

**MASARYKOVA  
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Charakterizace  
mechanismů vedoucích  
k synergickému  
terapeutickému efektu  
fágů a antibiotik proti  
stafylokokovým  
infekcím**

Diplomová práce

**FILIP KŘIVÁK**

Vedoucí práce: Mgr. Tibor Botka, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

Program Mikrobiologie

Brno 2023



**MUNI**  
**SCI**

## Bibliografický záznam

<b>Autor:</b>	FILIP KŘIVÁK Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
<b>Název práce:</b>	Charakterizace mechanismů vedoucích k synergickému terapeutickému efektu fágů a antibiotik proti stafylokokovým infekcím
<b>Studijní program:</b>	Mikrobiologie
<b>Vedoucí práce:</b>	Mgr. Tibor Botka, Ph.D.
<b>Rok:</b>	2023
<b>Počet stran:</b>	117
<b>Klíčová slova:</b>	Synergický efekt antibiotik a bakteriofágů, PAS, mechanismy PAS, Staphylococcus aureus, stafylokoková infekce, antibiotická rezistence

## Bibliographic record

**Author:** FILIP KŘIVÁK  
Faculty of Science  
Masaryk University  
Department of Experimental Biology

**Title of Thesis:** Characterization of mechanisms leading to a synergistic therapeutic effect of phages and antibiotics against staphylococcal infections

**Degree Programme:** Microbiology

**Supervisor:** Mgr. Tibor Botka, Ph.D.

**Year:** 2023

**Number of Pages:** 117

**Keywords:** Phage-Antibiotic Synergy, PAS, mechanisms of PAS, Staphylococcus aureus, staphylococcal infection, antibiotic resistance

## Abstrakt

Vzhledem k rostoucí hrozbě post-antibiotické éry je třeba hledat alternativní způsoby léčby bakteriálních infekcí. Jednou z možností je kombinace antibiotické a fágové terapie, která v ideálním případě vede k synergickému efektu (Phage Antibiotic Synergy, PAS). Ten byl pozorován u řady bakteriálních druhů. Jedním z nich je *Staphylococcus aureus*, jehož často multirezistentní kmeny bývají původci závažných infekcí. Aby bylo možné aplikovat PAS v klinické praxi, je nutné charakterizovat mechanismy, jež za tímto efektem stojí. Ačkoliv byl původ synergie u některých kombinací antibiotik a fágů již objasněn, pro řadu jiných kombinací není fungování PAS dostatečně charakterizováno. Nejasný je zejména mechanismus synergie mezi fágy a antibiotiky inhibujícími proteosyntézu. Jelikož jsou fágy závislé na proteosyntéze hostitele, měla by mít její inhibice na životní cyklus fága negativní dopad. Nicméně řada studií popisuje i v tomto případě synergický efekt. Tato práce testuje hypotézu, že PAS může spočívat v inhibici bakteriálních proteinů zapojených do obranných systémů proti fágům, a tím se snaží přispět k objasnění mechanismů interakce fágů a antibiotik inhibujících proteosyntézu. Zároveň se věnuje analýze stability fágů v lékových formách vhodných pro přípravu terapeutik založených na PAS efektu.

## Abstract

Due to the growing threat of the post-antibiotic era, alternative treatments for bacterial infections must be investigated. One option is a combination of antibiotic and phage therapy, which ideally leads to a synergistic effect (Phage Antibiotic Synergy, PAS). This has been observed in a number of bacterial species. One of them is *Staphylococcus aureus*, whose often multidrug-resistant strains are the causative agents of serious infections. In order to apply PAS in clinical practice, it is necessary to characterize the mechanisms behind this effect. Although the origin of synergy has been elucidated for some combinations of antibiotics and phages, for many other combinations the functioning of PAS has not been adequately characterized. In particular, the mechanism of synergy between phages and antibiotics inhibiting protein synthesis is unclear. Since phages are dependent on the host translational apparatus, its inhibition should have a negative impact on the phage life cycle. However, a number of studies describe a synergistic effect in this case as well. This work tests the hypothesis that PAS may be based on the inhibition of bacterial proteins involved in anti-phage defence systems, and thus attempts to contribute to the elucidation of the mechanisms of interaction between phages and antibiotics inhibiting protein synthesis. In addition, it is focused on the analysis of phage stability in drug forms suitable for the preparation of therapeutics based on the PAS effect.



ZADÁNÍ  
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2022/2023

Ústav:	Ústav experimentální biologie
Student:	Bc. Filip Křivák
Program:	Mikrobiologie
Specializace:	Mikrobiologie

Ředitel ústavu PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Charakterizace mechanismů vedoucích k synergickému terapeutickému efektu fágů a antibiotik proti stafylokokovým infekcím
Název práce anglicky:	Characterization of mechanisms leading to a synergistic therapeutic effect of phages and antibiotics against staphylococcal infections
Jazyk závěrečné práce:	čeština

**Oficiální zadání:**

Terapeutický efekt fágů může být ovlivněn aplikací antibiotik. Výsledné působení závisí na pořadí aplikace, koncentraci komponent i typu antibiotika, a může být nejen synergické, ale dokonce i antagonistické. Ačkoliv je známo, že na synergii se často podílejí antibiotika narušující proteosyntézu, stále není objasněn mechanismus, kterým k tomu dochází. Cílem diplomové práce bude přispět k objasnění tohoto mechanismu za pomoci sledování fágového výtěžku na kmenech *S. aureus* při současné aplikaci různých koncentrací antibiotik, působících v různých fázích translace, tj. při iniciaci (streptomycin), při vazbě tRNA (tetracyklin), při tvorbě peptidové vazby (chloramfenikol), nebo při pohybu ribozomu po mRNA (erytromycin). Pro přípravu srovnávacích skupin kmenů s různými antifágovými mechanismy bude využita lyzogenizace, klonování a transformace. Dále bude stanovena stabilita terapeutických fágů v různých nosičích využitelných pro povrchovou aplikaci společně s antibiotiky, a to v různých rozmezích teplot, pH a UV záření. Literatura k dispozici u školitele.

Vedoucí práce:	Mgr. Tibor Botka, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Marie Komárková
Datum zadání práce:	11. 8. 2021
V Brně dne:	13. 5. 2023

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Bc. Filip Křivák, 19. 10. 2021  
Mgr. Tibor Botka, Ph.D., 3. 11. 2021  
RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 3. 11. 2021



## **Čestné prohlášení**

Tímto prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.



## Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu práce Mgr. Tiboru Botkovi, Ph.D. za mnoho cenných rad, za jeho trpělivé vedení a podporu a v neposlední řadě za pozitivní přístup, s kterým mě procesem zpracování diplomové práce provedl. Dále bych chtěl poděkovat kolektivu LMDM, za přátelskou pracovní atmosféru, jmenovitě bych rád poděkoval zejména Mgr. Marii Komárkové, která mě s pečlivostí jí vlastní zasvětila do procesu testování stability fágových preparátů. Díky patří také Mgr. Ing. Elišce Kučerové, za předání mnoha cenných zkušeností s testováním efektu kombinací antibiotik a fágů.

Práce byla podpořena projektem Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Dále byla podpořena z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU21J-05-00035.



## Obsah

<b>Seznam pojmů a zkratk</b>	<b>17</b>
<b>1 Úvod</b>	<b>18</b>
<b>2 Teoretická část</b>	<b>19</b>
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
2.2 Stafylokokové fagy .....	20
2.3 Požadavky na terapeutické fagy .....	22
2.3.1 Stabilita .....	23
2.4 Mechanismy rezistence bakterií vůči fágům .....	25
2.4.1 Prevence fágové adsorpce .....	25
2.4.2 Specifické obranné mechanismy bakteriálního původu .....	26
2.4.3 Specifické obranné mechanismy fágového původu .....	28
2.5 Kombinace ATB a fágů .....	29
2.6 ATB cílící na proteosyntézu .....	30
2.6.1 Erytromycin .....	31
2.6.2 Gentamicin .....	31
2.6.3 Tetracyklin .....	32
2.6.4 Chloramfenikol .....	33
2.7 Synergický efekt ATB a fágů (PAS) .....	34
2.7.1 Předpokládané mechanismy PAS vlivem ATB inhibujících proteosyntézu .....	34
2.7.1.1 Urychlená lyze .....	34
2.7.1.2 Zpomalení růstu bakterií .....	35
2.7.1.3 Usnadněná fágová adsorpce .....	35
2.7.1.4 Inhibice syntézy proteinů zodpovědných za rezistenci k fágům .....	35
2.8 Výzvy při využití kombinace ATB a fágů .....	38
2.9 Synergické kombinace fágů a ATB inhibujících proteosyntézu u <i>S. aureus</i> .....	39
2.9.1 Eradikace biofilmu .....	39
2.9.2 Snížení potřebné koncentrace ATB .....	39
2.9.3 Zabránění rezistence .....	40

<b>3</b>	<b>Cíle diplomové práce</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>Materiály</b>	<b>42</b>
4.1	Bakteriální kmeny.....	42
4.2	Antibiotika .....	42
4.3	Bakteriofágy .....	43
4.4	Média a směsi .....	43
4.5	Enzymy.....	46
4.6	Chemikálie .....	47
4.7	Přístroje .....	47
4.8	Bioinformatické nástroje .....	48
<b>5</b>	<b>Metody</b>	<b>49</b>
5.1	Izolace bakteriální genomové DNA pomocí chloroformu .....	49
5.2	Sekvence na Oxford Nanopore MinION.....	49
5.3	Indukce excize profága pomocí UV .....	50
5.4	Stanovení titru kapkovou metodou .....	51
5.5	Stanovení citlivosti kmene k fágu .....	51
5.6	Izolace fága z jedné plaky.....	51
5.7	Příprava fágového lyzátu .....	52
5.8	Stanovení růstové křivky fága bez a v přítomnosti ATB.....	52
5.9	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	53
5.10	Elektroforéza v agarózovém gelu (ELFO).....	54
5.11	Lyzogenizace.....	55
5.12	Příprava hrubého buněčného lyzátu .....	55
5.13	Pulzní gelová elektroforéza (PFGE).....	56
5.14	Izolace plazmidové DNA – dle protokolu pro <i>S. aureus</i> pro izolaci plazmidové DNA kitem NucleoSpin Plasmid .....	57
5.15	Spektrofotometrické stanovení růstové křivky bakteriálních kultur v přítomnosti ATB a fága s využitím Tecan spektrofotometru .....	57
5.16	Hodnocení výsledného efektu ATB a fága na růst kultury pomocí interakčních grafů a jejich kvantifikace.....	57

---

5.17	Spektrofotometrické stanovení růstové křivky bakteriálních kultur v přítomnosti ATB a fága s využitím mikrobiologického bioreaktoru .....	58
5.18	Purifikace fágových částic pomocí ultrafiltrace .....	59
5.19	Příprava karbomerového gelu s obsahem fágových částic.....	59
5.20	Testování stability fága 812 a p68 v karbomerovém gelu vůči UV záření..	60
<b>6</b>	<b>Výsledky</b>	<b>61</b>
6.1	Stanovení sekvence kmenů NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09 .....	61
6.2	Profágy kmenů NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09 .....	62
6.3	Lyzogenizace kmenů 1039 a RN4220 $\Delta tarM$ indukovanými fágy .....	67
6.4	Plazmidy kmene NRL Atb 244 .....	69
6.5	Transdukce plazmidů z kmene NRL Atb 244 do kmene 1039 .....	69
6.6	Ověření rezistence lyzogenního kmene RN4220(53+).....	71
6.7	Testování rezistentních kmenů izolovaných po infekci RN4220 .....	71
6.8	Příprava a ověření kmene 1039(53+) .....	74
6.9	Efekt kombinace ATB ovlivňujících proteosyntézu a fága 812.....	75
6.9.1	Efekt kombinace fág-ATB na kmen 1039 .....	75
6.9.2	Efekt kombinace fág-ATB na kmen 1039(53+).....	77
6.9.3	Efekt kombinace fág-ATB na kmen E48.....	80
6.9.4	Role stechiometrie na výsledný efekt ATB a fága 812.....	83
6.9.5	Efekt inhibitorů proteosyntézy na schopnost produktivní infekce fágem 812 .....	85
6.9.6	Ověření synergického efektu (PAS) CLMP a fága 812 při prodloužené inkubaci kmene s antibiotikem .....	87
6.10	Stabilitní studie fágů 812 a P68 v tekutém a v polotuhém nosiči .....	90
<b>7</b>	<b>Diskuze</b>	<b>94</b>
7.1	Výběr a příprava modelových systémů.....	94
7.2	Testování efektu kombinací ATB a fága .....	96
7.3	Stabilitní studie fágů 812 a P68 v tekutém a v polotuhém nosiči .....	99
<b>8</b>	<b>Souhrn</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Summary</b>	<b>102</b>

<b>Použité zdroje</b>	<b>104</b>
<b>Příloha A    Výsledky testování stability fágů 812 a p68 v tekutém a v polotuhém přípravku</b>	<b>112</b>

## Seznam pojmů a zkratek

Acr	– anti-CRISPR proteiny
ATB	– antibiotikum
bp	– base pair (páry bazí)
CFU	– kolonie tvořící jednotky (Colony Forming Unit)
CLMP	– chloramfenikol
CRISPR	– Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ERY	– erytromycin
ESKAPE	– skupina nozokomiálních patogenů ( <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , a <i>Enterobacter</i> spp.)
GEN	– gentamicin
IR	– vkladový poměr (Input Ratio)
LMDM	– Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů
MGE	– mobilní genetický element
MIC	– minimální inhibiční koncentrace (Minimal Inhibition Concentration)
MPA	– masopeptonový agar
MPB	– masopeptonový bujon
MRSA	– meticilin-rezistentní <i>S. aureus</i>
NK	– negativní kontrola
OD	– optická hustota (Optical Density)
ON	– přesnoční kultura (over-night)
PAS	– synergický efekt antibiotik a fágů (Phage-Antibiotic Synergy)
PBS	– fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffer Solution)
PCR	– polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	– Pulzní gelová elektroforéza (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
PFU	– plaky tvořící jednotky (Plaque Forming Unit)
PK	– pozitivní kontrola
SaPI	– ostrov patogenity <i>S. aureus</i>
SCCmec	– stafylokoková chromozomová kazeta obsahující gen <i>mecA</i>
SpA	– imunoglobulin G-vazebný protein A u <i>S. aureus</i>
ST	– sekvenční typ
TET	– tetracyklin
VRSA	– vankomycin-rezistentní <i>S. aureus</i>
WHO	– Světová zdravotnická organizace

# 1 Úvod

Antibiotická rezistence je globální hrozbou, která vyžaduje hledání nových léčiv a alternativních přístupů při potlačování bakteriálních infekcí. Podle reportu Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2019 v důsledku antibiotické rezistence umírá každoročně 700 000 lidí. Pokud se současná situace nezlepší, pak by se počet obětí antibiotické rezistence mohl v roce 2050 dostat až na 10 milionů. Mezi nejvýznamnější multirezistentní patogeny patří *Staphylococcus aureus*, jež je častým původcem nozokomiálních nákaz.

Alternativou k antibiotikům je fágová terapie, jejíž slibnou inovací je její kombinace právě s antibiotiky, jež může vyústit v synergický efekt (Phage Antibiotic Synergy, PAS). Nicméně má-li být PAS uveden do praxe, je třeba nejprve podrobné charakterizace mechanismů za něj zodpovědných.

Předpokládaných mechanismů PAS bylo představeno hned několik, avšak pro některé skupiny antibiotik je proces synergie stále neobjasněn. Otázkou zůstává zejména u antibiotik inhibujících proteosyntézu. Jelikož jsou fágy závislé na translačním aparátu hostitele, měla by inhibice translace mít na jejich životní cyklus negativní dopad. I přesto byla popsána s antibiotiky inhibujícími proteosyntézu řada synergických kombinací.

Tato práce se snaží přispět k charakterizaci mechanismů, které za synergií s antibiotiky inhibujícími proteosyntézu stojí. Je zde představena a testována hypotéza, že mechanismus PAS spočívá v inhibici exprese proteinů zodpovědných za odolnost bakterií k fágům.

Lze předpokládat, že bude-li fágová terapie zavedena do běžné klinické praxe, najde uplatnění zejména v léčbě povrchových infekcí. Na rozdíl od nitrožilní aplikace zde totiž distribuci fága nekomplikuje interakce se specifickou imunitou, v jejímž důsledku byla popsána inhibice aktivity fágů. Nicméně nejprve je třeba najít vhodnou formu preparátů, ve které budou fágy dostatečně stabilní a zároveň snadno aplikovatelné na místo infekce. Proto se tato diplomová práce zaměřuje i na testování stability fágů v preparátech s využitím při léčbě povrchových infekcí *S. aureus*.

## 2 Teoretická část

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

Jedná se o zástupce kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales* a čeledi *Staphylococcaceae* (Schoch *et al.* 2020). *S. aureus* je grampozitivní kokovitá fakultativně anaerobní nepohyblivá bakterie, která typicky tvoří hroznovité shluky. Obsah guaninu a cytosinu v genomu je pouze 36 % (Foster, 2001). Tento druh získal své jméno díky produkci žlutého pigmentu, jež však není pravidlem. Zbarvení jeho kolonií se může pohybovat od světle béžové až po sytě žlutou. K diagnostice této bakterie se běžně používá katalázový a koagulázový test, přičemž oba vychází pro *S. aureus* typicky pozitivně. Při diagnostice a izolaci se využívá také vysoké osmotolerance této bakterie, kdy selekční médium pro stafylokoky obsahuje 7,5 % NaCl.

Tento oportunní patogen přirozeně osidluje kůži či sliznice savců a ptáků. Uvádí se, že zhruba 30 % lidské populace je jeho bezpříznakovými nositeli (Etter *et al.* 2020). K nejčastějším onemocněním způsobeným touto bakterií patří infekce ran, abscesy, sepse, syndrom toxického šoku či syndrom opařené kůže, přičemž u stafylokokových infekcí bývá častým problémem recidiva či chronický průběh.

*S. aureus* je nechvalně známý také pro svou častou odolnost vůči antibiotické terapii. Z tohoto důvodu se řadí do skupiny ESKAPE, jež zahrnuje vysoce virulentní původce nozokomiálních nákaz, kteří jsou schopni úspěšně unikat působení běžně užívaných antibiotik (Mulani *et al.* 2019). Kromě *S. aureus*, se do této skupiny řadí také *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, a *Enterobacter* spp.

V kontextu antibiotické rezistence patří k nejvýznamnějším kmenům *S. aureus* ty, jež nesou rezistenci vůči meticilinu (MRSA kmeny). Ta je kódována genem *mecA* lokalizovaným na stafylokokové chromozomové kazetě (*SCCmec*). *SCCmec* je mobilní genetický element (MGE), který umožňuje velmi efektivní šíření rezistence např. prostřednictvím transdukce (Hanssen *et Ericson Sollid* 2006). Významným rezervoárem genů zodpovědných za rezistenci vůči meticilinu jsou koaguláza-negativní stafylokoky, jako např. *Staphylococcus epidermidis*.

V Evropském kontextu je rozšíření kmenů MRSA velmi nerovnoměrné. Zatímco ve skandinávských zemích je prevalence MRSA pod jedno procento, v oblasti východní Evropy a Středozemního moře představují multirezistentní kmeny mnohdy více než 50 % izolátů (Řecko 73,7 %, Rumunsko 54,5 %) (atlas.ecdc.europa.eu, 2021). Ve výrazných rozdílech v rozšíření rezistence mají hlavní slovo průměrná spotřeba antibiotik na pacienta spolu s předepisováním více než jednoho antimikrobiálního přípravku (Borg *et Camilleri* 2021).

Pro léčbu infekcí způsobených MRSA se nejčastěji volí antibiotikum vankomycin. Avšak v nedávné době byly izolovány i kmeny *S. aureus* rezistentní k vankomycinu

(VRSA) (Cong, Yang, *et* Rao 2019). Podstatou této rezistence je opět přenos MGE, tentokrát původem z bakterií rodu *Enterococcus*.

## 2.2 Stafylokokové fágy

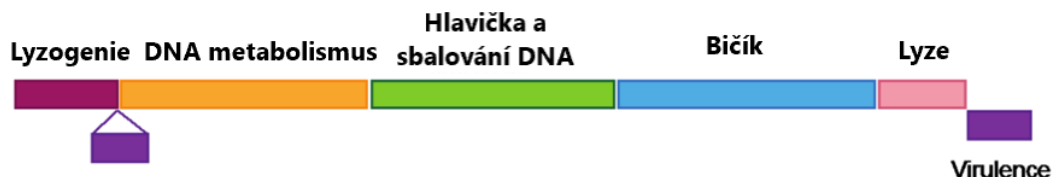
Jako nadějný alternativní způsob léčby stafylokokových infekcí se jeví fágová terapie. Nicméně bakteriofágy nepředstavují pouze potenciální nástroj léčby. Jejich nezastupitelnou úlohou je i horizontální přenos genů, lyzogenní konverze, selekce a řada dalších procesů, které vedou k diverzifikaci hostitele. Fágy jsou tedy esenciální silou evoluce.

Významným selekčním faktorem bakterií jsou lytické fágy, které svůj životní cyklus realizují infekcí bakterie za účelem rychlé propagace, s následným uvolněním potomstva do prostředí, což je doprovázeno smrtí hostitele formou buněčné lyze.

Významný vliv na strukturu genomu svých hostitelů mají temperované fágy, tedy fágy se schopností začlenit svou DNA do genomu hostitele (profágy) a navodit takzvaný lyzogenní cyklus. O jak významné aktéry evoluce u stafylokoků se jedná, svědčí fakt, že většina izolátů *S. aureus* nese více než jednoho profága (Ingmer, Gerlach, *et* Wolz 2019). *S. aureus* sám o sobě je vysoce klonální druh bakterie, který sdílí konzervované genomové sekvence (Feil *et al.* 2003). Diverzita tohoto druhu je tak dána především přítomností MGE, jako jsou plazmidy, ostrovy patogenity nebo právě profágy. Ty mohou nést geny kódující nejrůznější virulenční faktory, např. Pantonův-Valentinův leukocidin, stafylokinázu, enterotoxiny či exfoliativní toxiny (Xia *et* Wolz 2014). MGE a zejména profágy mohou také poskytovat svým hostitelům rezistenci proti infekci dalšími fágy, jak je podrobněji popsáno v kapitole 2.4.3 [Specifické obranné mechanismy fágového původu](#).

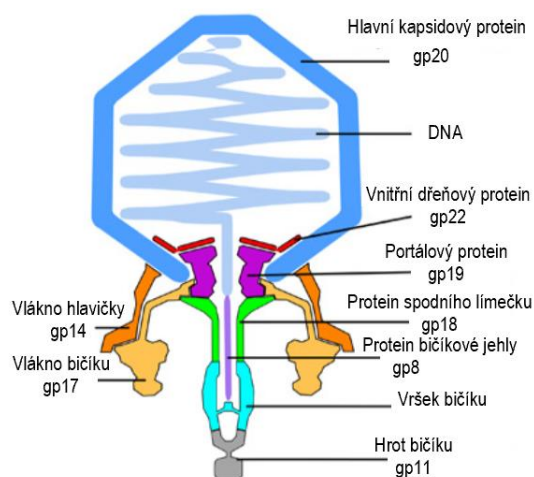
Všechny dosud popsané fágy parazitující na *S. aureus* patří do řádu *Caudovirales* (Azam *et* Tanji 2019). Vyznačují se charakteristickou morfologií, která sestává z proteinové ikosahedrální hlavičky, obsahující virový dsDNA genom, a z fágového bičíku, ve kterém jsou obvykle zakomponovány proteiny vázající se na receptor (Egido *et al.* 2022). Bičík tedy slouží k adsorpci na hostitele a k injekci fágové DNA do jeho cytoplazmy. Podle různých variací v této morfologii můžeme stafylokokové fágy dále rozdělit na sifoviry, podoviry a myoviry (Azam *et* Tanji 2019). Skupina sifovirů zahrnuje fágy s dlouhým nekontraktilním bičíkem a se středně velkým genomem (39-43 kbp). Jedná se zejména o temperované fágy s typicky modulární strukturou genomu, viz obrázek 1.

**Schéma modulární struktury  
genomu sifovirů**  
velikost genomu: 40 kb

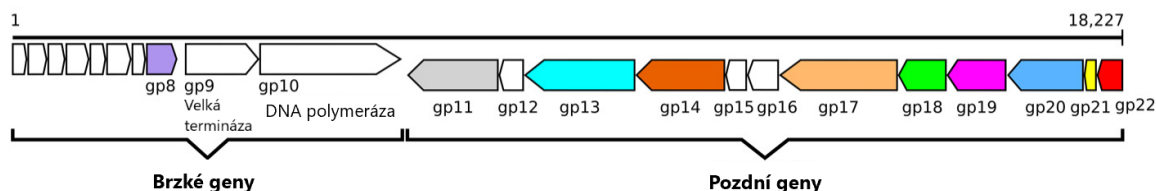


**Obrázek 1:** Schématické znázornění modulárního uspořádání genomu začleněného profága patřícího do skupiny sifovirů (Deghorain *et al.* 2012; upraveno)

Podoviry se naopak vyznačují velmi krátkým bičíkem. Nesou méně rozsáhlý genom (16-18 kbp), jehož struktura je též modulární, avšak ne tak striktně jako u předchozí skupiny. Z podovirů *S. aureus* je dobře charakterizován fág P68 s kapsidou o průměru 48 nm a s bičíkem o délce 39,5 nm (obr. 2) (Hřebík *et al.* 2019). Pro úspěšnou adsorpci fága P68 a ostatních stafylokokových podovirů, je esenciální  $\beta$ -N-acetylglukosaminový typ glykosylace teichoové kyseliny, který je zprostředkován glykosyltransferázou TarS (Li *et al.* 2015). Oproti tomu  $\alpha$ -N-acetylglukosaminový typ glykosylace zprostředkovaný pomocí TarM je zodpovědný za rezistenci k podovirům. Na schématickém znázornění genomu fága P68 (obr. 3) je dobře patrné rozdělení na tzv. brzké geny, které jsou exprimovány v první části infekce a slouží hlavně k převzetí kontroly nad hostitelem a k přípravě na pozdní část infekce, během níž se exprimují tzv. pozdní geny, jejichž produkty mají převážně strukturální či lytický charakter (Hřebík *et al.* 2019). Rozdělení genů na brzké a pozdní není specifické pouze pro podoviry a je popsáno též u dalších skupin fágů.

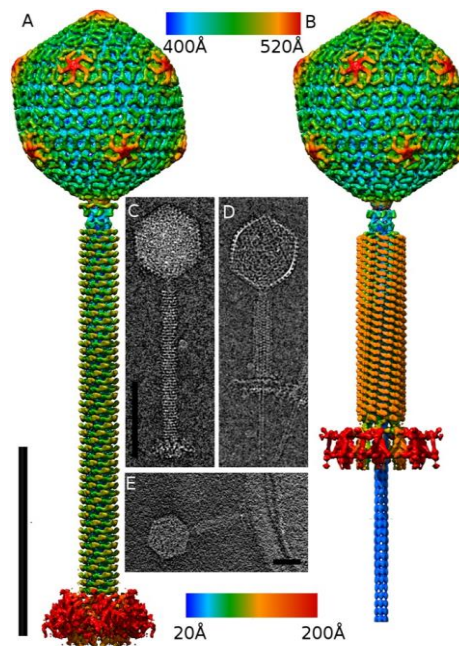


**Obrázek 2:** znázornění struktury virionu podoviru P68 (Hřebík *et al.* 2019, upraveno)



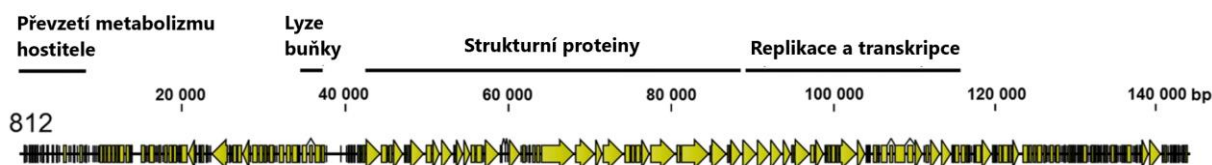
**Obrázek 3:** Schéma uspořádání genomu podoviru P68 (Hřebík *et al.*, 2019; upraveno)

Třetí skupinou jsou myoviry s dlouhým kontraktilním bičíkem a velkým genomem (120-140 kbp). Modulární struktura jejich genomu není tak patrná jako u sifovirů (obr. 5). Typickým zástupcem terapeuticky využívaných myovirů je *Kayvirus* 812, který je blízce příbuzný fágu K (Li *et al.* 2015). Fág 812 vykazuje značně široké hostitelské spektrum, které zahrnuje i některé koaguláza-negativní stafylokoky. Množství potenciálních hostitelů lze navíc ještě rozšířit izolací spontánních mutant schopných pomnožit se i na původně rezistentních kmenech (Botka *et al.* 2019). Fág 812 má kapsidu o průměru 90 nm a jeho kontraktilní bičík dosahuje délky 240 nm (Nováček *et al.* 2016). Bičík je zakončený dvouvrstvou bazální destičkou, ve které dochází v reakci na adsorpci na hostitele ke kon-



Obrázek 4: Virion kayviru 812 patří mezi myoviry pro něž je charakteristický kontraktilní bičík (Nováček *et al.* 2016)

formační změně, která je spolu s následnou strukturní změnou v tubusu bičíku zodpovědná za kontrakci bičíku a za uvolnění fágového genomu do cytoplazmy buňky (obr. 4).



Obrázek 5: Znárodnění modulárního uspořádání genů v genomu fága 812 (Botka *et al.*, 2019; upraveno)

### 2.3 Požadavky na terapeutické fágy

Při výběru terapeutických fágů je třeba zvážit hned několik parametrů. Je zásadní, aby fágy nenesly geny spojené s bakteriální virulencí či s rezistencí k antibiotikům (Azam *et Tanji* 2019). Zatímco výskyt genů antibiotické rezistence v genomech fágů je ojedinělý, není naopak výjimkou, že kódují virulenní faktory jako jsou enterotoxiny, staphylokináza,  $\beta$ -hemolysin, lipáza, exfoliativní toxin A či Pantonův-Valentinův leu-

kocidin (Pantůček *et al.* 2004). Dále jsou preferovány tzv. polyvalentní fágy, tedy fágy s širokým hostitelským spektrem (Hyman 2019). Ty zajišťují větší univerzálnost fágových preparátů a nižší nároky na diagnostiku.

Pro terapeutické účely se zpravidla volí pouze lytické fágy (Hyman 2019). Mírné fágy se považují za nevhodné zejména z důvodu, že v rámci zabránění superinfekce poskytují svým hostitelům prostřednictvím lyzogenního cyklu rezistenci vůči následné infekci stejným či příbuzným fágem. Dále je u nich běžně pozorována transdukce faktorů virulence a rezistence. Dokonce i regulační agentury, které pokročily ve schvalování fágové terapie nejdále, povolují pouze použití lytických fágů (Abedon *et al.* 2011).

Avšak v případě některých patogenních bakterií (popsáno u *Clostridium difficile*) nebyly lytické fágy dosud izolovány, což využití fágové terapie značně omezuje (Al-Anany *et al.* 2021). Naději pro využití mírných fágů přináší genové inženýrství, pomocí kterého mohou být odstraněny geny esenciální při lyzogenním cyklu a původně mírný fág si tak zachová pouze lytické vlastnosti (Kilcher *et al.* 2018). Druhým přístupem, který by mohl temperovaným fágům zajistit klinické využití je kombinace s antibiotiky, které indukují excizi profágů (Al-Anany *et al.* 2021).

Komerční fágové preparáty tedy zpravidla obsahují pouze lytické fágy, přednostně myoviry, s výjimkou ruského produktu Pyophage (Microgen), který obsahuje také podovirus SCH1 (McCallin *et al.*, 2018). Překážkou v širším využití podovirů je jejich omezené hostitelské spektrum, které zužuje glykosyltransferáza TarM zodpovědná za glykosylaci teichoové kyseliny v buněčné stěně, čímž u této skupiny dochází k zabránění adsorpce (Li *et al.* 2015).

Jak prokázala řada kazuistik, v současnosti se v západních zemích volí fágová terapie až při selhání léčby pomocí antibiotik, přičemž však podávání antibiotik nebývá přerušeno (Chan *et al.* 2016; Law *et al.* 2019; Van Nieuwenhuysse *et al.* 2021). Z toho důvodu je esenciálním požadavkem na terapeutické fágy jejich kompatibilita s antibiotiky, v ideálním případě ve smyslu synergie či přinejmenším aditivního efektu.

### 2.3.1 Stabilita

Jedním z důležitých požadavků na výběr fágů pro terapeutické použití je jejich stabilita. Pro správný průběh fágové terapie musí být fág stabilní jak v místě infekce, tak v lékové formě, v níž je skladován. Existuje řada studií zabývajících se testováním stability a aplikovatelnosti fágových preparátů určených pro ošetření infekcí povrchových ran, jichž je *S. aureus* častým původcem (Bean *et al.* 2014; O'Flaherty *et al.* 2005; Rhoads *et al.* 2009). Využití fágové terapie při léčbě povrchových infekcí se jeví jako atraktivní vzhledem k tomu, že zde nehrozí přímá inaktivace fágů imunitním systémem pacienta, což je výraznou překážkou při aplikaci fágů např. v léčbě infekcí oběhového systému (Kucharewicz-Krukowska *et al.* Slopek 1987).

V současnosti se pro distribuci fágů v místě infekce povrchových ran volí zpravidla tekuté přípravky (Chang *et al.* 2020). Jejich výhodou je nenáročnost na přípravu a udržení dlouhodobé životaschopnosti fágů. Právě stabilita v preparátech však velmi závisí na typu fága. Nejčastěji voleným médiem bývá u tekutých preparátů fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS) a Tris pufr obohacený o hořečnaté soli.

Řada komerčně dostupných tekutých fágových preparátů je připravována v Elia-vově institutu v Tbilisi (Gruzie), jmenovitě např. Pyo Bacteriophage, Intesti Bacteriophage či Staphylococcal Bacteriophage (Chang *et al.* 2020). Jejich uváděná stabilita je 18 až 24 měsíců při skladování v suchu při teplotě 4 °C a mimo dosah přímého světla. Trvanlivost zde prodlužuje konzervant chinazolin. Ke stabilizaci fágů ve vodném prostředí pomáhá také přítomnost vápenatých či hořečnatých iontů, které se váží na negativně nabitě proteiny tvořící fágovou hlavičku.

K zajímavým poznatkům ohledně stability došla studie PhagoBurn (Jault *et al.* 2019). V rámci této studie byl použit koktejl obsahující 12 lytických fágů. Byly-li tyto fágy skladovány individuálně, pak si v PBS pufru zachovaly titer  $10^9$  PFU/ml po dobu více než dvou let. Nicméně u směsi těchto fágů došlo k dramatickému poklesu titru, který se už po 6 měsících pohyboval v řádech  $10^4$  až  $10^5$  PFU/ml. Na vině byly pravděpodobně interakce mezi jednotlivými fágy, které vedly k jejich vzájemné inaktivaci. Z toho vyplývá, že při přípravě fágových koktejlů je třeba ověřit kompatibilitu jednotlivých fágů.

Tekuté přípravky obsahující fágy bývají zpravidla aplikovány buďto přímo kapáním směsi do oblasti povrchové infekce, či přiložením gázy namočené v roztoku s fágem (Chang *et al.* 2020). U těchto metod aplikace představuje komplikaci určení přesné dávky podaného fága. Je-li na ránu nanášen přímo tekutý preparát, je třeba zajistit, aby kapalina neodtekla mimo místo ošetření. Při použití gázy napuštěné fágovým preparátem pak představuje problém stanovení množství fágových částic, které se z gázy nebudou schopny uvolnit.

Alternativou k tekutým formám jsou polotuhé fágové přípravky ve formě gelů či krémů, které mohou poskytovat poraněné kůži ochranu a hydrataci, a navíc mohou přispět k vyšší stabilitě fága prostřednictvím vodíkových můstků mezi polymerem a fágovými proteiny (Chang *et al.* 2020). Dalším pozitivem je jejich snadná aplikovatelnost a s tím spojené jednodušší odhadnutí podané dávky. K přípravě polotuhých fágových preparátů se osvědčily ve vodě rozpustné polymery jako např. hydroxyethylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, karbomer a agaróza. Základními požadavky jsou, aby tyto polymery nevyvolávaly imunitní odpověď a byly biodegradabilní. Dále bylo zjištěno, že vhodnější je volit polymery, které nemají iontovou povahu. Jsou-li fágy naopak vneseny do aniontového gelu, může dojít k jejich rychlé deaktivaci, jelikož záporně nabitě polymery mohou interagovat s kladně nabitými proteiny fágového bičíku a blokovat vazbu fága na receptory, čímž znemožní adsorpci fága na hostitelskou buňku. Tento fenomén se projevil např. při porovnání stability fága v neionogenní hydroxyethylcelulóze a v karbomeru (aniontový polymer tvořený mo-

nomery akrylové kyseliny) (Carbol *et al.* 2018). Zatímco v hydroxyethylcelulóze byl fág po testované době čtyř týdnů stabilní, v karbomerovém gelu se jeho titer snížil o 99,95 %.

Také u polotuhých přípravků je třeba stanovit schopnost fága se z gelů a krémů uvolňovat do prostředí, kde může působit proti infekci, aby bylo určeno skutečné množství aktivně působících virionů. Při ověřování schopnosti difuze fágů z agarózo- vého gelu bylo zjištěno, že zde má velkou roli koncentrace polymeru (Bean *et al.* 2014). Zatímco z 0,2 % agarózo- vého gelu se po šesti hodinách bylo schopno uvolnit do vodného prostředí 20 % virionů, v případě 0,7 % gelu se do prostředí dostalo pou- ze 0,6 % virionů obsažených v gelu.

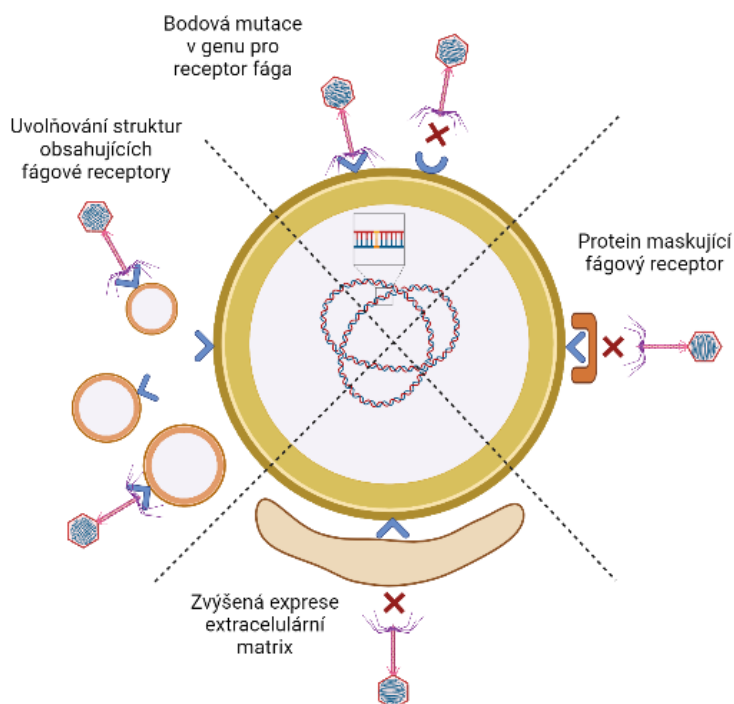
## 2.4 Mechanismy rezistence bakterií vůči fágům

Rezistence bakterií vůči fágům spočívá v zablokování určitého kroku fágové infekce, proto je nezbytné v úvodu této kapitoly proces fágové infekce stručně nastínit. Nejpr- ve musí dojít k setkání virionu s hostitelskou bakterií, což je náhodný proces závislý na difuzi fágových částic. Poté obvykle probíhá nespecifická reverzibilní adsorpce, která je následována ireverzibilní adsorpcí specifickou, zprostředkovanou vazebnými místy fága k receptorům na povrchu bakteriální buňky (složky bakteriální stěny, bičí- ku, pilusu, či dalších povrchových struktur) (Egido *et al.* 2022). Následně dochází k penetraci bakteriální stěny a cytoplazmatické membrány a k injekci virové DNA do cytoplazmy hostitele. Po adsorpci na hostitele a uvolnění DNA fág přestává být v médiu detekovatelný, čímž dochází ke snížení jeho titru, a to až do doby uvolnění virionů fágového potomstva. Tento jev se označuje jako fáze latence. Úspěšná fágová infekce může být produktivní (lytický cyklus), nebo latentní (lyzogenní cyklus). Při lytickém cyklu dochází po injekci fágového genomu k převzetí kontroly nad bakteri- ální buňkou, expresi virového genomu, sestavení nových virionů a k jejich uvolnění z hostitele.

### 2.4.1 Prevence fágové adsorpce

Nejjednodušším způsobem, jak zabránit tomuto počátečnímu kroku infekce je bodová mutace, jejímž výsledkem může být změna konformace nebo exprese receptoru (Egi- do *et al.* 2022). Tyto mutace bývají pozorovány zvláště často právě v přítomnosti se- lekčního tlaku fágů. Další strategií prevence fágové adsorpce je blokáce receptoru. Jako příklad lze uvést imunoglobulin G-vazebný protein A u *S. aureus* (SpA), což je důležitý faktor virulence, který umožňuje vyhnout se imunitní reakci hostitele (Vo- tintseva *et al.* 2014). Kromě toho má SpA také významnou úlohu v maskování fágo- vých receptorů na bakteriálním povrchu (Nordström *et Forsgren* 1974). Snížení pro- dukce tohoto proteinu vede k významnému zvýšení úrovně fágové adsorpce. Proteiny

maskující fágové receptory mohou být kódovány také na MGE (Labrie, Samson, *et* Moineau 2010). Jako příklad lze uvést protein TraT, jež je exprimován z F-plazmidu *Escherichia coli* a váže se na OmpA protein ve vnější membráně. Bakterie mohou ukrývat své receptory také díky zvýšení produkce extracelulární matrix, která může vést až ke tvorbě biofilmu. Zajímavou strategií obrany proti fágové adsorpci je uvolňování molekul či celých vezikul obsahujících receptory, jež slouží jako návnada pro viriony v prostředí (Augustyniak, Olszak, *et* Drulis-Kawa 2022). Nicméně modifikace povrchových elementů může vést i ke snížení virulence bakterie a její životaschopnosti v prostředí. Také z toho důvodu je esenciální přítomnost více specifických obranných mechanismů, které nevedou ke snížení fitness bakterií.



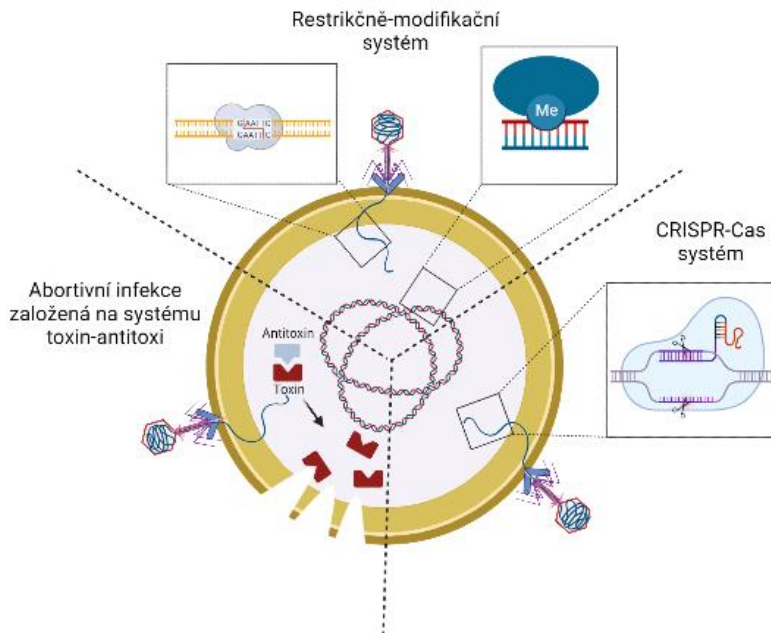
Obrázek 6: Prevence fágové adsorpce (vytvořeno pomocí BioRender podle Egido *et al.*, 2022)

#### 2.4.2 Specifické obranné mechanismy bakteriálního původu

Specifická obrana bakterií proti fágové infekci nejčastěji spočívá v interferenci s fágovými nukleovými kyselinami. Nejdéle známým a nejvíce využívaným obranným mechanismem jsou restriktivně-modifikační systémy (Luria 1953). Jedná se o enzymy štěpící buňce cizí DNA, která je rozpoznána díky absenci metylace specifických sekvencí (Tock *et* Dryden 2005). Součástí systému jsou také enzymy, které slouží k modifikaci vlastního bakteriálního genomu, čímž je zabráněno jeho poškození.

Relativně nedávno objeveným mechanismem rezistence je CRISPR-Cas systém, který je obdobou RNA interference známé u eukaryot (Egido *et al.* 2022). CRISPR spočívá v nahromadění krátkých palindromických repetit v sekvenci bakteriální DNA. Mezi těmito repetitami jsou vloženy tzv. spacers, což jsou sekvence získané při předchozím kontaktu s fágovou či jinou cizorodou DNA. Ze spacerů se přepisuje crRNA, která navádí Cas nukleázu k cílové sekvenci určené k rozštěpení. Jedná se o dosud jediný popsáný mechanismus adaptivní imunity prokaryot. Význam tohoto obranného systému podtrhuje jeho značné rozšíření, kdy je kódován přibližně 40 % bakteriálních genomů. Na základě rozdílů v počtu a povaze přidružených proteinů je možné CRISPR-Cas dělit do dvou tříd, šesti typů a 33 podtypů (Makarova *et al.* 2020).

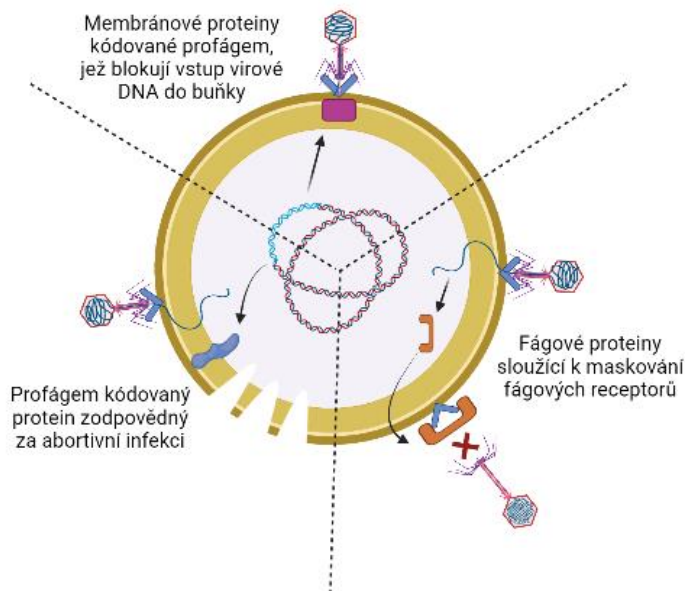
Na úrovni bakteriální populace se uplatňuje mechanismus rezistence založený na abortivní infekci (Egido *et al.* 2022). Při abortivní infekci umírá infikovaná buňka dříve než se fág stačí pomnožit, čímž dochází k vymizení fága z bakteriální populace, která tak přežívá. Hostitelské systémy zodpovědné za abortivní infekci často spoléhají na toxin-antitoxin (TA) mechanismus, v němž rovnováha mezi stabilním toxinem a nestabilním antitoxinem určuje osud buňky. Infekce fágem vyvolává represi promotoru antitoxinu. Výsledkem je, že toxin převládne a způsobí smrt bakterie. Mechanismů abortivní infekce existuje celá řada (Millman *et al.* 2020), přičemž některé mohou být kódovány profágy, jak je popsáno v následující kapitole 2.4.3 [Specifické obranné mechanismy fágového původu](#).



Obrázek 7: Specifické obranné mechanismy bakteriálního původu (vytvořeno pomocí BioRender podle Egido *et al.*, 2022)

### 2.4.3 Specifické obranné mechanismy fágového původu

Přítomnost fágové DNA uvnitř bakteriální buňky nemusí pro svého hostitele znamenat jen bezprostřední riziko, ale může mu poskytnout také ochranu před fágovou infekcí (Egido *et al.* 2022). Pro efektivní životní cyklus fága je výhodné, aby zabránil infekci jiným fágem stejného nebo i jiného druhu. Strategií pro vyloučení superinfekce existuje hned několik. Některé fágy produkují proteiny, které maskují jejich vlastní receptory (Pedruzzi, Rosenbusch, *et al.* 1998). Profágy zase mohou kódovat membránové proteiny, jež zabraňují vstupu virové DNA do buňky (Labrie *et al.* 2010), nebo mohou kódovat již zmíněné abortivní mechanismy, čímž chrání profágy v přeživších buňkách bakteriální populace. Dobře charakterizovaný je např. Rex systém u kmenů *E. coli* s profágem Lambda (Parma *et al.* 1992), nebo obdobně fungující recentně popsany mechanismus spouštěný proteinem PdpSau u *S. aureus* (Kuntová *et al.* 2023). Produktem profágového genu *pdpSau* je transmembránový protein, jehož struktura je obdobná jako u řady apoptotických proteinů. Zajímavé je, že přítomnost proteinu poskytuje rezistenci nejen vůči blízkce příbuzným temperovaným fágům, ale také vůči lytickým kayvirům. Mechanismus fágové rezistence je pravděpodobně spuštěn navázáním DNA infikujícího fága na PdpSau protein, načež dochází k zastavení replikace fága. Během deseti minut po infekci dochází ke změně polarity a permeability buněčné membrány hostitele, což má za následek profágem indukovanou smrt.

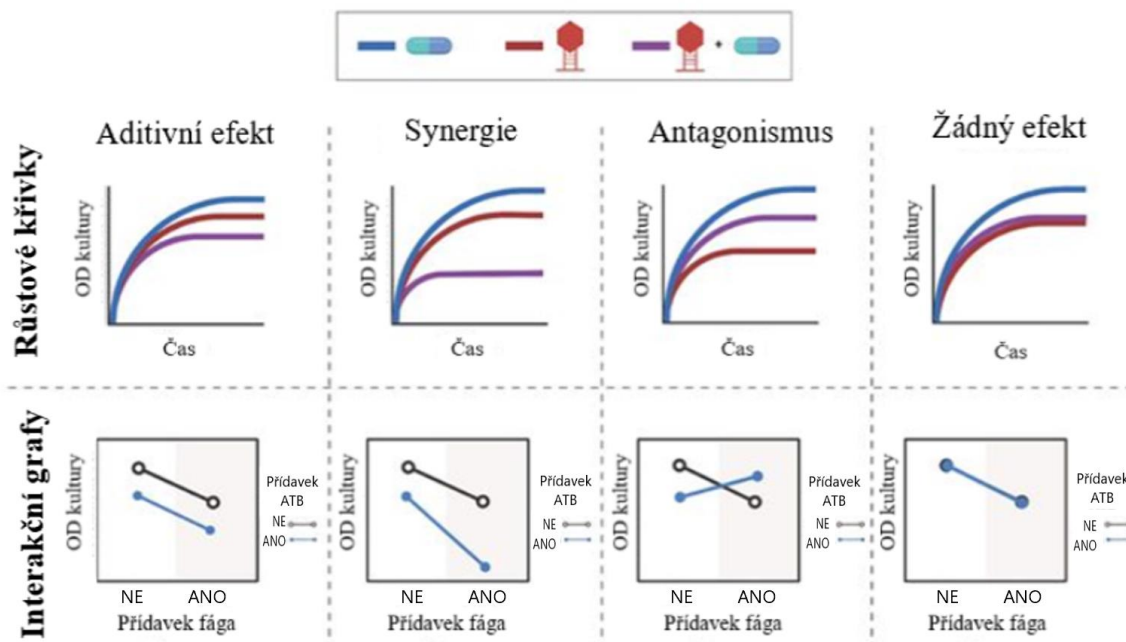


**Obrázek 8: Specifické obranné mechanismy fágového původu (vytvořeno pomocí BioRender podle Egido *et al.*, 2022)**

## 2.5 Kombinace ATB a fágů

I fágová terapie, přestože nabízí způsob, jak se vypořádat s antibiotickou rezistencí, má svá úskalí, a to v podobě výskytu bakteriálních kmenů rezistentních k fágům. Řešením by mohla být kombinace fágů a antibiotik, která může bránit vzniku rezistence. Jelikož rezistence k ATB a k fágům je založena na odlišných mechanismech, snižuje se při kombinované terapii pravděpodobnost výskytu bakterie odolné vůči oběma těmto složkám (Kirby 2012). Další výhodou kombinované terapie by mohlo být snížení nedůvěry úřadů ke klinickému využití fágů. V západních zemích je totiž fágová terapie stále považována spíše za alternativní medicínu, která se využívá až v případech nejvyšší nouze, a doprovodná aplikace antibiotik, jakožto léků volby, by mohla zmírnit počáteční skepsi (Chan *et al.* 2016; Law *et al.* 2019; Van Nieuwenhuysse *et al.* 2021).

Kombinované použití fágů a antibiotik může vést k několika rozdílným jevům (Gu Liu *et al.*, 2020). Výsledkem současného použití obou složek může být aditivní efekt, kdy je jejich společný účinek roven součtu účinků těchto složek působících samostatně. Existuje také možnost, že ani jedna ze složek nemá na daný bakteriální kmen žádný efekt. Dále může dojít k antagonismu, kdy se obě složky vzájemně inhibují. Z klinického hlediska je nejžádanější synergický efekt, kdy je účinek antibiotik a fágů působících současně vyšší než součet samostatných účinků těchto složek. Jednotlivé efekty kombinace ATB a fágů jsou pomocí schémat růstových křivek bakteriálních kultur znázorněny na obrázku 9.



Obrázek 9: Znázornění možných efektů kombinace ATB a fágů na bakteriální kulturu pomocí růstových křivek a interakčních grafů (Gu Liu *et al.*, 2020; upraveno)

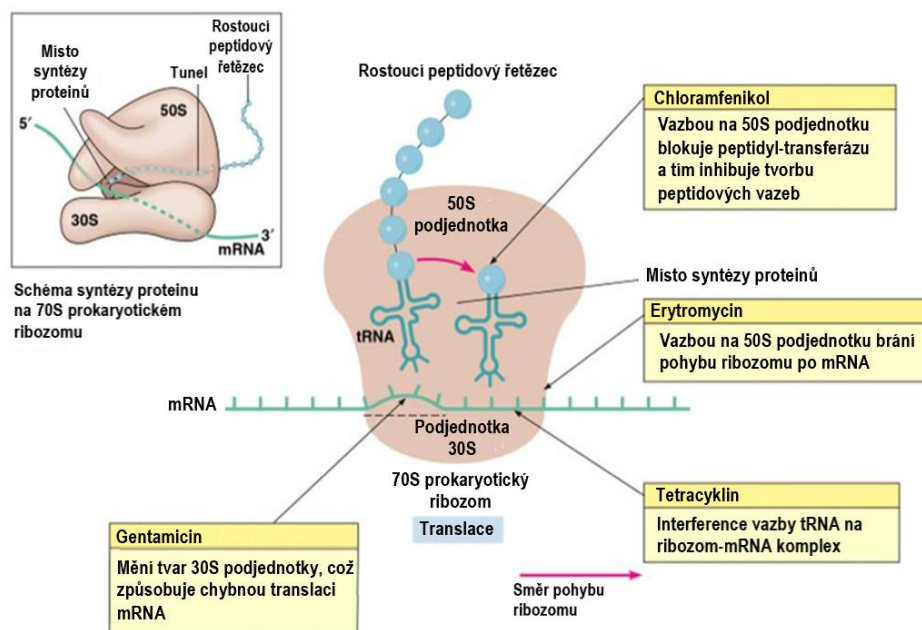
Synergii v užším slova smyslu lze popsat jako jev, kdy vlivem působení antibiotik na buňku dochází k efektivnějšímu pomnožení fága. Předpokládaných mechanismů, které vedou k PAS, existuje hned několik a budou rozebrány v následujících kapitolách.

Antagonismus v užším slova smyslu, kdy antibiotikum snižuje množství fágového potomstva, byl prokázán u aminoglykosidů v případě fágové infekce u *E. coli* a *Bacillus cereus* (Zuo, Yu, et alvarez 2021). Zajímavé je, že inhibiční efekt tetracyklinu, který je také inhibitorem translace, byl mnohem menší. To naznačuje jednak přímé antifágové působení aminoglykosidů a také, že inhibice replikace fágů není antibiotiky blokujícími proteosyntézu vyvolána vždy. Antagonismus aminoglykosidů a fágů prokázala i další studie, z jejíž výsledků vyplývá, že aminoglykosidy blokují časnou fázi životního cyklu fágů, tedy ještě před replikací genomu (Kever et al. 2022).

## 2.6 ATB cílící na proteosyntézu

Antibiotika jsou většinou látky mikrobiálního původu, které svým producentům poskytují kompetiční výhodu díky selektivní toxicitě vůči konkurenčním bakteriím. Antibiotika lze rozdělit podle struktur či procesů, na které cílí: buněčná stěna (peniciliny, cefalosporiny), cytoplazmatická membrána (polymyxiny), syntéza nukleových kyselin (chinolony), syntéza kyseliny listové (sulfonamidy) či syntéza proteinů (aminoglykosidy, makrolidy, tetracykliny, amfenikoly). Tato práce je zaměřena na popsání vlivu antibiotik inhibujících proteosyntézu na fágy, pročež je věnována pozornost této skupině antibiotik.

Antibiotik inhibujících proteosyntézu existuje hned několik skupin, s odlišným mechanismem působení: aminoglykosidy a tetracykliny se vážou na malou ribozomální podjednotku 30S; zatímco amfenikoly, makrolidy, linkosamidy či streptograminy se vážou na velkou ribozomální podjednotku 50S. Protože např. erythromycin, gentamicin, tetracyklin a chloramfenikol působí v různých fázích translace (obrázek 10), lze je využít pro studium mechanismů inhibice či synergie s fágovou infekcí.



**Obrázek 10: Působení erytromycinu, gentamicinu, tetracyklinu a chloramfenikolu na prokaryotickou syntézu proteinů (Bauman, 2004; upraveno)**

### 2.6.1 Erytromycin (ERY)

Jedná se o bakteriostatické ATB ze skupiny makrolidů vázající se na 50S ribozomální podjednotku (Dörries, Schlueter, *et al.* 2014). ERY blokuje přesun aminoacyl-tRNA z vazebného místa A na vazebné místo P, což vede k disociaci peptidyl-tRNA z ribozomu a inhibici růstu polypeptidového řetězce. První klinické izoláty stafylokoků s rezistencí vůči makrolidům byly popsány již nedlouho po zavedení erytromycinu do klinické praxe v roce 1952 (Weisblum, 1998). Rezistence může být navozena inhibicí transportu ERY do buňky, aktivním efluxem, modifikací samotného antibiotika, nebo nejčastěji změnou ve struktuře vazebného místa na 23S rRNA. Ta může být způsobena mutací, či posttranskripčními modifikacemi jako je metylace. Rezistence zapříčiněná alterací cílového místa se logicky vztahuje i na další ATB cílící na tuto oblast, tj. také na linkosamidy a B Streptograminy. Proto se souhrnně označuje jako MLS rezistence. Uživatelé erythromycinu se mohou setkat s vedlejšími účinky jako průjem, nauzea či zvracení v důsledku zvýšení střevní motility, při hypersenzitivní reakci může navíc docházet k narušení funkce jater.

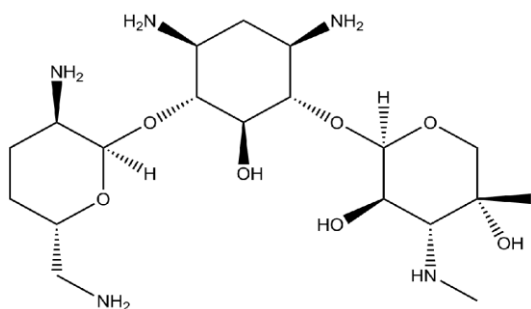
### 2.6.2 Gentamicin (GEN)

Je baktericidní ATB ze skupiny aminoglykosidů, které nachází v klinické praxi uplatnění zejména proti gramnegativním aerobním či fakultativně anaerobním bakteriím, protože jeho vstup skrze membránu probíhá prostřednictvím kyslík-dependentního

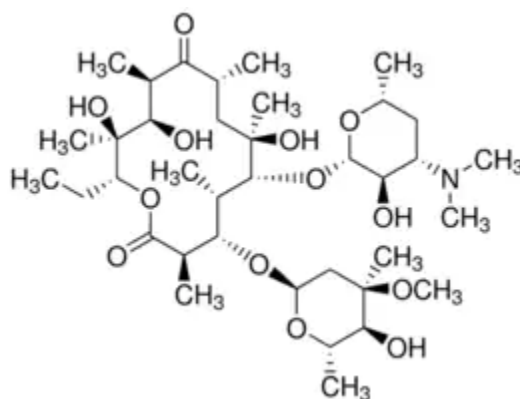
aktivního transportu (Chaves *et Tadi*, 2023). GEN se elektrostaticky váže na záporně nabitě teichoové kyseliny a fosfolipidy v buněčné membráně. To vede k vytěsnění dvojmocných kationtů a zvýšení propustnosti membrány, což umožňuje vstup GEN do buňky. V závislosti na protonmotivní síle vstupuje do buňky nejprve menší množství GEN. Ireverzibilně se váže na 16S rRNA podjednotky 30S, což vede k chybné translaci a ke vzniku nefunkčních proteinů. V důsledku akumulace chybně syntetizovaných proteinů se narušuje celistvost cytoplazmatické membrány a dochází k průniku většího množství GEN.

Rezistence vůči aminoglykosidům může spočívat v jejich deaktivaci pomocí N-acetylace, adenylace či O-fosforylace, dále také ve snížení vnitřní koncentrace aminoglykosidů skrze zvýšený eflux nebo změně v transportu do buňky (Shakil *et al.* 2008). Rezistence může být navozena také mutacemi v ribozomální podjednotce 30S či metylací vazebného místa.

V klinické praxi se využívá kombinace GEN s beta-laktamy, která umožňuje léčbu komplexních infekcí a umožňuje snížit dávku ATB, a tím i nežádoucí účinky. Gentamicin je nefrotoxický a ototoxický.



Obrázek 11: Gentamicin (phytotechlab.com)



Obrázek 12: Erytromycin (sigmaaldrich.com)

### 2.6.3 Tetracyklin (TET)

Jedná se o bakteriostatické ATB, jehož selektivní toxicita je dána tím, že u bakteriálních buněk dochází k jeho aktivnímu transportu do buňky, jeho cytoplazmatické koncentrace tak dosahují výrazně vyšších hodnot než u buněk eukaryot (McMurry *et Levy*, 1978). Reverzibilně se váže na 30S ribozomální podjednotku a blokuje vazbu vstupující aminoacyl-tRNA na akceptorové místo ribozomu (Chukwudi, 2016). Do určité míry se také váže na 50S ribozomální podjednotku a může způsobovat alterace v cytoplazmatické membráně. Rezistence je často způsobena aktivním efluxem TET z buňky či tvorbou proteinů chránících ribozom před působením tetracyklinu.

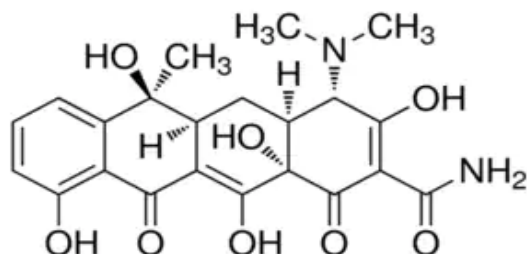
Užívání tetracyklinu přináší řadu nežádoucích účinků, jako je fototoxicita či poškození zubní skloviny a kostí. Kvůli interakci s vyvíjejícím se chrupem a kostrou nebývá indikován u dětí.

#### 2.6.4 Chloramfenikol (CLMP)

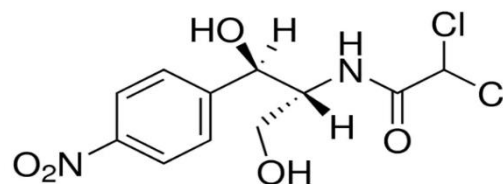
CLMP je rozpustný v tucích, což mu umožňuje volně pronikat skrze cytoplazmatickou membránu (Sanga *et Kharel*, 2022). V cytoplasmě se váže na protein L16 ribozomální podjednotky 50S (Pongs *et al.*, 1973). Blokadí peptidyltransferázy brání vzniku nové peptidické vazby a tím prodlužování peptidového řetězce, což má při běžně užívaných koncentracích bakteriostatický efekt (Wolfe *et Hahn*, 1965).

Při studiu vlivu chloramfenikolu na expresi genů MRSA bylo zjištěno, že vede k up-regulaci genů zapojených do procesu translace (Zin *et al.* 2020). Tento efekt je vysvětlován jako snaha bakterie o obnovení úrovně proteosyntézy a byl pozorováno také u *E. coli*, *Haemophilus influenzae* či *Streptococcus pneumoniae*.

Rezistence k CLMP je podmíněna zejména chloramfenikol-acetyltransferázou či efluxem antibiotika z buňky. Při užívání CLMP existuje riziko aplastické anémie, kdy dochází k nevratnému poškození kmenových krvetvorných buněk. Jednou z teorií, jak k tomu dochází, je přeměna CLMP střevní mikroflórou na toxický produkt poškozující zárodečné buňky (Jimenez *et al.* 1987). Dále se předpokládá, že při virové hepatitidě dochází k abnormálnímu metabolismu CLMP, který vede k redukci nitrobenzenového kruhu na nitroso funkční skupinu, která může být příčinou inhibice kmenových buněk (Drago 2019). Jelikož se riziko aplastické anémie pojí s vnitřním užitím, může být CLMP stále vhodným lékem volby při povrchových infekcích.



Obrázek 13: Tetracyklin  
(sigmaaldrich.com)



Obrázek 14: Chloramfenikol  
(sigmaaldrich.com)

## 2.7 Synergický efekt ATB a fágů (PAS)

Ačkoliv ATB i fágy jsou lidstvu známy už od první poloviny 20. století, jejich synergickému působení je věnována pozornost až v posledních dvou dekadách. Na synergický potenciál kombinace ATB a fágů poprvé upozornil jev, kdy se na nárůstu uropatogenního kmene *E. coli* vystavenému diskovým difuzním ATB testům objevily plaky, které se směrem k diskům zvětšovaly (Comeau *et al.* 2007). Ke zvětšení plak došlo u  $\beta$ -laktamových antibiotik působících na bakteriální buněčnou stěnu (obr. 15). Synergii, tedy zvýšení lytické aktivity fágů v přítomnosti subletální koncentrace ATB, se poté podařilo prokázat i u některých dalších ATB a fágů. Problematice mechanismů, které stojí za PAS se podrobněji věnuji ve své bakalářské práci.

Mechanismus synergie fágů s ATB inhibujícími proteosyntézu stále není dostatečně objasněn. Otázkou je, jak mohou fágy profitovat z inhibované proteosyntézy hostitele, na které jsou plně závislé. Tuto problematiku rozebírá následující kapitola.



Obrázek 15: Synergický efekt  $\beta$ -laktamových ATB a fága MFP (Comeau *et al.* 2007)

### 2.7.1 Předpokládané mechanismy PAS vlivem ATB inhibujících proteosyntézu

#### 2.7.1.1 Urychlená lyze

Studie, která došla k závěru, že za synergický efekt ATB a fágů je odpovědná urychlená lyze hostitelské buňky, se zabývala kombinací stafylokokového fága MR-5 s ATB linezolidem, tetracyklinem, klaritromycinem a telithromycin (Kaur, Harjai, *et Chhibber* 2012). Experimenty probíhaly na kmenech MRSA, které byly nejprve ošetřeny ATB a následně vystaveny fágu MR-5. K nejvýraznější synergii vedla kombinace fága se subletální koncentrací linezolidu, takto ošetřené buňky lyzovaly o 16,7 minut rychleji než MRSA vystavený pouze fágu bez přítomnosti ATB, zároveň bylo pozorováno zvýšení fágového výnosu v přítomnosti ATB.

Tabulka 1: Čas lyze MRSA fágem MR-5 v kombinaci s vlivem vybraných ATB (Kaur *et al.* 2012)

ATB ( $\mu\text{g/ml}$ )	Čas lyze (min)	Fágový výnos
Kontrola	33,3	51,7
Linezolid (1)	16,6	58,6
Tetracyklin (0,25)	18,3	57,4
Klaritromycin (4)	23,4	54,7
Telitromycin (4)	23,4	54,1

#### 2.7.1.2 Zpomalení růstu bakterií

Subletální koncentrace ATB ovlivňujících proteosyntézu zpomaluje bakteriální růst (Kaur *et al.* 2012). V kontextu bakteriální kultury tak dochází k oddálení stacionární fáze, což může mít příznivý vliv na fágy závislé na exponenciální fázi růstu hostitelské kultury. Navíc pomalejší vznik hustého bakteriálního nárůstu vede k efektivnějšímu šíření fágů v médiu, což přispívá ke komplexnější infekci kultury.

#### 2.7.1.3 Usnadněná fágová adsorpce

U buněk MRSA předem ošetřených linezolidem a tetracyklinem byla pozorována urychlená adsorpce fága MR-5 (Kaur *et al.* 2012). Vzhledem, že tento jev byl v řadě studií důsledkem alterace v morfologii bakterií vystavených ATB (Comeau *et al.* 2007; Kamal *et al.* 2015), bylo ověřeno, zdali nedošlo k morfologickým změnám také u buněk MRSA ošetřených linezolidem a tetracyklinem (Kaur *et al.* 2012). Změny v morfologii nebyly pozorovány, za usnadněnou fágovou adsorpcí je tak pravděpodobně zodpovědný v případě výše zmíněných ATB odlišný mechanismus.

#### 2.7.1.4 Inhibice syntézy proteinů zodpovědných za rezistenci k fágům

Fágy jsou plně závislé na schopnosti svého hostitele syntetizovat proteiny. Z tohoto důvodu by ATB ovlivňující proteosyntézu měla být škodlivá jak pro bakterie, tak pro fágy. Nicméně řada studií prokázala mezi těmito dvěma složkami naopak synergický efekt (tabulka 2). Vysvětlení tohoto jevu zatím není spolehlivě popsáno a jedním z cílů této diplomové práce je přispět k jeho objasnění. Jak je patrné z kapitoly 2.4.3

[Specifické obranné mechanismy fágového původu](#), většina mechanismů rezistence bakterií vůči fágům je zprostředkována proteiny. Z této skutečnosti vychází hypotéza, že synergie mezi fágy a ATB ovlivňujícími proteosyntézu spočívá v tom, že tato ATB inhibují expresi proteinů zodpovědných za odolnost bakterií vůči fágům. To může být pro fágy výhodné i za cenu ovlivnění syntézy jejich vlastních proteinů. Obrana proti fágům může být kódována MGE jako jsou profágy či genomické ostrovy. Jednou z metod, jak tuto hypotézu prokázat, je přenést dobře charakterizovaný MGE kódující fágovou rezistenci do kmenů citlivých k fágům, a následně testovat změnu jejich citlivosti k fágům v/bez přítomnosti ATB (obr. 16).

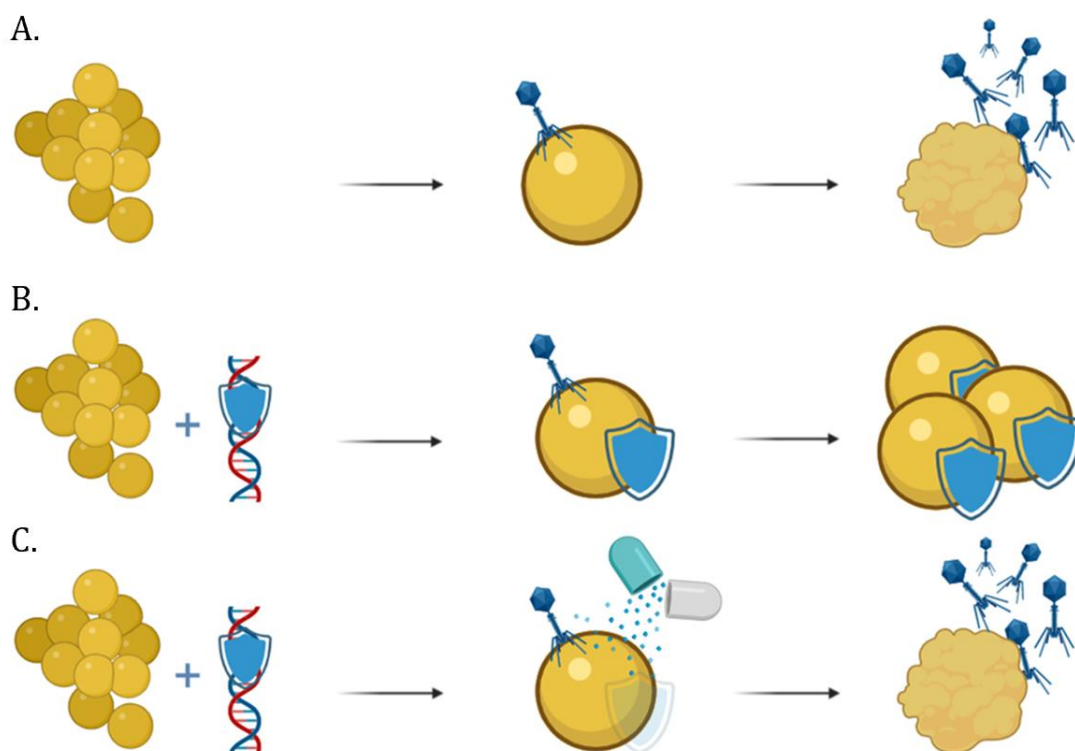
**Tabulka 2: Shrnutí synergických kombinací fágů a ATB inhibujících proteosyntézu při eradikaci *S. aureus***

Kmen <i>S. aureus</i>	Forma	Bakteriofág	ATB	Reference
Newman	<i>In vitro</i> , biofilm	PY0	Tetracyklin Erytromycin Gentamicin	Dickey <i>et al.</i> , 2019
PS80	<i>In vitro</i> , planktonní, biofilm	SA5	Gentamicin	Kirby, 2012
KACC 13236	<i>In vitro</i> , planktonní	SA11	Chloramfenikol	Jo <i>et al.</i> , 2016
ATCC 43300	<i>In vivo</i> , myši s navozeným <i>Diabetes mellitus</i>	MR-10	Linezolid	Chhibber <i>et al.</i> , 2013)
ATCC 43300	<i>In vitro</i> , planktonní, nárůst	MR-5	Linezolid Tetracyklin Klaritromycin Telitromycin	Kaur <i>et al.</i> , 2012
JJ2528	<i>In vitro</i> , planktonní	ΦHP3	Kanamycin Gentamicin Tetracyklin	Gu Liu <i>et al.</i> 2020

Za synergii mezi fágy a inhibitory proteosyntézy mohou být zodpovědné různé mechanismy. Např. u MRSA byla popsána snaha bakterie o vyvážení proteosyntézy inhibované chloramfenikolem up-regulací genů zapojených do syntézy proteinů (Zin *et al.* 2020). To by mohlo vést k efektivnější tvorbě nových virionů. Roli v synergickém působení může hrát také skutečnost, že ač jsou fágy závislé na translačním aparátu hostitele, mohou nést části translační výbavy ve svém genomu, např. geny pro tRNA (Nyerges *et al.* 2023).

Nicméně, ačkoliv řada studií popisuje synergii mezi fágy a ATB inhibujícími proteosyntézu, existují také studie, které naopak prokazují v některých případech přímý antagonismus (Kever *et al.* 2022; Pons *et al.* 2023; Zuo *et al.* 2021). Jako příklad může

posloužit popsaná inhibice propagace fága v přítomnosti ATB inhibujícího syntézu proteinů prostřednictvím snížení produkce fágových peptidů, které slouží k inhibici CRISPR-Cas systémů, tzv. anti-CRISPR (Acr) proteiny (Pons *et al.* 2023). Acr proteiny jsou intenzivně exprimovány na začátku infekce. Aby se fág mohl úspěšně pomnožit na hostiteli, který je proti němu vyzbrojen CRISPR-Cas systémem, musí se vytvořit dostatečná koncentrace Acr proteinů. Právě v tom však bránila inhibice proteosyntézy vlivem ATB. Přesto tato studie hypotézu ohledně mechanismu PAS vlivem inhibice proteinů fágové rezistence nepopírá. To proto, že se jednalo o případ, kdy podmínkou fágové infekce bylo překonání obranného mechanismu produkcí specifického fágového proteinu. Pokud je však specifický protein naopak podmínkou rezistence bakterie k fágu, pak vlivem jeho snížené produkce může dojít k produktivní fágové infekci. O ověření této hypotézy se pokouší předložená práce.



**Obrázek 16: Návrh vytvoření systému vhodného pro ověření hypotézy mechanismu PAS s antibiotiky inhibujícími proteosyntézu.** Do kmene citlivého k fágu (A) je vnesen MGE z něž se exprimuje protein navozující u tohoto kmene fágovou rezistenci (B). Je-li výše zmíněná teorie správná, pak v přítomnosti ATB inhibujícího proteosyntézu dochází ke snížení exprese proteinu, jež poskytuje rezistenci a kmen se stává opět citlivý k fágu (C). (vytvořeno pomocí nástroje BioRender)

## 2.8 Výzvy při využití kombinace ATB a fágů

Ke stanovení výsledného efektu kombinace ATB a fágů za širokého rozpětí podmínek byla navržena metoda využívající synogramy (Gu Liu *et al.* 2020). Pomocí synogramů lze stanovit například závislost výsledného efektu kombinace ATB a fágů na stechiometrii. Ta se ukázala pro PAS klíčová. Zatímco při aplikaci určitých koncentrací ATB a fágů docházelo k synergii, při použití odlišných koncentrací se mohl efekt změnit pouze na aditivní či dokonce na antagonistický (Gu Liu *et al.*, 2020). Rozsah koncentrací, které působí synergicky se přitom v jednotlivých případech značně liší. Toto představuje pro aplikaci fágů spolu s ATB v praxi problém, protože lze jen těžko předpovídat výsledné koncentrace obou složek v těle pacienta.

Navíc se ukazuje, že výsledný efekt kombinace ATB a fágů může být *in vivo* odlišný od efektu *in vitro* také kvůli chemickému složení substrátu (Gu Liu *et al.*, 2020). Bylo dokázáno, že například v kyselém prostředí lidské moči dochází ke snížení účinnosti fágů či k zvýšení MIC antibiotik. K dosažení synergie tak bylo zapotřebí zvýšit koncentrace antibakteriálních složek.

Problém představuje také velmi specifický charakter synogramu pro konkrétní kombinace. Zaměníme-li v definované kombinaci vykazující synergii např. fága za jiného s takřka identickým genomem a výrazně odlišným fágovým výnosem, charakter interakce ATB a fága vůči bakterii se může radikálně změnit. To samé platí při záměně ATB za jiné ATB se stejným mechanismem účinku (Gu Liu *et al.*, 2020).

Řada výše zmíněných proměnných spolu s dalšími, jako je např. pořadí aplikace jednotlivých složek (Kumaran *et al.*, 2018), výrazně ovlivňují povahu efektu ATB a fágů. Proto je obtížné předpovědět výsledný efekt při klinické aplikaci. Aby byly překonány tyto výzvy, je třeba podrobných studií, které pomohou nalézt nejen nejvhodnější kombinace, ale také jejich nejefektivnější stechiometrii, interakce s prostředím a mnohé další proměnné faktory.

Další výzvou při využití kombinace ATB a fágů je přenos antibiotické rezistence prostřednictvím transdukce (Leclerc, Lindsay, *et Knight* 2022). Nižší koncentrace fága schopného transdukce a jeho omezená baktericidní aktivita může podpořit vznik multirezistentních bakterií, které jsou v přítomnosti ATB navíc zvýhodněny a selektovány. Toto bylo pozorováno v uměle vytvořeném systému, který zahrnoval dva kmeny *S. aureus*; jeden nesoucí rezistenci k tetracyklinu (gen *tetK*) a druhý k erytromycinu (gen *ermB*). Horizontální přenos genů mohl proběhnout pouze skrze transdukci, která byla zprostředkována fágem 80 $\alpha$ . Ačkoliv se jedná o temperovaného fága, k lyzogenii u něj dochází jen s velmi nízkou frekvencí ( $3.3 \times 10^{-8}$ ). Při kokultivaci kmene rezistentního k tetracyklinu s kmenem rezistentním k erytromycinu byla pozorována transdukce genů zodpovědných za rezistenci a vznik variant odolných proti oběma ATB. V přítomnosti ATB je efekt transdukce navíc podpořen selekcí, což má za následek zvýšení rezistentní populace. Studie popisuje také závislost výsledného efektu kombinace ATB a fága na pořadí aplikace. Zatímco v případě, kdy

byla aplikována ATB před fágy, docházelo k nižší eradikaci stafylokokové kultury, při přednostním podání fágů existovalo vyšší riziko vzniku multirezistentních variant.

## 2.9 Synergické kombinace fágů a ATB inhibujících proteosyntézu u *S. aureus*

### 2.9.1 Eradikace biofilmu

K největším výzvám při boji s infekcemi způsobenými *S. aureus* jsou rezistence k ATB, schopnost perzistovat v prostředí a chronické infekce. Všechny tyto tři vlastnosti jsou podporovány tvorbou biofilmu. Při eradikaci biofilmu *S. aureus* se ukázalo jako esenciální pořadí aplikace jednotlivých složek (Kumaran *et al.* 2018). Bakterie nacházející se v biofilmu vykazují vyšší toleranci k antibiotikům než jejich planktonní formy. Jedním z důvodů je extracelulární matrix tvořící biofilm, která omezuje difuzi antibiotik a snižuje tak výslednou koncentraci, které jsou buňky uvnitř biofilmu vystaveny. Dalším principem zvýšené rezistence je stratifikace zralého biofilmu způsobená rozdílnou distribucí živin a bakteriálních metabolitů v rámci biofilmu. Ta má za následek, že buňky uložené v hlubších vrstvách mají nižší metabolickou aktivitu než ty vyskytující se více na povrchu. Metabolicky méně aktivní bakterie jsou pak odolnější např. proti antibiotikům, které k tomu, aby byly účinné vyžadují jejich růst a dělení.

*S. aureus* je díky své schopnosti efektivně tvořit biofilm a perzistovat na površích častým původcem infekcí spojených s operací kloubů. Jako preventivní opatření proti kolonizaci kloubních implantátů tímto patogenem byla navržena impregnace povrchů směsí fága MR-5 a linezolidu (Kaur, Harjai, *et Chhibber* 2014). Povrchy umělých kloubů ošetřené pouze linezolidem či pouze fágem MR-5 umožnily podobnou úroveň bakteriální kolonizace. V porovnání s použitím ATB či fága samostatně dokázala kombinace obou složek snížit nárůst biomasy *S. aureus* o více jak řád.

*In vitro* studie Kaur *et al.* z roku 2014 byla o dva roky později doplněna o *in vivo* studii, kde se efektivita zabránění bakteriální kolonizace umělých kloubů pomocí impregnace linezolidem a fágem MR-5 ověřovala na myších (Kaur, Harjai *et Chhibber* 2016). Ošetření femorálního intramedulárního hřebu kombinací ATB a fága vykazovalo maximální redukci bakteriální adheze a omezení rozvoje s tím souvisejícího zánetu kloubu, spolu s rychlejším obnovením lokomoce a motorické funkce končetiny.

### 2.9.2 Snížení potřebné koncentrace ATB

Vzhledem k toxické povaze mnoha antibiotik je jednou z velkých výhod PAS zvýšení efektivity nízké koncentrace ATB (Dickey *et Perrot* 2019). Toto bylo potvrzeno při zkoumání účinku kombinace fága PYO a devíti ATB na eradikaci biofilmu *S. aureus* (4 z 9 ATB byly inhibitory proteosyntézy: gentamicin, tetracyklin, erytromycin a line-

zolid). V případě aplikace samotných ATB inhibujících proteosyntézu bylo pro efektivní eradikaci biofilmu třeba použít  $10\times$  MIC. Při koncentraci pouhých  $2\times$  MIC neměly samotné inhibitory proteosyntézy na biofilm výrazný vliv. Avšak v kombinaci s fágem byla i koncentrace  $2\times$  MIC pro efektivní eradikaci biofilmu dostačující. I zde hrálo roli pořadí aplikace. Zatímco při současné aplikaci fága a ATB došlo k synergii jen v případě tetracyklinu, byl-li biofilm ošetřen nejprve fágem a až následně ATB, došlo u všech 4 výše zmíněných ATB k značně zvýšené efektivitě. Podstatným poznatkem je, že k synergii docházelo při  $2\times$  MIC. Vyšší koncentrace ATB, tedy  $10\times$  MIC, většinou nevedla u fágem ošetřeného biofilmu k úspěšnější eradikaci, a naopak v některých případech docházelo k antagonismu. Výjimku představuje gentamicin, u kterého byl s vzrůstající koncentrací pozorován i nárůst v kombinovaném účinku. Ačkoliv je zvýšení efektivity subinhibiční koncentrace ATB, které bylo v této studii dosaženo velmi slibným výsledkem, některé publikace před aplikací nižší koncentrace ATB ve spojitosti s fágy varují v souvislosti s transdukcí a selekcí rezistentních variant (Leclerc *et al.* 2022). Nutno však podotknout, že Leclerc *et al.* ve svých experimentech pracovali s temperovaným fágem.

### 2.9.3 Zabránění rezistence

Hlavním důvodem výzkumů alternativních způsobů léčby bakteriálních infekcí, jako je fágová terapie či synergický efekt ATB a fágů, je antibiotická rezistence. Tento globální problém se nevyhýbá ani České republice. Roku 2021 zde z více jak 2000 testovaných izolátů 9,4 % představoval MRSA (atlas.ecdc.europa.eu, 2023). Ačkoliv se fágy jeví jako slibná alternativa, také proti nim jsou bakterie schopné získat rezistenci. Jako efektivní způsob potlačení rezistence se ukázala právě kombinace obou výše zmíněných složek (Kirby 2012). Jelikož mechanismy rezistence vůči ATB jsou odlišné od rezistence k fágům, pravděpodobnost, že by se jeden kmen stal odolný vůči oběma složkám je velmi nízká. K tomu přispívá také fakt, že samotná rezistence je zátěží pro bakteriální metabolismus. Tato teorie byla ověřena na kontinuální kultuře *S. aureus* pomocí fága SA5 a gentamicinu. Samostatná aplikace antimikrobiálních složek vedla k nárůstu rezistentních variant. Oproti tomu použití fága SA5 a gentamicinu společně vedlo k eradikaci kultury bez nárůstu rezistentních variant. V přítomnosti gentamicinu navíc měl *S. aureus* tendenci k agregaci a tvorbě biofilmu. Tento fenotyp vykazoval větší náchylnost k fágové infekci, v přítomnosti gentamicinu tak byla fágová infekce úspěšnější a eradikace bakteriální kultury efektivnější.

Kombinace fágů a antibiotik se ukázala také jako efektivní způsob resenzitivizace již rezistentních kmenů (Jo, Ding, *et al.* 2016). Byl použit kmen *S. aureus* rezistentní vůči TET a CLMP, na který byl aplikován fág SA11 v kombinaci se subletální koncentrací výše uvedených ATB. I přesto, že kmen vykazoval vůči ATB rezistenci, v případě TET byla pozorována synergie, kombinace s chloramfenikolem pak byla pouze aditivní.

### 3 Cíle diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo přispět k charakterizaci mechanismu synergického působení fágů s antibiotiky inhibujícími proteosyntézu spolu s testováním vhodné léčivé formy pro aplikaci fágů při povrchových infekcích. Byly stanoveny tyto dílčí cíle:

1. Příprava modelových systémů pomocí vnesení genu pro rezistenci k fágům do původně citlivého kmene.
2. Stanovit výsledný efekt přítomnosti antibiotik působících v různých fázích translace, tj. při iniciaci (gentamicin), při vazbě tRNA (tetracyklin), při tvorbě peptidové vazby (chloramfenikol), nebo při pohybu ribozomu po mRNA (erytromycin), na fágový výtěžek a na schopnost eradikace kmenů se známým původem rezistence.
3. Stanovit stabilitu terapeutických fágů v různých nosičích využitelných pro povrchovou aplikaci společně s antibiotiky, a to v různých rozmezích teplot, pH a UV záření.

## 4 Materiály

### 4.1 Bakteriální kmeny

Tabulka 3: Seznam bakteriálních kmenů *S. aureus* a jejich stručná charakteristika

Kmen	Charakteristika a využití	Sekvenční typ	Tvorba biofilmu	Zdroj
1039	Kmen bez Spa, profágů a RM systémů, akceptor MGE	ST97	-	Sbírka LMDM
1039(phi_244_1+)	Lyzogenní kmen	ST97		Vytvořeno v této práci
1039(phi_2650_2+/3+)	Lyzogenní kmen	ST97		Vytvořeno v této práci
1039(53+)	Lyzogenní kmen	ST97	-	Vytvořeno v této práci
RN4220	Kmen citlivý k fágům typu 812	ST8	3	Sbírka LMDM
RN4220 <i>ΔtarM</i>	Kmen citlivý k lytickým fágům použitým v této práci, akceptor MGE	ST8	3	Sbírka LMDM
RN4220(53+)	Lyzogenní kmen	ST8	3	Sbírka LMDM
1137	Pomnožovací kmen pro fágy typu 812	ST4618	0	Sbírka LMDM
E48	Přirozeně obsahuje profága Φ53	ST8	-	Sbírka LMDM
E61	Kmen citlivý k fágu 812 a rezistentní k Φ53	ST111	N/A	Sbírka LMDM
NRL Atb 2650/09	Vícenásobný lyzogen, donor MGE	ST45	3	Sbírka LMDM
NRL Atb 244	Vícenásobný lyzogen, donor MGE	ST8	0	Sbírka LMDM

### 4.2 Antibiotika

Tabulka 4: Seznam použitých ATB

Antibiotikum	Způsob aplikace	Výrobce
Erythromycin	Vodný roztok / Disk (15 µg)	Sigma-Aldrich / Oxoid
Gentamicin	Vodný roztok / Disk (10 µg)	Sigma-Aldrich / Oxoid
Tetracyklin	Vodný roztok / Disk (30 µg)	Sigma-Aldrich / Oxoid
Chloramfenikol	Vodný roztok / Disk (30 µg)	Sigma-Aldrich / Oxoid

Neomycin	Disk (30 µg)	Oxoid
Kanamycin	Vodný roztok / Disk (30 µg)	Sigma-Aldrich / Oxoid

Antibiotika použita ve formě vodného roztoku byla naředěna na potřebnou koncentraci ve sterilní destilované vodě ze zásobního roztoku, který byl připraven rozpuštěním práškové formy antibiotika ve vodě (gentamicin, erytromycin, kanamycin) či v etanolu (tetracyklin, chloramfenikol). Zásobní roztoky antibiotik byly skladovány při teplotě - 20 °C.

### 4.3 Bakteriofágy

Tabulka 5: Použité bakteriofágy a kmeny na nichž byly pomnoženy

Lytické bakteriofágy	Kmeny <i>S. aureus</i> použité k pomnožení	Zdroj
812	1137	Sbírka LMDM
812h1	1137	Sbírka LMDM
812K1/420	1137	Sbírka LMDM
p68	RN4220 $\Delta$ <i>tarM</i>	Sbírka LMDM
Φ53	1039	Sbírka LMDM

### 4.4 Média a směsi

#### Masopeptonový bujón (MPB)

Nutrient broth (Oxoid)	13 g
Yeast extrakt (Oxoid)	3 g
Pepton (Imuna)	5 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

#### Masopeptonový agar (MPA) 0,7/1,5 %

Nutrient broth (Oxoid)	13 g
Yeast extrakt (Oxoid)	3 g
Pepton (Imuna)	5 g
Agar	7/15 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

## MATERIÁLY

---

### 0,02 M CaCl<sub>2</sub>

CaCl<sub>2</sub> 2,2 g  
H<sub>2</sub>O 1000 ml

### Fyziologický roztok

NaCl 8,5 g  
H<sub>2</sub>O 1000 ml

### Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (cfu)

NaCl 8 g  
KCl 0,2 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,95 g  
H<sub>2</sub>O 1000 ml

### Fágový pufr

5M NaCl 2 ml  
CaCl<sub>2</sub> 1,1 g  
1M Tris 8 50 ml  
H<sub>2</sub>O 948 ml

### Hognes's modified freezing medium (HMFM)

3,6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O 0,82 g  
1,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,175 g  
2,0 mM dihydrát citrátu sodného 0,59 g  
1,0 mM MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,245 g  
4,4 % (v/v) glycerol 44 ml  
H<sub>2</sub>O do výsledného objemu 1000 ml

### 50x TAE

Tris-base 24,2 g  
Kyselina octová (ledová) 57,1 ml  
0,5 M EDTA (pH 8) 100 ml  
H<sub>2</sub>O do výsledného objemu 1000 ml

### Promývací roztok pro PFGE

Tris Cl 1 M pH 7,5 10 ml  
EDTA 0,5 M 20 ml  
EGTA 0,5 M 20 ml  
NaCl 5 M 200 ml  
H<sub>2</sub>O 750 ml

**Lyzační roztok pro PFGE**

Tris 1 M pH 7,8	0,6 ml
EDTA 0,5 M	20 ml
BRIJ 58	0,5 g
Laurylsarkosin	0,5 g
Na - deoxycholát	0,2 g
H <sub>2</sub> O	Do 100 ml

**Deproteinizační roztok na PFGE**

EDTA 0,5 M	5 ml
EGTA 0,5 M	4 ml
Laurylsarkosin	1 g
NaOH	Přidáváno do pH 9
H <sub>2</sub> O	Do 100 ml

**Fágový pufr**

NaCl 5M	2 ml
CaCl <sub>2</sub> 0,02M	1,1 g
Tris 1M pH 8	50 ml
H <sub>2</sub> O	948 ml

**TE pufr**

EDTA 0,5M	2 ml
Tris 1M pH 8	10 ml
H <sub>2</sub> O	988 ml

**10× koncentrovaného profágového bujónu**

Trypton	10 g
Yeast extract	2 g
NaCl	2 g
Nutrient broth	13 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

**10 M NaOH**

NaOH	40 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

## MATERIÁLY

---

### Sevageova směs

Chloroform	480 ml
Isoamylalkohol	20 ml

### Promývací roztok na lyzogenizaci

0,15 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	11,7 g
0,15 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	26,85 g
0,01 M citrát sodný	14,7 g
H <sub>2</sub> O	500 ml

### Karbomerový gel

Fágový pufr	100 g
Karbomer	1 g
NaOH	Do pH 7

Veškerá média byla sterilizována autoklávováním při teplotě 120 °C. Výjimku tvoří Lyzační roztok pro PFGE a Deproteinizační roztok na PFGE, jehož sterilita byla po přidání všech komponent zajištěna tak, že byl přefiltrován přes 0,22 µm filtr (Filtratech).

Pokud byla média použita pro propagaci fágů, obsahovala přídavek CaCl<sub>2</sub> (1/10 objemu 0,02 M CaCl<sub>2</sub>). Naopak pro inhibici adsorpce fága bylo použito MPA s 0,01M citrátem sodným k vyvážení vápenatých kationtů.

U MPB, MPA, PBS a 10× koncentrovaného profágového bujónu bylo před autoklávováním upraveno pH na 7,5 (u médií dochází při autoklávování ke snížení pH, takže výsledná hodnota byla blízka 7)

## 4.5 Enzymy

Tabulka 6: Použité enzymy a jejich zásobní koncentrace

Enzym	Zásobní koncentrace	Výrobce
One Taq Quick-Load Master Mix with Standard Buffer	2×	NEB
SmaI (CutSmart pufr)	20000 U/ml	NEB
Ribonukleáza	10 mg/ml	SIGMA
Lyzostafin	10 mg/ml	SIGMA
Proteináza K	20 mg/ml	Roche Diagnostics
Lysozym	50 mg/ml	SIGMA
Mutanolyzin	1000 U/ml	Roche Diagnostics
Achromopeptidáza	25000 U/ml	SIGMA

## 4.6 Chemikálie

CaCl <sub>2</sub> (Penta, ČR)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Lachema, ČR)
CH <sub>3</sub> COONa·3H <sub>2</sub> O (Lachema, ČR)	Fenol (Penta, ČR)
KCl (Lachema, ČR)	NaCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)
EDTA (SIGMA, SRN)	Glycerol (SIGMA, SRN)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Lachema, ČR)	Sodiumdodecylsulfát (SIGMA, SRN)
Ethidium Bromid (SIGMA, SRN)	Chloroform (Penta, ČR)
Kyselina octová (Penta, ČR)	Tris-base (SIGMA, SRN)

## 4.7 Přístroje

### Centrifugy

- JOUAN BR4i (Thermo Fisher Scientific), rotor AB 50.10A, S40
- Mini Spin plus (Eppendorf), rotor F-45-12-11

### Spektrofotometry

- Tecan infinite 200Pro (Tecan)
- Nanodrop ND-2000c (Thermo Scientific)
- Bioreactor RTS-8 (Biosan)
- CO8000 Cell Density Meter (Biowave)

### Sekvenátor

- Oxford Nanopore MinION (Oxford Nanopore Technologies)

### PCR cycler

- Labcycler Gradient (SensoQuest)

### Zdroje pro elektroforézu

- PowerPac 300 (Biorad)

### Fotodokumentace gelů

- InGenius 3 (Syngene)

### Termostaty

- Stolní termostat DB-2D (Techne)
- Termostat SHEL LAB (Biotech)
- Termostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha)
- Blokový termostat TDB-120 (Biosan)

### Pracovní boxy

- Box na PCR Biosan (Biotech)
- Laminární box Antares 48NF (Steril-Antares)

### Další

- Vortex-2 Genie (Scientific Industries)
- Indukční skříň
- Stolní vodní lázeň NB-303 (N-Biotek)
- Thermo Shaker TS-100 Biosan (Biotech)
- Váhy Navigator (OHAUS)
- Zařízení pro PFGE – CHEFF MAPPER (BioRad)

## 4.8 Bioinformatické nástroje

BLAST 2.13.0+ (National Center for Biotechnology Information, USA)

- analýza sekvencí
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA) (Ye *et al.*, 2012)

- návrh PCR primerů
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

NEBcutter 2.0

- in silico restriční štěpení
- <https://nc3.neb.com/NEBcutter/>

PHASTER (Arndt *et al.*, 2016)

- predikce profágů v bakteriálních genomech
- <https://phaster.ca/>

HHpred (Zimmermann *et al.*, 2018)

- predikce funkce proteinů
- <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>

PROKKA 1.14.5.

- nástroj k automatické anotaci prokaryotních sekvencí
- [https://usegalaxy.eu/root?tool\\_id=prokka](https://usegalaxy.eu/root?tool_id=prokka)

RAST 2.0

- automatická anotace bakteriálních genomů
- <https://rast.nmpdr.org/>

UGENE 43.0

- zobrazení a manuální anotace sekvencí
- <http://ugene.net/>

MinKnow 1.4.2 (Oxford Nanopore Technologies)

- ovládání sekvenátoru MinION, basecalling a trimming sekvenačních čtení

Flye 2.9.1

- složení genomových sekvencí (využito výchozí nastavení programu)
- <https://doi.org/10.1073/pnas.1604560113>

Medaka Consensus Pipeline 1.7.2 (Oxford Nanopore Technologies)

- polishing sestavené sekvence pomocí neurálních sítí (model r941\_min\_sup507)

## 5 Metody

### 5.1 Izolace bakteriální genomové DNA pomocí chloroformu

4. 1 ml kultury o  $OD_{600} = 1$  bylo centrifugováno  $16\,000\times g$  po dobu 1 min.
5. Supernatant byl odsán a pelet resuspendován v 1 ml promývacího roztoku pro PFGE. Byla opakována centrifugace jako v předchozím bodě (u biofilm tvořících kmenů bylo promytí  $2\times$  zopakováno).
6. Po odstranění supernatantu bylo přidáno 250  $\mu$ l STET pufru, 20  $\mu$ l lyzostafinu (0,5 mg/ml) 10  $\mu$ l achromopeptidázy (25000 U/ml) a 10  $\mu$ l mutanolýzinu (1000 U/ml). Směs byla  $10\times$  krátce vortexována a inkubována 2 hodiny (do projasnění) při 37 °C.
7. Bylo přidáno 20  $\mu$ l proteinázy K (20 mg/ml) a následovalo zvortexování a 10 minut dlouhá inkubace při 55 °C/900 rpm na třepacím termobloku.
8. Bylo přidáno 5  $\mu$ l RNázy A (10 mg/ml), směs byla opět zvortexována a inkubována při 37 °C po dobu 15 min.
9. Směs byla přenesena do centrifugační zkumavky s gelem o objemu 15 ml. Bylo přidáno 350  $\mu$ l spodní fáze fenol-Sevageovy směsi. Následovalo mírné promíchávání vzorku na hula kývačce pomalým převrácením 10 minut. Poté byla provedena centrifugace 15 min/5000 rpm/10 °C (JOUAN BR4i, rotor AB 50.10A, S40)
10. K vodné fázi bylo opět přidáno 350  $\mu$ l Sevageovy směsi a byl opakován postup z předchozího bodu.
11. Byla odebrána čistá horní fáze do Eppendorff zkumavky a vzorek byl uložen na led. Bylo přidáno 30  $\mu$ l vychlazeného 3M octanu sodného. Po promíchání bylo přidáno dvojnásobek objemu ledového 96 % etanolu.
12. Pro lepší srážení DNA byl vzorek přes noc uložen při - 20 °C.
13. Další den následovala centrifugace  $22000\times g/ 20\text{ min}/4\text{ °C}$ . Etanol byl odlit a k peletu bylo přidáno 300  $\mu$ l 75 % etanolu. Směs byla ponechána 5 minut při pokojové teplotě.
14. Byla opakována centrifugace, jako v předchozím bodě. Po odsátí supernatantu byl zbytkový etanol odpařen, přičemž se však pelet nesměl zcela vysušit.
15. DNA byla rozpuštěna ve 150  $\mu$ l 10 mM TE pufru (pH 8) a analyzována na Nanodropu. Vzorky byly následně skladovány v lednici.

### 5.2 Sekvenace na Oxford Nanopore MinION

1. Bylo smícháno 400 ng bakteriální DNA s 0,8  $\mu$ l FRA (fragmentační mix)
2. Následovala inkubace 30 °C/1,5 min a poté schlazení na 4 °C
3. Byly resuspendovány AMPure XP beads a vytemperovány na pokojovou teplotu

4. Ke směsi bylo pipetováno 60  $\mu$ l AMPure XP beads. Směs byla 10 minut promíchávána na Hula mixéru
5. Zkumavka byla vložena do magnetického stojánku a po projasnění byl odsán supernatant.
6. Pelet byl 2 $\times$  promyt 40  $\mu$ l 70% etanolu.
7. Po odstranění a odtěžení etanolu byla zkumavka vyndána ze stojánku a pelet byl opatrně resuspendován v 10  $\mu$ l NFW o teplotě 50 °C.
8. Následovala inkubace 5 min/21 °C.
9. Vzorek byl vrácen do magnetického stojánku a po projasnění byl eluát odpipeťován do nové 1,5 ml DNA Lo-bind zkumavky.
10. Bylo přidáno 0,4  $\mu$ l Rapid-Adapter, vzorek byl promíchán a mžikově stočen.
11. Následovalo 10 minut inkubace při pokojové teplotě.
12. Po analýze koncentrace a čistoty DNA na nanodropu byl připraven flowcell priming mix (117  $\mu$ l Flush pufru (FB) a 3  $\mu$ l Flush Tether (FLT)).
13. Po vnesení flowcell priming mixu do flowcely byla připravená knihovna smíchána s 15  $\mu$ l SBII a 10  $\mu$ l LB a vnesena do flowcely po kapkách bez přístupu vzduchu.
14. Byla spuštěna sekvenace v módu MUX Scan 1-1,5 hod/24 hod.

### 5.3 Indukce excize profága pomocí UV

1. ON kultura donorového kmene byla přelita do 50 ml MPB ve 200ml Erlenmeyerově baňce a zde provzdušňována 2 hod intenzivním třepáním při 37 °C.
2. 45 ml čerstvě narostlé kultury bylo přeneseno do zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml a zcentrifugováno 20 min/3000 rpm (JOUAN BR4i, rotor AB 50.10A, S40).
3. Sediment byl resuspendován v 5 ml 0,85% fyziologického roztoku a naředěn na OD600 = 0,15 – 0,20.
4. 10 ml suspenze bylo přeneseno do sterilní skleněné Petriho misky (bylo třeba vyhradit vždy jednu misku pro odlišné časy působení UV). Miska byla přemístěna do předem vysvícené indukční skříně a bylo z ní odkryto víčko.
5. Indukce UV zářením proběhla 45 cm od UV lampy (15 W) při době expozice 30 s, 40 s a 50 s, načež byla ozářená směs přemístěna do tmy.
6. Poté byla směs přenesena do provzdušňovačky s 10 ml 10 $\times$  koncentrovaného profágového bujónu a 30 ml 0,85% fyziologického roztoku.
7. Následovala inkubace 2 hod/37 °C při mírném provzdušňování. Dále bylo provedeno stanovení titru kapkovou metodou. Směs byla po inkubaci uložena přes noc při 4 °C.
8. Lyzát byl přenesen do 50 ml zkumavky. Následovala centrifugace 10 min./5000 rpm. (JOUAN BR4i, rotor AB 50.10A, S40)
9. Lyzát byl přefiltrován přes 0,45 $\mu$ m PES filtr (FiltrateCH) do nové zkumavky a skladován v lednici.

## 5.4 Stanovení titru kapkovou metodou

1. Do 10 ml ON kultury byl přidán 1 ml 0,02 M CaCl<sub>2</sub>.
2. Zkumavky s 2,5 ml rozvařeného 0,7% MPA s CaCl<sub>2</sub> bylo vytemperováno na 46 °C.
3. 100 µl kultury bylo přeneseno do vytemperované zkumavky s 0,7% MPA. Obsah zkumavky byl přelit na Petriho misku s 1,5% MPA.
4. Na zatuhlou misku bylo nakapáno 10 µl lyzátu z ředící řady zpravidla v rozmezí 10<sup>-1</sup> až 10<sup>-7</sup>. Po zaschnutí kapek byly misky přeneseny do 37 °C a inkubovány přes noc. Následně byl stanoven titer (PFU/ml).

## 5.5 Stanovení citlivosti kmene k fágů

Při stanovení citlivosti k fágů byl použit stejný postup jako u stanovení titru fágů. Kmen byl považován za citlivý v případě, že proběhla produktivní infekce fágem, která se projevila přítomností jednotlivých plak.

## 5.6 Izolace fágů z jedné plak

Prováděno u fágů indukovaných z kmenů NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09, jelikož oba tyto kmene obsahují více profágů a bylo třeba je separovat.

1. Byla připravena ON kultura kmenů 1039 a RN4220Δ*tarM* v 10 ml MPB.
2. Byl naředěn lyzát tak, aby po vnesení 100 µl do 0,7 % MPA spolu se 100 µl kultury vznikly po vylití na misku 1,5 % MPA jednotlivé plak
3. Do zkumavky typu Eppendorf bylo přidáno 500 µl kultury pomnožovacího kmene o OD<sub>600</sub> = 0,2.
4. Z Petriho misek bylo náhodným výběrem odpíchnuto 20 plak. Každá plaka byla jednotlivě přenesena do zkumavky Eppendorf s naředěnou suspenzí pomnožovacího kmene.
5. Směs byla inkubována na třepačce 2 hod/37 °C/180rpm. Následovala centrifugace 15 min/13 000 rpm. (Mini Spin plus, rotor F-45-12-11)
6. Polovina vzorků byla uložena do lednice, pro případ, že by následující kroky bylo třeba opakovat. Druhá polovina byla vyočkována na misku s 1,5% MPA přes 0,7% MPA (do zkumavky přidáno 100 µl lyzátu a 100 µl kultury).
7. Po 18h kultivaci byl pomnožený fág z misky smyt pomocí 3 ml MPB, přičemž MPB bylo na misce ponecháno po dobu 15 minut, aby se viriony uvolnily do média.
8. Médium bylo přeneseno do zkumavky a zcentrifugováno. Fág byl pomnožen do většího objemu podle protokolu

## 5.7 Příprava fágového lyzátu

1. Do 20 ml MPB ve sterilní provzdušňovací lahvi byly přeneseny 2 ml ON kultury. Následovalo provzdušňování po dobu 2 – 4 hod/37 °C, do zákalu odpovídajícímu zhruba 100 CFU/ml.
2. Byla přidána 1/10 objemu 0,02 M CaCl<sub>2</sub> a 2 – 3 ml fágového lyzátu.
3. Následovalo provzdušňování při 37 °C do úplné lyze bakteriální kultury, maximálně však probíhalo 3 hod. Poté byl lyzát uložen v lednici do dalšího dne.
4. Následně byl lyzát zcentrifugován 15 min/4500 rpm (JOUAN BR4i, rotor AB 50.10A, S40) a přefiltrován přes 0,45µm PES filtr (FiltrateCH) a byl stanoven titr fága.

## 5.8 Stanovení růstové křivky fága bez a v přítomnosti ATB

1. 2 ml ON kultury bylo přeneseno do sterilní 250ml Erlenmeyerovy baňky se 50 ml MPB s CaCl<sub>2</sub>.
2. Poté co kultura dosáhla OD<sub>600</sub> = 0,4 (titr 10<sup>8</sup> CFU/ml) byla přenesena do lednice na dobu 20 min.
3. Následně z ní bylo odebráno dvakrát po osmnácti ml a přeneseno do dvou Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml.
4. K jednomu vzorku byl přidán 1 ml ATB tak, aby výsledná koncentrace ve směsi byla rovna ¼ MIC a k druhému 1 ml vody. Takto ošetřené vzorky byly inkubovány 20 min při 37 °C.
5. Po 20 minutách byl ke směsi přidán 1 ml fága tak, aby byl výsledný titr ve směsi roven 10<sup>7</sup> PFU/ml (IR=0,1).
6. Směs byla dál třepána a inkubována ve vodní lázni při 37 °C a v časech 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 a 80 min bylo odebráno 500 µl.
7. Odebraný vzorek byl centrifugován 11000× g / 1 min / RT, supernatant byl zfiltrován filtrem s velikostí pórů 0,45 µm (FiltrateCH).
8. Následně byly ze vzorků vytvořeny ředící řady a směs byla v triplikátech vyseta na Petriho misky s dvouvrstevným agarem obsahujícím kmen E61.
9. Misky byly inkubovány při 37 °C přes noc a poté byl stanoven titr fágových částic.
10. Fágový výnos, tedy počet uvolněných fágových částic na jednu infikovanou buňku byl vypočítán podle vzorce:

A = počet virionů na konci fáze vzestupu (PFU/ml)

B = počet virionů v čase 0 (PFU/ml)

C = počet nenadsorbovaných virionů (PFU/ml)

$$\text{Fágový výnos} = \frac{A-C}{B-C}$$

Pracujeme-li s nízkým vstupním poměrem, lze předpokládat, že B – C odpovídá počtu adsorbovaných virionů a zároveň, že jeden virion infikoval vždy právě jednu buňku. Za těchto předpokladů hodnota B – C

odpovídá počtu infikovaných buněk.

## 5.9 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR byla využita pro detekci vybraných sekvencí, díky čemuž mohly být identifikovány konkrétní fágy, bakteriální kmeny, či přítomnost genů zájmu. Parametry PCR se lišily v závislosti na povaze vzorků. Ve všech PCR reakcích bylo pracováno s OneTaq 2X Master Mix with Standard Buffer. Výsledný objem reakční směsi byl 25  $\mu$ l. Použité primery a velikosti ampliconů popsány v tabulce 7. Složení reakční směsi je popsáno v tabulce 8 a podmínky PCR v tabulce 9.

**Tabulka 7: Shrnutí použitých primerů**

Cíl detekce	Název	Sekvence	Velikost ampliconu	T <sub>a</sub> (°C)	Zdroj
MGE kmenů NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09	F_prophage_244_1	TTTGGGGAAGTGAGCGACAT	1351 bp	53	Navrženo v této práci
	R_prophage_244_1	TTTGCCAGCTCCCGCATTAT			
	F_prophage_244_2	GGGCTTGGTTTGAAGAGGCT	714 bp	52	Navrženo v této práci
	R_prophage_244_2	GTACGCAACTAGGGTGTACG			
	F_SCCmec_244_1	TTTGTAAGTGCTGACGCCTGA	201 bp	52	Navrženo v této práci
	R_SCCmec_244_1	GGCCGATTGTGCTTGATGAG			
	F_prophage_2650_2	GCGTGTGCGAAAGATAGCAG	801 bp	52	Navrženo v této práci
	R_prophage_2650_2	GGTCGTGCAGTATCGCAGTA			
	F_GI_2650_1	ACGTATGCTCAAGGTGATATTGGT	580 bp	53	Navrženo v této práci
	R_GI_2650_1	AACTTACAGGCAGTCCATCTCC			
	F_SCCmec_2650_2	ACCAAAATTGCTGATGCTCATGT	298 bp	52	Navrženo v této práci
	R_SCCmec_2650_2	AGTAGTCAGAAGGAGTGGTGT			

## METODY

φ53	F_prophage_2650_3	CGGTGTGCTACTTTTGGCGTT	450 bp	52	Navrženo v této práci
	R_prophage_2650_3	GCTTTGCTTAGACGGCAACC			
	pdpSau_F	ACAGTGGACTTTTTCGACAGGT	189 bp	55	(Kuntová <i>et al.</i> , 2023)
	pdpSau_R	TGATGCAACGACTGATAAACCG			
	Sa7Int_F	GTCCGGTAGCTAGAGGTC	214 bp	55	(Kuntová <i>et al.</i> , 2023)
	Sa7Int_R	GGCGTATGCTTGACTGTGT			
<i>S. aureus</i>	Sau_F	GACGGCTTTGATGGCTAGTGG	217 bp	55	(Štěpán <i>et al.</i> 2001)
	Sau_R	AGTTAATTCAGCCCTAGTG			

**Tabulka 8: Složení reakční směsi**

Složka	Objem (μl)
MM OneTaq	12,5
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
Templát	1
PCR voda	10,5

**Tabulka 9: Podmínky PCR**

Reakční kroky	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	30	1
Denaturace	94	30	
Nasednutí primeru	T <sub>a</sub> (viz tab. 7)	20	30
Prodloužení	68	60/1kb	
Finální prodloužení	68	300	1

### 5.10 Elektroforéza v agarózovém gelu (ELFO)

1. ELFO byla prováděna v 1× koncentrovaném TAE pufru. Pro separaci PCR amplikonů, fragmentů restriktivního štěpení a štěpeného vektoru byly použity agaróзовые gely s koncentrací v rozmezí 0,8 % – 1,5 %.

2. Po elektroforéze byl gel obarven v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$  po dobu 30 min, opláchnut destilovanou  $\text{H}_2\text{O}$  a fotografován pod UV světlem o vlnové délce 302 nm.

### 5.11 Lyzogenizace

1. 2 ml ON kultury bylo přeneseno do 50 ml MPB v provzdušňovací lahvi a provzdušňováno 2 hod při 37 °C do  $\text{OD}_{600} = 0,3$ .
2. K narostlé kultuře bylo přidáno 5 – 6 ml lyzátu lyzogenujícího fága o co nejvyšším titru a 5 ml 0,02M  $\text{CaCl}_2$ . Následovala inkubace po dobu 2 hod./37 °C za provzdušňování. Před navozením úplné lyze byla inkubace zastavena a směs byla přenesena do lednice, kde zůstala do dalšího dne.
3. Následovala centrifugace 15 min./4500 rpm (JOUAN BR4i, rotor AB 50.10A, S40) a odlití supernatantu.
4. Pelet byl 2× promyt v 5 ml sterilního promývacího lyzogenizačního roztoku a následně resuspendován v 1 ml MPB.
5. Byla připravena ředící řada kultury v MPB až po  $10^{-2}$  a z každého ředění byly skleněnou hokejkou vysety triplikáty po 100  $\mu\text{l}$  na misky s MPA s 0,01 M citrátem sodným.
6. Po přesnoční kultivaci bylo sterilním párátkem přečárkováno okolo 40 kolonií na MPA s 0,01 M citrátem sodným.
7. Pasážování na MPA s 0,01 M citrátem sodným proběhlo celkem třikrát.
8. Jednotlivé izoláty byly očíslovány a byl proveden test rezistence k lyzogenizujícímu fágu: Na misce s MPA a  $\text{CaCl}_2$  byly potenciální lyzogenní kolonie rozetřeny do proužku, na který bylo nakapáno 10  $\mu\text{l}$  lyzátu původního lyzogenizujícího fága (popřípadě také fága, vůči kterému měla být u lyzogenů navozena rezistence).
9. Takto připravené misky byly inkubovány přes noc.
10. Rezistentní kultury byly přeneseny do HMFM a zakonzervovány při -80 °C.
11. Lyzogenizace byla následně ověřena pomocí specifických PCR primerů.

### 5.12 Příprava hrubého buněčného lyzátu

1. 1 klička kultury byla přenesena do 1,5ml mikrozkuhavky s 500  $\mu\text{l}$  MPB a kultivována 3 hod./37°C.
2. Následovala centrifugace 3 min./12 000 rpm (Mini Spin plus, rotor F-45-12-11) a odlití supernatantu
3. Kultura byla 2× promyta v 1 ml sterilní destilované  $\text{H}_2\text{O}$ , a znovu centrifugována 3 min./12 000 rpm (Mini Spin plus, rotor F-45-12-11)
4. Byla provedena tepelná lyze v termobloku při 80 °C po dobu 20 min.
5. Jako templát v PCR byl použit supernatant po centrifugaci.

### 5.13 Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

1. ON kultura o objemu 10 ml byla přelita do 15 ml zkumavky a bylo k ní přidáno 100  $\mu$ l 0,5M EDTA. Směs byla vložena na 10 minut do lednice a poté centrifugována 15 min/4500 rpm/4 °C. (JOUAN BR4i, rotor AB 50.10A, S40)
2. Sediment byl 2× promyt v 5 ml předem na ledu vychlazeného promývacího pufru na PFGE.
3. Byla opakována centrifugace a supernatant odlit. Pelet byl resuspendován v 1 ml promývacího pufru.
4. Sediment byl umístěn na led a naředěn v 15 ml promývacího pufru na OD<sub>600</sub>= 0,2.
5. Následovala opět centrifugace za stejných podmínek jako v předchozích bodech. Po odlití supernatantu byl pelet resuspendován ve zbytku tekutiny a přenesen do 1,5ml mikrozkušavky.
6. Suspenze byla zahřáta na 55 °C na 2-3 minuty a bylo k ní přidáno 15  $\mu$ l lyzostafinu (0,5 mg/ml) a 150  $\mu$ l rozvařeného 2 % low-melting agarózy vytemperované na 55 °C.
7. Směs byla promíchána a přepipetována do tvořítek na tvorbu agarózových bločků.
8. Po zatuhnutí byly bločky vytlačeny do skleněných šroubovacích zkumavek s 1 ml lyzačního roztoku a 20  $\mu$ l lyzostafinu. Obsah zkumavky byl inkubován za mírného třepání při 37 °C 2-3 hodiny. Směs byla poté uložena do lednice do dalšího dne.
9. Byl odlit lyzační roztok a k bločkům byl přidán 1 ml deproteinizačního roztoku s 25  $\mu$ l proteinázy K (20 mg/ml). Následovala inkubace za mírného třepání po dobu 6 hodin při 55 °C. Po výměně deproteinizačního roztoku s proteinázou K bylo v inkubaci pokračováno přes noc.
10. Další den byly bločky 5× promyty na ledu ve zhruba hodinových intervalech v 10 ml vychlazeného 1× TE pufru (pH=8). Bločky byly dále skladovány v TE pufru v lednici.
11. Při přípravě na restriční štěpení byly nejprve bločky nakrájeny na 1 mm tlusté pásky. Na 1 pásek byla namíchána směs 68  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 8  $\mu$ l CutSmart pufru a 0,5  $\mu$ l restriktázy *Sma*I (20 U/ $\mu$ l). Štěpení probíhalo přes noc při 25 °C ve tmě.
12. Bylo přidáno 500  $\mu$ l TE pufru. Bločky byly po lehkém oschnutí přeneseny do jamek 1,2 % agarózového gelu. Jamka s bločkem byla zalita vytemperovanou 1 % low-melting agarózou.
13. PFGE probíhala v 1× TAE pufru při 5,5 V/cm, 24 hodin s pulzními časy od 1“ do 55“ a při 14 °C.
14. Gel byl obarven v roztoku ethidiumbromidu (1  $\mu$ g/ml) 30 min, omyt v destilované H<sub>2</sub>O a vyfotografován pod UV světlem o vlnové délce 302 nm.

#### 5.14 Izolace plazmidové DNA – dle protokolu pro *S. aureus* pro izolaci plazmidové DNA kitem NucleoSpin Plasmid

1. 7 ml ON kultury bylo centrifugováno 6000 g/15 minut/4 °C.
2. Supernatant byl odlit a k peletu byly přidány 4 ml PBS pufru, ve kterém byl pelet resuspendován.
3. Následovalo opakování centrifugačního kroku.
4. K peletu bylo přidáno 500  $\mu$ l roztoku A1 obsaženého v kitu.
5. Směs byla resuspendována a inkubována po dobu 1,5 hod/37 °C za přítomnosti 20  $\mu$ l lyzostafinu (0,5 mg/ml) a 2  $\mu$ l lysozymu (10 mg/ml).
6. Po ukončení inkubace bylo dále postupováno dle návodu výrobce.
7. Koncentrace izolované DNA byla měřena pomocí Nanodropu.

#### 5.15 Spektrofotometrické stanovení růstové křivky bakteriálních kultur v přítomnosti ATB a fága s využitím Tecan spektrofotometru

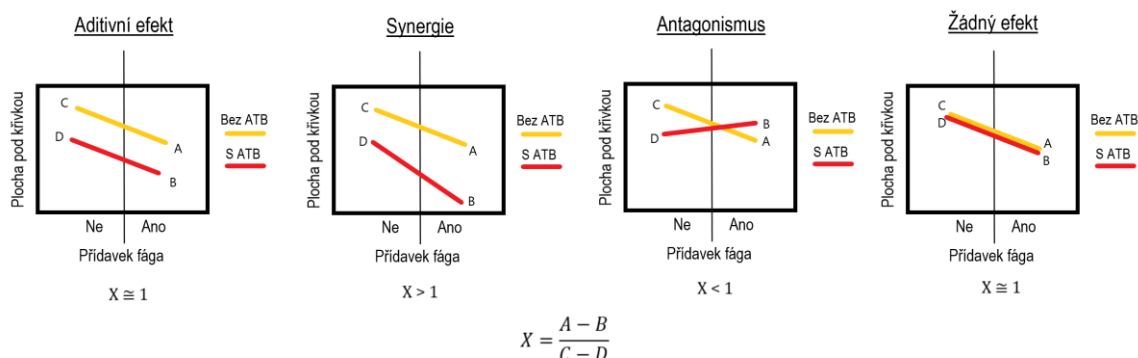
1. Do 10 ml MPB byl přenesen 1 ml ON kultury. Kultivace pokračovala na třepačce při 37 ° do nárůstu na  $OD_{600} = 0,4$ .
2. Kultura kmene s požadovaným ATB a fágový lyzát byly smíchány tak, aby vstupní poměr fág:kmen činil 0,1 a výsledná koncentrace ATB byla  $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{2}$  MIC.
3. V případě 20min kultivace kmene s ATB před přidáním fága, byla kultura nejprve synchronizována chladem (4°C/20 min).
4. Celkový objem směsi byl 200  $\mu$ l na jamku. Použita byla 96jamková destička.
5. Na destičku byly umístěny vždy také kontroly sterility média, kontroly kultury pouze s přídatkem fága a pouze s přídatkem ATB, a také kontrola růstu bakteriální kultury, kde místo ATB byla přidána pouze voda a místo fága pouze MPB.
6. Měření probíhalo na spektrofotometru Tecan při teplotě 37 °C za následujících podmínek: snímání absorbance při vlnové délce 600 nm, interval snímání 8 minut, amplituda lineárního třepání 2 mm po dobu 240 s, teplota 37 °C, celková délka měření 24 hodin.

#### 5.16 Hodnocení výsledného efektu ATB a fága na růst kultury pomocí interakčních grafů a jejich kvantifikace

1. K hodnocení výsledného efektu ATB a fága na růst kultury byla použita metoda interakčních grafů vytvořených z hodnot plochy pod křivkou. Princip interakčních grafů popsán na schématu X.
2. K usnadnění interpretace interakčního grafu byly hodnoty z něj převedeny na tzv. Interakční hodnotu ATB a fága pomocí vzorce:

$$X = \frac{A - B}{C - D}$$

Kde A = plocha pod růstovou křivkou kultury ošetřené pouze fágem, B = plocha pod růstovou křivkou kultury ošetřené fágem a ATB, C = plocha pod růstovou křivkou kultury bez antimikrobiálních složek (kontrola), D = plocha pod růstovou křivkou kultury ošetřené pouze ATB. Hodnocení výsledných hodnot: antagonismus < 1, aditivní efekt či žádný efekt  $\cong$  1, synergický efekt > 1. Pro lepší vizualizaci viz schéma X.



**Obrázek 17: Schéma popisující princip interakčních grafů a jejich kvantifikaci.** Kvantifikace byla stanovena podle vzorce  $X = \frac{A-B}{C-D}$ , kde A = plocha pod růstovou křivkou kultury ošetřené pouze fágem, B = plocha pod růstovou křivkou kultury ošetřené fágem a ATB, C = plocha pod růstovou křivkou kultury bez antimikrobiálních složek (kontrola), D = plocha pod růstovou křivkou kultury ošetřené pouze ATB. Antagonismus < 1, aditivní efekt či žádný efekt = 1, synergický efekt > 1.

### 5.17 Spektrofotometrické stanovení růstové křivky bakteriálních kultur v přítomnosti ATB a fága s využitím mikrobiologického bioreaktoru

1. 2 ml ON kultury bylo přeneseno do sterilní 250ml Erlenmeyerovy baňky s 50 ml MPB s CaCl<sub>2</sub> a kultivováno při 37°C / 150 rpm.
2. Poté, co kultura dosáhla OD<sub>600</sub> = 0,2, byl růst buněk synchronizován chladem při 4 °C/20 min.
3. Následně bylo odebráno po 18 ml kultury do 50ml centrifugačních zkumavek.
4. Ke vzorkům byl přidán 1 ml ATB tak, aby výsledná koncentrace ve směsi byla rovna ½ a 1 MIC (1 ml vody ke kontrole). Takto ošetřené vzorky byly vloženy do bioreaktoru nastaveném na teplotu 37 °C a inkubovány za otáčení zkumavek při 240 rpm se změnou směru každých 5s.
5. Po 3 či 9 hodinách byl ke směsi přidán 1 ml fága 812 tak, aby byl výsledný titr ve směsi roven 10<sup>9</sup>.
6. Měření probíhalo po dobu 20h a na konci byl stanoven titr fága.

### 5.18 Purifikace fágových částic pomocí ultrafiltrace

1. K filtrační kazetě VivaFlow 200 (Sartorius) o porozitě 100 kDa byly připojeny nástavce s hadičkami zajištěnými objímkami.
2. Jelikož byla kazeta uchována v roztoku NaOH, bylo třeba ji nejprve promýt sterilní destilovanou vodou.
3. Průtok byl nastaven na 30 – 50 ml/min. Voda se nechala protékat kazetou do objemu alespoň 300 ml. Výstup permeátu i retentátu byl sveden do odpadní nádoby.
4. Při stejném zapojení kazety a průtoku pumpy byla kazeta naplněna fágovým pufrem.
5. Po průtoku zhruba 50 ml pufru byla hadička s výstupem retentátu umístěna do zásobního fágového pufru. Takto se nechalo protéct zhruba 250 ml roztoku.
6. 200 ml fágového lyzátu bylo přefiltrováno přes Nalgene Rapid-flow filtrační nálevku do sterilní lahve s GL45 závitkem.
7. Do lahve s lyzátem byla zavedena hadička vedoucí do filtrační kazety a pro výstup retentátu zpět z kazety do lahve. Do lahve s lyzátem byl přiváděn fágový pufr ze zásobní nádoby, který byl nejméně o trojnásobném objemu.
8. Po zapojení systému byla spuštěna peristaltická pumpa na rychlost 40-50 ml/min.
9. Po převedení fága z média do fágového pufru (purifikace) byl zastaven přísun pufru, čímž byly viriony zakoncentrovány do objemu 50 ml.
10. Byl stanoven titr fága.
11. Kazeta byla promyta 0,1 M NaOH a uchována v lednici pro opakované použití.

### 5.19 Příprava karbomerového gelu s obsahem fágových částic

1. Do sterilní kádinky s širším dnem bylo naváženo 100 g fágového pufru s  $\text{CaCl}_2$  s pH 7,5 a na jeho povrch byl nanesen 1 g karbomeru.
2. Gelotvorný karbomer byl ponechán 15 minut k nabobtnání na hladině pufru. Směs byla poté pomocí skleněné tyčinky promíchána do homogenního stavu.
3. Za použití 1 M NaOH a za stálého míchání bylo kyselé pH karbomerové směsi dorovnáno na 7, vhodné pH poznáme díky vzniku hustějšího gelu.
4. Vzniklý gel byl sterilizován v parním autoklávu 121 °C/15 minut. Po sterilizaci bylo pracováno s gelem pouze v aseptických podmínkách.
5. Jakmile gel vychladl, byl přidán pomocí sterilní skleněné tyčinky fágový purifikát (titr  $10^{10}$  PFU/ml) v poměru 1:100 na výsledný titr fága  $10^8$  PFU/ml gelu.
6. Gel s fágem byl rozplněn po 1 ml do 1,5ml mikrozkuhavek. Byla připravena také negativní kontrola obsahující pouze gel bez fága.
7. Stabilita titru fága uloženého ve třech různých teplotách (4, 21 a 37 °C) byla určována pomocí kapkové metody v triplicátech po:
  - 24 hodinách
  - 7 dnech

- 14 dnech
- 28 dnech

Pozn.: Stabilita fága byla testována také ve fágovém pufru s titrem fága  $10^8$  PFU/ml.

### 5.20 Testování stability fága 812 a p68 v karbomerovém gelu vůči UV záření

1. K ověření stability fága 812 v karbomerovém gelu byl použit preparát skladovaný po dobu 7 dní při 4 °C.
2. Expozice UV probíhala na otevřené skleněné misce položené 45 cm pod UV lampou (15 W). Na misku bylo umístěno vždy 600  $\mu$ l gelu obsahujícího fága, které byly rozetřeny do 2 mm vrstvy.
3. Následovala expozice UV záření po dobu 30 sekund, 5 minut a 15 minut.
4. Po expozici UV záření bylo odebráno ze vzorků 100  $\mu$ l a naředěno v MPB médiu.
5. Ředící řada byla vykapána v triplikátech na dvouvrstevný agar obsahující kmen 1137.

## 6 Výsledky

### 6.1 Stanovení sekvence kmenů NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09

Pro testování hypotézy byla stěžejní příprava systému se známým původcem rezistence k lytickým fágům. Za tímto účelem byl navržen přenos MGE nesoucích geny fágové rezistence z donorového kmene rezistentního k fágům do akceptorového kmene, který je k fágům citlivý. Jako rezistentní donory MGE byly zvoleny kmeny NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09, které jsou rezistentní k fágům P68 a 812. Protože se ve sbírce LMDM nacházejí kmeny se stejným sekvenčním typem (ST), které jsou ke studovaným fágům citlivé, bylo předpokládáno, že je rezistence k těmto fágům kódována MGE. Z těchto kmenů byla izolována DNA a následovala sekvenace na Oxford Nanopore MinION. Sekvenční data jsou charakterizována v tabulce 10. Ze získaných dat byly sestaveny chromozomální i plazmidové sekvence obou kmenů a byly identifikovány MGE (tabulka 11).

**Tabulka 10: Sekvenční data kmenů NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09**

	<b>NRL Atb 244</b>	<b>NRL Atb 2650/09</b>
Velikost genomu (Mbp)	2,867	2,853
% GC	32,8	32,9
OrthoANI (%)		98,75
Počet čtení	89277	65503
N50 délka čtení (bp)	3967	2303
Max. Délka čtení (bp)	157806	63112
Průměrné pokrytí	102	53
Maximální pokrytí	1580	131

## VÝSLEDKY

---

Tabulka 11: Shrnutí anotace sekvencí kmenů NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09

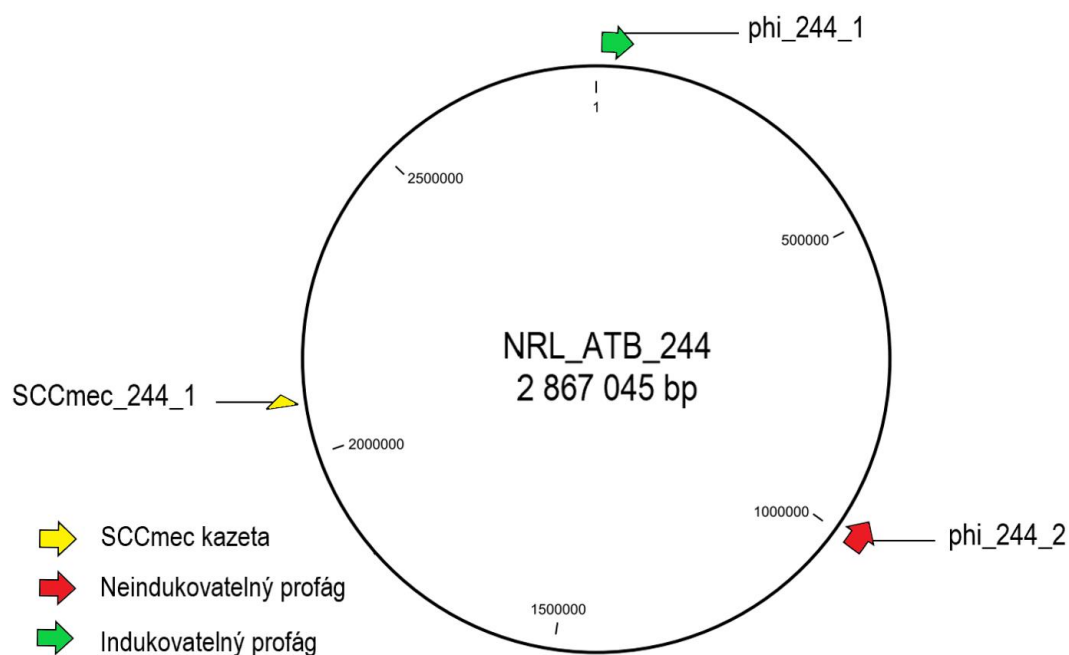
---

	NRL Atb 244	NRL Atb 2650/09
Počet CDS	2736	2697
tRNA	60	60
Plazmidy	p244_a (31881 bp), p244_b (5358 bp), p244_c (2470 bp)	-
Profágy	phi_244_1 (8643..53255), phi_244_2 (963265..1007722)	phi_2650_1 (6969..51241), phi_2650_2 (115775..159431), phi_2650_3 (563558..609201)
GI	-	GI_2650_1 (217894..236723)
Chromozomové kazety	SCCmec_244_1 (2081672..2098487)	SCCmec_2650_2 (2059506..2086922)

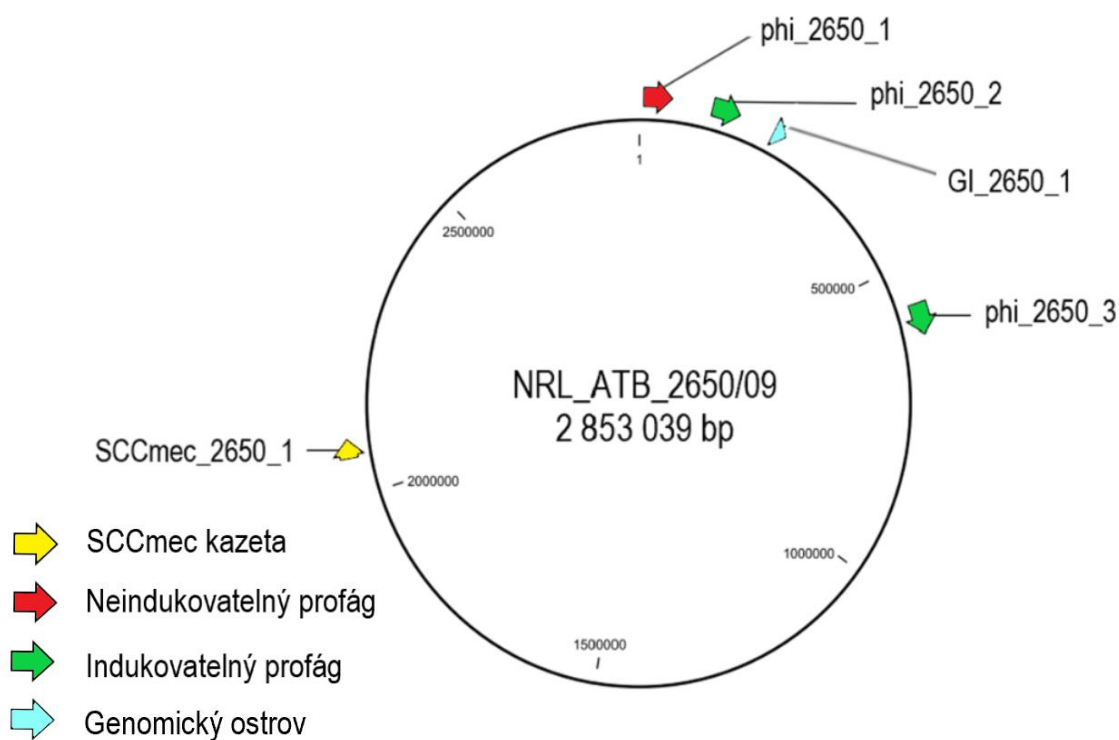
---

## 6.2 Profágy kmenů NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09

Pomocí bioinformatického nástroje PHASTER byly anotovány profágy v nukleotidové sekvenci donorových kmenů. V genomu kmene NRL Atb 244 byly identifikovány 2 profágy a jedna *SCCmec* kazeta (znázorněno na obrázku 18). V genomu kmene NRL Atb 2650/09 byly identifikovány 3 profágy, jeden genomový ostrov a jedna *SCCmec* kazeta (znázorněno na obrázku 19). V sekvencích MGE byly anotovány pomocí nástrojů jako HHpred či BLAST geny, jež byly podobné či identické s geny spojenými s rezistencí k fágům.

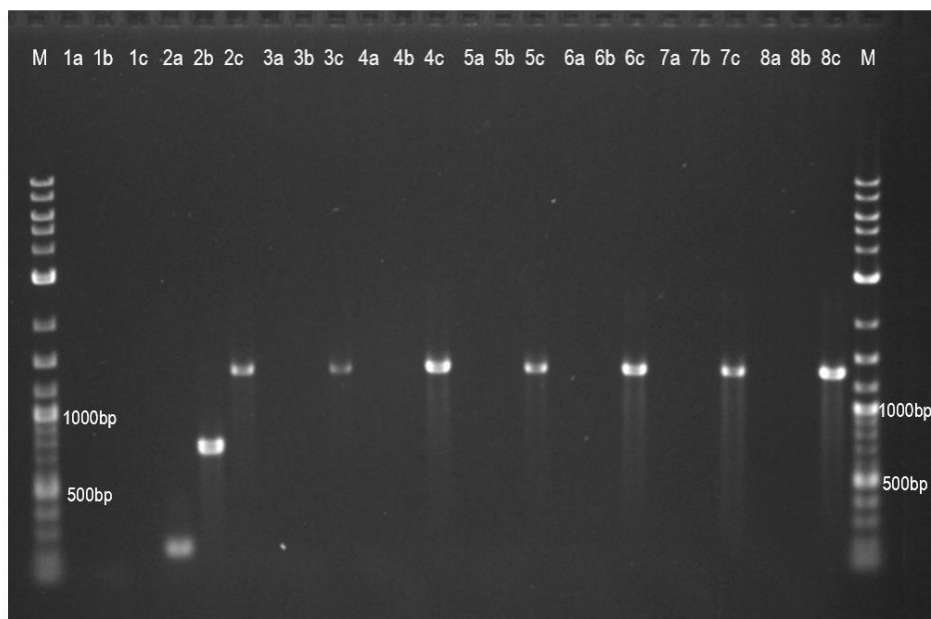


Obrázek 18: Lokalizace MGE v genomu kmene NRL Atb 244

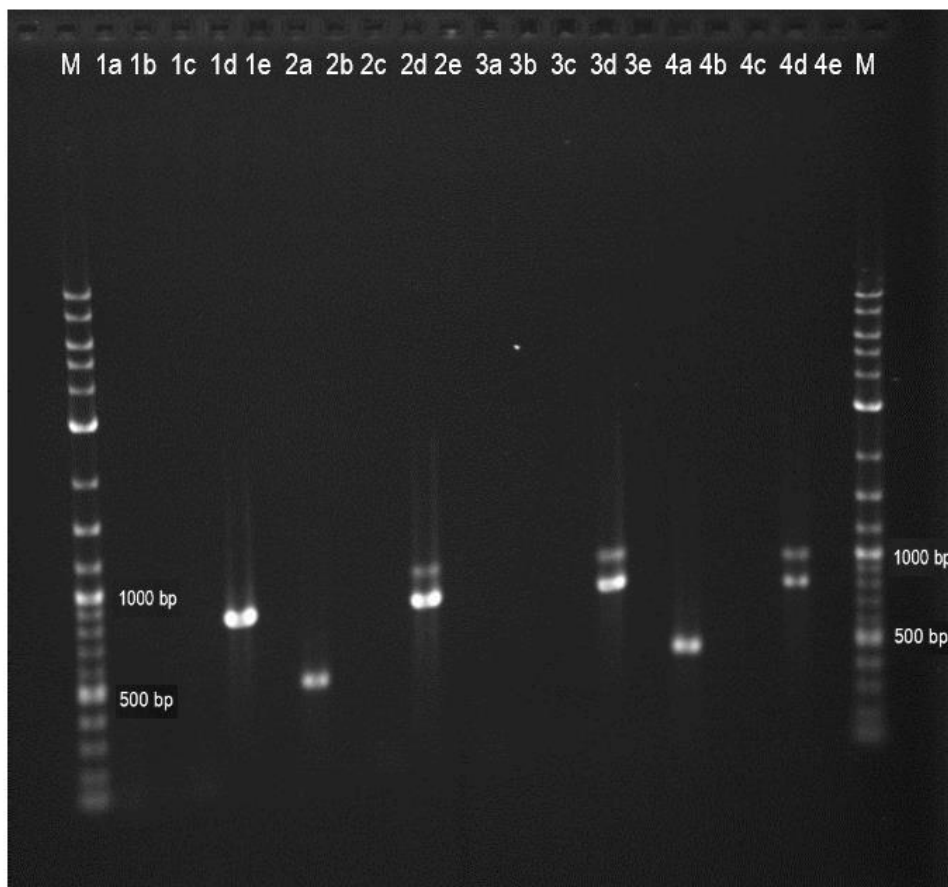


Obrázek 19: Lokalizace MGE v genomu kmene NRL Atb 2650/09

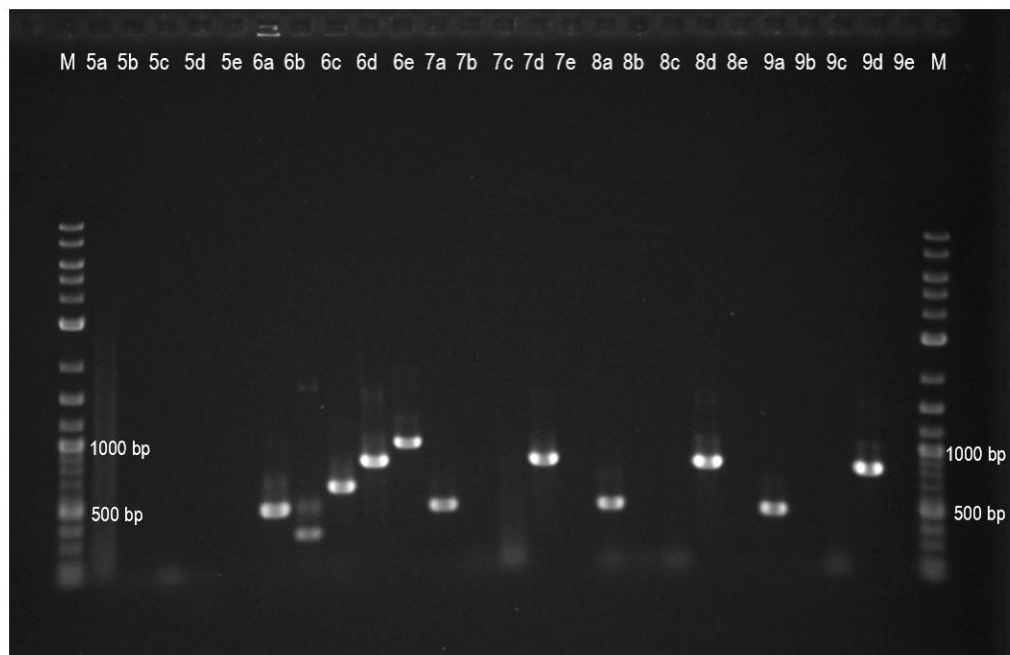
Následovala indukce excize profágů pomocí UV záření. Indukované fágy byly izolovány z jednotlivých plak, pomnoženy na kmenech RN4220 $\Delta$ *tarM* a 1039 a identifikovány pomocí specifických primerů (viz tabulka 5 v kapitole 5.9 [Polymerázová řetězová reakce \(PCR\)](#)). Výsledky identifikace shrnují obrázky 20-22. Informace týkající se profágů obsažených v kmenech NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09 shrnuje tabulka 12.



**Obrázek 20: Elektroforetogram s výsledky PCR pro identifikaci fágů indukovaných z kmene NRL Atb 244.** Čísla 1-8 slouží k označení jednotlivých vzorků, písmena a-c označují primery, které byly k analýze daných vzorků použity. Hodnoty 30s a 40s za pomlčkou značí čas expozice daného vzorku UV záření při indukci profágů. 1. H<sub>2</sub>O (NK); 2. NRL Atb 244 (PK); 3. phi\_244-40s (A); 4. phi\_244 30s (A); 5. phi\_244-30s (B); 6. phi\_244-40s (B); 7. phi\_244-40s (C); 8. phi\_244-40s (D); a) SCCmec\_244\_1 (amplikon 201 bp); b) phi\_244\_2 (amplikon 714 bp); c) phi\_244\_1 (amplikon 1351 bp); M = 1 kb Plus Ladder.



**Obrázek 21: Elektroforetogram s výsledky PCR pro identifikaci fágů indukovaných z kmene NRL Atb 2650/09.** Čísla 1-4 slouží k označení jednotlivých vzorků, písmena a-e označují primery, které byly k analýze daných vzorků použity. Hodnoty 30s a 40s za pomlčkou značí čas expozice daného vzorku UV záření při indukci profágů. 1. phi\_2650-40s (A); 2. phi\_2650-40s (B); 3. phi\_2650-40s (C); 4. phi\_2650-30s (A); a) phi\_2650\_3 (amplikon 450 bp); b) SCCmec\_2650\_2 (amplikon 298 bp); c) GI\_2650\_1 (amplikon 580 bp); d) phi\_2650\_2 (amplikon 801 bp); e) phi\_244\_1 (amplikon 1351 bp) (k amplifikaci phi\_244\_1 i phi\_2650\_1); M = 1 kb Plus Ladder.



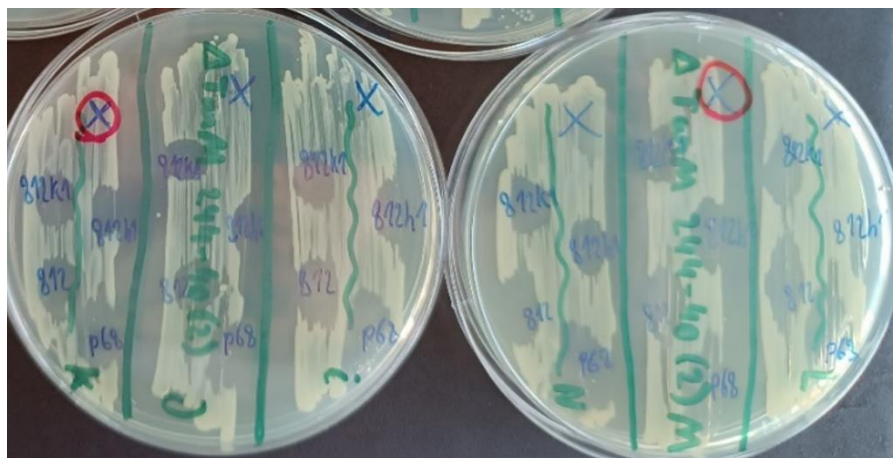
**Obrázek 22: Elektroforetogram s výsledky PCR pro identifikaci fágů indukovaných z kmene NRL Atb 2650/09.** Čísla 5-9 slouží k označení jednotlivých vzorků, písmena a-e označují primery, které byly k analýze daných vzorků použity. Hodnoty 30s a 50s za pomlčkou značí čas expozice daného vzorku UV záření při indukci profágů. 5. H<sub>2</sub>O (NK); 6. NRL Atb 2650/09 (PK); 7. phi\_2650-30s (B); 8. phi\_2650-50s (A); 9. phi\_2650-50s (B); a) phi\_2650\_3 (amplikon 450 bp); b) SCCmec\_2650\_2 (amplikon 298 bp); c) GI\_2650\_1 (amplikon 580 bp); d) phi\_2650\_2 (amplikon 801 bp); e) phi\_244\_1 (amplikon 1351 bp) (k amplifikaci phi\_244\_1 i phi\_2650\_1); M = 1 kb Plus Ladder.

**Tabulka 12: Profágy, GI a SCCmec kazety v kmenech NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09, jejich schopnost indukce a kódované proteiny, které mohou být zodpovědné za fágovou rezistenci**

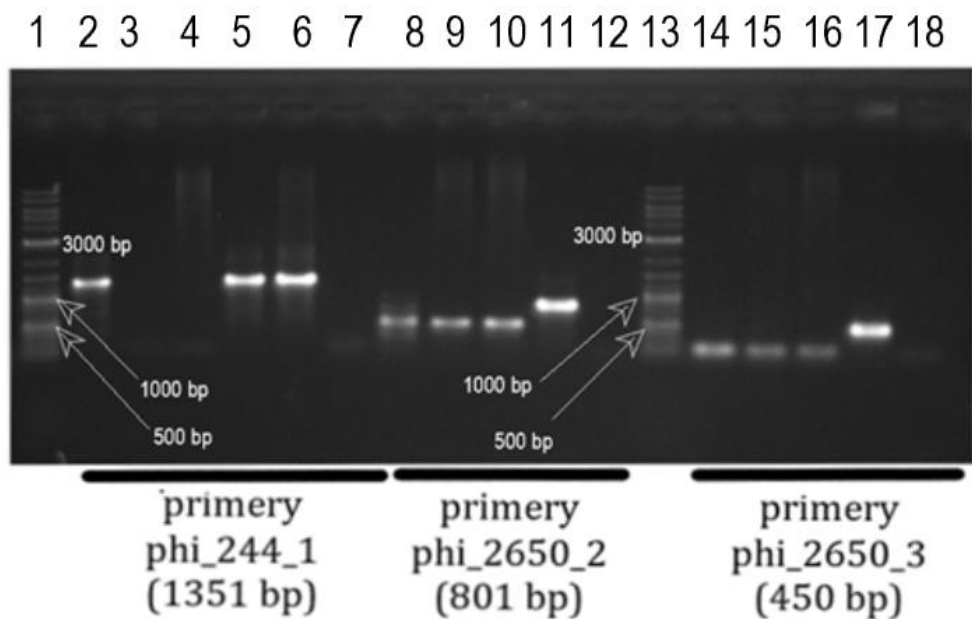
Kmeny SA	Profágy/GI (pozice v genomu hostitele)	Indukováno	Proteiny které mohou poskytovat rezistenci k fágům (anotováno pomocí RAST/HHpred) a pozice genu
NRL Atb 244	phi_244_1 (8643..53255)	Ano	Toxin-antitoxin systém typu II (9924..10463)
	phi_244_2 (963265..1007722)	Ne	Obdoba CI represoru (12269..12982) Fágový represor (1003029..1003223) Fágový regulátor transkripce (1003486..1003818)
	SCCmec_244_1 (2081672..2098487)	Ne	Typ I RM system (R podjednotka) (2091849..2092109)
NRL Atb 2650/09	phi_2650_1 (6969..51241)	Ne	Obdoba CI represoru (11161..11874)
	phi_2650_2 (115775..159431)	Ano	Fágový represor (118608..118931) Toxin-antitoxin systém (118134..118595)
	phi_2650_3 (563558..609201)	Pouze v přítomnosti phi_2650_2	Toxin-antitoxin systém (566590..567051) Obdoba CI represoru (567064..567378)
	GI_2650_1 (217894..236723)	Ne	-
	SCCmec_2650_2 (2059506..2086922)	Ne	-

### 6.3 Lyzogenizace kmenů 1039 a RN4220 $\Delta$ tarM indukovanými fágy

Kmeny 1039 a RN4220 $\Delta$ tarM byly lyzogenizovány fágy indukovanými z kmenů NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09. Úspěšnost lyzogenizace byla po pasážování přes citrát ověřena kapkovým titrem fága, kterým byl daný kmen lyzogenizován (test rezistence, obrázek 23), a také pomocí PCR (obrázek 24). Získané lyzogeny kmenů 1039 a RN4220 $\Delta$ tarM ovšem rezistenci k fágům typu 812 ani P68 nevykazovaly.



**Obrázek 23: Ověření úspěšné lyzogenizace kmene RN4220 $\Delta$ tarM.** Test rezistence k fág, kterým byl kmen lyzogenizován (na misce označeno písmenem X); ověření citlivosti lyzogenů k fágům P68, 812, 812h1 a 812K1/420.



**Obrázek 24: Elektroforetogram s výsledky PCR k ověření úspěšné lyzogenizace kmenů RN4220 $\Delta$ tarM a 1039.** Testováno na přítomnost phi\_244\_1 (amplikon 1351 bp), phi\_2650\_2 (amplikon 801 bp), phi\_2650\_3 (amplikon 450 bp). 1. 1 kb Plus DNA Ladder; 2. 1039(244\_1+); 3. RN4220 $\Delta$ tarM; 4. 1039; 5. RN4220 $\Delta$ tarM(244\_1+); 6. NRL Atb 244 (PK); 7. 1039 (NK); 8. RN4220 $\Delta$ tarM(2650\_02+/03+) (A); 9. 1039(2650\_02+/03+); 10. RN4220 $\Delta$ tarM(2650\_02+/03+) (B); 11. NRL Atb 2650/09 (PK); 12. 1039 (NK); 13. 1 kb Plus DNA Ladder; 14. RN4220 $\Delta$ tarM(2650\_02+/03+)

(A); 15. 1039(2650\_02<sup>+</sup>/03<sup>+</sup>); 16. RN4220 $\Delta$ tarM(2650\_02<sup>+</sup>/03<sup>+</sup>) (B); 17. NRL Atb 2650/09 (PK); 18. 1039 (NK);

#### 6.4 Plazmidy kmene NRL Atb 244

Dle dat ze sekvenace obsahuje kmen NRL Atb 244 3 plazmidy: p244\_a (konjugační plazmid, 31881 bp), p244\_b (5358 bp), p244\_c (2470 bp). Jejich přítomnost byla ověřena izolací plazmidové DNA a elektroforetickou separací na agarózovém gelu (obr. 25). Plazmidy byly anotovány pomocí nástroje RAST a PROKKA. Gen, který by mohl být zodpovědný za rezistenci k fágům byl však nalezen pouze jeden, a to gen pro protein podobný CptN toxinu umístěný na největším z plazmidů p244\_a (pozice 3202..3628, pravděpodobnost 98,45 %, E-hodnota  $2,1 \cdot 10^{-7}$ ).

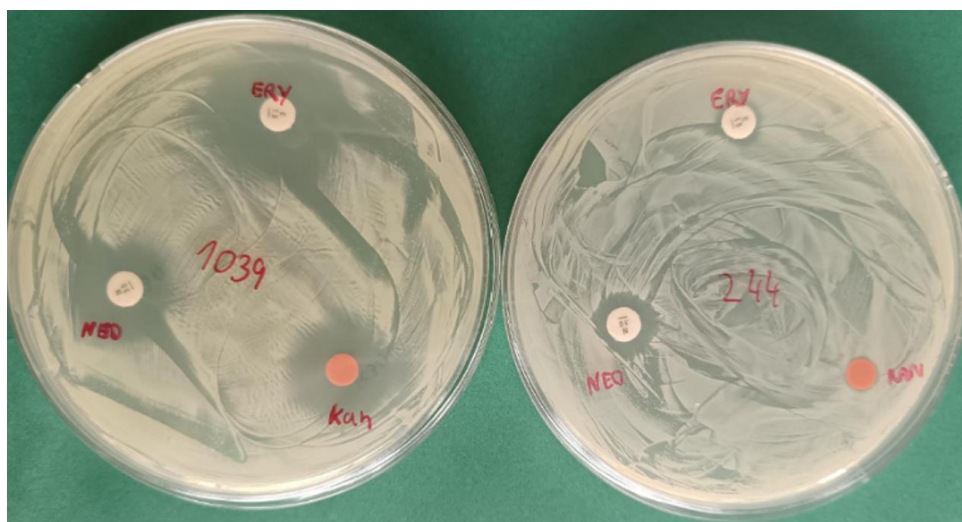


**Obrázek 25: Elektroforetogram s plazmidy kmene NRL Atb 244.**

1. 1 kb Plus DNA Ladder; 2. plazmidy z kmene NRL Atb 244

#### 6.5 Transdukce plazmidů z kmene NRL Atb 244 do kmene 1039

Pro přenos plazmidů z donorového kmene NRL Atb 244 do akceptorového kmene 1039 byla zvolena vzhledem k velikosti p244a metoda transdukce. U té bylo výhodou, že kmen NRL Atb 244 je kromě plazmidů také nositelem indukovatelného profága. Aby mohly být kmeny, které přijaly plazmid selektovány, bylo nejprve třeba identifikovat geny rezistence nesené na plazmidech a následně byl ověřen fenotyp rezistence pomocí ATB disků (tabulka 13 a obrázek 26).



Obrázek 26: Testování citlivosti kmenů 1039 (citlivý) a NRL Atb 244 (rezistentní) k ERY, NEO a KAN.

Tabulka 13: Charakterizace plazmidů kmene NRL Atb 244.

Plazmidy	Gen rezistence	Pozice genu	ATB na která rezistence cílí	Fenotyp (disková metoda)
p244a	<i>aph(3')-III</i> , adice fosfátu z ATP na 3'-hydroxylovou skupinu 4,6-disubstituovaného aminoglykosidu (Wright, GD, Thompson, PR (1999))	30015..30809	kanamycin, amikacin, neomycin...	Kanamycin, R (0 mm) Neomycin, R (13 mm)
p244b	rezistence nenalezena	-	-	-
p244c	<i>erm(C)</i> (23S RNA methylase) (MLS methylase gene)	1349..2083	erythromycin, linkomycin, klindamycin...	Erythromycin, R (9 mm)

Breakpointy pro *S. aureus* dle Eucast: Kanamycin (R<18 mm<S); Neomycin (R<14 mm<S); Erythromycin (R<21 mm<S). R = rezistentní, S = citlivý.

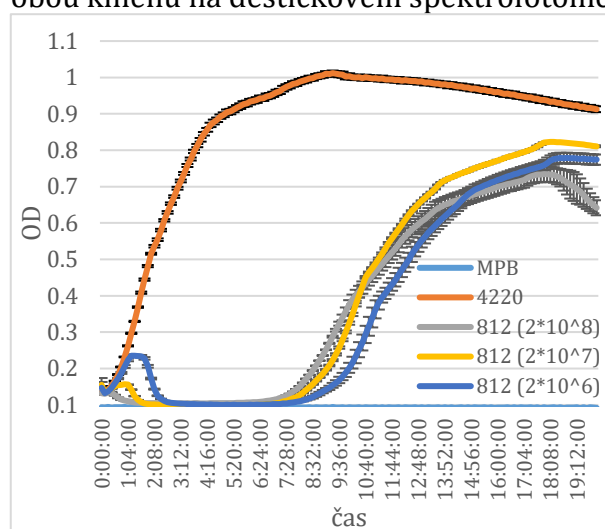
Jelikož se rezistence na vybraná ATB u kmene NRL Atb 244 potvrdila a kmen 1039 se naopak ukázal jako citlivý, bylo možné uskutečnit transdukcii s následnou selekcí na MPA s 1,5 µg/ml ERY (selekce transduktantů obsahujících plazmid p244c) a na MPA s 12 µg/ml KAN (selekce transduktantů obsahujících plazmid p244a). Nicméně

transdukce neproběhla úspěšně, přenesení plasmidů a selekce rezistentních kmenů se tedy neuskutečnila.

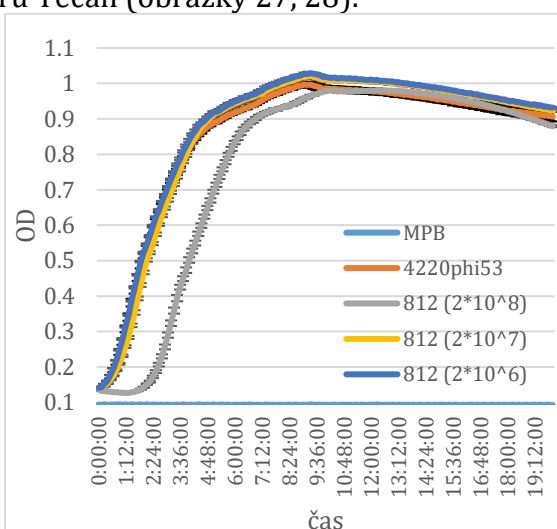
## 6.6 Ověření rezistence lyzogenního kmene RN4220(53<sup>+</sup>)

Jelikož se ukázalo, že geny nesoucí rezistenci k fágu P68 či k fágu 812 a jeho mutantům neleží na indukovatelných profázích a pravděpodobně ani na plasmidech, byl zvolen nový systém zahrnující temperovaného fága 53, jež kóduje protein PdpSau, který poskytuje rezistenci k fágu 812 prostřednictvím abortivní infekce (Kuntová *et al.*, 2023).

K testování vlivu profága na citlivost kmene k fágu 812 byl využit lyzogen RN4220(53<sup>+</sup>) (připraven v práci Kuntová *et al.* 2023). Citlivost kmenů RN4220 a RN4220(53<sup>+</sup>) k fágu 812 a jeho mutantům byla ověřena stanovením růstových křivek obou kmenů na destičkovém spektrofotometru Tecan (obrázky 27, 28).



Obrázek 27: Růst kmene RN4220 v přítomnosti fága 812

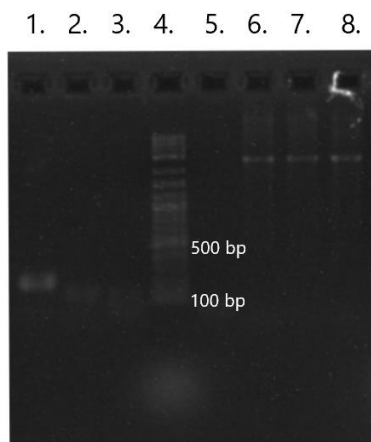


Obrázek 28: Růst kmene RN4220(53<sup>+</sup>) v přítomnosti fága 812

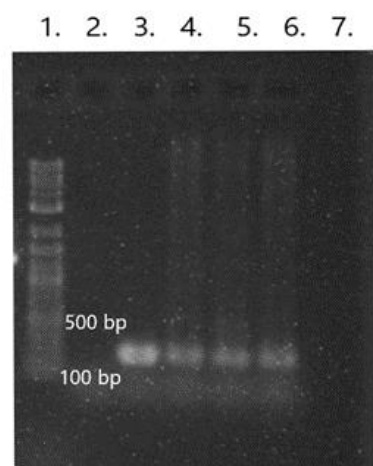
## 6.7 Testování rezistentních kmenů izolovaných po infekci RN4220

Po eradikaci kultury RN4220 fágem 812, 812h1 a 812K1/420 byl zaznamenán opětovný nárůst bakteriální kultury. Bylo proto ověřeno, nejedná-li se o mutanty, které získaly rezistenci k fágu 812. Vzorky byly přepasážovány přes MPA s citrátem sodným, aby se zbavily možné přítomnosti fága. Pro vyloučení kontaminace fágem 53, jehož přítomnost by mohla vést ke vzniku rezistentních lyzogenů, byla provedena PCR se specifickými primery (obr. 29). Vzorky byly identifikovány jako kmeny *S. au-*

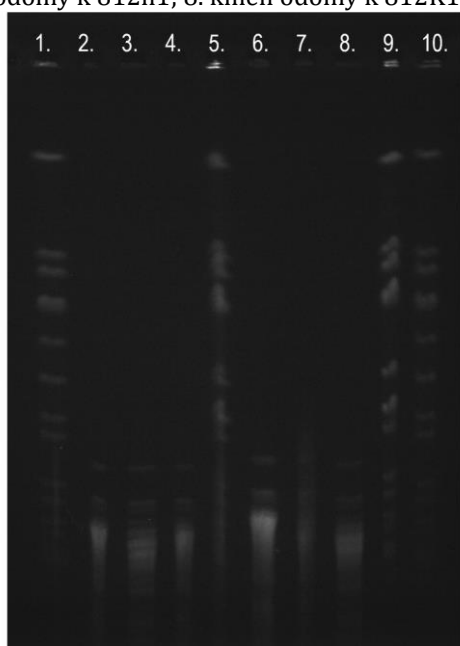
*reus* (obr. 30), přičemž přítomnost lyzogenů se nepotvrdila, pro vyloučení kontaminace jiným kmenem byla provedena PFGE (obr. 31). Ta potvrdila přítomnost kmenů významně odlišných od RN4220, které nemohly být pouhými mutantami tohoto kmene, a se vzorky se proto dále nepracovalo.



**Obrázek 29: Elektroforetogram PCR analýzy rezistentních kolonií.** Detekce přítomnosti genu *pdpSau* (amplikon 189 bp). 1. RN4220(53<sup>+</sup>) (PK); 2. RN4220 (NK); 3. SH1000 (NK); 4. 1 kb Plus DNA Ladder; 5. H<sub>2</sub>O (NK); 6. kmen odolný k 812; 7. kmen odolný k 812h1; 8. kmen odolný k 812K1/420



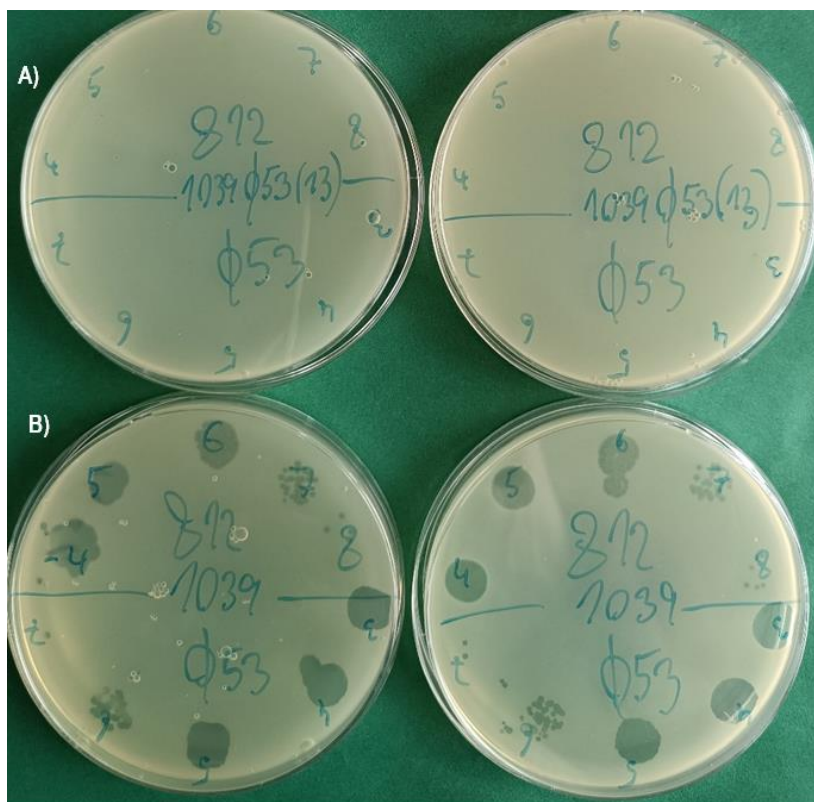
**Obrázek 30: Elektroforetogram PCR analýzy rezistentních kolonií.** Detekce přítomnosti genu *sau* (amplikon 217 bp). 1. 1 kb Plus Ladder; 2. H<sub>2</sub>O (NK); 3. NRL Atb 2650/09 (PK); 4. kmen odolný k 812; 5. kmen odolný k 812h1; 6. kmen odolný k 812K1/420



**Obrázek 31: PFGE rezistentních kmenů** (v duplikátech). 1./10. žebříček; 2./6. kmen odolný k 812; 3./7. kmen odolný k 812h1; 4./8. kmen odolný k 812K1/420; 5./9. RN4220 (kontrola)

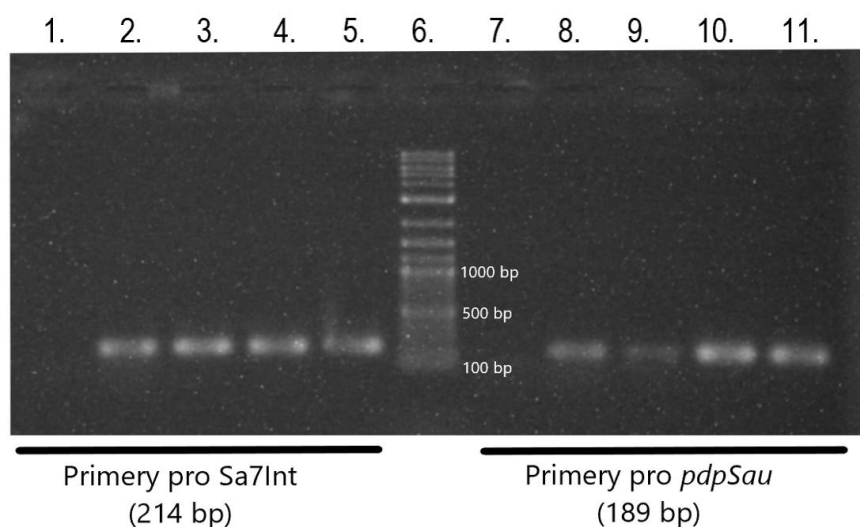
## 6.8 Příprava a ověření kmene 1039(53<sup>+</sup>)

Jako akceptorový kmen pro fága 53 byl vybrán kmen 1039, který se jevil jako ideální modelový systém, jelikož se jedná o laboratorní kmen se známou sekvencí, který postrádá RM-systémy a SpA a je tak citlivý k řadě fágů. V této práci byl proto připraven lyzogen 1039(53<sup>+</sup>), jež byl ověřen testem rezistence k fágu 53 i 812 (obr. 32).



**Obrázek 32: Ověření lyzogenizace kmene 1039 fágem 53 v duplikátech.** A) fágy 812 a 53 vykapané na kmen 1039(53<sup>+</sup>), který vůči zmíněným fágům navozuje rezistenci. B) fágy 812 a 53 vykapané na kmen 1039 bez profága, tento kmen je vůči zmíněným fágům citlivý.

Úspěšnost lyzogenizace byla ověřena také pomocí PCR (obr. 33). Jako příklad přirozeného systému sloužil klinický kmen MRSA E48, jehož genom obsahuje profága 53.



**Obrázek 33: Ověření lyzogenů 1039(53<sup>+</sup>) pomocí PCR detekce genu fágové integrázy Sa7Int (amplikon 214 bp) a *pdpSau* (amplikon 189 bp).** 1. 1039 (NK); 2. Φ53 (PK); 3. 4220(53<sup>+</sup>) (PK); 4. 1039(53<sup>+</sup>) (A); 5. 1039(53<sup>+</sup>) (B); 6. 1 kb Plus DNA Ladder; 7. 1039 (NK); 8. Φ53 (PK); 9. 4220(53<sup>+</sup>) (PK); 10. 1039(53<sup>+</sup>) (A); 11. 1039(53<sup>+</sup>) (B)

## 6.9 Efekt kombinace ATB ovlivňujících proteosyntézu a fága 812

Aby mohl být na vybraných kmenech testován efekt ATB a fága 812, musela být nejprve stanovena MIC vybraných ATB. Podle EUCAST breakpointů bylo určeno, zda je kmen možno považovat za citlivý, či rezistentní. Citlivosti k vybraným ATB jsou uvedeny v tabulce 14.

**Tabulka 14: MIC kmenů 1039(53<sup>+</sup>) a E48 a jejich vyhodnocení dle EUCAST**

Kmen	ERY (μg/ml)	GEN (μg/ml)	TET (μg/ml)	CLMP (μg/ml)
1039(53 <sup>+</sup> )	0,5	0,5	0,125	3
E48	9	0,75	7	10

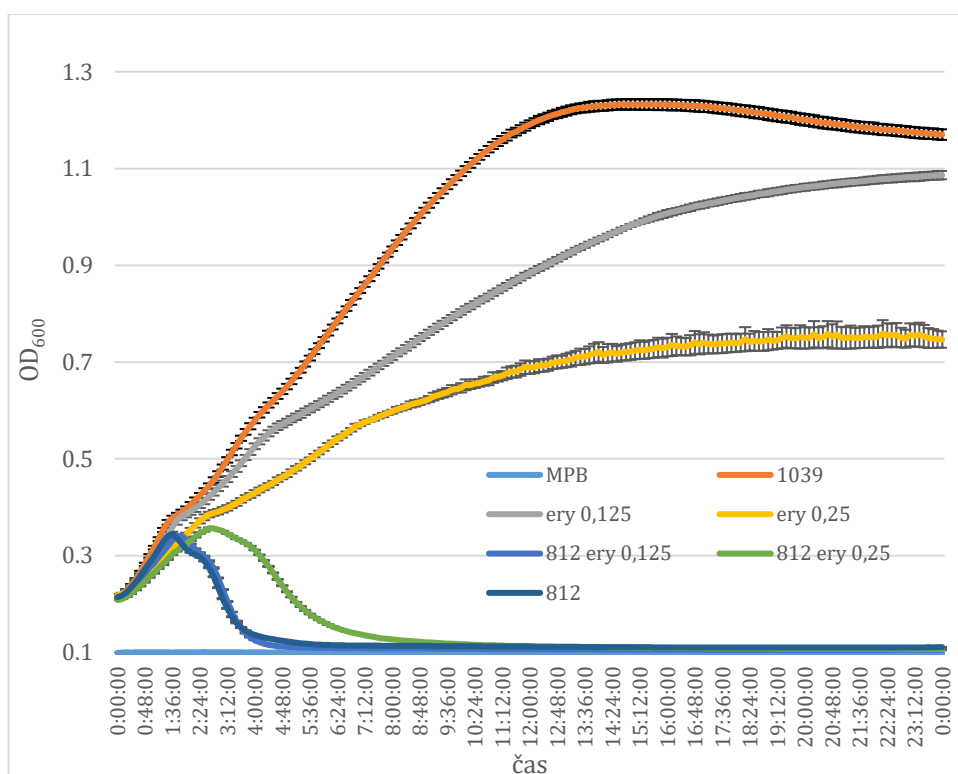
(S = citlivý, I = snížená citlivost, R = rezistentní) (ERY: MIC S≤1, R>1 mg/L, Průměr zón S≥21, R<21 mm; GEN: MIC S≤2, R>2 mg/L, Průměr zón S≥18, R<18 mm; TET: MIC S≤1, R>1 mg/L, Průměr zón S≥22, R<22 mm; CLMP: MIC S≤ 8 μg/ml, 16 μg/ml = I, R≥32 μg/ml)

Následovalo stanovení efektu kombinací ¼ a ½ MIC ERY, GEN, TET, a CLMP a fága 812 (IR=0,1) na růst kmenů 1039, 1039(53<sup>+</sup>) a E48 pomocí spektrofotometru Tecan. ATB bylo přidáno ke chladem synchronizované kultuře 20 minut před aplikací fága. Kvůli značnému množství grafů jsou zde uvedeny pouze ty, u kterých se projevil synergický či antagonistický efekt a ty, které jsou později zmíněny v diskuzi. Efekt všech

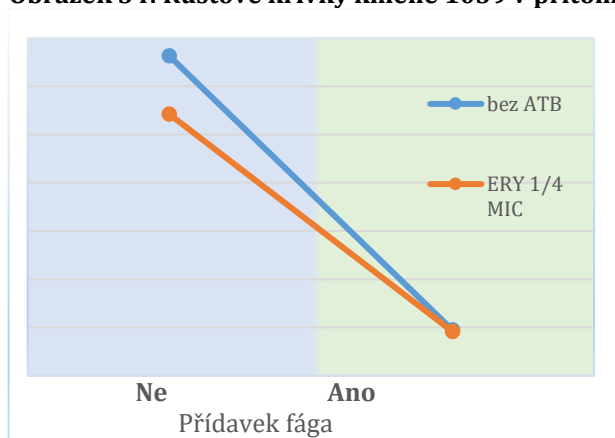
testovaných kombinací na vybrané kmeny je shrnut v tabulkách 13, 14 a 15 pomocí hodnoty kvantifikující interakční grafy (popsáno v kapitole 5.16 [Hodnocení výsledného efektu ATB a fága na růst kultury pomocí interakčních grafů a jejich kvantifikace](#)) tato hodnota byla při posuzování výsledného efektu ATB a fágů vždy brána v úvahu v kontextu růstové křivky.

### 6.9.1 Efekt kombinace fág-ATB na kmen 1039

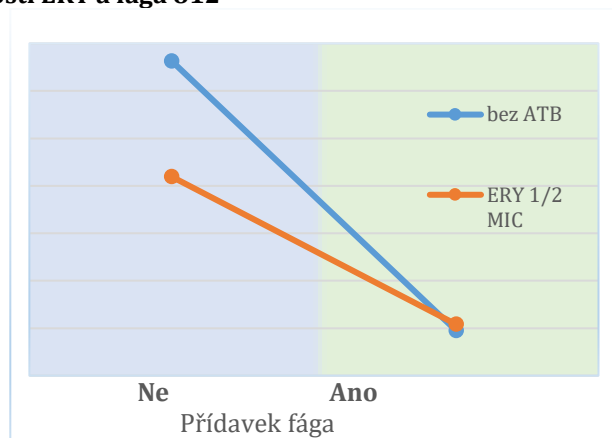
Kombinace ERY, GEN, TET a CLMP s fágem 812 (IR=0,1) byly testovány na bezprofágovém kmeni 1039, který je k fágu 812 přirozeně citlivý. Jelikož fág 812 tento kmen velmi efektivně lyzuje, nebyl zde prostor pro zlepšení jeho účinku v přítomnosti ATB. Výsledný efekt kombinací ATB a fága byl naopak spíše antagonistický. Jako příklad je uvedena růstová křivka kmene 1039 v přítomnosti ERY a fága 812 (obrázky 34, 35, 36).



Obrázek 34: Růstové křivky kmene 1039 v přítomnosti ERY a fága 812



Obrázek 35: Interakční graf pro kombinaci kmene 1039, 1/4 MIC ERY a fága 812.



Obrázek 36: Interakční graf pro kombinaci kmene 1039, 1/2 MIC ERY a fága 812.

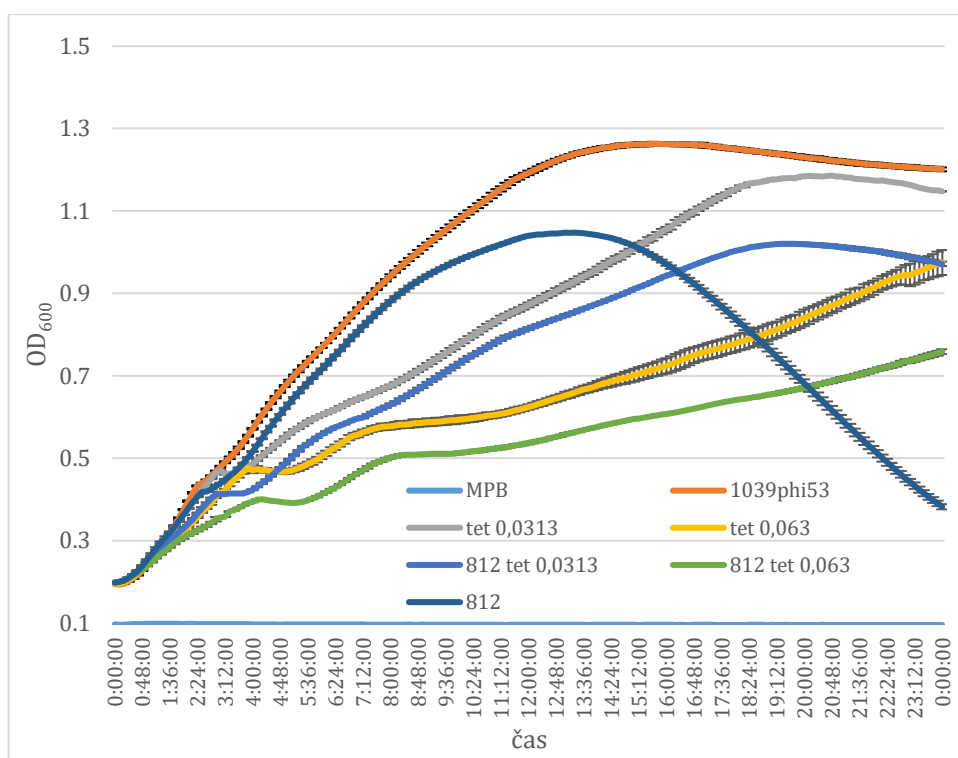
Tabulka 15: Efekt kombinací ATB a fága na kmen 1039.

ATB	koncentrace	interakční hodnota ATB a fága
ERY	1/4 MIC	0.027
	1/2 MIC	-0.055
GEN	1/4 MIC	-0.195
	1/2 MIC	-0.119
TET	1/4 MIC	0.001
	1/2 MIC	-0.048
CLMP	1/4 MIC	-0.002
	1/2 MIC	-0.010

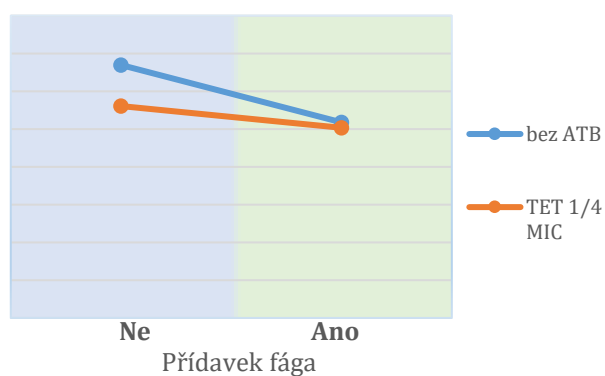
Antagonismus < 1 < synergie

### 6.9.2 Efekt kombinace fág-ATB na kmen 1039(53<sup>+</sup>)

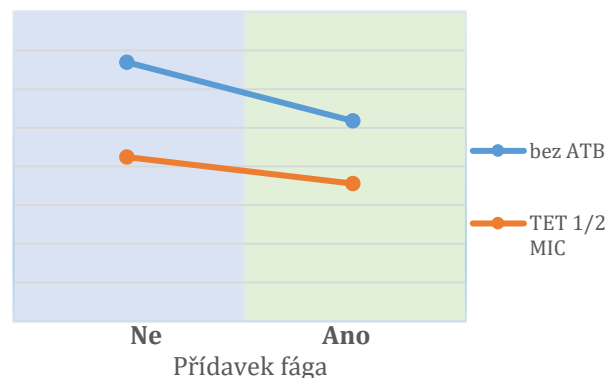
Významný efekt na růst tohoto kmene se projevil pouze u kombinací fága 812 s TET (obr. 37, 38, 39) a CLMP (obr. 40, 41, 42) přičemž v obou případech šlo o antagonismus. K antagonismu došlo také v případě GEN, ten byl však méně výrazný, než v případě kmene 1039. ERY měl spíše aditivní efekt.



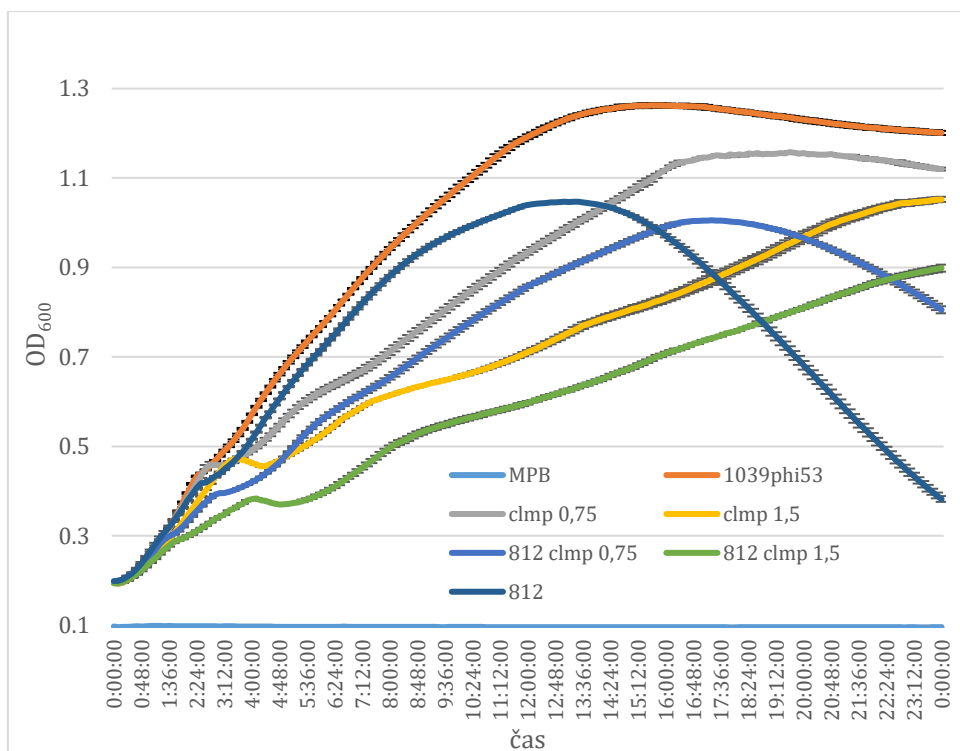
Obrázek 37: Růstové křivky kmene 1039(53+) v přítomnosti TET a fága 812



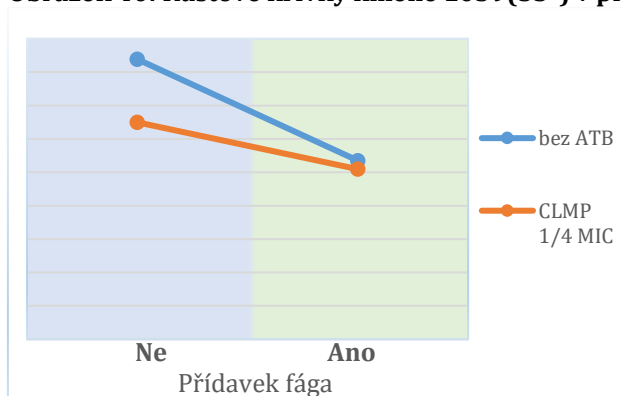
Obrázek 38: Interakční graf pro kombinaci 1039(53+) ¼ MIC TET a fága 812



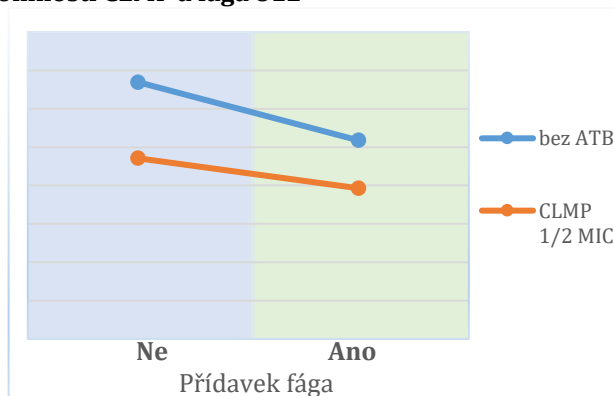
Obrázek 39: Interakční graf pro kombinaci 1039(53+) ½ MIC TET a fága 812



Obrázek 40: Růstové křivky kmene 1039(53+) v přítomnosti CLMP a fága 812



Obrázek 41: Interakční graf pro kombinaci 1039(53+) 1/4 MIC CLMP a fága 812



Obrázek 42: Interakční graf pro kombinaci 1039(53+) 1/2 MIC CLMP a fága 812

Tabulka 16: Efekt kombinací ATB a fága na kmen 1039(53+)

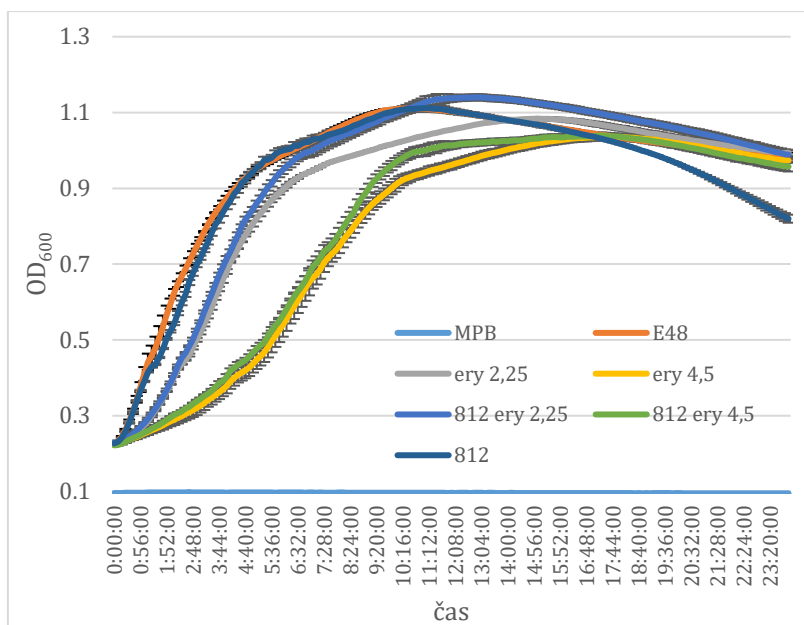
ATB	koncentrace	interakční hodnota ATB a fága
ERY	1/4 MIC	0.969
	1/2 MIC	0.966
GEN	1/4 MIC	0.575
	1/2 MIC	0.611
TET	1/4 MIC	0.132
	1/2 MIC	0.660
CLMP	1/4 MIC	0.135
	1/2 MIC	0.629

Antagonismus < 1 < synergie

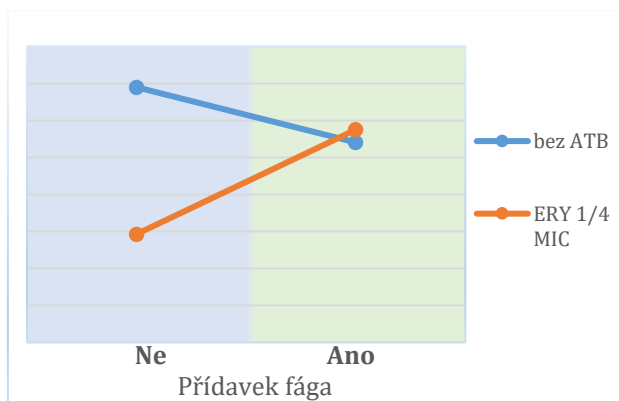
### 6.9.3 Efekt kombinace fág-ATB na kmen E48

U kmene E48 se působení jednotlivých kombinací výrazně lišilo, zatímco např. aplikace ERY s fágem 812 vyústila v antagonismus (obr. 43, 44, 45), kombinace CLMP a fága 812 vedla k synergii (obr. 46, 47, 48).

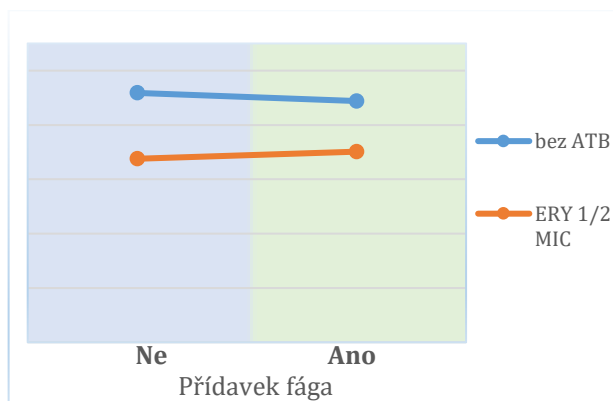
## VÝSLEDKY



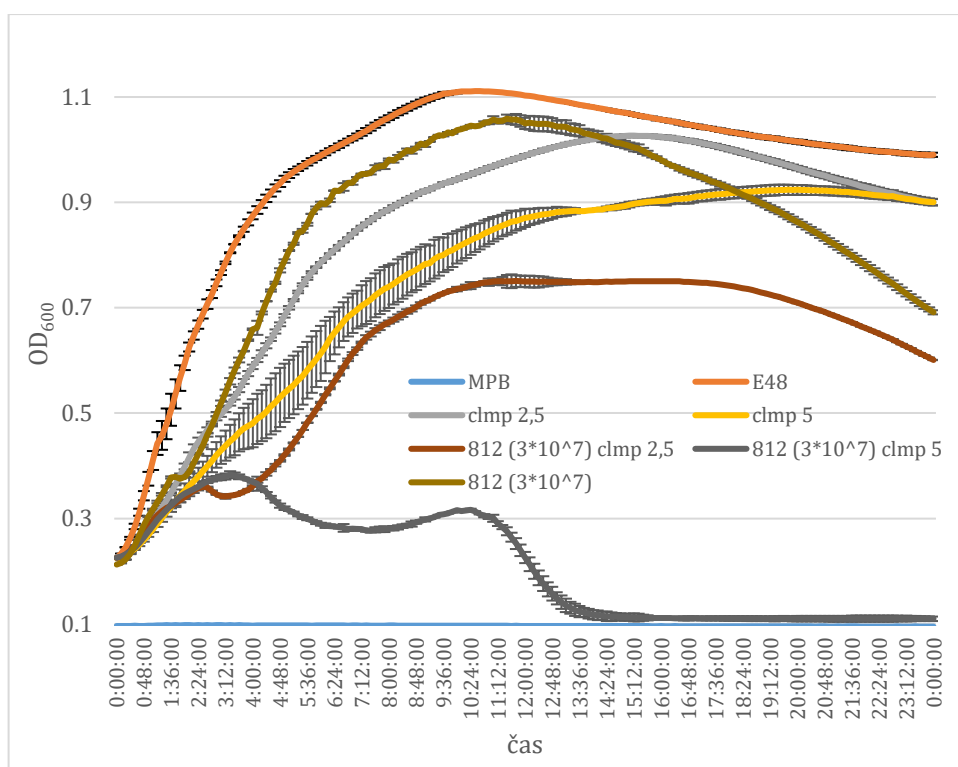
Obrázek 43: Růstové křivky kmene E48 v přítomnosti ERY a fága 812



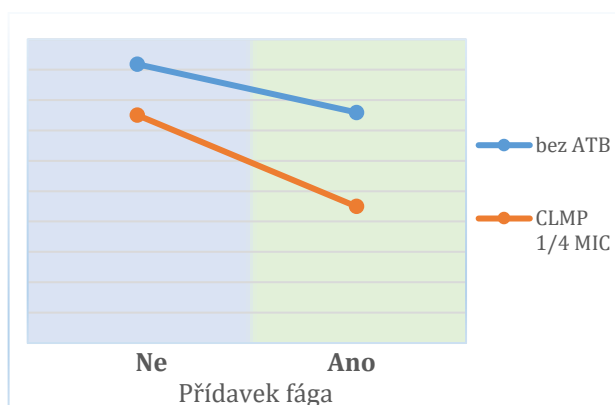
Obrázek 44: Interakční graf pro kombinaci E48  $\frac{1}{4}$  MIC ERY a fága 812



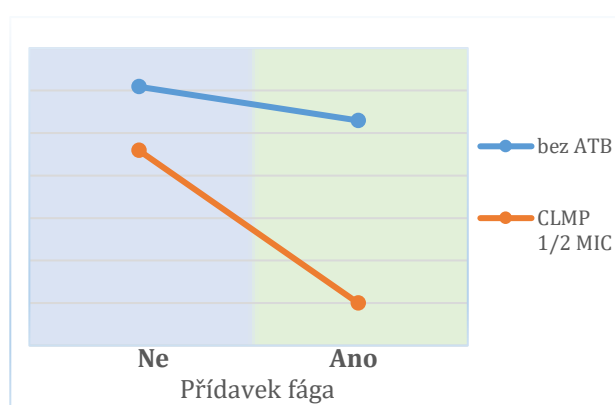
Obrázek 45: Interakční graf pro kombinaci E48  $\frac{1}{2}$  MIC ERY a fága 812



Obrázek 46: Růstové křivky kmene E48 v přítomnosti CLMP a fága 812 (IR=0,1)



Obrázek 47: Interakční graf pro kombinaci E48 ¼ MIC CLMP a fága 812 (IR=0,1)



Obrázek 48: Interakční graf pro kombinaci E48 ½ MIC CLMP a fága 812 (IR=0,1)

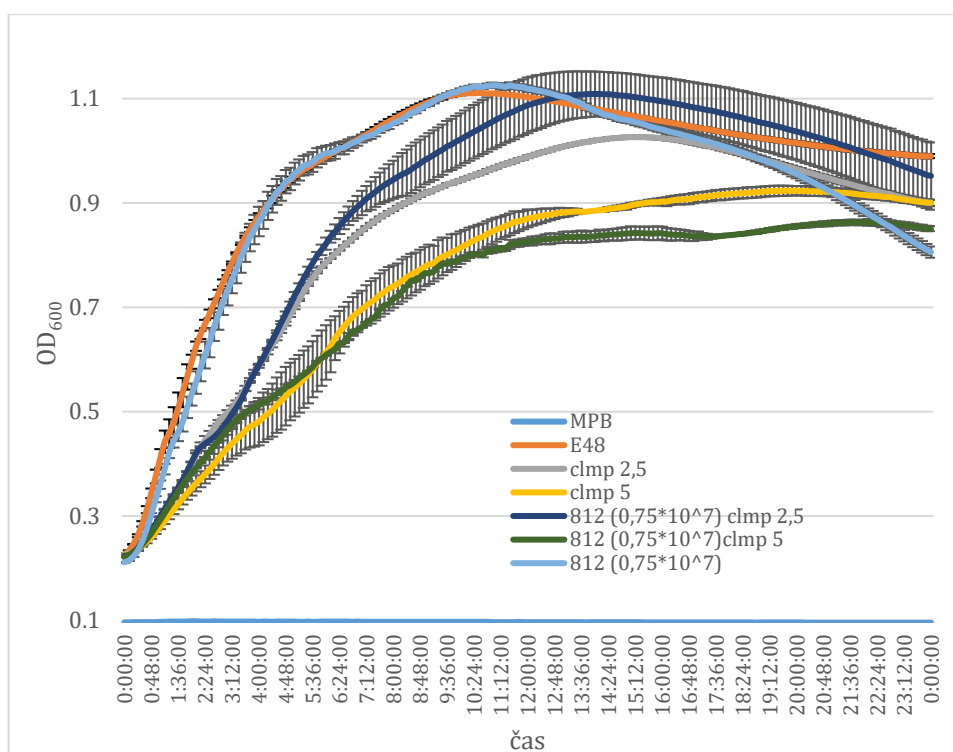
Tabulka 17: Efekt kombinací ATB a fága na kmen E48.

ATB	koncentrace	interakční hodnota ATB a fága
ERY	1/4 MIC	-0.087
	1/2 MIC	0.769
GEN	1/4 MIC	0.798
	1/2 MIC	0.922
TET	1/4 MIC	0.951
	1/2 MIC	0.931
CLMP	1/4 MIC	1.850
	1/2 MIC	2.867

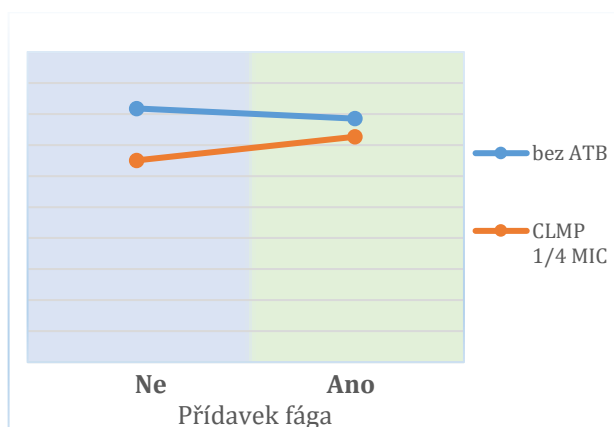
Antagonismus < 1 < synergie

#### 6.9.4 Role stechiometrie na výsledný efekt ATB a fága 812

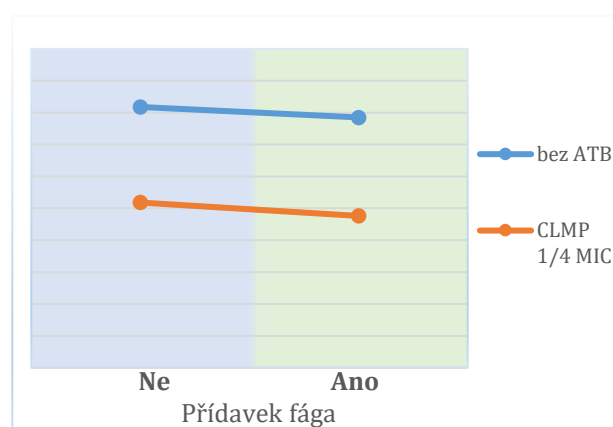
Jako esenciální se ukázala pro výsledný efekt fága 812 a CLMP role stechiometrie. Při porovnání obrázků 46, 47 a 48 s obrázky 49, 50 a 51, lze vidět, že zatímco v případě, kdy byl vstupní poměr fága 0,1, docházelo k výrazné synergii (obr. 46, 47 a 48), byl-li vstupní poměr snížen na 0,025, byl výsledný efekt naopak antagonistický (obr. 49, 50 a 51).



Obrázek 49: Růstové křivky kmene E48 v přítomnosti CLMP a fága 812 (IR=0,025)



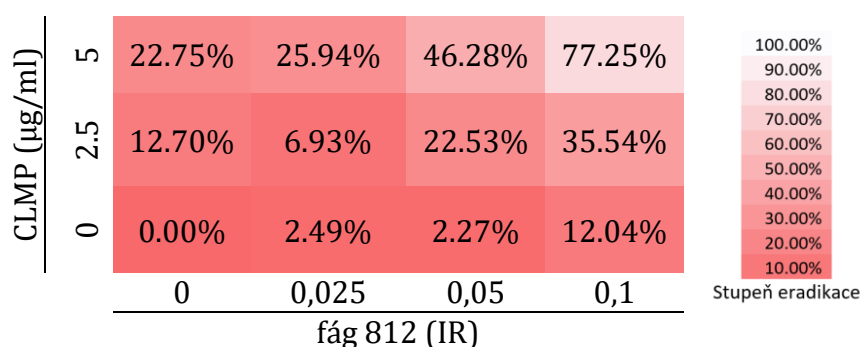
Obrázek 50: Interakční graf pro kombinaci E48 1/4 MIC CLMP a fága 812 (IR=0,025)



Obrázek 51: Interakční graf pro kombinaci E48 1/2 MIC CLMP a fága 812 (IR=0,025)

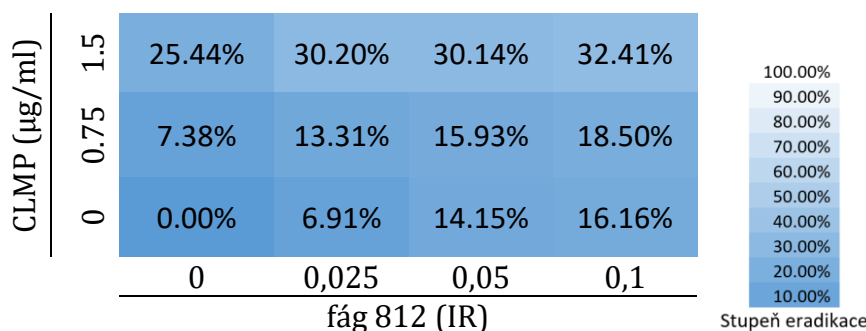
Při hodnotě vstupního poměru mezi výše zmíněnými hodnotami, konkrétně IR=0,05, docházelo ke slabší synergii. Efekt různých koncentrací CLMP a různých IR fága 812 na eradikaci kmene E48 je shrnut v níže přiloženém synogramu (obr. 52).

## VÝSLEDKY



Obrázek 52: Synogram znázorňující stupeň eradikace kultury kmene E48 v přítomnosti CLMP a fága 812

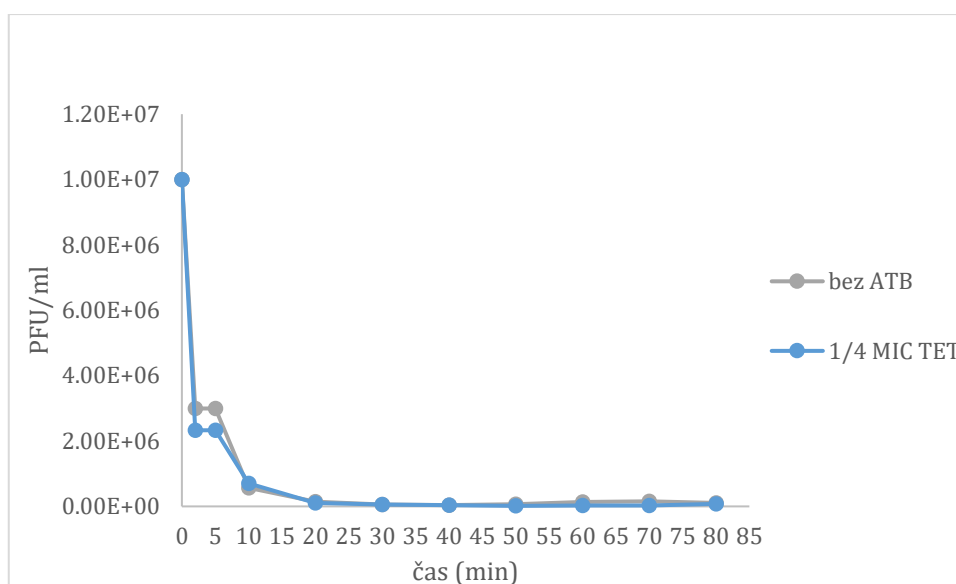
Jakmile se projevila výrazná vliv stechiometrie v PAS u kmene E48, byla ověřena její role také u kmene 1039(53<sup>+</sup>), zde však k tak výrazně rozdílným efektům u různých vkladových poměrů nedošlo (obr. 53).



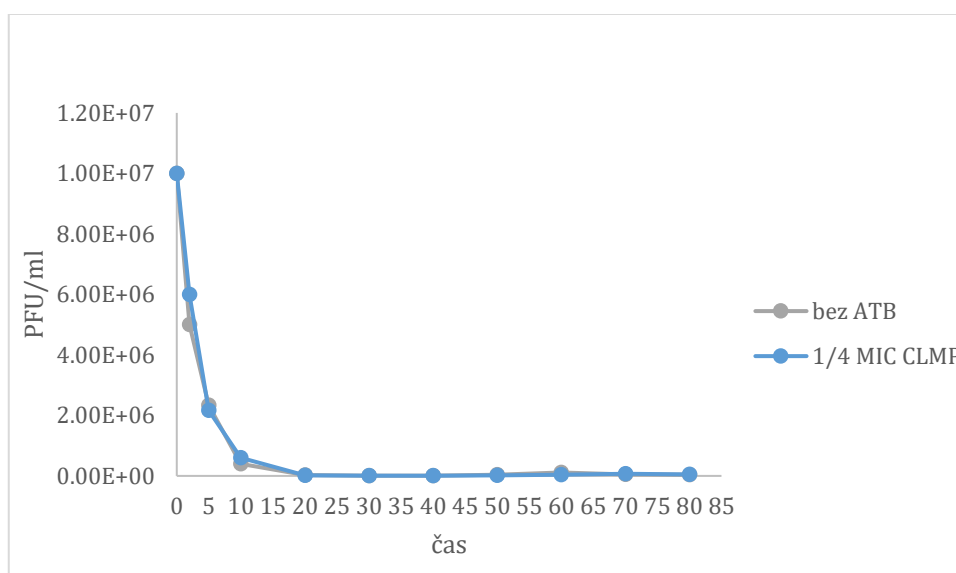
Obrázek 53: Synogram znázorňující stupeň eradikace kultury kmene 1039(53<sup>+</sup>) v přítomnosti CLMP a fága 812

### 6.9.5 Efekt inhibitorů proteosyntézy na schopnost produktivní infekce fágem 812

I v případě eradikace kmene kombinací fága a ATB, nelze na základě získaných růstových křivek stanovit, zdali je fág schopen se na rezistentním kmeni pomnožit. Proto byla na kmeni 1039(53<sup>+</sup>) předem ošetřeném ¼ MIC ERY, GEN, TET a CLMP stanovena jednostupňová růstová křivka fága. Přítomnost žádného ATB neumožnila fágu 812 pomnožení na rezistentním kmeni. Titr fága v kultuře ošetřené ATB se v průběhu růstové křivky nijak výrazně neodchýlil od titru fága v kontrolní kultuře bez ATB. Jako ukázka je zde uvedena kombinace s TET a CLMP (obr. 54 a 55).

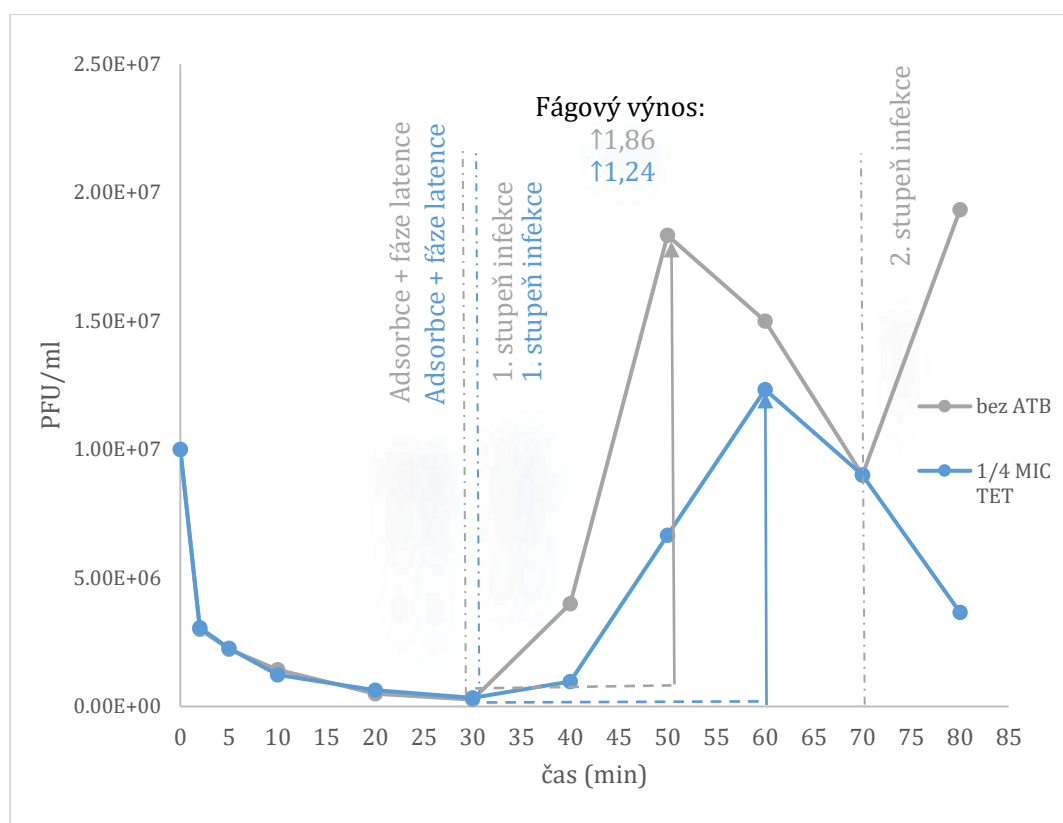


Obrázek 54: Růstová křivka fága 812 na kmeni 1039(53<sup>+</sup>) předem ošetřeném TET



Obrázek 55: Růstová křivka fága 812 na kmeni 1039(53<sup>+</sup>) předem ošetřeném CLMP

Vliv ATB na pomnožení fága 812 na citlivém kmeni byl analyzován pomocí jed-  
nostupňové růstové křivky fága na kmeni 1039. Jako příklad je zde uvedena křivka  
v přítomnosti TET (obr. 56).



Obrázek 56: Růstová křivka fága 812 na kmeni 1039 předem ošetřeném TET

Růstová křivka fága v přítomnosti ¼ MIC ERY, GEN, TET a CLMP byla vždy provedena s kontrolou bez ATB. Oproti kontrolám byl v přítomnosti ATB vždy zaznamenán pokles v titru a v případě ERY a TET byla zaznamenána též opožděná lyze. Fágové výnosy shrnuje tabulka 18. V přítomnosti jednotlivých ATB byl pokles v titru oproti kontrole bez ATB následující: ERY = 28 %, GEN = 31 %, TET = 33 %, CLMP = 18 %.

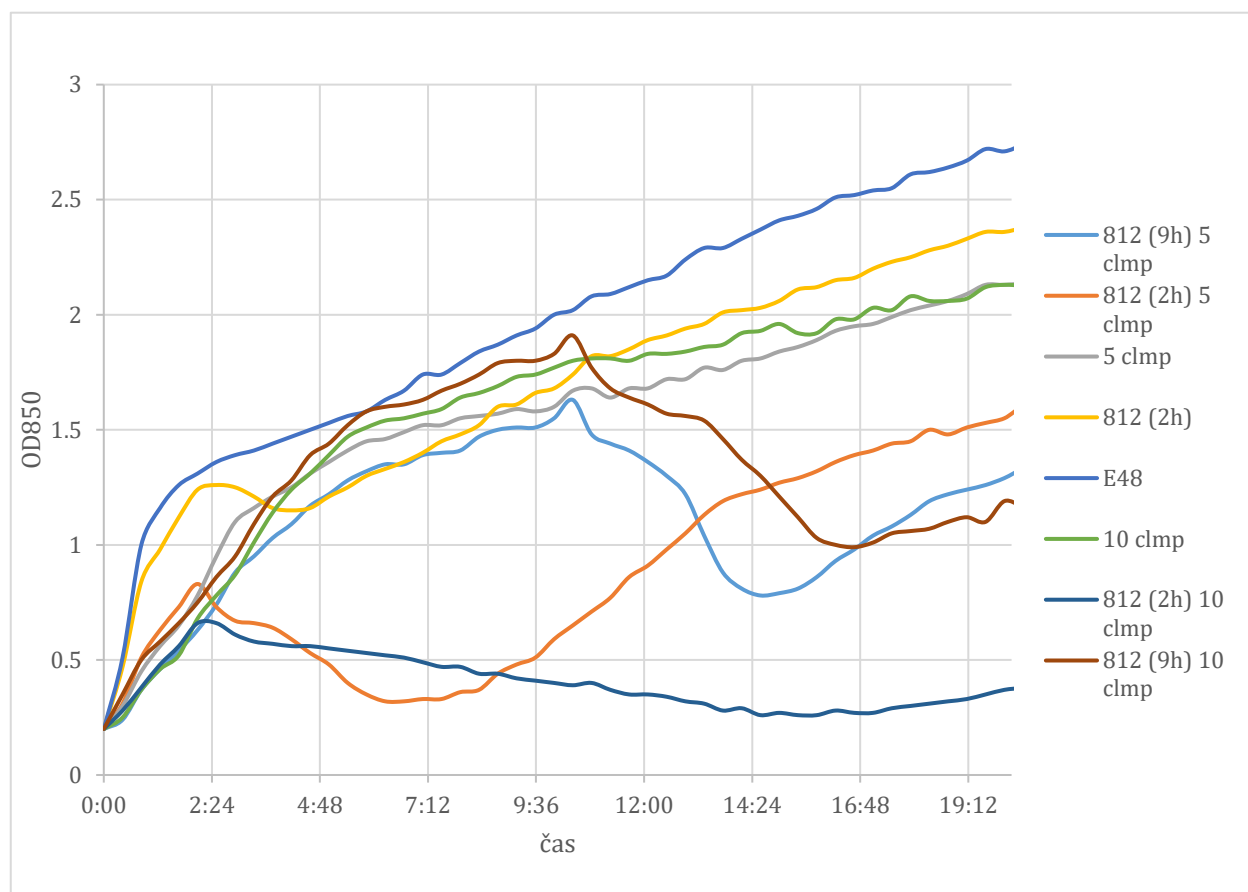
Tabulka 18: Fágový výnos fága 812 na kmeni 1039 s/bez ATB

	ERY	GEN	TET	CLMP
1039 s ATB	1,34	1,5	1,24	1,24
1039 bez ATB	1,87	2,18	1,86	1,51

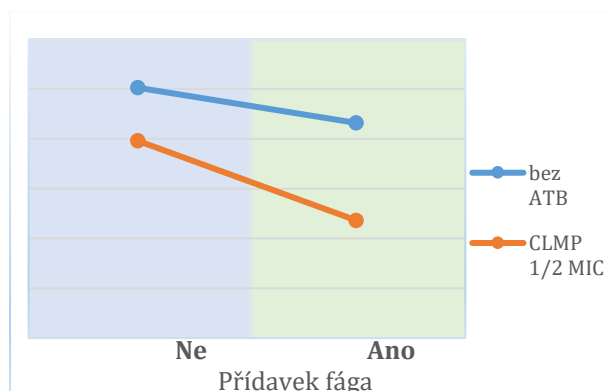
### 6.9.6 Ověření synergického efektu (PAS) CLMP a fága 812 při prodloužené inkubaci kmene s antibiotikem

Byla stanovena hypotéza, že doba působení inhibitoru proteosyntézy má vliv na vnitrobuněčnou koncentraci proteinu PdpSau, který je normálně produkován kontinuálně (Kuntová *et al.*, 2023). Proto byl analyzován efekt doby kultivace kultury s ATB před přidáním fága. Bylo provedeno stanovení růstových křivek kmene E48 na biore-

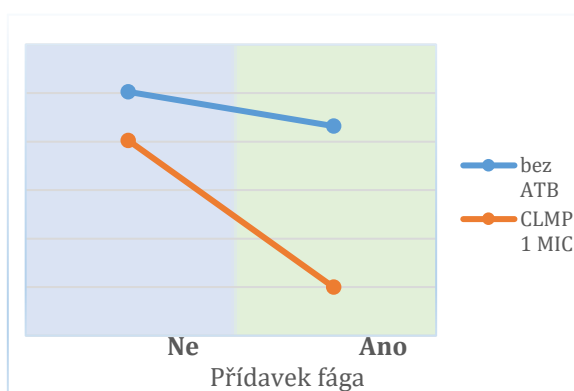
aktoru. Kultura kmene byla nejprve synchronizována chladem, a poté inkubována s ATB. V časech 2 a 9 hodin od podání CLMP byl přidán fág 812 o výsledném titru ve směsi  $1 \times 10^9$  PFU/ml. Zjištěný efekt je uveden na obrázku 57 a interakčních grafech 58 a 59.



**Obrázek 57: Efekt CLMP ( $1$  a  $\frac{1}{2}$  MIC) a fága 812 v závislosti na době podání (2h a 9h po aplikaci ATB) na růst kmene E48 (testováno v bioreaktoru).**



Obrázek 58: Interakční graf popisující efekt fága 812 (přidán po 2h) a 1/2 MIC CLMP (5 µg/ml) na růst kmene E48



Obrázek 59: Interakční graf popisující efekt fága 812 (přidán po 2h) a 1 MIC CLMP (10 µg/ml) na růst kmene E48

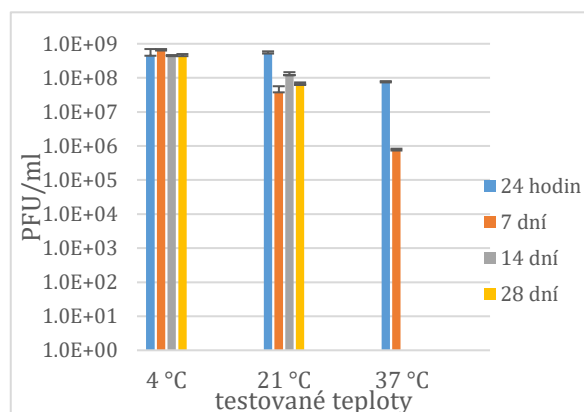
## 6.10 Stabilitní studie fágů 812 a P68 v tekutém a v polotuhém nosiči

Jedním ze základních parametrů, které musí fágy splňovat, mají-li být využity v klinické praxi, je jejich dostatečná stabilita v lékových formách. Z toho důvodu byla v rámci diplomové práce provedena stabilitní studie dvou fágů s terapeutickým potenciálem, které byly použity také v řadě experimentů spojených s charakterizací mechanismů PAS. Konkrétně se jednalo o stabilitní studii fágů 812 a P68 ve dvou nosičích s možným využitím při léčbě povrchových infekcí. Jedním z nosičů byl 1% karbomerový gel a druhým byl fágový pufr. Počáteční titr fága 812 v obou nosičích byl  $6 \times 10^8$  PFU/ml. Počáteční titr fága P68 v obou nosičích byl  $1 \times 10^9$  PFU/ml. Stabilita fágů byla testována po dobu čtyř týdnů, přičemž změna ve fágovém titru byla ověřována po 24 hodinách, 7, 14 a 28 dnech. Stabilita fága 812 je uvedena na obr. 60 a 61 a stabilita fága P68 v grafech 62 a 63. Grafy shrnující výsledky biologických replikátů této stabilitní studie je možné nalézt spolu s tabulkami uvádějícími konkrétní titry fágů v příloze A.

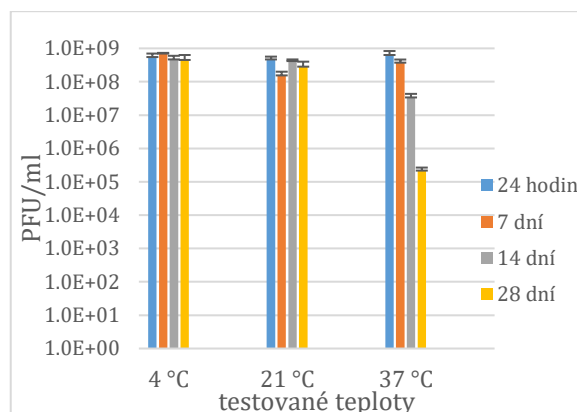
Z výsledků stability je patrné, že jak u fága 812, tak u fága P68, byla stabilita výrazně vyšší ve fágovém pufru. U obou těchto fágů byla stabilita v karbomerovém gelu velmi závislá na teplotě, kdy při 37 °C došlo u fága 812 po 7 dnech ke snížení titru v gelu o tři řády a ke kompletní deaktivaci po 14 dnech. U fága P68 byl fág deaktivován již po 7 dnech. Oproti tomu při 4 °C byl fág 812 v karbomerovém gelu stejně stabilní jako v pufru. Fág P68, takovouto stabilitu v karbomerovém gelu neprokázal; zatímco v pufru se hodnoty PFU/ml neměnily, u P68 v gelu docházelo už po prvním dni ke snížení titru o řád a v průběhu 28 dní bylo možné pozorovat další pokles.

Při porovnání hodnot PFU/ml u replikátů testování stability fága 812 v karbomerovém gelu je patrný výrazný rozdíl u stability fága při 37 °C, kdy u druhého

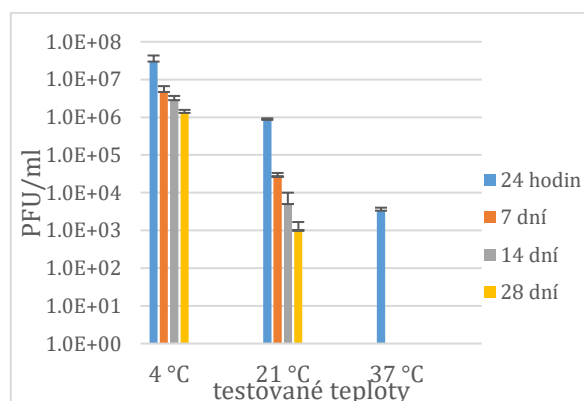
replikátu si fág po 7 a 14 dnech zachoval o řád vyšší titr, než u prvního replikátu. U fága 812 ve fágovém pufru se takovýto výrazný rozdíl nevyskytl. Při srovnání replikátů testování stability fága P68 se titr fága pohybuje ve stejných hodnotách. Větší rozdíl je patrný u stability fága v pufru v teplotě 37 °C po 28 dnech, kdy u prvního replikátu byla naměřena hodnota  $3 \times 10^5$  a u druhého  $6.67 \times 10^4$ .



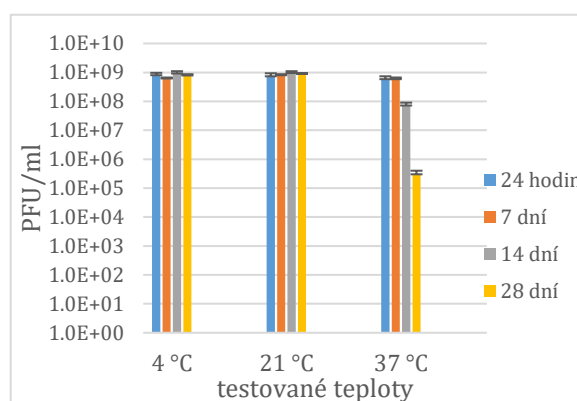
Obrázek 60: Stabilita fága 812 v 1 % karbomerovém gelu



Obrázek 61: Stabilita fága 812 ve fágovém pufru



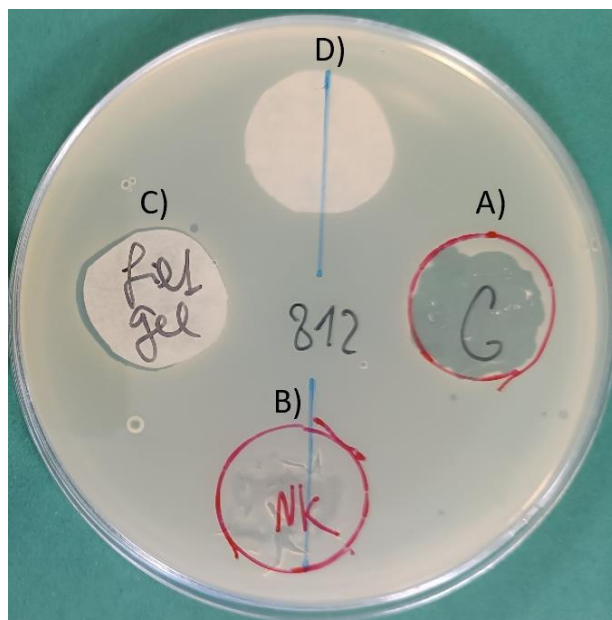
Obrázek 62: Stabilita fága P68 v 1 % karbomerovém gelu



Obrázek 63: Stabilita fága P68 ve fágovém pufru

Kromě klasického stanovení titru byla ověřována také schopnost fága uvolňovat se přímo z polotuhé lékové formy do okolí. Toto bylo testováno dvěma způsoby; jedním z nich bylo nanesení 500  $\mu$ l gelu s fágem přímo na petriho misku s citlivou kulturou (kmen SA 1137) na plochu 2,5 cm<sup>2</sup> a druhým nanesení stejného množství gelu s fágem na filtrační papír položený na agaru z důvodu ověření zdali je fág schopen z gelu difundovat do okolí i když gel nebude přímo v kontaktu s kulturou. Jako negativní kontrola posloužilo nanesení pouze samotného gelu bez fága či filtrační papír

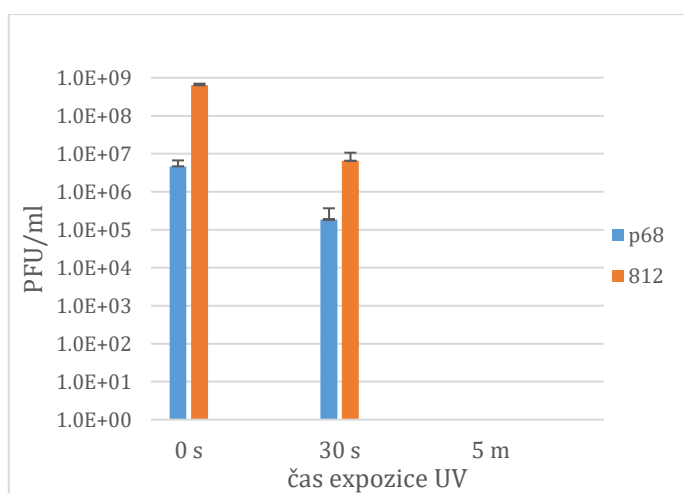
s gelem bez fága. Uvolňování fága polotuhého nosiče do okolí se potvrdilo jak při nanesení gelu přímo na misku, tak při difuzi virionů přes filtrační papír.



**Obrázek 64: Ověření schopnosti fága 812 uvolňovat se z karbomerového gelu.** A) gel obsahující fága; B) samotný gel bez fága (negativní kontrola); C) gel obsahující fága nanesený na filtračním papíře; D) samotný gel bez fága nanesený na filtračním papíře (negativní kontrola)

Stojí za zmínku, že v žádném z připravovaných vzorků nebyla zaznamenána kontaminace, se vzorky bylo samozřejmě pracováno sterilně, i přesto však existuje riziko kontaminace sporami plísní. Preparáty si tedy po celou dobu testování uchovaly mikrobiologickou jakost.

Stabilita fágů byla testována také při expozici UV. K tomuto účelu byla použita indukční skříň s UV lampou o síle 15 W, od níž byl testovaný gel (vzorek fága v karbomerovém gelu uchovaný po 7 dní v lednici) umístěn ve vzdálenosti 45 cm. Byly testovány následující časy expozice 30 s a 5 min. Výsledky stability fágů v karbomerovém gelu vystavených UV záření jsou shrnuty na obrázku 65. Testování bylo opět prováděno v biologických replikátech, přičemž výsledky druhého replikátu lze nalézt v příloze A. U obou replikátů došlo u fága 812 i P68 po 5 minutách expozice ke kompletní deaktivaci fágů.



Obrázek 65: Stabilita fágů 812 a P68 v karbomeovém gelu při vystavení UV záření

## 7 Diskuze

Synergický efekt ATB a bakteriofágů byl již prokázán při eradikaci řady bakteriálních druhů za využití nejrůznějších fágů a antibiotik (Comeau *et al.* 2007; Kamal *et al.* 2015; Kirby 2012). Původ synergického efektu je často připisován pozměněné morfologii hostitelské buňky vlivem ATB, často cílících na buněčnou stěnu (Comeau *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2018). Ta může představovat nejen zdroj receptorů, ale i významnou bariéru pro fágovou infekci, a její oslabení tak může vést k vyšší infektivitě fága a tím synergickému efektu. Avšak ne všechny skupiny ATB u kterých byl PAS pozorován vedou k alteraci buněčné morfologie (Kaur, Harjai, *et al.* Chhibber 2012). Mechanismus PAS stále není dostatečně popsán např. pro ATB s efektem na proteosyntézu, v jejichž případech nebyly pozorovány jakékoliv změny v morfologii bakterií. Fágy jsou na hostitelském proteosyntetickém aparátu závislé, a proto zůstává otázkou, jak mohou profitovat z inhibované proteosyntézy. Cílem diplomové práce je přispět k objasnění tohoto jevu.

Byla stanovena hypotéza, že mechanismus synergie mezi fágy a ATB s inhibičním efektem na proteosyntézu spočívá ve snížení tvorby proteinů zodpovědných za odolnost bakterií k fágům. Takovéto proteiny jsou často kódovány přídatným genomem, reprezentovaným MGE (Labrie, Samson *et al.* Moineau 2010). K ověření této hypotézy byl navržen systém, kdy do kmene citlivého k fágům byl přenesen MGE kódující gen fágové rezistence. Na takto připraveném systému byly následně testovány kombinace fágů s ATB interferujícími v odlišných krocích translace a výsledky byly srovnány s experimenty na kmeni, který stejný MGE obsahuje přirozeně.

### 7.1 Výběr a příprava modelových systémů

Za účelem přípravy systému byly nejprve vybrány dva kmeny, které měly sloužit jako donory MGE. Jednalo se o kmeny MRSA NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09. Tyto kmeny se od ostatních kmenů se stejným sekvenčním typem lišily svou rezistencí ke studovaným fágům (Botka *et al.*, 2019). Bylo tedy předpokládáno, že je tato rezistence kódována MGE.

Sekvence a následná anotace odhalila, že kmen NRL Atb 244 obsahuje dva profágy, jednu SCCmec kazetu a tři plazmidy. V kmeni NRL Atb 2650/09 byly identifikovány tři profágy, jeden genomový ostrov a jedna SCCmec kazeta. U těchto MGE byly následně predikovány proteiny, které by mohly být zodpovědné za rezistenci bakterií vůči fágům. Jednalo se zejména o proteiny s neznámou funkcí, a proto byly vzaty do úvahy všechny, u nichž byla predikovaná funkce jakkoliv spojena s fágovou rezistencí. Ověření, zdali se opravdu jedná o proteiny zodpovědné za rezistenci k vybraným fágům (812, 812h1, 812K1/420, P68) by vyžadovalo klonování odpovídajících genů pomocí vektorů s indukovatelnými promotory do vhodných citlivých recipientů.

Z důvodu časové náročnosti celé diplomové práce byl zvolen přenos celých MGE přirozenou cestou (indukce a lyzogenizace, transdukce).

U kmene NRL Atb 244 byl úspěšně indukován jeden profág, který byl identifikován jako phi\_244\_1. U kmene NRL Atb 2650 se podařilo indukovat dva profágy, phi\_2650\_2 a phi\_2650\_3. Zatímco phi\_2650\_3 se indukoval pouze společně s phi\_2650\_2, druhý jmenovaný se vyskytoval v lyzátech i samostatně. Tato skutečnost nasvědčuje tomu, že phi\_2650\_2 je pomocným fágem pro phi\_2650\_3, který není schopen samostatné indukce, případně realizace lytického cyklu, a to nejspíše z důvodu ztráty funkce genů esenciálních v těchto procesech. Podobná závislost na pomocném fágu byla pozorována například u ostrovů patogenity *S. aureus* (SaPI) (Ram *et al.*, 2015).

Indukované fágy úspěšně lyzogenizovaly citlivé kmeny 1039 a RN4220 $\Delta$ tarM, avšak ke změně fenotypu, ve smyslu navození rezistence k lytickým fágům P68, 812, 812h1 a 812K1/420, nedošlo. Přenesené profágy tedy pravděpodobně nenesou geny zodpovědné za rezistenci donorových kmenů. Je možné, že takové geny jsou nesené profágy, které se nepodařilo indukovat. Důvodem mohly být případné defektní geny těchto elementů, které indukci znemožnily.

Úspěšnost lyzogenizace byla ověřována mimo jiné pomocí PCR. Při identifikaci profága phi\_2650\_2 a phi\_2650\_3 v testovaných lyzogenech vznikaly menší amplikony než v případě donorového kmene. Došlo tak pravděpodobně k delecii v cílové sekvenci. Změny v genomu mírných fágů vlivem selekce či rekombinace s jinými profágy jsou poměrně časté (Kupczok *et al.*, 2018). K identifikaci obou fágů byly navrženy primery cílící na geny velké podjednotky fágové terminázy. Vzhledem k tomu, že se v připravených lyzogenech oba fágy vyskytovaly společně, nelze vyloučit vliv rekombinace. Dalším společným faktorem, který mohl ovlivnit změnu ve velikosti amplikonů byla osminukleotidová shoda v sekvenci, která se nacházela u obou forward primerů na 5' konci.

Dalšími MGE, které by mohly nést geny kódující rezistenci k fágům jsou genomické ostrovy a plazmidy. Anotace plazmidových sekvencí odhalila pouze jediný gen, jehož funkce by mohla souviset s fágovou rezistencí. Jednalo se o gen kódující protein podobný CptN toxinu, který se nacházel na velkém konjugačním plazmidu p244a. CptN toxin patří do TA systémů typu III, které jsou typicky spojovány s fágovou rezistencí (Rao *et al.*, 2015). Nicméně konkrétně u CptN toxinu bylo popsána pouze úloha ve stabilizaci plazmidu, jeho role v rezistenci vůči fágům se nepotvrdila.

Protože konjugace probíhá u stafylokoků *in vitro* s velice nízkou efektivitou (Firth *et al.*, 2018), byla pro přenos plazmidu p244a zvolena metoda transdukce, která je vhodná i pro přenos genomických ostrovů (Fišarová *et al.*, 2021). Protože je však donorový kmen rezistentní k fágům, bylo využito toho, že plazmidy se ve kmeni NRL Atb 244 vyskytují spolu s indukovatelným profágem. K pokusu o transdukci plazmidů tak mohl být použit přímo indukovaný lyzáat. Vzhledem k tomu, že na plazmidech p244a a p244b byly nalezeny geny pro rezistenci k ATB, která byla potvrzena i feno-

typově, mohla být tato rezistence využita pro selekci transduktantů. K transdukcii MGE do recipientního kmene 1039 s deficientním R-M systémem nedošlo, je tak možné, že indukovaný fág nemá transdukční potenciál, např. z důvodu mechanismu sbalování (Chiang *et al.* 2019).

Vzhledem k tomu, že úspěšný přenos MGE z donorových kmenů nenechal rezistenci recipientních kmenů a přenos dalších elementů znesnadňovala panrezistence donorových kmenů k fágům, byl zvolen alternativní systém. Jako MGE kódující rezistenci k lytickým fágům byl vybrán profág 53 obsahující gen *pdpSau*, jehož produkt v případě infekce bakterie fágem 812 spouští abortivní infekci (Kuntová *et al.*, 2023). Studium vlivu inhibitorů proteosyntézy na expresi PdpSau by mohlo přispět k širšímu poznání mechanismu působení tohoto proteinu.

Donorovým kmenem profága 53 byl lyzogen RN4220(53+), připravený v práci Kuntová *et al.* (2023). Zároveň byl připraven i lyzogen kmene 1039, který je jako modelový systém vhodnější, protože postrádá restriktivní modifikační systémy a SpA protein, a je tedy citlivý k celé řadě fágů. Systém s kmenem 1039 a jeho lyzogenem se ukázal jako spolehlivější i z důvodu nekonzistentních výsledků na kmeni RN4220, které byly pravděpodobně způsobeny minoritní přítomností dalšího kmene *S. aureus* ve výchozí kultuře. To způsobovalo opětovný nárůst kultury po infekci fágem.

## 7.2 Testování efektu kombinací ATB a fága

Pro testování efektu kombinace fága a ATB byly použity kmeny 1039 a 1039(53+), jakožto umělý systém, a kmen MRSA E48, který profága 53 obsahuje přirozeně. Zatímco kmen 1039(53+) byl ke všem použitým ATB citlivý, kmen E48 byl citlivý pouze ke gentamicinu. U chloramfenikolu byla zaznamenána snížená citlivost a vůči tetracyklinu a erytromycinu byl kmen rezistentní, takže k jeho inhibici musela být použita vyšší koncentrace ATB. Je třeba poznamenat, že vysoká koncentrace použitých ATB, by mohla být při terapeutické aplikaci problémem z důvodu toxicity pro pacienty (Eyler *et Shvets* 2019). Nicméně vzhledem k tomu, že cílem diplomové práce bylo přispět k charakterizaci mechanismu synergického efektu mezi fágy a ATB inhibujícími proteosyntézu, a nikoliv hledání kombinací s terapeutickým využitím, nebylo použití vysoké koncentrace ATB překážkou. Ostatně toto je třeba zdůraznit také v souvislosti s výběrem ATB. Např. klinické využití CLMP je kvůli jeho spojení s aplastickou anémií nežádoucí (Jimenez *et al.*, 1987), pro charakterizaci mechanismu PAS však jeho vedlejší účinky na lidský organismus nepředstavovaly problém.

Pro testování vlivu ATB na fágovou infekci byly použity chladem synchronizované kultury, které byly inkubovány s ATB 20 minut před přidáním fága. Řada studií PAS efektu vyzdvihuje roli pořadí aplikace jednotlivých složek, přičemž synergie byla pozorována v případě, že je fág podán před aplikací ATB (Dickey *et Perrot*, 2019;

Kumaran *et al.*, 2018). V opačném případě byl pozorován antagonismus. Tyto studie se ovšem zaměřovaly na testování PAS efektu na bakteriální biofilm, kdy je mechanismus synergie založen nejspíše na rozrušení extracelulární matrix biofilmu jakožto bariéry pro průnik antibiotik. Pro ověření stanovené hypotézy, že za synergií mezi fágy a ATB stojí inhibice syntézy proteinů zodpovědných za odolnost bakterií vůči fágům, však bylo potřeba nejprve inkubovat kulturu s ATB, aby mohlo dojít ke snížení koncentrace proteinu PdpSau ještě před podáním fága. V opačném případě by byla spuštěna abortivní infekce.

Efekt kombinace ATB a fága byl hodnocen prostřednictvím interakčních grafů (Gu Liu *et al.*, 2020). Interakční grafy mají výpovědní hodnotu pouze v případě, že jsou hodnoceny spolu s růstovými křivkami, z nichž byly vytvořeny. Jelikož vychází z rozdílů mezi jednotlivými hodnotami, neinformují o tom, zdali došlo k eradikaci kultury, ale referují pouze o tom, je-li kombinace ATB a fágů více či méně efektivní. Může tedy docházet k situacím, kdy i přesto, že interakční grafy svědčí o silné synergii (hodnota  $\gg 1$ ), reálně k eradikaci kmene nedojde. Proto mohou sloužit pouze jako doplněk k růstovým křivkám.

Fág 812 lyzuje bezprofágový kmen 1039 velice efektivně. Jelikož přítomnost antibiotika nepřináší fágu v tomto případě žádnou výhodu, ale naopak inhibuje syntézu jeho proteinů, nebyl zde prostor pro další zlepšení a vliv testovaných antibiotik na životní cyklus fága byl ve všech případech silně antagonistický. Nejsilnější antagonismus byl pozorován u gentamicinu, což je v souladu se studii, v nichž byla popsána inhibice proliferace fágů aminoglykosidy, která nespočívá jen v narušení proteosyntézy, ale i v blokaci infekce ještě před replikací fágového genomu (Kever *et al.*, 2022; Zuo *et al.*, 2021). Fágový výnos se v přítomnosti GEN snížil o 31 % což je obdobná hodnota jako byla zaznamenána i u TET či ERY, což roli dodatečného mechanismu inhibice životního cyklu fága nepotvrzuje. Nejméně byl fágový výnos omezen v přítomnosti CLMP, kde klesl pouze o 18 %. V případě TET a ERY byla zaznamenána také opožděná lyze, a to o 10 minut oproti kontrole bez ATB. Tyto výsledky jsou v rozporu se studií Kaur *et al.* 2012, kde v přítomnosti TET došlo ke zvýšení titru fága spolu s rychlejším uvolněním virionů z buňky. Je však třeba dodat, že tyto odlišnosti mohou být způsobeny použitím odlišných kultur a především fágů.

Žádné z ATB nevedlo k významné synergii s fágem 812 ani u kmene 1039(53<sup>+</sup>). V přítomnosti ATB a fága byl sice pozorován pomalejší nárůst kultury, avšak snížena byla pravděpodobně i aktivita fága. Zatímco růstová křivka kultury vystavené fágu samotnému začíná klesat již po 12 hodinách, v případě, že je fág přidán spolu s CLMP či TET, dochází k poklesu až o pět hodin později. Toto může být způsobeno inhibicí tvorby PdpSau, kdy k abortivní infekci dochází až mnohem později, kdy je dosaženo potřebné hladiny proteinu v buňce. Nicméně ani to fágu nestačilo k realizaci lytického cyklu. Růstové křivky fága 812 na kmeni 1039(53<sup>+</sup>) nepotvrdily hypotézu, že by přítomnost ATB inhibujícího proteiny umožnila fágům pomnožení. Fágový titr byl

v případě TET či GEN naopak lehce snížen. V přítomnosti ATB nebyla pozorována ani výrazná změna v adsorpci fága.

U kmene E48 byl v případě ERY a GEN pozorován antagonismus s fágem 812 a v případě TET nebyl pozorován žádný efekt, avšak kombinace s CLMP vedla opakovaně k silné synergii. Na výsledný efekt měl zásadní vliv vstupní poměr fága, což je v souladu s výsledky Gu Liu *et al.* 2020. Významná role stechiometrie infekce může mít více příčin. Jednou možností je, že aby se kultura rezistentního kmene stala citlivou k fágu, musí být vystavena CLMP po dostatečně dlouhou dobu. Fág o vyšším vstupním poměru se v kultuře, kde dochází k jeho depleci prostřednictvím abortivní infekce, udrží déle, a proto je nakonec schopen efektivní propagace.

Důvodem proč k synergii vedla právě interakce CLMP s fágem, zatímco u ostatních ATB tento jev pozorován nebyl, může být hned několik. Mechanismus inhibice translace je u všech čtyř testovaných ATB odlišný (viz kapitola 2.6 [ATB cílící na proteosyntézu](#)). Konkrétně u CLMP dochází jeho vazbou na 50S podjednotku ribozomu k blokaci peptidyl-transferázy a tedy k inhibici tvorby peptidových vazeb (Pongs *et al.*, 1973). CLMP je bakteriostatické ATB, což má však společné s ERY či TET. Dále má lipofilní povahu, což mu usnadňuje vstup do buňky skrze buněčnou membránu (Sanga *et Kharel*, 2022). Lipofilním antibiotikem je ale také ERY (Hofsli *et Nissen-Meyer*, 1989), u něhož byl pozorován antagonismus. Jevem pozorovaným u buněk vystaveným CLMP, který by mohl mít souvislost se synergickou interakcí s fágem, je vyvolání up-regulace genů zapojených do procesu translace (Zin *et al.*, 2020). Tento fenomén je vysvětlován jako snaha bakterie o obnovení úrovně proteosyntézy.

Přesto, že efekt CLMP u kmene E48 podporuje stanovenou hypotézu, problematickým se jeví fakt, že u kmene 1039(53+) docházelo k antagonismu i při aplikaci různých vstupních poměrů fága a různé koncentrace ATB. Příčinou může být významná odlišnost obou použitých kmenů, kdy kmen 1039 byl připraven chemickou mutagenzí, zatímco E48 je klinický kmen MRSA a přirozený lyzogen fága 53, a proto se u nich může regulace proteosyntézy významně lišit.

Význam délky inkubace kultury E48 s CLMP před podáním fága umocňuje to, že lyze u kultur inkubovaných s CLMP 2h a 9h probíhala po přidání fága výrazně rychleji než při 20minutové inkubaci. Nicméně experimenty na destičkovém spektrofotometru a bioreaktoru nejsou plně srovnatelné.

Vzhledem k časovému omezení práce již nebyla stanovena růstová křivka fága 812 na kmeni E48 v přítomnosti CLMP. Ta by jednoznačně potvrdila, zdali dochází na rezistentním kmeni k pomnožení fága, nebo je kultura eradikována vlivem kombinace abortivní infekce a dalšího, neznámého faktoru.

### 7.3 Stabilitní studie fágů 812 a P68 v tekutém a v polotuhém nosiči

Testování stability terapeutických fágů přineslo k diskuzi dva jevy. Jedním z nich byla nižší stabilita fágů v gelu než v pufru ve vyšších teplotách. Při 37 °C docházelo u obou fágů ke kompletní deaktivaci (po 14 dnech u fága 812, po 7 dnech u fága P68), zatímco v pufru zůstal titr detekovatelný po celou dobu měření. Oproti tomu při 4 °C byly oba fágy v karbomerovém gelu relativně stabilní. Karbomerový gel je aniontový polymer tvořený monomery akrylové kyseliny. U tohoto nosiče byla popsána interakce aniontů s pozitivně nabitými proteiny fágového bičíku, což mělo za následek pokles titru fága (Carbol *et al.*, 2018). Při přípravě karbomeru se jeho velmi nízké pH zvyšuje přidávkem NaOH, aby při pH 7 získal gelovitou strukturu (proto nebyl testován vliv pH na stabilitu fága). Je proto možné, že se vlivem vyšší teploty mění pH, což má prokazatelně negativní vliv na životnost fágů (Pandey *et al.*, 2013).

Druhým zajímavým jevem byla výrazně vyšší stabilita fága 812 v karbomerovém gelu oproti fágu P68. Důvodem může být rozdílná stavba virionů. Zatímco fág 812 je myovirus s velikostí o průměru 90 nm a s bičíkem o délce 240 nm (Nováček *et al.*, 2016), P68 je podovirus jehož kapsida má průměr pouhých 48 nm a bičík délku 39,5 nm (Hřebík *et al.*, 2019). Oba fágy se také liší ve své závislosti na vápenatých kationtech, kdy u myovirů dochází vazbou kationtů ke konformačním změnám proteinů vázajících se na receptor (Dunne *et al.*, 2018). Tato změna pak umožňuje úspěšnou adsorpci. Lze předpokládat, že odlišný vliv iontů na infektivitu obou fágů může hrát významnou roli v jejich stabilitě v médiu.

Roli ve vyšší stabilitě fága 812 může hrát také jeho závislost na vápenatých iontech. U myovirů byla popsána role vápenatých iontů v konformačních změnách receptor vazebných proteinů (Dunne *et al.*, 2018). Z důvodu úspěšné adsorpce myovirů se při jejich pomnožování vápenaté ionty běžně přidávají do média ve formě CaCl<sub>2</sub> a byly přidány také do testovaného karbomerového gelu. Je možné, že právě schopnost interakce s vápenatými ionty je to, co odlišuje fága 812 od P68 a umožňuje mu vyšší stabilitu. Vzhledem k tomu, že u testovaných fágových preparátů se předpokládá využití v terapii povrchových infekcí, bylo žádoucí otestovat stabilitu preparátů také při vystavení UV záření. Fágy v gelu zůstaly aktivní při expozici UV záření ze zdroje o síle 15 W maximálně po dobu 30s a po 5 minutách byl jejich titr již nedetekovatelný. Negativní efekt UV záření a slunečního záření na aktivitu fágů byl popsán již dříve (Pandey *et al.*, 2013). Fágové preparáty by proto měly být ideálně skladovány mimo dosah přímého světla a na omezení expozice slunečnímu záření by se mělo dbát i při jejich aplikaci.

Přesto, že fágy skladované v pufru vykazovaly vyšší stabilitu, je použití preparátu ve formě gelu pro zamýšlený typ léčby mnohem vhodnější. V závěru lze proto říct, že karbomerový gel se jako nosič pro fága 812 osvědčil, ideální skladování tohoto preparátu by bylo ve tmě při čtyřech stupních, ačkoliv i při pokojové teplotě si preparát zachoval dobrou stabilitu. Pro fága P68 se karbomerový gel ukázal jako méně

## DISKUZE

---

vhodný potenciální nosič a v budoucnu bude třeba testovat jiné polotuhé lékové formy, které ideálně nebudou mít aniontovou povahu.

## 8 Souhrn

Hlavním cílem diplomové práce bylo přispět k objasnění mechanismu synergického efektu fágů a antibiotik inhibujících proteosyntézu. Bylo tak učiněno testováním hypotézy, že za synergii je zodpovědné potlačení exprese proteinů, které bakterii poskytují rezistenci k fágům. Pro tyto účely byl připraven systém zahrnující kmen *S. aureus* citlivý k fágu a jeho lyzogen se známým původem rezistence, na kterém byla testována antibiotika s různým mechanismem inhibice proteosyntézy.

Nejprve byly přenášeny charakterizované profágy z klinických kmenů MRSA NRL Atb 244 a NRL Atb 2650/09, které vykazovaly rezistenci k fágům. Získané lyzogeny však rezistenci k fágům nevykazovaly, z čehož vyplývá, že tato rezistence byla kódovaná jinými elementy, např. neindukovatelnými profágy. Jako další zdroj rezistence byl použit profág 53 kódující PdpSau protein, jež poskytuje popsanou rezistenci k fágu 812 prostřednictvím abortivní infekce. Byl připraven a testován systém laboratorního kmene 1039 a jeho lyzogenu 1039(53<sup>+</sup>), a také klinický kmen MRSA E48, který profága 53 přirozeně obsahuje.

Byla pozorována synergická interakce fága 812 a chloramfenikolu při eradikaci kmene E48, nicméně u uměle připraveného lyzogenního kmene 1039(53<sup>+</sup>) byl pozorován naopak antagonismus. Vysvětlením může být zásadní rozdíl v biologii klinického a mutagenezí připraveného laboratorního kmene, která se může projevovat odlišnou interakcí s fágem a/nebo s antibiotikem. Nulový či negativní vliv použitých antibiotik na schopnost propagace fága 812 byl potvrzen u lyzogenu 1039(53<sup>+</sup>) pomocí stanovení růstové křivky fága. Naproti tomu stanovení růstové křivky fága v případě synergické kombinace v této práci z časových důvodů neproběhlo.

Přesto, že vliv inhibice proteinu zodpovědného za rezistenci k fágu na vznik PAS nebyl zcela jasně potvrzen, poukázala tato práce na esenciální dopad stechiometrie na charakter interakce fág-antibiotikum. V závislosti na vkladových poměrech docházelo u stejných kombinací buď k synergii, anebo k antagonismu. Dále bylo zjištěno, že významnou úlohu hraje i doba inkubace bakteriální kultury s antibiotikem před podáním fága, což se projevilo rozdílnou rychlostí nástupu lyze kultury.

Dalším cílem diplomové práce bylo stanovit stabilitu fága 812 a fága P68 v nosičích s potenciálním využitím při léčbě povrchových infekcí preparáty založenými na PAS. Oba terapeutické fágy 812 a P68 byly stabilní ve fágovém pufru. Avšak zatímco u fága 812 se potvrdila dobrá stabilita i v karbomerovém gelu, který je pro aplikaci na místo infekce praktičtější, fág P68 byl v gelu nestabilní. Podstatou naměřených rozdílů je pravděpodobně odlišný mechanismus infekce obou fágů, který je ovlivněn prostředím gelu. Má-li být v budoucnu použit v polotuhých lékových formách i fág P68, bylo by zapotřebí najít vhodnější nosič.

Tato práce přispěla k vývoji terapeutických preparátů, využívajících synergických interakcí mezi fágy a antibiotiky.

## 9 Summary

The main aim of this thesis was to contribute to the elucidation of the mechanism of the synergistic effect of phages and antibiotics inhibiting proteosynthesis. This was done by testing the hypothesis that suppression of the expression of bacterial proteins that confer resistance to phages is responsible for the synergy. For this purpose, a system involving a phage-susceptible *S. aureus* strain and its lysogen with a known origin of resistance was prepared and antibiotics with different mechanisms of proteosynthesis inhibition were tested.

Firstly, characterized prophages from MRSA clinical strains NRL Atb 244 and NRL Atb 2650/09, which showed resistance to phages, were transferred. However, the obtained lysogens did not show phage resistance, suggesting that this resistance was encoded by other elements, e.g. non-inducible prophages. Another source of resistance was prophage 53 encoding the PdpSau protein providing the described resistance to phage 812 via abortive infection. A system of laboratory strain 1039 and its lysogen 1039(53<sup>+</sup>), as well as a clinical strain of MRSA E48, which naturally contains prophage 53, was prepared and tested.

A synergistic interaction between phage 812 and chloramphenicol was observed in the eradication of strain E48, however, antagonism was observed in the artificially prepared lysogenic strain 1039(53<sup>+</sup>). An explanation may be the fundamental difference in the biology of the clinical and the mutagenesis-prepared laboratory strain, which may be manifested by a different interaction with the phage and/or the antibiotic. The null or negative effect of the antibiotics used on the phage 812 ability to propagate was confirmed for lysogen 1039(53<sup>+</sup>) by phage growth curve determination. In contrast, the determination of the phage growth curve in the case of the synergistic combination was not performed in this work due to time constraints.

Despite the fact that the effect of inhibition of the protein responsible for phage resistance on the development of PAS has not been clearly confirmed, this work has highlighted the essential impact of stoichiometry on the nature of the phage-antibiotic interaction. Depending on the insertion ratios, either synergy or antagonism occurred for the same combinations. Furthermore, the incubation time of the bacterial culture with the antibiotic prior to phage addition was found to play an important role, which was reflected by the different rates of onset of culture lysis.

Another aim of this thesis was to determine the stability of phages 812 and P68 in carriers with potential use in the treatment of surface infections by PAS-based preparations. Both therapeutic phages 812 and P68 were stable in phage buffer. However, while phage 812 was confirmed to be well stable even in carbomer gel, which is more practical for application to the site of infection, phage P68 was unstable in gel. The differences observed are probably due to the different infection mechanism of the used phages, which is influenced by the gel environment. If phage P68 is

intended to be used in semi-solid drug forms, it would be advisable to find a more suitable carrier.

This work has contributed to the development of therapeutic formulations benefiting from synergistic interactions between phages and antibiotics.

## Použité zdroje

- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: A better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W16-21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
- Bauman, R. W. (2004). *Microbiology*. Pearson/Benjamin Cummings.
- Botka, T., Pantůček, R., Mašlaňová, I., Benešík, M., Petráš, P., Růžičková, V., Havlíčková, P., Varga, M., Žemličková, H., Koláčková, I., Florianová, M., Jakubů, V., Karpíšková, R., & Doškař, J. (2019). Lytic and genomic properties of spontaneous host-range Kayvirus mutants prove their suitability for upgrading phage therapeutics against staphylococci. *Scientific Reports*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41868-w>
- Carbol, J., Tan, P. I., Varma, Y., & Osborne, D. W. (2018). Formulating Topical Products Containing Live Microorganisms as the Active Ingredient. *Pharmaceutical Technology*, 42(3), 32–36.
- Comeau, A. M., Tétart, F., Trojet, S. N., Prère, M.-F., & Krisch, H. M. (2007). Phage-Antibiotic Synergy (PAS):  $\beta$ -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLOS ONE*, 2(8), e799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>
- Deghorain, M., & Van Melderren, L. (2012). The Staphylococci Phages Family: An Overview. *Viruses*, 4(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/v4123316>
- Dickey, J., & Perrot, V. (2019). Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *PLOS ONE*, 14(1), e0209390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209390>

- Dunne, M., Hupfeld, M., Klumpp, J., & Loessner, M. J. (2018). Molecular Basis of Bacterial Host Interactions by Gram-Positive Targeting Bacteriophages. *Viruses*, *10*(8), 397. <https://doi.org/10.3390/v10080397>
- Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P.-J., & Brouns, S. J. J. (2022). Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *46*(1), fuab048. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048>
- Erythromycin* -. (b.r.). Získáno 1. květen 2023, z <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/substance/erythromycin73393114078>
- Eyler, R. F., & Shvets, K. (2019). Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *14*(7), 1080. <https://doi.org/10.2215/CJN.08140718>
- Firth, N., Jensen, S. O., Kwong, S. M., Skurray, R. A., & Ramsay, J. P. (2018). Staphylococcal Plasmids, Transposable and Integrative Elements. *Microbiology Spectrum*, *6*(6), 6.6.06. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0030-2018>
- Gentamicin Sulfate*. (b.r.). Získáno 1. květen 2023, z <https://phytotechlab.com/gentamicin-sulfate.html>
- Gu Liu, C., Green, S. I., Min, L., Clark, J. R., Salazar, K. C., Terwilliger, A. L., Kaplan, H. B., Trautner, B. W., Ramig, R. F., & Maresso, A. W. (2020). Phage-Antibiotic Synergy Is Driven by a Unique Combination of Antibacterial Mechanism of Action and Stoichiometry. *mBio*, *11*(4), e01462-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01462-20>
- Hofslí, E., & Nissen-Meyer, J. (1989). Reversal of drug resistance by erythromycin: Erythromycin increases the accumulation of actinomycin D and doxorubicin in

## SUMMARY

---

multidrug-resistant cells. *International Journal of Cancer*, 44(1), 149–154.

<https://doi.org/10.1002/ijc.2910440126>

Hrebík, D., Štveráková, D., Škubník, K., Füzik, T., Pantůček, R., & Plevka, P. (2019).

Structure and genome ejection mechanism of Staphylococcus aureus phage P68. *Science Advances*, 5(10), eaaw7414.

<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw7414>

Chaves, B. J., & Tadi, P. (2023). Gentamicin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557550/>

Chhibber, S., Kaur, T., & Sandeep Kaur, null. (2013). Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: Effective treatment in eliminating methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from diabetic foot infections. *PloS One*, 8(2), e56022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056022>

Chiang, Y. N., Penadés, J. R., & Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathogens*, 15(8), e1007878. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007878>

Chukwudi, C. U. (2016). RRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 4433–4441. <https://doi.org/10.1128/AAC.00594-16>

Jimenez, J. J., Arimura, G. K., Abou-Khalil, W. H., Isildar, M., & Yunis, A. A. (1987). Chloramphenicol-Induced Bone Marrow Injury: Possible Role of Bacterial Metabolites of Chloramphenicol. *Blood*, 70(4), 1180–1185. <https://doi.org/10.1182/blood.V70.4.1180.1180>

Jo, A., Ding, T., & Ahn, J. (2016). Synergistic antimicrobial activity of bacteriophages and antibiotics against Staphylococcus aureus. *Food Science and Biotechnology*, 25(3), 935–940. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0153-0>

- Kamal, F., & Dennis, J. J. (2015). Burkholderia cepacia Complex Phage-Antibiotic Synergy (PAS): Antibiotics Stimulate Lytic Phage Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(3), 1132–1138. <https://doi.org/10.1128/AEM.02850-14>
- Kaur, S., Harjai, K., & Chhibber, S. (2012). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(23), 8227–8233. <https://doi.org/10.1128/AEM.02371-12>
- Kever, L., Hardy, A., Luthe, T., Hünnefeld, M., Gätgens, C., Milke, L., Wiechert, J., Wittmann, J., Moraru, C., Marienhagen, J., & Frunzke, J. (2022). Aminoglycoside Antibiotics Inhibit Phage Infection by Blocking an Early Step of the Infection Cycle. *MBio*, *13*(3), e0078322. <https://doi.org/10.1128/mbio.00783-22>
- Kim, M., Jo, Y., Hwang, Y. J., Hong, H. W., Hong, S. S., Park, K., & Myung, H. (2018). Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(22), e02085-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02085-18>
- Kirby, A. E. (2012). Synergistic action of gentamicin and bacteriophage in a continuous culture population of Staphylococcus aureus. *PLoS One*, *7*(11), e51017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051017>
- Kumaran, D., Taha, M., Yi, Q., Ramirez-Arcos, S., Diallo, J.-S., Carli, A., & Abdelbary, H. (2018). Does Treatment Order Matter? Investigating the Ability of Bacteriophage to Augment Antibiotic Activity against Staphylococcus aureus Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00127>
- Kuntová, L., Mašlaňová, I., Obořilová, R., Šimečková, H., Finstrlová, A., Bárďy, P., Šiborová, M., Troianovska, L., Botka, T., Gintar, P., Šedo, O., Farka, Z., Doškač, J., &

- Pantůček, R. (2023). Staphylococcus aureus Prophage-Encoded Protein Causes Abortive Infection and Provides Population Immunity against Kayviruses. *MBio*, e0249022. <https://doi.org/10.1128/mbio.02490-22>
- Kupczok, A., Neve, H., Huang, K. D., Hoepfner, M. P., Heller, K. J., Franz, C. M. A. P., & Dagan, T. (2018). Rates of Mutation and Recombination in Siphoviridae Phage Genome Evolution over Three Decades. *Molecular Biology and Evolution*, 35(5), 1147–1159. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy027>
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), Art. 5. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- McCallin, S., Sarker, S. A., Sultana, S., Oechslin, F., & Brüssow, H. (2018). Metagenome analysis of Russian and Georgian Pyophage cocktails and a placebo-controlled safety trial of single phage versus phage cocktail in healthy Staphylococcus aureus carriers. *Environmental Microbiology*, 20(9), 3278–3293. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14310>
- McMurry, L., & Levy, S. B. (1978). Two transport systems for tetracycline in sensitive Escherichia coli: Critical role for an initial rapid uptake system insensitive to energy inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14(2), 201–209. <https://doi.org/10.1128/AAC.14.2.201>
- Nováček, J., Šiborová, M., Benešík, M., Pantůček, R., Doškař, J., & Plevka, P. (2016). Structure and genome release of Twort-like Myoviridae phage with a double-layered baseplate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(33), 9351–9356. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605883113>

- Pandey, S., Chachra, D., Chandra, M., & Saxena, H. (2013). Protein profiling and physico-chemical characterization of an isolated phage against *Brucella abortus* Strain 19. *African journal of microbiology research*, 7, 1233–1238.  
<https://doi.org/10.5897/AJMR12.1301>
- Pongs, O., Bald, R., & Erdmann, V. A. (1973). Identification of Chloramphenicol-Binding Protein in *Escherichia coli* Ribosomes by Affinity Labeling\*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(8), 2229–2233.
- Ram, G., Chen, J., Ross, H. F., & Novick, R. P. (2015). An insight into staphylococcal pathogenicity island-mediated interference with phage late gene transcription. *Bacteriophage*, 5(2), e1028608.  
<https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1028608>
- Rao, F., Short, F. L., Voss, J. E., Blower, T. R., Orme, A. L., Whittaker, T. E., Luisi, B. F., & Salmond, G. P. C. (2015). Co-evolution of quaternary organization and novel RNA tertiary interactions revealed in the crystal structure of a bacterial protein–RNA toxin–antitoxin system. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9529–9540.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv868>
- Sanga, B., & Kharel, M. K. (2022). Chloramphenicol. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00349-3>
- Stepán, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Rosypal, S., Hájek, V., & Doskar, J. (2001). Identification of *Staphylococcus aureus* based on PCR amplification of species specific genomic 826 bp sequence derived from a common 44-kb *Sma* I restriction fragment. *Molecular and Cellular Probes*, 15(5), 249–257.  
<https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0368>

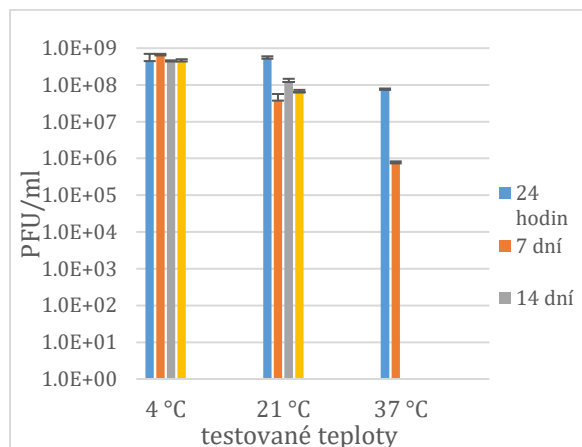
## SUMMARY

---

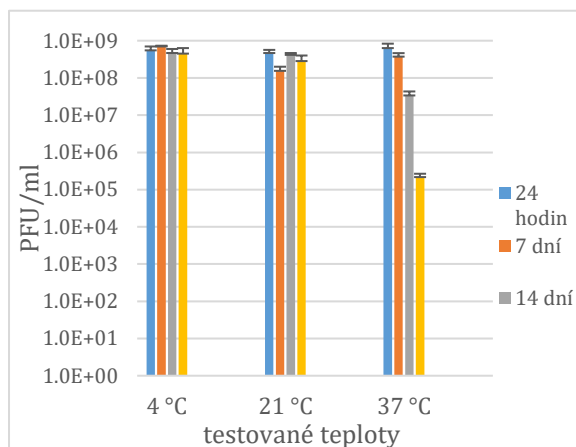
- Weisblum, B. (1998). Macrolide resistance. *Drug Resistance Updates*, 1(1), 29–41.  
[https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(98\)80212-4](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80212-4)
- Wolfe, A. D., & Hahn, F. E. (1965). Mode of action of chloramphenicol IX. Effects of chloramphenicol upon a ribosomal amino acid polymerization system and its binding to bacterial ribosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 95(1), 146–155. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(65\)90219-4](https://doi.org/10.1016/0005-2787(65)90219-4)
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.-Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A. N., & Alva, V. (2018). A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *Journal of Molecular Biology*, 430(15), 2237–2243.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.007>
- Zin, N. M., Al-shaibani, M. M., Jalil, J., Sukri, A., Al-Maleki, A. R., & Sidik, N. M. (2020). Profiling of gene expression in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in response to cyclo-(l-Val-l-Pro) and chloramphenicol isolated from *Streptomyces* sp., SUK 25 reveals gene downregulation in multiple biological targets. *Archives of Microbiology*, 202(8), 2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01896-x>
- Zuo, P., Yu, P., & Alvarez, P. J. J. (2021). Aminoglycosides Antagonize Bacteriophage Proliferation, Attenuating Phage Suppression of Bacterial Growth, Biofilm

Formation, and Antibiotic Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*,  
87(15), e0046821. <https://doi.org/10.1128/AEM.00468-21>

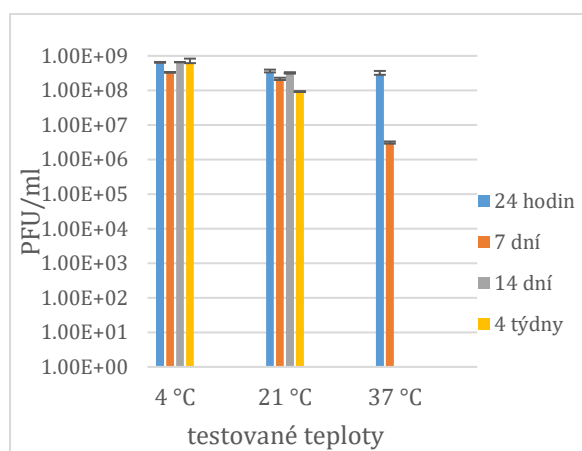
## Příloha A Výsledky testování stability fágů 812 a p68 v tekutém a v polotuhém přípravku



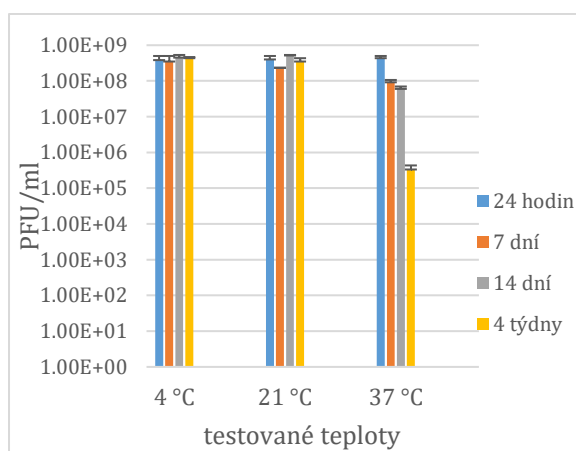
**Obrázek 66: Stabilita fága 812 v 1 % karbomerovém gelu ve třech různých teplotách (1. replikát)**



**Obrázek 67: Stabilita fága 812 ve fágovém pufru ve třech různých teplotách (1. replikát)**

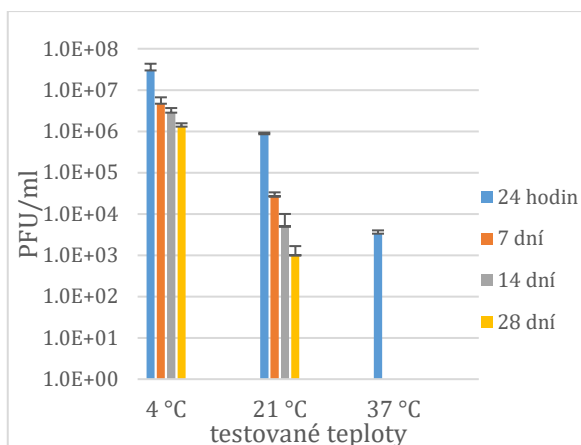


**Obrázek 68: Stabilita fága 812 v 1 % karbomerovém gelu ve třech různých teplotách (2. replikát)**

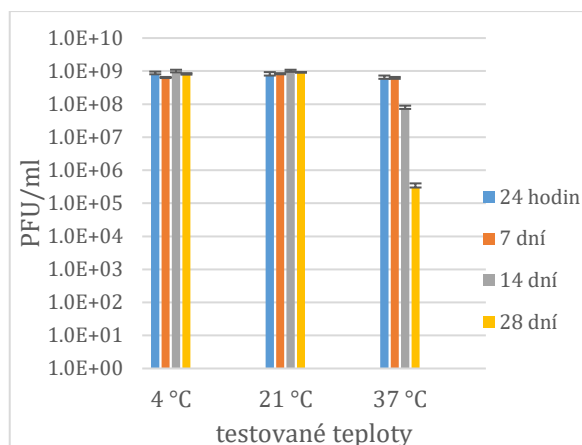


**Obrázek 69: Stabilita fága 812 ve fágovém pufru ve třech různých teplotách (2. replikát)**

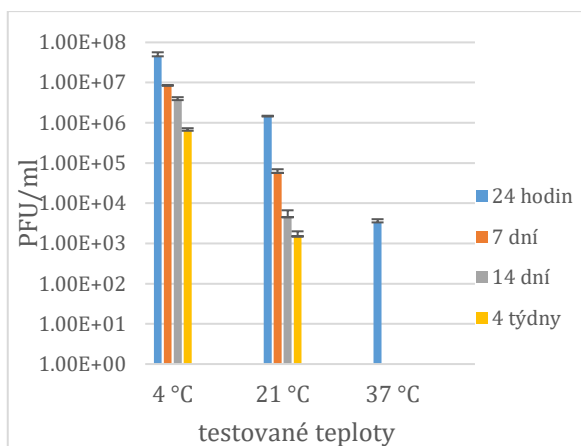
VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ STABILITY FÁGŮ 812 A P68 V TEKUTÉM A V POLOTUHÉM PŘÍPRAVKU



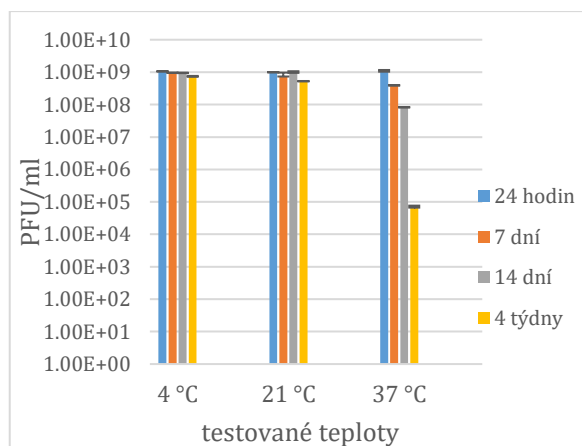
Obrázek 70: Stabilita fága P68 v 1 % karbomerovém gelu ve třech různých teplotách (1. replikát)



Obrázek 71: Stabilita fága P68 ve fágovém pufru ve třech různých teplotách (1. replikát)

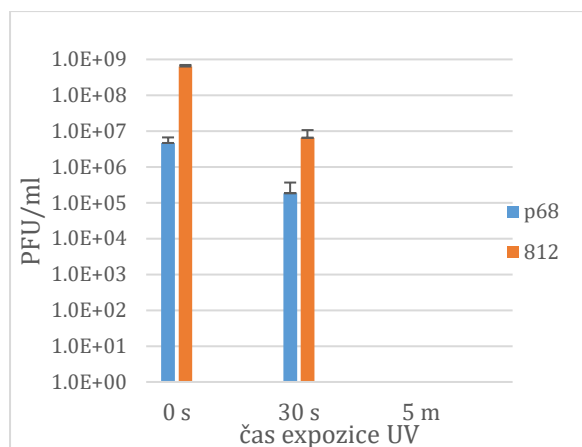


Obrázek 72: Stabilita fága P68 v 1 % karbomerovém gelu ve třech různých teplotách (2. replikát)

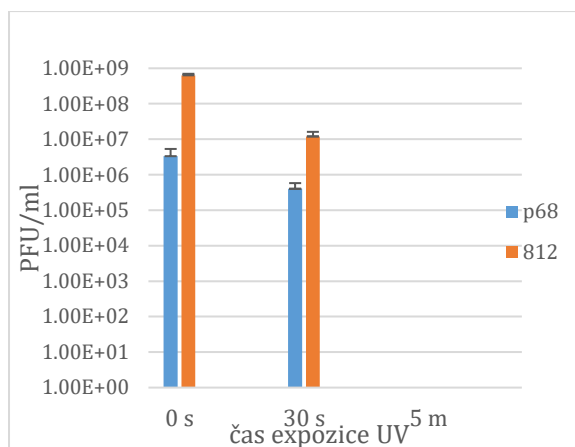


Obrázek 73: Stabilita fága P68 ve fágovém pufru ve třech různých teplotách (2. replikát)

## VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ STABILITY FÁGŮ 812 A P68 V TEKUTÉM A V POLOTUHÉM PŘÍPRAVKU



**Obrázek 74: Stabilita fágů 812 a P68 v karbomeovém gelu při vystavení UV záření (1. replikát)**



**Obrázek 75: Stabilita fágů 812 a P68 v karbomeovém gelu při vystavení UV záření (2. replikát)**

