova *Aeromonas* koji pomenuti proces vrše uz oslobađanje gasa. Dokazivanjem produkcije indola isključuju se vrste roda *Pseudomonas* koje takođe poseduju citohrom C oksidazu i mogu da rastu na podlogama namenjenim za izolaciju bakterije *P. shigelloides*. Manji broj šema za identifikaciju podrazumeva potvrdu nemogućnosti hidrolize želatina koja je obavljena i u ovom radu kao i potvrdu osetljivosti izolata na vibriostatski agens O/129, čime se vrši diferencijacija vrste *P. shigelloides* od bakterija roda *Vibrio* odnosno *Aeromonas*. Iako u ovom radu nisu ispitivane, u značajne diskriminatorne osobine vrste *P. shigelloides* u odnosu na bakterije rodova *Vibrio* i *Aeromonas* kao i u odnosu na članove

familije *Enterobacteriaceae* ubrajaju se još i mogućnost dekarboksilacije lizina i ornitina kao i dihidrolaza arginina.

5.2 Ekstrakcija bakterijske DNK i potvrda identifikacije sojeva primenom PCR tehnike

Poređenje amplifikovanih fragmenata ispitivanih sojeva nakon tehnike PCR-a, potvrdilo je nalaze preliminarnih biohemijskih testova kod svih sojeva *P. shigelloides* izolovanih iz površinskih voda Panonske nizije. U radu je korišćen jedan od prvih PCR protokola osmišljen za identifikaciju vrste *P. shigelloides*, a koji se zasniva na detekciji specifičnog regiona 23S rRNK gena. Ciljna sekvenca na 5' kraju pomenutog gena diskriminiše *P. shigelloides* od genetički bliskih rodova *Aeromonas*, *Vibrio* i *Proteus* i budući da je visoko specifična koristi se prilikom PCR identifikacije kod uzoraka iz vodene sredine kao i uzoraka poreklom iz humanog i animalnog materijala (González-Rey i sar., 2000). Herrera i saradnici (2006) su u okviru istraživanja vezanog za detekciju vrste *P. shigelloides* u uzorcima hrane osmislili i testirali set prajmera za detekciju gena koji kodira receptor na površini ćelije odgovoran za transport hem-gvožđa (*hugA*) kod pomenute vrste, a uporedo je testiran set prajmera za detekciju specifičnog regiona 23S rRNK gena osmišljen od strane González-Rey i saradnika. Rezultati su pokazali veću pouzdanost kod dokazivanja *hugA* gena budući da je za soj *stx2* vrste *E. coli* ustanovljen amplifikat približne veličine onoga koji se dobija prilikom detekcije specifičnog regiona 23S rRNK gena. Ipak, rezultati PCR identifikacije u okviru ovog istraživanja mogu se smatrati pouzdanim, ako se imaju u vidu rezultati i broj preliminarnih biohemijskih testova.

5.3 Određivanje genetičke bliskosti izolovanih sojeva metodom RAPD-PCR

Primenom RAPD-PCR metode ustanovljena je značajna genetička varijabilnost sojeva *P. shigelloides* poreklom iz površinskih voda Panonske nizije, a klonalna identičnost nije registrovana ni među izolatima poreklom iz istog uzorka. Na osnovu konstruisanog dendrograma nije uočeno grupisanje odnosno razdvajanje sojeva na osnovu geografskog porekla uzoraka. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru istraživanja Gu i saradnika (2006) kada je korišćenjem dva RAPD prajmera ustanovljeno ne podudaranje RAPD profila i značajna genetička varijabilnost među većinom ispitivanih izolata poreklom iz vodene sredine (n=10), riba (n=6) i kliničkog materijala humanog porekla (n=10). Do sličnih zaključaka došli su González-Rey i saradnici (2011) prilikom ispitivanja genetičke raznovrsnosti 24

soja 9 različitih serotipova. Ispitivanjem su bili obuhvaćeni sojevi poreklom iz životne sredine kao i sojevi humanog i animalnog porekla, a primenom jednog prajmera ustanovljena je razlika u RAPD profilima kod dvadeset i jednog soja. Značajna genetička varijabilnost sojeva *P. shigelloides* ustanovljena je i PFGE metodom, a istraživanjem je bilo obuhvaćeno 39 izolata poreklom iz kliničkog materijala (Shigematsu i sar., 2000). Potvrdu velike heterogenosti na nivou DNK molekula pružila je molekularna tipizacija MLST metodom (multilocus sequence typing) kojom je ustanovljen visok stepen diverziteta nukleotida među 77 sojeva *P. shigelloides* (Salerno i sar., 2007). Autori pomenute studije kao razloge varijabilnosti bakterije navode česte homologe rekombinacije tzv. housekeeping gena koje se kod alela i nukleotida javljaju 7 odnosno 77 puta češće u odnosu na mutacije.

U ovom radu korišćeno je pet dekamernih prajmera koji do sada nisu korišćeni prilikom određivanja genetičke bliskosti sojeva *P. shigelloides*. Najmanji broj različitih RAPD profila dobijen je primenom prajmera K01 (31 profil), dok se kao najdiskriminatorniji pokazao prajmer OPN02 (35 profila).

Vrednosti Žakarovog koeficijenta kretale su se u rasponu od 0 do 0,357. Pomenuti pokazatelj sličnosti taksonomskih jedinica koristi se za binarne karaktere kada je jedna realizacija karaktera znatno važnija od druge (Tepavčević i Lužanin, 2006), a budući da prajmeri nisu davali produkte za sve sojeve njegova upotreba u ovom radu bila je opravdana. Tako je u određenoj meri izbegnuto grupisanje sojeva na osnovu odsustva produkata amplifikacije. I pored toga, zabeležene su niske vrednosti pouzdanosti dendrograma.

5.4 Testiranje sposobnosti formiranja biofilma sojeva *Plesiomonas shigelloides*

Jedna od novijih definicija biofilma opisuje pomenuti fenomen kao zajednicu mikroorganizama koja je ireverzibilno vezana za površinu ili međufazu, koja je uklopljena u egzopolisaharidni matriks i koja se odlikuje izmenjenim fenotipom u vezi sa brzinom rasta i transkripcijom gena (Donlan i Costerton, 2002). Bakterije formiraju biofilm na velikom broju struktura, uključujući živa tkiva, medicinske implantate, industrijske i vodovodne cevi kao i prirodne akvatične ekosisteme (Prakash i sar., 2003). Povećana otpornost bakterija na antibiotike (Gristina i sar., 1987), jone metala (Cu i Ag) (Harrison i sar., 2007), dezinficijense (Bridier i sar., 2011) i otpornost na komponente imunološkog sistema domaćina (Eiff i sar., 1999) samo su neke od prednosti života bakterija u formi biofilma, a koje utiču na povećanje njihove virulentnosti.

U ovom radu ispitivana je sposobnost produkcije biofilma sojeva *P. shigelloides* poreklom iz površinskih voda Panonske nizije i u tu svrhu su izabrane površine od polistirena i borosilikata. Kada je korišćena površina od polistirena, svi izolovani sojevi nakon 24 časa inkubacije pri temperaturi od 37°C ocenjeni su kao neadherentni, a bliske vrednosti sa graničnom ODC vrednošću (0,1191) zabeležene su jedino kod sojeva 1PAD (0,063) i 5ZD (0,072) poreklom iz Paličkog jezera i akumulacije Zobnatica. Procena sposobnosti produkcije biofilma sojeva *P. shigelloides* na površinama od borosilikata vršena je uz određene modifikacije u odnosu na način opisan od strane Christensen i saradnika (1982). U opisu metode adherencija se prati na zidovima i dnu epruveta, dok se formirani prsten na granici između podloge i vazdušne sredine ne uzima u obzir. Imajući u vidu izmenjenu i dopunjenu definiciju biofilma koju su postavili Donlan i Costerton po kojoj je biofilm zajednica mikroorganizama koji su ireverzibilno vezani za površinu ili prostor između faza, u ovom radu je 20 sredinskih kao i referentni soj ATCC51903 na osnovu uočenog prstena okarakterisano kao pozitivno na produkciju biofilma.

Do danas je objavljen mali broj radova u kojima se mogu naći podaci vezani za produkciju biofilma vrste *P. shigelloides*. Castelo-Branco i saradnici (2016) su pratili produkciju biofilma sojeva *P. shigelloides* izolovanih iz kloakalnog brisa vrste *Eudocimus ruber* (n=7) kao i iz vodene sredine (n=3) pri temperaturama od 28 i 37°C u trajanju od 48 časova, pri čemu je stepen adhezije ispitivan na površinama od polistirena. Od ukupno 10 ispitivanih sojeva, tri soja je ocenjeno kao slabo adherentno kada je temperatura inkubacije iznosila 28°C, dok je pri temperaturi od 37°C čak šest od deset sojeva formiralo biofilm (5 slabo i 1 umereno adherentan soj). Nisku produkciju biofilma zabeležili su i Hostacká i saradnici (2005) kada je fenomen ispitivan na površini od stakla. Pomenuto istraživanje obuhvatilo je sojeve *P. shigelloides* humanog (n=13) i animalnog porekla (n=14) pri čemu je slaba adherencija primećena kod svih sojeva. Kako su rezultati ovog ispitivanja dostupni jedino u formi sažetka ostaje nepoznato koja metoda je korišćena. Veći procenat producenata biofilma među sojevima u pomenutim studijama u odnosu na ovaj rad mogao bi biti posledica dužeg perioda inkubacije kao i razlika u poreklu ispitivanih sojeva. Pored toga, Aquilini i saradnici (Aquilini i sar., 2013) su ustanovili da mogućnost adherencije među sojevima *P. shigelloides* varira u zavisnosti od prisustva O1 antigena koji je označen kao važan činiac kod bakterijske adhezije i invazivnosti na eukariotskim ćelijama, a utiče i na sposobnost stvaranja biofilma. Pored toga, mogući razlozi slabe adherencije ćelija *P. shigelloides* mogli bi biti posledica odsustva produkcije adhezina i egzopolisaharida za koje se pretpostavlja da imaju ključnu ulogu u održavanju strukturnog integriteta zajednica u okviru biofilmova (An i Parsek, 2007).

5.5 Određivanje hemolitičke, lipazne i DNAzne aktivnosti sojeva *Plesiomonas shigelloides* na krvnom agaru, enzimske aktivnosti na podlozi sa Tween 80 i DNase agaru

Mogućnost lize eritrocita od strane sojeva *P. shigelloides* ispitivana je u velikom broju radova, a dobijeni rezultati su prilično nekoherentni i ukazuju da procena ove sposobnosti kod izolata u određenoj meri zavisi od metode koja je primenjena za njegovu detekciju. Daskaleros i saradnici (1991) su kod tri soja *P. shigelloides* ustanovili odsustvo hemolize prilikom rasta kolonija na površini Luria agara sa dodatkom humanih i ovčijih eritrocita, dok je u tretmanima na tečnoj podlozi (LB) kao i prilikom primene agar overlay metode ova sposobnost detektovana. Isti autori pretpostavljaju da na lizu eritrocita u prisustvu ćelija *P. shigelloides* mogu da utiču i faktori sredine kao što su parcijalni pritisak kiseonika i stepen viskoziteta podloge. Uticaj parcijalnog pritiska kiseonika na proces hemolize pretpostavljaju i Gibotti saradnici (2000) koji su ispitujući hemolitička svojstva vodenih izolata *P. shigelloides* na različitim tipovima eritrocita kod istih sojeva utvrdili α i β tip hemolize u zavisnosti od toga da li su kolonije rasle na površini odnosno ispod sloja podloge koja je sadržala ovčije eritrocite (agar overlay metoda). Prisustvo jona gvožđa u podlozi navodi se kao još jedan faktor koji utiče na sintezu hemolizina kod vrste *P. shigelloides*, budući da je maksimalna koncentracija ovog enzima detektovana prilikom primene podloga koje u svom sastavu nisu sadržale jone pomenutog metala (Santos i sar., 1999; Daskaleros i sar., 1991). U prilog ovoj tvrdnji idu rezultati Baratéla i saradnika (2001) koji su detektovali hemolitičku aktivnost kod svih ispitivanih sojeva *P. shigelloides* ($n=7$) jedino u slučaju korišćenja podloge koja u svom sastavu nije sadržala jone gvožđa (Luria agar sa 5% ovčije krvi). Isti autori primećuju i stimulatívno dejstvo jona kalcijuma na proces hemolize. Osim toga, pozitivne reakcije zabeležene prilikom rasta kolonija na površini pomenute podloge u suprotnosti su sa navodima Daskaleros i sar. i Gibotti i sar. i pretpostavkama vezanim za uticaj parcijalnog pritiska kiseonika na proces hemolize kod vrste *P. shigelloides*. U ovom radu inokulacija sojeva *P. shigelloides* je vršena potezom eze po površini podloge koja u svom sastavu ne sadrži jone gvožđa (krvna baza sa 5% ovčijih eritrocita), a navedenom metodom detektovana je β hemoliza kod svih 37 izolata *P. shigelloides* poreklom iz površinskih voda Panonske nizije, uključujući i referentni soj ATCC51903. Istom metodom Krovacek i saradnici (2000) su ustanovili β tip hemolize kod svih 5 sojeva *P. shigelloides* izolovanih iz vodene sredine na podlozi koja je sadržala 5% goveđih eritrocita. Sintezu hemolizina kod svih sojeva *P. shigelloides* izolovanih iz vodene sredine ($n=10$) dokazali su i Mondino i saradnici (1995), a za potrebe istraživanja koje je izvedeno agar overlay metodom korišćeni su ovčiji i humani eritrociti (tip A). Produkcija hemolizina ispitivana je i kod sojeva *P. shigelloides* izolovanih iz fecesa pacijenata sa dijarealnim sindromom ($n=89$), a procenat β hemolitičkih

sojeva je varirao u zavisnosti od vrste odnosno porekla eritrocita. Tako je na podlozi sa humanim eritrocitima detektovano 92% β -hemolitičkih sojeva, dok je taj procenat za kokošije i ovčije eritrocite iznosio 63 i 0 (Ramalivhana i Obi, 2009). Janda i Abbott (1993) su primenom agar overlay metode i modifikovanog kontaktnog testa ustanovili prisustvo proteina odgovornog za β hemolizu kod više od 90% sojeva *P. shigelloides* (n=36). Pomenuti autori su zabeležili najefikasniju lizu na ovčijim eritrocitima i naveli da je protein odgovoran za hemolizu vezan za ćelije *P. shigelloides*. U ovom radu je ustanovljena intenzivnija hemolitička aktivnost supernatanta oslobođenih od bakterijskih ćelija (n=6), a do istih rezultata vezanih za mesto dejstva hemolitičkog proteina sojeva *P. shigelloides* (n=3) došli su Santos i saradnici (1999) koji su ispitivanje obavili takođe na ovčijim eritrocitima. Prisustvo hemolitičkog agensa u supernatantu dva ispitivana soja potvrdili su i González-Rodríguez i saradnici (2007) na eritrocitima psa i miša ali ne i humanim, ovčijim i goveđim eritrocitima.

I pored činjenice da je produkcija triacilglicerol lipaza jedan od glavnih faktora u patogenezi bakterijskih infekcija kod velikog broja vrsta (Rollof i sar., 1988; Straus i sar., 1992; Waldon i sar., 2002), smatra se da ovaj enzim ne igra značajnu ulogu kod infekcija izazvanih bakterijom *P. shigelloides* (Čižnár i sar., 2004). U ovom radu je produkcija lipaza potvrđena kod 5 od 37 (13,5%) ispitivanih sojeva poreklom iz površinskih voda Panonske nizije. Salerno i saradnici (2010) su u istraživanju koje je obuhvatilo ispitivanje faktora virulencije 60 sojeva vrste *P. shigelloides*, od kojih je 17 bilo poreklom iz vodene sredine, dokazali odsustvo produkcije lipaza na podlozi hranjivi agar sa 1% Tween 80 kod svih ispitivanih sojeva. Dijametralno suprotne rezultate navode Čižnár i saradnici (2004) koji su kvantitativnom analizom koja je podrazumevala merenje optičke gustine reakcione smeše (0,1 mL Tween 20 pufer, 0,1 mL Ca-Tris pufer, 2,5 mL Tris pufer i 0,5 mL supernatanta) potvrdili sintezu pomenutog enzima kod svih 30 ispitivanih sojeva poreklom iz vodene sredine (n=20), humanog (n=5) i animalnog materijala (n=5).

Ekstracelularne DNAze produkuju mnoge patogene bakterije, a pretpostavka je da ovi enzimi imaju ulogu u širenju infekcije putem likvefakcije gnoja (Tillett i sar., 1948; Sherry i sar., 1949) i izbegavanja imunog odgovora putem degradacije tzv. neutrofilnih ekstracelularnih zamki (NETs) (Brinkmann, 2004). Salerno i saradnici (2010) su u okviru ispitivanja koje je obuhvatilo 60 sojeva *P. shigelloides* ustanovili DNAznu aktivnost humanih (96%, n=25), animalnih (100%, n=18) i sojeva poreklom iz vodene sredine (100%, n=17) na podlozi DNAza agar. Sa druge strane, odsustvo pomenute karakteristike zabeležili su Vandepitte i saradnici (1974) prilikom ispitivanja biohemijskih svojstava 42 izolata poreklom iz fecesa (n=41) i žuči (n=1) pacijenata sa dijarealnim sindromom. Da sojevi *P. shigelloides* mogu ispoljiti veliku varijabilnost u pogledu sinteze DNAza ustanovili su Alabi i Odugbemi (1990b) prilikom analize biohemijskih karakteristika 16 izolata poreklom iz humanog materijala.

Nasuprot tome, u ovom radu je ustanovljena mogućnost hidrolize DNK kod svih 37 sojeva poreklom iz površinskih voda Panonske nizije uključujući i referentni soj ATCC51903. Imajući u vidu dobijene rezultate koji pokazuju uniformne karakteristike vezane za DNA-znu i hemolitičku aktivnost, diferencijaciju sojeva *P. shigelloides* prema stepenu patogenosti u odnosu na produkciju enzima u ovom radu je bilo moguće izvesti jedino na osnovu rezultata lipazne aktivnosti.

5.6 Pokretljivost sojeva *Plesiomonas shigelloides*

Pokretljivost flagelama se ubraja u potencijalne faktore patogenosti kod bakterija, a predstavlja jedan od mehanizama njihove translokacije neophodan za početno vezivanje za površine (Braga i sar., 1995; O'Toole i Kolter 1998). U ovom radu je ustanovljena pokretljivost kod svih sojeva poreklom iz površinskih voda Panonske nizije, a rezultati ispitivanja stepena pokretljivosti ukazali su da među ispitivanim izolatima postoji značajna varijabilnost. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Čižnár i saradnika (2004) kada je korišćenjem podloge koja je sadržala 0,35% agara ustanovljena pokretljivost kod svih 29 sojeva poreklom iz površinskih voda (n=19), humanog (n=5) i animalnog materijala (n=5). Iako je za pripremu podloge u pomenutoj studiji korišćena nešto veća koncentracija agara u odnosu na koncentraciju koja je korišćena u ovom radu (0,25%) zabeležen je veći stepen pokretljivosti, odnosno veće vrednosti prečnika zona (12,7 – 68,4 mm). Odsustvo flagelarne pokretljivosti kod malog procenta sojeva *P. shigelloides* (5%) ustanovili su Kelly i Kain prilikom analize 73 izolata poreklom iz humanog materijala (n=68) i životne sredine (n=5), a do sličnih rezultata u pogledu procenta nepokretnih sojeva (6,7%) došli su Salerno i saradnici (2010) u studiji koja je obuhvatila 60 izolata poreklom iz vodene sredine (n=17) i uzoraka humanog (n=25) i animalnog materijala (n=18).

5.7 Detekcija histidin dekarboksilazne aktivnosti sojeva *Plesiomonas shigelloides*

Histamin je biogeni amin koji u namirnicama nastaje dekarboksilacijom aminokiseline histidina pod dejstvom brojnih mikroorganizama (Yoshinaga i Frank, 1982; Middlebrooks i sar., 1988; Lopez-Sabater i sar., 1996). Ukoliko se u većim koncentracijama nađe u hrani dolazi do trovanja koja su praćena hipotenzijom, dijarejom, povraćanjem i iritacijom kože (Taylor i sar., 1989).

Do danas je objavljeno nekoliko radova koji potvrđuju produkciju enzima histidin dekarboksilaze od strane sojeva *P. shigelloides*. Lopez-Sabater i saradnici (1996) su u okviru ispitivanja prisustva histidin dekarboksilaza pozitivnih bakterija u uzorcima tune (*Thunnus thynnus*, n=18), palamide (*Sarda sarda*, n=12) i skuše (*Scomber scombrus*, n=15) iz šest maloprodajnih objekata detektovali 64 izolata sa pomenutom sposobnošću među kojima je pet identifikovano kao *P. shigelloides*. Prisustvo histidin dekarboksilaza pozitivnih sojeva *P. shigelloides* detektovano je i prilikom mikrobiološke analize uzoraka ribe *Piaractus mesopotamicus* koji su u cilju praćenja procesa kvarenja čuvani 21 dan na temperaturi od 5°C (Leitão i saradnici, 1997). Podatke u vezi sa procentualnim učešćem histidin dekarboksilaza pozitivnih sojeva *P. shigelloides* iznose Čižnár i saradnici (2004) koji su u okviru ispitivanja potencijalnih faktora virulencije sojeva *P. shigelloides* poreklom iz vodene sredine (n=20), humanog (n=5) i animalnog materijala (n=5) ustanovili datu aktivnost kod 13,3% sojeva. U ovom radu je sposobnost produkcije histamina zabeležena kod 34 soja (91,9%) poreklom iz površinskih voda Panonske nizije.

U cilju detekcije produkcije amina kod bakterija koristi se nekoliko kvalitativnih i kvantitativnih metoda od kojih većina podrazumeva upotrebu različitih diferencijalnih podloga koje u svom sastavu sadrže osnovne komponente (pepton, kvašćev ili mesni ekstrakt, soli i glukoza), indikator bromkrezol purpur i prekursor za sintezu odgovarajuće aminokiseline (Moeller 1954; Niven i sar., 1981; Choudhury i sar., 1990). Kako bi se izbegla greška u interpretaciji rezultata (lažno pozitivan rezultat), za koju pojedini autori navode da je moguća usled dekarboksilacije aminokiselina prisutnih u osnovnom sastavu podloge (Baranowski, 1985; Roig-Sagués i sar., 1997), u ovom radu je vršena paralelna inokulacija sojeva *P. shigelloides* na podloge identičnog sastava sa i bez dodatka histidina.

5.8 Praćenje rasta sojeva *Plesiomonas shigelloides* u podlozi sa različitim koncentracijama NaCl

Brojni izveštaji o izolaciji vrste *P. shigelloides* iz uzoraka brakične i morske vode u priobalnoj zoni (Zakhariev, 1971; Islam i sar., 1991; De Mondino i sar., 1995; Alodova i sar., 1999; Pasquale i Krovacek, 2001) ukazuju da pomenuta vrsta dobro podnosi blago povišene koncentracije NaCl.

Miller i Koburger (1986) su utvrdili da bakterija raste pri koncentracijama NaCl od 0 do 3%, a da tolerancija bakterije na različite koncentracije NaCl varira u zavisnosti od sastava korišćene podloge u slučaju kada je koncentracija NaCl veća od 3%. Pomenuti autori su testirali 40 sojeva poreklom iz vodene sredine (n=9), sedimenata (n=4), humanog (n=5) i animalnog materijala (n=21) kao i referentni soj ATCC14029 i zabeležili odsustvo rasta za sve ispitivane izolate na podlozi tripton bujon sa 4% NaCl. Isti

procenat NaCl u podlozi TSB (tripton soja bujon) nije inhibirao rast ni jednog od ispitivanih sojeva, dok je u prisustvu 5 i 6% NaCl odsustvo rasta zabeleženo kod 35 odnosno 100% izolata. Salerno i saradnici (2010) su u okviru fenotipske karakterizacije 60 izolata *P. shigelloides* poreklom iz vodene sredine (n=17) i uzoraka humanog (n=25) i animalnog materijala (n=18) ustanovili mogućnost rasta za sve ispitivane sojeve na podlozi Peptonska voda koja je sadržala 4% NaCl. Ipak, prisustvo 5% NaCl u istoj podlozi inhibiralo je rast svih ispitivanih sojeva. Isti autori navode da tolerancija vrste *P. shigelloides* na povišene koncentracije NaCl može imati značaja u uspostavljanju ekoloških odnosa sa marinskim vrstama životinja i zauzimanju marinskih niša. U ovom radu su potvrđeni raniji navodi u vezi sa tolerancijom bakterije na prisustvo NaCl u količini od 3%, a rast sojeva *P. shigelloides* praćen je na podlozi LB pri koncentracijama od 4% NaCl, kada je rast detektovan kod 51% sojeva, kao i 5% NaCl kada je zabeleženo odsustvo rasta za sve sojeve *P. shigelloides* poreklom iz površinskih voda Panonske nizije.

5.9 Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva *Plesiomonas shigelloides* na antibiotike

Produkcija β -laktamaza od strane *P. shigelloides* sojeva potvrđena je u većem broju radova. Avison i saradnici (2000) su kod 10 od 20 ispitivanih sojeva poreklom iz humanog materijala (n=11) i životne sredine (n=9) ustanovili ekspresiju odnosno produkciju pomenutog enzima od strane neinducibilnog gena lociranog na bakterijskom hromozomu. Ipak, primenom mikrodilucione metode kod svih dvadeset sojeva je ustanovljena rezistencija na ampicilin i karbenicilin, a budući da su neki od sojeva izolovani pre početka primene pomenutih antibiotika, isti autori pretpostavljaju da rezistencija na β -laktamske antibiotike nije rezultat selektivnog pritiska. Do sličnog zaključka u pogledu rezistencije sojeva *P. shigelloides* na β -laktamske antibiotike došli su i Stock i Wiedemann (2001), nakon ispitivanja antibiotske osetljivosti 74 soja poreklom iz vodene sredine (n=22) i humanog (n=50) i animalnog materijala (n=2). U pomenutom radu korišćena je mikrodiluciona metoda, a rezistencija kod svih sojeva je ustanovljena na peniciline u odsustvu inhibitora β -laktamaza (benzilpenicilin, oksacilin, amoksicilin, piperacilin, mezlocilin, azlocilin i tikarcilin). Sa druge strane, isti autori primećuju dva obrasca kada je u pitanju osetljivost na β -laktamske antibiotike. Tako je jedna grupa sojeva ispoljila pojačanu, a druga značajno smanjenu osetljivost na piperacilin/tazobaktam, aztreonam i veliku većinu ispitivanih cefalosporina. Pored toga, sojevi druge grupe ispoljili su rezistenciju na cefoperazon, ceftazidim i cefepim, pri čemu je veći broj rezistentnih sojeva bio poreklom iz humanog materijala. Bravo i saradnici (2009) su primenom disk difuzione metode ispitivali osetljivost 54 soja poreklom iz fecesa pacijenata sa

dijarealnim sindromom, a najveći procenat rezistentnih sojeva (77,7%) registrovan je prilikom primene ampicilina. Rezistenciju na amoksicilin u kombinaciji sa inhibitorom β -laktamaze, klavulanskom kiselinom, ispoljilo je 7,4% sojeva. Isti autori navode ispoljenu osetljivost svih ispitivanih sojeva na cefalosporine (cefoperazon, ceftriakson i ceftazidim) kao i na β -laktamski antibiotik iz grupe karbapenema, imipenem. U odnosu na rezultate Bravo i saradnika, u ovom radu je istom metodom detektovan veći procenat sojeva rezistentnih na ampicilin (92%), dok rezistencija na amoksicilin u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom nije detektovana. Podudaranje rezultata zapaža se prilikom primene cefalosporina (cefoksitin, cefotaksim, ceftazidim) i imipenema iz grupe karbapenema, budući da je na pomenute antibiotike ustanovljena osetljivost svih sojeva *P. shigelloides* poreklom iz površinskih voda Panonske nizije. Gotovo istovetne rezultate (91,7% rezistentnih sojeva) u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovom radu, a u vezi sa osetljivošću sojeva *P. shigelloides* na ampicilin, zabeležili su Chen i saradnici (2013), primenom disk difuzione metode na 97 izolata bakterije poreklom iz fecesa pacijenata sa dijarealnim sindromom. U istom radu je kod izolata detektovana rezistencija na piperacilin (7,8%), amoksicilin u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom (3,2%), ampicilin u kombinaciji sa sublaktamom (4,4%), zatim na β -laktamske antibiotike iz grupe cefalosporina, cefazolin (16%), cefuroksim (3,3%), ceftazidim (3,1%), cefotaksim (1,1%), cefepim (2,1%) i cefoksitin (6,4%). Međutim, i pored velikog broja ispitanih izolata, rezistencija na imipenem nije ustanovljena, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

Odličnu aktivnost tetraciklina protiv sojeva *P. shigelloides* u *in vitro* uslovima ustanovili su Reinhardt i George (1985), na osnovu čega je tetraciklin u tom periodu predstavljen kao lek izbora za lečenje infekcija izazvanih ovom bakterijom. Međutim, kasnija istraživanja davala su prilično neujednačene rezultate. Kain i Kelly (1989b) su agar dilucionom metodom ustanovili rezistenciju na tetraciklin kod 26% izolata poreklom iz fecesa pacijenata sa dijarealnim sindromom, a 6% sojeva je okarakterisano kao umereno osetljivo. Najveći procenat rezistentnih sojeva na tetraciklin (67%) zabeležili su Wong i saradnici (2000) u okviru kliničkog istraživanja koje je obuhvatilo analizu antibiotske osetljivosti 167 izolata. Osetljivost i umerenu osetljivost svih sojeva na tetracikline (tetraciklin, doksiciklin i minociklin) zabeležili su Stock i Wiedemann (2001) mikrodilucionom metodom u ispitivanju koje je obuhvatilo 74 izolata *P. shigelloides* poreklom iz vodene sredine (n=22) i humanog (n=50) i animalnog materijala (n=2). U ovom radu je disk difuzionom metodom ustanovljena osetljivost na tetracikline (tetraciklin i doksiciklin) kod svih 37 sojeva. Istovetne rezultate u pogledu osetljivosti vodenih izolata *P. shigelloides* na tetracikline navode De Mondino i saradnici (1995) koji su primenom agar dilucione metode ustanovili osetljivost svih 46 sojeva poreklom iz marinskih i slatkovodnih

ekosistema. Ipak, pronalazak *tetA* gena odgovornog za rezistenciju bakterija na tetracikline u genomu soja *P. shigelloides* poreklom iz azijske arovane (*Scleropages formosus*) (Jun i sar., 2011) pokazalo je da determinante rezistencije na pomenuti antibiotik mogu biti prisutne i u nekliničkim izolatima.

Prema rezultatima više studija, osetljivost na antibiotike iz grupe aminoglikozida među sojevima *P. shigelloides* prilično varira. U cilju procene osetljivosti sojeva, od kojih je velika većina bila poreklom iz humanog kliničkog materijala, korišćene su disk difuziona, agar diluciona i mikrodiluciona metoda. Najveća variranja posmatrano za sva istraživanja zabeležena su u slučaju tobramicina (36-97% osetljivih sojeva) (Clark i sar., 1990; Kain i Kelly, 1989b; Stock i Wiedemann, 2001; Tseng i sar., 2002), dok su prilikom ispitivanja dejstva netilmicina dobijeni prilično ujednačeni rezultati (94-100% osetljivih sojeva) (Kain i Kelly, 1989b; Stock i Wiedemann, 2001; Visitsunthorn i Komolpis, 1995). Prema navodima autora, od 54 do 99% testiranih sojeva bilo je osetljivo na amikacin (Chen i sar., 2013; Stock i Wiedemann, 2001; Bravo i sar., 2009), dok je osetljivost na gentamicin ispoljilo između 63 i 100% izolata (Chen i sar., 2013; Stock i Wiedemann, 2001). Marshall i saradnici (1996) su kod pet sojeva *P. shigelloides* izolovanih iz homogenizata plave krabe (*Callinectes sapidus*), ustanovili rezistenciju na kanamicin i streptomycin pri čemu su dokazali da je rezistencija na streptomycin bila posredovana plazmidom. U ovom radu je disk difuzionom metodom ustanovljena osetljivost na streptomycin i tobramicin kod svih ispitivanih sojeva, a isti rezultat zabeležen je i u slučaju netilmicina, što je u saglasnosti sa navodima drugih autora. Pored toga, zastupljenost sojeva poreklom iz površinskih voda Panonske nizije osetljivih na kanamicin, gentamicin i amikacin u okviru su vrednosti dobijenih u ranijim studijama. Sa druge strane, nizak procenat osetljivih sojeva na neomicin koji je zabeležen u ovom radu, u suprotnosti je sa navodima Miller i Koburger (1985c) koji su na osnovu sumiranih rezultata više studija okarakterisali bakteriju kao osetljivu na pomenuti antibiotik.

Prema podacima dostupnim u literaturi, rezistencija na ciprofloksacin među sojevima *P. shigelloides* je retka i po pravilu se javlja kod humanih kliničkih izolata. Chen i saradnici (2013) su disk difuzionom metodom ustanovili rezistenciju na pomenuti antibiotik kod 9% sojeva (n=97) poreklom iz fecesa i krvi obolelih pacijenata. U ovom radu je primenom disk difuzione metode ustanovljena osetljivost na ciprofloksacin kod svih 37 sojeva *P. shigelloides*, a istovetne rezultate navode Matsuyama i saradnici (2015) koji su primenom mikrodilucione metode zabeležili osetljivost na pomenuti antibiotik kod svih sojeva *P. shigelloides* (n=33) izolovanih iz fecesa velikog kormorana (*Phalacrocorax carbo hanedae*).

Prema rezultatima više studija, procentualna zastupljenost sojeva *P. shigelloides* koji su osetljivi na hloramfenikol kreće se u rasponu od 82 do 100%, pri čemu je rezistencija detektovana jedino kod

sojeva poreklom iz humanog kliničkog materijala (Tseng i sar., 2002; Wong i sar., 2000; Stock i Wiedemann, 2001; Matsuyama i sar., 2015). Rezultati ovog rada su u saglasnosti sa ranijim navodima budući da među ispitivanim sojevima nije zabeležena rezistencija na pomenuti antibiotik.

Osetljivost sojeva *P. shigelloides* na Trimetoprim/Sulfametoksazol veoma varira (Janda, 2016). Najveći procenat rezistentnih sojeva (44,3%) zabeležili su Chen i saradnici (2013), primenom disk difuzione metode na 97 izolata bakterije poreklom iz fecesa pacijenata sa dijarealnim sindromom. Međutim, da velika učestalost rezistencije na pomenuti antibiotik među humanim kliničkim izolatima nije pravilo, pokazali su Bravo i saradnici (2009), kada je na uzorku od 54 soja poreklom iz fecesa osetljivost ustanovljena kod 98,2% sojeva. Slično tome, osetljivost na Trimetoprim/sulfametoksazol zabeležena je kod svih 37 sojeva poreklom iz površinskih voda Panonske nizije.

5.10 Izolacija bakteriofaga

U ovom radu je predstavljena prva izolacija bakteriofaga specifičnih za vrstu *P. shigelloides*. Fagi su izolovani iz 31,3% uzoraka, što je značajan procenat ako se uzme u obzir činjenica da se bakterija *P. shigelloides* češće izoluje u subtropskim i tropskim klimatskim regionima.

Izolacija bakteriofaga specifičnih za vrste koje pokazuju izvesnu filogenetsku bliskost sa bakterijom *P. shigelloides* bila je predmet više studija. Tako su Chow i Rouf (1983) iz uzorka otpadne vode grada Oshkosh (Viskonsin, SAD) izolovali dva bakteriofaga primenom agar overlay metode i korišćenjem dva soja *Aeromonas hydrophila* kao domaćina. Paterson i saradnici (1969) su primenom agar overlay metode ustanovili prisustvo bakteriofaga specifičnih za vrstu *Aeromonas salmonicida* u 37 od 54 uzoraka vode i mulja (68,5%) poreklom iz više jezera i mrestilišta pastrmke u južnom Ontariju. Uspešnu izolaciju bakteriofaga specifičnog za pomenutu vrstu prijavili su i Kim i saradnici (2010) prilikom analize koja je podrazumevala obogaćenje uzoraka rečne vode (90 mL) (reka Han, Južna Koreja) i primenu agar overlay metode. U cilju izolacije *Vibrio harveyi* specifičnih bakteriofaga i njihove potencijalne primene u regulaciji brojnosti pomenute bakterije, Crothers-Stomps i saradnici (2010) su analizirali 21 uzorak vode poreklom iz uzgajališta jastoga (*Panulirus ornatus*) na severoistoku Kvinslenda (Australija). Uzorci su prethodno obogaćeni, nakon čega je primenom spot metode iz osam uzoraka (38,1%) izolovano osam bakteriofaga. Veliki uspeh u izolaciji bakteriofaga specifičnih za vrstu *Vibrio harveyi* zabeležili su Surekhamol i saradnici (2013) prilikom analize šest uzoraka vode i dva uzorka sedimenta poreklom sa farmi škampa u Indiji. Svi uzorci su prethodno obogaćeni nakon čega je primenom agar overlay metode ukupno izolovano 33 bakteriofaga. U cilju izolacije *Vibrio cholerae*

specifičnih bakteriofaga Maina i saradnici (2013) su analizirali uzorke vode (50 mL) različitog porekla (otpadna voda, voda bunara, reka, bara i jezera) u oblasti jezera Viktorija u Keniji. Tom prilikom primenjene su agar overlay i spot metoda kao i zasejavanje iscrpljivanjem, pri čemu su svi uzorci prethodno bili obogaćeni. Prisustvo pomenutih virusa detektovano je u deset od ukupno 42 uzorka (23,8%), pri čemu je najveći procenat pozitivnih uzoraka bio poreklom iz otpadnih voda. Al-Fendi i saradnici (2014) su primenom spot i agar overlay metode uz prethodno obogaćenje izolovali 11 *Vibrio cholerae* specifičnih bakteriofaga iz 75 uzoraka vode (14,7%) različitog porekla (bare, reke, jezera, ribnjaci i otpadne vode) na teritoriji Malezije. Prema navodima istih autora, najveći uspeh u izolaciji zabeležen je prilikom obrade uzoraka otpadnih voda (28,6 pozitivnih uzoraka), dok je najmanje pozitivnih uzoraka zabeleženo prilikom izolacije faga iz uzoraka vode sa ribljih farmi (11,8 pozitivnih uzoraka). Prisustvo *Proteus* specifičnih faga u uzorcima otpadnih voda ustanovili su Schmidt i Jeffries (1973) kada je izolovano 18 bakteriofaga tehnikom obogaćenja i primenom agar overlay metode na četiri uzorka komunalnih otpadnih voda grada Detroita (SAD). Prilikom analize autori su kao domaćine koristili *P. mirabilis*, *P. morgani*, *P. vulgaris* i *P. rettgeri* sojeve. Uspešnu izolaciju bakteriofaga specifičnog za vrstu *P. vulgaris* prijavili su i Zhilenkov i saradnici (2006) prilikom analize uzoraka otpadnih voda (10 mL) grada Moskve. Uzorci su kao i u prethodnom slučaju prethodno bili obogaćeni nakon čega je primenjena agar overlay metoda.

Za razliku od većine navedenih studija u kojima je primenjena tehnika obogaćenja, u ovom radu je u cilju izolacije *P. shigelloides* specifičnih bakteriofaga veliki broj uzoraka direktno zasejavan u zapremini od 50 mL *single layer* metodom. I pored toga obavljena je uspešna izolacija virusa, što ukazuje da su *P. shigelloides* specifični bakteriofagi zastupljeni u značajnom broju u vodenim sredinama umerenog klimatskog područja. Sa druge strane, evidentna je sličnost sa rezultatima navedenih studija kada se posmatra uspeh izolacije virusa i poreklo uzoraka budući da je velika većina izolovanih virusa u okviru ovog istraživanja poreklom iz uzoraka otpadnih voda.

5.11 Utvrđivanje litičkog spektra bakteriofaga

Iako bakteriofagi imaju ogroman uticaj na brojnost bakterija, njihov litički spektar je najčešće ograničen na jednu bakterijsku vrstu ili neretko na svega nekoliko sojeva unutar te vrste bakterija (Hyman i Abedon, 2010). Bakteriofagi širokog litičkog spektra različito se definišu od strane različitih autora. Tako jedan broj autora opisuje pomenuto svojstvo kao sposobnost bakteriofaga da inficiraju više

bakterijskih vrsta (Greene i Goldberg, 1985; Uchiyama i sar., 2008; Mirzaei i Nilsson, 2015; Yu i sar., 2016), dok drugi autori bakteriofagima širokog litičkog spektra smatraju bakterijske viruse koji inficiraju više sojeva unutar jedne vrste bakterija (Vinod i sar., 2006; Gupta i Prasad, 2010; Anand i sar., 2015). Pored toga, u upotrebi je i termin polivalentni fagi koji se često poistovećuje sa terminom bakteriofagi širokog litičkog spektra iako je prvobitno osmišljen kako bi definisao fage koji uspešno inficiraju različite rodove bakterija (Ackermann i Dubow, 1987). Bez obzira na to koji termin se koristi i dalje ne postoji jedinstveno gledište o tome koji broj bakterijskih sojeva odnosno vrsta je potrebno da bakteriofag inficira da bi se mogao smatrati bakterijskim virusom širokog litičkog spektra (Ross i sar., 2016).

Još jedan problem u vezi sa definisanjem odnosno određivanjem litičkog spektra izolovanih bakteriofaga proizilazi iz činjenice da rezultati mogu da variraju u zavisnosti od primenjene metode (Hyman i Abedon, 2010). Tako je moguće da prilikom izvođenja analiza metodom plaka, nakon perioda inkubacije i pored uspešne infekcije bakterije od strane bakteriofaga, plake ne budu vidljive usled malog broja oslobođenih viriona (Ross i sar., 2016). Jedna od najčešće korišćenih metoda je tzv. spot metoda koja je korišćena i u ovom radu prilikom preliminarnih analiza izolovanih bakteriofaga. Metoda je jednostavna i brza, međutim preciznost metode može biti sporna budući da je bakterijska liza moguća i usled prisustva rezidua endolizina i bakteriocina u prečišćenoj suspenziji faga kao i usled adsorpcije velikog broja faga za površinu bakterijske ćelije (Abedon, 2011, Mirzaei i Nilsson, 2015).

U ovom radu određivanje litičkog spektra je obavljeno spot metodom, a procenat liziranih sojeva *P. shigelloides* (37 sojeva izolovanih u okviru rada i 2 referentna soja) kretao se u rasponu od 71,8% (fag Psh-10) do 20,5% (fag Psh-PP1). Kod ispitivanih bakteriofaga nije zabeležena polivalentnost odnosno mogućnost infekcije drugih rodova bakterija (*Aeromonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Bordetella*, *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*). Odsustvo polivalentnosti i širok litički spektar prema sojevima *P. shigelloides*, svrstava izolovane bakteriofage u dobre kandidate za eventualnu primenu u kontroli brojnosti ove bakterije.

Mogućnost infekcije više različitih vrsta odnosno rodova bakterija od strane faga specifičnih za vrste koje pokazuju izvesnu filogenetsku bliskost sa bakterijom *P. shigelloides* ispitivana je u više radova. Za razliku od rezultata prikazanih u ovom radu, Surekhamol i saradnici (2013) su za šest bakteriofaga izolovanih na sojevima *Vibrio harveyi* spot metodom ustanovili mogućnost infekcije sojeva iz roda *Aeromonas* kao i više sojeva različitih vrsta u okviru roda *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*). Slično tome, Crothers-Stomps i saradnici (2010) su nakon dodavanja suspenzije bakteriofaga izolovanih na sojevima *V. harveyi* ustanovili lizu bakterijskih ćelija kada su kao domaćini korišćeni sojevi *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus* i *V. parahaemolyticus*. Širok litički

spektar bakteriofaga phiAS5 koji je izolovan na soju *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* AS01 zabeležili su Kim i saradnici (2012) u okviru analize kojom je ispitivana mogućnost infekcije više predstavnika rodova *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vibrio*, *Staphylococcus* i *Listeria*. Pomenuto svojstvo, autori su zabeležili na sojevima *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, *Aeromonas salmonicida subsp. masoucida*, *Aeromonas hydrophila* i *Aeromonas sobria*.

Litički spektar bakteriofaga ograničen isključivo na sojeve bakterije *Vibrio cholerae*, ustanovili su Al-Fendi i saradnici (2014) nakon analize spot metodom koja je pored pomenutih sojeva obuhvatila sojeve 15 različitih vrsta bakterija (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *P. vulgaris*, *P. mirabillis*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *M. morgani*, *S. marcescens*, *Y. enterocolitica* i *E. faecalis*). Uzak litički spektar, odnosno visoku specifičnost bakteriofaga izolovanog na soju *V. harveyi* uočili su i Vinod i saradnici (2006) kada je pojava lize, praćena na sojevima *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* i *V. vulnificus*, zabeležena jedino na *V. harveyi* sojevima.

5.12 Karakterizacija odabranih bakteriofaga

Tri bakteriofaga, sa oznakama Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1, koja su izolovana iz uzoraka poreklom sa različitih lokaliteta i kod kojih su uočene razlike u veličini i opisu plaka kao i razlike u litičkom spektru, odabrano je za detaljniju karakterizaciju.

Jedan od mogućih načina ispitivanja fenomena lize bakterijskih ćelija od strane bakteriofaga zasniva se na izvođenju testa tokom kojeg se prati promena optičke gustine medijuma nakon indukcije profaga ili inficiranja ćelija bakterija. U ovom radu vrednosti optičkih gustina varirale su različito u zavisnosti od multipliciteta infekcije za sva tri ispitivana virusa. Očekivano, najveće i najmanje vrednosti optičkih gustina zabeležene su pri najmanjem (MOI=1) odnosno najvećem multiplicitetu infekcije (MOI=100). Prilikom ispitivanja litičke efikasnosti virusa Psh-10 i Psh-AB1 uočene su bliske OD vrednosti, koje su u odnosu na vrednosti dobijene prilikom ispitivanja efikasnosti lize bakteriofaga Psh-PP1 bile niže, pa bi se moglo zaključiti da fagi Psh-10 i Psh-AB1 efikasnije liziraju sojeve *P. shigelloides* na kojima su izolovani. Nakon pada vrednosti optičkih gustina koji se javio kao posledica lize bakterijskih ćelija, u sva tri testa uočeno je povećanje turbiditeta medijuma. Isti obrazac zabeležili su Morita i saradnici (2002) prilikom ispitivanja efikasnosti lize enterohemoragične *E.coli* serogrupe O157:H7 od strane bakteriofaga PP01. Ponovno uvećanje broja ćelija pomenute bakterije u medijumu, koje se očituje

povećanjem OD vrednosti, posledica je mutacije gena odgovornog za sintezu površinskog receptora ćelije za koji se virus vezuje (Hashemolhosseini i sar., 1994). Naredna istraživanja mogla bi da pokažu da li su mutacije odnosno gubitak ili promena receptora na površini ćelija uzrok opisane pojave i u slučaju vrste *P. shigelloides*.

Young (1992) navodi da su prilikom interpretacije rezultata dobijenih nakon lize bakterijskih ćelija i merenja turbiditeta podloge u kojima se test izvodi moguće greške, a kao razloge navodi razlike u mehanizmima lize ćelijskih zidova bakterija od strane enzima faga. Isti autor navodi primer potpunog razaranja ćelijskog zida bakterije praćenog taloženjem ostataka ćelija, kakav je slučaj prilikom infekcije *E. coli* fagom λ , i primer postepenog pražnjenja ćelijskog sadržaja bez značajnog narušavanja oblika ćelija pri pojačanoj ekspresiji *E* gena bakteriofaga ϕ X174 prilikom infekcije iste bakterije. Za potpuno razaranje ćelijskog zida bakterija koje se odvija i nakon oslobađanja viriona iz ćelije domaćina odgovorni su virusni endolizini i proteini koji raskidaju veze i narušavaju stabilnost peptidoglikana. Sa druge strane, za *E* protein bakteriofaga ϕ X174 je utvrđeno da sprečava sintezu ćelijskog zida bakterije kao i da je odgovoran za nastanak struktura koje su u vezi sa slojem peptidoglikana i za koje Witte i saradnici (1990) pretpostavljaju da predstavljaju oligomerne transmembranske tunele. U prilog ovoj tezi idu i rezultati fazno kontrastne mikroskopije koji su pokazali da prilikom infekcije fagom ϕ X174 peptidoglikanski sloj ćelijskog zida bakterija trpi manja oštećenja i da zadržava svoj oblik (Young i sar., 2000).

Analiza efikasnosti stvaranja plaka (*EOP*) za viruse Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 na sojevima *P. shigelloides* poreklom iz površinskih voda Panonske nizije potvrdila je rezultate dobijene spot metodom. Iako su za većinu bakterija dobijene niske vrednosti *EOP*-a, pojedinačne plake zabeležene su u slučaju svih ispitivanih domaćina kod kojih su nakon spot metode uočene zone lize. Za viruse Psh-AB1 i Psh-PP1 ustanovljena je veća infektivnost odnosno veći broj plaka na domaćinima koji nisu korišćeni prilikom njihove izolacije. Varijabilnost u broju plaka istog virusa na različitim sojevima, Mirzaei i Nilsson (2015) objašnjavaju rezistencijom bakterija na transkripcionom nivou odnosno postojanjem restrikciono modifikacionih, abortivnih i CRISPR-Cas sistema kod bakterija koji u većoj ili manjoj meri sprečavaju uspešnu virusnu infekciju.

Prilikom analize uticaja različitih temperatura (8°C, 22°C, 37°C i 44°C) na stepen adsorpcije bakteriofaga PSh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 za površine ćelija originalnih domaćina uočene su manje razlike u procentu adsorbovanih faga kako među ispitivanim virusima tako i u okviru različitih temperaturnih tretmana istog virusa. Capra i saradnici (2006) su prilikom ispitivanja efekta više sredinskih faktora na vijabilnost i proces adsorpcije faga specifičnih za vrste *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus paracasei*

pokazali da stepen adsorpcije pri različitim temperaturama može značajno varirati. Tako je u slučaju faga J-1 procenat adsorbovanih čestica varirao u širokom opsegu (57-97%) kada je proces praćen pri temperaturama od 0, 10, 20, 30, 37, 45 i 50°C, pri čemu je značajan pad zabeležen već pri temperaturama od 10 odnosno 45°C. Pad procentualne zastupljenosti adsorbovanih faga pri nižim temperaturama od optimalne za rast bakterije domaćina zabeležili su i Knežević i saradnici (2011) u okviru studije koja je ispitala uticaj sredinskih faktora na proces adsorpcije i inaktivacije faga karakterističnih za vrstu *P. aeruginosa*. Zavisnost između broja adsorbovanih viriona i temperature na kojoj se proces odvijao (7, 18, 26, 37 i 44°C) tada je ustanovljena kod tri od ukupno četiri ispitivana virusa. U ovom radu zabeležen je relativno nizak procenat adsorbovanih faga na svim temperaturama. Jedan od mogućih razloga je odsustvo jona kalcijuma za koje je dokazano da kao dodatak u podlozi značajno pospešuju vezivanje faga za receptore na površini bakterijskih ćelija (Havelaar i Hogeboom, 1983; Jamal i sar., 2015). Pored toga, na stepen adsorpcije u manjoj meri mogu da utiču i fagi koji sporije adheriraju za ćelijske površine. Heterogenost faga u smislu postojanja frakcije u ukupnoj populaciji koja ispoljava sporije vezivanje ili potpuno odsustvo vezivanja za receptore na ćelijskom zidu bakterija, prvi je ustanovio Schlesinger (1932). Rezidualnu frakciju, kako ju je označio Schlesinger, čine fagi sa defektom koji je najverovatnije ograničen na antireceptorski deo (Gallet i sar., 2012; Steensma 1982; Storms i Sauvageau, 2014).

Uticaj aciditeta sredine na vijabilnost bakteriofaga ispitivan je u brojnim studijama. Iako se u literaturi mogu pronaći podaci vezani za uspešnu izolaciju bakteriofaga iz pojedinih fermentisanih proizvoda (Barrangou i sar., 2002; Lu i sar., 2003b) i alkalnih sredina (Yu i sar., 2005), rezultati brojnih studija ukazuju da je većina do sada izolovanih faga vijabilna u rasponu od pH5 do pH9 (King i sar., 2012). Sharp i saradnici (1946) su ispitali vijabilnost bakteriofaga T2 pri različitim pH vrednostima (2 – 11) u trajanju od jednog časa, 24 časa i četiri nedelje. Prema rezultatima istraživanja čak 50% viriona je zadržalo infektivnost u širem pH opsegu (5-9) nakon dve nedelje od početka eksperimenta. Isti autori uočili su skoro trenutnu koagulaciju viriona pri pH2 kao i njihovu postepenu precipitaciju pri pH3 i pH4. Studija koja je ispitala vijabilnost bakteriofaga T4 u pH opsegu od 1,1 do 9,2 u trajanju od jednog časa pokazala je smanjenje titra za približno 50% pri pH 9,2, dok je pri pH4 i nižim vrednostima ustanovljeno potpuno odsustvo vijabilnosti faga (Kłak i sar., 2010). Jepson i March (2004) su prilikom ispitivanja vijabilnosti bakteriofaga λ u pH opsegu od 2 do 14 u trajanju od 24 časa ustanovili odsustvo infektivnosti za sve virione koji su bili izloženi pH vrednosti od 2 odnosno pH intervalu od 11,8 do 14. Slično tome, rezultati ovog rada ukazuju da bakteriofagi Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1, specifični za vrstu *P. shigelloides*,

zadržavaju infektivnost u toku jednog časa u širokom opsegu pH vrednosti, što može biti od velikog značaja sa aspekta njihove potencijalne primene u terapijske svrhe.

Termalna inaktivacija bakteriofaga bila je predmet brojnih studija koje su pokazale različitu stabilnost bakteriofaga u uslovima povišene temperature. Tako su Bryner i saradnici (1970) prilikom karakterizacije bakteriofaga specifičnih za vrstu *Vibrio fetus* ustanovili da temperatura od 60°C inaktivira sve virione u suspenziji već nakon 10 minuta inkubacije. Sa druge strane, otpornost na visoke temperature i očuvanu vijabilnost u temperaturnom opsegu od 25 do 65°C u trajanju od jednog časa, prijavili su Nurhafizah i saradnici (2017) prilikom karakterizacije bakteriofaga karakterističnih za vrstu *Vibrio harveyi*. Ispitivanje uticaja visokih temperatura na vijabilnost bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 u ovom radu pokazalo je da pri blago povišenoj temperaturi (40°C) u odnosu na optimalnu temperaturu rasta vrste *P. shigelloides*, vijabilnost u najvećoj meri zadržava fag sa oznakom Psh-PP1, dok su pri višim temperaturama (50 i 60°C) najstabilniji bili virioni bakteriofaga Psh-10. Ipak, za sva tri virusa utvrđeno je odsustvo vijabilnosti nakon jednog časa inkubacije na temperaturi od 60°C.

Analiza parametara multiplikacije bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 pokazala je približno isto vreme trajanja latentnog perioda za sva tri bakteriofaga (~30 min). Bakteriofagi Psh-10 i Psh-AB1 odlikovali su se znatno većim brojem oslobođenih viriona (220 - 240) u odnosu na bakteriofag Psh-PP1 (10). Sličnost između faga Psh-10 i Psh-AB1 uočena je i kod parametra trajanja ciklusa multiplikacije (~120 min) koje je bilo kraće u odnosu na vreme umnožavanja virusa Psh-PP1 (~150 min). Brzina multiplikacije bakteriofaga varira u zavisnosti od brzine adsorpcije, hemijskog sastava sredine u kojoj se odvija, broja oslobođenih viriona, trajanja latentnog perioda kao i njihove sposobnosti da prevaziđu odbrambene mehanizme bakterije (Abedon i Thomas-Abedon, 2010). Müller-Merbach i saradnici (2007) su ustanovili zavisnost između dužine latentnog perioda i broja oslobođenih viriona sa jedne i temperature, pH vrednosti i tipa podloge sa druge strane. U pomenutoj studiji blago povećanje temperature (za 5°C) i smanjenje pH vrednosti medijuma (za 1,6 log jedinice) dovelo je do povećanja broja oslobođenih viriona i skraćanja latentnog perioda za bakteriofag P008 specifičan za vrstu *Lactococcus lactis*. Ipak i pored mogućnosti modulacije procesa, među istraživačima još uvek ne postoji jedinstveno mišljenje o tome koji broj oslobođenih virusa i koje vreme latentnog perioda bi bilo optimalno za eventualnu primenu faga u terapijske svrhe (Ahmadi i sar., 2016).

Upotrebom transmisiona elektronske mikroskopije ustanovljeno je da bakteriofagi Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 poseduju izometrične kapside sa kratkim strukturama nalik repu. Na osnovu morfologije, opisani virusi mogu biti svrstani u familiju *Podoviridae* u okviru reda *Caudovirales*, u kojem se prema devetom izveštaju Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa nalazi najveći broj izolovanih

bakteriofaga (King i sar., 2012). Dimenzije izometričnih kapsida pomenute grupe virusa kreću se u rasponu od 45 do 170 nm, dok dimenzije strukture označene kao rep za viruse familije *Podoviridae* iznose oko 20 x 8 nm (King i sar., 2012). U ovom radu, u slučaju virusa Psh-PP1 uočene su nešto manje dimenzije kako kapsida ($41,3 \pm 1,4$) tako i repa ($11,4 \pm 2,1 \times 9,1 \pm 1$), dok su dimenzije faga Psh-10 i Psh-AB1 bile u opsegu vrednosti do sada opisanih virusa familije *Podoviridae*.

Na osnovu podataka dobijenih nakon restrikcione digestije virusnih nukleinskih kiselina, veličine genoma bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 procenjene su na približno 35 kbp, pri čemu je u slučaju virusa Psh-10 i Psh-AB1 zabeležen identičan raspored i broj traka, što može da ukazuje na veliku sličnost faga bez obzira na različito geografsko poreklo uzoraka iz kojih je izolacija obavljena (Boulé i sar., 2011). Kada se uporede veličine genoma tipskih predstavnika bakteriofaga iz familije *Podoviridae* opisanih u devetom izveštaju Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa sa genomima bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1, uočava se da velika većina tipskih predstavnika poseduje veće genome. Izuzetak su bakteriofagi subfamilije *Picovirinae* specifični za vrste *Staphylococcus aureus* (44AHJD) i *Bacillus subtilis* (phi29) kod kojih procenjena veličina genoma iznosi između 16 i 20 kb (King i sar., 2012).

Analiza strukturnih proteina bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 metodom SDS-PAGE pokazala je velike sličnosti u broju ($n=12, 10$ i 14) i rasporedu traka, naročito u slučaju faga Psh-10 i Psh-AB1. Kod sva tri virusa detektovani su glavni proteini sa istim ili veoma bliskim vrednostima molekulske mase (~ 37 kDa, ~ 29 kDa i ~ 22 kDa). Prema izveštaju Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa iz 2012. godine broj strukturnih proteina među tipskim predstavnicima faga familije *Podoviridae* varira između 6 (*Salmonella* fag *epsilon15*) i 49 (*Bordetella* fag *BPP-1*), pri čemu je strukturni protein sa najvećom molekulskom masom ustanovljen kod virusa *SP6* specifičnog za vrstu *Salmonella typhimurium* (150 kDa), dok je protein najmanje molekulske mase (12,2 kDa) detektovan kod faga *epsilon 15* koji inficira više vrsta roda *Salmonella* (King i sar., 2012). Bakteriofagi opisani u ovom radu najveću sličnost u pogledu broja strukturnih proteina imaju sa fagima *N4* i *PhiEco32* ($n=10$) specifičnim za vrstu *E. coli*, dok je najveća sličnost u molekulskoj masi najzastupljenijeg proteina viriona uočena sa virusom *epsilon15* (36,8 kDa) koji inficira više vrsta roda *Salmonella* (King i sar., 2012).

5.13 Detekcija izolovanih bakteriofaga protočnom citometrijom

U ovom radu je korišćenjem protočnog citometra obavljena uspešna detekcija bakteriofaga specifičnih za vrstu *P. shigelloides*. Mogućnost detekcije predstavnika više virusnih familija

(*Baculoviridae*, *Herpesviridae*, *Myoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Picornaviridae*, *Podoviridae*, *Retroviridae* i *Siphoviridae*) pomenutom metodom ispitivali su Brussaard i saradnici (2000). Pozitivni rezultati zabeleženi su u slučaju svih virusa koji su genetički materijal imali u formi DNK i veličinu genoma između 48,5 i 300 kb, dok je limit detekcije uočen pri analizi virusa sa manjim genomima (7.4-14.5 kb) i nukleinskim materijalom u obliku RNK (HIV-1, PV-1 i ISAV). Bremner i saradnici (2016) su u okviru ispitivanja interspecijske kompeticije bakteriofaga T7 i T4, a u cilju određivanja brojnosti viriona takođe uspešno primenili metodu protočne citometrije. Kako su veličine genoma bakteriofaga T7 i bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 približno jednake, rezultati ovog rada mogli bi da budu još jedna potvrda uspešnosti metode detekcije za viruse sa sličnim brojem baznih parova u okviru genoma. Prema Brussaard i saradnicima (2000) protočna citometrija trenutno važi za najbrži i najprecizniji način detekcije i kvantifikacije virusnih čestica kada su u pitanju direktne metode i veliki broj virusa različite morfologije, različitih tipova i veličine genoma na ovaj način mogu biti detektovani. Međutim, kao i kod ostalih direktnih metoda glavni nedostatak protočne citometrije jeste nemogućnost razlikovanja vijabilnih od inaktivisanih viriona, tako da metode bazirane na propagaciji (metod plaka i MPN metod) i dalje ostaju nezamenjive prilikom određivanja brojnosti bakterijskih virusa.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu utvrđena je prevalenca bakterijske vrste *Plesiomonas shigelloides* u površinskim vodama na teritoriji Panonske nizije. Sa ukupno 28 lokaliteta analiziran je 51 uzorak od kojih je 22 bilo pozitivno na prisustvo ove vrste bakterije. Izolovano je ukupno 37 sojeva, a na osnovu dobijenih rezultata ispitivanjem genotipskih i fenotipskih svojstava ove bakterije izvedeni su sledeći zaključci:

- i. RAPD PCR analiza je ukazala je na značajnu genetičku varijabilnost izolovanih sojeva *P. shigelloides* do tog nivoa da klonalna identičnost nije registrovana ni među izolatima iz istog uzorka.
- ii. Izolovani sojevi vrste *P. shigelloides* nisu pokazali sposobnost stvaranja biofilma na površinama od polistirena, dok je slaba produkcija zabeležena na površinama od borosilikata i manifestuje se u pojavi prstena na granici tečne i gasovite faze kod 54% izolata.
- iii. Sposobnost potpune hemolize ovčijih eritrocita su pokazali svi ispitivani sojevi *P. shigelloides*. Prisustvo hemolitičkog agensa potvrđeno je u ćelijskoj suspenziji i supernatantu, pri čemu je u toku 24 časa veći procenat hemoliziranih eritrocita ustanovljen u tretmanima sa supernatantom. Ovakav nalaz ukazuje na potencijalno patogena svojstva izolovanih sojeva budući da prisustvo hemolizina povećava invazivnost bakterijskih ćelija.
- iv. Lipazna aktivnost potvrđena je kod 13,5% ispitivanih sojeva, dok je mogućnost hidrolize DNK ustanovljena kod svih ispitivanih sojeva *P. shigelloides* poreklom iz površinskih voda Panonske nizije
- v. Pokretljivost je ustanovljena za sve sojeve *P. shigelloides*, a rezultati ispitivanja stepena pokretljivosti ukazali su da među ispitivanim izolatima postoji velika varijabilnost.
- vi. Sposobnost produkcije histamina zabeležena je kod 91,9% sojeva *P. shigelloides* poreklom iz površinskih voda Panonske nizije.
- vii. Ispitivanje uticaja povećanih koncentracija NaCl na rast rast ćelija *P. shigelloides* pokazalo je da su svi ispitivani izolati nehalofili odnosno ni jedan soj nije ispoljio sposobnost rasta pri koncentraciji većoj od 1M NaCl
- viii. Rezistencija sojeva *P. shigelloides* zabeležena je prema antibioticima iz grupe penicilina (92% rezistentnih sojeva na ampicilin i 27% rezistentnih sojeva na amoksicilin) i aminoglikozida (2,7% rezistentnih sojeva na gentamicin). Svi ispitivani sojevi bili su osetljivi na antibiotike:

cefoksitin, cefotaksim, ceftazidim, imipenem, streptomycin, tetraciklin, doksiciklin, aztreonam, ciprofloksacin, trimetoprim/sulfametoksazol i hloramfenikol, te bi pomenuti antibiotici mogli biti lekovi izbora prilikom tretiranja infekcija izazvanih sojevima vrste *P. shigelloides*.

- ix. prema dostupnim literaturnim podacima ovo su prvi rezultati koji se odnose na izolaciju bakterija *Plesiomonas shigelloides* iz površinskih voda Panonske nizije. Oni predstavljaju važan doprinos u poznavanju rasprostranjenja ove bakterije u površinskim vodama umerenog klimatskog pojasa
- x. dobijeni rezultati ukazuju da bi bakterija *P.shigelloides* mogla biti šire rasprostranjena u odnosu na dosadašnja saznanja i da je stoga ne treba posmatrati isključivo kao tropsku ili subtropsku vrstu već bi njeno šire rasprostranjenje trebalo sagledavati kao jednu od posledica globalnog zagrevanja
- xi. sličnost simptoma akutnih bolesti koje izaziva *P. shigelloides* sa gastrointestinalnim infekcijama izazvanim *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* i drugim bakterijama familije *Enterobacteriaceae* često vodi ka dijagnostičkim greškama, te su zbog toga potrebna detaljnija istraživanja sa ciljem realnije procene značaja ove bakterije kao uzročnika gastrointestinalnih bolesti i utvrđivanja mogućeg mikrobiološkog rizika po zdravlje ljudi u umereno klimatskom pojasu

U ovom radu su po prvi put izolovani *Plesiomonas shigelloides* specifični fagi. Četiri soja bakterije *P. shigelloides* izolovanih u ovom radu korišćeni su kao domaćini za izolaciju ukupno 25 specifičnih faga iz uzoraka vode Dunava. Izolacija bakteriofaga je bila najuspešnija na mestu izlivanja komunalnih otpadnih voda, dok su svega dva pozitivna uzorka zabeležena iz rečne vode. Komunalne otpadne vode su se pokazale kao značajan izvor ovih virusa, dok bi učestalost u površinskim vodama trebalo dalje istražiti. Na osnovu dobijenih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljevima mogu se izvesti sledeći zaključci:

- i. Litički spektar svih devet prečišćenih bakteriofaga na homolognim domaćinima je širok jer su inficirali 74,4% sojeva *P. shigelloides* koji su u ovom radu izolovanih iz površinskih voda južnog dela Panonske nizije, a sposobnost lize pojedinačnih faga kretala se od 20,5% do 71,8%
- ii. Ispitivanih devet bakteriofaga nisu polivalentni, odnosno nisu pokazali sposobnost infekcije heterolognih domaćina kao što su bakterijski sojevi iz rodova *Aeromonas*, *Escherichia*,

Klebsiella, *Yersinia*, *Bordetella*, *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* što bi moglo da ukaže na uski litički spektar ove grupe faga.

iii. Tri bakteriofaga, sa oznakama Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1, izolovana sa različitih lokaliteta i kod kojih su uočene razlike u veličini i opisu plaka kao i razlike u litičkom spektru, su izabrana za detaljniju karakterizaciju i oni su *in vitro* uslovima pokazali sledeće osobine:

a. Bakteriofagi Psh-10 i Psh-AB1 su u većoj meri lizirali ćelije *P. shigelloides* u odnosu na fag Psh-PP1 pa samim tim predstavljaju pogodnije kandidate za primenu u terapeutske svrhe

b. Sva tri bakteriofaga su na većini ispitivanih domaćina/sojeva *P. shigelloides* pokazali niske vrednosti efikasnosti stvaranja plaka EOP-a ($\sim 10^{-5} - 10^{-1}$).

c. Različiti temperaturni tretmani (8°C, 22°C, 37°C i 44°C) su neznatno uticali na stepen adsorpcije bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 za površine ćelija originalnih domaćina. Uočene su male razlike u procentu adsorbovanih faga kako među ispitivanim virusima tako i u okviru različitih temperaturnih tretmana istog virusa. Na svim ispitivanim temperaturama registrovan je relativno nizak procenat adsorbovanih faga koji je iznosio manje od 60%.

d. Bakteriofagi Psh-10 i Psh-PP1 zadržavaju visok procenat vijabilnosti (>90%) u širokom pH opsegu (pH4 – pH11) u toku 60 minuta i otporniji su od bakteriofaga Psh-AB1 kod koga se uočava smanjenje procenta vijabilnih faga pri pH8-pH11.

e. Pri visokim temperaturama od 50°C i 60°C nakon 10 i 20 minuta inkubacije bakteriofagi su održavali prilično visoku vijabilnost koja je bila iznad 70%. Produženje tretmana je uslovio drastično smanjenje vijabilnosti sva tri faga.

f. Kriva multiplikacije pokazala je da je latentni period približno isti (~30 min) kod sva tri faga. Ciklusi multiplikacije su trajali od 120 do 150 minuta. Bakteriofagi Psh-10 i Psh-AB1 se odlikuju znatno većim brojem oslobođenih viriona (220 - 240) u odnosu na bakteriofag Psh-PP1 (10).

g. Na osnovu rezultata transmisiona elektronske mikroskopije sva tri bakteriofaga poseduju prilično uniformnu morfologiju, kratak rep i izometrični kapsid odnosno pripadaju morfotipu C1. Rezultati predstavljaju prvu karakterizaciju *P.shigelloides* specifičnih faga iz familije *Podoviridae*.

h. Restrikciona digestija nukleinske kiseline bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 je ukazala da je njihov genom u formi dvolančane DNK te da su oni genetički relativno slični.

- Veličina genoma sva tri virusa iznose približno 35 kbp. Na osnovu rasporeda i broja traka nakon restrikcione digestije enzimom Dral virusi Psh-10 i Psh-AB1 pokazuju veliku sličnost.
- i. Analiza strukturnih proteina bakteriofaga Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 pokazala je velike sličnosti u broju i rasporedu traka naročito u slučaju faga Psh-10 i Psh-AB1.
- iv. Bakteriofagi specifični za vrstu *P. shigelloides*, veličine genoma oko 35 kbp, uspešno su detektovani primenom protočne citometrije, što pokazuje da bi karakterizacija ove grupe virusa primenom protočne citometrije mogla biti izvođena na jednostavniji i precizniji način.
- v. Na osnovu iznetih rezultata karakterizacije bakteriofaga može se zaključiti da bakteriofagi sa oznakama Psh-10, Psh-AB1 i Psh-PP1 mogu zauzeti značajno mesto u kontroli brojnosti bakterije *P. shigelloides* i da se po svojim karakteristikama (litička efikasnost i vijabilnost u širokom pH opsegu) naročito izdvojio bakteriofag Psh-10.

7. LITERATURA

1. Abbott, S.L., R.P. Kokka and J.M. Janda. (1991). Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. J. Clin. Microbiol. 29: 148–153.
2. Abedon, S., T. (2008). Phages, ecology, evolution. In Abedon, S., T. Bacteriophage ecology. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, pp.1-27.
3. Abedon, S., Thomas-Abedon, C. (2010). Phage Therapy Pharmacology. Current Pharmaceutical Biotechnology, 11(1), 28-47.
4. Abedon, S. (2011). Lysis from without. Bacteriophage, 1(1), 46-49. <http://dx.doi.org/10.4161/bact.1.1.13980>
5. Ackermann, H. W., DuBow, M. S. (1987). Phage multiplication. In H.-W. Ackermann and M. S. DuBow (eds.), Viruses of Prokaryotes. Volume I: General Properties of Bacteriophages. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 49–85.
6. Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Arch. Virol, 146: 843–857.
7. Ackermann, H.W. (2006). Classification of Bacteriophages. In Calendar, R. The bacteriophages. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, p.12.
8. Ackermann, H.W. (2009). Phage Classification and Characterization. Methods in Molecular Biology, 501, 127-140.
9. Ackermann, H. W. (2012). Bacteriophage electron microscopy. In: Advances in virus research, Łobocka, M. and Szybalski, W., Eds., 82., pp.1-32.
10. Adams, M. (1959). Bacteriophages. 1st ed. New York: Interscience Publishers.
11. Ahmadi, M., Karimi Torshizi, M., Rahimi, S., & Dennehy, J. (2016). Prophylactic Bacteriophage Administration More Effective than Post-infection Administration in Reducing *Salmonella enterica serovar Enteritidis* Shedding in Quail. Frontiers In Microbiology, 7.
12. Aksyuk, A. A. and Rossmann, M. G. (2011). Bacteriophage Assembly. Viruses, 3(3), 172–203.
13. Alabi, S., A., Odugbemi, T. (1990a): Occurrence of *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides* in patients with and without diarrhoea in Lagos, Nigeria. J. Med Microbiol, 32:45-8
14. Alabi, S., A., Odugbemi, T. (1990b). Biochemical characteristics and a simple scheme for the identification of *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides*. J.Trop.Med.Hyg. 93, 166–169.

15. Albert MJ, Ansaruzzaman M, Qadri F, Hossain A, Kibriya AKM, Haider K, Nahar S, Faruque SM, Alam AN. (1993). Characterisation of *Plesiomonas shigelloides* strains that share type-specific antigen with *Shigella flexneri* 6 and common group 1 antigen with *Shigella flexneri* spp. and *Shigella dysenteriae* 1. *J Med Microbiol* 39:211–217.
16. Aldova, E. & Shimada, T. (2000). New O and H antigens of the International Antigenic Scheme for *Plesiomonas shigelloides*. *Folia Microbiol.* 45, 301-304.
17. Aldova, E., Melter, O., Chyle, P., Slosarek, M. & Kodym, P. 1999. *Plesiomonas shigelloides* in water and fish. *Centr. Eur. J. Publ. Hlth.* 7, 172-175.
18. Al-Fendi, A., Shueb, R. H., Ravichandran, M. and Yean, C. Y. (2014). Isolation and characterization of lytic vibriophage against *Vibrio cholerae* O1 from environmental water samples in Kelantan, Malaysia. *J. Basic Microbiol.*, 54: 1036–1043.
19. An, D., Parsek, M. (2007). The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Current Opinion In Microbiology*, 10(3), 292-296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2007.05.011>
20. Anand T., Vaid R. K., Bera B. C., Barua S., Riyesh T., Virmani N., Yadav, N., Malik, P. (2015). Isolation and characterization of a bacteriophage with broad host range, displaying potential in preventing bovine diarrhoea. *Virus Genes* 51 315–321.
21. Anon, (2016). [online] Available at: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308960-002-gb-b-apiweb-booklet.pdf> [Accessed 7 Nov. 2016].
22. Arai, T., Ikejima, N., Itoh, T., Sakai, S., Shimada, T., Sakazaki, R. (1980). A survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. *J Hyg (Lond)*. 84 (2): 203-211.
23. Aquilini, E., Merino, S. and Tomás, J. (2013). The *Plesiomonas shigelloides* wbO1 gene cluster and the role of O1-antigen LPS in pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*, 63, pp.1-7.
24. Auckenthaler R, Michea-Hamzehpour M, Pechere JC. In-vitro activity of newer quinolones against aerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1986;17:29-39
25. Ausubel FM, Brent R, Kingston, RE, et al. (1998) Preparing DNA from small-scale liquid lysates. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley & Sons, Inc. p 1.13.8.
26. Avison, M.B., Bennett, P.M. & Walsh, R. 2000. b-Lactamase expression in *Plesiomonas shigelloides*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 877-880.
27. Bader, R.E. (1954). Ueber die Herstellung eines agglutinierenden Serums gegen die Rundform von *Shigella sonnei* mit einem Stamm der Gattung *Pseudomonas*. *Z. Hyg. Infektionskr.* 140, 450-456.

28. Baess, I. 1971. Report on a pseudolysogenic mycobacterium and a review of the Literature concerning pseudolysogeny. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 79: 428–34.
29. Bag, A., Bhattacharyya, S., Pal, N., Chattopadhyay, R. (2012). In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. *Microbiological Research*, 167(6), 352-357. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.005>
30. Bao, H., Zhang, H. and Wang, R. (2011). Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Poultry Science*, 90(10), pp.2370-2377.
31. Baranowski, J. (1985). Assay for histamine decarboxylase activity. In: Pan, B.S., James, D. (Eds.), *Histamine in Marine Products: Production by Bacteria, Measurement and Prediction of Formation*, Vol. 252, pp. 10–13, FAO Fish. Tech. Paper.
32. Baratela, K., Saridakis, H., Gaziri, L. and Pelayo, J. (2001). Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. *Journal of Applied Microbiology*, 90(3), pp.482-487.
33. Bardoň, J. (1994): Sepsis caused by *Plesiomonas shigelloides* in the lemur vari (*Varecia variegata*) (Sepse způsobená *Plesiomonas shigelloides* u lemura vari, *Varecia variegata*). *Veterinářství*, 44, 15.
34. Bardon, J. (1999). *Plesiomonas shigelloides* and its serovars in animals in the Czech Republic – Region Moravia. *Cent. Eur. J. Public Health* 1, 47-49.
35. Barrangou, R., Yoon, S., Breidt, F., Fleming, H., Klaenhammer, T. (2002). Characterization of Six *Leuconostoc fallax* Bacteriophages Isolated from an Industrial Sauerkraut Fermentation. *Applied And Environmental Microbiology*, 68(11), 5452-5458.
36. Bauwens, L., de Meurichy, W., Lemmens, P. & Vandepitte, J. (1983). Isolation of *Plesiomonas shigelloides* and *Edwardsiella* species in the Antwerp zoo. *Acta Zool. Pathol. Antverp.* 77, 61-74.
37. Bensing, B., Siboo, I. and Sullam, P. (2001). Proteins PblA and PblB of *Streptococcus mitis*, Which Promote Binding to Human Platelets, Are Encoded within a Lysogenic Bacteriophage. *Infection and Immunity*, 69(10), pp.6186-6192.
38. Berry, J.D., Rajaure, M., Pang, T., and Young, R. (2012). The spanin complex is essential for lambda lysis. *J. Bacteriol.* 194, 5667– 5674.
39. Beutin, L., Stroehler, U. and Manning, P. (1993). Isolation of enterohemolysin (Ehly2)-associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*. *Gene*, 132(1), pp.95-99.
40. Biology Discussion. (2016). Infection Cycles of Lytic, Single-Stranded and Temperate Bacteriophages. [online] Available at: <http://www.biologydiscussion.com/microbiology/infection-cycles/infection-cycles-of-lytic-single-stranded-and-temperate-bacteriophages/50080> [Accessed 1 Dec. 2016].

41. Bordner, R., Winter, J. (1978). *Microbiological Methods for Monitoring the Environment*. Cincinnati, Ohio: U. S. Government Printing Office.
42. Bose, A. (2006). *Aeromonas and Plesiomonas spp.* Centre for Medical Microbiology. Royal Free and University College Medical School. London, UK.
43. Boulé, J., Sholberg, P., Lehman, S., O'gorman, D., Svircev, A. (2011). Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. *Canadian Journal Of Plant Pathology*, 33(3), 308-317.
44. Bozzola, J. J, Russell, L. D. (1998). *Electron Microscopy - Principles and Techniques for Biology*. 2nd Ed. Jones and Bartlett Publishers, Sundbury, Massachusetts, pp 670.
45. Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31, 230-314.
46. Braga, P.c., Dal Sasso, S. Maci, S. Reggio, and G. Piatti. (1995). Influence of Subinhibitory Concentrations of Brodimoprim and Trimethoprim on the Adhesiveness, Hydrophobicity, Hemagglutination and Motility of *Escherichia Coli*." *Chemotherapy* 41.1: 50-58.
47. Bravo, L.,F., Correa, Y.,M., Clausell, J.,F.,I., Fernandez, A.A., Ramirez, M.A, Nunez, F.F., Ledo, Y.G., Cruz, YI. (2009). Caracterizacion de factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de pacientes con diarrea en Cuba. *Rev Chil Infect* 26:233–238.
48. Bremner, W., Campbell, T., Ferera, J., & Zaman, R. (2016). Evaluating Double Agar Overlay Assay and Flow Cytometry as Methods for Characterizing Competition between T4 and T7 Bacteriophages in *Escherichia coli* C600. *Journal Of Experimental Microbiology And Immunology*, 20, 69-77.
49. Brenden, R.A., Miller, M.A., Janda, J.M. (1988): Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infections in humans. *Rev. Infect. Dis.*, 10: 303–316.
50. Brenner, S., Horne, R. W. (1959). A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 34:103–110.
51. Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. (2005): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; Volume two: Proteobacteria; Part B: The Gammaproteobacteria*. 2nd Ed. Garrity, G. M. Springer
52. Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. and Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), pp.1017-1032.
53. Brinkmann, V. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(5663), pp.1532-1535.

54. Brisse, S., Grimont, F., Grimont, P.A.D. 2006. The genus *Klebsiella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*, 3rd edn. Springer, NewYork. pp. 159–196.
55. Brussaard, C. P. (2004). Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*, 70(3), 1506-13.
56. Brüssow, H., M., Fremont, A. Bruttin, J. Sidoti, A. Constable, and V. Fryder. (1994). Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4537–43.
57. Brüssow, H., Canchaya, C. and Hardt, W. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), pp.560-602.
58. Brüssow, H., Kutter, E. (2005). Phage ecology, in *Bacteriophages: Biology and Application*, E. Kutter and A. Sulakvelidze, Eds., pp. 145–146, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA
59. Bryner, J.H., Ritchie, A.E., Foley, J.W., Berman, D.T. (1970) Isolation and characterization of a bacteriophage for *Vibrio fetus*. *J Virol* 6, 94–99.
60. Büchen-Osmond, C. (Ed) (2003). 00.053. *Plasmaviridae*. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), ICTVdB Management, The Earth Institute and Department of Epidemiology, Mailman School of Public Health, Columbia University, New York, NY, USA. pp. 16 - 25
61. Bull, J. J., Levin, B. R., DeRouin, T., Walker, N. & Bloch, C. A. (2002). Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BMC Microbiol* 2, 35.
62. Buller, N., B., 2004. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: a Practical Identification Manual*, CABI Publishing p.25
63. Campbell, A. (2006). General aspects of lysogeny. In Calendar, R. *The bacteriophages*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, p.71.
64. Canchaya, C. A., M. Ventura, D. van Sinderen. (2007). Bacteriophage bioinformatics and genomics, p. 43-59. In S. McGrath and D. van Sinderen (ed.), *Bacteriophage genetics and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
65. Capra, M.L., Quiberoni, A., Reinheimer, J. (2006). Phages of *Lactobacillus casei/paracasei*: response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 334–342.
66. Carlson, K. (2005). Appendix: Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches, in *Bacteriophages: Biology and Application*, E. Kutter and A. Sulakvelidze, Eds., pp. 437–494, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA

67. Carmody L. A., Gill J. J., Summer E. J., Sajjan U. S., Gonzalez C. F., Young R. F., LiPuma J. J. (2010). Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J. Infect. Dis.* 201, 264–271.10.1086/649227
68. Castelo-Branco, D., Silva, A., Monteiro, F., Guedes, G., Sales, J., Oliveira, J., Maia Junior, J., Miranda, S., Sidrim, J., Alencar, L., Brilhante, R., Cordeiro, R., Bandeira, T., Pereira Neto, W. and Rocha, M. (2016). *Aeromonas* and *Plesiomonas* species from scarlet ibis (*Eudocimus ruber*) and their environment: monitoring antimicrobial susceptibility and virulence. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(1), pp.33-43.
69. Chen X, Chen Y, Yang Q, Kong H, Yu F, Han D, Zheng S, Cui D, Li L. (2013). *Plesiomonas shigelloides* infection in southeast China. *PLoS One* 8:e77877.
70. Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M., Marvin-Guy, L., Rami-Shojaei, S. and Brussow, H. (2004). *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage LP65: a New Member of the SPO1-Like Genus of the Family Myoviridae. *Journal of Bacteriology*, 186(21), pp.7069-7083.
71. Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., Brüssow, H. (2004). Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3677–3686.
72. Chopin, M., Chopin, A. and Bidnenko, E. (2005). Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), pp.473-479.
73. Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammes, W. and Holzapfel, W. (1990). Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. *Letters in Applied Microbiology*, 11(6), pp.278-281.
74. Chow, M. S., Rouf, M. A. (1983). Isolation and Partial Characterization of Two *Aeromonas hydrophila* Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5), 1670–1676.
75. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H., 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37, 318–326.
76. Clark, R.B., Lister, P.D, Arneson-Rotert L., Janda JM. (1990) In vitro susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* to 24 antibiotics and antibiotic-beta-lactamase-inhibitor combinations. *Antimicrob Agents Chemother.* 34:159-160
77. Clark, R.B. & Janda, J.M. 1991. *Plesiomonas* and human disease. *Clin. Microbiol. Newsl.* 13, 49-52.
78. Cohen, K. L., P. R. Holyk, L. R. McCarthy, and R. L. Peiffer. 1983. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* endophthalmitis. *Am. J. Ophthalmol.* 96:403–404.

79. Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J. and Muniesa, M. (2011). Bacteriophages Carrying Antibiotic Resistance Genes in Fecal Waste from Cattle, Pigs, and Poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), pp.4908-4911.
80. Cowan, S. (1956): Taxonomic rank of *Enterobacteriaceae* group J. *Gen. Microbiol.*, 15, 345-348.
81. Crothers-Stomps, C., Høj, L., Bourne, D.G., Hall, M.R. and Owens, L. (2010), Isolation of lytic bacteriophage against *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1744–1750.
82. Cruz, J.M., Saraiva, A., Eiras, J.C., Branco, R. & Sousa J.C. 1986. An outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*, in Portugal. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 6, 20-22.
83. Čižnár I., Hošťacká A., Gonzales-Rey C., Krovacek K. (2004): Potential virulence-associated properties of *Plesiomonas shigelloides*. *Folia Microbiol.* 49, 543–548
84. Daskaleros P A, Stoebner J A, Payne S M. (1991). Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: cloning of the genes for the heme-iron uptake system. *Infect Immun.* 59:2706–2711.
85. Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V. and Touqui, L. (2010). Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Journal of Infectious Diseases*, 201 (7), pp. 1096-1104.
86. d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des baccilles dysenteriques. *CR Acad Sci Paris* 1917,163,173-5.
87. d'Herelle F. 1926. *The Bacteriophage and Its Behavior*, pp. 490–97. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. 629 pp.
88. De Mondino, S.S., Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. (1995). Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro city. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 1-4.
89. DePaola, A., Hill, W.E. & Harrell, F.M. 1993. Oligonucleotide probe determination of tetracycline-resistant bacteria isolated from catfish ponds. *Mol. Cell. Probes* 7, 345-348.
90. Diba, F., Hossain, K., Azim, M., Moinul Hoque, M. (2013). Isolation , Characterization and Determination of Antimicrobial Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk. *Jordan Journal Of Biological Sciences*, 6(2), 111-116. <http://dx.doi.org/10.12816/0000268>
91. Di Lallo, G., Evangelisti, M., Mancuso, F., Ferrante, P., Marcelletti, S., Tinari, A., Superti, F., Migliore, L., D'Addabbo, P., Frezza, D., Scortichini, M. and Thaller, M. C. (2014), Isolation and partial characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*, causal agent of kiwifruit bacterial canker. *J. Basic Microbiol.*, 54: 1210–1221.
92. Dokland, T. (1999). Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 56(7-8), pp.580-603.

93. Donlan, R. and Costerton, J. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp.167-193.
94. Douglas, J. (1975). *Bacteriophages*. 1st ed. London: Chapman & Hall.
95. Duplessis M., Moineau S. Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 2001;41:325–336.
96. Dülger B. (2004). Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* and relationship with faecal pollution in Nilufer Stream, Bursa, Turkey. *Turkish Electron J Biotechnol* 2:22–29.
97. East, A.K., D. Allaway and M.D. Collins. 1992. Analysis of DNA encoding 23S rRNA and 16S–23S rRNA intergenic spacer regions from *Plesiomonas shigelloides*. *FEMS Microbiol. Lett.* 74: 57–62.
98. Eddy, B., Carpenter, K. (1964): Further studies on *Aeromonas* II. Taxonomy of *Aeromonas* and C27 strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 27, 96 – 109.
99. Edlin, G., Lin, L., Bitner, R. (1977). Reproductive fitness of P1, P2, and Mu lysogens of *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 21(2), 560–564.
100. Edward P.R. and Ewing W.H. (1972). *Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 1992, 4th ed., J.B. Lippincott Co. Philadelphia.
101. Eiff, C., Heilmann, C. and Peters, G. (1999). New Aspects in the Molecular Basis of Polymer-Associated Infections due to *Staphylococci*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 18(12), pp.843-846.
102. Ellis, E. L. and Delbrück, M. (1939). The Growth of Bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 22(3), 365–384.
103. Ewing, W.H., Hugh, R., Johnson, J.G. (1961): Studies on the *Aeromonas* group. US Dpt. Hlth, Educ. And Welfare, Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, U.S.A.
104. Fane, B.A., Chen, M. and Cherwa, J.E. (2010). Icosahedral ssDNA bacterial viruses. In Brian, W.J. Mahy and Marc H.V. van Regenmortel. *Desk Encyclopedia Animal and Bacterial Virology*, 1st Ed. Oxford: Academic Press.
105. Ferguson, W.W., Henderson, N.D. 1947. Description of strain C27: a motile organism with the major antigen of *Shigella sonnei* phase I. *J. Bacteriol.* 54, 179-81.
106. Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G. and Ysebaert, M. (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*, 260(5551), pp.500-507.
107. Frank, C., Littmann, M., Alpers, K., Hallauer, J. (2006). *Vibrio vulnificus* wound infections after contact with Baltic Sea, Germany. *Euro Suveill.* 11:3024–3025.

108. Freund, S., Koburger, J., Wei, C. (1988). Enhanced Recovery of *Plesiomonas shigelloides* following an OBO Technique. *Journal of Food Protection*, 51(2), pp.110-112.
109. Fukuda, K., Ishida, W., Uchiyama, J., Rashel, M., Kato, S., Morita, T., Muraoka, A., Sumi, T., Matsuzaki, S., Daibata, M., Fukushima, A. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: Effects of topical bacteriophage KPP12 administration. *PLoS one.*, 7(10)
110. Furuse, K. (1987). Distribution of coliphages in the general environment: general considerations, p. 87-124. In S. M. Goyal, C. Gerba, and G. Bitton (ed.), *Phage ecology*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
111. Gallet, R., Lenormand, T., Wang, I.N. (2012). Phenotypic stochasticity protects lytic bacteriophage populations from extinction during the bacterial stationary phase. *Evolution* 66.11. pp. 3485-3494.
112. Gamaleya, N. F. (1898) Bacteriolytins—ferments destroying bacteria, *Russian Archives of Pathology, Clinical Medicine, and Bacteriology*, vol. 6, pp. 607–613.
113. Garrity, G.M., Winters, M., Searles, D.B. 2001. Taxonomic outline of the prokaryotic genera. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed. Ed. Garrity, G.M. Springer-Verlag, New York, USA, page 13.
114. Gibotti, A., Saridakis, H., Pelayo, J., Tagliari, K., Falcao, D. (2000). Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas spp.* and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambe Stream (State of Parana, Brazil). *Journal of Applied Microbiology*, 89(1), pp.70-75.
115. Gill, J., Abedon, S. (2003). Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Feature Articles*.
116. González-Rodríguez, N., Santos, J., Otero, A. and García-López, M. (2007). Cell-Associated Hemolytic Activity in Environmental Strains of *Plesiomonas shigelloides* Expressing Cell-Free, Iron-Influenced Extracellular Hemolysin. *Journal of Food Protection*, 70(4), pp.885-890.
117. Gonzalez-Rey, C., Svenson, S., Eriksson, L., Ciznar, I., Krovacek, K. (2003). Unexpected finding of the "tropical" bacterial pathogen *Plesiomonas shigelloides* from lake water north of the Polar Circle. *Polar Biology*, 26(8), pp.495-499.
118. González-Rey C, Svenson SB, Bravo L, Rosinsky J, Ciznar I, Krovacek K. (2000). Specific detection of *Plesiomonas shigelloides* isolated from aquatic environments, animals and human diarrhoeal cases by PCR based on 23S rRNA gene. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29:107–113.
119. González-Rey, C. (2003): Studies on *Plesiomonas shigelloides* isolated from different environments. PhD th., Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Veterinary Microbiology, Uppsala.

120. González-Rey, C., Siitonen, A., Pavlova, A., Ciznar, I., Svenson, S. and Krovacek, K. (2011). Molecular evidence of *Plesiomonas shigelloides* as a possible zoonotic agent. *Folia Microbiologica*, 56(2), pp.178-184.
121. Gray, C., Brown, R. and Marvin, D. (1981). Adsorption complex of filamentous fd virus. *Journal of Molecular Biology*, 146(4), pp.621-627.
122. Greene J., Goldberg R. B. (1985). Isolation and preliminary characterization of lytic and lysogenic phages with wide host range within the streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.*
123. Grimont, F., Grimont, P.A.D. (2006). The genus *Enterobacter*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds), *The Prokaryotes Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, Springer, New York, pp. 197-214.
124. Gristina, A., Hobgood, C., Webb, L. and Myrvik, Q. (1987). Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials*, 8(6), pp.423-426.
125. Gu, W., Gonzalez-Rey, C., Krovacek, K. and Levin, R. (2006). Genetic Variability Among Isolates of *Plesiomonas shigelloides* from Fish, Human Clinical Sources and Fresh Water, Determined by RAPD Typing. *Food Biotechnology*, 20(1), pp.1-12
126. Gu W, Levin RE. (2006). Factors affecting quantitative PCR assay of *Plesiomonas shigelloides*. *Food Technol* 20:219–230.
127. Gupta R., Prasad Y. (2010). Efficacy of polyvalent bacteriophage P-27/HP to control multidrug resistant *Staphylococcus aureus* associated with human infections. *Curr. Microbiol.* 62 255–260.
128. Guttman B, Raya R, Kutter E. (2005). In: *Basic phage biology. Bacteriophages Biology and Application*. Kutter E, Sulakvelidze A, Boca Raton FL, editors. USA: CRC Press; pp. 29–66.
129. Habs, H. Schubert, R.H.W. (1962). Über die biochemischen Merkmale und die taxonomische Stellung von *Pseudomonas shigelloides* (Bader). *Zentralbl. Bakteriol. [Orig]* 186, 316-327.
130. Han, J., Kim, J., Hwang, S., Choresca Jr, C., Shin, S., Jun, J., Chai, J., Park, Y. and Park, S. (2013). Isolation and characterization of a *Myoviridae* bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis. *Research in Veterinary Science*.
131. Hankin E H. (1896) L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann Inst Pasteur.* 10:511.
132. Hara, S., Terauchi, K. and Koike, I. (1991). Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2731–2734.
133. Harrison, S., Caspar, D., Camerini-Otero, R. and Franklin, R. (1971). Lipid and Protein Arrangement in Bacteriophage PM2. *Nature New Biology*, 229(7), pp.197-201.

134. Harrison, J., Ceri, H. and Turner, R. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12), pp.928-938.
135. Harshey, R., M. (1988) Phage Mu. in *The bacteriophages*, ed Callendar R.(Plenum Press, New York, N.Y), 1:193–234
136. Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., Samuel, M.D. (2002). Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Science*, 296(5576), 2158-2162. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1063699>
137. Hashemolhosseini, S., Holmes, Z., Mutschler, B., Henning, U. (1994). Alterations of receptor specificities of coliphages of the T2 family. *J. Mol. Biol.* 240,105-110.
138. Havelaar, A.H., Hogeboom, W.M. (1983). Factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage-polluted waters. *Antonie van Leeuwenhoek* (1983) 49: 387.
139. Hayashi, M. (1978) In *The Single-Stranded DNA Phages* (eds Denhardt, D. T., Dressler, D. & Ray, D. S.) 531– 547, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
140. Hendrie, M., Schewan, J., Véron, M. (1971): *Aeromonas shigelloides* (Bader) Ewing et al. A proposal that it e transferred to the genus *Vibrio*. *Int. J. Syst. Bact.* 21, 25 – 27.
141. Heo, Y.J., Lee, Y.R., Jung, H.H., Lee, J.E., Ko, G.P., and Cho, Y.H. (2009). Antibacterial efficacy of phages against *Pseudomonas aeruginosa* infections in *Drosophilla melanogaster*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 2469-2474.
142. Herrera PC, Santos JA, Otero A, Garcia-López ML. 2006. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in displayed portions of saltwater fish determined by a PCR assay based upon the *hugA* gene. *Int J Food Microbiol* 108:233–238.
143. Herrington, D., Tzipori, S., Robins-Browne, R.M., Tall, B.D. & Levine, M.M. 1987. In vitro and in vivo pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *Infect. Immun.* 55, 979-985.
144. Holding, A. J. & Collee, J. G. (1971). Routine Biochemical Tests. In *Methods in Microbiology*, vol. 6A, pp. 1–32. Edited by J. R. Norris & D. W. Ribbons. London and New York: Academic Press.
145. Holmberg SD, Wachsmuth IK, Hickman-Brenner FW, Blake PA, Farmer JJ III. *Plesiomonas* enteric infections in the United States. *Ann Intern Med* 1986;105:690-694.
146. Horvath, P. and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of *Bacteria* and *Archaea*. *Science*, 327(5962), pp.167-170.
147. Hostacká, A., Ciznár, I. and Rosinský, J. (2005). Biological characteristics of *Plesiomonas shigelloides* strains of human and animal origin. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.*, 54(4), pp.148-53.

148. Huys, G., Sings, J. (1999). Evaluation of a fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) methodology for the genotypic discrimination of *Aeromonas* taxa. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 83-92.
149. Hyman P., Abedon S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* 70 217–248.
150. Ingram CW, Morrison AJ, Levitz RE. (1987). Gastroenteritis, sepsis, and osteomyelitis caused by *Plesiomonas shigelloides* in an immunocompetent host: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol*; 25:1791-1793.
151. Islam, S., Alam, J., Khan, S.I. (1991). Distribution of *Plesiomonas shigelloides* in various components of pond ecosystems in Dhaka, Bangladesh. *Microbiol. Immunol.* 35, 927-932.
152. Jamal, M., Chaudhry, W. N., Hussain, T., Das, C. R. and Andleeb, S. (2015). Characterization of new *Myoviridae* bacteriophage WZ1 against multi-drug resistant (MDR) *Shigella dysenteriae*. *J. Basic Microbiol.*, 55: 420–431.
153. Janda, J.M. and S.L. Abbott. 1993. Expression of hemolytic activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1206–1208.
154. Janda JM, Abbott SL. 1998. The enterobacteria. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
155. Janda, J.M., (2005). Genus XXVII. *Plesiomonas*, Habs and Shubert 1962, 324AL, 740-744. In Brenner, D. J., Krieg, N., Staley, J. T., Garrity, G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2: *Proteobacteria*. Part B: The *Gammaproteobacteria*. 2nd Ed. Garrity, G. M. Springer.
156. Janda JM, Abbott SL. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, pitfalls. *J Clin Microbiol* 45:2761–2764.
157. Jassim, S. and Limoges, R. (2014). Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(8), pp.2153-2170.
158. Jeltsch, A. (2003). Maintenance of species identity and controlling speciation of bacteria: a new function for restriction/modification systems?. *Gene*, 317, pp.13-16.
159. Jensen, E. C., Schrader, H. S., Rieland, B., Thompson, T. L., Lee, K. W., Nickerson, K. W., Kokjohn, T. A. (1998). Prevalence of Broad-Host-Range Lytic Bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 575–580.
160. Jepson, C.D., March, J.B. (2004). Bacteriophage lambda is highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine*. 22:3413–1419.
161. Joh SJ, Ahn EH, Lee HJ, Shin GW, Kwon JH, Park CG (2013) Bacterial pathogens and flora isolated from farm-cultured eels (*Anguilla japonica*) and their environmental waters in Korean eel farms. *Vet Microbiol* 163:190–195

162. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiologica*, 56(3),191–200.
163. Jun, J.W., Kim, J.H., Choresca, Jr.C.H., Shin, S.P., Han, J.E., Jeong, D.S., Park, S.C. (2011): Isolation and molecular detection of *Plesiomonas shigelloides* containing *tetA* gene from Asian arowana (*Scleropages formosus*) in a Korean aquarium. *African Journal of Microbiology Research*, 5(28): 5019-5021
164. Kain, K.C., Kelly, M.T. (1989a). Clinical features, epidemiology, and treatment of *Plesiomonas shigelloides* diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 27, 998-1001.
165. Kain K.C., Kelly MT., (1989b). Antimicrobial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* from patients with diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother.* 33:1609-1610.
166. Kalatzis, P., Bastías, R., Kokkari, C., Katharios, P. (2016). Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; Phage Therapy Application for Biological Control of *Vibrio alginolyticus* in Aquaculture Live Feeds. *PLOS ONE*, 11(3), e0151101. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151101>
167. Kelly MT, Kain KC. Biochemical characteristics and plasmids of clinical and environmental *Plesiomonas shigelloides*. *Experientia* 1991, 47:439–441.
168. Kim, J., Gomez, D., Nakai, T., Park, S. (2010). Isolation and identification of bacteriophages infecting ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum*. *Veterinary Microbiology*, 140(1-2), 109-115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.002>
169. King, A. M. Q., Lefkowitz, E., Adams, M. J., Carstens, E. B. (eds.) 2012. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier.
170. Kłak, M., Międzybrodzki, R., Bubak, B., Jończyk, E., Weber-Dąbrowska, B., Górski, A. (2010). Studies on the gastrointestinal transit and blood penetration of a therapeutic staphylococcal bacteriophage. Abstract no. 209, First International Congr. Viruses of Microbes, Paris
171. Klimeš, J., Čížek, A. (1996): Bacterial infection of the digestive tract (Bakteriální infekce trávicího traktu). In: Svoboda M., Pospíšil, Z. A kol.: Infectious disease of dogs and cats (Infekční nemoci psa a kočky). Brno, Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat. 338
172. Klinčić, T. (2016). Bakteriofagi – potencijal za prevladavanje antibiotičke rezistencije. Specijalistički rad. Zagreb: Farmaceutsko – biokemijski fakultet.
173. Knezevic, P., Kostanjsek, R., Obreht, D., Petrovic, O., (2009). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific phages with broad activity spectra. *Curr. Microbiol.* 59, 173-180
174. Kolle, P., and Hoffmann, R. (1998). Zoonoses from Reptiles, Amphibians and Fishes. European Association of Zoo-and Wildlife Veterinarians (EAZVV), Second scientific meeting. May 21-24, 1998. United Kingdom.

175. Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E., Johnson, R.P. (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, urednici. Bacteriophages: Methods and Protocols. Vol. 1. New York, NY: Humana Press; 2009. pp. 69–76.
176. Krovacek K, Eriksson LM, González-Rey C, Rosinsky J, Ciznar I (2000) Isolation, biochemical and serological characterisation of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in Northern Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 23:45–51
177. Kutter, E., and Sulakvelidze, A. (2005). Bacteriophages: biology and applications, in Bacteriophages: Biology and Applications, eds E. Kutter and A. Sulakvelidze, (Boca Raton: CRC Press).
178. Kutter, E. (2009). Phage Host Range and Efficiency of Plating. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, urednici. Bacteriophages: Methods and Protocols. Vol. 1. New York, NY: Humana Press; 2009. pp. 141–149.
179. Kwaga, J. K., A. A. Adesiyun, C. S. Bello, and S. U. Abdullahi. 1988. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in humans and water in Zaria, Nigeria. *Microbiologica* 11:165-167.
180. Labrie, S., Samson, J. and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), pp.317-327.
181. Lee, A.C.W., Yeun, K.Y., Ha, S., Y. et al. (1996). *Plesiomonas shigelloides* septicaemia: case report and literature review. *Pediatr Hematol Oncol*. 13: 265–269.
182. Leitão, Mauro F.F., Rios, Daniel P.F.A., Guimarães, Judite G.L., Baldini, V.L.S., & Mainardes Pinto, Cleide S. R.. (1997). Aterações químicas e microbiológicas em PACU (*Piaractus mesopotamicus*) armazenado sob refrigeração a 5°C. *Food Science and Technology (Campinas)*, 17(2), 160-166.
183. Levin R.E. (2008): *Plesiomonas shigelloides* – an aquatic food borne pathogen: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, and molecular detection. *Food Biotechnol*. 22, 189–202
184. Lin, L., Bitner, R., Edlin, G. (1977) Increased reproductive fitness of *Escherichia coli* lambda lysogens. *J. Virol*. 21, 554–559
185. Lindberg, A.,A. (1973) Bacteriophage receptors. *Annu Rev Microbiol* 27:205–241.
186. Ling TKW, Tam PC, Liu ZK, Cheng AFB. 2001. Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gramnegative clinical isolates. *J Clin Microbiol* 39:2964–2966.
187. Liu, Z., Ke, X., Lu, M., Gao, F., Cao, J., Zhu, H. and Wang, M. (2015). Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Acta Microbiologica Sinica*, [online] 55(1), pp.96-106.

188. Lopez-Sabater EI, Rodriguez-Jerez JJ, Hernandez-Herrero M, MoranaVentura MT (1996). Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in Scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *Int. J. Food Microbiol.*, 28(3): 411-418
189. Łoś, M., Węgrzyn, G. (2012). Chapter 9 – Pseudolysogeny, in *Bacteriophages, Part A*, eds. Lobočka, M., & Szybalski, W. (London: Academic Press). pp. 339 – 349.
190. Lu, Z., F. Breidt, V. Plengvidhya, and H. P. Fleming. (2003a). Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3192–202.
191. Lu, Z., F. Breidt, Jr., H. P. Fleming, E. Altermann, and T. R. Klaenhammer. (2003b.) Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, phiJL-1, from a cucumber fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 225–35.
192. Luria, S. E., and Steiner, D. L. (1954). The role of calcium in the penetration of bacteriophage T5 into its host. *Journal of Bacteriology*, 67(6), 635–639.
193. MacDonell, M.T., D.G. Swartz, B.A. Ortiz-Conde, G.A. Last and R.R. Colwell. (1986). Ribosomal RNA phylogenies for the vibrio-enteric group of eubacteria. *Microbiol. Sci.* 3: 172–178.
194. Maina, A.N., Mwaura, F.B., Oyugi, J., Goulding, D., Toribio, A.L., Kariuki, S. (2013). Characterization Of *Vibrio Cholerae* Bacteriophages Isolated From The Environmental Waters Of The Lake Victoria Region Of Kenya. *Current Microbiology* 68.1: 64-70.
195. Männistö, R., Kivelä, H., Paulin, L., Bamford, D., & Bamford, J. (1999). The Complete Genome Sequence of PM2, the First Lipid-Containing Bacterial Virus To Be Isolated. *Virology*, 262(2), 355-363. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1999.9837>
196. Marie, D., Brussaard, C. P. D., Thyraug, R., Bratbak, G., Vaulot, D. (1999). Enumeration of Marine Viruses in Culture and Natural Samples by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 45–52.
197. Marshall, D., Kim, J. and Donnelly, S. (1996). Antimicrobial susceptibility and plasmid-mediated streptomycin resistance of *Plesiomonas shigelloides* isolated from blue crab. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(2), pp.195-200.
198. Martin DL, Gustafson TL. *Plesiomonas* gastroenteritis in Texas [letter]. *JAMA* 1985;254:2063.
199. Martinez-Murcia, A.J., Benlloch, S. & Collins, M.D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 412-421.
200. Matsuyama R, Kuninaga N, Morimoto T, Shibano T, Sudo A, Sudo K, Asano M, Suzuki M, Asai T. (2015). Isolation and antimicrobial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* from great cormorants (*Phalacrocorax carbo hanedae*) in Gifu and Shiga prefectures, Japan. *J Vet Med Sci* 77: 1179–1181.

201. Mäkela, P.H., Mayer, H. (1976). Enterobacterial common antigen. *Bacteriol. Rev.* 40: 591–632.
202. Meng S, Xu J, Xiong Y, Ye C. 2012. Rapid and sensitive detection of *Plesiomonas shigelloides* by loop-mediated isothermal amplification of the *hugA* gene. *PLoS One* 7:e41978.
203. Merabishvili, M., Vandenheuvel, D., Kropinski, A., Mast, J., De Vos, D., Verbeken, G., Noben, J., Lavigne, R., Vaneechoutte, M. and Pirnay, J. (2014). Characterization of Newly Isolated Lytic Bacteriophages Active against *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*, 9(8), p.e104853.
204. Merino, S., Aquilini, E., Fulton, K.M., Twine, S.M. and Tomás, J.M. (2015) 'The polar and lateral flagella from *Plesiomonas shigelloides* are glycosylated with legionaminic acid', *Frontiers in Microbiology*, 6.
205. Microgen.ru. (2016). Микроген. [online] Available at: <http://www.microgen.ru/> [Accessed 20 Dec. 2016].
206. Middlebrooks, B. L., Toom, P. M., Douglas, W. L., Harrison, R. E., & McDowell, S. (1988). Effects of storage time and temperature on the microfloras and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *Journal of Food Science*, 53(4), 1024- 1029.
207. Miller, R.,V., Day, M.,J. (2008). Contribution of lysogeny, pseudolysogeny, and starvation to phage ecology. In Abedon, S. *Bacteriophage ecology*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, pp.114-147.
208. Miller, R. V., and S. A. Ripp. (2002). Pseudolysogeny: a bacteriophage strategy for increasing longevity in situ. In M. Syvanen and C. I. Kado (eds.), *Horizontal Gene Transfer*, 2nd edn. San Diego, CA: Academic Press, pp. 81–91.
209. Miller, M.L., Koburger, J.A. (1986a). Tolerance of *Plesiomonas shigelloides* to pH, sodium chloride and temperature. *J Food Prot.* 49: 877-879.
210. Miller, M.L., Koburger, J.A. (1986b). Evaluation of inositol brilliant green bile salts and *Plesiomonas shigelloides* from aquatic samples in a seasonal survey of the Suwanee river estuary. *J Food Prot.* 49: 274-278.
211. Miller, M., Koburger, J., A. (1985). *Plesiomonas shigelloides*: An Opportunistic Food And Waterborne Pathogen. *Journal of Food Protection* 48.5: 449-457.
212. Millership, S.E., Chattopadhyay, B. (1984). Methods for the isolation of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* from faeces. *J. Hyg.* 92: 145–152.
213. Mirzaei, M.K., Nilsson, A.S. (2015). Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLoS ONE* 10(5): e0127606.

214. Moak, M., Molineux, I. J. (2004). Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Molecular Microbiology*, 51: 1169–1183.
215. Moeller, V. (1954). Distribution of amino acid decarboxylase in *Enterobacteriaceae*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 35: 259-277.
216. Monge, R., Arias-Echandi, M.L. & Utzinger, D. (1998). Presence of cytotoxic *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* in fresh vegetables. *Rev. Biomed.* 9, 176-180.
217. Montanuci, F., Jorge, L., Jorge, R. (2013). Kinetic, thermodynamic properties, and optimization of barley hydration. *Food Science And Technology (Campinas)*, 33(4), 690-698. <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612013000400014>
218. Morgan, D.R., Johnson, P.C., DuPont, H.L., Satterwhite, T.K., Wood, L.V. (1985). Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infection and Immunity* 50, 62-65.
219. Morita, M., Tanji, Y., Mizoguchi, K., Akitsu, T., Kijima, N., Unno, H. (2002). Characterization of a virulent bacteriophage specific for *Escherichia coli* O157:H7 and analysis of its cellular receptor and two tail fiber genes. *FEMS Microbiology Letters*, 211: 77–83.
220. Müller-Merbach, M., Kohler, K., Hinrichs, J. (2007). Environmental factors for phage-induced fermentation problems: Replication and adsorption of the *Lactococcus lactis* phage P008 as influenced by temperature and pH. *Food Microbiology*, 24(7-8), 695-702.
221. Nagy, E. 1974. A highly specific phage attacking *Bacillus anthracis* strain Sterne. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 21:257-263.
222. Nilsson, J. (2006). *Plesiomonas shigelloides* – en ovanlig orsak till diarré hos katt?. MSc, Undergraduate. Swedish University of Agricultural Sciences.
223. Nimmervoll, H., Wenker, C., Robert, N., & Albin, S. (2011). Septicaemia caused by *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* in captive penguin chicks. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 153(3), 117–121. doi:10.1024/0036-7281/a000165
224. Nisha RG, Rajathi V, Manikandan R, Prabhu NM. 2014. Isolation of *Plesiomonas shigelloides* from infected cichlid fishes using 16S rRNA characterization and its control with probiotic *Pseudomonas* sp. *Acta Sci Vet* 42:1–7.
225. Niven, C. F., Jeffrey, M. B., & Corlett, D. A. (1981). Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 321–322.
226. Nurhafizah W. W. I., Alia S. A., Azna N. S., Lee K. L., Nadirah M., Laith A. R., Danish-Daniel M., Zainathan S. C., Shariff M., Mazlan A. G., Najiah M. (2017). In-Vitro characterization of lytic bacteriophage PhVh6 as potential biocontrol agent against pathogenic *Vibrio harveyi*. *AACL Bioflux* 10(1):64-76.

227. O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A. Bacteriophage and Their Lysins for Elimination of Infectious Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009;33:801–819.
228. Ogawa, J., Amano, Y. (1987). Electron microprobe X-ray analysis of polyphosphate granules in *Plesiomonas shigelloides*. *Microbiol. Immunol.* (31): 1121-1125.
229. Ogunseitan, O. A., G. S. Saylor, and R. V. Miller. 1990. Dynamic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and bacteriophages in lake water. *Microb. Ecol.* 19: 171–85.
230. O'Hara CM, Miller JM. 2002. Ability of the MicroScan rapid gramnegative type 3 panel to identify nonenteric glucose-fermenting and nonfermenting gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 40:3750–3752.
231. O'Hara CM. 2006. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST system and NID panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 44:928–933.
232. Olsen, R. H., Siak, J.-S., Gray, R. H. (1974). Characteristics of PRD1, a Plasmid-Dependent Broad Host Range DNA Bacteriophage. *Journal of Virology*, 14(3), 689–699.
233. O'Toole, G. and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), pp.295-304.
234. Pajunen M, Kiljunen S, Skurnik M: Bacteriophage phi YeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O : 3, is related to coliphages T3 and T7. *Journal of Bacteriology* 2000, 182:5114-5120.
235. Pastian, M.R., Bromel, M.C. (1984). Inclusion bodies in *Plesiomonas shigelloides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 216-218
236. Pasquale, V. and Krovacek, K. (2001). Isolamenti di *Plesiomonas shigelloides* da ambienti marini costieri. *Biologi Ital.* 6, 47-50.
237. Paterson, W. D., Douglas, R. J., Grinyer, I. McDermott, L. A. (1969). Isolation and preliminary characterization of some *Aeromonas salmonicida* bacteriophage. *J Fish Res Board Can* 26, 629–632.
238. Paul, J.,H, Kellogg, C.,A. (1998). The ecology of bacteriophages in nature. In: Hurst CJ (ed) *Viral ecology*. Academic, San Diego, pp. 211– 247
239. Payne, R. J. H., and V. A. A. Jansen. (2001). Understanding phage therapy as a density-dependent process. *J. Theor. Biol.* 208:37-48.
240. Payne, R.J., Jansen, V.A., (2003). Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 315–325.

241. Peoi.org. (2016). Introduction to botanyViruses. [online] Available at: <http://www.peoi.org/Courses/Coursesen/bot/frame12.html> [Accessed 30 Nov. 2016].
242. Perales I. (2012). Culture media for the isolation of *Aeromonas spp.* and *Plesiomonas shigelloides*, 451-481. In Corry, J., Curtis, G. and Baird, R. (2010). Handbook of culture media for food microbiology. 3rd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp.451-481.
243. Phageiary.com. (2016). Phageiary - Phi6 - Category: Phi6. [online] Available at: <https://phageiary.com/phage/phi6> [Accessed 25 Nov. 2016].
244. Poddar, S., Cadden, S., Das, J. and Maniloff, J. (1985). Heterogeneous Progeny Viruses Are Produced by a Budding Enveloped Phage. *Intervirolgy*, 23(4), pp.208-221.
245. Prakash, B., Veeregowda, B., Krishnappa, G. (2003). Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Curr. Sci.*, 85, 1299–1307.
246. Rahim, Z., and B.A. Kay. Enrichment for *Plesiomonas shigelloides* from stools. *J. Clin. Microbiol.* 26: 789- 90, 1988.
247. Rakonjac, J., Feng, J.N., and Model, P. (1999). Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a twostep mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII. *J Mol Biol* 289, 1253-1265.
248. Ramaiah, N., Hill, R. T., Chun, J., Ravel, J., Matte, M.H., Straube, W.L., Colwell, R.R. (2000). Use of a *chiA* probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay. *FEMS Microbiol Ecol.* 34: 63-71.
249. Ramalivhana, N. J. & Obi, C. L. (2009). *Plesiomonas shigelloides* in stool samples of patients in the Venda Region: Possible considerations on pathogenicity and antibiogram profiles. *African Journal of Biotechnology* , 8(22), 6388-6392.
250. Ramia, S., E. Neter and D.J. Brenner. 1982. Production of enterobacterial common antigen as an aid to classification of newly identified species of the families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 395–398.
251. Raya RR, Hebert EM. Isolation of Phage via Induction of Lysogens. U knjizi: Clokie MRJ, Kropinski AM, urednici. *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Vol. 1. New York, NY: Humana Press; 2009. str. 23–33.
252. Reinhardt JF, George WL. (1985). Comparative *in vitro* activities of selected antimicrobial agents against *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides*. *Antimicrob Agents Chemother.* 27:643-645.
253. Ripp, S. and Miller, R.V. (1997) The role of pseudolysogeny in bacteria–host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology* 143: 2065–2070.

254. Ripp, S. and Miller, R.V. (1998) Dynamics of pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 144: 2225–2232.
255. Rohrmann, G. F., Krueger, R. G. (1970). Physical, Biochemical, and Immunological Properties of Coliphage MS-2 Particles. *Journal of Virology*, 6(3), 269–279.
256. Rohwer, F., Prangishvili, D., Lindell, D. (2009), Roles of viruses in the environment. *Environmental Microbiology*, 11: 2771–2774.
257. Roig-Sagués, A., Hernández-Herrero, M., López-Sabater, E., Rodríguez-Jerez, J. and Mora-Ventura, M. (1997). Evaluation of three decarboxylating agar media to detect histamine and tyramine-producing bacteria in ripened sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 25(5), pp.309-312.
258. Rollof, J., Braconier, J., Söderström, C. and Nilsson-Ehle, P. (1988). Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 7(4), pp.505-510.
259. Ronner, A. B., and D. O. Cliver. 1990. Isolation and characterization of a coliphage specific for *Eschericia coli O157:H7*. *J. Food Protect.* 53:944-947.
260. Ross, A., Ward, S., & Hyman, P. (2016). More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1352.
261. Rountree, P. (1951). The Role of Certain Electrolytes in the Adsorption of Staphylococcal Bacteriophages. *Journal of General Microbiology*, 5(4), pp.673-680.
262. Rountree, P. (1955). The Role of Divalent Cations in the Multiplication of Staphylococcal Bacteriophages. *Journal of General Microbiology*, 12(2), pp.275-287.
263. Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M. & Christen, R. (1994). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 416-426.
264. Russel, M., Model, P. (2006). Filamentous phage. In R. L. Calendar and S. T. Abedon (eds.), *The Bacteriophages*, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press, pp. 146–60.
265. Rust, L., Messing, C.R. & Iglewski, B.H. (1994). Elastase assays. In *Methods in enzymology: bacterial pathogenesis. Part A: identification and regulation of virulence factors*, vol. 235. Ed. Clark, V.L. & Bavoil, P.M. Academic Press, London, Great Britain, pp. 554-562.
266. Sakazaki, R., Namioka, S., Nakaya, R. & Fukumi, H. (1959). Studies on so-called paracolony C27 (Ferguson). *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 12, 355-363.

267. Salerno, A., Delétoile, M., Lefevre, I., Ciznar, I., Krovacek, K., Grimont, P., et al. (2007). Recombining population structure of *Plesiomonas shigelloides* (*Enterobacteriaceae*) revealed by multilocus sequence typing. *J. Bacteriol.* 189, 7808–7818.
268. Salerno A, Čížnar I, Krovacek K, Conte M, Dumontet S, González-Rey C, Pasquale V. (2010). Phenotypic characterization and putative virulence factors of human, animal and environmental isolates of *Plesiomonas shigelloides*. *Folia Microbiol (Praha)* 55:641–647.
269. Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
270. Sambrook, J., Russell, D. (2006). Purification of Bacteriophage λ Particles by Isopycnic Centrifugation through CsCl Gradients. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb.prot3968. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot3968>
271. Santos J. A., Gonzalez C. J., Lopez T. M., Otero A., Garcia-Lopez M. L. (1999). Hemolytic and elastolytic activities influenced by iron in *Plesiomonas shigelloides*. *J. Food. Protection Dec*; 62(12):1475-1477
272. San Martín, C., Huiskonen, J., Bamford, J., Butcher, S., Fuller, S., Bamford, D., & Burnett, R. (2002). Minor proteins, mobile arms and membrane–capsid interactions in the bacteriophage PRD1 capsid. *Nature Structural Biology*, 9(10), 756-763. <http://dx.doi.org/10.1038/nsb837>
273. Sawle, G.V., Das, B.C., Acland, P.R. & Heath, D.A. 1986. Fatal infection with *Aeromonas sobria* and *Plesiomonas shigelloides*. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 292, 525-526.
274. Schlesinger, M. (1932). Über Die Bindung Des Bakteriophagen An Homologe Bakterien. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 114.1, pp. 149-160.
275. Schmelcher, M., Donovan, D. and Loessner, M. (2012). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), pp.1147-1171.
276. Schmid, E.E., Veludapillai, T., Niles, G.R. (1954). Study of paracolon organisms with the major antigen of *Shigella sonnei*, form I. *J. Bacteriol.* 68, 50-52.
277. Schmidt, W. C., Jeffries, C. D. (1974). Bacteriophage Typing of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Proteus morgani*. *Applied Microbiology*, 27(1), 47–53.
278. Schofield, D., Sharp, N. and Westwater, C. (2012). Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens. *Bacteriophage*, 2(2), pp.105-121.
279. Schrader, H., Schrader, J., Walker, J., Wolf, T., Nickerson, K. and Kokjohn, T. (1997). Bacteriophage infection and multiplication occur in *Pseudomonas aeruginosa* starved for 5 years. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(12), pp.1157-1163.

280. Schubert, R.H.W. 1977. Ueber den Nachweis von *Plesiomonas shigelloides* Habs und Schubert. 1962, und ein Elektivmedium, den inositol-Brillantgrun-Gallesalz-Agar. Ernst-Rodenwaldt-Arch. 4, 97-103.
281. Schubert, R.H.W. (1981). On the ecology of *Plesiomonas shigelloides*. Zentralbl Bakteriolog Hyg I Abt Orig A. 172: 528-533.
282. Schubert, R.H.W. & Beichert, R. 1993. The influence of treated sewage effluents on the numbers of *P. shigelloides* isolated from river waters. Hyg. Med. 18, 57-59.
283. Schubert, R.H.W. 1984. Genus IV. *Plesiomonas*. In Krieg and Holt (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st Ed., Vol. 1, The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 548–550.
284. Seed K. D., Dennis J. J. 2009. Experimental bacteriophage therapy increases survival of *Galleria mellonella* larvae infected with clinically relevant strains of the *Burkholderiacepacia* complex. Antimicrob. Agents Chemother. 53: 2205–2208.
285. 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.
286. Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, S.R. & Miller, G.H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycosidemodifying enzymes. Microbiol. Rev. Biochem. 14, 138-163.
287. Shepherd JG, Wang L, Reeves PR. 2000. Comparison of O-antigen gene clusters of *Escherichia coli* (*Shigella*) *sonnei* and *Plesiomonas shigelloides* O17: *sonnei* gained its current plasmid-borne O-antigen genes from *P. shigelloides* in a recent event. Infect Immun 68:6056–6061.
288. Sherry, S., Johnson, A. and Tillett, W. (1949). The action of streptococcal desoxyribose nuclease (streptodornase) in vitro and on purulent pleural exudations of patients 12. Journal of Clinical Investigation, 28(5 Pt 2), pp.1094-1104.
289. Shigematsu, M., Kaufmann, M., Charlett, A., Niho, Y., & Pitt, T. (2000). An Epidemiological Study of *Plesiomonas shigelloides* Diarrhoea among Japanese Travellers. Epidemiology and Infection, 125(3), 523-530.
290. Shimada, T. & Sakazaki, R. 1985. New O and H antigens and additional serovars of *Plesiomonas shigelloides*. Japan. J. Med. Sci. Biol. 38, 73-76.
291. Smith, P. B., Hancock, G. A. and Rhoden, D. L. (1977): Improved medium for detecting Deoxyribonuclease producing bacteria. Applied microbiology, Vol 18 (6) : 991-993.
292. Snyder, L., Peters, J.E., Henkin, T.M., Champness, W. (2014). Molecular genetics of bacteria. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, pp.281-282.
293. Steensma, H. Y. (1982) An Evaluation Of The Rate Constants For The Adsorption Of The Defective Phage PBS Z To *Bacillus Subtilis*". Antonie van Leeuwenhoek 48.2, pp. 183-188.

294. Stock I. (2004). *Plesiomonas shigelloides*: an emerging pathogen with unusual properties. *Rev Med Microbiol* 15:129–139.
295. Stock, I., Wiedemann, B. (2001). Natural antimicrobial susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* strains. *J Antimicrob Chemother.* 48:803-811.
296. Storms, Z.J., Sauvageau D. (2012). Evidence That The Heterogeneity Of A T4 Population Is The Result Of Heritable Traits. *PLoS ONE* 9.12 (2014): e116235.
297. Straus, D., Lonon, M. and Hutson, J. (1992). Inhibition of rat alveolar macrophage phagocytic function by a *Pseudomonas cepacia* lipase. *Journal of Medical Microbiology*, 37(5), pp.335-340.
298. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. and Morris, J. (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), pp.649-659.
299. Summers WC. (1999). *Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology*. New Haven, CT: Yale Univ. Press. 230 pp.
300. Summers, W. (2001). Bacteriophage Therapy. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), pp.437-451.
301. Surekhamol, I.S., Deepa, G.D., Somnath Pai, S., Sreelakshmi, B., Varghese, S. and Bright Singh, I.S. (2014). Isolation and characterization of broad spectrum bacteriophages lytic to *Vibrio harveyi* from shrimp farms of Kerala, India. *Lett Appl Microbiol*, 58: 197–204.
302. Tabatabai, L., Zimmerli, M., Zehr, E., Briggs, R., Tatum, F. (2010). *Ornithobacterium rhinotracheale* North American Field Isolates Express a Hemolysin-Like Protein. *Avian Diseases Digest*, 5(3), e21-e22. <http://dx.doi.org/10.1637/9490-907010-digest.1>
303. Taylor, S., Stratton, J. and Nordlee, J. (1989). Histamine Poisoning (Scombroid Fish Poisoning): An Allergy-Like Intoxication. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 27(4-5), pp.225-240.
304. Tepavčević, A., Lužanin, Z. (2006). *Matematičke metode u taksonomiji*, Departman za matematiku i informatiku, PMF, Univerzitet u Novom Sadu, 2006, 112 str.
305. Terpeluk C, Goldmann A, Bartmann P, Pohlandt F. (1992). *Plesiomonas shigelloides* sepsis and meningoenophalitis in a neonate. *Eur J Pediatr*;151:499-501.
306. Tetart, F., Desplats, C., Kutateladze, M., Monod, C., Ackermann, H. and Krisch, H. (2001). Phylogeny of the Major Head and Tail Genes of the Wide-Ranging T4-Type Bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, 183(1), pp.358-366.
307. Tillett, W., Sherry, S. and Christensen, L. (1948). Streptococcal Desoxyribonuclease: Significance in Lysis of Purulent Exudates and Production by Strains of Hemolytic Streptococci. *Experimental Biology and Medicine*, 68(1), pp.184-188.

308. Tippen, P. S., Meyer, A., Blank E. C., Donnell Jr H. D. (1989). Aquarium-associated *Plesiomonas shigelloides* infection. (Missouri). MMWR. 38(36): 617-619.
309. Torrella, F. and Morita, R.Y. (1979). Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. Appl. Environ. Microbiol. 37, 774–778.
310. Tseng, H. K., Liu, C. P., Li, W. C., Su, S. C., Lee, C. M. (2002). Characteristics of *Plesiomonas shigelloides* infection in Taiwan. Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi, 35(1), 47-52.
311. Tsukamoto, T., Kinoshita, Y., Shimada, T. & Sakazaki, R. 1978. Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. J. Hyg. (London) 80, 275-280.
312. Twort, F. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. The Lancet, 186(4814), pp.1241-1243.
313. Uchiyama J., Rashed M., Maeda Y., Takemura I., Sugihara S., Akechi K., Muraoka, A., Wakiguchi, H., Matsuzaki, S. (2008). Isolation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage ϕ EF24C as a therapeutic candidate. FEMS Microbiol. Lett. 278 200–206.
314. USEPA (2001). Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. EPA Number: EPA 821-R-01-029, April, 2001, Washington, DC.
315. Vandepitte J, Makudu A, Gatti, F. (1974). *Plesiomonas shigelloides*: Survey and possible association with diarrhoea in Zaire. Ann. Ass. Belg. Trop. Med. 54: 503-513.
316. Vasu, K. and Nagaraja, V. (2013). Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 77(1), pp.53-72.
317. Vladík, P., Vítovec J. (1974): *Plesiomonas shigelloides* in rainbow trout septicemia (*Plesiomonas shigelloides* v septikemii pstruha duhového). Vet. Med. (Praha), 19, 297 – 300.
318. Vinod M. G., Shivu M. M., Umesha K. R., Rajeeva B. C., Krohne G., Karunasagar I., Karunasagar I. (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture* 255 117–124.
319. Visitsunthorn, N., Komolpis, P. (1995). Antimicrobial therapy in *Plesiomonas shigelloides*-associated diarrhea in Thai children. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 26:86-90.
320. von Graevenitz, A., Bucher, C. (1982). The effect of N-formimidoyl thienamycin, ceftazidime, cefotiam, ceftriaxone and cefotaxime on non-fermentative gram-negative rods, *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Enterobacter* agglomerans. Infection. 10:293-298.
321. von Graevenitz A, Bucher C. 1983. Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* spp. from human feces. J Clin Microbiol 17:16–21.

322. Waldon, E., Sobiś-Glinkowska, M. and Szewczyk, E. (2002). Evaluation of selected features of *Staphylococcus cohnii* enabling colonization of humans. *Folia Microbiologica*, 47(5), pp.565-571.
323. Waldor, M. and Mekalanos, J. (1996). Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science*, 272(5270), pp.1910-1914.
324. Wang, J., Hu, B., Xu, M., Yan, Q., Liu, S., Zhu, X., Sun, Z., Reed, E., Ding, L. & other authors (2006). Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Med* 17, 309–317.
325. Wang X, Xu L, Cao H, Wang J, Wang S. 2013. Identification and drug sensitivity of a *Plesiomonas shigelloides* isolated from diseased sturgeons. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 53:723–729.
326. Weinbauer, M. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), pp.127-181.
327. Weinbauer, M., G., Agis, M., Bonilla-Findji, O., Malits, A., Winter, C. (2007). Bacteriophage in the environment. In S. McGrath, D. van Sinderen (eds) *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*, Horizon Press, pp. 61-91.
328. Whang, H.Y., M.E. Heller and E. Neter. 1972. Production by *Aeromonas* of common enterobacterial antigen and its possible taxonomic significance. *J. Bacteriol.* 110: 161–164.
329. Wiegand I, Burak S. Effect of inoculum density on susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* to cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:418-423.
330. Wilhelms, M., Fulton, K.M., Twine, S.M., Tomás, J.M., and Merino, S. (2012). Differential glycosylation of polar and lateral flagellins in *Aeromonas hydrophila* AH-3. *J. Biol. Chem.* 287, 27851–27862. doi: 10.1074/jbc.M112.376525
331. Villafane, R. (2009). Construction of Phage Mutants. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, urednici. *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Vol. 1. New York, NY: Humana Press; 2009. pp. 223–237.
332. Williamson, K., Radosevich, M., Wommack, K. (2005). Abundance and Diversity of Viruses in Six Delaware Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), pp.3119-3125.
333. Witte, A., Wanner, G., Bläsi, U., Halfmann, G., Szostak, M., Lubitz, W. (1990). Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phi X174 lysis protein E. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 4109–4114.
334. Wommack, K., Colwell, R. (2000). Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), pp.69-114.
335. Wong TY, Tsui HY, So MK, Lai JY, Tse CWS, Ng TK. (2000). *Plesiomonas shigelloides* infection in Hong Kong: retrospective study of 167 laboratory-confirmed cases. *Hong Kong Med J* 6:375–380.

336. Woo PCY, Lau SKP, Wong SSY, Yuen K-Y. Two cases of continuous ambulatory peritoneal dialysis-associated peritonitis due to *Plesiomonas shigelloides*. J Clin Microbiol 2004;42:933-935.
337. Woods, T. L., Israel, H. W., Sherf, A. F. (1981): Isolation and partial characterization of a bacteriophage of *Erwinia stewartii* from the corn flea beetle *Chaetocnema pulicaria*. Protection Ecology, 3: 229–36.
338. Wu, X., Lu, Y., Zhou, S., Chen, L., Xu, B. (2016). Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. Environment International, 86, 14-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.007>
339. Www3.nd.edu. (2016). Electron micrograph of the filamentous bacteriophage M13. [online] Available at: <https://www3.nd.edu/~aseriann/CHAP5B.html/sld087.htm> [Accessed 25 Nov. 2016].
340. Yarmolinsky, M. B., Sternberg, N. (1988). Bacteriophage P1. In The bacteriophages (pp. 291-438). Springer US.
341. Yoshida, M., Nakamura, N., Horikoshi, K. (1998). Production of trehalose by a dual enzyme system of immobilized maltose phosphorylase and trehalose phosphorylase. Enzyme Microb. Technol. 22, 71-75.
342. Yoshinaga, D. H., Frank, H. A. (1982). Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Applied and Environmental Microbiology, 44(2), 447–452.
343. Young, R. (1992). Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiological Reviews, 56(3), 430–481.
344. Young, R., Wang, I. and Roof, W. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. Trends in Microbiology, 8(3), pp.120-128.
345. Yu P., Mathieu J., Li M., Dai Z., Alvarez P. J. (2016). Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple-host approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 82 808–815.
346. Yu, M., Slater, M., Ackermann, H. (2005). Isolation and characterization of Thermus bacteriophages. Archives Of Virology, 151(4), 663-679.
347. Zakhariyev, Z. A. (1971). *Plesiomonas shigelloides* isolated from sea water. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 15, 402-404.
348. Zhilenkov, E., Popova, V., Popov, D., Zavalsky, L., Svetoch, E., Stern, N., Seal, B. (2006). The ability of flagellum-specific *Proteus vulgaris* bacteriophage PV22 to interact with *Campylobacter jejuni* flagella in culture. Virology Journal, 3, 50.

8. PRILOZI

Prilog 1. Biohemijske karakteristike *P. shigelloides* (Janda, 2005)

test	reakcija	test	reakcija
Oksidaza	+	Fermentacija D-galaktoze	V
Katalaza	+	Fermentacija glicerola	V
Pokretljivost	+	Fermentacija laktoze	V
Ornitin dekarboksilaza	+	Fermentacija D-manoze	V
Lizin dekarboksilaza	+	Fermentacija melobioze	V
Arginin dihidrolaza	+	Fermentacija salicina	V
Metil red test	+	Fermentacija adonitola	-
Voges-Proskauer	-	Fermentacija L-arabinoze	-
Hidroliza uree	-	Fermentacija celobioze	-
Hidroliza ONPG*-a	+	Fermentacija dekstrina	-
Redukcija NO ₃ do NO ₂	+	Fermentacija galaktitola	-
Korišćenje citrata	-	Fermentacija D-manitola	-
Korišćenje malonata	-	Fermentacija melezitoe	-
Korišćenje galaktarata	-	Fermentacija D-sorbitola	-
Korišćenje acetata	V	Fermentacija saharoze	-
Fermentacija D-glukoze	+	Fermentacija L-ramnoze	-
Produkcija gasa u toku fermentacije D-glukoze	-	Fermentacija D-ksiloze	-
Fermentacija m-inozitola	+	Likvefakcija želatina	-
Fermentacija maltoze	+	Hidroliza tirozina	-
Fermentacija trehaloze	+	Deoksiribonukleazna aktivnost	-

* - o-nitrofenil-b-galaktopiranozid

V – varijabilna osobina

Prilog 2. Izolovani sojevi *P. shigelloides* (rezultati bojenja po Gramu i biohemijskih testova)

test oznaka soja	reakcija po Gramu	oksidaza test	katalaza test	produkcija indola	hidroliza želatina	korišćenje citrata	fermentacija glukoze	fermentacija inozitola	fermentacija sorbitola	fermentacija saharoze	fermentacija maltoze	fermentacija arabinoze
2ŠD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
1 LD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
2LD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
6PAND	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
4PAND	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
1KD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
8KD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
1PECD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
4PECD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
2KRD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
5KRD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
6KRD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
2PD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
1KOVD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
4KOVD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
2DD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
5DD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
2VD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
8VD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
2BD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
4BD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
6HERD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
9HERD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
7SD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
3ŠELD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
1ZD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
3ZD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
5ZD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
1PAD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
2ORFD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
14ORFD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
2JD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
5JD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
4ČD	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
DBPM1	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
D737A2	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-
DBPM2	G-	+	+	+	-	-	+ / gas -	+ / gas -	-	-	+ / gas -	-

Prilog 3. Broj amplifikata po sojevima dobijen nakon RAPD-PCR metode

Soj	prajmer	Broj traka						Soj	prajmer	Broj traka					
		K01	OPB11	OPM10	OPA07	OPN02	Σ			K01	OPB11	OPM10	OPA07	OPN02	Σ
2ŠD		2	5	0	2	3	12	4BD		1	4	6	1	0	12
1LD		2	2	6	0	5	15	6HERD		3	5	7	3	3	21
2LD		2	5	7	3	5	22	9HERD		1	7	6	8	9	31
6PAND		1	2	2	1	3	9	7SD		3	5	0	2	2	12
4PAND		3	6	9	4	5	27	3ŠELD		1	7	2	4	2	16
1KD		2	6	6	4	2	20	1ZD		1	4	1	5	2	13
8KD		2	3	2	1	2	10	3ZD		4	7	6	3	4	24
1PECD		1	0	2	3	4	10	5ZD		2	3	3	1	0	9
4PECD		1	4	4	4	4	17	1PAD		3	9	4	1	3	20
2KRD		1	2	3	5	2	13	2ORFD		3	3	5	1	4	16
5KRD		0	2	2	2	3	9	14ORFD		3	7	5	1	4	20
6KRD		1	2	1	5	2	11	2JD		1	4	6	1	0	12
2PD		1	2	2	1	2	8	5JD		3	5	2	1	5	16
1KOVD		2	8	8	0	6	24	4ČD		4	5	2	4	3	18
4KOVD		1	4	4	5	2	16	DBPM1		2	4	1	2	3	12
2DD		3	4	3	5	5	20	D737A2		1	4	2	4	1	12
5DD		0	3	4	1	1	9	DBPM2		3	4	7	5	1	20
2VD		1	5	6	1	3	16	ATCC51903		2	2	4	6	1	15
8VD		2	14	4	2	5	27	ATCC14029		2	4	4	4	0	14
2BD		8	8	6	6	7	35								

Prilog 4. Matrica genetičke sličnosti po Žakarovu (nastavak)

	11D	7SD	1PAD	2VD	4PECD	6HERD	2PD	14ORFD	2DD	2SHD	2BD	2KRD	6PAND	ATCC519	4BD	3SHELD	4CHD	4KOVD	6KRD	
11D																				
7SD	1	0.038																		
1PAD		1	0.067																	
2VD			1	0.059																
4PECD				1	0.138															
6HERD					1	0.056														
2PD						1	0.074													
14ORFD							1	0.037												
2DD								1	0.212											
2SHD									1	0.100										
2BD										1	0.091									
2KRD											1	0.143								
6PAND												1	0.294							
ATCC519													1	0.294						
4BD														1	0.143					
3SHELD															1	0.038				
4CHD																1	0.120			
4KOVD																	1	0.097		
6KRD																		1	0.080	
5ZD																				1
8VD																				
1KD																				
2LD																				
9HERD																				
1PECD																				
1KOVD																				
5DD																				
4PAND																				
2ORFD																				
2JD																				
3ZD																				
5JD																				
1ZD																				
DBPM2																				
D737A2																				
ATCC140																				
5KRD																				
8KD																				
DBPM1																				

Prilog 5. Kinetika hemolize (bakterijske suspenzije)

prvo ponavljanje (bakterijska suspenzija) %						
	2DD	2KRD	ATCC501903	4KOVD	1KD	9HERD
1h	3,028118	1,153569	2,883922134	1,730353	0,576784427	3,31651
2h	3,604903	1,009373	3,316510454	2,162942	0,720980534	3,028118
3h	2,739726	0,865177	3,316510454	2,451334	1,73035328	3,604903
5h	4,037491	1,730353	6,633020908	3,172314	2,018745494	3,604903
10h	4,037491	1,874549	7,209805335	3,749099	2,307137707	4,470079
24h	7,209805	3,893295	8,363374189	5,335256	4,902667628	5,19106

drugo ponavljanje (bakterijska suspenzija) %						
	2DD	2KRD	ATCC501903	4KOVD	1KD	9HERD
1h	2,883922	1,441961	3,460706561	1,009373	1,297765	2,307138
2h	3,172314	1,586157	4,037490988	1,009373	1,153569	2,739726
3h	3,460707	1,586157	4,325883201	2,59553	2,018745	3,749099
5h	4,614275	2,307138	5,912040375	2,59553	2,018745	2,883922
10h	5,335256	3,31651	6,344628695	1,874549	2,451334	4,614275
24h	7,78659	5,335256	8,219178082	3,893295	3,460707	6,056236

prosek (bakterijska suspenzija) %						
	2DD	2KRD	ATCC51903	4KOVD	1KD	9HERD
1h	2,95602	1,297765	3,172314348	1,369863	0,937275	2,811824
2h	3,388609	1,297765	3,677000721	1,586157	0,937275	2,883922
3h	3,100216	1,225667	3,821196828	2,523432	1,874549	3,677001
5h	4,325883	2,018745	6,272530642	2,883922	2,018745	3,244412
10h	4,686373	2,59553	6,777217015	2,811824	2,379236	4,542177
24h	7,498198	4,614275	8,291276136	4,614275	4,181687	5,623648
standardna devijacija (bakterijska suspenzija) %						
	2DD	2KRD	ATCC51903	4KOVD	1KD	9HERD
1h	0,101962	0,203924	0,407848179	0,50981	0,50981	0,713734
2h	0,305886	0,407848	0,509810224	0,815696	0,305886	0,203924
3h	0,50981	0,50981	0,713734314	0,101962	0,203924	0,101962
5h	0,407848	0,407848	0,509810224	0,407848	0	0,50981
10h	0,917658	1,01962	0,611772269	1,325507	0,101962	0,101962
24h	0,407848	1,01962	0,101962045	1,01962	1,01962	0,611772

Prilog 5. Kinetika hemolize (bakterijski supernatanti)

prvo ponavljanje (supernatant) %						
	2DD	2KRD	ATCC501903	4KOVD	1KD	9HERD
1h	6,056236	2,307138	1,730353	0,432588	0	0
2h	14,8522	7,498198	4,470079	2,451334	1,586157	4,181687
3h	37,49099	24,80173	10,67051	2,451334	7,78659	14,27541
5h	57,53425	53,78515	46,28695	4,470079	51,9106	39,07714
10h	94,88104	82,91276	92,4297	12,97765	98,34174	76,42394
24h	96,89978	97,76496	102,235	66,18601	99,06273	91,13194

drugo ponavljanje (supernatant) %						
	2DD	2KRD	ATCC501903	4KOVD	1KD	9HERD
1h	5,767844	2,307138	1,874549	0	0,720981	0,432588
2h	14,56381	8,940159	4,758472	1,441961	1,730353	2,59553
3h	37,2026	26,53208	9,228551	1,586157	6,633021	14,8522
5h	57,10166	55,22711	46,86373	3,172314	52,48738	40,37491
10h	94,73684	84,93151	90,98774	14,41961	99,06273	74,98198
24h	95,45782	96,75559	100,9373	67,19539	100,0721	90,41096

prosek (supernatant) %						
	2DD	2KRD	ATCC501903	4KOVD	1KD	9HERD
1h	5,91204	2,307138	1,802451	0,216294	0,36049	0,216294
2h	14,708	8,219178	4,614275	1,946647	1,658255	3,388609
3h	37,34679	25,66691	9,949531	2,018745	7,209805	14,56381
5h	57,31795	54,50613	46,57534	3,821197	52,19899	39,72603
10h	94,80894	83,92213	91,70872	13,69863	98,70224	75,70296
24h	96,1788	97,26027	101,5862	66,6907	99,56741	90,77145
standardna devijacija (supernatant) %						
	2DD	2KRD	ATCC501903	4KOVD	1KD	9HERD
1h	0,203924	7,23E-15	0,101962	0,305886	0,50981	0,305886
2h	0,203924	1,01962	0,203924	0,713734	0,101962	1,121582
3h	0,203924	1,223545	1,01962	0,611772	0,815696	0,407848
5h	0,305886	1,01962	0,407848	0,917658	0,407848	0,917658
10h	0,101962	1,427469	1,01962	1,01962	0,50981	1,01962
24h	1,01962	0,713734	0,917658	0,713734	0,713734	0,50981

Prilog 6. Osetljivost *P. shigelloides* sojeva na ampicilin (AM), amoksicilin (AX), amoksicilin/klavulansku kiselinu (AMC), cefoksitin (FOX), cefotaksim (CTX), ceftazidim (CAZ), imipenem (IPM), streptomycin (S), neomicin (N), kanamicin (K).

Naziv soja	antibiotici																			
	AM 10µg		AX 25µg		AMC 20/10 µg		FOX 30µg		CTX 30µg		CAZ 30µg		IPM 10µg		S 300 µg		N 30µg		K 30µg	
	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K
2ŠD	8	R	14	I	18	S	22	S	32	S	25	S	30	S	20	S	14	I	18	S
1LD	6	R	18	S	17	I	26	S	35	S	28	S	30	S	24	S	15	I	18	S
2LD	6	R	14	I	22	S	25	S	37	S	30	S	31	S	23	S	16	I	19	S
6PAND	7	R	17	S	16	I	22	S	35	S	28	S	28	S	23	S	15	I	18	S
4PAND	6	R	11	R	16	I	24	S	35	S	28	S	30	S	21	S	14	I	18	S
1KD	7	R	7	R	16	I	21	S	35	S	30	S	31	S	22	S	14	I	18	S
8KD	6	R	11	R	21	S	23	S	34	S	29	S	28	S	23	S	16	I	18	S
1PECD	7	R	10	R	20	S	23	S	37	S	30	S	28	S	25	S	16	I	19	S
4PECD	10	R	6	R	18	S	21	S	37	S	28	S	28	S	21	S	14	I	17	I
2KRD	6	R	14	R	19	S	23	S	36	S	28	S	28	S	24	S	15	I	16	I
5KRD	7	R	15	I	18	S	22	S	37	S	29	S	32	S	23	S	16	I	19	S
6KRD	7	R	18	S	19	S	23	S	37	S	29	S	29	S	22	S	14	I	19	S
2PD	7	R	16	I	21	S	20	S	38	S	31	S	32	S	22	S	15	I	17	I
1KOVD	7	R	18	S	20	S	24	S	39	S	30	S	32	S	24	S	18	S	19	S
4KOVD	13	R	14	I	17	I	21	S	34	S	27	S	29	S	21	S	13	I	18	S
2DD	7	R	13	I	16	I	25	S	33	S	27	S	28	S	23	S	15	I	18	S
5DD	7	R	17	S	20	S	23	S	36	S	30	S	30	S	24	S	15	I	18	S
2VD	6	R	15	I	16	I	23	S	35	S	26	S	28	S	21	S	17	S	18	S
8VD	7	R	15	I	18	S	23	S	33	S	27	S	29	S	22	S	17	S	18	S
2BD	7	R	11	R	17	I	23	S	34	S	28	S	30	S	20	S	19	S	16	I
4BD	6	R	15	I	18	S	22	S	34	S	28	S	28	S	21	S	13	I	17	I
6HERD	7	R	15	I	17	I	24	S	36	S	28	S	34	S	23	S	14	I	18	S
9HERD	15	I	18	S	23	S	23	S	39	S	33	S	32	S	21	S	16	I	22	S
7SD	6	R	15	I	20	S	24	S	38	S	30	S	34	S	23	S	15	I	16	I
3ŠELD	6	R	14	I	17	I	23	S	35	S	28	S	29	S	21	S	13	I	17	I
1ZD	7	R	19	S	20	S	21	S	35	S	31	S	29	S	24	S	21	S	18	S
3ZD	7	R	16	I	21	S	23	S	39	S	32	S	30	S	25	S	16	I	18	S
5ZD	7	R	15	I	18	S	23	S	35	S	26	S	29	S	21	S	18	I	17	I
1PAD	10	R	17	S	18	S	20	S	34	S	28	S	27	S	21	S	15	I	19	S
2ORFD	7	R	15	I	21	S	22	S	37	S	31	S	29	S	24	S	16	I	18	S
14ORFD	10	R	12	R	19	S	24	S	34	S	29	S	30	S	25	S	15	I	19	S
2ID	18	S	25	S	25	S	24	S	38	S	30	S	30	S	24	S	16	I	17	I
5JD	10	R	15	R	16	I	21	S	31	S	26	S	28	S	22	S	15	I	18	S
4ČD	7	R	20	S	19	S	24	S	35	S	27	S	30	S	24	S	15	I	19	S
DBPM1	6	R	6	R	16	I	19	S	31	S	28	S	25	S	20	S	14	I	14	I
D737A2	14	I	19	S	17	I	21	S	34	S	29	S	31	S	24	S	15	I	20	S
DBPM2	11	R	18	S	16	I	24	S	34	S	27	S	30	S	22	S	17	S	18	S

φ - prečnik zone inhibicije; K – interpretativna kategorija; S – osetljiv; I – umereno osetljiv; R – rezistentan

Prilog 6 (nastavak). Osetljivost *P. shigelloides* sojeva na gentamicin (CN), netilmicin (NET), tobramicin (TOB), amikacin (AK), tetraciklin (TE), doksiciklin (DO), aztreonam (ATM), ciprofloksacin (CIP), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), hloramfenikol (C)

Naziv soja	antibiotici																			
	CN 10µg		NET 30µg		TOB 10µg		AK 30µg		TE 30µg		DO 30µg		ATM 30µg		CIP 5µg		SXT 1,25/23,75 µg		C 30µg	
	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K	φ	K
2ŠD	15	S	20	S	17	S	16	I	29	S	34	S	32	S	34	S	30	S	31	S
1LD	18	S	21	S	17	S	19	S	32	S	31	S	35	S	35	S	26	S	33	S
2LD	17	S	22	S	20	S	20	S	31	S	31	S	36	S	38	S	27	S	35	S
6PAND	16	S	19	S	18	S	18	S	29	S	33	S	33	S	32	S	28	S	31	S
4PAND	15	S	20	S	19	S	17	S	31	S	32	S	34	S	37	S	30	S	32	S
1KD	14	I	20	S	18	S	19	S	30	S	31	S	35	S	36	S	30	S	32	S
8KD	18	S	21	S	18	S	18	S	30	S	31	S	35	S	32	S	28	S	31	S
1PECD	19	S	23	S	22	S	22	S	30	S	31	S	35	S	37	S	30	S	35	S
4PECD	17	S	22	S	18	S	19	S	29	S	28	S	32	S	38	S	22	S	29	S
2KRD	18	S	22	S	18	S	19	S	28	S	31	S	32	S	32	S	21	S	35	S
5KRD	17	S	20	S	19	S	19	S	30	S	32	S	38	S	33	S	28	S	37	S
6KRD	17	S	20	S	17	S	18	S	30	S	30	S	34	S	39	S	27	S	35	S
2PD	15	S	21	S	17	S	18	S	30	S	33	S	39	S	35	S	32	S	37	S
1KOVD	17	S	22	S	19	S	21	S	33	S	32	S	37	S	36	S	27	S	35	S
4KOVD	15	S	18	S	18	S	18	S	28	S	29	S	34	S	36	S	23	S	32	S
2DD	16	S	21	S	18	S	18	S	30	S	30	S	32	S	33	S	28	S	30	S
5DD	17	S	22	S	19	S	19	S	29	S	29	S	36	S	35	S	23	S	32	S
2VD	6	R	21	S	15	S	18	S	28	S	32	S	30	S	30	S	25	S	30	S
8VD	14	I	21	S	16	S	18	S	31	S	31	S	33	S	36	S	27	S	31	S
2BD	14	I	19	S	17	S	17	S	28	S	32	S	35	S	32	S	28	S	32	S
4BD	15	S	18	S	18	S	18	S	28	S	32	S	34	S	32	S	25	S	34	S
6HERD	15	S	20	S	19	S	20	S	30	S	29	S	36	S	37	S	28	S	34	S
9HERD	18	S	23	S	20	S	21	S	32	S	35	S	39	S	40	S	33	S	35	S
7SD	16	S	21	S	18	S	19	S	30	S	34	S	37	S	39	S	30	S	37	S
3ŠELD	15	S	19	S	16	S	16	I	30	S	32	S	35	S	34	S	29	S	34	S
1ZD	17	S	21	S	18	S	18	S	29	S	32	S	34	S	36	S	28	S	34	S
3ZD	17	S	22	S	18	S	19	S	30	S	32	S	37	S	36	S	27	S	35	S
5ZD	14	I	18	S	17	S	17	S	30	S	31	S	31	S	33	S	26	S	30	S
1PAD	17	S	21	S	18	S	18	S	31	S	30	S	35	S	35	S	25	S	34	S
2ORFD	18	S	21	S	19	S	19	S	29	S	34	S	35	S	36	S	27	S	32	S
14ORFD	20	S	25	S	19	S	19	S	31	S	30	S	35	S	35	S	28	S	35	S
2JD	18	S	21	S	18	S	20	S	29	S	30	S	36	S	35	S	28	S	34	S
5JD	16	S	19	S	18	S	18	S	28	S	32	S	31	S	29	S	23	S	33	S
4ČD	17	S	22	S	19	S	20	S	30	S	32	S	36	S	32	S	28	S	30	S
DBPM1	16	S	19	S	16	S	17	S	25	S	29	S	33	S	28	S	27	S	31	S
D737A2	18	S	21	S	18	S	19	S	32	S	15	S	35	S	34	S	28	S	34	S
DBPM2	16	S	19	S	19	S	18	S	30	S	33	S	34	S	35	S	25	S	32	S

φ - prečnik zone inhibicije (mm) ; K – interpretativna kategorija; S – osetljiv; I – umereno osetljiv; R – rezistentan

Prilog 7. Ispitivanje *in vitro* efikasnosti faga

PSH10				
vreme (h)	kontrola	MOI1	MOI10	MOI100
0	0,0575	0,0581	0,0578	0,0584
1	0,0581	0,0587	0,0574	0,0590
2	0,0612	0,0586	0,0579	0,0579
3	0,0586	0,0581	0,0580	0,0589
4	0,0603	0,0587	0,0589	0,0581
5	0,0676	0,0656	0,0652	0,0592
6	0,0770	0,0912	0,0890	0,0589
7	0,1700	0,2010	0,1903	0,0637
8	0,3494	0,3668	0,3659	0,0789
9	0,4071	0,4326	0,4284	0,1552
10	0,4665	0,4669	0,2192	0,3570
11	0,5316	0,3637	0,1359	0,4465
12	0,6278	0,2206	0,1529	0,1277
13	0,6333	0,2300	0,1654	0,1244
14	0,6417	0,2420	0,1733	0,1302
15	0,6578	0,2484	0,1864	0,1325
16	0,6735	0,2577	0,1943	0,1375
20	0,6646	0,2850	0,2863	0,1975

PSHAB1				
vreme (h)	kontrola	MOI1	MOI10	MOI100
0	0,0577	0,0583	0,0583	0,0586
1	0,0576	0,0579	0,0584	0,0593
2	0,0577	0,0577	0,0588	0,0593
3	0,0578	0,0584	0,0582	0,0594
4	0,0580	0,0588	0,0589	0,0591
5	0,0632	0,0665	0,0648	0,0586
6	0,0843	0,1001	0,0878	0,0585
7	0,1713	0,2249	0,1783	0,0585
8	0,3589	0,3793	0,3610	0,0616
9	0,4227	0,4321	0,4280	0,0789
10	0,5086	0,2101	0,2596	0,1655
11	0,5847	0,1859	0,2093	0,3587
12	0,6657	0,1902	0,2381	0,4088
13	0,6635	0,1844	0,2505	0,1290
14	0,6784	0,1892	0,2598	0,1292
15	0,6806	0,2003	0,2714	0,1364
16	0,6920	0,2030	0,2751	0,1418
20	0,6773	0,2782	0,3685	0,2097

PSHPP1				
vreme (h)	kontrola	MOI1	MOI10	MOI100
0	0,0581	0,0590	0,0581	0,0586
1	0,0588	0,0589	0,0584	0,0584
2	0,0583	0,0590	0,0585	0,0582
3	0,0587	0,0593	0,0588	0,0587
4	0,0596	0,0608	0,0612	0,0589
5	0,0654	0,0715	0,0729	0,0642
6	0,0883	0,1200	0,1245	0,0849
7	0,1753	0,2707	0,2874	0,1647
8	0,3613	0,4132	0,4233	0,3531
9	0,4710	0,5390	0,5579	0,4756
10	0,5891	0,6738	0,6965	0,4394
11	0,6951	0,8123	0,3570	0,3029
12	0,7565	0,6652	0,3585	0,3068
13	0,7878	0,5640	0,4067	0,3437
14	0,8407	0,5776	0,4407	0,3731
15	0,8421	0,5841	0,4658	0,4034
16	0,8315	0,5840	0,4810	0,4344
20	0,7510	0,5625	0,5150	0,4986

BIOGRAFIJA



Milivoje Petrušić je rođen 4. januara 1984. u Novom Sadu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Za vreme osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja učestvovao je na smotrama naučno – istraživačkih radova i pohađao seminare iz oblasti mikrobiologije u Naučno – Istraživačkoj stanici Petnica. Prirodno – matematički fakultet u Novom Sadu, smer diplomirani biolog upisao je 2004. godine. Godine 2009. je diplomirao sa prosečnom ocenom 8.78, a diplomski rad pod nazivom: „Izolacija *Pseudomonas aeruginosa* bakteriofaga širokog litičkog spektra“ odbranio je sa ocenom 10. Master studije iz oblasti mikrobiologije upisuje 2009. godine. Tokom studija učestvuje u istraživanjima katedre za mikrobiologiju u oblasti bakteriologije i izolacije i karakterizacije bakteriofaga.

Od 2011. godine je zaposlen na projektu Prirodno-matematičkog fakulteta pod nazivom „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvor novih lekova i dijetetskih suplemenata“ broj OI 172058 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, čiji je rukovodilac prof. dr Neda Mimica-Dukić. Godine 2013. bira se u zvanje asistenta na katedri za mikrobiologiju na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Od 2011 do 2017. učestvuje u izvođenju praktične nastave iz predmeta Osnove mikrobiologije, Ekologija mikroorganizama, Mikrobiologija u zaštiti životne sredine, Virusologija, Bakteriologija, Patogeni mikroorganizmi, Biofilmovi, Biologija bakteriofaga i Mikrobiološki praktikum. Učestvovao je u realizaciji četiri nacionalna i dva međunarodna projekta. Koautor je dva rada objavljena u međunarodnim časopisima i jednog rada u vodećem nacionalnom časopisu. Pored toga, koautor je više saopštenja na skupovima od međunarodnog i nacionalnog značaja.

Od 2011. godine član je Društva mikrobiologa Srbije i Evropskog društva mikrobiologa (*The Federation of European Microbiological Societies*). Dva puta je bio dobitnik stipendije Evropskog društva mikrobiologa za učešće na kongresima evropskih mikrobiologa.



UNIVERZITET U NOVOM SADU • Prirodno-matematički fakultet
21000 NOVI SAD, Trg Dositeja Obradovića 3

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj, RBR:			
Identifikacioni broj, IBR:			
Tip dokumentacije, TD:	Monografska		
Tip zapisa, TZ:	Tekstualni štampani materijal		
Vrsta rada, VR:	Doktorska disertacija		
Autor, AU:	Milivoje Petrušić		
Mentor, MN:	Dr Dragan Radnović, redovni profesor Dr Sava Lazić, naučni savetnik		
Naslov rada, NR:	Prisustvo bakterije <i>Plesiomonas shigelloides</i> u površinskim vodama Panonske nizije i izolacija i karakterizacija njenih specifičnih faga		
Jezik publikacije, JP:	Srpski (latinica)		
Jezik izvoda, JI:	Srpski/Engleski		
Zemlja publikovanja, ZP:	Republika Srbija		
Uže geografsko područje, UGP:	Vojvodina		
Godina, GO:	2017.		
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/strana/citata/tabela/slika/grafika/p riloga	poglavlja (8); str. (150); tabela (24); grafikona (12); slika (36); lit. navoda (348); priloga (7)		
Naučna oblast, NO:	Biologija		
Naučna disciplina, NU:	Mikrobiologija		
Predmetna odrednica/Ključne reči, PO:	<i>Plesiomonas shigelloides</i> , površinske vode, bakteriofagi, izolacija, karakterizacija		
UDK			
Čuva se, ČU:	Biblioteka Dept. za biologiju i ekologiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad		
Važna napomena, VN:			
Izvod, IZ:	U ovom radu vršena je izolacija sojeva <i>P. shigelloides</i> iz uzoraka površinskih voda Panonske nizije i formirana je kolekcija kultura, nakon čega je obavljena karakterizacija faktora virulencije i antibiotske rezistencije izolovanih sojeva. Pored toga vršena je izolacija bakteriofaga specifičnih za vrstu <i>P. shigelloides</i> iz uzoraka površinskih i otpadnih voda kao i njihova karakterizacija. Karakterizacija je podrazumevala sledeće testove: ispitivanje efikasnosti lize, litičkog spektra, uticaja različitih ekoloških faktora, određivanje proteinskog profila i karakterizaciju genoma. Pored toga, vršena je detekcija izolovanih bakteriofaga korišćenjem protočnog citometra. Rezultati ovog rada su potvrdili prisustvo bakterije <i>P. shigelloides</i> i njenih specifičnih bakteriofaga u površinskim vodama Panonske nizije. Budući da su bakteriofagi specifični za vrstu <i>P. shigelloides</i> po prvi put izolovani, rezultati ovog rada mogu predstavljati prvi korak u ispitivanjima vezanim za regulaciju brojnosti ove bakterije putem primene bakteriofaga.		
Datum prihvatanja teme, DP:	31.03.2016.		
Datum odbrane, DO:			
Članovi komisije, KO:	Predsednik:	Dr Maja Karaman, vanr.prof., PMF Novi Sad	Potpis mentora
	Član, mentor	Dr Dragan Radnović, red prof. PMF Novi Sad	
	Član, mentor	Dr Sava Lazić, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad"	
	Član	Dr Ivica Tamaš, naučni saradnik, PMF Novi Sad	



KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :			
Identification number, INO :			
Document type, DT :	Monograph type		
Type of record, TR :	Printed text		
Contents code, CC :	PhD Thesis		
Author, AU :			
Mentor, MN :	Dr Dragan Radnović Dr Sava Lazić		
Title, TI :	Presence of <i>Plesiomonas shigelloides</i> and its corresponding bacteriophages in surface waters of the Pannonian Plain		
Language of text, LT :	Serbian		
Language of abstract, LA :	Serbian/English		
Country of publication, CP :	Serbia		
Locality of publication, LP :	Vojvodina		
Publication year, PY :	2017.		
Publisher, PB :	Author's reprint		
Publication place, PP :	Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, Trg Dositeja Obradovića 2		
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	Chapters (8), pages (150), ref. (348), tables (24), pictures (36), graphs (12), appendixes (7)		
Scientific field, SF :	Biology		
Scientific discipline, SD :	Microbiology		
Subject/Key words, S/KW :	<i>Plesiomonas shigelloides</i> , surface waters, bacteriophages, isolation, characterisation		
UC			
Holding data, HD :	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia		
Note, N :	No		
Abstract, AB :	We analyzed surface waters collected in Panonian plane, for the presence of bacterium <i>P. shigelloides</i> . The bacterial strains were preserved and characterized for virulence factors and antibiotic resistance. In addition, isolation of <i>P. shigelloides</i> specific bacteriophages was performed. Characterization of isolated phages included the following tests: examination of lytic efficacy, lytic spectrum, the influence of various ecological factors, the determination of the protein profile and the characterization of the genome. In addition, isolated bacteriophages were detected using a flow cytometer. The results of this paper demonstrate that the surface waters of Panonian plane contain bacterium <i>P. shigelloides</i> and its specific bacteriophages. Since <i>P. shigelloides</i> – specific bacteriophages are for the first time isolated, the results of this paper can represent the first step in the studies related to the regulation of the number of this bacterium by the application of bacteriophages.		
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	31.03.2016.		
Defended on, DE :			
Defended Board, DB :	President:	Dr Maja Karaman, assoc. Prof., Faculty of Science Novi Sad	Mentor's signature
	Member:	Dr Dragan Radnović, full Prof. Faculty of Science, Novi Sad	
	Member	Dr Sava Lazić, principal researcher fellow, Scientific Veterinary Institute "Novi Sad"	
	Member, Mentor	Dr Ivica Tamaš, Research Associate, Faculty of Science Novi Sad	