

# Izolacija i karakterizacija bakteriofaga specifičnih za vrste *Acinetobacter baumannii* i *Escherichia coli* iz efluenta zagrebačkog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda

---

Mihaljević, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:046004>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marina Mihaljević

**Izolacija i karakterizacija bakteriofaga  
specifičnih za vrste *Acinetobacter baumannii* i  
*Escherichia coli* iz efluenta zagrebačkog  
uređaja za pročišćavanje otpadnih voda**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Marina Mihaljević

**Isolation and characterization of  
bacteriophages specific for *Acinetobacter  
baumannii* and *Escherichia coli* species from  
effluent of the Zagreb wastewater treatment  
plant**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Silvije Černi, te neposrednim voditeljstvom dr. sc. Lucije Nuskern Karaica. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

*Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Silviji Černi na vodstvu ovog diplomskog rada, pristupačnosti i velikom strpljenju. Veliko hvala dr. sc. Luciji Nuskern Karaica na neposrednom vodstvu izvedbe ovog rada, svoj strpljivosti i pristupačnosti te ugodnoj radnoj atmosferi. Veliko hvala prof. dr. sc. Mladenu Krajačiću na ideji za temu diplomskog rada, te pomoći oko uvoda ovog rada. Puno zahvaljujem prof. dr. sc. Jasni Hrenović na sakupljanju uzorka efluenta otpadne vode i ustupljenom uzorku bakterije *Acinetobacter baumannii*, bez kojih ne bih mogla izvesti ovo istraživanje, te na kratkom ustupanju svog laboratorija i opreme te na utrošenom vremenu i svojoj pomoći. Puno zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na detaljnom pregledu uzoraka transmisijskim elektronskim mikroskopom, na fotografijama, svom utrošenom vremenu, trudu i ugodnoj radnoj atmosferi. Zahvaljujem tehničarkama Barbari Novotni i Darinki Kajić na rješavanju velike količine otpadnog materijala i posuđa, na svojoj pomoći kod snalaženja u laboratoriju i ugodnoj radnoj atmosferi. Zahvaljujem svim djelatnicima zavoda za mikrobiologiju koji su stvorili ugodnu radnu atmosferu.*

*Zahvaljujem svim svojim profesorima i asistentima s PMF-a na prenesenom znanju i vještinama, te mojoj srednjoškolskoj profesorici biologije Mihaeli Marceljak Ilić, koja je pokazala koliko je biologija interesantna i logična znanost.*

*Veliko hvala mojoj obitelji na uzdržavanju i emocionalnoj potpori kroz cijelo školovanje. Puno hvala mojim prijateljima i kolegama na potpori.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Izolacija i karakterizacija bakteriofaga specifičnih za vrste *Acinetobacter baumannii* i *Escherichia coli* iz efluenta zagrebačkog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda

Marina Mihaljević

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bakteriofagi (fagi) su virusi koji inficiraju bakterije, te ih posljedično često liziraju. Širenjem antibiotske rezistencije je porastao interes za terapijsko korištenje faga, osobito kod infekcija rezistentnim sojevima patogenih bakterija, poput *Acinetobacter baumannii*. Jedna od osnovnih metoda proučavanja i izoliranja faga je uzgoj plakova na bakterijskim livadama, a različiti fagi se često razlikuju po morfologiji plakova koje stvaraju. Cilj ovog istraživanja bio je izolirati i karakterizirati fage specifične za bakteriju *A. baumannii*, te visoko zastupljenu bakteriju *Escherichia coli* iz efluenta centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. Namjera je bila proučiti plakove koje fagi stvaraju na bakterijskim livadama te fage izolirane iz plakova različite morfologije proučiti transmisivnim elektronskim mikroskopom. Uzorci eluenta obogaćeni su inkubacijom s navedenim bakterijama pri različitim temperaturama, a prisutnost faga potvrđena je konfluentnom lizom bakterijske livade te metodom čistina i plakova tehnikom nakapavanja. Fagi izolirani iz plakova, uzgojenih metodom čistina u dvostrukom agaru, umnoženi su metodom konfluentne lize bakterijske livade te im je određen titar. Na livadama *E. coli* utvrđene su četiri različite morfologije plakova iz kojih su izolirani fagi, dok fagi specifični za *A. baumannii* nisu izolirani iz testiranih uzoraka. Korištenom metodom pročišćavanja i koncentriranja uzoraka nisu dobiveni uzorci zadovoljavajuće kvalitete za karakterizaciju faga elektronskom mikroskopijom.

(89 stranica, 15 slika, 4 tablica, 96 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: plak, metoda plakova u dvostrukom agaru, terapija fagima

Voditelj: prof. dr. sc. Silvija Černi

Neposredni voditelj: Lucija Nuskern Karaica, dr. sc.

Ocjenitelji:

izv. prof. dr. sc. Silvija Černi

prof. dr. sc. Mladen Krajačić

doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 10.02.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

### Isolation and characterization of bacteriophages specific for *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* species from effluent of the Zagreb wastewater treatment plant

Marina Mihaljević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bacteriophages (phages) are viruses that infect bacteria, and consequently often lyse host cells. Interest in the therapeutic usage of phages has increased due to the spread of antibiotic resistance, especially in infections caused by resistant strains of pathogenic bacteria, such as *Acinetobacter baumannii*. One of the fundamental methods for studying and isolating phages is growing plaques on bacterial lawns, where different phages can often be distinguished by the morphology of plaques they produce. The aim of this research was to isolate and characterize phages specific for *A. baumannii* and highly abundant *Escherichia coli* from effluent of the Zagreb wastewater treatment plant; to study phage produced plaques on bacterial lawns; and to observe phages isolated from plaques of different morphology by transmission electron microscopy. Effluent samples were enriched by incubation with the mentioned bacteria at different temperatures, and the presence of phages was confirmed by both confluent lysis of bacterial lawn and combined spot and plaque assay. Phages, isolated from plaques grown by double agar overlay, were multiplied by confluent lysis of bacterial lawns and their titer was determined. Four plaques of different morphology were observed on *E. coli* bacterial lawns, from which specific phages were isolated, while phages specific for *A. baumannii* were not isolated from tested samples. The methodology used for phage purification and concentration was not of satisfactory quality for their characterization by electron microscopy.

(89 pages, 15 figures, 4 tables, 96 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: plaque, double agar overlay, phage therapy

Supervisor: Assoc. Prof. Silvija Černi

Assistant Supervisor: Lucija Nuskern Karaica, PhD.

Reviewers:

Assoc. Prof. Silvija Černi

Prof. Mladen Krajačić

Assist. Prof. Sofia Ana Blažević

Thesis accepted: 10.02.2022.

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 1.1. Bakterijska rezistencija na antibiotike – potreba za novim terapijama ..... | 1  |
| 1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....  | 3  |
| 1.2.1. Svojstva i klasifikacija.....   | 3  |
| 1.2.2. Laboratorijski uzgoj.....   | 5  |
| 1.2.3. Bolesti.....  | 5  |
| 1.2.4. Patogeneza.....   | 7  |
| 1.2.5. <i>A. baumannii</i> – značajan problem u bolnicama.....                   | 8  |
| 1.2.6. Rezistencija na antibiotike i terapija.....                               | 10 |
| 1.3. <i>Escherichia coli</i> .....   | 13 |
| 1.3.1. Svojstva i klasifikacija.....   | 13 |
| 1.3.2. Modelni organizam.....  | 15 |
| 1.3.3. Laboratorijski uzgoj.....   | 16 |
| 1.3.4. Patogeni sojevi i rezistencija na antibiotike .....                       | 16 |
| 1.4. Bakteriofagi .....  | 18 |
| 1.4.1. Osnovne činjenice i klasifikacija.....                                    | 18 |
| 1.4.2. Životni ciklus.....   | 20 |
| 1.4.3. Ekologija.....  | 21 |
| 1.4.4. Rezistencija bakterija na bakteriofage.....                               | 22 |
| 1.4.5. Tehnike uzgoja i proučavanja bakteriofaga .....                           | 23 |
| 1.4.6. Plakovi.....  | 23 |
| 1.5. Terapija fagima .....   | 26 |
| 1.5.1. Karakteristike i povijest.....  | 26 |
| 1.5.2. Izolacija faga u svrhu terapije.....                                      | 28 |
| 1.6. Bakteriofagi specifični za <i>A. baumannii</i> .....                        | 29 |
| 1.7. Bakteriofagi specifični za <i>E. coli</i> .....                             | 30 |
| 1.8. Centralni uređaj za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba .....         | 30 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....  | 31 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....  | 32 |
| 3.1. MATERIJALI .....  | 32 |
| 3.2. METODE.....   | 33 |
| 3.2.1. Priprema hranjivih medija i pufera za fage .....                          | 35 |
| 3.2.2. Priprema bakterija domaćina.....  | 36 |
| 3.2.3. Obogaćivanje uzorka – umnažanje specifičnih faga .....                    | 37 |



|  |    |
|--|----|
| 3.2.4. Preliminarno utvrđivanje prisutnosti faga .....   | 39 |
| 3.2.5. Metoda čistina i plakova tehnikom nakapavanja.....  | 39 |
| 3.2.6. Metoda plakova u dvostrukom agaru .....   | 40 |
| 3.2.7. Opisivanje plakova i izolacija bakteriofaga iz plaka.....   | 41 |
| 3.2.8. Pročišćavanje izoliranih bakteriofaga.....  | 42 |
| 3.2.9. Dodatni postupci sa svrhom izolacije faga specifičnih za <i>A. baumannii</i> .....                    | 43 |
| 3.2.10. Priprema koncentriranih suspenzija izoliranih bakteriofaga .....                                     | 44 |
| 3.2.11. Određivanje titra bakteriofaga u konačnim izolatima .....  | 45 |
| 3.2.12. Fotografiranje i mjerenje promjera plakova izoliranih faga.....                                      | 46 |
| 3.2.13. Elektronska mikroskopija izoliranih faga.....  | 47 |
| 4. REZULTATI.....  | 48 |
| 4.1. Rezultati preliminarnih pokusa.....   | 48 |
| 4.1.1. Utvrđivanje prisutnosti faga specifičnih za <i>E. coli</i> i njihova brojnost .....                   | 48 |
| 4.1.2. Utvrđivanje prisutnosti faga specifičnih za <i>A. baumannii</i> i njihova brojnost .....              | 49 |
| 4.2. Izolacija i pročišćavanje faga specifičnih za <i>E. coli</i> .....                                      | 51 |
| 4.3. Izolacija faga specifičnih za <i>A. baumannii</i> .....   | 56 |
| 4.4. Morfološke karakteristike plakova faga specifičnih za <i>E. coli</i> .....                              | 57 |
| 4.5. Zbirni rezultati izolacije bakteriofaga specifičnih za vrste <i>E. coli</i> i <i>A. baumannii</i> ..... | 61 |
| 4.6. Titar faga specifičnih za <i>E. coli</i> .....  | 62 |
| 4.7. Elektronska mikroskopija .....  | 63 |
| 5. RASPRAVA .....  | 66 |
| 6. ZAKLJUČAK .....   | 81 |
| 7. LITERATURA.....   | 82 |
| 8. ŽIVOTOPIS .....   | 89 |

## 1. UVOD

### 1.1. Bakterijska rezistencija na antibiotike – potreba za novim terapijama

Antibiotike je 1947. godine definirao S. A. Waksman kao kemijske supstance koje proizvode mikroorganizmi, a imaju sposobnost inhibiranja rasta ili uništenja bakterija i drugih mikroorganizama; danas se antibiotik može definirati i kao organska kemikalija prirodnog ili sintetskog podrijetla koja inhibira ili ubija patogene bakterije, ili kao bilo koja antimikrobna tvar, te se sve tri definicije koriste u literaturi (Mohr 2016). Antibiotici se smatraju najuspješnijim oblikom kemijske terapije u povijesti medicine, spašavajući mnogo života i doprinoseći kontroli zaraznih bolesti koje su dugo bile među glavnim uzrocima smrtnosti (Aminov 2010). Pridonijeli su produljenju očekivanog trajanja životnog vijeka čovjeka, te pomogli u sprječavanju i izlječenju bakterijskih infekcija kod pacijenata koji su podvrgnuti kompleksnim medicinskim pothvatima kao što su suvremeni kirurški zahvati i transplantacija organa, kao i kod kroničnih bolesnika (Ventola 2015). Širenje rezistencije na antibiotike stoga predstavlja veliki zdravstveni problem, te je WHO prozvao antibiotsku rezistenciju jednom od tri najvažnije prijetnje javnom zdravstvu u 21. stoljeću (Munita i Arias 2016). Procijenjeno je da će bakterijska rezistencija na antibiotike do 2050. godine uzrokovati oko 300 milijuna preranih smrti (Munita i Arias 2016).

Početak moderne ere antibiotika se smatra otkriće penicilina 1928. godine; prvi put je propisivan za liječenje bolesti u 1940-ima, a već u 1950-ima je rezistencija na ovaj antibiotik postala značajan problem. Primijećena je rezistencija na skoro sve proizvedene antibiotike, koja bi se ponekad pojavila samo nekoliko godina nakon uvođenja novog antibiotika kao terapeutika. Danas se stanje u području istraživanja novih antibiotika opisuje kao „*dry pipeline*“ („presušeni cjevovod“) zbog malog broja novorazvijenih i odobrenih antibiotika, a kao glavni razlozi se navode ekonomska neisplativost i regulatorne prepreke; također postoji svijest da će se naposljetku najvjerojatnije pojaviti rezistencija i na nove antibiotike (Ventola 2015).

Antibiotici imaju više različitih mehanizama djelovanja na bakterije, gdje im glavna „meta“ djelovanja može biti: DNA replikacija, transkripcija, translacija, C1-metabolizam, stanična membrana ili biosinteza peptidoglikana (Davies i Davies 2010).

Bakterije su razvile mnogo različitih mehanizama rezistencije, koji su svrstani u nekoliko glavnih skupina ovisno o biokemijskom putu kojim se postiže rezistencija: 1) modifikacija antimikrobne molekule, 2) sprečavanje antimikrobne tvari u dosezanju ciljnog mjesta unutar bakterije, tako što se sprečava ulazak tvari u bakteriju ili se antibiotik aktivno izbacuje iz bakterijske stanice, 3) kemijske promjene ciljnog mjesta („mete“) antibiotika, povećana proizvodnja „mete“ antibiotika ili zamjena ciljne molekule drugom molekulom iste funkcije, 4) rezistencija uzrokovana

globalnim adaptivnim promjenama unutar stanice. Rezistencija na neku skupinu antibiotika se može postići kroz više različitih mehanizama, te bakterija može koristiti više različitih mehanizama protiv jednog antibiotika (Munita i Arias 2016).

Rezistencija na antibiotike se može razviti kao posljedica mutacijskih adaptacija, promjena u ekspresiji gena, te stjecanja genetičkog materijala od drugih bakterija horizontalnim transferom gena (Munita i Arias 2016). Horizontalni transfer gena (HGT) se može postići preko tri različita mehanizma: transformacija kompetentnih bakterija slobodnom DNA, transdukcija posredovana bakteriofagima, te konjugacija. Svi navedeni mehanizmi HGT-a se s određenom učestalošću događaju u prirodi (Peterson i Kaur 2018). Bakterije su sposobne održavati i prenositi gene za rezistenciju u sklopu mobilnih genetičkih elemenata: plazmida, transpozona i integrona (Sultan i sur. 2018).

Smatra se da postoji kontinuum gena za rezistenciju kod bakterija koje proizvode antibiotike (rezistencija na vlastite antibiotike), okolišnih bakterija i patogenih bakterija, te se skup svih gena za rezistenciju nađenih u mikroorganizmima nazivaju rezistom (Peterson i Kaur 2018). Izvorni geni okolišnih bakterija ne moraju imati ulogu u antibiotskoj rezistenciji u prirodnom okolišu, dok ulaskom u mikrobiom ljudi ili životinja može doći do njihove selekcije antibioticima i širenja među bakterijama (Aminov 2010). Ljudska populacija je uzrokovala suvremeni problem antibiotske rezistencije različitim aktivnostima, poput prekomjernog korištenja antibiotika (pogotovo u zemljama gdje njihovo korištenje nije dobro regulirano), pogrešnog propisivanja antibiotika (propisivanje nepotrebnih antibiotika, terapija pogrešnog trajanja), raširenog korištenja antibiotika u poljoprivredi, prvenstveno kod prehrambenih životinja kao dodatak za rast i preventivu protiv bolesti (rezistentne vrste bakterija prisutne kod tretiranih životinja se mogu dalje proširiti na ljude i okoliš)(Ventola 2015). Kanalizacija, postrojenja za obradu otpadnih voda, otpadne vode bolnica, akvakultura, poljoprivredni otpadi i otpadi klaonice se smatraju „vrućim točkama“ razmjene genetskog materijala zbog visoke koncentracije bakterija, plazmida i faga. Utjecaj u takvim okolišima mogu imati i subinhibitorne koncentracije antibiotika, metala i toksičnih tvari koje stvaraju selektivni pritisak i mogu potaknuti kompetentnost bakterije na transformaciju i aktivaciju profaga, odnosno potaknuti transdukciju (Peterson i Kaur 2018).

Kad se karakterizira šira rezistencija bakterija na antibiotike, najvažniji pojmovi su: višestruko rezistentne (MDR – *multidrug-resistant*) bakterije, ekstenzivno rezistentne (XDR – *extensively drug-resistant*) bakterije, pan-rezistentne (PDR – *pandrug-resistant*) bakterije (Magiorakos i sur. 2012), te se ponekad spominju potpuno rezistentni sojevi (*fully drug-resistant*) kao ne-istoznačnica sa pan-rezistentnim sojevima (Wang i Qin 2019). U medicinskoj literaturi se koriste mnoge različite definicije za MDR, XDR i PDR bakterije, zbog čega se pokušalo razviti standardizirane internacionalne definicije: višestruka rezistencija (MDR) se definira kao stečena

neosjetljivost na barem jedan agens iz tri ili više kategorija antimikrobiotika, ekstenzivna rezistentcija (XDR) kao neosjetljivost na barem jedan agens u svim osim dvije (ili manje) kategorije antimikrobiotika (što znači da su osjetljivi na samo jednu ili dvije kategorije antimikrobiotika), a pan-rezistencija (PDR) se definira kao neosjetljivost na sve agense u svim kategorijama antimikrobiotika (Magiorakos i sur. 2012).

Bakterije koje najčešće uzrokuju teže infekcije rezistentnim sojevima nazivaju se zajedničkim imenom (akronimom) ESKAPE bakterije, a to su: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, te *Enterobacter* spp. (Gordillo Altamirano i Barr 2019).

Širenjem rezistencije na antibiotike zdravstveno stanje u svijetu se sve više približava tzv. „postantibiotskoj eri“, stoga se predlaže poticanje istraživanja novih antibiotika, kao i istraživanje novih, ali i napuštenih alternativnih terapija, u koje spada terapija fagima (Gordillo Altamirano i Barr 2019).

## 1.2. *Acinetobacter baumannii*

### 1.2.1. Svojstva i klasifikacija

Bakterija *Acinetobacter baumannii* je Gram-negativna, striktno aerobna (katalaza-pozitivna i oksidaza-negativna), nepomična, nefermentirajuća bakterija (Peleg i sur. 2008). Bakterije iz roda *Acinetobacter* su širine 1,0-1,5 µm i duljine 1,5-2,5 µm (Almasaudi 2018), te su po obliku kokobacili (Peleg i sur. 2008, Howard i sur. 2012). Bakterije *A. baumannii* imaju sposobnost *quorum-sensing*-a, gdje bakterija može osjetiti gustoću bakterija u svojoj blizini zbog akumulacije signalnih molekula, te posljedično specifično reagirati – smatra se da taj fenomen može kontrolirati stvaranje biofilma (Dijkshoorn i sur. 2007), koji pomaže preživljavanju bakterije na živim i neživim površinama (Howard i sur. 2012, Asif i sur. 2018).

Bakterija *A. baumannii* je klasificirana u koljeno Proteobacteria, razred Gammaproteobacteria, red Pseudomonadales, porodicu Moraxellaceae, te rod *Acinetobacter* (Almasaudi 2018).

Bakterija *A. baumannii* je po fenotipskim svojstvima teško razdvojiva od nekoliko vrsta iz istog roda, uključujući vrstu *A. calcoaceticus*, stoga se ta skupina bakterija naziva *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks (Dijkshoorn i sur. 2007, Peleg i sur. 2008). U taj kompleks su ranije svrstavane četiri vrste: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* genomski vrsta 3 i *Acinetobacter* genomski vrsta 13TU (Dijkshoorn i sur. 2007, Peleg i sur. 2008, Howard i sur. 2012, Vijayakumar i sur. 2019). Kasnije je *Acinetobacter* genomski vrsta 3 preimenovana u *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter* genomski vrsta 13TU preimenovana u *Acinetobacter nosocomialis*, te su u skupinu (kompleks) dodane još dvije vrste: *Acinetobacter seifertii* (prije poznata kao genomski

vrsta bliska 13TU) i *Acinetobacter dijkschoorniae*, koja je blisko srodna s *A. pittii* (Vijayakumar i sur. 2019). Bakterija *A. calcoaceticus* je okolišna vrsta, često izolirana iz uzoraka tla i vode, za koju se smatra da nije nikada izazvala teške kliničke bolesti (Peleg i sur. 2008), te ju neki nazivaju nepatogenom vrstom (Jung i Park 2015, Vijayakumar i sur. 2019), odnosno navode ju kao vrstu koja je rijetko povezana sa bolesti (Vijayakumar i sur. 2019). Ostale vrste koje se nalaze u ovom kompleksu (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* i *A. dijkschoorniae*) su klinički značajne, pogotovo *A. baumannii*, *A. pittii* i *A. nosocomialis*. Bakterija *A. baumannii* je najznačajnija vrsta ovog kompleksa, te se smatra da je uzrok 80% oboljelih od infekcije bakterijom iz tog kompleksa (Vijayakumar i sur. 2019). Pošto vrsta *A. calcoaceticus* nije klinički značajna, neki smatraju da je sam naziv kompleksa zavaravajući ili neprimjeren (Peleg i sur. 2008, Howard i sur. 2012). Zbog poteškoća u razlikovanju vrsta *A. baumannii*, *A. pittii* i *A. nosocomialis*, koje se može sa sigurnošću postići jedino molekularnim metodama (Vijayakumar i sur. 2019), infekcije uzrokovane bilo kojom od navedene tri vrste često su se dijagnosticirale kao infekcije uzrokovane bakterijom *A. baumannii* (Dijkshoorn i sur. 2007), te ih neki iz tog razloga, poput Dijkshoorn i sur. (2007), nazivaju *A. baumannii* u širem smislu. Danas se ističe važnost točne identifikacije vrste, s obzirom da ove različite vrste imaju različitu epidemiologiju, patogenost i rezistenciju na antibiotike (Chen i sur. 2014, Vijayakumar i sur. 2019), te vrsta *A. baumannii* izaziva drugačiju, često težu kliničku sliku i pokazuje veći spektar rezistencije (Chen i sur. 2014).

U prošlosti je *A. baumannii* opisana kao organizam koji živi u tlu, ali se najvjerojatnije radilo o pogrešnom zaključku zbog drugih vrsta ovoga roda koje jesu izolirane iz tla i vode (Dijkshoorn i sur. 2007), poput okolišne vrste *A. calcoaceticus* (Peleg i sur. 2008). Smatra se da je *A. baumannii* rijetka u okolišu (Dijkshoorn i sur. 2007), ali je važan uzročnik bolničkih infekcija u svijetu (Wang i Qin 2019). Postoje rijetki sigurni izolati *A. baumannii* iz okoliša, poput uzoraka tla u Hong-Kongu ili uzoraka povrća u Velikoj Britaniji, ali se i dalje smatra da *A. baumannii* nije tipični okolišni organizam (Peleg i sur. 2008). Bakterija *A. baumannii* je prvenstveno povezana sa zdravstvenim ustanovama (Howard i sur. 2012). Ipak, *A. baumannii* se može proširiti u okoliš iz bolničkog okruženja, te je dokazana prisutnost klinički važnih izolata u otpadnim vodama bolnica, postrojenjima za obradu otpadnih voda, te prirodnom riječnom sustavu rijeke Seine u Francuskoj i u rijeci Savi u Hrvatskoj (Dekić i sur. 2018); također je izoliran i soj *A. baumannii* srodan kliničkom izolatu iz kiselog paleosola u Hrvatskoj, te je pretpostavka da je povezan s ilegalnim odlaganjem krutog otpada (Seruga Music i sur. 2017). Širenje klinički važnih sojeva u okoliš predstavlja moguću opasnost od širenja zaraze (Dekić i sur. 2018). Bakterije iz roda *Acinetobacter* su dio mikrobiote ljudske kože (Peleg i sur. 2008), ali čini se da je vrsta *A. baumannii* rijetko njen dio (Peleg i sur. 2008, Howard i sur. 2012). Bakterija *A. baumannii* je izolirana sa ruku medicinskih

radnika (Dijkshoorn i sur. 2007, Peleg i sur. 2008, Wang i Qin 2019), što predstavlja mogući način širenja infekcije u bolnicama (Dijkshoorn i sur. 2007).

Bakterija *A. baumannii* je nosokomijalni patogen kojeg karakterizira sve jače širenje višestruke rezistencije na antibiotike (Dijkshoorn i sur. 2007, Peleg i sur. 2008, Howard i sur. 2012, García-Quintanilla i sur. 2013, Wang i Qin 2019).

### 1.2.2. Laboratorijski uzgoj

Bakterija *A. baumannii* se tipično uzgaja na LB-mediju, te se mogu koristiti i mnogi drukčiji hranjivi mediji poput triptičnog sojinog bujona (Jacobs i Zurawski 2014), triptičnog sojinog agara, krvnog agara (Peleg i sur. 2008), čokoladnog agara i dr. (Asif i sur. 2018). Različiti sojevi *A. baumannii* su sposobni koristiti, osim šećera, i druge različite ugljikove spojeve kao jedini izvor ugljika, poput aminokiselina, masnih kiselina i različitih intermedijarnih spojeva Krebsovog ciklusa. Može se umnažati u rasponu temperature od 15 °C do 44 °C, te u rasponu pH od 4,0 do 8,0, iako se neutralni pH smatra najpogodnijim (Jacobs i Zurawski 2014). Dobro se umnaža na temperaturi od 37 °C (Peleg i sur. 2008), te se ta temperatura koristi u preporučenim protokolima uzgoja ove vrste (Jacobs i Zurawski 2014). Može preživjeti na 4 °C, zbog čega se ploče koje ih sadrže mogu čuvati u hladnjaku; pohranjuje se u obliku zamrznute kulture unutar 25-40% glicerola pri -80 °C (Jacobs i Zurawski 2014). Na LB-agaru stvara bijele, neprozirne, mukoidne kolonije okruglog oblika (Jacobs i Zurawski 2014), veličine 1,5-3 mm nakon prekoćne inkubacije (Peleg i sur. 2008). Bakterija *A. baumannii* je patogen biosigurnosne razine 2 (Jacobs i Zurawski 2014).

### 1.2.3. Bolesti

Patogena bakterija *A. baumannii* najčešće uzrokuje bolesti u imunokompromitiranih pacijenata i pacijenata koji dulje borave u bolnici, pogotovo na odjelu intenzivne njege, gdje često izaziva bolničke epidemije (Howard i sur. 2012, Almasaudi 2018). Rizičnom skupinom se smatraju, osim imunokompromitiranih i kronično bolesnih pacijenata bolnica, i pacijenti kojima su potrebni kateteri, uređaji za mehaničko disanje, te ljudi koji su prošli kroz postupak dijalize ili primali antimikrobnu terapiju unutar zadnjih 90 dana (Howard i sur. 2012). Osim u bolnicama, *A. baumannii* je uzročnik i epidemija izvan bolnice (tzv. *community-acquired*), uglavnom u tropskim krajevima (Dijkshoorn i sur. 2007, Peleg i sur. 2008). Dijelovi tijela koji mogu biti kolonizirani ili inficirani ovom bakterijom su: dišni putevi, pleuralna tekućina, krv, urinarni trakt, kirurške rane, koža, oči i središnji živčani sustav (Howard i sur. 2012). Infekcija bakterijom *A. baumannii* može uzrokovati pneumoniju stečenu u bolnici (Peleg i sur. 2008), infekcije krvotoka, infekcije (traumatskih) rana, infekcije urinarnog trakta, meningitis, endokarditis, endoftalmitis, keratitis (Peleg i sur. 2008), bronhiolitis i traheobronhitis stečene u zajednici (Asif i sur. 2018), te

pneumoniju stečenu u zajednici (engl. *community-acquired pneumonia*) (Peleg i sur. 2008). Najčešće bolesti uzrokovane infekcijom *A. baumannii* su pneumonija povezana s uređajem za mehaničko disanje i infekcija krvotoka (Dijkshoorn i sur. 2007). Pneumonija stečena u bolnici je najčešće povezana s infekcijom preko uređaja za mehaničko disanje (Dijkshoorn i sur. 2007, Peleg i sur. 2008, Howard i sur. 2012). Infekcije krvi su najčešće uzrokovane pneumonijom, urinarnom infekcijom ili infekcijom rane (Peleg i sur. 2008). Smatra se da pneumonija povezana s mehaničkom ventilacijom i infekcije krvotoka imaju veliku stopu smrtnosti, do 52% (Dijkshoorn i sur. 2007). Urinarne infekcije su najčešće uzrokovane infekcijom preko koloniziranog katetera (Peleg i sur. 2008), te se smatra da uglavnom imaju blažu kliničku sliku (Dijkshoorn i sur. 2007). Infekcije rana bakterijom *A. baumannii* su česte kod opekline, te su bile česte kod borbenih rana stečenih u Iraku i Afganistanu (Peleg i sur. 2008), zbog čega je *A. baumannii* dobila nadimak „*Iraqibacter*” (Howard i sur. 2012, Lee i sur. 2017). Smatra se da je do širenja bakterija u ratnim područjima došlo u poljskim bolnicama i zdravstvenim ustanovama. Nosokomijalno širenje infekcija rana bakterijom *A. baumannii* znalo se događati, osim pri katastrofama uzrokovanim ljudskim djelovanjem i ratovanjem, i nakon prirodnih katastrofa poput potresa (Dijkshoorn i sur. 2007). Meningitis uzrokovan infekcijom *A. baumannii* je najčešći u pacijenata koji su imali neurološku operaciju i imaju ventrikularni dren, te je često uzrokovan bakterijom višestruko rezistentnom na antibiotike. Smatra se da bi takav oblik meningitisa mogao imati mortalitet i do 70%, iako je to teško odrediti sa sigurnošću (Peleg i sur. 2008). Endokarditis uzrokovan infekcijom *A. baumannii* je rijedak, te je najčešće povezan sa umjetnim zaliscima (Peleg i sur. 2008). Endoftalmitis i keratitis su ponekad povezani s korištenjem leća ili operacijom oka (Peleg i sur. 2008). Bakterija *A. baumannii* može kolonizirati mjesto traheostomije u djece i imunokompromitiranih odraslih osoba, te dovesti do bronhiolitisa i traheobronhitisa (Asif i sur. 2018). Pneumonija stečena u zajednici se pojavljivala u tropskim područjima Azije i Australije, uglavnom za vrijeme kišne sezone, i to u ljudi s poviješću pretjerane konzumacije alkohola (Peleg i sur. 2008), ili s drugim zdravstvenim stanjima poput pušenja, kronične obstruktivne pulmonarne bolesti i dijabetes mellitusa (Dijkshoorn i sur. 2007). Pneumonija stečena u zajednici ima veliku incidenciju razvoja bakteremije, te veliku stopu mortaliteta od 40-64% (Dijkshoorn i sur. 2007).

Težina oboljenja uzrokovanih infekcijom *A. baumannii*, prognoza toka bolesti i stopa smrtnosti diskutabilni su zbog prvotnih bolesti od kojih su pacijenti postali podložni infekciji ovom bakterijom i zbog koje već imaju lošu prognozu, te neki istraživači navode da infekcija nema velikog utjecaja na povećanje smrtnosti, dok drugi ukazuju na veliko povećanje stope smrtnosti (Dijkshoorn i sur. 2007). Postoji mogućnost da je razlika u težini bolesti zapravo uzrokovana nerazlikovanjem infekcije *A. baumannii* od infekcije vrstama *A. nosocomialis* ili *A. pittii*, koje mogu imati blažu kliničku sliku (Chen i sur. 2014, Vijayakumar i sur. 2019).

#### 1.2.4. Patogeneza

Patogenost *A. baumannii* potječe od različitih faktora koji imaju različite uloge, kao što su: stvaranje biofilma, kolonizacija domaćina, prianjanje bakterije uz stanice domaćina, uništavanje stanica domaćina, izbjegavanje imunološkog odgovora, preživljavanje u tkivima domaćina i dr. (Lee i sur. 2017). Smatra se da *A. baumannii* ima relativno malu sposobnost prianjanja uz stanice domaćina u usporedbi sa drugim patogenima (poput *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori* itd.), te da stoga ima manju virulenciju, ali ima dobro razvijenu sposobnost prianjanja uz plastične abiotičke površine (poput intravaskularnih uređaja) zbog hidrofobne površine (Asif i sur. 2018).

Neki od faktora virulencije identificirani u vrste *A. baumannii* su: porini (uključujući OmpA), pili, kapsularni polisaharidi, lipopolisaharidi (LPS), fosfolipaze, proteaze, vezikule vanjske membrane (engl. *outer membrane vesicles*, OMV), sustavi za pribavljanje metala (željeza, cinka i mangana), sustavi za sekreciju proteina (engl. *protein secretion system*, II, V i VI), penicilin-vezujući protein 7/8 (engl. *penicillin-binding protein 7/8* – PBP7/8),  $\beta$ -laktamaza, plazminogen-vezujući proteini i dr. U usporedbi s drugim Gram-negativnim bakterijama, identificirano je relativno malo faktora virulencije kod bakterije *A. baumannii* (Lee i sur. 2017).

Porini su proteini vanjske membrane, od kojih je u *A. baumannii* najbrojniji OmpA (Lee i sur. 2017), za kojeg je dokazno da značajno pridonosi patogenosti ove bakterije (Howard i sur. 2012). OmpA ima važnu ulogu u prianjanju i invaziji epitelnih stanica, ima sposobnost indukcije apoptoze stanica ciljanjem mitohondrija i uzrokovanjem ispuštanja proapoptotskih molekula (citokroma c i faktora indukcije apoptoze), veže se na serumski faktor H, što možda omogućava izbjegavanje sustava komplementa, potpomaže stvaranje biofilma, regulira biogenezu vezikula vanjske membrane (OMV), te sudjeluje u otpornosti bakterije na određene antibiotike. Osim OmpA, prepoznat je porin s citotoksičnim djelovanjem oznake Omp33-36 (Lee i sur. 2017).

Pili omogućavaju prianjanje uz stanice domaćina, te imaju ulogu u stvaranju biofilma (Lee i sur. 2017). Fimbrije također imaju ulogu u prianjanju bakterija uz epitelne stanice domaćina (Howard i sur. 2012).

Kapsularni polisaharidi pomažu preživljavanju bakterije u serumu i mekom tkivu domaćina, povećavaju otpornost bakterije na djelovanje komplementa domaćina, imaju ulogu u stvaranju biofilma, te sudjeluju u antibiotskoj rezistenciji (Lee i sur. 2017). Polisaharidna kapsula bakterije je glavni faktor u zaštiti *A. baumannii* od fagocitoze imunoloških stanica domaćina (Asif i sur. 2018). Lipopolisaharid (LPS, u sastavu vanjske membrane bakterijske stijenke) pomaže u preživljavanju bakterije unutar domaćina, sudjeluje u otpornosti bakterije na serum domaćina, pomaže izbjegavanju imunološkog sustava domaćina (Lee i sur. 2017), te je jak endotoksin (Peleg i sur. 2008).



Fosfolipaze C i D su virulentni faktori *A. baumannii* koji pomažu preživljavanje bakterija u domaćinu, sudjeluju u otpornosti na serum domaćina, te pomažu invaziju stanica domaćina (Lee i sur. 2017).

Vezikule vanjske membrane (OMV) su male kuglaste vezikule koje se sastoje od vanjske membrane, lipopolisaharida, periplazmatskih proteina, fosfolipida, i DNA ili RNA, te mogu dostaviti virulentne faktore bakterije u stanice domaćina bez kontakta. Vezikule vanjske membrane *A. baumannii* dokazano dostavljaju OmpA, fosfolipaze i proteaze u stanice domaćina, a imaju ulogu i u horizontalnom prijenosu gena za antibiotsku rezistenciju (Lee i sur. 2017). Vezikule vanjske membrane potiču djelovanje urođenog imunološkog odgovora na mjestu infekcije, što uzrokuje oštećenje tkiva (Asif i sur. 2018).

Siderofore, male molekule što ih izlučuju bakterijske stanice radi preuzimanja željeza, mogu imati ulogu u patogenezi. Dokazana je uloga acinetobactina (siderofora vrste *A. baumannii*) u preživljavanju bakterije unutar domaćina, a moguće i u ubijanju domaćinskih stanica. Sustavi za pribavljanje cinka i sustavi za pribavljanje mangana omogućavaju preživljavanje bakterije u domaćinu s obzirom da omogućavaju bakteriji pribavljanje cinka/mangana u uvjetima u kojima je njihova koncentracija smanjena djelovanjem imunološkog proteina kalprotektina (Lee i sur. 2017).

Sustavi za sekreciju proteina imaju različite uloge: sustav za sekreciju proteina tipa II ima ulogu u preživljavanju bakterije, tip V ima ulogu u prianjanju uz stanice domaćina i stvaranje biofilma, dok tip VI vjerojatno ima ulogu u ubijanju konkurentnih bakterija i kolonizaciji domaćina (Lee i sur. 2017).

$\beta$ -laktamaza ima ulogu u prianjanju uz stanice domaćina, dok penicilin-vezujući protein 7/8 ima ulogu u preživljavanju bakterija unutar domaćina i otpornosti bakterije na serum (Lee i sur. 2017).

Istraživanja genoma *A. baumannii* su pokazala postojanje mnogo otoka patogenosti, te postoji mogućnost da ova bakterija može primiti determinante za virulentnost od drugih vrsta (Peleg i sur. 2008).

#### 1.2.5. *A. baumannii* – značajan problem u bolnicama

Bakterija *A. baumannii* je postala jedan od globalno najproblematičnijih patogena u bolnicama zbog sposobnosti dugog preživljavanja u bolničkom okruženju, izazivanja bolničkih epidemija, te brzog razvoja sve veće antibiotske rezistencije (Peleg i sur. 2008). Odjeli intenzivne njege u bolnicama su mjesta na kojima se lako šire oportunistički patogeni (kao što su bakterije iz roda *Acinetobacter*), koji su često i višestruko rezistentni na antibiotike, s obzirom da se tamo nalaze kritično bolesni i ugroženi pacijenti podložni bolestima. Bakterija *A. baumannii* izaziva

epidemije na takvim odijelima, te na taj način povećava smrtnost osjetljivih pacijenata. Osim epidemija višestruko rezistentnih bakterija unutar bolnica, ponekad se pojavljuju i endemski, odnosno s konstantnom prisutnošću u nekoj bolnici ili na nekom području (Dijkshoorn i sur. 2007).

Bakterija *A. baumannii* može lako preživjeti unutar bolničkog okruženja, s obzirom da je otporna na isušivanje, dezinficijense i (određene) antibiotike, može koristiti različite supstrate za rast, te može stvarati biofilm (Dijkshoorn i sur. 2007). Dokazano je da može preživjeti na suhim površinama više od 25 dana (Wang i Qin 2019). Iako se pravilno korištenje dezinficijensa pokazalo učinkovitim pri uklanjanju ove bakterije, dokazano je da razvodnjavanje dezinficijensa (korištenje u koncentraciji manjoj od preporučene), ili nanošenje dezinficijensa na kraće vrijeme od preporučenog (manje od 30 s) nije dovoljno za uništavanje *A. baumannii*, a postoji mogućnost da je takva praksa u nekim bolnicama (Peleg i sur. 2008). Ova bakterija pokazuje veliku rezistenciju na UV-zrake i kemijske dezinficijense (Wang i Qin 2019). Bakterija *A. baumannii* može stvarati biofilme na različitim abiotičkim površinama kao što su endotrahealne cijevi kod mehaničke ventilacije i druga medicinska oprema, ali i na biotičkim površinama poput epitelnih stanica, što im omogućava preživljavanje i umnažanje u nepovoljnim uvjetima te kolonizaciju pacijenata. Stvaranje biofilma je kontrolirano različitim faktorima, kao što su dostupnost hranjivih tvari, prisutnost pila na bakteriji, utjecaj proteina vanjske membrane, ali i okolišni čimbenici poput prisutnosti metalnih kationa. Nakon prijanjanja bakterije na površinu dolazi do sinteze pila, koji također prionu uz površinu i potaknu stvaranje mikrokolonije; zatim pili i površinski proteini zvani proteini povezani s biofilmom (engl. *biofilm-associated protein*, BAP) potaknu sazrijevanje biofilma (Howard i sur. 2012). Bakterije postanu metabolički inertne u dubljim slojevima biofilma, zbog čega su otporne na antibiotike, a i antibiotici teško prodiru kroz biofilm (Asif i sur. 2018).

Smatra se da je bakterija uglavnom unesena u bolnicu preko koloniziranog pacijenta, ili rjeđe preko kontaminiranog materijala. Sa zaraženog pacijenta prelazi na druge pacijente i okolinu preko kapljica aerosola (na manje udaljenosti), oljuštene kože, sputuma i različitih ekskreta (Dijkshoorn i sur. 2007). Smatra se da se *A. baumannii* najviše rasprostranjuje unutar bolnice preko kontaminiranih ruku zdravstvenih zaposlenika, a moguće i zaraženom medicinskom opremom (Dijkshoorn i sur. 2007), poput cijevi koje se koriste pri mehaničkom disanju, katetera, intravenskih cijevi i dr. (Peleg i sur. 2008). Bakterija *A. baumannii* je pronađena i na zastorima bolničkih kreveta, bolničkom pokućstvu, jastucima (Dijkshoorn i sur. 2007), te su mnoga mjesta u bolničkom okruženju ocijenjena kao potencijalni izvor zaraze, kao što su posude za sakupljanje urina, vlažna krevetnina, ovlaživači zraka, kompjuterske tipkovnice i dr. (Peleg i sur. 2008). Postoje izvještaji i o pronalasku *A. baumannii* u zraku odjela intenzivne njege (Seruga Music i sur. 2017), te je dokazana mogućnost otpuštanja nekih vrsta u zrak prostorije iz pernatih jastuka (Almasaudi 2018). Bakterija *A. baumannii* je najčešće izoliran Gram-negativni bacil u medicinskog osoblja i medicinske opreme,

te često pokazuje široku rezistenciju na antibiotike (Wang i Qin 2019). Kad bakterija prijede na podložnog domaćina, može kolonizirati njegovu kožu i mukozne površine, ili intravenske katetere, intraureteralne katetere (Dijkshoorn i sur. 2007), ventrikularne katetere (Peleg i sur. 2008) i endotrahealne cijevi, te uzrokovati infekciju (Dijkshoorn i sur. 2007). Bolnice uglavnom provode različite procedure kako bi zaustavile širenje zaraze, što može uključivati izolaciju koloniziranog pacijenta, analizu pacijentove okoline na prisutnost bakterije, provjeru svih pacijenata na prisustvo zaraze, poboljšanje higijene ruku, dezinfekciju prostora, kohortno njegovanje pacijenata, ograničenje pristupa odijelu, pa čak i zatvaranje odjela dok se ne provede detaljno čišćenje i dezinfekcija (Dijkshoorn i sur. 2007). U nekim slučajevima je i nakon provođenja bitnih procedura zaustavljanja i uklanjanja višestruko rezistentne *A. baumannii* došlo do nastavka širenja zaraze (Peleg i sur. 2008).

Osim u bolnicama, *A. baumannii* se pojavljuje i u veterinarskim klinikama kao nosokomijalni patogen (Seruga Music i sur. 2017).

#### 1.2.6. Rezistencija na antibiotike i terapija

Prije 1970-ih *A. baumannii* nije pokazivala višestruku rezistenciju na antibiotike, te su se za liječenje infekcija koristili (uobičajeni) antibiotici  $\beta$ -laktami, aminoglikozidi i tetraciklini (Jung i Park 2015). Za vrijeme 1970-ih ova bakterija se smatrala osjetljivom na većinu antibiotika (Howard i sur. 2012), ali se od 1970-ih šire višestruko rezistentni sojevi unutar bolnica uzrokujući epidemije, a i čini se da su postale učestalijima i infekcije stečene u zajednici (Dijkshoorn i sur. 2007). Zbog višestruke rezistencije na antibiotike u ove bakterije, povećava se incidencija oboljenja iz godine u godinu (Wang i Qin 2019). Došlo je do globalnog širenja višestruko rezistentnih sojeva *A. baumannii*, gdje je broj učinkovitih antibiotika značajno smanjen (García-Quintanilla i sur. 2013). Nekoliko sojeva pokazuje visoku rezistenciju na većinu dostupnih antibiotika (Lee i sur. 2017), te su otkriveni sojevi koji su rezistentni na praktički sve postojeće antibiotike (Dijkshoorn i sur. 2007). WHO (World Health Organization) je 2017. godine proglasio sojeve *A. baumannii* rezistentne na karbapenem primarnim izvorom zabrinutosti – *number one concern* (Dekić i sur. 2018). Karbapenem je bio vrlo važan antibiotik u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijom *A. baumannii* od 1990-ih, ali su u novije vrijeme u nekim područjima otkriveni veliki udjeli sojeva rezistentnih na ovu skupinu antibiotika, u nekim državama dosežući učestalost preko 50% (Asif i sur. 2018). U Hrvatskoj je učestalost *A. baumannii* rezistentne na karbapeneme narasla sa 10% kliničkih izolata u 2008. godini na 87% kliničkih izolata u 2015. godini (Hrenovic i sur. 2017).

Kad se karakterizira šira rezistencija *A. baumannii* na antibiotike, koriste se uobičajeni pojmovi: višestruka rezistencija (MDR), pan-rezistencija (PDR) (Peleg i sur. 2008, Howard i sur. 2012, Almasaudi 2018, Wang i Qin 2019), ekstenzivna rezistencija (XDR) (Almasaudi 2018), i

potpuna rezistentcija (Wang i Qin 2019), iako ne uvijek s istim značenjem. Koristi se definicija MDR *A. baumannii* kao bakterija rezistentna na najmanje tri kategorije antimikrobiotika (Almasaudi 2018), ali i druga, specifičnija definicija u kojoj se *A. baumannii* smatra višestruko rezistentnom (MDR) ako je rezistentna na više od dvije od slijedećih pet klasa lijekova: antipseudomonalni cefalosporini, antipseudomonalni karbapenemi, ampicilin-sulbaktam, fluorokinolon, i aminoglikozidi (Peleg i sur. 2008, Almasaudi 2018). Neki znanstvenici su pan-rezistentne (PDR) *A. baumannii* definirali kao bakterije koje pokazuju rezistenciju na sve antimikrobotike prve linije terapije protiv *A. baumannii* (svi  $\beta$ -laktami uključujući karbapeneme, fluorokinoloni i aminoglikozidi), ostavljajući mogućnost za proširenje pojma na rezistenciju i na sve češće korištene polimiksine i tigeciklin (Peleg i sur. 2008), koji su jedni od novije korištenih antibiotika protiv široko rezistentnih *A. baumannii* (García-Quintanilla i sur. 2013). Drugi znanstvenici pan-rezistentne *A. baumannii* jednostavno definiraju kao bakterije rezistentne na sve klinički korištene antibiotike (García-Quintanilla i sur. 2013). Ekstenzivno rezistentne (XDR) bakterije roda *Acinetobacter* neki znanstvenici definiraju kao MDR bakterije koje su rezistentne na karbapeneme, a pan-rezistentne (PDR) bakterije ovog roda kao XDR bakterije rezistentne na polimiksine i tigecikline (Almasaudi 2018).

*A. baumannii* ima širok spektar mehanizama rezistencije na antibiotike, te ima potencijal brzog prilagođavanja selektivnim pritiscima uzrokovanim antibioticima (Peleg i sur. 2008). Neki od mehanizama rezistencije na antibiotike u ove vrste su: enzimska razgradnja lijekova, enzimska modifikacija lijekova, modifikacija mete, efluks pumpe (izbacivanje antibiotika iz bakterije), defekti u permeabilnosti vanjske membrane (smanjena mogućnost unosa antibiotika) i dr. (Lee i sur. 2017).

Rezistencija na  $\beta$ -laktame, koji djeluju na biosintezu peptidoglikana (Davies i Davies 2010), u ove bakterije najčešće je postignuta enzimskom razgradnjom  $\beta$ -laktamazama, a može biti postignuta i promjenama proteina vanjske membrane, efluks pumpama djelotvornim na više lijekova (engl. *multidrug efflux pump*), te promijenama u ekspresiji ili afinitetu penicilin-vezujućih proteina (Peleg i sur. 2008). Više različitih mehanizama često djeluju zajedno, tako proizvodeći određeni rezistentni fenotip (Peleg i sur. 2008). Posebno je važna rezistencija na karbapeneme, koji su  $\beta$ -laktami širokog spektra (Dijkshoorn i sur. 2007), najčešće uzrokovana posebnim  $\beta$ -laktamazama – (OXA) karbapenemazama klase D (Almasaudi 2018). Rezistencija na aminoglikozide, koji djeluju na translaciju (Davies i Davies 2010), je u ove vrste postignuta aminoglikozid-modificirajućim enzimima – acetiltransferazama, nukleotidiltransferazama i fosfotransferazama, metilacijom 16S rRNA (što postiže zaštitu mete od djelovanja aminoglikozida), te efluks pumpama (Peleg i sur. 2008). Rezistencija na tetracikline, koji također djeluju na translaciju (Davies i Davies 2010), i njihove derivate glicilcikline, se postiže preko djelovanja

efluks-pumpi (specifičnih ili djelotvornih na više lijekova), te zaštitom ribosoma (Peleg i sur. 2008). Rezistencija na kvinolone, koji djeluju na replikaciju DNA (Davies i Davies 2010), je postignuta mutacijama (za DNA girazu i topoizomerazu IV) koje mijenjaju mjesto vezanja na metu, te preko djelovanja efluks-pumpi (Peleg i sur. 2008). Mehanizmi rezistencije na polimiksine, lipopeptidne kationske antibiotike koji djeluju na staničnu membranu bakterije i uzrokuju istjecanje sadržaja bakterijske stanice (Wang i Qin 2019), se navode kao još uvijek nerazjašnjeni (Almasaudi 2018), ali je pokazano da može biti uzrokovana potpunim gubitkom lipopopisaharida (Wang i Qin 2019).

Poznato je da i neki virulentni faktori imaju ulogu u rezistenciji na antibiotike, poput OmpA, koji ima sposobnost izbacivanja određenih antibiotika iz periplazmatskog prostora tako nadopunjujući rad efluks pumpi unutarne membrane, ili kapsularnih polisaharida, koji povećavaju otpornost na peptidne antibiotike (Lee i sur. 2017).

Što se tiče genetike mehanizama rezistencije, *A. baumannii* ima sposobnost uzrokovati *up*-regulaciju postojećih unutarnjih mehanizama rezistencije, ali i primiti strane determinante za rezistenciju (Dijkshoorn i sur. 2007, Peleg i sur. 2008). Rezistencija na određene antibiotike (fluorokvinolone) može biti uzrokovana točkastim mutacijama. Neki geni za rezistenciju se nalaze na bakterijskom kromosomu, te mogu biti pojačano ekspimirani (*up*-regulirani) nakon uzvodne insercije posebne sekvence koja služi kao dobar promotor. Određeni geni za rezistenciju, poput inaktivirajućih enzima i specifičnih efluks-pumpi, su povezani s transpozonima, integronima i plazmidima, te su najvjerojatnije stečeni horizontalnim prijenosom. Pronađena je i posebna genska struktura u genomu (MDR soja) *A. baumannii* prozvana otokom rezistencije, koja bi mogla biti „vruća točka” kod stjecanja gena za rezistenciju horizontalnim prijenosom gena (Dijkshoorn i sur. 2007). Bakterija *A. baumannii* je prirodno kompetentna primati egzogenu DNA, a dokazano je i da krvni protein albumin može pojačati to svojstvo (Lee i sur. 2017). Značajan broj gena koji kodiraju rezistenciju na antibiotike, teške metale i antiseptike najvjerojatnije potječu od drugih patogenih bakterija, poput *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., i *E. coli* (Peleg i sur. 2008).

Liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *A. baumannii* je otežano zbog sve većeg širenja višestruke rezistencije na različite skupine antibiotika, što je još više otežano činjenicom da se unutar ove vrste razvila rezistencija na sve klinički korištene antibiotike (Dijkshoorn i sur. 2007, Peleg i sur. 2008, García-Quintanilla i sur. 2013). Zbog toga je važno provođenje testiranja osjetljivosti ove bakterije na antibiotike, ali to može odgoditi početak liječenja (Howard i sur. 2012). Karbapenemi su bili smatrani najboljim izborom za liječenje, ali širenje rezistentnih sojeva smanjuje uspješnost takvog liječenja, kao i što korištenje antibiotika može potaknuti širenje rezistencije (Peleg i sur. 2008). Kao mogući tretmani se još navode antibiotici polimiksini (koji pokazuju nefrotoksičnost) i tige ciklini (Dijkshoorn i sur. 2007), ali su poznati slučajevi infekcija u

kojima je bakterija bila otporna i na njihovo djelovanje (García-Quintanilla i sur. 2013). Kao mogućnost se nudi sulbaktam, koji je inhibitor  $\beta$ -laktamaza (Dijkshoorn i sur. 2007, Peleg i sur. 2008, Almasaudi 2018), ponekad u kombinaciji s drugim antibiotikom (Asif i sur. 2018), te općenito antimikrobiotička kombinacijska terapija (Dijkshoorn i sur. 2007). Sve se više ističe potreba za razvojem novih alternativnih tretmana (Dijkshoorn i sur. 2007, Howard i sur. 2012, García-Quintanilla i sur. 2013), kao što su fotodinamička terapija, terapija nanočesticama i dušikovim spojevima (Howard i sur. 2012, García-Quintanilla i sur. 2013), radioimunoterapija, terapija transfera baktericidnih gena vektorom (Howard i sur. 2012), terapija kelacijom željeza i terapija galijem, antimikrobni peptidi, profilaktična i pasivna cjepiva (García-Quintanilla i sur. 2013), te terapija fagima (Howard i sur. 2012, García-Quintanilla i sur. 2013, Lee i sur. 2017, Asif i sur. 2018).

### 1.3. *Escherichia coli*

#### 1.3.1. Svojstva i klasifikacija

Bakterija *Escherichia coli* je Gram-negativna, fakultativno anaerobna (katalaza-pozitivna i oksidaza-negativna), uglavnom pokretna bakterija, koja je sposobna (većina sojeva) fermentirati laktozu (Percival i Williams 2014), te koja ne stvara spore (Schaechter 2009). Uobičajeno je štapićastog oblika s oblim rubovima (bacil), iako oblik može varirati između okruglastog i vrlo izduljenog (Percival i Williams 2014). Bakterija *E. coli* je širine 0,35  $\mu\text{m}$  i duljine 1  $\mu\text{m}$  s mogućnošću velikih varijacija u veličini ovisno o soju i uvjetima (Blount 2015), odnosno, po drugom navodu, širine 1,1-1,5  $\mu\text{m}$  i duljine 2,0-6,0  $\mu\text{m}$  (Percival i Williams 2014). Pokretnost potječe od peritrihno rasprostranjenih bičeva (Percival i Williams 2014) uobičajene veličine 5-10  $\mu\text{m}$ , kojih je najčešće 5-10 po stanici (Schaechter 2009). Vrsta *E. coli* posjeduje fimbrije ili pile različitih struktura i antigenskih svojstava (Percival i Williams 2014), koji se mogu podijeliti na uobičajene fimbrije (uobičajeno 100-1000 po stanici) i konjugativne fimbrije/pile (Schaechter 2009). Određeni sojevi mogu izmjenjivati stanje ekspresije fimbrija i stanje bez fimbrija (Schaechter 2009). Mnoge stanice *E. coli* imaju kapsulu ili mikrokapsulu građenu od kiselih polisaharida, a postoje i mukoidni sojevi koji proizvode izvanstaničnu polisaharidnu sluz različite građe i antigenosti (Percival i Williams 2014).

Bakterija *E. coli* je klasificirana u koljeno Proteobacteria, razred Gammaproteobacteria, red Enterobacteriales, porodicu Enterobacteriaceae, te rod *Escherichia*, u kojeg je uvršteno sveukupno pet različitih vrsta (Liu 2019).

Bakterija *E. coli* pokazuje veliku genetsku raznolikost između različitih sojeva, te posljedično i fenotipsku raznolikost. Pangenom ove bakterije (set svih gena nađenih u svim sojevima vrste) sadrži više od 16000 gena, od kojih je samo 20% sržnih gena vrste. Ostatak čini

fleksibilni genom koji sadrži pomoćne gene, profage i transpozone. Te gene soj može steći horizontalnim genetičkim transferom. Fleksibilni genom može pomoći u prilagođenosti soja određenoj niši, povećati metaboličku fleksibilnost, ali i utjecati na patogenost (Blount 2015).

Sojevi *E. coli* se uglavnom definiraju prema njihovom antigenskom sastavu (Schaechter 2009). Neki od antigena koji se koriste u tu svrhu su lipopolisaharidni antigeni – O antigeni, kapsularni antigeni – K antigeni, flagelarni proteini – H antigeni, fimbrijski proteini – F antigeni (Schaechter 2009), kiseli polisaharidi (od kolanske kiseline) mukoidnih sojeva – M antigeni (Percival i Williams 2014).

Vrsta *E. coli* se uglavnom nalazi u donjem crijevnom traktu toplokrvnih životinja, od kuda se putem fecesa otpušta u okoliš (Jang i sur. 2017), stoga se smatra bakterijom fekalnog podrijetla (Percival i Williams 2014). Bakterija *E. coli* je uglavnom sastavni dio probavnog mikrobioma sisavaca, te je ponekad nađena kao dio probavne mikrobiote ptica, gmazova i riba. Bakterija *E. coli* je najčešća aerobna bakterija u donjem dijelu probavnog sustava, ali čini samo 0,1-5% mikrobne zajednice, čiju većinu čine obligatni anaerobi (poput vrsta iz bakterijskih skupina *Bacteroides* i Firmicutes), s obzirom da je donji dio probavnog sustava anoksičan okoliš. U probavnom sustavu čovjeka *E. coli* stvara kompleksne interakcije s ostalim bakterijama mikrobioma, s viromom domaćina, kao i sa samim domaćinom (Blount 2015). Bakterija *E. coli* kolonizira, osim debelog crijeva, i ileum (završni dio tankog crijeva), u kojem stvara prolazne populacije koje brzo bivaju pogurane u početak debelog crijeva (Schaechter 2009). U ljudskom probavnom sustavu se nalaze stalni i prolazni sojevi *E. coli* koji ovise o domaćinovoju prehrani, zdravstvenom stanju i konzumaciji antibiotika. Unutar donjeg dijela probavnog sustava *E. coli* živi u tankom sloju mukusa formirajući kompleksne biofilme sastavljene od više vrsta bakterija. Domaćin i *E. coli* su u mutualističkom odnosu u kojem domaćin pruža temperaturno pogodan okoliš i nutrijente, dok bakterija proizvodi domaćinu potrebne vitamine K i B12, te kompetitira s patogenim vrstama unutar probavnog sustava domaćina (Blount 2015). Do kolonizacije domaćina dolazi za vrijeme njegovog rađanja izlaganjem fekalnoj tvari majke ili naknadnim rukovanjem novorođenčetom. Kolonizirajući sojevi posjeduju sekretorne sustave i pile kojima se pričvrste na epitelne stanice probavnog sustava novog domaćina, formiraju rastuću populaciju, te uzrokuju strukturne i funkcionalne promjene epitelnih stanica koje su važne za formiranje zdravog mikrobioma (Blount 2015). Koncentracija *E. coli* po gramu fecesa ovisi o domaćinovoju vrsti, te je u domaćih životinja u rasponu  $10^4$ - $10^6$  bakterija po gramu fecesa, a u ljudi uobičajeno  $10^7$ - $10^9$  bakterija po gramu fecesa (Jang i sur. 2017). Pošto se mukus probavnog sustava konstantno ljušti i izbacuje unutar fecesa, populacija *E. coli* koja se nalazi u njemu se zajedno izlučuje u okoliš (Blount 2015).

U prošlosti se smatralo da *E. coli* ne može dugo preživjeti izvan tijela domaćina, odnosno da se ne može razmnožavati u vanjskom okolišu, ali je u novije vrijeme dokazano da ova bakterija može preživjeti dugo vremena izvan tijela domaćina i razmnožavati se u tlu, sedimentu i pijesku tropskih, sutropskih i umjerenih klima, te postati dio autohtone mikrobiote tih područja (Jang i sur. 2017), kao i dio nekih vodenih mikrobni zajednica poput onih povezanih s biljkama (Blount 2015). Zbog prijelaza iz mukusa domaćina u vanjski okoliš, životni ciklus *E. coli* se može opisati kao bifazičan (Blount 2015). Uspješnost preživljavanja i umnažanja *E. coli* u vanjskom okolišu ovisi o abiotičkim faktorima poput temperature, pH, sunčeve radijacije i dostupnosti nutrijenata, te o biotičkim faktorima poput kompeticije s drugim mikroorganizmima i mogućnosti stvaranja biofimoza (Jang i sur. 2017). Postoji mogućnost da perzistentne varijante *E. coli* unutar populacije, koje su u dormantnom stanju i metabolički neaktivne kao posljedica aktivacije redundantnih metaboličkih puteva poput stresnog odgovora, imaju važnu ulogu u preživljavanju *E. coli* u nepovoljnim okolišnim uvjetima. Smatra se da izdržljivost, metabolička fleksibilnost i sposobnost korištenja različitih nutrijenata u ove vrste, zbog kojih je odličan modelni organizam, omogućuju bakteriji preživljavanje nepogodnih okolišnih uvjeta do pronalaska novog domaćina. Određene analize različitih sojeva *E. coli* su dokazale postojanje sojeva koji su prilagođeniji životu bez domaćina (Blount 2015). Potencijalno patogeni sojevi također mogu preživjeti u okolišu, kao što je površina različitog lisnatog zelenog povrća (Jang i sur. 2017). Zbog intestinalnog podrijetla ove bakterije, *E. coli* se koristi kao važan indikator fekalnog zagađenja vodenih okoliša (Percival i Williams 2014).

### 1.3.2. Modelni organizam

Bakteriju *E. coli* je 1884. godine otkrio mikrobiolog Theodor Escherich, dok je proučavao mikrobe dječjeg probavnog sustava. Zbog svojstva brzog rasta, nepatogenosti, prilagodljivosti i izdržljivosti, te općenito jednostavnosti rukovanja, kao i činjenice da se lako može izolirati iz ljudi s kojima je simbiotskom odnosu, *E. coli* je u 20. stoljeću postala modelnim organizmom u mnogim biološkim područjima istraživanja. Bakterija *E. coli* je modelni organizam u području mikrobiologije, te su na njoj provedena važna istraživanja o bakterijskoj fiziologiji i genetici. Uz pomoć ove bakterije su postignuta mnoga otkrića o bakteriofagima, kao što je životni ciklus litičkih i lizogenih faga. Kao modelni organizam u području molekularne biologije, poslužila je za razrješenje prirode genetičkog koda, DNA-replikacije, transkripcije, translacije, genske regulacije, te strukture i funkcije ATP-sintetaze. Proučavanjem *E. coli* su otkriveni i restriksijski enzimi. Ova bakterija je postala vrlo važan organizam u području genskog inženjerstva, posluživši razvijanju mnogih tehnika i tehnologija tog područja, kao što su molekularno kloniranje i tehnologija rekombinantne DNA. Važna je i u području biotehnoške industrije, te se koristi u proizvodnji



bioloških goriva i industrijskih kemikalija. Važna je u području farmaceutske proizvodnje, služeći za sintezu rekombinantnih proteina koji se koriste u terapijama, poput inzulina, ljudskog hormona rasta, eritropoetina, ljudskih faktora zgrušavanja i dr. Ova bakterija je važan modelni organizam i u području eksperimentalne evolucije, te je na njoj dokazana nasumična priroda mutacija. Bakterija *E. coli* se navodi kao najvažniji modelni organizam u biologiji (Blount 2015).

### 1.3.3. Laboratorijski uzgoj

Bakterija *E. coli* je kemoheterotrof, te može koristiti različite šećere i aminokiseline za rast i umnažanje. U slučaju samo jednog ugljikovog izvora, kolonija nabolje raste ukoliko je taj izvor glukoza. Najbrže raste u hranjivim medijima bogatim nutrijentima (Schaechter 2009). Smatra se da je sposobnost *E. coli* da koristi različite izvore nutrijenata posljedica kompeticije s drugim bakterijama koje su dio mikrobiote domaćina, a možda i života izvan domaćina na različitim supstratima. Ova bakterija ima sposobnost metabolizma laktoze, s obzirom da je prirodno dio mikrobiote sisavaca (Blount 2015). Bakterija *E. coli* ima sposobnost iskorištavanja respiratornih i fermentativnih metaboličkih puteva (Schaechter 2009). Tipični laboratorijski sojevi rastu na velikom broju različitih tekućih i čvrstih hranjivih medija u aerobnim ili anaerobnim uvjetima, iako se umnažaju puno brže kad je kisik prisutan (Tuttle i sur. 2021). Najbolje se umnaža pri 37 °C (Tuttle i sur. 2021), ali se može umnažati i u temperaturnom rasponu od 8 °C do 48 °C, ovisno o soju i hranjivom mediju (Schaechter 2009). Može se umnažati u pH rasponu od 6,0 do 8,0, s manjom sposobnošću kad je pH vrijednost do jednu pH jedinicu iznad ili ispod navedenog raspona (Schaechter 2009), ali se za laboratorijski uzgoj najčešće koristi pH vrijednosti 7 (Tuttle i sur. 2021). U pogodnim uvjetima temperature, pH, kisika i bogatog tekućeg hranjivog medija (poput LB-bujona), *E. coli* se umnaža brzinom vremena udvostručenja od ~20 min. Može preživjeti na temperaturi od -4 °C na krutom mediju kroz dulje vremenske periode (do 3 mjeseca). Dugoročno se pohranjuje pri -80 °C u 30%-tnom glicerolu. Tipični laboratorijski sojevi smatraju se nepatogenim mikroorganizmima. Većina sojeva su mikroorganizmi biosigurnosne razine 2 (Tuttle i sur. 2021).

### 1.3.4. Patogeni sojevi i rezistencija na antibiotike

Različiti sojevi *E. coli* mogu uzrokovati različita oboljenja, te je ova bakterija jedan od glavnih uzročnika bolesti povezanih s proljevom, peritonitisa, kolitisa, infekcija urinarnog trakta, bakteremija i dojenačke smrtnosti (Blount 2015). Najčešće infekcije uzrokovane ovom bakterijom su infekcije intestinalnog sustava ili urinarnog trakta (Schaechter 2009). Smatra se da svake godine umre oko 2 milijuna ljudi od bolesti uzrokovanih infekcijom *E. coli* (Blount 2015). Neke zaraze mogu biti uzrokovane uobičajeno neopasnim ili korisnim sojevima kad prijeđu u dijelove tijela izvan probavnog sustava ili u već bolesne domaćine, tako uzrokujući oportunističke infekcije. Osim

uobičajenih simbiotskih sojeva, postoje i patogeni sojevi koji posjeduju faktore virulencije. Patogeni sojevi su podijeljeni na patotipove, ovisno o mjestu i načinu uzrokovanja oboljenja (Blount 2015). Postoji sedam enteričkih patotipova *E. coli*: enteropatogena *E. coli* (EPEC), eneterohemoragična *E. coli* (EHEC), enterotoksična *E. coli* (ETEC), enteroagregativna *E. coli* (EAEC), difuzno adherentna *E. coli* (DAEC), enteroinvazivna *E. coli* (EIEC) i adherentno invazivna *E. coli* (AIEC), te tri ekstraintestinalna patotipa *E. coli*: uropatogena *E. coli* (UPEC), *E. coli* koja uzrokuje neonatalni meningitis (NMEC), te ptičja patogena *E. coli* (APEC) (Allocati i sur. 2013). EPEC uzrokuje teški proljev u male djece i vodenast proljev u odraslih popraćeno s povraćanjem i abdominalnim bolovima (Percival i Williams 2014), EHEC uzrokuje hemoragični kolitis s krvavim proljevom, ETEC uzrokuje putnički proljev, EAEC uzrokuje proljev u djece, DAEC uzrokuje akutni proljev u djece i ponavljajuću infekciju urinarnog trakta, EIEC uzrokuje bolesti slične šigelozii s vodenastim proljevom i dizenterijom, dok je AIEC povezana s Chronovom bolesti, uzrokujući ustrajnu intestinalnu upalu (Allocati i sur. 2013). UPEC uzrokuje infekcije urinarnog trakta (cistitis, pijelonefritis) i sistemske infekcije, dok NMEC uzrokuje neonatalni meningitis. APEC uzrokuje ekstraintestinalne bolesti u različitim vrsta ptica, te postoji mogućnost da mogu uzrokovati bolesti koje se prenose hranom, ali sposobnost da uzrokuje bolest u ljudi nije dokazana (Allocati i sur. 2013). Morbiditet i mortalitet infekcije ovom bakterijom ovisi o soju i domaćinu, te je veća vjerojatnost težih oboljenja i smrtnih ishoda u zemljama u razvoju gdje se bolesti povezane s proljevom lakše prenose (Percival i Williams 2014).

Pošto *E. coli* uglavnom živi u probavnom sustavu toplokrvnih životinja, često dolazi u dodir s antibioticima koje konzumiraju domaćini. Antibiotici na taj način stvaraju konstantan selektivni pritisak unutar probavnog sustava domaćina, te postoje sojevi rezistentni na njih. Smatra se da bakterije mogu steći gene za rezistenciju i u različitim okolišima poput voda, tla i postrojenja za obradu otpadnih voda (Jang i sur. 2017). Zbog tretiranja životinja antibioticima, MDR sojevi se mogu pronaći u izolatima iz životinja i prehrambenih proizvoda, što predstavlja zdravstveni rizik za ljude (Allocati i sur. 2013). U okolišu je otkrivena višestruko rezistentna *E. coli* koja predstavlja zdravstveni rizik (Jang i sur. 2017), te se smatra da su otpadne vode bolnica jedan od izvora MDR *E. coli* (Allocati i sur. 2013). Višestruka rezistencija je sve češća u Europi, te su u Hrvatskoj nađeni sojevi rezistentni na cefalosporine, fluorokvinolone i aminoglikozide, kao i MDR sojevi (Allocati i sur. 2013). Mehanizmi rezistencije na antibiotike kod ove vrste su raznoliki, kao što su enzimatska inaktivacija ( $\beta$ -laktamaze, karbapenemaze, rezistencija na aminoglikozide), promjene u meti antibiotika (rezistencija na fluorokvinolone i aminoglikozide), smanjen unos antibiotika, te efluks-pumpe. Jedna od predloženih alternativnih terapija infekcija uzrokovanih rezistentnom *E. coli* je terapija fagima, a fagi se mogu koristiti i u prehrambenoj industriji za sprečavanje kontaminacije bakterijama (Allocati i sur. 2013).

## 1.4. Bakteriofagi

### 1.4.1. Osnovne činjenice i klasifikacija

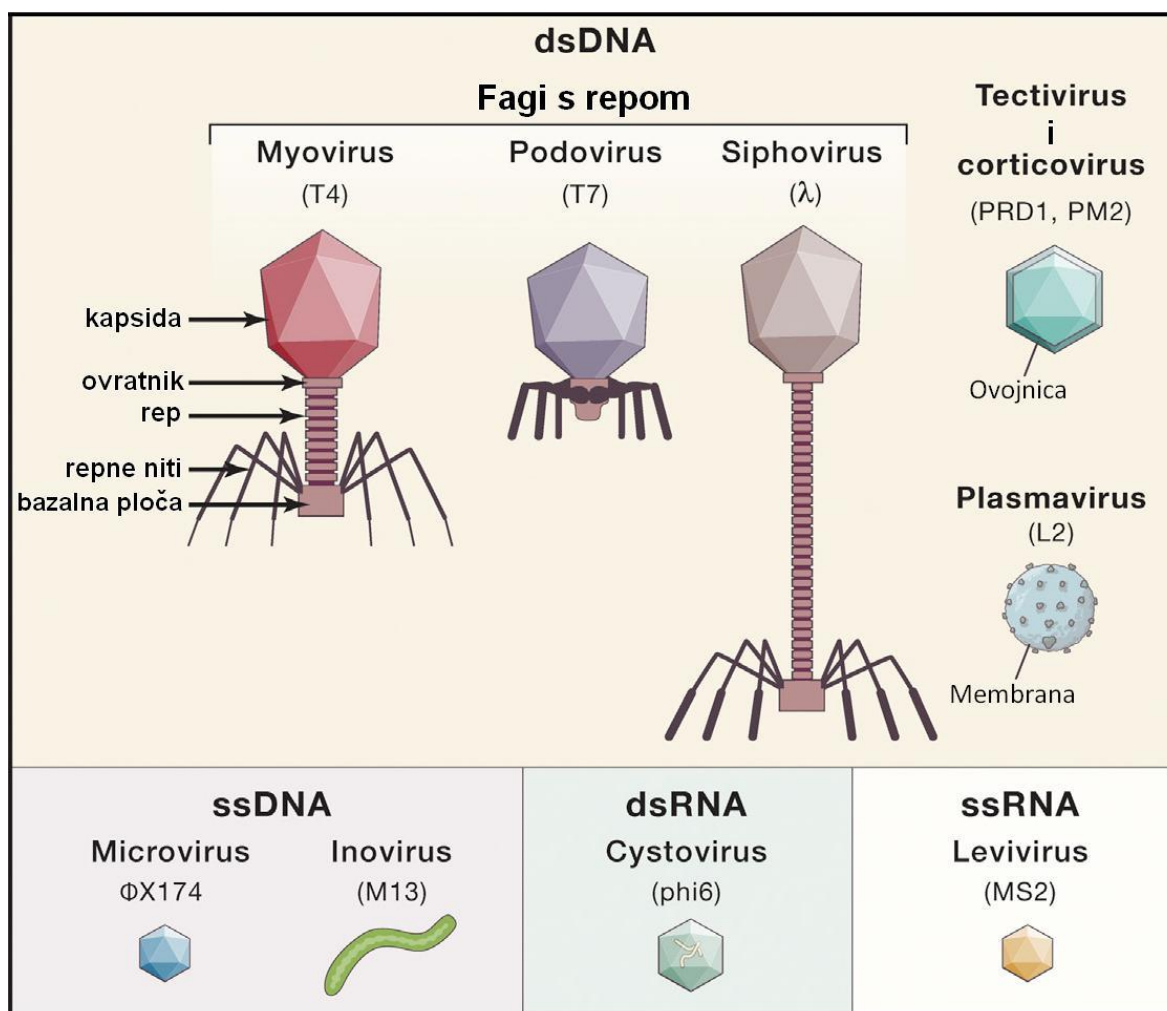
Bakteriofagi su virusi koji inficiraju bakterije (Moineau 2013). Otkrili su ih nezavisno Frederick Twort 1915. godine i Félix d'Hérelle 1917. godine, koji ih je i prozvao bakteriofagi, što znači „izjelica bakterija” (Salmond i Fineran 2015). Građeni su od nasljednog materijala, koji može biti dvostruka ili jednostruka DNA ili RNA, unutar proteinskog omotača, a virusne čestice mogu biti različitih oblika. Neki posjeduju i unutarnju ili vanjsku lipidnu membranu. Poznat je i fag (jedini član porodice *Plasmaviridae*) koji nema proteinski omotač, već dsDNA pakiranu u proteinsko-lipidnu membranu (Dion i sur. 2020). Veličina bakteriofaga se mjeri u nanometarskoj skali (Moineau 2013).

Najranija istraživanja bakteriofaga su se fokusirala na korištenje faga u terapijske svrhe, što je kasnije zapušteno otkrićem i širenjem antibiotika, te ponovno istraživano širenjem antibiotske rezistencije. Eksperimentiranjem s bakteriofagima je dokazano da su geni sastavljeni od DNA, dokazano je čitanje genetičkog koda u tripletima, postignuta su važna otkrića u području genske regulacije, te je dokazano da mutacije nastaju bez selekcije. Istraživanja na fagima su rezultirala otkrićem mnogih alata u molekularnoj biologiji, genetičkom inženjerstvu i biotehnologiji, kao što su restriksijski enzimi i CRISPR-Cas sustav. Neki alati molekularne biologije su podrijetlom iz faga, kao što su T4 DNA ligaza, fag  $\lambda$  kao vektor za kloniranje i kozmidi, te T7 DNA polimeraza. Genomi faga su prvi sekvencirani genomi – ssRNA genom faga M2, ssDNA genom faga  $\Phi$ X174, te dsDNA genom faga  $\lambda$  (Salmond i Fineran 2015). Bakteriofagi se proučavaju za korištenje u medicini i biotehnologiji kao terapeutici, prijenosnici DNA i proteina u svrhu cijepljenja, kao dijagnostički alat, biokontrolni agens protiv problematičnih bakterija u agrikulturi i industriji i dr. (Haq i sur. 2012).

Tradicionalno su bakteriofagi klasificirani prema tipu genoma, morfologiji i specifičnosti prema domaćinu, ali se danas takva podjela revidira prema rezultatima genomskih istraživanja (Dion i sur. 2020). Većina klasificiranih faga spada u red *Caudovirales*, koje karakterizira poliedrična glava s repom i dsDNA kao nasljedni materijal. Spomenuti red se ranije dijelio na tri porodice: *Siphoviridae*, koje karakterizira izdužen ne-kontraktilni rep, *Myoviridae*, koji posjeduju kontraktilne repove, te *Podoviridae* koji imaju kratke ne-kontraktilne repove (Moineau 2013, Dion i sur. 2020). Naknadno su u red dodane dvije porodice kao zasebne skupine od porodice *Myoviridae*: *Ackermannviridae*, koje karakterizira morfologija slična *Myoviridae* s repnim šiljcima na bazi repa, te *Herelleviridae*, morfologije jednake kao i *Myoviridae* (Dion i sur. 2020). Danas se u ovom redu nalazi 14 porodica i jedna vrsta neodređene porodice ([talk.ictvonline.org/](http://talk.ictvonline.org/)). Otkriva se sve više DNA virusa morfologije bez repa, te postoji mogućnost da prevladavaju u određenim biomima (Dion i sur. 2020). Osnovna morfologija faga se može vidjeti na Slici 1.

Različiti bakteriofagi pokazuju velike razlike u genomu, te ne postoji niti jedan gen ili protein koji se nalazi u genomu svih faga. Usprkos tome, pronađen je ograničen broj virionskih struktura, odnosno proteinskih struktura koje ne pokazuju homologiju niti u aminokiselinskom slijedu, niti u genima koji ih kodiraju (Dion i sur. 2020).

Bakteriofagi pokazuju mozaicizam genoma, odnosno posjeduju gene i genske blokove koji evolucijski potječu od različitih izvora. Mozaicizam genoma je posljedica horizontalnog prijenosa gena između različitih bakteriofaga, koji se postiže različitim oblicima genske rekombinacije između dva faga koji ko-inficiraju istu bakterijsku stanicu. Fagi kodiraju rekombinaze, enzime koji kataliziraju prijenos njihovih gena i specifične rekombinacije. Umjereni fagi, koji se mogu integrirati u genom domaćina, pokazuju veći stupanj mozaicizma, te se smatra da često djeluju kao posrednici u razmjeni genskog materijala. Genske domene za proteine koji se vežu na receptore (engl. *receptor binding proteins*, RBP) su jedne od genskih struktura koje se mogu razmjenjivati između faga, što može uzrokovati promjenu specifičnosti za domaćina (Dion i sur. 2020).



Slika 1: Osnovne morfologije faga. Naznačeni su nazivi rodova i primjerak vrste iz tog roda. Na primjeru Myovirusa su naznačeni osnovni dijelovi viriona. Preuzeto iz Ofir i Sorek (2018) i prilagođeno (prevedeno).

#### 1.4.2. Životni ciklus

Bakteriofagi imaju nekoliko različitih životnih ciklusa: litički, lizogeni, te slabije proučeni pseudolizogeni i stanje nositelja (Díaz-Muñoz i Koskella 2014).

Bakteriofag započinje ciklus interakcijom s receptorom na bakteriji i adsorpcijom, nakon čega slijedi unos genskog materijala u stanicu injektiranjem ili mehanizmom nalik endocitozi. Ukoliko je fag litički, bakterijska stanica proizvodi proteine kodirane virusnim genomom, replicira virusni genom, nakon čega dolazi do sastavljanja faga, lize stanice litičkim ezimima i otpuštanja novih viriona (Díaz-Muñoz i Koskella 2014). Fagi koji imaju isključivo litički ciklus se još nazivaju virulentnim fagima. Umjereni fagi mogu ući u litički ili lizogeni ciklus. Lizogeni ciklus znači ulazak faga u stabilno stanje s bakterijom domaćinom u obliku koji se naziva profag, pri čemu se nasljedni materijal faga integrira u kromosom bakterije ili se u njoj nalazi u obliku plazmida, te se replicira zajedno s bakterijskom DNA. Profagi mogu ući u litički ciklus koji rezultira proizvodnjom novih viriona, a taj prijelaz može biti induciran stresom (Salmond i Fineran 2015). Pseudolizogen je fenomen koji se događa samo kada je bakterija u stanju gladovanja, a označava stanje kada fag uđe u stanicu domaćina ali ne ulazi u litički ili lizogeni ciklus. Nakon što bakterija uđe u povoljnije uvjete s dovoljno nutrijenata, bakteriofag nastavlja s normalnim ciklusom. Nije sasvim utvrđeno radi li se o zasebnom ciklusu ili o jednostavnom zaustavljanju litičkog/lizogenog ciklusa (Díaz-Muñoz i Koskella 2014). Stanje nositelja (engl. *carrier state*) je posebno stanje faga u kojem stvara kroničnu infekciju bakterije bez integracije u genom, neovisno o dostupnosti nutrijenata potrebnih bakteriji. Fagi neprestano „pupaju” iz bakterije bez njene lize, ili se asimetrično dijele na stanice kćeri. Takvo stanje može usporiti bakterijsko umnažanje (Díaz-Muñoz i Koskella 2014).

Adsorpcija, odnosno receptori na koje se bakteriofagi vežu, određuje specifičnost faga za domaćina (Rakhuba i sur. 2010). Određeni fagi su uskog raspona specifičnosti za domaćina i mogu inficirati samo nekoliko sojeva iste vrste, neki mogu inficirati veliki broj sojeva iste vrste, a rijetki imaju polivalentan raspon specifičnosti za domaćina i mogu inficirati više od jedne vrste (Hyman 2019). Adsorpcija ovisi o nasumičnim sudarima bakteriofaga i receptora na bakterijama, a njena brzina ovisi o specifičnom fagu i domaćinu, njihovoj koncentraciji, fiziološkom stanju domaćina, kao i o temperaturi, pH i prisutnosti određenih supstanci i iona. Receptori se mogu nalaziti na staničnoj stijenci bakterije, kapsuli, pilima i bičevima. Receptori lokalizirani na staničnoj stijenci Gram-negativnih bakterija mogu biti proteini vanjske membrane i lipopolisaharid (LPS). Mogući proteinski receptori su: strukturni proteini vezani na sloj peptidoglikana, porini (specifični i nespecifični), enzimi, receptori supstrata visokog afiniteta, te transportni sekretorni proteini. Ukoliko se fag veže na receptore distalnog dijela biča bakterije, takav oblik vezanja je reverzibilan, a ireverzibilno se vežu tek kad se pomaknu na bazalni dio

biča ili površinu bakterijske stanice. Vežanje na kapsulu ili bakterijsku sluz je također reverzibilno i uglavnom uključuje enzimsku razgradnju, nakon čega slijedi ireverzibilno vežanje na staničnu stijenkku. Nakon ireverzibilnog vežanja faga na bakterijsku stanicu, fag unosi svoj genski materijal, a taj proces ovisi o samom fagu i domaćinu. Na mehanizam unosa genskog materijala može utjecati membranski potencijal, te dio tog procesa može biti enzimska razgradnja peptidoglikana (Rakhuba i sur. 2010). Proteini faga koji se vežu na receptore (engl. *receptor binding proteins*, RBP) nalaze se na površini viriona, te se u faga s repom nalaze na repnim nitima ili repnim šiljcima (Doore i sur. 2021), vrhu repa ili bazalnoj ploči (Dion i sur. 2020). U faga koji ne posjeduju rep, RBP se mogu nalaziti na šiljcima vezanima na kapsidu (Doore i sur. 2021). Vežanje RBP na bakterijski receptor uzrokuje konformacijsku promjenu u faga, što rezultira unosom njegovog genskog materijala u bakteriju (Doore i sur. 2021).

Ukoliko fag prolazi kroz litički ciklus, nakon unosa genskog materijala dolazi do ekspresije njegovih gena. Eksprimiraju se rani geni, čija je uloga zaštita genoma faga i rekonstrukcija domaćina za potrebe faga, nakon čega se aktiviraju srednje eksprimirani geni, što je potrebno za umnažanje nasljednog materijala faga. Na kraju se aktiviraju kasni geni koji kodiraju slaganje kapside, mašineriju za pakiranje nasljednog materijala, proteine repa, te proteine koji liziraju bakteriju (Moineau 2013). Kod dsDNA faga tri enzima imaju ulogu u lizi Gram-negativnog domaćina: holin ili pinholin, endolizin i spanin. Holin ili pinholin se nakupljaju u stanici dok ne dostignu kritičnu koncentraciju, nakon čega formiraju otvore koji propuštaju endolizine u periplazmu. Enzolizini razgrade peptidoglikanski sloj, nakon čega spanini poremete strukturu vanjske membrane što dovodi do lize stanice (Young 2013). Kod nekih manjih ssDNA i ssRNA faga samo jedan protein stvara proteinske kanale koji uzrokuju autolizu bakterije domaćina (Young 2013).

#### 1.4.3. Ekologija

Bakteriofagi su najbrojniji i najraznolikiji biološki entiteti na Zemlji, s procijenjenom brojnošću od  $10^{31}$ . Pronađeni su u svim istraženim mikrobiomima, a u nekim ekosustavima je broj bakteriofaga oko deset puta veći od broja bakterija (Dion i sur. 2020).

Bakteriofagi imaju veliki utjecaj na mikrobnu populaciju ekosustava, u kojem održavaju ravnotežu i raznolikost bakterijskih populacija (Moineau 2013). Populacije bakteriofaga uzrokuju selekciju u bakterijskim populacijama, potičući njihovu evoluciju, a vrijedi i obrnuto. Fagi mogu imati predator-plijen odnos sa bakterijama, smanjujući njihovu brojnost, ali mogu imati i kompleksnije odnose. Primjer kompleksnijeg odnosa su određeni fagi koji nose pomoćne metaboličke gene, homologne genima bakterija domaćina, koji poboljšavaju fiziologiju bakterija na način koji pomaže virusnu replikaciju (Díaz-Muñoz i Koskella 2014). Fagi mogu uzrokovati

horizontalni transfer gena između bakterija transdukcijom, kao i poticati transformaciju lizom bakterija. Profagi mogu opskrbiti bakterije novim korisnim genom, što se naziva lizogena konverzija. Dokazano je da profagi mogu nositi gene za virulenciju, te na taj način utjecati na razvoj bakterijske patogenosti (Salmond i Fineran 2015). U vodenim okolišima bakteriofagi imaju važnu ulogu u biogeokemijskim ciklusima jer liziraju bakterije, što uzrokuje otpuštanje organskih spojeva u okoliš. Vrlo su brojni u morskim sustavima, gdje omjer prema bakterijama može biti i 100:1. Bakteriofagi su također izolirani iz različitih vrsta tla (Dion i sur. 2020). Najbrojniji su u šumskom i močvarnom tlu (Dion i sur. 2020), a izolirani su i iz pustinja i polarnih regija (Díaz-Muñoz i Koskella 2014).

Bakteriofagi su nađeni i na ljudskom tijelu – na koži, u ustima, crijevima te respiratornom sustavu (Moineau 2013). U probavnom sustavu čovjeka se nalaze u velikom broju, te je istraživanjem otkriveno do  $10^8$  virusu sličnih čestica (engl. *viruse-like particle*, VLP) po mililitru filtrata fecesa. Elektronska mikroskopija i metagenomska istraživanja su pokazala da su u čovjekovom probavnom sustavu najbrojniji raznoliki članovi reda *Caudovirales*, a sama metagenomska istraživanja su pokazala i prisutnost virusa iz reda *Microviridae* (ssDNA fagi s ikozaedarskom kapsidom), ali je i veliki broj detektiranih virusa neklasificiran. Virom individue je specifičan i stabilan kroz vrijeme, osim u ranijim godinama života kada dolazi do brzih promjena sastava. Sastav viroma ovisi o zdravstvenom stanju čovjeka, te može biti specifično promijenjen pri kroničnim upalnim bolestima crijeva. Virom različitih jedinki se jako razlikuje, te iako postoje široko rasprostranjeni fagi koji čine jezgri virom, on sačinjava manjinu viroma jedinke. Smatra se da su bakteriofagi u probavnom sustavu čovjeka često dio lizogena u obliku profaga (Dion i sur. 2020).

#### 1.4.4. Rezistencija bakterija na bakteriofage

Bakterije imaju više različitih mehanizama kojima se mogu obraniti protiv infekcije bakteriofagima, ili širenja infekcije na druge bakterije u populaciji. Mehanizmi rezistencije koji štite bakteriju mogu djelovati u različitim fazama infekcije: rezistencija na adsorpciju faga, blokiranje primanja genetskog materijala faga, obrana restriktivnim mjerama koje sprečavaju fag u preuzimanju bakterijske stanice, abortivna infekcija pri kojoj umire bakterijska stanica i zaustavlja se ciklus faga, smanjenje veličine otpusta i povećanje latentnog perioda faga, te smetnje u diseminaciji faga (Hyman i Abedon 2010). Mehanizmi rezistencije uključuju otpuštanje vanjskih membranskih vezikula koje nose receptore za fage i mogu ih vezati, sakrivanje receptora na površini bakterije kapsulom ili biofilmom, post-translacijske modifikacije receptora i modifikacije receptora drugim proteinima, mutacije samih receptora i regulacija ekspresije receptora; blokiranje ulaska DNA bakteriofaga u stanicu; restriktivsko-modifikacijski sustavi, odnosno restriktivski

enzimi koji degradiraju nasljedni materijal faga, CRISPR-Cas mehanizmi prepoznavanja i uništavanja nasljednog materijala faga; programirana stanična smrt (abortivna infekcija), toksin-antitoksin sustavi koji mogu djelovati smetanjem samog životnog ciklusa faga, uzrokovati ulazak bakterije u stanje mirovanja ili smrt inficirane bakterije; ometanje sastavljanja viriona aktivacijom genetičkih elemenata koji rezultiraju manjim česticama virusa koji prenose bakterijske gene; te još nerazjašnjeni mehanizmi rezistencije (Rostøl i Marraffini 2019). Razvoj rezistencije na fage može imati negativan utjecaj na bakterije: može uzrokovati smanjenje fitnesa, smanjenu efikasnost produkcije polisaharida, gubitak virulencije, skraćenje životnog vijeka, te povećanu osjetljivost na antibiotike (Gordillo Altamirano i Barr 2019). Kod bakteriofaga se mogu razviti mehanizmi kojima zaobilaze bakterijske mehanizme rezistencije (Rostøl i Marraffini 2019).

#### 1.4.5. Tehnike uzgoja i proučavanja bakteriofaga

Neke od postojećih tehnika uzgoja i proučavanja bakteriofaga su: liza bakterijske kulture (engl. *culture lysis*) – uzgoj faga u tekućim bakterijskim kulturama te promatranje lize bakterija u kulturi; metoda plakova (engl. *plaque testing*) – izlijevanje više serijskih razrjeđenja suspenzije faga i bakterije domaćina (razmaz ili unutar mekog agara) na podloge kako bi se uzgojili plakovi; metoda čistina tehnikom nakapavanja (engl. *spot testing*) – nakapavanje suspenzija faga na medij inokuliran bakterijama kako bi se, nakon inkubacije, dobile čistine na bakterijskoj livadi uzrokovane lizom bakterija; kombinirana tehnika čistina i plakova (miješani *spot* i *plaque testing*; u ovom radu zvano metoda čistina i plakova tehnikom nakapavanja) – nakapavanje serijskih razrjeđenja suspenzije faga na medij inokuliran bakterijama kako bi se na dijelu ploče dobile čistine, a na dijelu zasebni plakovi (Hyman 2019); konfluentna liza – liza cijele bakterijske livade nastala spajanjem velikog broja uzgojenih plakova (Abedon 2018). Uzgoj plakova je centralna i najvažnija tehnika u istraživanjima faga (Abedon i Yin 2009). Jedan od oblika metode plakova je metoda plakova u dvostrukom agaru, gdje se mješavina bakterije i razrjeđenja suspenzije faga izlijeva unutar rastopljenog agara manje gustoće na agar veće gustoće (Francis i sur. 2017).

#### 1.4.6. Plakovi

Plak je prostorno ograničena populacija bakteriofaga nastala iz jedne točke inicijacije (jednog faga ili inficirane bakterije), koja uzrokuje lokalno smanjenje broja bakterija domaćina na bakterijskoj livadi, zbog čega je vidljiv golim okom (Abedon 2018). Jednostavnije rečeno, plak je čistina u bakterijskoj livadi nastala djelovanjem faga koji se difuzno šire iz jedne točke inicijacije (Abedon i Yin 2009). Plakovi, odnosno bakterijska livada u kojoj nastaju, se uzgaja na ili unutar krutog ili polukrutog medija, koji je najčešće agarni. Točka inicijacije plaka, koja nastaje infekcijom jedne bakterije fagom (prije ili nakon izlijevanja na kruti medij), se naziva „*plaque forming unit*” -



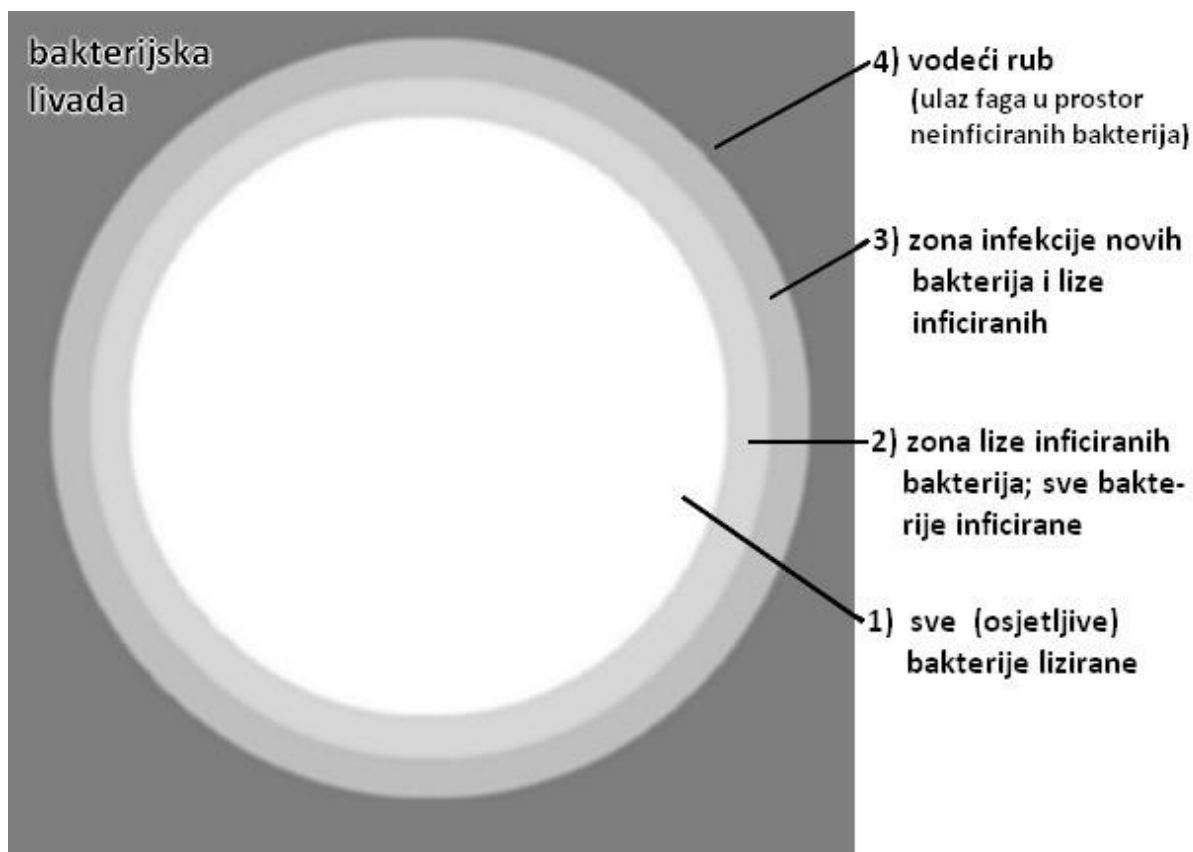
PFU (Abedon 2018). Bakterije se uglavnom ne mogu kretati unutar agara u kojem su izlivenne, stoga su bakteriofagi jedini koji difundiraju na ploči (Abedon i Yin 2009). Plakovi unutar (polukrutog) medija rastu u obliku sfere, čiji oblik mogu ograničiti dimenzije (debljina) agara u kojem rastu (Abedon 2018).

Metoda uzgoja plakova se koristi u svrhu izolacije, pročišćavanja i prebrojavanja faga, te proučavanja njihovih određenih svojstava, poput raspona mogućih domaćina, vijabilnosti i dr. (Abedon 2018). Smatra se da uzgoj plakova na bakterijama unutar polukrutog medija simulira rast populacije faga unutar prirodnih prostornih struktura u kojima rastu bakterije, poput biofilma, unutar tla, te na ili unutar tkiva biljaka i životinja (Abedon i Yin 2008).

Plakovi rastu za vrijeme formiranja bakterijske livade, a rast im prestaje kada bakterije uđu u stacionarnu fazu rasta, osim u slučaju iznimke kao što je fag T7 (Abedon 2018). Plak se formira ponavljanjem nekoliko koraka: 1) adsorpcija faga na ne-inficiranu bakteriju domaćina, 2) infekcija bakterije, 3) inhibicija umnažanja bakterije, koja je najčešće rezultat lize bakterijske stanice, 4) otpuštanje novosintetiziranih faga, 5) difuzija bakteriofaga (Abedon 2018). Plak ima nekoliko faza formiranja: 1) primarna adsorpcija faga na bakteriju domaćina, 2) početna umnažanja bakteriofaga (stopa rasta plaka nije konstantna), 3) faza povećanja plaka (sa konstantnom stopom/brzinom rasta), te 4) konačna faza prestanka umnažanja faga (Abedon i Yin 2009). Plakovi određenih faga mogu imati i peti korak modifikacije plaka nakon završetka rasta plaka (Abedon i Yin 2008). Rast plaka je posljedica izmjene difuzije virusa i povećanja njihovog broja umnažanjem u bakterijama nakon infekcije. Za vrijeme rasta plaka raste i broj bakterija koje prolaze kroz svoje stadije rasta i umnažanja (Abedon i Yin 2008). Bakterije rastu u obliku mikrokolonija (mala kolonija nastala klonalnim umnažanjem bakterije), što ima poseban utjecaj na morfologiju plaka (Abedon 2018).

Morfologije plakova se mogu razlikovati kvantitativno, odnosno mjerom promjera plaka, te kvalitativno, odnosno generalnim izgledom plakova, poput zamućenosti (Abedon i Yin 2008). Izgled plakova istog faga je uglavnom konstantan u standardiziranim uvjetima (Gallet i sur. 2011), te se različiti tipovi faga često mogu razlikovati prema morfologiji plakova koje stvaraju (Abedon 2018).

Plak se tijekom rasta može podijeliti u nekoliko zona: 1) zona gdje su sve (osjetljive) bakterije lizirane, 2) zona gdje su sve bakterije inficirane, ali nisu sve i lizirane, 3) zona gdje se inficiraju nove bakterije, te liziraju zaražene bakterije, 4) vodeći rub – prostor neinficiranih bakterija u kojeg prodiru fagi (Slika 2). Završetkom rasta iz treće zone, te ponekad druge zone, se mogu razviti dijelovi plaka veće zamućenosti (mjesto gdje sve bakterije nisu lizirane, stoga je plak na tom dijelu manje proziran) (Abedon 2018).



Slika 2: Zone rastućeg plaka na bakterijskoj livadi (2D prikaz, pogled sa gornje/donje strane ploče). Prilagođeno prema [Abedon \(2018\)](#).

Veličina plaka ovisi o njegovoj stopi/brzini rasta (koja je uglavnom konstantna za vrijeme rasta tog plaka), i vremenu dostupnom za rast prije nego bakterijska livada uđe u stacionarnu fazu. Kasnija inicijacija plaka stoga rezultira manjim plakom (Abedon 2018). Na veličinu plaka utječe nekoliko faktora: sposobnost difuzije faga, brzina adsorpcije odnosno afinitet faga za bakteriju, duljina latentnog perioda faga (vrijeme u kojem fagi inficiraju stanicu prije otpuštanja novih faga), veličina otpusta (engl. *burst size*), fiziološko stanje bakterija i gustoća livade, dostupnost nutrijenata, gustoća agara i njegova isušenost (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018). Veća sposobnost difuzije faga i veća veličina otpusta rezultiraju većim plakovima (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018). Kraći latentni period može rezultirati većim plakovima (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018), iako moguće da postoji kompliciraniji odnos između vremena lize bakterije i veličine plaka sa optimalnim vremenom lize koji rezultira najvećim plakovima (dok manje ili veće vrijednosti uzrokuju manje plakove), moguće zbog veze između vremena lize i veličine otpusta faga (Gallet i sur. 2011). Manja sposobnost adsorpcije rezultira većom difuzijom, ali manjim brojem faga koji stvaraju plak (Abedon i Yin 2009), stoga se teoretski očekuje da postoji optimalna stopa adsorpcije, a da bi veće ili manje vrijednosti rezultirale manjim plakom (Gallet i sur. 2011). Dulje vrijeme rasta kulture bakterija rezultira većim plakovima. Manja gustoća bakterijske livade omogućava difundiranje faga kroz veće udaljenosti prije adsorpcije i stoga veće plakove, te veća gustoća

bakterija pri inicijaciji livade uzrokuje brže sazrijevanje livade i manje plakove (Abedon i Yin 2009). Veća dostupnost kvalitetnih nutrijenata i dobra mogućnost puferiranja medija (na što mogu utjecati i donji i gornji agar kod metode u dvostrukom agaru) uzrokuje vremenski dulji rast bakterijske livade i kraći latentni period faga, te stoga i veće plakove (Abedon 2018). Manja gustoća agara uzrokuje bržu difuziju i veće plakove, dok isušnost agara uzrokuje manje plakove (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018). Veća stopa difuzije, te time veći plak, može biti posljedica malih dimenzija faga (Abedon i Yin 2009). Pokazano je da neki fagi s većim dimenzijama glava stvaraju manje plakove, najvjerojatnije uzrokujući sporiju difuziju faga kroz agar (Jurczak-Kurek i sur. 2016).

Morfologija plaka ovisi o sposobnosti faga da lizira mikrokolonije – liza manjeg broja mikrokolonija ili djelomična liza mikrokolonija rezultira zamućenijim izgledom. Sposobnost faga da lizira mikrokoloniju ovisi o trenutku kada fagi dođu do mikrokolonije koja raste tijekom inkubacije. Širenjem vodeći rub plaka dolazi u doticaj sa sve većim mikrokolonijama (pošto su imale više vremena za rast) koje je teže lizirati, stoga će najvjerojatnije središte plaka biti prozirnije, sa povećanjem zamućenja (turbiditet) prema rubu plaka. Veća sposobnost faga da lizira veće mikrokolonije rezultira manje zamućenim plakom, a moguće i većim promjerom plaka (Abedon 2018). Jedna od teorija uzroka manje sposobnosti lize veće mikrokolonije je ulazak bakterija unutar mikrokolonija u stacionarnu fazu rasta, odnosno fazu rasta otporniju na lizu fagima, zbog čega je teže lizirati središte mikrokolonije (Abedon 2018, Eriksen i sur. 2018). Druga dokazana teorija ukazuje da postoji kritična masa mikrokolonije, nakon koje umnažanje bakterija u unutarnjem dijelu mikrokolonije nadbrojava bakterije koje liziraju fagi na periferiji mikrokolonije (Eriksen i sur. 2018). Plakovi mogu imati različitu konačnu morfologiju: proziran plak, plak sa prozirnim centrom i mutnom periferijom, kao i mutni plak (Jurczak-Kurek i sur. 2016). Plak sa prozirnim centrom i povećanjem zamućenosti prema periferiji se naziva „*bullseye*” morfologijom. Alternativno se tim imenom prozivaju plakovi sa mutnim središtem i prozirnijom periferijom, što je posljedica stvaranja lizogena i imuniteta superinfekcije (Abedon 2018). Izvan samog ruba plaka se može formirati tzv. „*halo*” - prostor izvan plaka koji je manje zamućen od livade i zamućeniji od samog plaka, a posljedica je difuzije virusnih hidrolizirajućih enzima (depolimeraze izvanstanične polimerne tvari), koji mogu lizirati kapsule bakterija (Abedon 2018). Umjereni fagi često stvaraju mutne plakove (Abedon i Yin 2008, Jurczak-Kurek i sur. 2016).

## 1.5. Terapija fagima

### 1.5.1. Karakteristike i povijest

Terapija fagima je primjena virulentnih faga direktno na pacijenta sa svrhom lize bakterijskog patogena koji uzrokuje klinički važnu infekciju (Gordillo Altamirano i Barr 2019).

Terapija fagima može biti monofagna, gdje se koristi samo jedan soj faga, ili polifagna, gdje se koristi više različitih bakteriofaga u obliku „virusnog koktela”. Monofagna terapija se smatra manje učinkovitom od polifagne terapije (Gordillo Altamirano i Barr 2019). Polifagna terapija može imati više različitih oblika: ustaljena gotova mješavina različitih faga, kokteli faga koji se konstantno modificiraju dodavanjem faga protiv novih cirkulirajućih sojeva bakterija, personalizirana terapija fagima, te *in vitro* i genetički modificirani fagni terapeutici (Nikolich i Filippov 2020).

Terapija fagima se može koristiti i u sinergiji s antibioticima, koji u subletalnim koncentracijama mogu imati pozitivan učinak na propagaciju faga (Nikolich i Filippov 2020).

Pozitivne strane terapije fagima, odnosno prednosti terapije fagima nad terapijom antibioticima su: brza i lagana izolacija, manji troškovi izolacije (Taati Moghadam i sur. 2020), specifičnost za bakteriju domaćina zbog čega ne štete prirodnoj mikroflori pacijenta, samoograničavanje – prestaju djelovati nakon nestanka bakterije domaćina, samoumnjažanje zbog čega primijenjene doze mogu biti manje, aktivnost protiv bakterijskih biofilmova, ne utječu na stanice sisavaca, mogu ju koristiti ljudi alergični na antibiotike (Gordillo Altamirano i Barr 2019), te se lako manipuliraju različitim genetskim te *in vitro* i *in vivo* evolucijskim tehnikama (Burrowes i sur. 2011).

Nedostaci terapije fagima su: potreba za točnom identifikacijom bakterije koja uzrokuje infekciju jer specifičnost faga ograničava njihov raspon (Gordillo Altamirano i Barr 2019), bakterije mogu razviti rezistenciju na fage, fagi mogu biti prijenosnici gena za antibiotsku rezistenciju ili virulenciju, brzo liziraju bakterije što može uzrokovati prebrzo otpuštanje endotoksina (Taati Moghadam i sur. 2020), mogu biti inaktivirani djelovanjem urođenog i adaptivnog imunološkog odgovora, varijabilnost u „roku trajanja” i potreba nekih faga za držanjem u hladnim uvjetima (Burrowes i sur. 2011), problemi s formulacijom i stabilizacijom kao farmaceutskih preparata (Principi i sur. 2019), te je teško sa sigurnošću zaključivati o djelovanju faga *in vivo* prema rezultatima *in vitro* uzgoja (Taati Moghadam i sur. 2020). Terapija fagima nema još točno utvrđene regulatorne smjernice (Gordillo Altamirano i Barr 2019) i fagi nisu priznati kao farmaceutski lijekovi (Taati Moghadam i sur. 2020).

Bakteriolog Ernest H. Hankin je 1896. godine otkrio biološki entitet koji prolazi kroz miliporni filter (koji zadržava bakterije) i uništava kulture bakterija koje uzrokuju koleru (Wittebole i sur. 2014). 1915. godine je Frederick Twort objavio rad o „prenosivoj bakterijskoj lizi”, gdje je opisao pokus (bez objašnjenja uzroka) u kojem je izolirao entitet koji uzrokuje lizu kolonija vrsta iz roda *Staphylococcus*, čiji je filtrirani izolat uzrokovao čistine unutar bakterijske livade različitih sojeva navedene vrste (Chanishvili 2012). Iste godine je Felix d’Herelle eksperimentirao s fekalnim filtratima francuskih vojnika oboljelih od dizenterije, gdje je na hranjivoj ploči inkubirao izolat filtriran od bakterija i bakterije izolirane iz istih izvora i dobio čistine koje je na kraju prozvao

plakovi. Rezultate je javno iznio 1917. godine. On je tvrdio da je fenomen uzrokovan virusima kojima je dao naziv bakteriofagi, te ih je ubrzo počeo koristiti u terapeutske svrhe za liječenje dizenterije, kolere i kuge (Chanishvili 2012). Prvi komercijalni preparat faga protiv kolere je pripremljen u institutu u Tbilisiju (Gruzija), a preparati za liječenje različitih bolesti su (komercijalno) proizvedeni i korišteni i u Indiji, Parizu, Brazilu i SAD-u (Chanishvili 2012). Rezultati terapija su bili kontradiktorni, a kako su se antibiotici počeli široko koristiti, terapija fagima je napuštena u većini zapadnih zemalja (Chanishvili 2012) u 1940-ima (Wittebole i sur. 2014). Istraživanja u području terapije fagima su nastavljena u zemljama bivšeg SSSR-a, Poljskoj i Indiji (Wittebole i sur. 2014), s *Eliava Institute of Bacteriophage* u Tbilisiju kao jednim od najvažnijih institucija (Chanishvili 2012), zajedno sa *Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy* u Poljskoj (Gordillo Altamirano i Barr 2019). Interes za terapiju fagima se vratio na zapadu 1980-ih, s velikim porastom u zadnjih deset godina (Principi i sur. 2019). Do danas su provedena različita istraživanja terapije fagima u životinja i ljudima protiv različitih bakterija, kao što su *E. coli*, *A. baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* (Principi i sur. 2019). Neka od važnijih istraživanja su kliničko istraživanje faze I/II provedeno 2009. godine liječenja kroničnog otitisa uzrokovanog sojem *P. Aeruginosa* rezistentnim na antibiotike, te Phagoburn studija 2015-2017. godine, koja je opisana kao prvo kliničko testiranje provedeno po potrebnim standardima. Provedene su i individualne studije milosrdne primjene terapije fagima (Gordillo Altamirano i Barr 2019). U novija vremena su provedena istraživanja terapije fagima na ljudima za liječenje urinarnih infekcija (faze II/III, Gruzija), gastrointestinalnih poremećaja (kao prebiotik, SAD), venskih ulkusa uzrokovanih bakterijama *E. coli*, *P. aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* (faza I, SAD), dijabetičkih ulkusa stopala uzrokovanih bakterijom *S. aureus* (faza I/II, Francuska), proljeva uzrokovanih enterotoksičnom *E. coli* (Bangladeš), opekline inficiranih bakterijom *P. Aeruginosa* (Belgija, Francuska, Švicarska), te intravenske terapije protiv različitih oboljenja u Poljskoj (Furfaro i sur. 2018).

### 1.5.2. Izolacija faga u svrhu terapije

Bakteriofage za protubakterijsku terapiju treba izolirati iz okoliša. Okoliš pogodan za izolaciju faga je onaj u kojem je prisutna bakterija za koju želimo izolirati specifične fage. Glavna metoda izolacije se sastoji od nekoliko koraka: 1) uzorkovanje iz okoliša, 2) procesiranje uzorka (centrifugiranje, filtriranje; ovaj korak nije obavezan), 3) obogaćivanje uzorka, odnosno umnažanje specifičnih faga miješanjem uzorka i bakterija domaćina te inkubacijom koja je najčešće prekonocna, 4) pročišćavanje uzorka centrifugiranjem i filtracijom, 5) testiranje uzorka na prisustvo faga, što se može postići različitim metodama (liza tekuće kulture bakterija, metoda čistina tehnikom nakapavanja, metoda plakova), 6) izolacija faga i pročišćavanje izolata, najčešće

tehnikom plakova, 7) testiranje na poželjna svojstva faga za primjenu u terapijske svrhe. Ukoliko se ciljana bakterija teško kultivira ili je visoke patogenosti, mogu se koristiti srodne bakterije koje su pogodnije za laboratorijski rad, ali se nakon izolacije mora provjeriti sposobnost faga da inficiraju ciljane bakterije (Hyman 2019). Otpadne/kanalizacijske vode se smatraju optimalnim izvorom mnogih specifičnih bakteriofaga (Mattila i sur. 2015).

#### 1.6. Bakteriofagi specifični za *A. baumannii*

Zbog širenja višestruke rezistencije na antibiotike u vrste *A. baumannii*, terapija fagima se smatra obećavajućom alternativnom terapijom (Bagićska i sur. 2019).

Najboljim izvorom faga specifičnih za *A. baumannii* se smatra bolnička kanalizacija. Izolacija i umnažanje ovih faga se navodi izazovnim zadatkom, gdje je iznimno važno prilagoditi metode za svaki individualni fag (Bagićska i sur. 2019). Mnogi fagi specifični za *A. baumannii* su izolirani iz kanalizacije ili otpadnih voda, a kao izvor su korišteni i farmsko tlo, feces domaćih životinja, kirurške rane (Bagićska i sur. 2019), sputum pacijenata, klinički uzorci, te morske i jezerske vode (García-Quintanilla i sur. 2013). Ubrzo nakon povratka interesa za terapiju fagima u zapadnom svijetu (oko 1980-ih), dokazano je da specifični bakteriofagi mogu kontrolirati infekciju *A. baumannii* u miševa (Principi i sur. 2019). Prvi izvještaji koji karakteriziraju litičke fage specifične za *A. baumannii* su iz 2010. godine, a radi se o fagima AB1 i AB2. Fag AB2 je lizirao 25 od 125 testiranih kliničkih izolata, a pokazalo se da ima litičku aktivnost i protiv soja ATCC 19606 (kojeg sam koristila u svojem istraživanju). Prvi izolirani fagi su uglavnom imali manji raspon bakterija domaćina, ali su kasnije nađeni i fagi s nešto većim rasponom (García-Quintanilla i sur. 2013). Fagi specifični za *A. baumannii* (kao i neke druge ESKAPE bakterije) su prepoznati kao fagi s malim rasponom bakterija domaćina, a i bakterija često razvija mutante otporne na fage, stoga je za terapijske svrhe važno koristiti više faga odjednom (Nikolich i Filippov 2020). Mnoge izolirane fage specifične za *A. baumannii* odlikuje morfologija s repom (García-Quintanilla i sur. 2013, Bagićska i sur. 2019).

Provedena su različita istraživanja na životinjskim modelima (miševi i štakori) s različitim mjestima infekcije (pluća, rane, peritonealna šupljina, intranazalna infekcija, sepsa), gdje se testirala terapijska sposobnost jednog ili više faga, te su ta istraživanja imala pozitivne rezultate s većom stopom preživljavanja tretiranih životinja u odnosu na kontrolu. Terapija fagima je uspješno iskorištena i za liječenje pacijenta s pankreatitisom koji je bio inficiran s MDR *A. baumannii*, gdje je korišteno nekoliko koktela bakteriofaga (Bagićska i sur. 2019).

### 1.7. Bakteriofagi specifični za *E. coli*

Fagi specifični za bakterije koje obitavaju u crijevima sisavaca se lako izoliraju iz kanalizacije i fekalne materije (Hyman 2019), s obzirom da se defekacijom otpuštaju u okoliš, a smatra se da tamo mogu odolijevati okolišnim uvjetima dulje od samih domaćina (Muniesa i sur. 2011). Štoviše, kolifagi se mogu koristiti kao indikatori fekalne kontaminacije određenih vodenih područja (Wentzel i sur. 1982, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)). Bakteriofagi specifični za *E. coli* se uobičajeno izoliraju iz kanalizacije, bolničkih otpadnih voda, zagađenih rijeka, te fekalnih uzoraka ljudi i životinja (Bolocan i sur. 2016).

Liječenje rezistentnih i invazivno-adherentnih sojeva *E. coli* antibioticima može uzrokovati teški poremećaj mikrobiote i reinfekciju, stoga se proučava terapija fagima kao alternativa za liječenje takvih oboljenja. Postignuti su uspješni rezultati u nekim *in vitro* i prekliničkim *in vivo* istraživanjima, stoga postoji mogućnost budućeg razvoja terapije fagima za liječenje oboljenja uzrokovanih bakterijom *E. coli* (Bolocan i sur. 2016). Jednim od najvažnijih istraživanja terapije fagima na životinjskim modelima u zapadnom svijetu se smatraju uspješna istraživanja iz 1980-ih, kada je procjenjivana mogućnost sprečavanja i liječenja akutnog proljeva uzrokovanim bakterijom *E. coli* (Principi i sur. 2019).

### 1.8. Centralni uređaj za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba

Centralni uređaj za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba (CUPOVZ) je postrojenje za sekundarnu obradu otpadnih voda. Otpadne vode potječu od kombiniranog kanalizacijskog sustava otpadnih voda bolnica, što uključuje otpadne vode svih devet kliničkih bolnica grada Zagreba (Hrenovic i sur. 2016), domaćinstava, industrijskih otpadnih voda i oborinskih voda (Hrenovic i sur. 2016, Hrenovic i sur. 2017), te voda šest potoka koji su dio gradske kanalizacije (Tušar i sur. 2009). Postrojenje provodi mehaničko pročišćavanje otpadnih voda (prvi stupanj obrade otpadne vode), što uključuje otklanjanje grubih i finih tvari, pijeska i masti iz otpadne vode, na što se nadovezuje biološko pročišćavanje, odnosno drugi stupanj pročišćavanja otpadne vode ([www.zov-zagreb.hr](http://www.zov-zagreb.hr)), što uključuje miješanje otpadne vode s aktivnim muljem u aeriranim biološkim reaktorima i njihovo odvajanje, čime se dobiva pročišćena otpadna voda (Tušar i sur. 2009).

Vrsta *A. baumannii* je prije izolirana iz influenta i efluenta otpadnih voda CUPOVZ (Hrenovic i sur. 2016). Pošto su bakterije *E. coli* fekalnog podrijetla i indikatori zagađenja vode fekalnom materijom (Percival i Williams 2014, Blount 2015, Jang i sur. 2017), trebale bi se nalaziti u otpadnim vodama koje obrađuje CUPOVZ.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U sklopu rastućeg interesa za terapiju fagima u tretiranju infekcija uzrokovanih bakterijom *A. baumannii*, primarni cilj ovog istraživanja je izolirati bakteriofage specifične za tu vrstu. Pošto je za okolišni uzorak, iz kojeg je cilj izolirati fage, izabran uzorak efluenta otpadne vode, kao kontrolu metodologije je bilo potrebno izolirati fage specifične za *E. coli*.

Specifični ciljevi ovog rada su bili:

- Izolirati bakteriofage koji inficiraju bakteriju *A. baumannii* i bakteriofage koji inficiraju bakteriju *E. coli* iz kompozitnog uzorka efluenta otpadnih voda uzorkovanog iz centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba
- Optimizirati metodu detekcije i izolacije specifičnih faga korištenjem tehnika konfluentne lize bakterijske livade, metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja, te tehnikom uzgoja plakova na livadama bakterija domaćina metodom plakova u dvostrukom agaru
- Opisati morfologiju dobivenih plakova, te odrediti broj uspješno izoliranih različitih faga specifičnih za bakteriju *A. baumannii* te za bakteriju *E. coli*
- Prirediti čiste izolate faga iz plakova različite morfologije, umnožiti ih, te odrediti titar konačnih izolata
- Morfološki okarakterizirati izolirane bakteriofage transmisijskom elektronskom mikroskopijom u svrhu potvrđivanja njihove različitosti.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### Bakterije

*Acinetobacter baumannii* Bouvet and Grimont ATCC 19606 ([www.atcc.org](http://www.atcc.org))

*Escherichia coli* LMM2632 (Buljubašić i sur. 2019)

##### Uzorak efluenta otpadnih voda

Efluent otpadne vode iz centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba (CUPOVZ) uzorkovan 6. 10. 2020. – kompozitni uzorak za period od 8 do 14 h, sakupljen u sterilnoj staklenoj boci volumena 1 L (uzorkovala prof. dr. sc. Jasna Hrenović)

##### Kemikalije

- etanol, 99,8%, Lach-ner, Češka
- kloroform, Carlo Erba, Francuska
- klorovodična kiselina, min. 36,5%, Kemika, Hrvatska
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer substance, Alkaloid, Sjeverna Makedonija
- Magnezijev sulfat heptahidrat *pro analysi*, Pliva tvornica lijekova, Hrvatska ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Natrijev klorid, Kemika, Hrvatska (NaCl)
- Nutrient broth (general purpose medium), Biolife, Italija
- LB-Broth (high salt for microbiology), Fluka Analytical
- Triptični sojin agar – TSA, Biolife, Italija
- EC X-gluc, Biolife, Italija

##### Uređaji

- Deionizator (Stakpure Ominatap 12 UV)
- Orbitalna tresilica (Biosan OS-10)
- Termostatirana tresilica (Edmund Buhler GmbH, KS-15)
- Vodene kupelji (Mettler, Julabo SW22)
- Inkubatori (Mettler; Kambič Laboratorijska oprema, I-50)
- Suhi termoblok (Eppendorf Thermomixer Comfort)
- Vrtložne miješalice (*vortex* Tehnica Vibromix 10; *vortex* technoKartell TK 35)
- Magnetska mješalica (technoKartel TK 23)

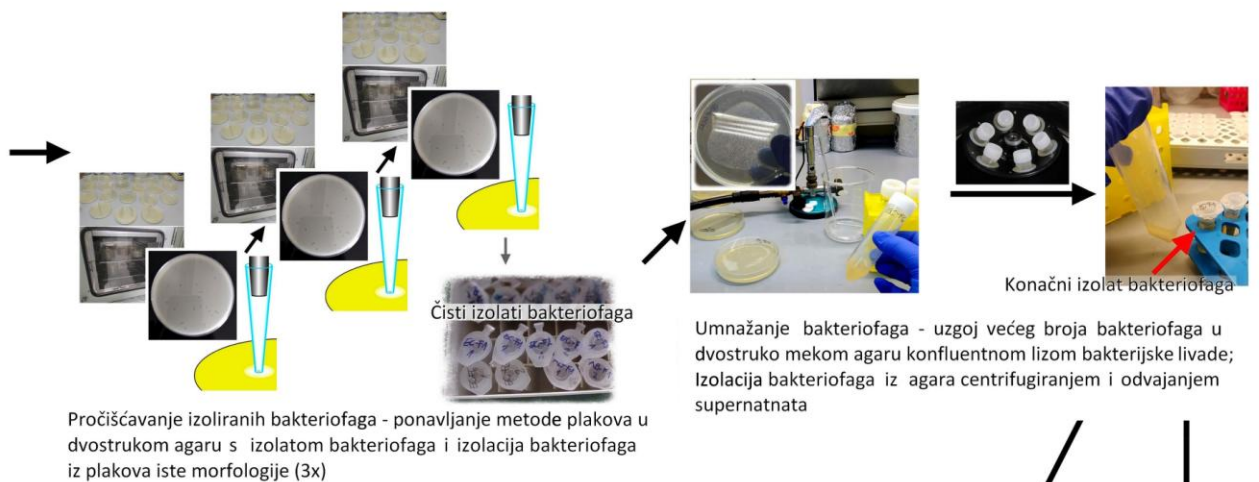
- pH metar (Sartorius)
- Tehničke vage (Mettler Toledo; Core Balance, Adam)
- Analitička vaga (SwissQuality, Precisa 62 A)
- Centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804 R; Sigma 4-16KS)
- Autoklav (Kambič Laboratorijska oprema, Avtoklav A-21)
- Spektrofotometar (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific), s pripadajućim Nanodrop 2000 računalnim programom na računalu
- Transiluminator (Cole Parmer CL-5000L)
- Mikroskopi (Olympus CX21; Zeiss)
- Lupa (Pro-Lux Microscope)
- Fotoaparat Nikon D3500 (dio D3500 15-55 VR kit)
- Adapter za fotoaparat i mikroskop NDPL-1(2x)
- Transmisijski elektronski mikroskop (Morgagni 268D, napona 70 kV); pripadajući računalni program na računalu (Microscope control TEM1)
- Kabinet s laminarnim strujanjem zraka (Klimaoprema, Cleanroom Tehnology)

### 3.2. METODE

Pokus izolacije i karakterizacije faga specifičnih za vrste *A. baumannii* ili *E. coli* iz uzorka efluenta sam provela po metodama razvijenim i prilagođenim prema Hyman (2019), Regeimbal i sur. (2016), Mattila i sur. (2015), Shende i sur. (2017), Ghajavand i sur. (2017), te Popova i sur. (2012). Glavni koraci u radu bili su (Slika 3):

1. Obogaćivanje uzorka, odnosno umnažanje faga specifičnih za *A. baumannii* ili *E. coli*.
2. Testiranje uzoraka na prisutnost specifičnih faga.
3. Izoliranje i pročišćavanje specifičnih faga iz plakova različite morfologije (uzgojenih metodom plakova u dvostrukom agaru).
4. Detaljno opisivanje morfološki različitih plakova, fotografiranje plakova i mjerenje njihovih dimenzija.
5. Određivanje titra konačnih (umnoženih) izolata faga.
6. Elektronska mikroskopija konačnih izolata faga – pokušaj dobivanja slika specifičnih faga.

Sav rad s bakterijskim kulturama, uzorcima, suspenzijama bakteriofaga i hranjivim medijima sam provodila u sterilnim uvjetima uz Bunsenov plamenik ili u kabinetu s laminarnim strujanjem zraka.



Slika 3: Pojednostavljeni slikovni prikaz korištene metodologije. Fotografija centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda je preuzeta sa službene stranice Zagrebačkih otpadnih voda ([www.zov-zagreb.hr/media](http://www.zov-zagreb.hr/media)).

### 3.2.1. Priprema hranjivih medija i pufera za fage

#### Priprema Luria-Bertani (LB) medija

Pri izvođenju ovog istraživanja bili su mi potrebni: tekući LB-medij, kruti LB-medij, tzv. meki LB-medij i tzv. dvostruko meki LB-medij. Potrebne volumene deionizirane vode sam odmjeravala prikladnim menzurama, a masu potrebnog LB-medija i agara uz pomoć tehničke vage, ili analitičke vage ukoliko je masa potrebnog praha bila manja od 2 g. Sve medije sam sterilizirala autoklaviranjem 20 min na 121 °C.

Tekući LB-medij sam pripremala prema uputama proizvođača, otapanjem LB-praha u deioniziranoj vodi, tako da je masena koncentracija bila 25 g/L. Nakon autoklaviranja sam ga pohranila pri 4 °C do korištenja.

Kruti LB-medij (1,5%-tni agar) sam pripremala kao i tekući LB medij s dodatkom 15 g/L agara. Nakon autoklaviranja sam izlivala približno 20 mL medija u Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Pripremljene krute LB-podloge sam čuvala pri 4 °C ili na sobnoj temperaturi, a prije korištenja sam ih temperirala pri 37 °C.

Meki LB-medij (0,75%-tni agar) sam pripremala kao i tekući LB medij s dodatkom 7,5 g/L agara. Nakon autoklaviranja sam ga pohranila pri 4 °C, a po potrebi ga otapala u mikrovalnoj pećnici.

Dvostruko meki LB-medij (0,375%-tni agar) sam pripremala na dan pokusa, miješanjem tekućeg i mekog LB medija u omjeru 1:1, ili miješanjem tekućeg i krutog LB medija u omjeru 3:1, stoga je masena koncentracija agara bila 3,75 g/L.

#### Priprema pufera za fage

Pufer za fage sam pripremila prema popratnom internetskom materijalu rada Hanauer i sur. (2006).

Sastav pufera za fage:

10 mM Tris

10 mM MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O

68,45 mM NaCl (4 g/L)

Za pripremu pufera (150 mL) sam odvagala potrebne mase kemikalija na analitičkoj vagi, te ih otopila u deioniziranoj vodi. Podesila sam vrijednost pH na 7,5 dodatkom klorovodične kiseline (pH≈3, kasnije razrijeđenu) uz miješanje na magnetskoj miješalici, te nadopunila deioniziranom vodom do potrebnog volumena. Pufer sam sterilizirala autoklaviranjem 20 min pri 121 °C.

### 3.2.2. Priprema bakterija domaćina

Prije provođenja pokusa, bakterija *A. baumannii* je čuvana imobilizirana na kuglicama, dok je bakterija *E. coli* čuvana u 25%-tnom glicerolu, obje pri -80 °C. Za vrijeme daljnjeg provođenja pokusa (nakon postupka obogaćivanja uzorka) obje bakterije su čuvane u 25%-tnom glicerolu pri -80 °C.

Bakterije domaćine sam presađivala iz glicerola na krute LB-podloge *streak-plate* metodom, te inkubirala preko noći pri 37 °C, kako bih dobila zasebne kolonije. Tako pripremljene ploče s bakterijama sam čuvala pri 4 °C i koristila po potrebi najviše dva tjedna, nakon čega sam pripremala nove kulture.

#### Priprema tekućih bakterijskih kultura

Tekuće bakterijske kulture sam pripremila prenošenjem jedne bakterijske kolonije sterilnom ezom u 5 mL tekućeg LB-medija za postupak preliminarnog utvrđivanja prisutnosti faga, jedne bakterijske kulture u 3 mL tekućeg LB-medija za postupak metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja, te dvije do tri bakterijske kolonije u 10 mL tekućeg LB-medija za ostale postupke. Sadržaj sam dobro promiješala uz pomoć vrtložne miješalice (*vortex technoKartell*), te inkubirala u termostatiranoj tresilici pri 37 °C s konstantnim miješanjem na 300 mot/min u vremenskom trajanju određenim pokusom, ili do optičke gustoće ( $OD_{600}$ , od engl. „*optical density*“) određene pokusom. Vrijednost  $OD_{600}$  je kod svih postupaka, osim preliminarnog utvrđivanja prisutnosti faga i metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja, bila u rasponu 0,400 – 0,500 za bakteriju *E. coli* i 0,700 – 0,800 za *A. baumannii* (Francis i sur. 2017).

Svježu tekuću kulturu *E. coli* sam uvijek pripremala na dan pokusa. Svježu tekuću kulturu *A. baumannii* sam za postupak preliminarnog utvrđivanja prisutnosti faga pripremila na dan pokusa, ali pošto je *A. baumannii* imala sporije vrijeme umnažanja, za metodu plakova u dvostrukom agaru pripremala sam je dan prije provedbe pokusa i inkubirala preko noći. Pripremljenu prekonoćnu kulturu razrijedila sam tekućim LB-medijem tako da vrijednost  $OD_{600}$  bude u rasponu od 0,700 do 0,800, kako bi se izbjegli problemi s uzgojem bakterijske livade koji se znaju pojavljivati uglavnom kada je  $OD_{600}$  iznad 0,8 (Francis i sur. 2017).

#### Mjerenje optičke gustoće tekućih bakterijskih kultura

Kod metode plakova u dvostrukom agaru, bakterije unutar tekuće kulture moraju biti u povoljnom stadiju rasta da bi, nakon prekonoćne inkubacije u mekom LB-mediju, stvorile bakterijsku livadu na kojoj su vidljivi plakovi (Francis i sur. 2017). Kod svih metoda je bitno da su bakterije u pogodnoj fazi rasta kako bi bile prijemljive na bakteriofage, s obzirom da su bakterije u stacionarnoj fazi uglavnom otporne na infekciju fagima (Abedon 2018). Jesu li bakterije u dobrom

stadiju rasta sam provjeravala mjerenjem optičke gustoće tekuće bakterijske kulture na valnoj duljini od 600 nm ( $OD_{600}$ ).

Vrijednost  $OD_{600}$  određivala sam spektrofotometrijski u 500  $\mu$ L bakterijske kulture, koju sam dobro resuspendirala mikropipetom prije uzorkovanja, u plastičnoj kiveti. Za nuliranje instrumenta sam koristila 500  $\mu$ L tekućeg LB-medija. Ukoliko je vrijednost  $OD_{600}$  narasla preko željenog raspona kulturu sam razrijedila tekućim LB-medijem do potrebne vrijednosti i ponovno izmjerila.

### 3.2.3. Obogaćivanje uzorka – umnažanje specifičnih faga

Provela sam postupak obogaćivanja uzorka kako bi se povećala vjerojatnost za uspješnu izolaciju specifičnih faga iz okolišnog uzorka (Hyman 2019). Postupak je prilagođen prema Mattila i sur. (2015) i Regeimbal i sur. (2016). Bakterijama od interesa sam obogaćivala nefiltrirani (sirovi) i filtrirani efluent.

Otpriblike polovina uzorka ( $\approx 500$  mL) efluenta je profiltrirana kroz filter pora 0,45  $\mu$ m (*Ahlstrom-Munksjö ReliaDisc™ CN-filter, steril*) sustavom za vakuum filtraciju kako bi se uklonile bakterije prisutne u uzorku (Hyman 2019), a koje su u kompeticiji s bakterijama domaćinima ciljanih faga (Serwer i sur. 2004). Fliter pora 0,45  $\mu$ m je dobar izbor za propuštanje najvećih bakteriofaga, ali i neke bakterijske vrste mogu proći kroz filter i zadržati se u uzorku (Hyman 2019).

Bakterija *E. coli* je sterilnom plastičnom ezom nasadena iz zamrznute kulture na unaprijed pripremljenu EC X-gluc i LB hranjivu podlogu. Bakterija *A. baumannii* je s kuglica na kojima je bila imobilizirana nasadena na unaprijed pripremljenu TSA i LB hranjivu podlogu. Inkubirala sam ih 24 sata pri 37 °C u inkubatoru (Memmert). Nakon inkubacije sam pripremila suspenzije svake od bakterija tako da je ezom dodano  $\approx 30$   $\mu$ L bakterijske kulture s obje hranjive podloge na kojima je uzgojena bakterija u 9 mL hranjivog bujona (*Nutrient broth*; Biolife, 8 g/L), te sam sadržaj obje epruvete dobro pomiješala na vrtložnoj miješalici (Vorteks Tehnica Vibromix 10) na 40 Hz u trajanju od 3 min. Također sam bakterije s hranjivih podloga obojala po Gramu s unaprijed pripremljenim kompletom kemikalija prema protokolu opisanom u Stilinović i Hrenović (2009), kako bih okvirno provjerila čistoću kultura bakterija i upoznala se s nekim morfološkim svojstvima bakterija koje ću koristiti u pokusu. Ukratko, razmazala sam malu količinu bakterija po predmetnom stakalcu, fiksirala provlačenjem kroz plamen, nanijela boju kristal violet u trajanju od 3 min, nanijela Lugolovu otopinu u trajanju od 1 min, isprala preparat 70% -tnim etanolom i vodom te osušila, nanijela safranin u trajanju od 30 sek i isprala tekućom vodom; osušeni preparat sam pogledala pod imerzijskim objektivom mikroskopa Zeiss povećanja 1000x.

Postupak obogaćivanja uzoraka sam provela u staklenim bocama s po 100 mL sirovog ili profiltriranog efluenta obogaćenog s 3 g praha za hranjivi bujon (*Nutrient broth, Biolofe*) dodavanjem po 2 mL odgovarajuće suspenzije bakterija domaćina. Kulture sam inkubirala 24 sata pri 37 ili 42 °C uz konstantno miješanje pri 150 rpm (37 °C – orbitalna tresilica Biosan OS-10, 42 °C – horizontalna tresilica Memmert). U konačnici sam za svaku bakteriju imala četiri različita uzorka (Tablica 1).

Tablica 1. Različiti tretmani umnažanja specifičnih faga i oznake pripremljenih otopina.

| Oznaka   | Vrsta bakterije     | Temperatura inkubacije prilikom umnažanja faga [°C] | Filtrirani efluent DA/NE |
|----------|---------------------|---|--------------------------|
| AB, 37   | <i>A. baumannii</i> | 37  | NE                       |
| AB, 37 F | <i>A. baumannii</i> | 37  | DA                       |
| AB, 42   | <i>A. baumannii</i> | 42  | NE                       |
| AB, 42 F | <i>A. baumannii</i> | 42  | DA                       |
| EC, 37   | <i>E. coli</i>      | 37  | NE                       |
| EC, 37 F | <i>E. coli</i>      | 37  | DA                       |
| EC, 42   | <i>E. coli</i>      | 42  | NE                       |
| EC, 42 F | <i>E. coli</i>      | 42  | DA                       |

Uzorke s potencijalno umnoženim specifičnim fagima sam centrifugirala i profiltrirala kako bi se uklonile bakterije i ostatci liziranih bakterija (Hyman 2019), te otpad iz efluenta. Po 90 mL svakog obogaćenog uzorka sam raspipetirala u tri sterilne plastične epruvete od 30 mL, te ih centrifugirala 10 minuta na 8000 x g, pri 4 °C. Zatim sam medicinskom štrcaljkom (20 mL) s iglom odvajala supernatant od taloga, te ga filtrirala kroz filtere za štrcaljke veličine pora od 0,2 µm (*Whatman syringe filter 25MM GD/X, sterile*) u sterilnu staklenu bocu. Tako pripremljene obogaćene i pročišćene uzorke efluenta (u daljnjem tekstu samo „uzorci efluenta”) sam čuvala pohranjene pri 4 °C i koristila u daljnjim pokusima, odnosno iz njih sam pokušala izolirati specifične fage.

U slučaju da je tijekom kasnijeg rada uočeno zagađenje nekog uzorka (vidljivo kao kontaminirajuće kolonije u hranjivim podlogama), te uzorke (EC 37F, AB 37) sam profiltrirala filterima za medicinske štrcaljke veličine pora 0,22 µL (*Rotilabo-Spritzenfilter, CME, steril*).

*Napomena: u daljem tekstu sve Petrijeve zdjelice koje sadrže meki ili dvostruko meki LB-medij izliven na kruti LB-medij, radi jednostavnosti i preglednosti, nazivam „ploče”.*

#### 3.2.4. Preliminarno utvrđivanje prisutnosti faga

Prisutnost bakteriofaga specifičnih za odabrane bakterije domaćine u uzorcima sam provjerila metodom konfluentne lize bakterijske livade. U ovoj fazi nisam pokušavala dobiti zasebne plakove iz kojih se mogu izolirati fagi, već utvrditi dolazi li do lize bakterija u agaru koja bi ukazivala na moguće prisustvo barem jednog soja specifičnih bakteriofaga. Postupak je prilagođen prema Jothikumar i sur. (2000), s detaljnim postupcima i volumenima određenima prema internom postupku laboratorija.

Priredila sam po 5 mL dvostruko mekog agara u plastičnim epruvetama, te ga pohranila u termostatiranu tresilicu pri 45 °C, s konstantnim miješanjem od 120 mot/min, dok nije bio potreban za nastavak pokusa.

Potreban volumen tekućih bakterijskih kultura pripremila sam postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2., s inkubacijom od 2 h.

Pomiješala sam 1 mL tekuće bakterijske kulture (*E. coli* ili *A. baumannii*) i 1 mL pripadajućeg uzorka efluenta (EC 37, EC 37F, EC 42, EC 42F s *E. coli*; AB 37, AB 37F, AB 42, AB 42F s *A. baumannii*) u duplikatu, te inkubirala u vodenoj kupelji (Julabo SW22) 45 minuta pri 37 °C, s konstantnom trešnjom na 120 rpm. Na isti način sam pripremila i bakterijske kontrole koje su sadržavale samo 1 mL tekuće bakterijske kulture.

Nakon 45 min inkubacije sam suspenziju bakterija i uzorka pomiješala s 5 mL dvostruko mekog agara, sadržaj promiješala pažljivim okretanjem zatvorene epruvete nekoliko puta, te ga izlila na krutu LB-podlogu. Nakon polimerizacije agara pripremljene ploče sam inkubirala preko noći pri 37 °C okrenute poklopcem prema gore.

Sve ploče sam pregledala nakon ≈21 h inkubacije. Pregledala sam bakterijske kontrole kako bih utvrdila je li bakterijska livada narasla, je li homogena, te utvrdila da nema inhibicije rasta bakterija (što bi ukazivalo na moguću kontaminaciju bakterijske kulture i nevaljanost rezultata). Provjerila sam je li došlo do konfluentne lize na pločama s mješavinom uzoraka i bakterija, postoje li zone inhibicije rasta bakterija, te postoje li razlike naspram kontrolnih ploča.

#### 3.2.5. Metoda čistina i plakova tehnikom nakapavanja

Metodu čistina i plakova tehnikom nakapavanja sam provela kako bih odredila okvirnu koncentraciju svih faga specifičnih za bakteriju domaćina (*E. coli* ili *A. baumannii*) u priređenim uzorcima, te time znala odrediti koja razrjeđenja uzoraka ću trebati koristiti u daljnjim postupcima kako bih dobila jasno odvojene plakove. Postupak je prilagođen prema Hajsig i Delaš (2016).



Tekuće bakterijske kulture *E. coli* i *A. baumannii* priredila sam postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2.; mjerila sam vrijednost OD<sub>600</sub> obje kulture nakon 2 h, nakon čega sam bakterijsku kulturu *A. baumannii* inkubirala dodatna 2 h, te ponovno mjerila vrijednost OD<sub>600</sub>. Pogodnom vrijednosti OD<sub>600</sub> sam smatrala ≈0,1. Iako je OD<sub>600</sub> tekuće kulture *E. coli* bila veća, smatrana je prihvatljivom.

Meki LB-medij sam otopila u mikrovalnoj pećnici, raspipetirala po 5 mL u plastične epruvete, te ih stavila u vodenu kupelj pri 45 °C s konstantnom trešnjom pri 120 rpm, dok nije bio potreban za nastavak pokusa.

Priredila sam seriju decimalnih razrjeđenja svih uzoraka 10<sup>-1</sup>-10<sup>-7</sup> u LB-mediju, ukupnog volumena 1000 µL (svako razrjeđenje).

Za formiranje bakterijske livade sam pomiješala 5 mL mekog LB-medija i 100 µL tekuće bakterijske kulture, promiješala smjesu pažljivim okretanjem zatvorene epruvete nekoliko puta, te izlila na krutu LB-podlogu. Za svaku bakteriju sam priredila četiri bakterijske livade. Nakon što su se ploče skrtnule, s donje strane sam naznačila 16 pravokutnika podjednake veličine, koji označavaju mjesta na koja treba nakapati određena razrjeđenja uzoraka. Na bakterijsku livadu sam nakapala po 10 µL originalnog uzorka i njegova serijalna decimalna razrjeđenja (10<sup>-7</sup>-10<sup>-1</sup>) na za to predviđene pravokutnike, svaku otopinu u duplikatu. Nakon otprilike 1 h, kad su se kapljice upile u meki LB-medij, ploče sam stavila na inkubaciju pri 37 °C okrenute poklopcem prema dolje.

Nakon ≈21 h inkubacije za *A. baumannii*, odnosno ≈24 h za *E. coli*, detaljno sam pregledala ploče da utvrdim zone inhibicije rasta bakterija, odnosno pojavu čistina i plakova.

### 3.2.6. Metoda plakova u dvostrukom agaru

Metoda plakova u dvostrukom agaru se sastoji od miješanja suspenzije faga, bakterija i rastopljenog mekog agara, te izlijevanja na krutu LB-podlogu. Nakon inkubacije bi umnoženi fagi trebali stvoriti plakove u bakterijskoj livadi. Postupak je prilagođen prema Francis i sur. (2017).

Pripremila sam tekuću kulturu bakterije *E. coli* ili *A. baumannii* na način objašnjen u poglavlju 3.2.2.

Pripremila sam 3 mL mekog LB-medija na jednak način kao i u poglavlju 3.2.5.

Priredila sam seriju decimalnih razrjeđenja svih uzoraka s LB-medijem, a potrebna razrjeđenja sam odredila na temelju rezultata dobivenih metodom čistina i plakova tehnikom nakapavanja (poglavlje 3.2.5.). Za uzorke EC 37, EC 42, EC 42F to su bila razrjeđenja 10<sup>-1</sup>-10<sup>-8</sup>, za EC 37F 10<sup>-1</sup>-10<sup>-9</sup>, za AB 37 i AB 37F 10<sup>-1</sup>-10<sup>-7</sup>, te za AB 42 i AB 42F 10<sup>-1</sup>-10<sup>-5</sup>.

Sljedeći korak je adsorpcija faga na bakterijske stanice prije formiranja bakterijske livade, jer naknadna adsorpcija faga i inicijacija plaka može rezultirati manjim plakom (Abedon 2018), čime se otežava prepoznavanje plakova uzrokovanih različitim fagima. Također, pošto neki fagi

mogu imati prvi litički ciklus 10-12 min nakon infekcije, inkubacija ne smije trajati dulje od 10 min (Francis i sur. 2017). Za postizanje adsorpcije faga inkubirala sam 100  $\mu$ L razrjeđenja (četiri najveća priređena razrjeđenja za svaki uzorak efluenta) s 1000  $\mu$ L tekuće bakterijske kulture u epruvetama od 2 mL (pošto su oblog dna) 8 min pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sam mješavinu bakterija i razrjeđenja uzoraka pomiješala s pripremljenih 3 mL mekog LB-medija, promiješala sadržaj okretanjem zatvorene epruvete nekoliko puta, te pažljivo izlila na označenu krutu LB-podlogu. Postupak sam provodila u triplikatima za svako razrjeđenje.

Na isti način sam pripremila i kontrolne ploče: i) kontrolu na kontaminaciju LB-medija (K LB - 1100  $\mu$ L tekućeg LB-medija), ii) kontrolu na kontaminaciju uzorka (K ef - 100  $\mu$ L uzorka efluenta i 1000  $\mu$ L tekućeg LB-medija) i iii) kontrolu bakterijske livade (K EC/K AB - 100  $\mu$ L tekućeg LB-medija i 1000  $\mu$ L tekuće bakterijske kulture).

Nakon polimerizacije, sve ploče sam inkubirala pri 37 °C okrenute poklopcem prema dolje. Ploče s *E. coli* sam inkubirala  $\approx$ 24 h, a s *A. baumannii* sam napravila procjenu rezultata nakon  $\approx$ 24 h, te ih inkubirala dodatna  $\approx$ 24 h za potvrdu rezultata.

Za uzorke AB 37F, AB 42 i AB 42F sam, zbog negativnog rezultata na većim razrjeđenjima, postupak metode plakova u dvostrukom agaru provela i s razrjeđenjima  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , te s nerazrijeđenim uzorcima.

### 3.2.7. Opisivanje plakova i izolacija bakteriofaga iz plaka

Nakon inkubacije sam pregledala sve ploče s dvostrukim agarom. Provjerila sam sve tri kontrolne ploče: čistoću kontrola K LB i K ef (prozirnost mekog agara i prisutnost bakterijskih kolonija), te izgled bakterijske livade K EC/K AB – opći izgled, homogenost livade, prisutnost plakova. Ručno sam prebrojala sve plakove na svim pločama s uzorcima efluenta, pazeći da ih ne zamijenim za moguće zaostale mjehuriće zraka. Plakove sam dobro proučila bez optičkih pomagala pod različitim osvjetljenjima (pod halogenom rasvjetom laboratorija, na transiluminatoru), te pod lupom (Pro-Lux Microscope) na povećanjima 10x i 15x (te ponekad 20x i 25x), s osvjetljenjem iznad i ispod ploče koju sam proučavala. Opisala sam izgled plakova, te međusobne sličnosti i razlike. Temelje za razlikovanje plakova sam proučila iz Abedon (2018), te iz fotografija i opisa plakova iz Jurczak-Kurek i sur. (2016) i Shende i sur. (2017). Obratila sam pozornost na veličinu plakova, zamućenost (turbiditet) plakova – zamućenost cijelog plaka, postojanje razlika između zamućenosti centra, prostora prema rubu i samog ruba plaka, debljinu prijelaznog prostora prema rubu, oblike rubova, te na prisutnost ikakvih vidljivih zona (poput „halo”) izvan samog ruba plaka.

Za svaku pretpostavljenu morfologiju plakova sam odabrala dva pokazna plaka (ukoliko sam našla dva jednaka) koji su jasno odvojeni od drugih plakova, što je važno kako ne bi došlo do

miješanja dvaju različitih faga. Iz odabranih plakova sam izolirala bakteriofage (opisano na kraju potpoglavlja) te ih označila istom oznakom zbog pretpostavke da se radi o istom fagu.

Potencijalne izolirane fage iz različitih plakova sam nazvala EC-F[redni broj izoliranog plaka] za fage specifične za *E. coli* izolirane iz EC otopina, odnosno AB-F[redni broj izoliranog plaka] za fage specifične za *A. baumannii* izolirane iz AB otopina. Svaki od faga izoliranih iz jednog od dva različita plaka iste morfologije imao je dodatnu oznaku „\_1” ili „\_2”.

Izolacija bakteriofaga iz plaka – Postupak je prilagođen prema opisu u Abedon i Yin (2009). U sterilne plastične epruvete sam stavila 100  $\mu\text{L}$  pufera za fage. Vrhom sterilnog plastičnog nastavka za mikropipetu od 10-100  $\mu\text{L}$  sam zagrebla plak, te prenijela vrh nastavka u pufer. Par puta sam uvukla pufer u mikropipetu i ispustila nazad u otopinu kako bih isprala sve fage u pufer.

Na taj način sam pripremila prve izolate bakteriofaga.

### 3.2.8. Pročišćavanje izoliranih bakteriofaga

Izolirane fage potrebno je pročititi pošto postoji mogućnost da se u prvotnom izolatu iz plaka nalazi mješavina više sojeva faga (Mattila i sur. 2015). Postupak pročišćavanja sam provela tri puta po uzoru na literaturu (Mattila i sur. 2015, Regeimbal i sur. 2016, Hyman 2019). Sam postupak se sastoji od ponavljanja prilagođene metode plakova u dvostrukom agaru, slične ranije opisanoj u poglavlju 3.2.6., te izolacije faga iz novonastalih plakova po postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.

Uzgoj tekuće bakterijske kulture i priprema mekog LB medija je jednaka kao i u postupku metode plakova u dvostrukom agaru opisanom u poglavlju 3.2.6.

Pripremila sam seriju decimalnih razrjeđenja izolata bakteriofaga ukupnog volumena 100  $\mu\text{L}$  za razrjeđenje  $10^{-1}$ , odnosno 200  $\mu\text{L}$  za veća razrjeđenja, koristeći pufer za fage. Za prvo pročišćavanje sam koristila razrjeđenja  $10^{-2}$ - $10^{-4}$ , dok sam za sljedeća dva koristila razrjeđenja  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$ . U slučaju prevelike lize bakterijske livade postupak sam ponovila s većim razrjeđenjima ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ). Ukoliko plakovi nisu bili vidljivi ili ih je bilo premalo za sigurno utvrđivanje morfologije, postupak sam ponovila s razrjeđenjem  $10^{-1}$  ili nerazrijeđenim izolatom faga. Priredila sam i dvije kontrolne ploče: i) kontrolu na kontaminaciju LB-medija i pufera (K LB - 1000  $\mu\text{L}$  tekućeg LB-medija i 100  $\mu\text{L}$  pufera za fage) i ii) kontrolu bakterijske livade (K EC/ K AB - 1000  $\mu\text{L}$  tekuće kulture bakterije i 100  $\mu\text{L}$  pufera za fage).

Postupak miješanja faga s tekućim bakterijskim kulturama i mekim LB-medijem provela sam kako je opisano u poglavlju 3.2.6., s time da su fagi inkubirani s bakterijama 15 min (prema popratnom internetskom materijalu rada Hanauer i sur. (2006)).

Ploče sam inkubirala pri 37 °C  $\approx$ 24 h. Nakon inkubacije sam izolirala fage iz barem dva plaka iste morfologije kakve je bio i plak originalnog izolata faga, po postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.

Prvo pročišćavanje sam provela s izolatom plakova oznake „\_1“, a ukoliko rezultati s prvim nisu bili očekivani (pogrešna morfologija plakova, premali broj ili nedostatak plakova) postupak sam ponovila s izolatom oznake „\_2“. Nakon prvog i drugog pročišćavanja sam uvijek izolirala fage iz barem dva različita plaka iste morfologije (dva izolata istog faga), te sam drugo i treće pročišćavanje provela s barem dva izolata istog faga. Nakon trećeg pročišćavanja sam priredila tri izolata iz različitih plakova iste morfologije (tri izolata istog faga).

### 3.2.9. Dodatni postupci sa svrhom izolacije faga specifičnih za *A. baumannii*

U AB uzorcima efluenta nisam utvrdila prisutnost faga, stoga sam na tim uzorcima provela dodatne postupke s kojim sam pokušala povećati vjerojatnost izolacije potencijalnih faga specifičnih za vrstu *A. baumannii*.

#### Ponovno obogaćivanje uzorka i testiranje na prisustvo faga

U slučaju neuspješne izolacije faga, postupak umnažanja mogućih faga unutar uzorka se može ponoviti više puta (Mattila i sur. 2015). Postupak obogaćivanja uzoraka sam ponovila u uzorcima efluenta AB 37F, AB 42 i AB 42F koji su već jednom bili obogaćivani, kako je opisano u poglavlju 3.2.3. s nekoliko razlika: umjesto hranjivog bujona sam koristila LB-medij (3 g), bakteriju *A. baumannii* sam uzgojila na krutoj LB-podlozi, te sam uzorke obogaćene bakterijama inkubirala ( $\approx 24$  h) u sličnim uređajima drugih proizvođača pod istim uvjetima – otopine AB 42 i AB 42F sam inkubirala u vodenoj kupelji (Edmund Buhler GmbH, KS-15) pri temperaturi 42 °C, a otopinu AB 37F sam inkubirala u termostatiranoj tresilici (Julabo SW22) pri temperaturi od 37 °C. U uzorku AB 37 nisam ponovila postupak obogaćivanja jer sam tada smatrala da bi se u tom uzorku mogli nalaziti fagi, što se kasnije pokazalo zagađenjem. Uzorke sam pročistila centrifugiranjem i filtracijom na način opisan u dijelu poglavlja 3.2.3. s nekoliko razlika: obradila sam ukupno 75 mL svakog uzorka, te sam supernatante profiltrirala kroz filtere za medicinske štrcaljke pora 0,22  $\mu\text{m}$  (Rotilabo-Spritzenfilter, CME, steril) u sterilne staklene boce.

Kako bih provjerila uzorak na prisustvo bakteriofaga i odredila koncentraciju potencijalnih faga, provela sam postupak metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja opisan u poglavlju 3.2.5. s razlikama: tekuću kulturu bakterija sam pripremila tako da je OD<sub>600</sub> bio u rasponu od 0,700-0,800, koristila sam 1000  $\mu\text{L}$  tekuće bakterijske kulture i 3 mL mekog LB-medija po ploči, priredila sam kontrolu LB-medija (K LB) miješanjem 1000  $\mu\text{L}$  tekućeg LB-medija s 3 mL mekog LB-medija. Ploče sam pregledala nakon  $\approx 19$  h inkubacije.

#### Ukoncentriravanje uzoraka i provjera prisutnosti faga

Iako sam i nakon ponovnog obogaćivanja bakterijom *A. baumannii* dobila negativne rezultate, smatrala sam da je i dalje postojala mogućnost da su fagi prisutni, ali u izuzetno malim

koncentracijama. Zato sam ukoncentrirala sve AB uzorke efluenta (AB 37, AB 37F, AB 42, AB 42F) i provela metodu plakova u dvostrukom agaru.

Uzorke sam ukoncentrirala u epruvetama za ukoncentriravanje (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters*, 50K) po uputama proizvođača. U svaku epruvetu sam stavila 12 mL uzorka i centrifugirala (centrifuga Sigma 4-16KS) 20 min pri 5000x g, pri 4 °C. Ukoncentrirala sam sveukupno 24 mL svakog AB uzorka efluenta, na konačni volumen od otprilike 500-900 µL. Pripremljene koncentrate sam čuvala pri 4 °C.

Provela sam metodu plakova u dvostrukom agaru opisanu u poglavlju 3.2.6. s nerazrijeđenim koncentratima i razrjeđenjima  $10^{-1}$ - $10^{-4}$ . Priredila sam 200 µL svakog razrjeđenja s puferom za fage. Nakon  $\approx 23$  h inkubacije pri 37 °C sam pregledala sve ploče, vratila ih na inkubaciju pod jednakim uvjetima te ih ponovno pregledala nakon  $\approx 46$  h inkubacije kako bih potvrdila rezultate.

#### Metoda plakova u dvostrukom agaru s dvostruko mekim agarom

Ukoliko fagi ne stvaraju plakove u standardnom mediju, za njihovu izolaciju se može pokušati koristiti hranjivi mediji manje gustoće (Hyman 2019). Zbog rezultata prijašnjih pokusa u uzorku AB 37 sumnjala sam na prisutnost bakteriofaga koji nisu sposobni stvarati plakove u mekom LB-mediju (0,75%-nom agaru). Iz tog razloga sam s tim uzorkom provela metodu plakova u dvostrukom agaru s dvostruko mekim LB-medijem (0,375%-tni agar). Pokus sam provela po postupku opisanom u poglavlju 3.2.6. s nekoliko razlika, od kojih je najvažnija korištenje duplo mekog LB-medija umjesto mekog LB-medija kao gornjeg medija u kojem se razvijaju bakterijska livada i plakovi (ukoliko su prisutni specifični bakteriofagi). Pokus sam provela s razrjeđenjima  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  (priredila sam 200 µL svakog razrjeđenja s puferom za fage), te s uobičajenim kontrolama K LB i K AB. Rezultate sam pregledala nakon 22 h inkubacije, te jedan dan nakon prve provjere.

#### 3.2.10. Priprema koncentriranih suspenzija izoliranih bakteriofaga

Izolirane pročišćene bakteriofage treba umnožiti kako bi se dobila koncentrirana suspenzija izoliranih faga koja se može dalje koristiti u istraživačke svrhe. Umnažanje bakteriofaga se može postići unutar bakterijske livade u mekom agaru postizanjem konfluentne lize, nakon čega se fagi izoliraju iz agara (Jothikumar i sur. 2000). Metodu konfluentne lize bakterijske livade sam provela za sve izolirane fage, prilagođeno prema Jothikumar i sur. (2000), s detaljnim postupcima i volumenima određenima prema internom postupku laboratorija i metodi plakova u dvostrukom agaru opisanoj u poglavlju 3.2.6.

### Konfluentna liza u svrhu umnažanja faga

Priredila sam tekuću kulturu bakterija po postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. ( $OD_{600}$  u rasponu 0,400-0,500). Pipetirala sam po 3 mL dvostruko mekog LB-medija u sterilne epruvete, te stavila u vodenu kupelj pri 46 °C s konstantnom trešnjom pri 120 rpm.

Umnažala sam sve izolirane fage koji su tri puta pročišćeni, i to po dva izolata od istog faga. Od svakog izolata sam pripremila 100 µL razrjeđenja  $10^{-1}$  s puferom za fage. Kontrole K LB i K EC sam pripremila kako je opisano u poglavlju 3.2.8.

Pomiješala sam 100 µL razrjeđenja faga s 1000 µL tekuće bakterijske kulture, te sam sve pripremljene suspenzije inkubirala 45 min u suhom termobloku pri temperaturi od 37 °C, s konstantnim miješanjem pri 300 rpm.

Nakon inkubacije sam bakterije s fagima pomiješala s 3 mL dvostruko mekog LB-medija na jednak način kao u poglavlju 3.2.6. Ploče sam inkubirala preko noći u inkubatoru pri 37 °C, okrenute poklopcem prema gore.

### Izolacija bakteriofaga iz dvostruko mekog agara – priprema konačnih izolata bakteriofaga

Nakon  $\approx 17$  h inkubacije sam s ploča na kojima je došlo do konfluentne (prihvatljivo polukonfluentne) lize bakterijske livade (obje ploče svakog faga) sastrugala dvostruko meki agar u sterilnu plastičnu epruvetu flambiranim staklenim štapićem u obliku slova „L“. Objе ploče istog faga sam objedinila u istu epruvetu. U svaku epruvetu sam dodala 200 µL kloroforma, sadržaj epruveta dobro promiješala uz pomoć vrtložne mješalice (*vortex* technoKartell) u trajanju od 30 sekundi na najvećoj brzini, te inkubirala 30 min pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sam uzorke centrifugirala (centrifuga Eppendorf Centrifuge 5804 R) 10 min na 8000 x g, pri temperaturi od 4 °C. Odvojila sam supernatant mikropipetom u sterilne plastične epruvete, te tako pripremila konačne izolate bakteriofaga.

#### 3.2.11. Određivanje titra bakteriofaga u konačnim izolatima

Priredila sam seriju decimalnih razrjeđenja konačnih izolata faga ukupnog volumena 100 µL za razrjeđenje  $10^{-1}$ , odnosno 500 µL za razrjeđenja  $10^{-1}$ - $10^{-8}$ , s puferom za fage. Titar bakteriofaga u konačnim izolatima sam odredila metodom plakova u dvostrukom agaru na način opisan u poglavlju 3.2.6. s razrjeđenjima  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  u triplikatima. Priredila sam i kontrolu medija (K LB) i kontrolu bakterijske kulture (K EC) na način opisan u poglavlju 3.2.8.

Nakon 22 h inkubacije sam ručno izbrojala plakove na svim pločama na kojima je broj plakova bio brojiv. U slučaju da je broj plakova bio prevelik za ručno brojanje ili su plakovi na ploči spojeni tako da se ne može odrediti točan broj, te ploče sam označila kao nebrojive. Izračunala

sam srednju vrijednost broja plakova za svako razrjeđenje koje je bilo brojivo, te sam izračunala titar faga (PFU/mL) po formuli:

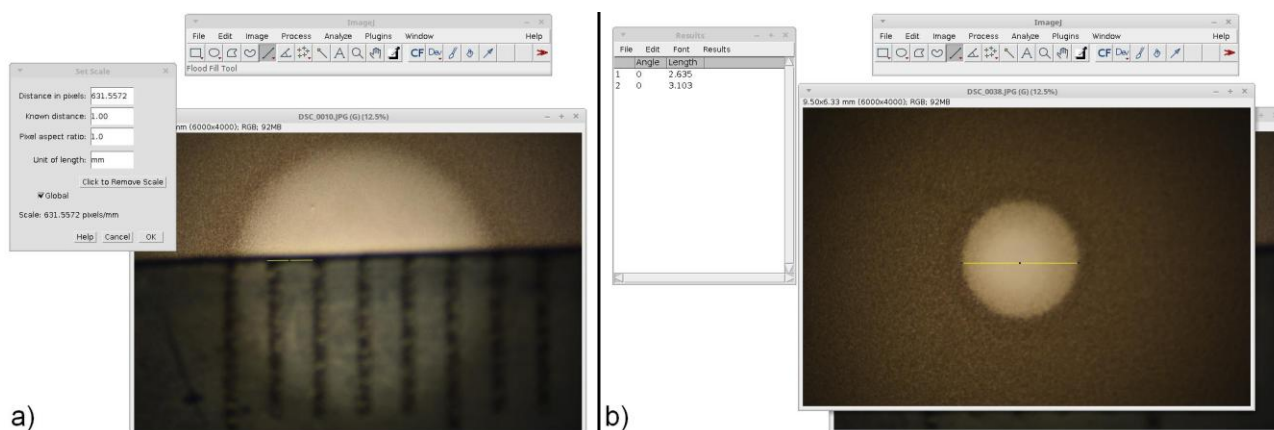
$$[PFU/mL] = \text{srednji broj plakova na pločama istog razrjeđenja} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 10$$

Za izolate koji su imali više brojivih ploča odredila sam titar za svako razrjeđenje te izračunala srednju vrijednost. Francis i sur. (2017) preporučuju da se za izračunavanje titra koriste ploče s 20-200 plakova.

### 3.2.12. Fotografiranje i mjerenje promjera plakova izoliranih faga

Provela sam metodu plakova u dvostrukom agaru na način opisan u poglavlju 3.2.6. s razrjeđenjima  $10^{-4}$ - $10^{-7}$  pripremljenim s puferom za fage (na način pisan u poglavlju 3.2.8.), s kontrolom medija (K LB) i kontrolom bakterijske kulture (K EC) pripremljenim na način opisan u poglavlju 3.2.8. Ploče sam pregledala nakon 20 h inkubacije. Po 10 nasumično odabranih plakova potpune veličine sam fotografirala uz pomoć fotoaparata (Nikon D3500), lupe (Pro-Lux Microscope) i adaptera za mikroskop NDPL-1(2x). Plakove sam fotografirala tako da je donja strana ploče bila okrenuta prema fotoaparatu, a poklopac uklonjen, s osvjetljenjem ispod ploče. Plakovi svih faga fotografirani su na jednakom povećanju. Uz jedan od plakova sam fotografirala i ravnalo s milimetarskom skalom kako bih imala referentnu skalu veličine plakova.

Veličinu plakova sam izmjerila uz pomoć programa ImageJ 1.53e. U programu sam označila duljinu koja je u stvarnosti jednaka 1 mm na fotografiji plaka s ravnalom koja sadrži milimetarsku skalu – program je na taj način kalibrirao skalu, odnosno označio koliko piksela na fotografiji je jednako duljini 1 mm u stvarnosti. Na fotografijama plakova sam označila promjer plaka, program je izračunao njegovu stvarnu veličinu, te sam izračunala prosječan promjer plaka svakog faga u desetinu milimetra, kao i standardnu devijaciju. Prikaz kalibriranja skale i označavanja promjera se nalazi na Slici 4.



Slika 4: Prikaz mjerenja promjera plakova nastalih metodom plakova u dvostrukom agaru. a) Postavljanje skale. b) Mjerenje promjera plaka.

### 3.2.13. Elektronska mikroskopija izoliranih faga

Kako bih potvrdila da su izolirani fagi iz plakova različitih morfologija uistinu različite vrste/sojevi bakteriofaga i pod uvjetom da su bakteriofagi dovoljno različite morfologije da se to može uočiti na slikama elektronskog mikroskopa, dobiveni izolati faga pregledani su transmisivnim elektronskim mikroskopom.

#### Priprema konačnih izolata bakteriofaga za proučavanje elektronskom mikroskopijom

Konačne izolate bakteriofaga treba ukoncentrirati kako bi pronalazak bakteriofaga postupkom elektronske mikroskopije bio lakši. Pošto konačni izolati sadrže različite soli čiji kristali mogu ometati mikroskopiranje, treba pročititi uzorak, odnosno zamijeniti otopinu u kojoj se nalazi. Kako bih to postigla, ukoncentrirala sam sve izolate bakteriofaga u epruvetama za ukoncentriravanje (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters, 50K*) po uputama proizvođača, pri tome mijenjajući otopinu u kojoj se nalaze fagi sa sterilnom destiliranom vodom.

U epruvete za ukoncentriravanje sam stavila 15 mL sterilne deionizirane vode i 1000  $\mu$ L konačnog izolata bakteriofaga, te centrifugirala (centrifuga Sigma 4-16KS) 20 min pri 5000 g i temperaturi od 4 °C. Mikropipetom sam pažljivo odvojila koncentrate i prenijela ih u sterilne plastične epruvete. Koncentrate sam pohranila pri 4 °C.

#### Elektronska mikroskopija izolata bakteriofaga

Uzorke bakteriofaga (pripremljene koncentrate i originalne konačne izolate bakteriofaga) je transmisivnim elektronskim mikroskopom (TEM) pregledala izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić, uz moju prisutnost. Za postavljanje uzorka je korištena bakrena mrežica prekrivena formvarom i ugljikom sa 100 okašca (engl. *mesh*). Uzorci su tretirani na različite načine kako bi se našla što bolja slika: bojanje uzoraka kontrastnim bojilima (2%-tna fosfovolframska kiselina – PWK i 2%-tni uranil-acetat) u različitim omjerima, različiti postupak stavljanja uzorka na mrežicu (nakapavanje mješavine uzorka i bojila na mrežicu i analiza nakon što se osuši, ili stavljanje mrežice u kapljicu uzorka i bojila, inkubacija 10 min i analiza nakon što se osuši), te pregledavanje nebojanih uzoraka. Korištena su negativna kontrastna bojila kako bi se dobila slika svjetlijeg bakteriofaga okruženog tamnim bojilom. Potencijalni bakteriofagi su fotografirani.

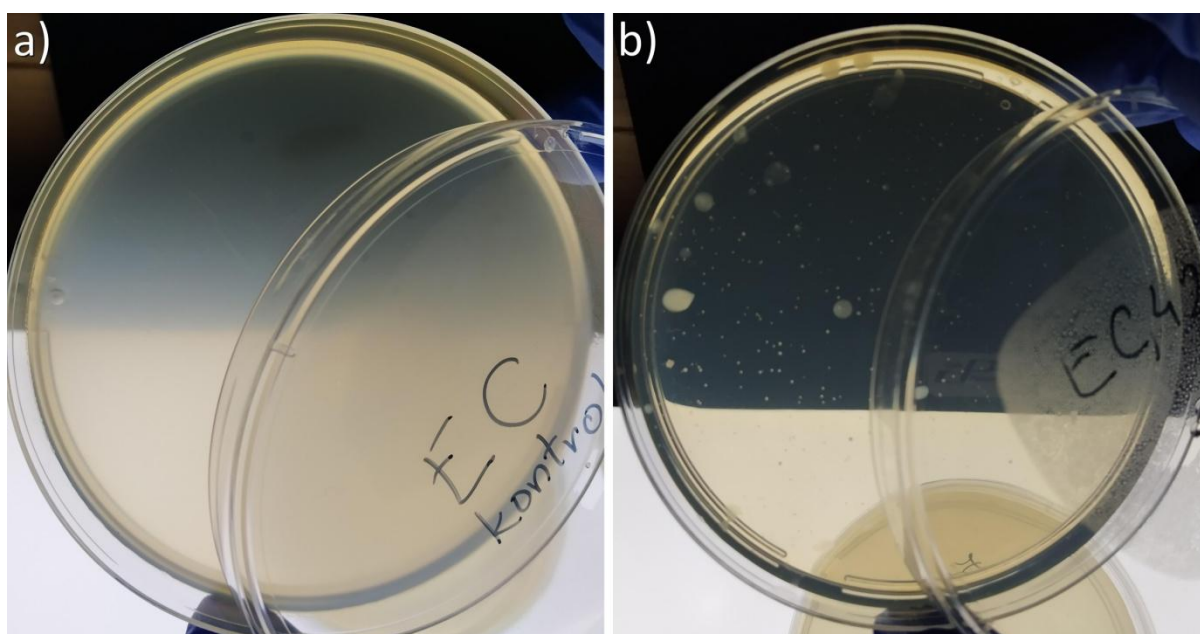


## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati preliminarnih pokusa

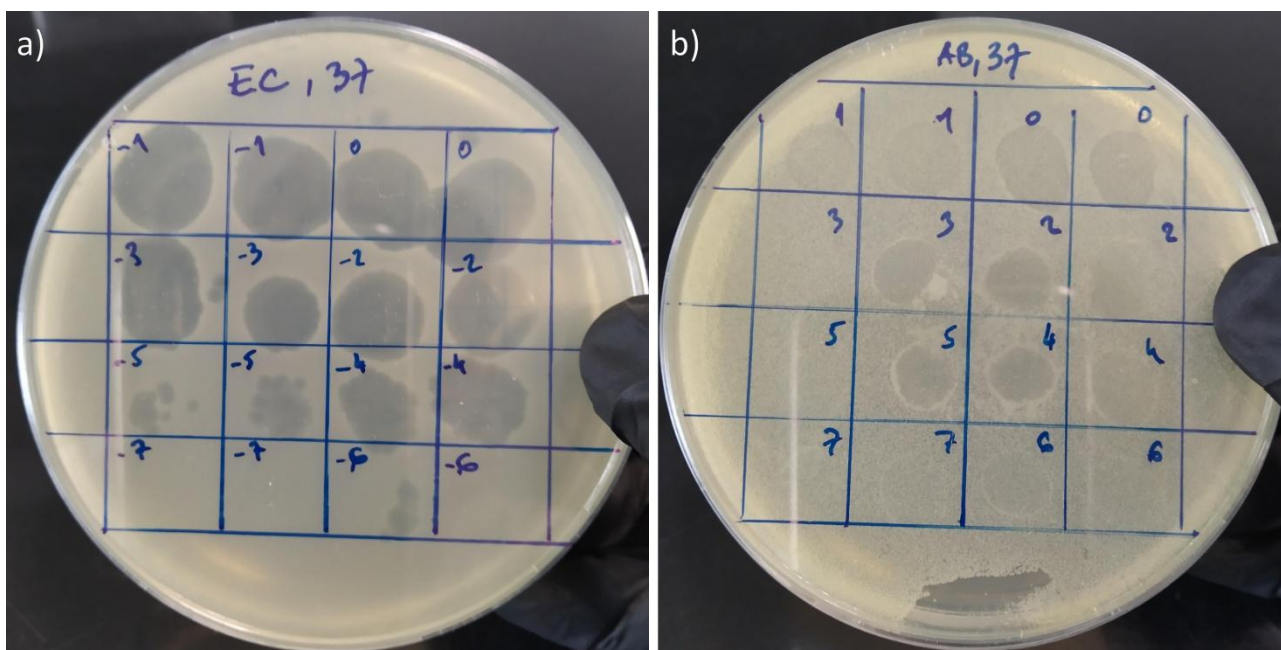
#### 4.1.1. Utvrđivanje prisutnosti faga specifičnih za *E. coli* i njihova brojnost

Rezultati preliminarnih testova oba duplikata svih EC uzoraka su pokazali potpunu konfluentnu lizu bakterijske livade *E. coli* (Slika 5), što je ukazivalo na prisutnost barem jednog soja specifičnih faga u svim uzorcima.



Slika 5: Konfluentna liza bakterijske livade bakterije *Escherichia coli* (EC): a) EC kontrola – čista homogena livada bakterije *E. coli*. b) Uzorak EC 42 – potpuna konfluentna liza bakterijske livade (vidljive su kontaminirajuće kolonije nepoznatog uzroka). Fotografije su snimljene iznad transiluminatora.

U preliminarnom pokusu određivanja koncentracije faga metodom čistina i plakova tehnikom nakapavanja svi EC uzorci su pokazali relativno visok titar faga (Slika 6 a). U uzorcima EC 37, EC 42 i EC 42F su jasno razlučivi plakovi bili vidljivi pri razrjeđenjima  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$ , a u uzorku EC 37F pri razrjeđenjima  $10^{-6}$  i  $10^{-7}$ . Iz tog razloga sam za nastavak pokusa odabrala navedena razrjeđenja i po dva veća razrjeđenja svakog uzorka.



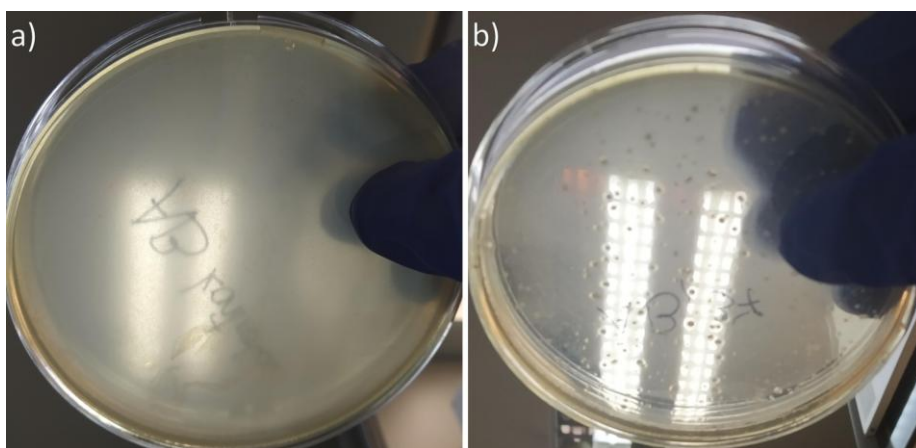
Slika 6: Rezultati metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja uzoraka efluenta. Prikazani su neki od relevantnih rezultata za svaku od istraživanih bakterija: a) Rezultat uzorka EC 37 na bakterijskoj livadi bakterije *Escherichia coli*. Na razrjeđenjima  $10^{-1}$ - $10^{-4}$  vidljiva je potpuna liza bakterijske livade; s porastom razrjeđenja razlučuju se pojedinačni plakovi, dok na razrjeđenju  $10^{-7}$  nema vidljivih plakova. b) Rezultat uzorka AB 37 na bakterijskoj livadi bakterije *Acinetobacter baumannii*. Vidljiv je drugačiji izgled bakterijske livade u zonama nakapavanja uzorka, moguće zbog lize bakterija bez nastanka plakova, ali zasebni plakovi nisu uočljivi ni na jednom polju. Razrjeđenja uzoraka su nanosena u naznačena polja u duplikatima.

#### 4.1.2. Utvrđivanje prisutnosti faga specifičnih za *A. baumannii* i njihova brojnost

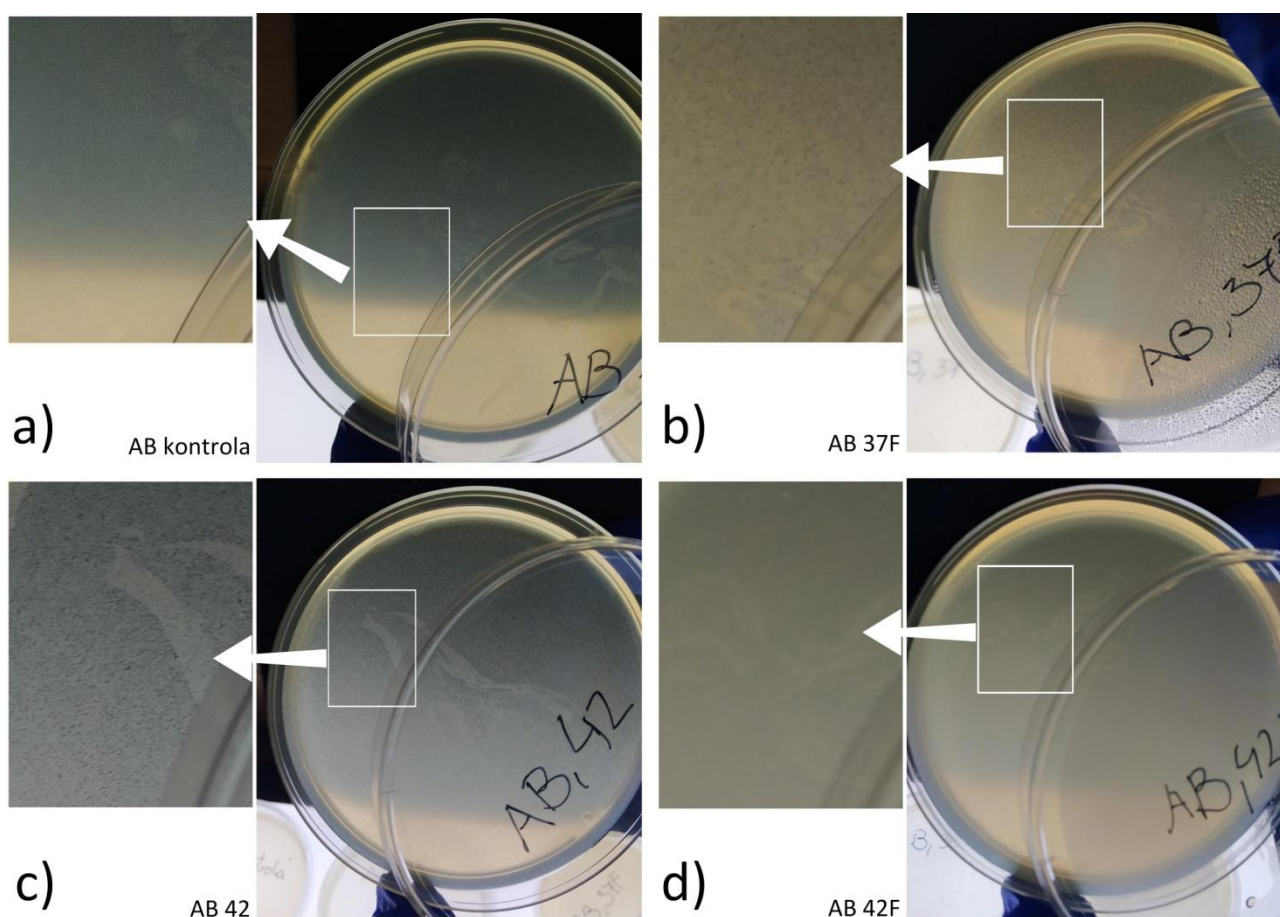
Rezultati preliminarnih testova oba duplikata uzorka AB 37 su pokazali potpunu konfluentnu lizu bakterijske livade *A. baumannii* (Slika 7), što je ukazivalo na prisustvo barem jednog soja specifičnih faga. Na pločama su se nalazile crvenkasto-narančaste kolonije neutvrđene bakterijske vrste, vjerojatno prisutne kao kontaminacija uzorka.

Uzorci AB 37F i AB 42 nisu uzrokovali konfluentnu lizu bakterijske livade *A. baumannii*, ali su na oba duplikata svakog uzorka bila vidljiva sitna prazna polja na razvijenoj bakterijskoj livadi, veća nego na kontrolnoj AB ploči (Slika 8 a-c). Navedeni rezultati nisu sasvim jasni, te sam ih smatrala najvjerojatnije negativnima, ali sam usprkos tome provela sve daljnje postupke s navedenim uzorcima kako bih bila sigurna u rezultat.

Oba duplikata uzorka AB 42F nisu uzrokovala konfluentnu lizu livade *A. baumannii*, odnosno imale su potpuno razvijenu homogenu bakterijsku livadu (Slika 8 d). Rezultat ovog uzorka je negativan na prisustvo specifičnih faga.



Slika 7: Konfluentna liza bakterijske livade bakterije *Acinetobacter baumannii* (AB): a) AB kontrola – čista homogena livada bakterije *A. baumannii*. b) Uzorak AB 37 – potpuna konfluentna liza bakterijske livade (vidljive su crvenasto-narančaste kolonije nepoznatog izvora). Fotografije su snimljene ispod halogene rasvjete prostorije.



Slika 8: Preliminarno utvrđivanje prisutnosti faga specifičnih za *Acinetobacter baumannii* (AB): a) AB kontrola – čista livada bakterije *A. baumannii*. b) uzorak AB 37F – vidljive sitne praznine između nakupina bakterija. c) uzorak AB 42 – vidljive male praznine između nakupina bakterija. d) uzorak AB 42 – livada bakterije *A. baumannii* bez vidljivih razlika naspram AB kontrole. Fotografije su snimljene iznad transiluminatora.

Rezultati metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja uzoraka AB 37 i AB 37F nisu bili sasvim jasni. Kod oba uzorka je bila vidljiva promjena izgleda bakterijske livade u zonama nakapavanja (jače vidljiva kod uzorka AB 37), ali ne i potpuna liza, te pojedinačni plakovi nisu bili vidljivi niti na jednom razrjeđenju (Slika 6 b). Rezultati ukazuju na moguću djelomičnu lizu bakterijske livade, što bi ukazivalo na prisutnost specifičnih faga, ali se ne može tvrditi sa sigurnošću. Na temelju rezultata sam odabrala razrjeđenja  $10^{-4}$ - $10^{-7}$  za korištenje u daljnjim pokusima.

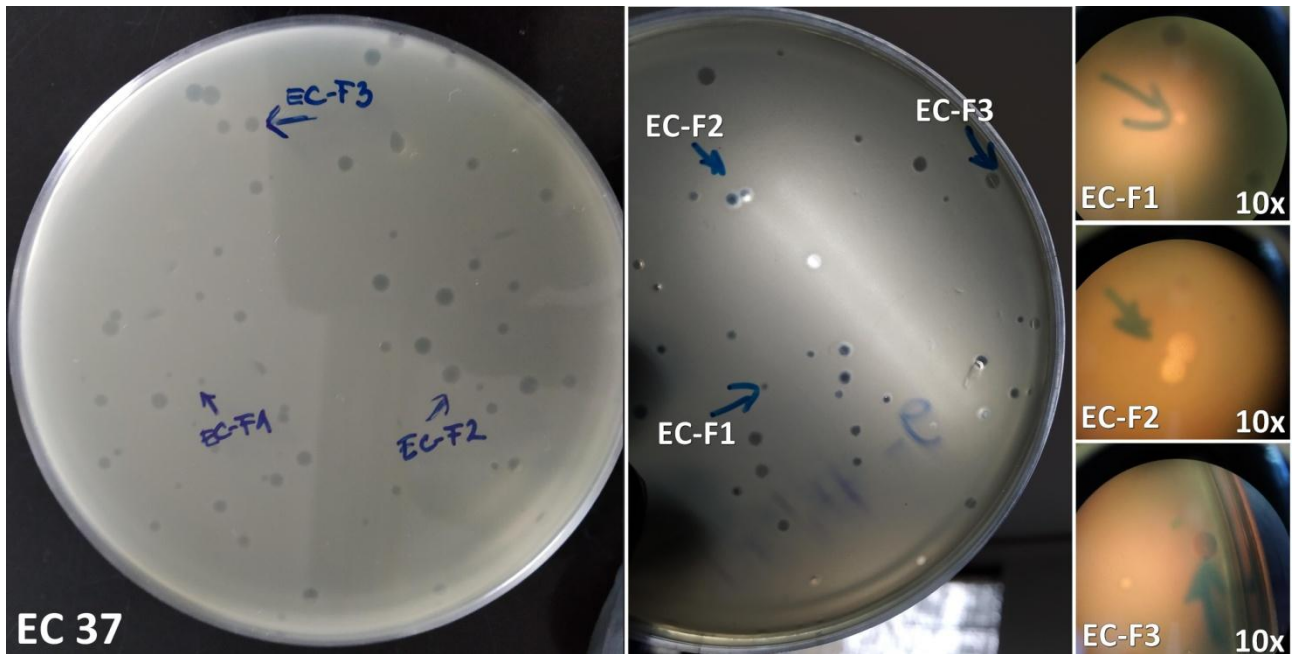
Uzorci AB 42 i AB 42F nisu uzrokovali nikakvu promjenu bakterijske livade u pokusu metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja, stoga se uzorci smatraju negativnima na prisustvo specifičnih litičkih faga. U daljnjim postupcima sam tu pretpostavku dodatno ispitala koristeći mala razrjeđenja ( $10^{-2}$ - $10^{-5}$ ), a naknadno  $10^{-1}$  i nerazrijeđene uzorke.

#### 4.2. Izolacija i pročišćavanje faga specifičnih za *E. coli*

##### Uzorak EC 37

Na pločama s optimalnim brojem plakova ( $\approx 50$  plakova po ploči razrjeđenja  $10^{-6}$ ) bili su vidljivi plakovi različitih veličina koje sam podijelila na „velike plakove” i „male plakove”. Kod nekih „velikih plakova” sam primijetila „oštriji” rub, a kod drugih pomalo zamućen rub. Sveukupno sam uočila tri različite morfologije plakova, te sam iz njih izolirala potencijalno različite fage i imenovala ih EC-F1 („mali“ plakovi), EC-F2 („veliki“ plakovi oštrijih rubova) i EC-F3 („veliki“ plakovi zamućenih rubova) (Slika 9). Svi plakovi su promatrani golim okom bili okrugli, dok je pod lupom bio vidljiv nepravilan rub. Pod lupom (povećanja 10x i 15x) su EC-F1 plakovi bili vidljivi samo pod određenim fokusima, za razliku od većih EC-F2 i EC-F3, koji su bili vidljivi kroz cijeli meki agar, što znači da su EC-F1 plakovi bili manje dubine. EC-F1 plakovi su bili manje prozirni kad su promatrani bez lupe. Potencijalno različite fage izolirane iz plakova različitih morfologija sam provela kroz tri ciklusa pročišćavanja.





Slika 9: Plakovi dobiveni metodom plakova u dvostrukom agaru s uzorkom EC 37 na bakterijskoj livadi bakterije *Escherichia coli*. Lijevo - fotografija donje strane ploče, sredina - fotografija dijela iste ploče ispod halogene svjetiljke, desno - fotografije pojedinačnih plakova specifične morfologije nađene u ovom uzorku (EC-F1, EC-F2 i EC-F3), snimljene pod lupom (povećanje 10x).

Pročišćavanje EC-F1: Jedan od dva izolata EC-F1 nije rezultirao zadovoljavajućim brojem plakova prilikom prvog pročišćavanja. Iz drugog izolata sam dobila plakove koji više nisu mogli biti opisani kao "mali", s obzirom da je većina uzgojenih plakova imala veličinu i izgled sličan plakovima originalnih EC-F2 ili EC-F3, uz rijetku pojavu malih zamućenih plakova. Daljnje izoliranje i pročišćavanje malih zamućenih plakova je ponovno rezultiralo većim plakovima sličnih originalnim EC-F2 ili EC-F3. Proces pročišćavanja ovog faga je pokazao da, kada plak ima dovoljno vremena za rast (prije ulaska bakterijske livade u stacionarno stanje) ne rezultira malenom zamućenom morfologijom, već plakovima veličine originalnih EC-F2 ili EC-F3 s nepravilnim nazubljenim zamućenim rubom. Prilikom pročišćavanja, ploče s korištenim (malim) razrjeđenjima ( $10^{-2}$  i  $10^{-3}$ ) su često rezultirale vrlo malim brojem plakova ( $<10$ ).

Pročišćavanje EC-F2: Pročišćavanje izolata EC-F2 je rezultiralo plakovima jednake morfologije kao i originalno označeni EC-F2, odnosno jednake morfologije kao i konačni EC-F1 ("veći" plakovi nepravilnog nazubljenog zamućenog ruba), te su najvjerojatnije uzrokovani istim fagom. Zato sam fage izolirane iz plaka ovog izolata u konačnici smatrala izolatom EC-F1. Prilikom pročišćavanja neki izolati nisu doveli do pojave plakova, dok su drugi rezultirali s manjim brojem plakova ( $\approx 20$ ) na pločama malih razrjeđenja ( $10^{-2}$ ).

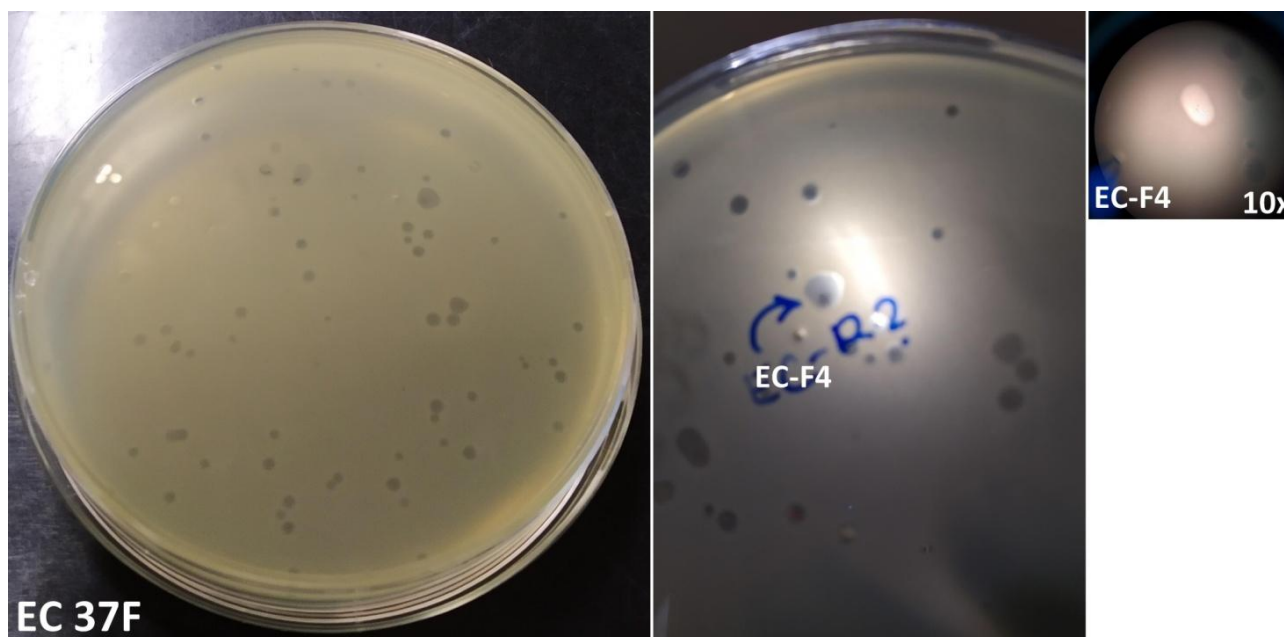
Pročišćavanje EC-F3: Prvo pročišćavanje jednog izolata EC-F3 je rezultiralo plakovima morfologije iste kao originalni EC-F2 (kasnije preimenovan u EC-F1), s iznimnom pojavom dva plaka morfologije slične originalnom EC-F3. Prvo pročišćavanje drugog izolata je rezultiralo s obje

morfologije plakova (originalni EC-F2 i EC-F3), s time da su plakovi izgleda EC-F3 bili malo veći. Izolacija i pročišćavanje plakova morfologije EC-F3 je rezultiralo plakovima morfologije originalno prozване EC-F2, odnosno prepoznate kao EC-F1 ("veći" plakovi nepravilnog nazubljenog zamućenog ruba), što je pokazalo da se ne radi o zasebnoj morfologiji plaka, već najvjerojatnije o fagima EC-F1. Izolati su većinom rezultirali manjim brojem plakova (nekoliko desetaka ili <10) na pločama malih razrjeđenja ( $10^{-2}$  i  $10^{-3}$ ).

U konačnici, nakon provedenih postupaka izolacije i pročišćavanja faga, iz uzorka EC 37 sam izolirala jednu vrstu/soj faga kojeg sam prozvala EC-F1.

#### Uzorak EC 37F

Na pločama su bili vidljivi plakovi koji su veličinom sličili originalnom opisu EC-F1, EC-F2 i EC-F3 (plakovima uzgojenim iz uzorka EC 37), te ih tada nisam razlikovala od plakova dobivenih iz uzorka EC 37. Na jednoj od ploča (razrjeđenje  $10^{-7}$ , >50 plakova na ploči) su se nalazila dva „plaka“ drugačije morfologije – imali su izduljen oblik, s potpuno prozirnim dijelom okruženim zamućenim dijelom koji postaje manje proziran prema rubu, te koji se izduljuje u jednom smjeru (Slika 10). Nije bilo sigurno radi li se o rijetkim plakovima nove morfologije ili o dva ili više spojena plaka, stoga sam izolirala fage iz jednog takvog navodnog plaka, dodijelila im naziv EC-F4, te provela kroz proces pročišćavanja. Najpogodnije razrjeđenje je bilo  $10^{-7}$  (ploče razrjeđenja  $10^{-6}$  su imale nebrojivo mnogo plakova).



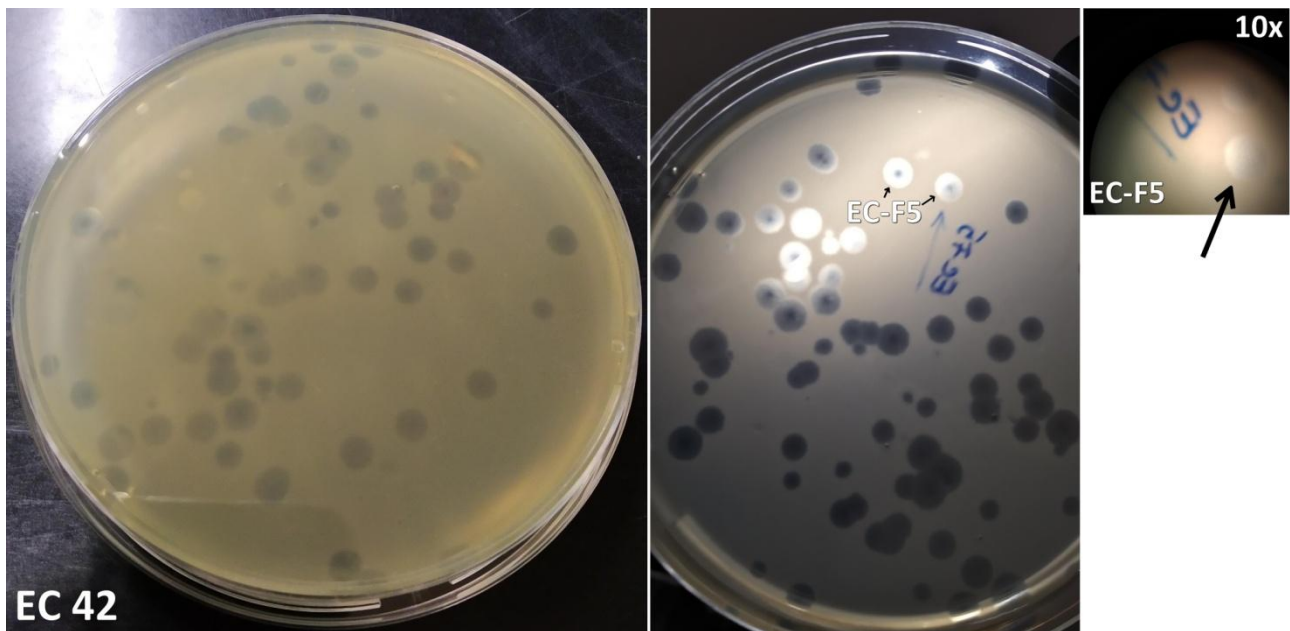
Slika 10: Plakovi dobiveni metodom plakova u dvostrukom agaru s uzorkom EC 37F na bakterijskoj livadi bakterije *Escherichia coli*. Lijevo - fotografija donje strane ploče, sredina - fotografija dijela iste ploče ispod halogene svjetiljke, desno - „plak“ specifične morfologije nađene u ovom uzorku (originalno prozvan EC-F4; nije isti kao prikazani na srednjoj slici), snimljen pod lupom.

Prvo pročišćavanje izolata EC-F4, kao i naknadna pročišćavanja uzgojenih plakova, nisu rezultirala plakovima neobične izdužene morfologije, već plakovima nove morfologije u odnosu na one u uzorku EC 37 - plakovi oštih rubova, prozirnog centra i postepeno sve više zamućenog prostora prema rubu ("*bullseye*" morfologija). Izduljeni oblik, uočen nakon metode plakova u dvostrukom agaru uzorka EC 37F, je najvjerojatnije bio posljedica spajanja dvaju plakova ili nepravilnog rasta plaka uzrokovanog nepravilnostima u krutom hranjivom mediju. Sva pročišćavanja su rezultirala većim brojem plakova (uglavnom nebrojivim na razrjeđenju  $10^{-2}$  i nekoliko desetaka na razrjeđenju  $10^{-3}$ ) opisane "*bullseye*" morfologije.

U konačnici, nakon provedenih postupaka izolacije i pročišćavanja faga, iz uzorka EC 37F sam izolirala jednu vrstu/soj faga kojeg sam prozvala EC-F4. Nije sigurno jesu li se u uzorku nalazili i fagi EC-F1, pošto prilikom provedbe pokusa nisam imala iskustva u prepoznavanju plakova faga. Naknadnim proučavanjem fotografija ploča metode plakova u dvostrukom agaru uzorka EC 37F (koje sam napravila uz pomoć kamere mobilnog uređaja) sam zaključila da se na pločama ovog uzorka najvjerojatnije nisu nalazili plakovi faga EC-F1, već da su svi primijećeni plakovi bili plakovi faga EC-F4, ali ne mogu to tvrditi sa sigurnošću. Naknadnim pregledom fotografija sam i primijetila da se oko plaka EC-F4 može vidjeti obruč koji se čini svjetlijim ili tamnijim od bakterijske livade, ovisno o upadu svjetla na plak.

#### Uzorak EC 42

Na pločama ovog uzorka (nakon metode plakova u dvostrukom agaru) sam detektirala plakove nove jedinstvene morfologije koju nisam primijetila kod drugih uzoraka, te sam ih nazvala EC-F5: vrlo veliki plakovi, otprilike dvostruko većeg promjera od predhodno opisanih plakova, prozirnog središta i mutnijeg ostatka plaka gdje se prozirnost smanjivala prema rubu ("*bullseye*" morfologija) (Slika 11). Pod lupom (povećanje 10x) se vidjelo da su pravilno okrugli, te se dobro vidjelo smanjenje prozirnosti prema rubu plaka. Osim EC-F5, na pločama su se rijetko nalazili i manji plakovi mutnijeg izgleda, koji su najvjerojatnije bili nepotpuno narasli plakovi istog faga. Nisam primijetila plakove drugačijih morfologija. Iz plakova EC-F5 sam izolirala fage i provela ih kroz tri ciklusa pročišćavanja. Za proučavanje morfologije plakova sam koristila razrjeđenja  $10^{-5}$  (>50 plakova po ploči), a za izolaciju razrjeđenja  $10^{-6}$  (s malo manje od 10 plakova po ploči).



Slika 11: Plakovi dobiveni metodom plakova u dvostrukom agaru s uzorkom EC 42 na bakterijskoj livadi bakterije *Escherichia coli*. Lijevo - fotografija donje strane ploče, sredina - fotografija dijela iste ploče ispod halogene svjetiljke, desno - plak specifične morfologije nađene u ovom uzorku (EC-F5), snimljen pod lupom.

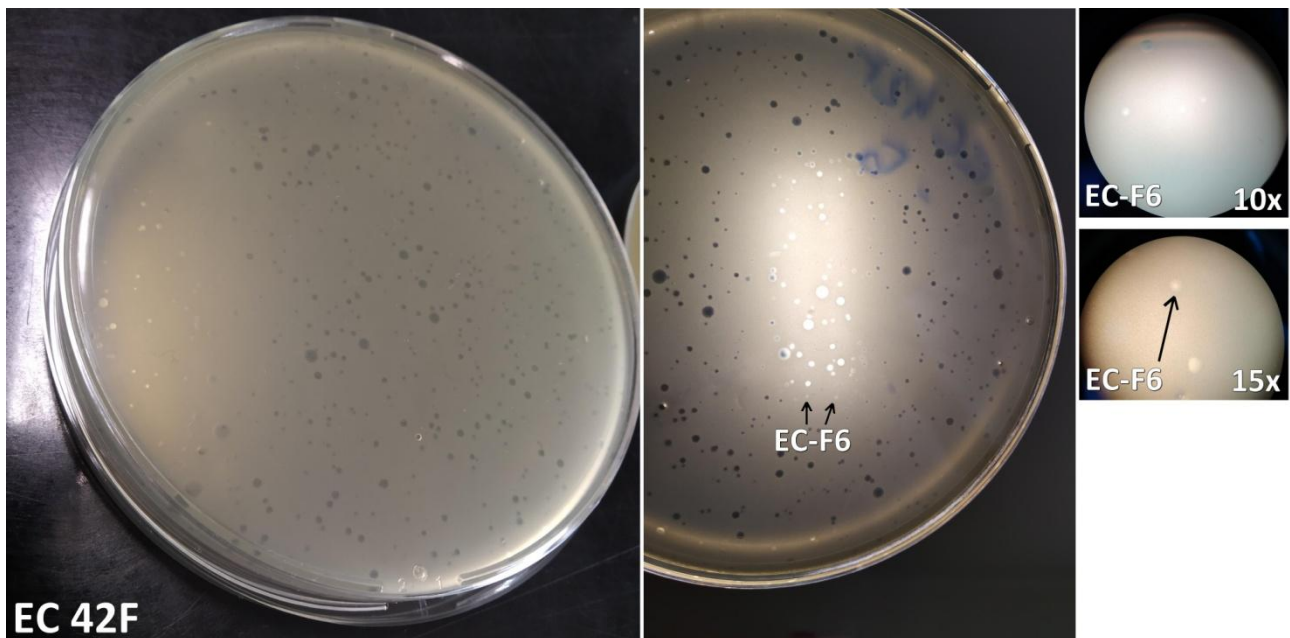
Sva tri ciklusa pročišćavanja su uvijek rezultirala istom očekivanom morfoloijom. S obzirom na specifičnu veličinu plakova, često sam na razrjeđenju  $10^{-2}$  dobivala potpuno liziranu livadu ili veći broj spojenih plakova, stoga sam za izolaciju faga iz zasebnog plaka kod svih ciklusa pročišćavanja koristila razrjeđenje  $10^{-3}$  (desetak ili više desetaka plakova po ploči).

U konačnici, nakon provedenih postupaka izolacije i pročišćavanja faga, iz uzorka EC 42 sam izolirala jednu vrstu/soj faga kojeg sam prozvala EC-F5. U uzorku nisam primijetila prisutnost drugih faga.

#### Uzorak EC 42F

Na svim pločama su se nalazila dva tipa „malenih“ plakova: jedni promjera oko 1 mm slično originalnom opisu EC-F1, i drugi još manjeg promjera i zamućeni, te stoga teško uočljivi. Pod lupom (povećanja 15x, 20x i 25x) se vidjelo da su veći plakovi puno prozirniji, dok su manji imali proziran centar i zamućene deblje rubove (Slika 12). Iz plakova manjeg promjera i manje prozirnosti sam izolirala fage, prozvala ih EC-F6 i provela kroz tri ciklusa pročišćavanja. Najpogodnije razrjeđenje za proučavanje i izoliranje plakova je bilo  $10^{-6}$  s 50-ak plakova po ploči, dok je na razrjeđenju  $10^{-5}$  bilo nebrojivo mnogo plakova.





Slika 12: Plakovi dobiveni metodom plakova u dvostrukom agaru s uzorkom EC 42F na bakterijskoj livadi bakterije *Escherichia coli*. Lijevo - fotografija donje strane ploče, sredina - fotografija dijela iste ploče ispod halogene svjetiljke, desno - plakovi specifične morfologije nađene u ovom uzorku (EC-F6), snimljen pod lupom.

Prvo pročišćavanje plaka EC-F6 je rezultiralo malim plakovima od kojih sam izolirala dva. Nakon drugog pročišćavanja sam izolirala dva manja i manje prozirna plaka procijenjenog promjera oko 0,5 mm i jedan prozirniji veći plak procijenjenog promjera oko 1 mm, te ih provela kroz proces trećeg pročišćavanja. Rezultati trećeg pročišćavanja su bili jednaki kod oba izolata, što ukazuje da se radi o plakovima istog faga koji nekada nisu narasli potpuno pa imaju manji promjer i prozornost. Sva pročišćavanja su rezultirala velikim brojem plakova, >100 ili nebrojivim na razrjeđenju  $10^{-2}$ .

U konačnici, nakon provedenih postupaka izolacije i pročišćavanja faga, iz uzorka EC 42F sam izolirala jednu vrstu/soj faga kojeg sam prozvala EC-F6. U uzorku nisam primijetila prisutnost drugih faga.

#### 4.3. Izolacija faga specifičnih za *A. baumannii*

##### Rezultati izolacije faga iz originalnih uzoraka

Rezultati svih testiranih razrjeđenja AB uzoraka, uključujući i nerazrijeđene uzorke, su bili negativni, odnosno ni na jednoj ploči se nije razvio niti jedan plak, niti je bilo naznaka ikakve lize bakterija.

Na pločama metode plakova u dvostrukom agaru uzorka AB 37 sam uočila pojave nepravilnog oblika, promjera oko 3-4 mm, pomalo tamnije i crvenije nijanse od livade *A. baumannii* s izrazitim tamnijim središtem, a brojnost im je bila proporcionalna s razrjeđenjem

uzorka. Pokušaj pročišćavanja uzroka pojave metodom pročišćavanja faga iz plakova, kao i izlivanje izolata pojave bez prisutnosti bakterija su pokazala da se radi o zagađenju koje raste u obliku kolonija.

#### Rezultati dodatnih postupaka

Nakon drugog ciklusa obogaćivanja AB uzoraka efluenta bakterijom *A. baumannii*, rezultati metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja svih testiranih AB uzoraka su bili negativni. Iako su na nekoliko razrjeđenja svakog uzorka bili vidljivi rubovi kapi nanesenog uzorka omeđeni agregiranim bakterijama (pogotovo kod uzroka AB 37F gdje je pojava bila vidljiva na nerazrijeđenom uzorku i skoro svim razrjeđenjima), nije bilo nikakvih promjena na bakterijskoj livadi koje bi ukazivale na lizu.

Postupak ukoncentriravanja svih AB uzoraka je također dao negativne rezultate metode plakova u dvostrukom agaru, odnosno nisu nastali plakovi niti ikakve čistine uzrokovane lizom bakterija.

Metodom plakova u dvostrukom agaru za uzorak AB 37 proveden s dvostruko mekim agarom kao gornjim agarom nisam uspjela detektirati prisutnost faga u uzorku, odnosno nisam primijetila formiranje plakova niti ikakve zone gdje su bakterije odsutne. Jedino što sam primijetila su veće i više razmaknute mikrokolonije bakterija na pločama s uzorcima naspram bakterijske kontrole K AB, međutim nije bilo lize bakterija.

#### 4.4. Morfološke karakteristike plakova faga specifičnih za *E. coli*

##### Izgled plakova

###### EC-F1

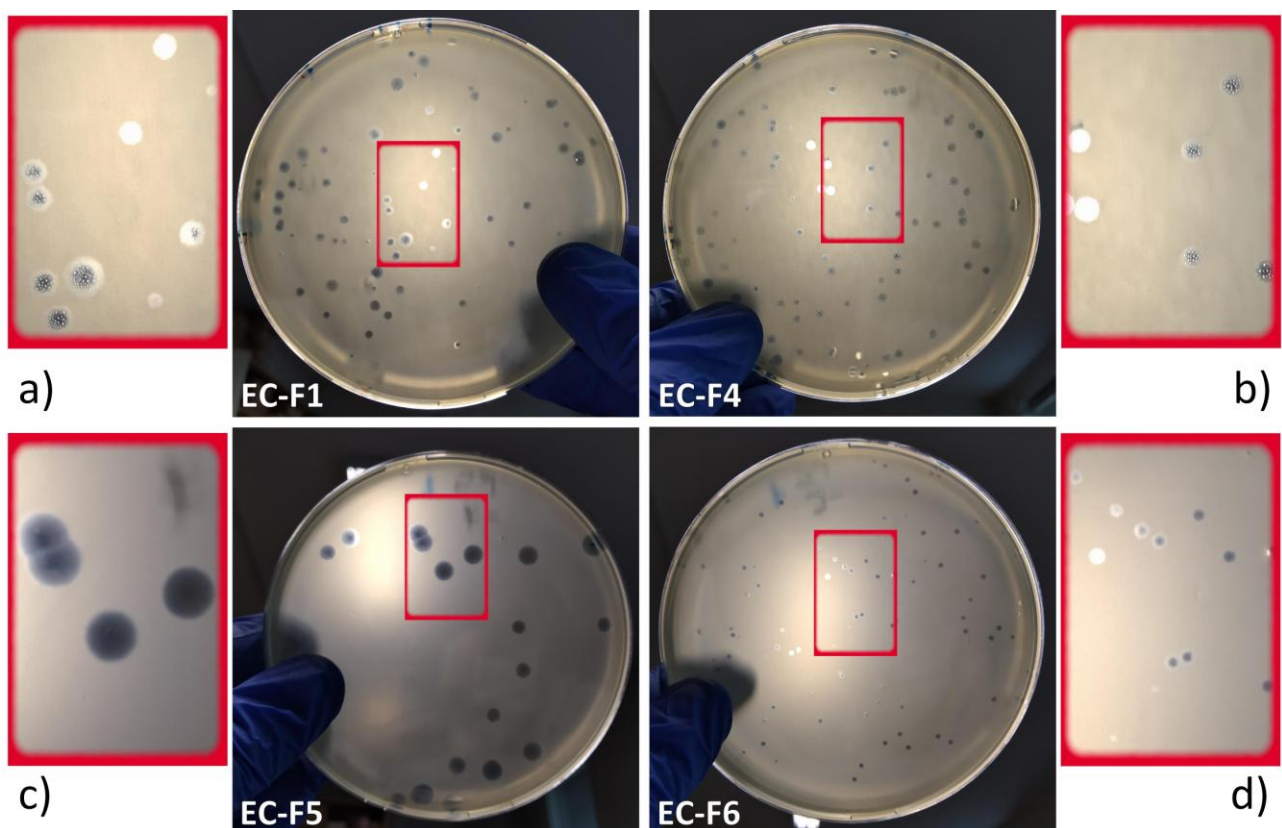
Promatrani bez optičkih pomagala, plakovi faga EC-F1 su okrugli s nepravilnim „nazubljenim“ zamućenim rubovima, dok je većina plaka potpuno prozirna (Slika 13 a).

Pod povećanjem, odnosno na fotografijama plakova faga EC-F1 pod lupom se mogu primijetiti vrlo nepravilni nazubljeni rubovi plakova, kao i blago zamućen rub s bljeđim mikrokolonijama bakterija. Na fotografijama svih plakova se nalazio tamniji prostor s vanjske strane plaka čiji uzrok nisam odredila (Slika 14 a).

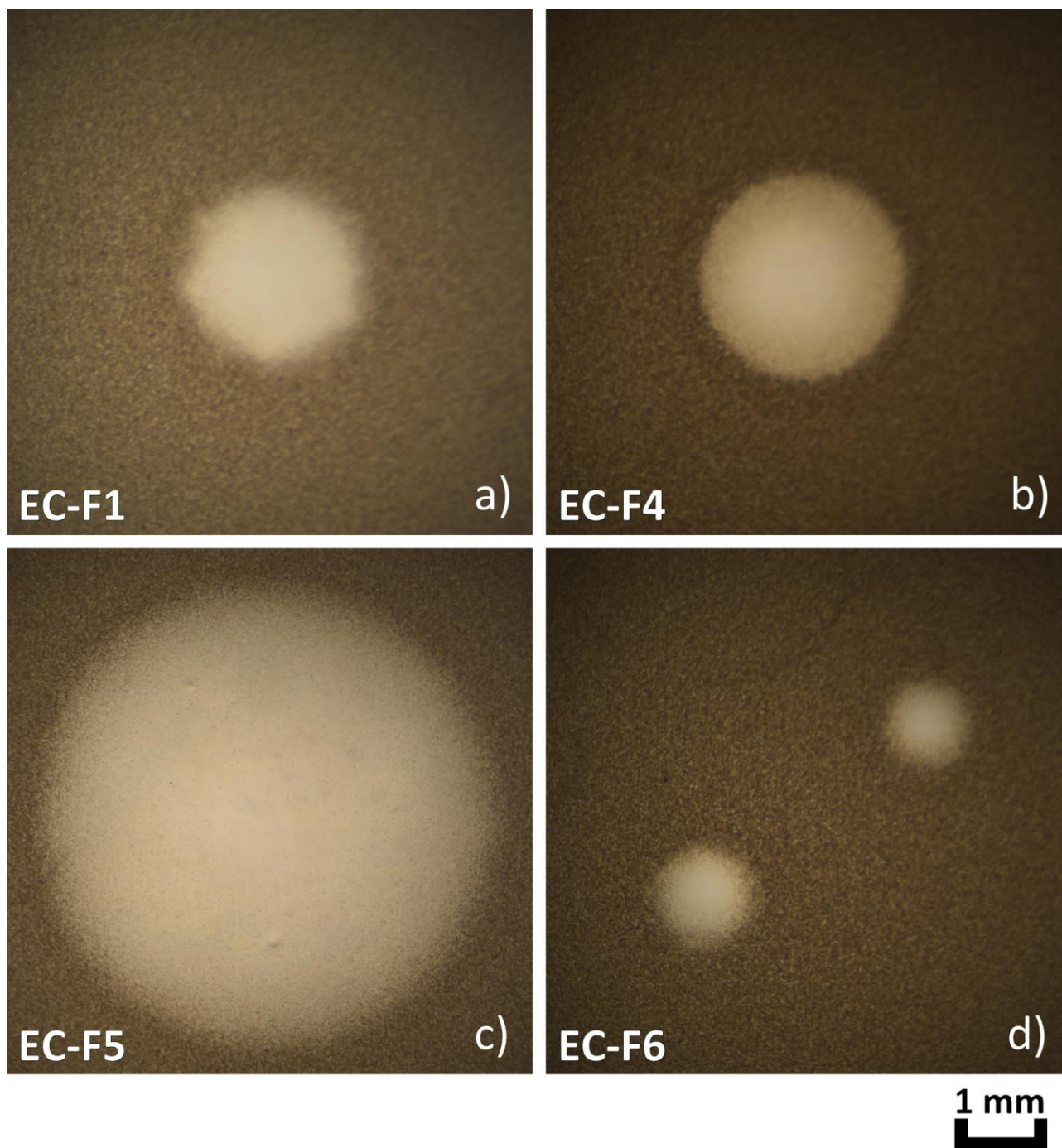
## EC-F4

Promatrani bez optičkih pomagala, plakovi faga EC-F4 su savršeno okrugli s pravilnim rubom, imaju prozirno središte te im se povećava zamućenost prema rubu plaka, odnosno imaju tzv. "bullseye" morfologiju (Slika 13 b).

Pod povećanjem, odnosno na fotografijama plakova faga EC-F4 pod lupom su vidljivi potpuno pravilni oštri rubovi plaka koji opisuju pravilne kružnice. Unutar plakova su vidljive mikrokolonije bljeđeg izgleda, koje stvaraju zamućen izgled dijela plaka oko središta, čija se zamućenost povećava prema rubu plaka s povećanjem vidljivosti mikrokolonija bakterija. Kao i kod plakova faga EC-F1, s vanjske strane svih plakova EC-F4 se nalazio tamniji prostor, koji je uži, pravilnijeg oblika (kružnica) i vidljiviji nego kod plakova EC-F1 (Slika 14 b).



Slika 13: Plakovi izoliranih bakteriofaga specifičnih za bakteriju *Escherichia coli*: a) EC-F1, b) EC-F4, c) EC-F5, d) EC-F6. Pored fotografije ploče se nalazi uvećana fotografija označenog pravokutnika. Fotografije su napravljene ispod halogene svjetiljke.



Slika 14: Fotografije plakova svakog izoliranog bakteriofaga specifičnih za bakteriju *Escherichia coli*, snimljene pod istim povećanjem lupe: a) EC-F1, b) EC-F4, c) EC-F5, d) dva plaka EC-F6. Skala prikazuje duljinu od 1 mm.

#### EC-F5

Promatrani bez optičkih pomagala, plakovi faga EC-F5 su vrlo veliki (puno veći od EC-F1 i EC-F4). Savršeno su okrugli s pravilnim rubom, imaju prozirno središte te veliki zamućeni prostor kojemu se smanjuje prozirnost prema rubu plaka, odnosno imaju tzv. "bullseye" morfologiju (Slika 13 c).

Pod povećanjem, odnosno na fotografijama plakova faga EC-F5 pod lupom je bilo jasno vidljivo da su plakovi puno veći od plakova ostalih izoliranih faga, te da rub plaka opisuje pravilnu kružnicu. Kao i kod plakova faga EC-F4, unutar plakova se nalaze mikrokolonije bljedeg izgleda koje stvaraju zamućeni izgled dijela plaka od središta do ruba plaka. Prozirnost plaka se također smanjuje prema rubu plaka povećanjem broja mikrokolonija koje ujedno postaju tamnije i jasnije vidljive (Slika 14 c).

#### EC-F6

Promatrani bez optičkih pomagala, plakovi faga EC-F6 su vrlo sitni, okrugli, prozirni sa zamućenim rubom (Slika 13 d).

Pod povećanjem, odnosno na fotografijama plakova faga EC-F6 pod lupom je bilo jasno vidljivo da su plakovi puno manji od razvijenih plakova ostalih faga. Mogao se dobro primijetiti pravilan okrugao rub plaka, kao i zamućenost samog ruba sastavljen od bljeđih mikrokolonija (Slika 14 d).

#### Veličina plakova

Svakom od izoliranih faga odredila sam promjer plakova (Tablica 2). Iako je skala po kojoj sam kalibrirala mjere plakova milimetarska skala, zbog očitih razlika u veličinama plakova sam promjere prikazala u jednu desetinu milimetra (program može dati veći broj decimala).

Tablica 2. Promjeri opisanih plakova faga specifičnih za bakteriju *Escherichia coli*.

| Redni broj plaka  | EC-F1     | EC-F4     | EC-F5     | EC-F6     |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1   | 3,5       | 2,6       | 5,7       | 1,2       |
| 2   | 2,6       | 2,5       | 6,1       | 1,2       |
| 3   | 2,8       | 2,3       | 6,1       | 1,0       |
| 4   | 3,0       | 2,6       | 5,6       | 1,2       |
| 5   | 2,3       | 2,4       | 6,1       | 1,3       |
| 6   | 2,3       | 2,3       | 5,2       | 1,2       |
| 7   | 1,8       | 2,1       | 5,4       | 1,1       |
| 8   | 2,3       | 2,4       | 6,0       | 1,1       |
| 9   | 1,8       | 2,7       | 6,4       | 1,1       |
| 10  | 1,5       | 2,4       | 5,3       | 1,1       |
| srednja vrijednost promjera plaka ± standardna devijacija | 2,4 ± 0,6 | 2,4 ± 0,2 | 5,8 ± 0,4 | 1,2 ± 0,1 |

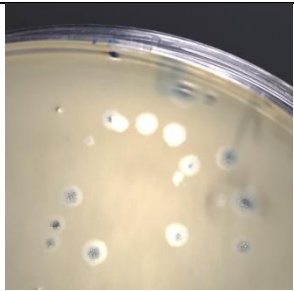
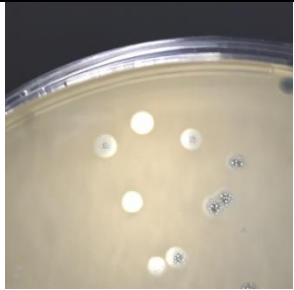


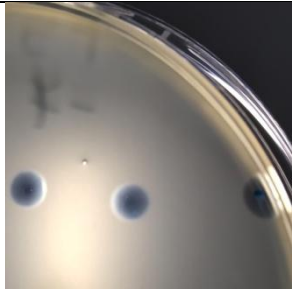
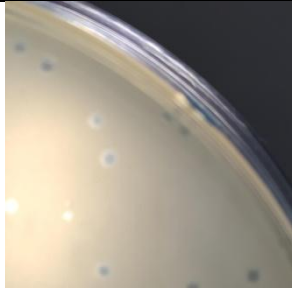
#### 4.5. Zbirni rezultati izolacije bakteriofaga specifičnih za vrste *E. coli* i *A. baumannii*

Iz uzorka efluenta otpadnih voda, odnosno četiri različito tretirana EC uzorka efluenta sam sveukupno izolirala četiri faga specifična za vrstu *E. coli* koji stvaraju plakove različite morfologije, odnosno najvjerojatnije četiri različite vrste/soja faga (Tablica 3). U svakom uzorku se najvjerojatnije nalazila samo jedna vrsta/soj faga: u uzorku EC 37 fag EC-F1, u uzorku EC 37F fag EC-F4, u uzorku EC 42 fag EC-F5, te u uzorku EC 42F fag EC-F6. U uzorku EC 37F su se možda uz fage EC-F4 nalazili i fagi EC-F1. Pošto je na početku bilo teško razlikovati morfologiju plakova ovih faga, postoji mogućnost da sam inicijalno zamijenila plakove EC-F4 za EC-F1. Nakon naknadne analize fotografija plakova dobivenih metodom plakova u dvostrukom agaru, čini se da su svi plakovi na pločama uzorka EC 37F morfologije EC-F4 (koja je sigurno utvrđena nakon procesa pročišćavanja). Na žalost, zbog kvalitete fotografija i mogućnosti analize plakova s fotografija navedeno ne mogu tvrditi sa sigurnošću.

Nisam uspjela izolirati niti jedan fag specifičan za vrstu *A. baumannii*, ali preliminarni rezultati, pogotovo pozitivni rezultati konfluentne lize uzorka AB 37 ukazuju na moguću prisutnost specifičnih faga koje nisam uspjela izolirati korištenim metodama.

Tablica 3. Fagi specifični za bakteriju *Escherichia coli* izolirani iz četiri različito tretirana uzorka efluenta\* i njihove morfološke značajke u LB-mediju s 0,75% agara (uzgojeni metodom plakova u dvostrukom agaru).

| Naziv faga  | Uzorak iz kojeg je izoliran fag* | Prosječna veličina plaka ± standardna devijacija | Morfologija potpuno razvijenog plaka (gledano bez optičkih pomagala)  | Fotografija dijela ploče s plakovima  |
|---|----------------------------------|--|---|---|
| EC-F1<br>(u početku izoliran i kao EC-F2 i EC-F3) | EC 37                            | 2,4 ± 0,6  | Okrugao, nepravilnog nazubljenog ruba, proziran sa zamućenim rubom  |  |
| EC-F4   | EC 37F                           | 2,4 ± 0,2  | Okrugao, pravilnog ruba, prozirnog središta i zamućenog prostora prema rubu koji postaje manje proziran što je dalje od središta („bullseye” morfologija) |  |

|       |        |               |   |   |
|-------|--------|---------------|---|---|
| EC-F5 | EC 42  | $5,8 \pm 0,4$ | Okrugao, pravilnog ruba, prozirnog središta i zamućenog prostora prema rubu koji postaje manje proziran što je dalje od središta („bullseye” morfologija) |  |
| EC-F6 | EC 42F | $1,2 \pm 0,1$ | Okrugao, pravilnog ruba, proziran sa zamućenim rubom  |  |

\* Svi uzorci efluenta su obogaćeni bakterijom *E. coli*; EC 37 – sirovi efluent, inkubacija pri 37 °C; EC 37F – filtrirani efluent, inkubacija pri 37 °C; EC 42 – sirovi efluent, inkubacija pri 42 °C; EC 42F – filtrirani efluent, inkubacija pri 42 °C.

#### 4.6. Titar faga specifičnih za *E. coli*

Titar u konačnim izolatima (određenim triplikatima razrjeđenja) je iznosio [PFU/mL]: EC-F1 –  $7,6 \times 10^7$ , EC-F4 –  $6,3 \times 10^9$ , EC-F5 –  $1,4 \times 10^9$ , EC-F6 –  $8,2 \times 10^8$ ; titar faga određen samo uz pomoć razrjeđenja koji je statistički značajan prema Francis i sur. (2017) je iznosio [PFU/mL]: EC-F1 –  $7,2 \times 10^7$ , EC-F4 –  $6,5 \times 10^9$ , EC-F5 –  $1,22 \times 10^9$ , EC-F6 –  $8,6 \times 10^8$  (Tablica 4).

Tablica 4. Titar izoliranih bakteriofaga specifičnih za bakteriju *Escherichia coli* u konačnim izolatima.

| fag   | Replika                           |                    | razrjeđenje ( $10^x$ ) |                   |                   |    |    |
|-------|-----------------------------------|--------------------|------------------------|-------------------|-------------------|----|----|
|       |                                   |                    | -4                     | -5                | -6                | -7 | -8 |
| EC-F1 | Broj plakova                      | 1                  | nebrojivo              | 65                | 5                 | 1  | 0  |
|       |                                   | 2                  | nebrojivo              | 75                | 7                 | 0  | 0  |
|       |                                   | 3                  | nebrojivo              | 76                | 12                | 1  | 0  |
|       |                                   | Srednja vrijednost | X                      | 72                | 8                 | X  | X  |
|       | Titar [PFU/mL]                    |                    | X                      | $7,2 \times 10^7$ | $8,0 \times 10^7$ | X  | X  |
|       | Srednja vrijednost titra [PFU/mL] |                    | $7,6 \times 10^7$      |                   |                   |    |    |

|              |                                   |                    |                     |                    |                            |                           |                   |
|--------------|-----------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------|
| <b>EC-F4</b> | Broj plakova                      | 1                  | potpuna liza        | skoro potpuna liza | nebrojivo                  | 42                        | 1                 |
|              |                                   | 2                  | potpuna liza        | skoro potpuna liza | nebrojivo                  | 67                        | 4                 |
|              |                                   | 3                  | potpuna liza        | skoro potpuna liza | nebrojivo                  | 86                        | 13                |
|              |                                   | Srednja vrijednost | X                   | X                  | X                          | 65                        | 6                 |
|              | Titar [PFU/mL]                    |                    | X                   | X                  | X                          | <b>6,5x10<sup>9</sup></b> | 6x10 <sup>9</sup> |
|              | Srednja vrijednost titra [PFU/mL] |                    | 6,3x10 <sup>9</sup> |                    |                            |                           |                   |
| <b>EC-F5</b> | Broj plakova                      | 1                  | skoro potpuna liza  | skoro potpuna liza | 133                        | 15                        | 0                 |
|              |                                   | 2                  | skoro potpuna liza  | skoro potpuna liza | 132*                       | 18                        | 0                 |
|              |                                   | 3                  | skoro potpuna liza  | skoro potpuna liza | 101*                       | 11                        | 1                 |
|              |                                   | Srednja vrijednost | X                   | X                  | 122*                       | 15                        | X                 |
|              | Titar [PFU/mL]                    |                    | X                   | X                  | <b>1,22x10<sup>9</sup></b> | 1,5x10 <sup>9</sup>       | X                 |
|              | Srednja vrijednost titra [PFU/mL] |                    | 1,4x10 <sup>9</sup> |                    |                            |                           |                   |
| <b>EC-F6</b> | Broj plakova                      | 1                  | skoro potpuna liza  | nebrojivo          | 89                         | 10                        | 1                 |
|              |                                   | 2                  | x**                 | nebrojivo          | 88                         | 3                         | 2                 |
|              |                                   | 3                  | x**                 | nebrojivo          | 82                         | 10                        | 0                 |
|              |                                   | prosjek            | X                   | X                  | 86                         | 8                         | X                 |
|              | Titar [PFU/mL]                    |                    | X                   | X                  | <b>8,6x10<sup>8</sup></b>  | 7,7x10 <sup>8</sup>       | X                 |
|              | Srednja vrijednost titra [PFU/mL] |                    | 8,2x10 <sup>8</sup> |                    |                            |                           |                   |

\*EC-F5 procijenjen broj plakova (broj potpuno prozirnih središta gdje se plakovi preklapaju) jer su se zbog specifične veličine plakovi preklapali.

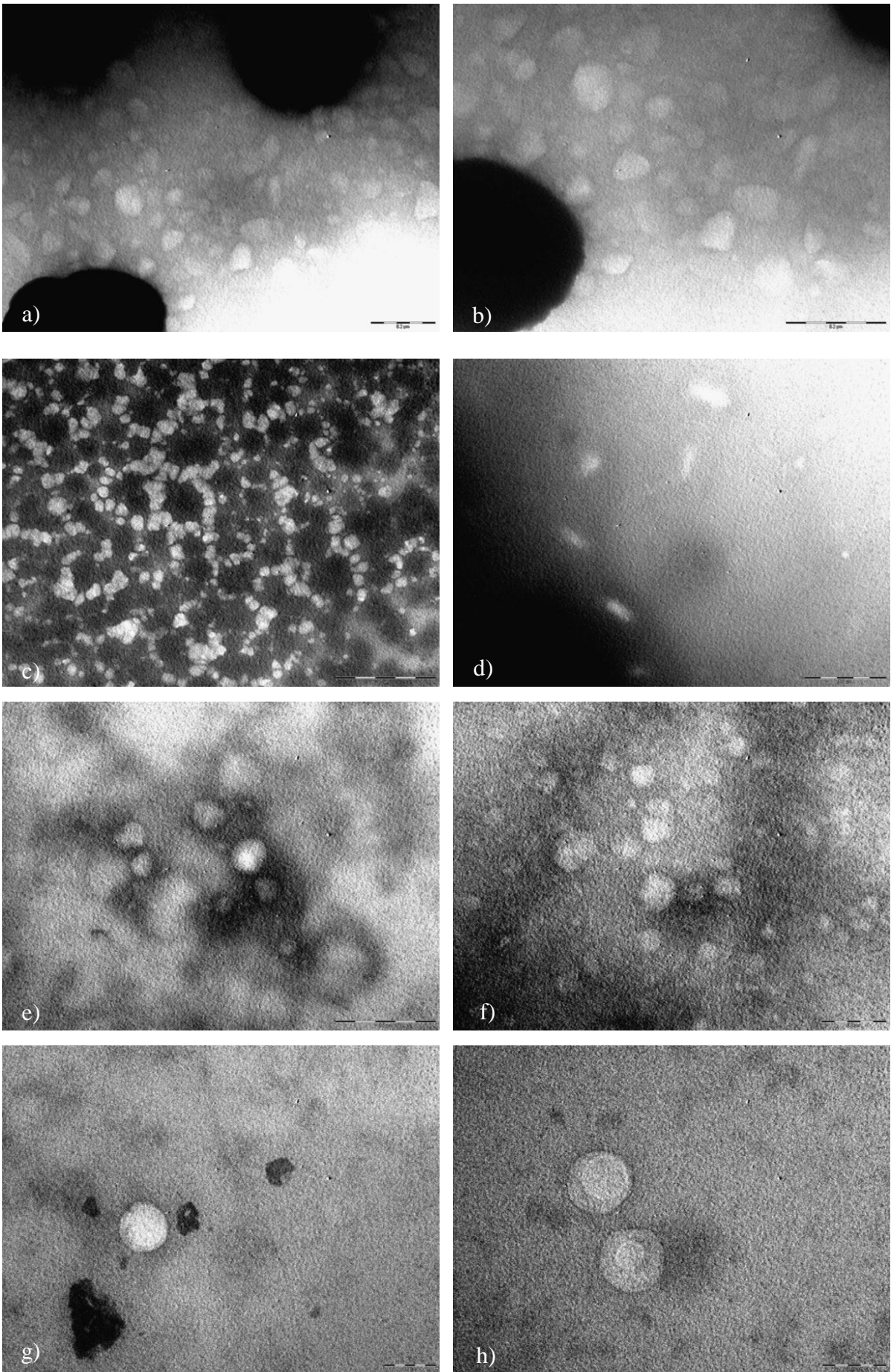
\*\*nema podataka zbog tehničke pogreške

X – srednju vrijednost nije bilo moguće odrediti zbog prevelikog ili premalog broja plakova

#### 4.7. Elektronska mikroskopija

Uz pomoć elektronske mikroskopije nismo uspjeli dobiti neosporive fotografije izoliranih faga. Uzorci su uglavnom imali puno onečišćenja (najvjerojatnije kristala soli i dr.), zbog čega je bilo vrlo teško pretraživati uzorak koji je bio nakapan direktno na bakrenu mrežicu. Zato je postupak stavljanja uzorka na mrežicu modificiran tako da se mrežica stavi na kapljicu uzorka na kratko vrijeme (10 min). Iako su tako pripremljeni uzorci na mrežici bili puno čišći, i dalje nisu pronađene dobre i neosporive slike bakteriofaga. Uslikane su fotografije (Slika 15) nekih nepoznatih struktura (kristalne strukture, pravilne okrugle strukture), koje su možda povezane s bakteriofagima, ali bez daljnjih istraživanja ne mogu biti sigurna što su točno te strukture.





Slika 15. Konačni izolati bakteriofaga specifičnih za vrstu *Escherichia coli* obojeni s

fosfovolframskom kiselinom (PWK) snimljeni pod transmisijskim elektronskim mikroskopom. Uzorci pod c), e), f), g), h) su obojani tako da je mrežica inkubirana na mješavini PWK 10 min.

a) Ukoncentrirani uzorak EC-F1, uvećanje 71 000 x – vidljive su kristalne strukture okruglastog ili trokutastog oblika; mjerka na slici - 0,2  $\mu\text{m}$ .

b) Ukoncentrirani uzorak EC-F1 (isti kao na fotografiji a), uvećanje 110 000 x – dvije strukture su bile izmjerene i promjer je iznosio 90 nm i 70 nm; mjerka na slici – 0,2  $\mu\text{m}$ .

c) Ukoncentrirani uzorak EC-F1, uvećanje 22 000 x – vidljive su bijele okruglaste strukture koje okružuju crno onečišćenje; mjerka na slici – 1  $\mu\text{m}$ .

d) Ukoncentrirani uzorak EC-F4, uvećanje 36 000 x – vidljive su bijele štapičaste strukture kroz cijeli uzorak, duljine oko 200 nm; mjerka na slici – 0,5  $\mu\text{m}$ .

e) Talog ukoncentriranog uzorka EC-F5, uvećanje 44 000 x – vidljive su male svjetlije okruglaste strukture; mjerka na slici – 0,5  $\mu\text{m}$ .

f) Talog ukoncentriranog uzorka EC-F5, uvećanje 71 000 x – vidljive su bijele okruglaste strukture oštrijih rubova, nepravilnog oblika; mjerka na slici – 0,2  $\mu\text{m}$ .

g) Talog ukoncentriranog uzorka EC-F6, uvećanje 56 000 x – vidljiva je bijela okrugla struktura čiji je promjer iznosio 190 nm; mjerka na slici – 0,2  $\mu\text{m}$ .

h) Talog ukoncentriranog uzorka EC-F6, uvećanje 140 000 x – vidljive su dvije svjetlije okrugle strukture s drugačijom strukturom središta; mjerka na slici – 0,1  $\mu\text{m}$ .

## 5. RASPRAVA

Iz uzorka efluenta centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba sam uspješno izolirala fage specifične za vrstu *Escherichia coli*, ali ne i za vrstu *Acinetobacter baumannii*, iako preliminarni rezultati (konfluentna liza bakterijske livade s uzorkom AB 37) upućuju da su u uzorku efluenta možda bili prisutni fagi specifični za tu bakteriju. Zašto izolacija faga specifičnih za bakteriju *A. baumannii* nije bila uspješna nije potpuno jasno, ali literatura (Latz i sur. 2016, Mattila i sur. 2015, Bagińska i sur. 2019) upućuje da ovaj rezultat nije neuobičajen. Latz i sur. (2016), koji su se fokusirali na izolaciju faga specifičnih za bakterije iz „ESKAPE“ grupe (u koju spada vrsta *A. baumannii*), ističu kako su u literaturi navedeni okolišni uzorci iz kojih su uspješno izolirani fagi specifični za bakterije od interesa, ali da postoji malo informacija o tome koliko je okolišnih uzoraka bilo potrebno za uspješnu izolaciju i da li je tokom procesa izolacije bilo potrebno mijenjati uvjete dok izolacija nije rezultirala uspjehom. Iz tog razloga je teško zaključiti kolika je vjerojatnost uspješne izolacije faga za ove bakterije (Latz i sur. 2016). Rad koji je obratio pozornost na uspješnost izolacije specifičnih faga iz otpadnih voda je Mattila i sur. (2015). Ovi autori su istraživali mogućnost izolacije faga specifičnih za različite bakterijske vrste, uključujući *E. coli* i *A. baumannii*, iz kanalizacijske vode uzorkovane više puta kroz vremenski period od skoro dvije godine, unutar jednog postrojenja za obradu otpadnih voda (u gradu Jyväskylä, Finska). Iako su uspjeli izolirati fage specifične za *E. coli* (testirano na šesnaest različitih sojeva) u oko 90% pokušaja, fage specifične za *A. baumannii* (devet sojeva) su uspjeli izolirati u manje od 40% pokušaja, te nisu uspjeli izolirati fage specifične za sve korištene sojeve (uspjeli su za njih pet od devet), dok su za skoro sve korištene sojeve *E. coli* (15/16) izolirali specifične fage (Mattila i sur. 2015). Iako su Mattila i sur. (2015) istraživanje proveli na samo jednoj lokaciji koja ne mora biti slična CUPOVZ, njihovi rezultati ipak sugeriraju da bi izolacija faga specifičnih za vrstu *A. baumannii* mogla biti manje uspješna od izolacije faga specifičnih za *E. coli* iz kanalizacijskih voda. Ja sam specifične fage pokušala izolirati iz samo jednog kompozitnog uzorka efluenta (kojeg sam obogatila na nekoliko različitih načina), te za samo jedan soj *A. baumannii*, pa prema rezultatima autora Mattila i sur. (2015) nije neuobičajeno što izolacija specifičnih faga za ovu bakteriju nije uspjela. No, treba imati na umu da su spomenuti autori izolirali fage najvjerojatnije iz sirove neobrađene kanalizacije, dok su u ovom pokusu izolirani iz efluenta otpadne vode pročišćene kroz postrojenje CUPOVZ, što bi eventualno moglo imati utjecaj na relativnu uspješnost izolacije faga specifičnih za bakteriju *A. baumannii*. Poznato je da u postrojenjima za obradu otpadnih voda kolifagi bivaju uklonjeni iz otpadne vode (Ewert i Paynter 1980, Mandilara i sur. 2006), zajedno sa svojim domaćinima na koje su vezani, u procesu koji uključuje aktivni mulj u aeriranom reaktoru djelovanjem praživotinja (Ewert i Paynter 1980). No, Ewert i Paynter (1980) su pronašli povećanje

ukupnog broja faga u efluentu iz reaktora naspram influenta u reaktor postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda (u gradu Gaffney, Južna Karolina) te nisu utvrdili koje bakterije uzrokuju povećanje broja faga (Ewert i Paynter 1980). Dokazano je da se vrsta *A. baumannii* nalazi u aktivnom mulju CUPOVZ (Higgins i sur. 2018), pa možda postoji teoretska mogućnost da u aktivnom mulju dolazi do umnažanja faga specifičnih za ovu bakteriju koji bi mogli završiti u efluentu, s obzirom da dolazi do povećanja broja nekih faga u reaktoru s aktivnim muljem (Ewert i Paynter 1980). Naravno, postoji mogućnost da nema značajne razlike u koncentraciji faga u influentu i efluentu ili da dolazi do smanjenja broja faga specifičnih za *A. baumannii*, kao što su Ewert i Paynter (1980) našli da se događa s fagima specifičnim za bakterije koje su uspjeli izolirati iz postrojenja.

Kao najbolji izvor faga specifičnih za *A. baumannii* se navodi bolnička kanalizacija (Bagićska i sur. 2019), a Higgins i sur. (2018) procjenjuju da bolničke otpadne vode čine samo 0,3-1,7% ukupnog influenta otpadnih voda u CUPOVZ. S druge strane, Latz i sur. (2016) su uspješno izolirali fage specifične za *A. baumannii* iz nekoliko vodenih izvora koji su, osim bolničke kanalizacije, uključivali i netretirani influent u postrojenje za obradu otpadnih voda, ali i dva jezera. No, oni su izolaciju provodili na sojevima koji su izolirani iz bolnice iz čije su okoline uzimali uzorke te su našli specifične fage za tri od pet korištenih kliničkih sojeva (Latz i sur. 2016). Ja sam u svojem pokusu koristila samo jedan laboratorijski soj *A. baumannii* ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)), a ne sojeve izolirane iz bolnica grada Zagreba.

Kao što sam napomenula u uvodu, Bagićska i sur. (2019) navode da je vrlo teško izolirati i umnožiti fage specifične za vrstu *A. baumannii* i da je stoga potrebno optimizirati postupak za svaki zasebni fag. Sve prije navedeno (Latz i sur. 2016, Mattila i sur. 2015, Bagićska i sur. 2019) ukazuje na probleme izolacije faga specifičnih za vrstu *A. baumannii* te da, iako je moguće postići pozitivne rezultate, nije neobično što ja nisam uspjela izolirati fage specifične za samo jedan soj iz samo jednog okolišnog uzorka. Unatoč tome, postoji mogućnost da se u uzorku ipak nalazio specifičan fag s obzirom na pozitivni preliminarni rezultat. Pošto je poznato da su fagi specifični za bakteriju *A. baumannii* u više slučajeva uspješno izolirani iz uzoraka kanalizacijske vode i otpadnih voda (Bagićska i sur. 2019), smatram da bi trebalo nastaviti s pokušajima izolacije specifičnih faga za ovu bakteriju iz uzoraka Zagrebačkih otpadnih voda. Smatram da bi trebalo provesti više uzorkovanja i pokušaja izolacije faga iz efluenta otpadnih voda iz CUPOVZ, pogotovo jer moji preliminarni rezultati impliciraju da bi pokušaji mogli biti uspješni. Također smatram da bi bilo dobro pokušati izolirati fage iz uzoraka nepročišćene otpadne vode, odnosno influenta u CUPOVZ, pošto influent u postrojenje za obradu otpadnih voda može biti izvor faga specifičnih za vrstu *A. baumannii* (Latz i sur. 2016), ali bi sam postupak možda mogao biti teži zbog otpada koji se uklanja procesom pročišćavanja CUPOVZ, pa i opasniji po zdravlje. Zbog specifičnosti faga prema bakterijama domaćinima (Hyman 2019, Nikolich i Filippov 2020), smatram da bi bilo korisno

pokušati izolirati fage specifične za vrstu *A. baumannii* koristeći sojeve koji su pronađeni u Zagrebačkoj otpadnoj vodi, odnosno influentu, aktivnom mulju i efluentu CUPOVZ. Higgins i sur. (2018) su dokazali konstantan priljev određenih klonova *A. baumannii* u CUPOVZ tijekom godine dana, a ova je bakterijska vrsta izolirana sporadično i ranije (Higgins i sur. 2018). Problem bi mogla biti sigurnost rada s takvim sojevima, s obzirom da su iz CUPOVZ izolirane *A. baumannii* neosjetljive na različite antibiotike, uključujući karbapenem (Higgins i sur. 2018). Bilo bi možda najviše korisno pokušati izolirati fage na sojevima izoliranim iz Zagrebačkih bolnica čije otpadne vode ulaze u CUPOVZ, slično kao što su napravili Latz i sur. (2016), pošto je ideja izolacije u svrhu potencijalne terapije fagima pa fagi trebaju biti specifični za bakterije od interesa (Hyman 2019). Da je izolacija faga bila uspješna sa sojem kojeg sam koristila u ovom pokusu, mogla bih naknadno testirati njihovu učinkovitost protiv višestruko rezistentnih sojeva za koje bi terapija fagima bila značajna, s obzirom da je ovaj soj bio „surogat“ soj sigurniji za rad u danim laboratorijskim uvjetima (Gill i Hyman 2010, Hyman 2019).

Zbog rezultata koje su postigli Mattila i sur. (2015), Mandilara i sur. (2006) te Jurczak-Kurek i sur. (2016), uspjeh u izolaciji faga specifičnih za *E. coli* se čini očekivanim. Jurczak-Kurek i sur. (2016) su iz urbane kanalizacije uspješno izolirali 60 različitih faga specifičnih za vrstu *E. coli*, od kojih je 59 moglo inficirati soj MG1655 (Jurczak-Kurek i sur. 2016), iz kojeg je izveden *E. coli* soj LMM2632 kojeg sam koristila u ovom pokusu (Buljubašić i sur. 2019). Iako se kolifagi uklanjaju unutar postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda (Ewert i Paynter 1980, Mandilara i sur. 2006), Mandilara i sur. (2006) su dokazali prisutnost somatskih kolifaga i u efluentu postrojenja za sekundarno pročišćavanje otpadnih voda. Mandilara i sur. (2006) su unutar svog pokusa (mjesečno tokom dvije godine) uzorkovali influent i efluent postrojenja za sekundarnu obradu otpadnih voda (u gradu Ateni) te su odredili koncentraciju od oko 10-100 PFU/mL somatskih kolifaga u efluentu postrojenja ( $\approx 10^3$  PFU/mL u influentu); oni su također otkrili korelaciju između broja određenih bakterija indikatora fekalnog zagađenja, uključujući intestinalnih enterokoka, i prisutnosti specifičnih bakteriofaga, te moguću djelomičnu korelaciju između koncentracije intestinalnih enterokoka i somatskih kolifaga. Koncentracija intestinalnih enterokoka koju su Mandilara i sur. (2006) odredili u influentu i efluentu je slična koncentraciji intestinalnih enterokoka koje su Hrenovic i sur. (2017) otkrili u influentu i efluentu CUPOVZ (oboje malo manje od  $10^5$  CFU/mL u influentu i oko  $10^2$  CFU/mL u efluentu), pa je stoga možda i koncentracija somatskih kolifaga slična, iako ne nužno.

Uspješno sam izolirala najvjerojatnije četiri različite vrste/soja faga specifičnih za vrstu *E. coli*, s obzirom da sam izolirala četiri različite morfologije plakova (različiti tipovi faga se često mogu razlikovati prema morfologiji plakova koje stvaraju (Abedon 2018)), iako se na početku

činilo da sam našla šest različitih morfologija plakova. Razlog zamijene jednog faga (EC-F1) za tri različita (EC-F1, EC-F2 i EC-F3) je velika razlika u veličini plakova i razlika u izgledu ruba plakova, koja je možda uzrokovana slabijom adsorpcijom faga na bakteriju – što je adsorpcija faga na bakterije sporija, to je veća varijacija u vremenu kada se individualni fag veže na bakteriju (Abedon i Yin 2009), a plak će imati više vremena za rast ako se ranije veže na bakteriju (Abedon 2018). Iz tog razloga se smanjuje varijabilnost veličine plakova ukoliko se na ploči iniciraju inficiranim bakterijama, a ne slobodnim fagima koji se prvo moraju adsorbirati na bakteriju da bi započeo rast plaka (Abedon 2018). Danih 8 minuta inkubacije faga i bakterija prije izlijevanja najvjerojatnije nije bilo dovoljno da se većina faga EC-F1 adsorbira na bakterije prije izlijevanja, zbog čega su se mnogi fagi adsorbirali na bakterije naknadno u samoj ploči. Kasnija adsorpcija je uzrokovala da njihovi plakovi imaju manje vremena za rast do sazrijevanja livade i stoga budu manje veličine (originalno prozvani EC-F1) nego plakovi faga koji su se adsorbirali ranije (originalno prozvani EC-F2 i EC-F3). Originalno prozvani plakovi EC-F3 su stoga najvjerojatnije uzrokovani fagima koji su se prvi adsorbirali na bakterije, te time imali najviše vremena za rast. Kada je vrijeme inkubacije faga i bakterija bilo 15 min (tokom pročišćavanja faga iz plakova), varijacija u veličini plakova je bila puno manja, najvjerojatnije jer je trajanje inkubacije bilo dovoljno da se većina faga adsorbira na bakterije prije izlijevanja.

Kako sam tokom cijelog pokusa za provođenje metode plakova u dvostrukom agaru za sve fage koristila jednake hranjive podloge, što znači jednaku količinu nutrijenata, agara, te jednaku vlažnost ploča, ti uvjeti, koji inače mogu utjecati na veličinu plakova (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018), nisu utjecali na razlike u veličini plakova različitih izoliranih faga u mom pokusu. Jednako tome, pošto sam koristila jednaku količinu bakterija sa određenim stadijem rasta, gustoća livade i stanje bakterija, koji inače mogu utjecati na veličinu plakova (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018), nisu utjecali na razlike u veličini plakova različitih izoliranih faga u mom pokusu. Na razliku u veličini plakova različitih faga su stoga utjecala svojstva faga: sposobnost difuzije faga, adsorpcija, latentni period, veličina otpusta (Abedon i Yin 2009, Gallet i sur. 2011, Abedon 2018) te sposobnost lize bakterija u kasnijoj fazi rasta (Abedon 2018). Difuzivnost faga u hranjivoj podlozi može ovisiti o njegovoj veličini (Abedon i Yin 2009) pa je možda i veličina faga utjecala na veličinu plakova, iako to nisam mogla dokazati zbog neuspjeha dobivanja slika faga TEM-om. Svojstva faga kao što su stopa adsorpcije, latentni period i veličina otpusta se mogu mjeriti metodama koje nisam provodila (Hyman i Abedon 2009), stoga ne mogu donositi nikakve pouzdane zaključke o tim svojstvima izoliranih faga. Plakovi EC-F6 su bili jako malenih dimenzija, što bi moglo biti uzrokovano: fagima koji slabo difundiraju u korištenoj hranjivoj podlozi (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018), možda zbog većih viriona (Abedon i Yin 2009), veće stope adsorpcije (Gallet i sur. 2011, Abedon 2018), dugog latentnog perioda (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018) te vrlo male

veličine odpusta (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018). Plakovi EC-F5 su imali vrlo velike promjere, što bi moglo biti uzrokovano: fagima koji bolje difundiraju u korištenoj hranjivoj podlozi (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018), možda zbog manjih viriona (Abedon i Yin 2009), manje stope adsorpcije (Gallet i sur. 2011, Abedon 2018), kraćeg latentnog perioda (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018) te veće veličine odpusta (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018). Plakovi EC-F1 i EC-F4 su bili sličnih dimenzija kad su narasli do pune veličine, ali je varijabilnost u veličini plakova bila veća kod faga EC-F1 (nakon metode plakova u dvostrukom agaru kada je vrijeme inkubacije bakterija i faga prije izlijevanja bilo 15 min i kada je bilo 8 min), što bi moglo biti uzrokovano slabijom adsorpcijom faga EC-F1 (Abedon i Yin 2009, Abedon 2018).

Uzrok razlike u morfologijama plakova različitih faga koje sam izolirala nije poznat, pošto je nehomogenost unutar plakova slabo istraživana (Abedon i Yin 2008). Kao što sam već objasnila u uvodu, na turbiditet plaka utječu bakterijske mikrokolonije koje nisu lizirane, što bi moglo uključivati broj neliziranih mikrokolonija ili mikrokolonije koje su djelomično lizirane. Pošto su mikrokolonije u središtu plaka (odakle je krenulo stvaranje plaka) bile manje tokom stvaranja plaka, njih fagi mogu lakše lizirati i stoga središte plaka može biti prozirnije. Dok plak raste, rastu i bakterijske mikrokolonije koje stoga mogu biti teže za lizirati, pa zamućenost plaka može rasti prema njegovoj periferiji. Prema tome fagi koji lakše liziraju starije/veće mikrokolonije bi mogli stvarati plak koji je prozirniji prema svome rubu (Abedon 2018). Možda je bolja sposobnost lize starijih/većih mikrokolonija uzrok prozirnijeg izgleda faga EC-F1 i nešto manje faga EC-F6. Uzrok stvaranja „bullseye“ morfologije plaka (koju su imali plakovi EC-F4 i EC-F5) je nepoznat, iako postoji više teorija o njihovom mogućem uzroku: gustoća bakterija se povećava rastom livade, kao što se i vjerojatno mijenja njihovo fiziološko stanje. Stoga, ako se mutacijama razvijaju bakterije rezistentne na fage biti će ih više što su se dulje razvijale bakterije, odnosno dalje od središta plaka (Abedon i Yin 2008). Ukoliko mikrokolonije postaju otpornije na lizu fagima tokom rasta, što bi moglo biti uzrokovano vremenski duljom lizom veće mikrokolonije ili mogućnosti da su središta mikrokolonija ušla u stacionarnu fazu rasta, onda bi ih bilo teže lizirati što kasnije fagi dođu do njih, odnosno dalje od središta plaka (Abedon i Yin 2008). „Bullseye“ morfologija u slučaju T4 faga može biti povezana s inhibicijom lize – fenomen gdje adsorpcija više faga na bakteriju uzrokuje značajno produljenje latentnog perioda (Abedon i Yin 2008). Smatra se da bi u različitim dijelovima plaka mogli djelovati različiti selekcijski pritisci, te da bi prema periferiji plaka mogla postojati selekcija za kraćim latentnim periodom jer se time fagima povećava pristup neinficiranim bakterijama koje su gusto narasle (Abedon i Yin 2008). Prema tome pretpostavljam da bi možda fagi s duljim latentnim periodom mogli imati mutnije „bullseye“ plakove te da bi veliki „bullseye“ plak kojeg stvara EC-F5 možda mogao biti uzrokovan fagima koji imaju veliku sposobnost difuzije i dugi latentni period.

Tamniji prostor oko plakova EC-F1 i EC-F4, koji je bio vidljiv na fotografijama faga pod lupom (kao i obruč oko plakova vidljiv na neuvećanim fotografijama ploča s plakovima EC-F4), bi mogao biti uzrokovan difuzijom hidrolitičkih enzima podrijetlom iz faga koji liziraju kapsule bakterija (Abedon 2018), odnosno enzimima podrijetlom iz faga koji uništavaju vanjski dio bakterije (Jurczak-Kurek i sur. 2016), stvarajući prostor oko plaka zvan „halo“ (Abedon 2018, Jurczak-Kurek i sur. 2016). „Halo“ raste preko granica plaka jer enzimi, zbog svoje male veličine, mogu difuzijom prelaziti veće udaljenosti od faga (Abedon 2018).

Čini se da sam iz svakog EC uzorka izolirala samo jedan fag, te iz svakog uzorka drugu vrstu/soj faga specifičan za bakteriju *E. coli*. Smatram da je to posljedica metode obogaćivanja uzoraka. Metode obogaćivanja uzorka mogu uzrokovati „pristranost“ u konačnoj izolaciji faga jer će se prilikom obogaćivanja uzorka vjerojatno najviše umnožiti fag ili fagi koji se najbrže umnažaju u danim uvjetima, te time potisnuti fage koji se sporije umnažaju (Gill i Hyman 2010). Postupak obogaćivanja uzorka u tekućoj kulturi uzrokuje kompeticiju između različitih bakteriofaga (u uzorku u kojem je prisutno više različitih faga), stoga rezultat tog procesa može biti jedan najuspješniji bakteriofag u kulturi (Serwer i sur. 2004). Pošto različiti fagi mogu imati različitu uspješnost umnažanja na različitim temperaturama (Seeley i Primrose 1980), temperatura je mogla biti selektirajući faktor u procesu obogaćivanja faga u tekućoj kulturi kojeg sam provela u svojem pokusu – različiti fagi su možda bili uspješniji na različitim temperaturama (EC-F1 i EC-F4 na 37 °C, EC-F5 i EC-F6 na 42 °C) i time najuspješniji ili jedini bakteriofagi umnoženi u uzorku. Jurczak-Kurek i sur. (2016) su testirali različite fage, koje su izolirali iz kanalizacije, na mogućnost „preživljavanja“ određenih temperatura, te je od 60 izoliranih faga specifičnih za vrstu *E. coli* 35 faga imalo postotak preživljavanja <50% nakon 40-minutne inkubacije pri temperaturi od 40 °C (nekoliko njih ≤10%), ali je i 15 faga imalo 100% preživljavanja pri toj temperaturi. Svi fagi su izolirani nakon postupka obogaćivanja na temperaturi od 37 °C, na kojoj su i inkubirane ploče s fagima i bakterijama u svrhu dobivanja plakova za izolaciju faga i određivanje termalne inaktivacije faga, što znači da se mogu umnažati pri toj temperaturi (Jurczak-Kurek i sur. 2016). Ovakva razlika u sposobnosti preživljavanja temperature od 40 °C između različitih faga specifičnih za bakteriju *E. coli* ukazuje kako su različiti rezultati izolacije faga nakon postupka obogaćivanja uzorka kod različitih temperatura u mom pokusu mogli biti očekivani, s obzirom da određeni fagi nisu niti sposobni „preživjeti“ takve temperature, a time najvjerojatnije nisu ni sposobni biti najuspješniji bakteriofagi u uzorku. Seeley i Primrose (1980) su istraživanjem bakteriofaga iz vodenih i drugih medija (uzorci rijeke, kanalizacija, ljudski izmet i izmet određenih domaćih životinja) pronašli kolifage koji imaju različite temperaturne raspone na kojima stvaraju plakove (na pločama s *E. coli*) i različitu relativnu uspješnost stvaranja plakova pri različitim temperaturama (odnosno tzv.



„*efficiency of plating*“). Iz tog razloga su ih podijelili na tri skupine: „*low temperature phages*“ (fagi niskih temperatura; stvaraju plakove na temperaturama  $\leq 30$  °C), „*mid-temperature phages*“ (fagi srednjih temperatura; stvaraju plakove na temperaturama 15-42 °C) i „*high temperature phages*“ (fagi visokih temperatura; stvaraju plakove na temperaturama  $\geq 25$  °C). Kako mnogi fagi niskih temperatura ne stvaraju plakove pri temperaturi od 37 °C, te kako im je optimalna temperatura pri 20-30 °C (Seeley i Primrose 1980), takve fage najvjerojatnije nisam izolirala. No, fagi srednjih temperatura i fagi visokih temperatura uspijevaju pri temperaturi od 37 °C (Seeley i Primrose 1980), stoga sam mogla izolirati fage koji spadaju u bilo koji od ta dva tipa. Prema njihovim prikazanim rezultatima čini se kako bi fagi srednjih temperatura i fagi visokih temperatura mogli imati sličnu relativnu uspješnost stvaranja plakova pri temperaturi od 37 °C, dok su pri višim temperaturama fagi visokih temperatura uspješniji. Oba tipa faga su pronašli u sirovoj kanalizaciji, te smatraju da potječu iz probavnog sustava toplokrvnih životinja u kojima su također pronašli obje skupine faga (ljudski izmet ima podjednaki udio oba tipa faga, dok kanalizacija ima puno više faga srednjih temperatura)(Seeley i Primrose 1980). Prema tome, postoji mogućnost da su se u mom pokusu u kulturi prilikom procesa obogaćivanja uzorka pri temperaturi od 37 °C natjecali fagi oba tipa, dok su pri višim temperaturama fagi visokih temperatura imali prednost, iako je moguće da sve ovisi o pojedinačnim fagima u uzorku. Ovi rezultati sugeriraju da bi primjena različitih temperatura inkubacije kod postupka obogaćivanja uzorka u tekućoj kulturi mogla rezultirati izolacijom više različitih faga, što bi se trebalo potvrditi pokusima dizajniranima u svrhu testiranja ove hipoteze. U tom slučaju smatram da bi trebalo testirati više različitih temperatura koje su pogodne za umnažanje bakterije domaćina. Fagi koji se žele koristiti u terapijske svrhe bi se trebali moći umnažati u bakterijama u ljudskom tijelu (Gordillo Altamirano i Barr 2019), stoga smatram da bi bilo korisno, tijekom postupka obogaćivanja uzorka u tekućoj kulturi koristiti temperature koje može imati ljudsko tijelo u zdravlju (36,1-37,8 °C) i bolesti, što uključuje i povišene temperature pri groznici (Herlihy 2007), ali i niže temperature kože (Herlihy 2007) za izolaciju faga namijenjenih liječenju kožnih infekcija.

Treba napomenuti da se određeni uzorci mogu izravno testirati na prisustvo faga bez postupka obogaćivanja uzorka, čime se uklanja „pristranost“, ali ti uzorci trebaju sadržavati relativno veću koncentraciju faga (Hyman 2019). Alternativno se fagi iz uzorka mogu ukoncentrirati ultracentrifugiranjem, ali i taj postupak bi mogao uvesti manje poznate „pristranosti“, te se kao mogućnosti navode inaktivacija ili „zarobljavanje“ faga ultrafiltracijskom membranom, te usporedna koncentracija spojeva koji mogu inaktivirati fage (Gill i Hyman 2010). No, činjenica da se postupkom obogaćivanja selektiraju virulentni fagi koji se brzo umnažaju u danim uvjetima se smatra i pozitivnom stranom, s obzirom da bi se fagi, koji se žele koristiti u terapijske svrhe, trebali lako umnažati i manipulirati u laboratorijskim uvjetima (Gill i Hyman 2010).

Razlog zašto je došlo do umnažanja različitih faga ovisno o tome je li uzorak bio filtriran se čini nejasnijim te smatram da u obzir treba uzeti više mogućnosti: 1) Postoje vrlo veliki fagi koji spadaju u skupinu tzv. „*Jumbo*“ faga (bakteriofagi s genomom većim od 200 kpb), kao što je fag G čija je glava veličine 160 nm i rep duljine 453 nm (Yuan i Gao 2017), koji bi možda u velikom broju zapeli na filteru pora 0,45  $\mu\text{m}$ , ali bi u tom slučaju teško mogli proći kroz filter pora 0,2  $\mu\text{m}$  (kojeg sam koristila za konačno pročišćavanje svih uzoraka, uključujući nefiltrirane), stoga se takvi fagi najvjerojatnije uopće ne bi ni nalazili u konačno obrađenim uzorcima, osim u malo vjerojatnom slučaju slučajne kontaminacije pročišćenog uzorka nepročišćenim uzorkom ili velikih grešaka filtera pora 0,2  $\mu\text{m}$  (poput rupe u filteru). Ipak, pošto „*Jumbo*“ fagi ne stvaraju vidljive plakove u polučvrstom mediju (Yuan i Gao 2017), njih najvjerojatnije ne bih ni detektirala. 2) Hyman (2019) izvještava da je u slučaju obrade određenih vrsta uzoraka (fekalni uzorci i tlo) u svom laboratoriju dobivao bolje rezultate kada bi se preskočio postupak filtriranja prije prvog ciklusa infekcije bakterija domaćina s uzorkom te pretpostavlja da su možda uzrok fagi vezani na veće čestice iz uzorka, ukoliko su receptori faga slobodni kako bi bili sposobni inficirati bakterije (Hyman 2019). Ukoliko su u mom pokusu određeni fagi bili vezani na čestice iz efluenta koje ne mogu proći kroz filter pora 0,45  $\mu\text{m}$  (koje su sigurno bile prisutne u uzorku s obzirom da su neke bile vidljive golim okom), a koji su zadržali sposobnost infekcije bakterija, možda su mogli inficirati bakterije domaćine u uzorku i dominirati uzorkom tokom procesa obogaćivanja. 3) Ukoliko se fag nalazio unutar bakterija koje se „prirodno“ nalaze u uzorku efluenta, takve bakterije su mogle biti uklonjene iz dijela filtriranog uzorka, ali zadržane u nefiltriranom dijelu uzorka. Pošto se određeni fagi mogu nalaziti u posebnom stanju mirovanja unutar bakterije koja je u stanju gladovanja (pseudolizogeni ciklus), nakon čega ulaze u normalan litički/lizogeni ciklus kada bakterija uđe u povoljno stanje (Díaz-Muñoz i Koskella 2014), možda su fagi u takvom obliku mogli biti prisutni u bakterijama uzorka te se aktivirati i namnožiti ulaskom bakterija u povoljne nutritivne i temperaturne uvjete tijekom procesa obogaćivanja u nefiltriranom dijelu uzorka. Također, pošto umjereni fagi mogu biti u stanju profaga unutar bakterija i prijeći u litički dio ciklusa spontano ili pod utjecajem stresora (Howard-Varona i sur. 2017), tokom procesa obogaćivanja u nefiltriranom dijelu uzorka je možda moglo doći do aktivacije profaga bakterija koje se „prirodno“ nalaze u uzorku te do njihovog umnažanja u bakterijama domaćinima. Iako lizogeni fagi često uzrokuju zamućenu morfologiju plakova koju nisam primijetila u svom pokusu, nezamućeni plakovi nisu dokaz da fag koji ih stvara nije sposoban stvarati stabilne lizogene pod drugim uvjetima ili kod druge bakterije domaćina (Gill i Hyman 2010). Stoga možda postoji mogućnost da profag bakterije koja se nalazi u uzorku, nakon prelaska u litički ciklus, zarazi bakteriju domaćina i u njoj se ponaša poput virulentnog faga. Možda postoji mogućnost da ulazak u litički ili lizogeni ciklus nekih umjerenih faga *E. coli* ovisi o temperaturi okoliša, kao kod faga specifičnih za patogenu bakteriju koja živi u tlu (*Burkholderia*

*pseudomallei* i njenog nepatogenog modela *B. thailandensis*) koje su izolirali i testirali Shan i sur. (2014). Spomenuti su fagi imali lizogeni ciklus pri nižoj temperaturi (25 °C), a litički pri višoj temperaturi (37 °C; obje temperature se pojavljuju u njihovom prirodnom staništu), koja je ujedno i povoljnija temperatura za umnažanje njihove bakterije domaćina (Shan i sur. 2014). Pošto se pokazalo da *E. coli* ima bifazičan ciklus koji uključuje život u domaćinu i vanjskom okolišu (Blount 2015), možda postoje umjereni fagi specifični za ovu vrstu sa sličnim načinom izmjene litičkog i lizogenog ciklusa ovisno o temperaturi okoliša. Poznati su mutanti lambda faga čiji litički ciklus može biti potaknut promjenom temperature (Lieb 1979, Shan i sur. 2014), gdje je represor profaga, koji sprečava indukciju i prijelazak u litički ciklus, nestabilan pri višim temperaturama (Lieb 1979).

4) Pošto se u nefiltriranom dijelu uzorka nalaze i druge, kontaminirajuće bakterije koje se mogu umnažati tijekom procesa obogaćivanja uzorka, ukoliko postoji fag sposoban inficirati takve bakterije i bakterije domaćine, taj fag bi možda mogao imati prednost pred drugim fagima u uzorku. Dodatne bakterije iz uzorka mogu imati pozitivan utjecaj na umnažanje ciljanih faga ukoliko ih fagi mogu inficirati (Hyman 2019), ali se smatra da postoji ravnoteža između širine raspona mogućih domaćina i virulentnosti bakteriofaga prema specifičnom domaćinu (Gill i Hyman 2010).

5) Možda je došlo do slučajne raspodjele bakteriofaga u različite uzorke/boce (što bi moglo objasniti i razliku u uzorcima inkubiranim na različitim temperaturama), pogotovo ako su fagi relativno male koncentracije unutar originalnog uzroka efluenta, ali vjerojatnost da bi došlo do takve slučajne raspodjele faga je upitna.

Kako je preliminarni test uzorka AB 37 bio pozitivan, odnosno došlo je do konfluentne lize bakterijske livade na obje ploče, moguće je da su se u uzorku nalazili fagi specifični za bakteriju *A. baumannii*. Sa sigurnošću se može utvrditi da se u uzorku nalazilo nešto što je ometalo umnažanje bakterije na pločama, te da taj entitet nije djelovao niti u jednom drugom uzorku. Pošto su svi uzorci profiltrirani kroz filter pora 0,22 µm prije testiranja na prisutnost faga, entitet je morao biti dovoljno malen da prođe kroz filter, što znači da bi uzrok mogao biti fag, neki kemijski spoj/spojevi prisutni u efluentu (poput antibiotika koji mogu biti prisutni u kanalizacijskoj vodi (Davies i Davies 2010)), ili bakterija (pošto je dokazano da neke bakterije mogu proći kroz filter pora 0,2 µm (Hahn 2004)) koja može inhibirati rast *A. baumannii*, a sama ne stvara kolonije. Da je uzrok kemijski spoj inhibicija bi se primijetila kod svih uzoraka, osim ako je osjetljiv na temperaturu od 42 °C, ali bi i u tom slučaju inhibicija bila vidljiva u uzorku AB 37F. Da je uzrok neka nepoznata bakterija koja može proći kroz filter pora 0,22 µm (koja ne stvara kolonije) očekivala bih inhibiciju i kod drugih uzoraka, ili barem AB 37F ukoliko je osjetljiva na više temperature. Uzrok prisutnosti faga u samo jednom od četiri uzorka sam već raspravljala kod izoliranih faga *E. coli*, s razlikom u tome što ovdje uopće nema kompeticije između faga koji bi prednjačili u različitim uzorcima, već o potpunoj

eliminaciji faga, ili o slučajnom „upadu“ faga u bocu uzorka AB 37. Pošto je uzrok konfluentne lize najvjerojatnije fag, vrlo važno je pitanje zašto nije stvarao plakove iz kojih bih ga mogla izolirati. Neki fagi nisu sposobni stvarati plakove zbog male produktivnosti ili ograničene mogućnosti difuzije u agaru (Hyman 2019), odnosno zbog male veličine otpusta, vrlo dugog latentnog perioda ili vrlo spore difuzije u agaru (Abedon 2018). Nemogućnost difuzije faga (ili vrlo spora difuzija) zbog pregustog krutog medija je možda mogao biti razlog negativnih rezultata metode plakova u dvostrukom agaru (Serwer i sur. 2004, Abedon i Yin 2009, Hyman 2019), s obzirom da sam preliminarni test prisutnosti faga provodila u dvostruko mekom LB-mediju koji je 0,375%-tni agar, i to nakon 45 min inkubacije faga i bakterija u tekućoj kulturi pri pogodnoj temperaturi (37 °C), dok sam metodu plakova u dvostrukom agaru provodila u mekom LB-mediju, odnosno 0,75%-tnom agaru. 0,75%-tni agar sam koristila po uzoru na Francis i sur. (2017) te su slične koncentracije (uspješno) koristili drugi autori za izolaciju faga specifičnih za *A. baumannii*. Mattila i sur. (2015) i Ghajavand i sur. (2017) su koristili 0,7%-tni agar, Regeimbal i sur. (2016) su koristili 0,6%-tni agar, ali očito postoji mogućnost da je ova koncentracija agara bila prevelika za navodne fage u uzorku AB 37. Postoji teorija da su koncentracije agara koje se koriste po uzoru na 1950-e godine, što uključuje 0,7%-tni gornji i 1,5%-tni donji agar, prevelike za današnje vrijeme zbog efikasnije metode izolacije agara koji je veće molekularne gustoće i bolje se „želira“, stoga više ograničava difuziju faga (Abedon i Yin 2009). U slučaju prevelikih faga ili faga koji agregiraju se može koristiti razrijeđeni kruti medij za uspješnije izoliranje (Hyman 2019), te fag može imati značajno različite veličine plakova u različitim gustoćama krutog medija (Serwer i sur. 2004). Iz tog razloga i jesam provela prilagođeni postupak metode plakova u dvostrukom agaru sa dvostruko mekim agarom kao gornjim agarom, ali sam taj postupak provela više od tri mjeseca nakon uzorkovanja efluenta (postupak sam provela 21.1.2021., efluent je uzorkovan 6.10.2020.; proces sam provela toliko kasno jer sam tek naknadno saznala za postojanje faga koji nisu sposobni stvarati plakove u agaru većih koncentracija). Mattila i sur. (2015) su otkrili prosječan pad titra faga unutar mjesec dana, čuvanih u LB-mediju pri 4 °C, od  $\approx 0,5 \times \log_{10}$  za sve izolirane fage specifične za različite bakterije, odnosno pad od skoro  $\log_{10}$  kod faga specifičnih za *A. baumannii*. Prema tome, velika je vjerojatnost da je došlo do potpunog nestanka vijabilnih faga u mom uzorku u vremenu koje je prošlo između uzorkovanja i provođenja prilagođene metode plakova u dvostrukom agaru. Da sam prilagođeni postupak provela ubrzo nakon uzorkovanja možda bih uspjela uzgojiti plakove. Pošto je postupak preliminarnog testiranja uključivao 45-min inkubaciju bakterija i faga u tekućoj kulturi prije izlivanja u agaru, možda postoji mogućnost da je već tada došlo do lize značajnog broja bakterija u uzorku ili barem adsorpcije faga na većinu bakterija. Fagi mogu uzrokovati neproduktivnu infekciju ili lizu bakterija, što u slučaju tekuće kulture može uzrokovati lažno pozitivan rezultat (Hyman 2019) pa je možda moglo doći do takve infekcije tokom 45-min

inkubacije. I kod direktne inkubacije faga i bakterija na ploči može doći do prividno konfluentne lize bakterijske livade i kada fagi nisu sposobni stvarati plakove, ali pod uvjetom da je broj faga dovoljan naspram broja bakterija (Abedon 2018). Isti problem s lažno pozitivnim rezultatima se može pojavljivati i kod tehnike čistina nakapavanjem (Hyman 2019). Neobičan rezultat metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja kojeg sam dobila s uzorkom AB 37 (mutne čistine na nerazrijeđenom uzorku i manjim razrjeđenjima, najprozirnije na nerazrijeđenom) je stoga mogao biti uzrokovan neproduktivnom lizom manjeg broja bakterija na području na kojem je nakapan uzorak ili produktivnom lizom manjeg broja bakterija fagima koji ne mogu difundirati u 0,75% -tnom agaru pa su uspjeli lizirati samo bakterije na koje su dospjeli nakapavanjem. Mattila i sur. (2015) su prilikom tehnike čistina nakapavanjem ponekad dobili mutne čistine, a isti fagi su često stvarali prozirne čistine na nekom drugom soju iste bakterijske vrste (Mattila i sur. 2015).

Postupak povećanja titra faga se pokazao uspješnim, s obzirom da je titar u konačnom izolatu bio oko  $10^3$ - $10^4$  puta veći nego u izolatima tokom pročišćavanja. Titar svih faga koje sam izolirala u konačnim lizatima se čini uobičajenim ako ga uspoređujem s rezultatima autora Mattila i sur. (2015), čiji su konačni lizati od 29 izoliranih faga specifičnih za *E. coli* (dobiveni na malo drugačiji način koji uključuje semi-konfluentne ploče inkubiranih faga i bakterija) bili u rasponu od  $>10^6$  do  $<10^{11}$  PFU/mL. Konačni lizati faga s titrom većim od  $10^9$  PFU/mL se smatraju lizatima visokog titra (<https://phagesdb.org/media/workflow/protocols/> - PhageHunting Program), stoga sam uspjela proizvesti konačne lizate visokog titra za dva izolirana faga (EC-F4 i EC-F5), malo manju vrijednost titra od toga za fag EC-F6, te manju vrijednost titra za fag EC-F1. Nepoznato je zašto je titar konačnog lizata faga EC-F1 znatno manji od titra konačnih lizata ostalih faga jer svi su pripremljeni na jednak način, svi su uzrokovali potpunu konfluentnu lizu livade i svi su izolirani na jednak način. Iz tog razloga pretpostavljam da su uzrok tome najvjerojatnije sama svojstva faga. Pretpostavljam da bi uzrok mogao biti manja veličina otpusta tog faga, što bi možda objasnilo i očito manju koncentraciju faga izoliranih iz plakova tokom procesa pročišćavanja jer manja veličina otpusta faga znači manji broj nastalih faga po infekciji (Abedon 2018). Možda postoji mogućnost da taj fag slabije podnosi kloroform korišten tokom izolacije faga iz agara, pošto određeni fagi mogu biti osjetljiviji na kloroform od drugih (Jurczak-Kurek i sur. 2016, Hyman 2019) ili možda općenito brže gubi vijabilnost pri čuvanju u hladnjaku, s obzirom da različiti fagi imaju različitu stopu gubitka vijabilnosti tokom čuvanja (vidljivo u mjerenju opadanja titra nakon mjesec dana u istraživanju Mattila i sur. (2015)), ali nije mi poznato postoje li fagi kojima bi toliko brzo opadao titar.

Postoji više metoda određivanja titra faga u suspenziji te sve imaju prednosti i mane. Određivanje titra prebrojavanjem plakova smatra se „zlatnim standardom“ (Anderson i sur. 2011,

Ács i sur. 2020). Ipak, određivanje titra prebrojavanjem plakova ima negativnih strana, kao što je činjenica da su rezultati slabo reproducibilni – različiti laboratoriji mogu dobiti različite rezultate te čak različiti izvodači pokusa u istom laboratoriju mogu dobiti različite rezultate za istu suspenziju (Anderson i sur. 2011). Štoviše, testiranje iste suspenzije faga na različitim bakterijama domaćinima često rezultira različitim mjerama titra (Anderson i sur. 2011). Titar faga se još može odrediti: TEM-om, protočnom citometrijom, masenom spektrometrijom (Ács i sur. 2020), kvantitativnim PCR-om (qPCR) te NanoSight tehnologijom – detekcijom nanočestica laserski osvijetljenom optičkom mikroskopijom (Anderson i sur. 2011, Ács i sur. 2020). Prednost određivanja titra prebrojavanjem plakova nakon metode plakova u dvostrukom agaru, osim jednostavnosti, je i činjenica da se tom metodom određuje titar virulentnih faga, dok neke druge metode ne mogu razlikovati vijabilne virusne čestice od defektnih (Ács i sur. 2020). Za potrebe ovog pokusa je ova metoda bila dobra, ali je za druge svrhe, poput terapije fagima, negativna strana činjenica da ova metoda iziskuje vrijeme (Anderson i sur. 2011, Ács i sur. 2020).

Transmisijaska elektronska mikroskopija je vrlo važan aspekt proučavanja bakteriofaga, s obzirom da je TEM poslužila kao temelj za formiranje bakteriofagnih porodica, te je i dalje vrlo važan dio postupka klasifikacije novoizoliranih faga (Ackermann 2012), stoga je teoretski dobar izbor za okvirno razlikovanje faga iz svojih uzoraka. Fosfovolframati i uracil-acetat su najčešće korištena bojila kod elektronske mikroskopije bakteriofaga (Ackermann 2012), stoga je izbor bojila najvjerojatnije bio dobar. Velike nečistoće unutar uzoraka su otežale, a možda i potpuno onemogućile vizualizaciju faga uz pomoć TEM-a. Moguće je i da uzorak nije dovoljno ukoncentriran. Uzorci faga se prije mikroskopije pročišćavaju (Ackermann 2012), za što ukoncentriravanje i mijenjanje otopine s destiliranom vodom unutar epruveta za ukoncentriravanje *Amicon Ultra-15* najvjerojatnije nije najprikladnija metoda. Jurczak-Kurek i sur. (2016) su postigli dobre fotografije izoliranih faga, a prije provođenja mikroskopije su pročistili uzorke metodom centrifugiranja u gradijentu gustoće CsCl. Istu metodu pročišćavanja su proveli Popova i sur. (2012), te su time dobili dobre slike faga kojeg su izolirali (specifičnog za *A. baumannii*), ali su proveli i kompliciraniji postupak pripreme uzorka za samo mikroskopiranje. Ghajavand i sur. (2017) su proveli jednostavniji postupak pročišćavanja i ukoncentriravanja, koji se sastojao od centrifugiranja i filtriranja tekuće kulture s umnoženim fagima, nakon čega su fage precipitali uz pomoć polietilen glikola (sve tri skupine su koristili uracil-acetat kao bojilo). Očito je potrebna pogodnija metoda pročišćavanja faga od metode koju sam provela, a najvjerojatnije i ukoncentriravanja, kako bi mikroskopiranje bilo uspješnije. Možda bi filtracija supernatanta (nakon centrifugiranja mješavine mekog agara s fagima i kloroformom) kroz filter pora 0,22 µm bila dovoljna, s obzirom da se filtracija kroz pripadajući filter (od 0,45 ili 0,2 µm), nakon centrifugiranja

i tretiranja uzorka kloroformom, smatra dovoljnom za uklanjanje bakterija i većeg otpada (Gill i Hyman 2010). Vrlo čisti pripravci faga se mogu dobiti precipitacijom uz pomoć polietilen glikola i provođenjem kroz metodu centrifugiranja u gradijentu CsCl, ali to iziskuje puno vremena, rada i specifičnu opremu (Gill i Hyman 2010). Za pročišćavanje se može koristiti i kromatografija (Gill i Hyman 2010). Kao mogućnost bi se mogla razmotriti flokulacija, odnosno korištenje flokulacijskih agenasa koji uzrokuju agregaciju faga u velike komplekse, te njihovo sakupljanje filtracijom, sedimentacijom ili centrifugiranjem (Gill i Hyman 2010). Ukoliko poboljšani proces pročišćavanja i ukoncentriravanja ne bi bio dovoljan za postizanje slike faga, trebalo bi probati poboljšati proces same elektronske mikroskopije.

Iz fotografija koje jesu postignute u mom pokusu se ne može donijeti nikakav zaključak. Iako neke fotografije pokazuju relativno pravilne oblike veličine  $\approx 100$  ili  $\approx 200$  nm (okruglaste ili trokutaste), ništa od toga se ne može identificirati sa sigurnošću, te su vjerojatno zapravo nečistoće u uzorku. Očekivala sam slike faga koji imaju morfologiju s repom, zbog njihove učestalosti u probavnom sustavu čovjeka i pošto je to najčešće izolirana morfologija faga (Dion i sur. 2020) ili male pravilne ikozaedarske fage bez repa, poput virusa iz reda *Microviridae* za koje se također zna da su prisutni u probavnom sustavu čovjeka (Dion i sur. 2020), no ništa od toga nisam uočila u svojim izolatima.

Cijeli pokus je relativno dobro dizajniran, iako bih poučena rezultatima uvela nekoliko preinaka. Proces obogaćivanja koji je proveden u ovom pokusu je odlično proveden te pokazuje koliko je važno provoditi taj proces na različitim temperaturama te na filtriranom i nefiltriranom uzorku, s obzirom da bih izolirala samo jedan fag specifičan za *E. coli*, a ne četiri, da sam provela taj postupak pri samo jednoj temperaturi obogaćivanja i samo na filtriranom ili nefiltriranom uzorku jer selekcija koja se događa tokom procesa obogaćivanja očito ima utjecaj na broj faga koji će biti izoliran (Serwer i sur. 2004, Gill i Hyman 2010). Kao što sam već spomenula, ukoliko postoji potrebna laboratorijska oprema, proces obogaćivanja bi se možda trebao provesti i pri više različitih temperatura, pošto fagi imaju različitu uspješnost umnažanja na različitim temperaturama (Seeley i Primrose 1980). Postupak bi se možda mogao provesti i sa dodatnim uzorkom efluenta koji je filtriran kroz filter pora  $0,22 \mu\text{m}$ , kako bi se provjerilo ima li filtracija kroz filtere različite poroznosti utjecaj na uspješnost izolacije više različitih faga, s obzorom da se filteri pora  $0,22 \mu\text{m}$  koriste za uklanjanje svih bakterija u uzorku, a filteri pora  $0,45 \mu\text{m}$  kada se žele propustiti veći fagi s rizikom propuštanja i nekih bakterija (Hyman 2019). Iz navedenog razloga propuštanja različitih veličina faga kroz filtere pora  $0,22 \mu\text{m}$  i  $0,45 \mu\text{m}$ , možda bi bilo dobro provesti konačno filtriranje uzoraka (nakon obogaćivanja, prije izoliranja faga) kroz filtere pora  $0,45 \mu\text{m}$ , a ne  $0,22 \mu\text{m}$ , ali bi takav postupak mogao biti manje poželjan zbog mogućeg propuštanja bakterija (Hyman 2019).

Smatram da je preliminarno određivanje prisutnosti faga postupkom koji pokušava dovesti do konfluentne lize livade bilo korisno i informativno. No, kako bi se bakterijska livada pravilno razvijala, umjesto inkubacije određene vremenski, smatram da bi trebalo mjeriti OD<sub>600</sub> bakterijske tekuće kulture i provoditi pokus kada je u rasponu kojeg sam koristila za metodu plakova u dvostrukom agaru. Jednako tome, kod metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja, umjesto OD<sub>600</sub> u vrijednosti od 0,1 (koju sam koristila prema Hajsig i Delaš (2016)), trebalo bi koristiti vrijednosti korištene kod metode plakova u dvostrukom agaru. Sama metoda čistina i plakova tehnikom nakapavanja je bila korisna u potvrđivanju prisutnosti faga specifičnih za *E. coli*, kao i u određivanju potrebnih razrjeđenja za provođenje metode plakova u dvostrukom agaru, čime se znatno smanjio broj ploča koji bih inače morala napraviti za pronalaženje potrebnih razrjeđenja pripremljenih EC uzoraka. Metoda plakova u dvostrukom agaru je bila dobra za izolaciju faga specifičnih za *E. coli* te bi možda mogla biti i za izolaciju faga specifičnih za bakteriju *A. baumannii*, iako u ovom pokusu to nisam postigla. Činjenica da je zabuna morfologije plakova jednog faga (EC-F1) za tri (EC-F1, EC-F2 i EC-F3), zbog velike varijacije u veličini plakova, uklonjena manjom varijacijom u veličini plakova kod dulje inkubacije faga i bakterija prije izlivanja (tokom procesa pročišćavanja faga), ukazuje na veliku važnost duljine vremenskog intervala danog za adsorpciju faga na bakterije. Kod izolacije plakova sam slijedila protokol od Francis i sur. (2017), koji je dizajniran za određivanje titra faga i preporuča vrijeme inkubacije od 8-10 min te napominje da se vrijeme od 10 min ne smije premašiti; time sam mogla dobro odrediti količinu faga u obogaćenim uzorcima, ali određivanje razlike u morfologiji u ovom stupnju pokusa očito nije sigurno. Zato je dobro što sam kod pročišćavanja faga koristila dulje vrijeme inkubacije prema popratnom internetskom materijalu autora Hanauer i sur. (2006), iako je pokus dizajniran s drugom bakterijom domaćinom, koji upućuje na inkubaciju od 15-30 min čime sam postigla ujednačenu veličinu plakova i jasne rezultate. Kako bi se smanjila vjerojatnost zamjene nove morfologije plakova za prije uočene i izolirane (kao što se najvjerojatnije dogodilo kod uzorka EC 37F gdje sam najvjerojatnije zamijenila plakove faga EC-F4 za EC-F1(F3), koje sam uzgojila dan ranije), smatram da bi bilo dobro napraviti bolje fotografije ploča i plakova tokom pokusa ili sačuvati ploče s razvijenim plakovima u hladnjaku. U slučaju čuvanja ploča u hladnjaku radi usporedbe s novim plakovima uzgojenima u narednim danima, treba imati na umu da „halo“ može nastaviti rasti i u uvjetima čuvanja pri nižim temperaturama (Abedon 2018). Ta činjenica bi se možda mogla iskoristiti kako bi se naknadno bolje utvrdila prisutnost ili odsutnost „halo“. Ukoliko preliminarni rezultati ukazuju na prisutnost faga, ali se fagi ne uspiju izolirati metodom plakova u dvostrukom agaru po provedenom postupku, smatram da bi trebalo odmah provesti istu metodu s agarom manje koncentracije zbog moguće ograničene difuzije faga kod pregustog agara (Serwer i sur. 2004, Abedon i Yin 2009, Hyman 2019). Postupak pripremljanja konačnih lizata s većim titrom



faga koji sam provela se također pokazao dobrim i uspješnim. Iako ja nisam imala nikakvih vidljivih problema kod provođenja tog postupka, treba obratiti pažnju da neki fagi mogu imati određenu osjetljivost na kloroform (Jurczak-Kurek i sur. 2016, Hyman 2019) pa u slučaju da postupkom umnažanja kojeg sam ja provela dođe do inaktivacije faga kloroformom, bilo bi potrebno razviti drugačiji postupak povećanja titra. Metoda kojom sam određivala titar faga u konačnim lizatima je također dobra. Ukoliko bi se htjelo smanjiti broj ploča potrebnih za određivanje titra, mogao bi se provesti dodatan postupak metode čistina i plakova tehnikom nakapavanja za svaki fag kako bi se bolje odredila razrjeđenja koja bi mogla dati koristan (brojiv) broj plakova, ali bi se time dodao jedan dan rada. Fotografije faga pod lupom su bile informativne – omogućile su mjerenje promjera plakova te bolju vizualizaciju njihove morfologije. Kako bi mjere promjera bile preciznije trebalo bi fotografirati mjerku koja prikazuje desetine milimetra ili manje dimenzije, kako bi se provela dobra kalibracija mjerke. Ja sam za kalibriranje koristila milimetarsku mjerku, a mjerila promjere plakova u desetinu milimetra kompjutorskim programom zbog očitih razlika u veličini plakova koja se nije mogla prikazati u milimetarskoj skali - kako skala nije toliko precizna te mjere možda nisu sasvim točne, ali bi trebale dobro prikazivati odnos veličina među plakovima, pošto je jedna kalibracija vrijedila za sve fotografije plakova. Postupak pripreme uzoraka konačnih lizata za transmisijsku elektronsku mikroskopiju najvjerojatnije nije bio najpogodniji pošto su uzorci imali puno nečistoća te nepobitne fotografije faga nisu nađene.

Fage specifične za *E. coli* koje sam izolirala bi se moglo testirati na klinički značajnim sojevima (ukoliko bi postojali sigurni laboratorijski uvjeti) kako bi se odredilo imaju li potencijal za terapijske svrhe protiv specifičnih patogena, a jednak postupak bi se trebao provesti i da sam uspjela izolirati fage specifične za *A. baumannii*, pošto su korišteni sojevi bili zamjenski za MDR sojeve radi veće sigurnosti rada (Gill i Hyman 2010, Hyman 2019). Kada su Jurczak-Kurek i sur. (2016) testirali fage koje su izolirali na *E. coli* soju MG1655 (soj iz kojeg je izveden *E. coli* soj kojeg sam koristila u ovom pokusu (Buljubašić i sur. 2019)) na šest različitih klinički značajnih sojeva *E. coli*, većina faga je mogla lizirati barem jedan klinički značajan soj (Jurczak-Kurek i sur. 2016) pa postoji mogućnost da su fagi koje sam ja izolirala isto sposobni lizirati neki klinički važan soj.

Temeljem navedenih razloga i dobivenih rezultata, smatram da bi trebalo provesti pokus specifično dizajniran kako bi se provjerio utjecaj odabira različitih temperatura kod procesa obogaćivanja uzorka i utjecaj izolacije faga iz filtriranih i nefiltriranih uzoraka obogaćenima pri različitim temperaturama.

## 6. ZAKLJUČAK

U skladu s postavljenim ciljevima zaključila sam sljedeće:

- Iz različito tretiranih uzoraka efluenta centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba uspješno sam izolirala fage specifične za bakteriju *E. coli* primjenom metode plakova u dvostrukom agaru. Fage specifične za bakteriju *A. baumannii* nisam uspjela izolirati iako rezultati preliminarnog testa ukazuju na eventualnu prisutnost specifičnog faga.
- Sudeći prema rezultatima izolacije faga specifičnih za *E. coli*, metodologiju detekcije i izolacije specifičnih faga uspješno sam optimizirala. Postupak podrazumijeva: postupak obogaćivanja filtriranog i ne-filtriranog uzorka efluenta (kroz filter pora 0,45 µm) inkubacijom s bakterijama domaćinima pri različitim temperaturama (37 °C ili 42 °C), preliminarno testiranje na prisustvo faga konfluentnom lizom bakterijske livade i metodom čistina i plakova tehnikom nakapavanja, metodu plakova u dvostrukom agaru, koju treba provesti i s dvostruko mekim agarom kao gornjim agarom u slučaju negativnih rezultata. Postupak pročišćavanja uzoraka za elektronsku mikroskopiju treba optimizirati. Zbog niske očekivane koncentracije, postupak uzorkovanja efluenta i izolacije faga specifičnih za *A. baumannii* trebalo bi provesti više puta uz obogaćivanje sa više sojeva ove bakterije čija je prisutnost u uzorku otpadne vode izglednija.
- Na bakterijskim livadama *E. coli* unutar hranjivog medija (LB-medij, gornji 0,75% agar), nakon metode plakova u dvostrukom agaru, identificirala sam plakove četiri različite morfologije: vrlo mali (promjer oko 1,2 mm) i prozirni plakovi s mutnim rubom, vrlo veliki plakovi (promjer oko 5,8 mm) s „bullseye“ morfologijom, te plakovi slične veličine (promjer oko 2,4 mm), gdje je jedan proziran s mutnim rubom, a drugi „bullseye“ morfologije. Pretpostavljam da odgovaraju četirima različitim fagima.
- Uspješno sam izolirala čiste suspenzije faga specifičnih za *E. coli* postupkom pročišćavanja faga (ponavljanjem metode plakova u dvostrukom agaru i izolacije faga iz zasebnog plaka) te ih umnožila (konfluentnom lizom bakterijske livade). Konačni titar svih izolata bio je veći od  $10^7$  PFU/mL.
- Elektronskom mikroskopijom iz priređenih uzoraka niti u jednom uzorku nije potvrđena prisutnost faga zbog visokog pozadinskog onečišćenja. Prije provedbe postupka bilo bi potrebno provesti dodatno pročišćavanje i ukoncentriravanje faga, po mogućnosti u gradijentu gustoće.

## 7. LITERATURA

- Abedon S.T. (2018): Detection of Bacteriophages: Phage Plaques. U: Harper D., Abedon S., Burrowes B., McConville M. (ur.) Bacteriophages. Springer, Cham, str. 1-32.
- Abedon S.T., Yin, J. (2008): Impact of spatial structure on phage population growth. U Abedon S. (ur.) Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses. Cambridge University Press, str. 94-113.
- Abedon S.T., Yin J. (2009): Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis. U: Clokie M.R.J., Kropinski A.M. (ur.) Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Methods in Molecular Biology. vol. 501, Humana Press, str. 161-174.
- Ács N., Gambino M., Brøndsted L. (2020): Bacteriophage Enumeration and Detection Methods. Frontiers in Microbiology 11: 594868.
- Ackermann H.W. (2012): Bacteriophage Electron Microscopy. Advances in Virus Research 82: 1-32.
- Allocati N., Masulli M., Alexeyev M.F., Di Ilio C. (2013): *Escherichia coli* in Europe: an overview. International Journal of Environmental Research and Public Health 10 (12): 6235-6254.
- Almasaudi S.B. (2018): *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi Journal of Biological Sciences 25: 586-596.
- Aminov R.I. (2010): A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Frontiers in Microbiology 1: 134.
- Anderson B., Rashid M.H., Carter C., Pasternack G., Rajanna C., Revazishvili T., Dean T., Senecal A., Sulakvelidze A. (2011): Enumeration of Bacteriophage Particles: Comparative Analysis of The Traditional Plaque Assay and Real-Time QPCR- and Nanosight-Based Assays. Bacteriophage 1(2): 86-93.
- Asif M., Alvi I.A., Rehman S.U. (2018): Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. Infection and Drug Resistance 11: 1249-1260.
- Bagińska N., Pichlak A., Górski A., Jończyk-Matysiak E. (2019): Specific and Selective Bacteriophages in the Fight against Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Virologica Sinica 34 (4): 347-357.
- Blount Z.D. (2015): The unexhausted potential of *E. coli*. Elife 4: e05826.
- Bolocan A.S., Callanan J., Forde A., Ross P., Hill C. (2016): Phage therapy targeting *Escherichia coli* – a story with no end? FEMS Microbiology Letters 363 (22): fnw256.

- Buljubašić M., Hlevnjak A., Repar J., Đermić D., Filić V., Weber I., Zahradka K., Zahradka D. (2019): RecBCD- RecFOR-independent pathway of homologous recombination in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* 83: 102670.
- Burrowes B., Harper D.R., Anderson J., McConville M., Enright M.C. (2011): Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 9 (9): 775-785.
- Chanishvili N. (2012): Phage therapy – history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Advances in Virus Research* 83: 3-40.
- Chen T.L., Lee Y.T., Kuo S.C., Yang S.P., Fung C.P., Lee S.D. (2014): Rapid identification of *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* with a multiplex PCR assay. *Journal of Medical Microbiology* 63 (9): 1154-1159.
- Davies J., Davies D. (2010): Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (3): 417-433.
- Dekić S., Klobučar G., Ivanković T., Zanella D., Vucić M., Bourdineaud J.P., Hrenović J. (2018): Emerging human pathogen *Acinetobacter baumannii* in the natural aquatic environment: a public health risk?. *International Journal of Environmental Health Research* 28 (3): 315-322.
- Díaz-Muñoz S.L., Koskella B. (2014): Bacteria-phage interactions in natural environments. *Advances in Applied Microbiology* 89: 135-183.
- Dion M.B., Oechslin F., Moineau S. (2020): Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology* 18 (3): 125-138.
- Dijkshoorn L., Nemec A., Seifert H. (2007): An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology* 5: 939-951.
- Doore S.M., Parent K.N., Subramanian S., Schrad J.R., Hubbs N.B. (2021): Bacteriophage Receptor Proteins of Gram-Negative Bacteria. U: Bamford D.H., Zuckerman M. *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*, Academic Press, str. 175-185.
- Eriksen R.S., Svenningsen S.L., Sneppen K., Mitarai N. (2018): A growing microcolony can survive and support persistent propagation of virulent phages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (2): 337-342.
- Ewert D.L., Paynter M.J. (1980): Enumeration of bacteriophages and host bacteria in sewage and the activated-sludge treatment process. *Applied and Environmental Microbiology* 39 (3): 576-583.
- Francis F., Miller R., Nagra M. (2017): Phage Overlay Assay for Quantification of Infectious Bacteriophage Particles. *The Undergraduate Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 1: 18-21.

- Furfaro L.L., Payne M.S., Chang B.J. (2018): Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8: 376.
- Gallet R., Kannoly S., Wang, I.N. (2011): Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiology* 11: 181.
- García-Quintanilla M., Pulido M.R., López-Rojas R., Pachón J., McConnell M.J. (2013): Emerging therapies for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Trends in Microbiology* 21 (3): 157-163.
- Ghajavand H., Esfahani B.N., Havaei A., Fazeli H., Jafari R., Moghim S. (2017): Isolation of bacteriophages against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Research in Pharmaceutical Sciences* 12 (5): 373-380.
- Gill J.J., Hyman P. (2010): Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11 (1): 2-14.
- Gordillo Altamirano F.L., Barr J.J. (2019): Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews* 32 (2): e00066-18.
- Hajsig D., Delaš F. (2016): Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije. Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, str. 112-114.
- Hahn M.W. (2004): Broad diversity of viable bacteria in 'sterile' (0.2 µm) filtered water. *Research in Microbiology* 155 (8): 688-691.
- Hanauer D.I., Jacobs-Sera D., Pedulla M.L., Cresawn S.G., Hendrix R.W., Hatfull G.F. (2006): Inquiry learning. Teaching scientific inquiry. *Science* 314 (5807): 1880-1881. Supporting Online Material.
- Haq I.U., Chaudhry W.N., Akhtar M.N., Andleeb, S., Qadri, I. (2012): Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal* 9: 9.
- Herlihy B. (2007): *The Human Body in Health and Illness*, Third Edition. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, SAD.
- Higgins P.G., Hrenovic J., Seifert H., Dekic S. (2018): Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water Research* 140: 261-267.
- Howard A., O'Donoghue M., Feeney A., Sleator R.D. (2012): *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3 (3): 243-250.
- Howard-Varona C., Hargreaves K.R., Abedon S.T., Sullivan M.B. (2017): Lysogeny In Nature: Mechanisms, Impact and Ecology of Temperate Phages. *The ISME Journal* 11 (7): 1511-1520.

- Hrenovic J., Goic-Barisic I., Kazazic S., Kovacic A., Ganjto M., Tonkic M. (2016): Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Euro Surveill* 21: 15.
- Hrenovic J., Ivankovic T, Ivekovic D., Repec S., Stipanicev D., Ganjto M. (2017): The fate of carbapenem-resistant bacteria in a wastewater treatment plant. *Water Research* 126: 232-239.
- Hyman P. (2019): Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals (Basel)* 12 (1): 35.
- Hyman P., Abedon S.T. (2009): Practical Methods for Determining Phage Growth Parameters. U: Clokie M.R.J., Kropinski A.M. (ur.) *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. *Methods in Molecular Biology*. vol. 501, Humana Press, str. 175-202.
- Hyman P., Abedon S.T. (2010): Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology* 70: 217-248.
- Jacobs A.C., Zurawski D.V. (2014): Laboratory Maintenance of *Acinetobacter baumannii*. *Current Protocols in Microbiology* 35: 6G.1.1-6G.1.6.
- Jang J., Hur H.G., Sadowsky M.J., Byappanahalli M.N., Yan T., Ishii S. (2017): Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology* 123 (3): 570-581.
- Jothikumar N., Reddy C.G., Sundari R.B., Saigopal D.V. (2000): Isolation of coliphages specific to enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). *Journal of Environmental Monitoring* 2 (4): 372-374.
- Jung J., Park W. (2015): *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (6): 2533-2548.
- Jurczak-Kurek A., Gašior T., Nejman-Faleńczyk B., Bloch S., Dydecka A., Topka G., Necel A., Jakubowska-Deredas M., Narajczyk M., Richert M., Mieszkowska A., Wróbel B., Węgrzyn G., Węgrzyn A. (2016): Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports* 6: 34338.
- Latz S., Wahida A., Arif A., Häfner H., Hoß M., Ritter K., Horz H.P. (2016): Preliminary survey of local bacteriophages with lytic activity against multi-drug resistant bacteria. *Journal of Basic Microbiology* 56: 1117-1123.
- Lee C.R., Lee J.H., Park M., Park K.S., Bae I.K., Kim Y.B., Cha C.J., Jeong B.C., Lee S.H. (2017): Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 55.

- Lieb M. (1979): Heat-sensitive lambda repressors retain partial activity during bacteriophage induction. *Journal of Virology* 32 (1): 162-166.
- Liu D. (2019): *Escherichia coli*. U: Schmidt T.M. (ur.) *Encyclopedia of Microbiology* (Fourth Edition), Academic Press, str. 171-182.
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. (2012): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18 (3): 268-281.
- Mandilara G.D., Smeti E.M., Mavridou A.T., Lambiri M.P., Vatopoulos A.C., Rigas F.P. (2006): Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiology Letters* 263 (1): 119-126.
- Mattila S., Ruotsalainen P., Jalasvuori M. (2015): On-Demand Isolation of Bacteriophages Against Drug-Resistant Bacteria for Personalized Phage Therapy. *Frontiers in Microbiology* 6: 1271.
- Moineau S. (2013): Bacteriophage. U: Maloy S., Hughes K. (ur.) *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition). Academic Press, str. 280-283.
- Mohr K.I. (2016): History of Antibiotics Research. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 398: 237-272.
- Muniesa M., Imamovic L., Jofre J. (2011): Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments. *Microbial Biotechnology* 4 (6): 725-734.
- Munita J.M., Arias C.A. (2016): Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum* 4 (2): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Nikolich M.P., Filippov A.A. (2020): Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics (Basel)* 9 (3): 135.
- Ofir G., Sorek R. (2018): Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell* 172 (6): 1260-1270.
- Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. (2008): *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 21 (3): 538-582.
- Percival S.L., Williams D.W. (2014): Chapter Six - *Escherichia coli*. U: Percival s.l., Yates M.V., Williams D.W., Chalmers R.M., Gray N.F. (ur.) *Microbiology of Waterborne Diseases* (Second Edition), Academic Press, str. 89-117.
- Peterson E., Kaur P. (2018): Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology* 9: 2928.

- Popova A.V., Zhilenkov E.L., Myakinina V.P., Krasilnikova V.M., Volozhantsev N.V. (2012): Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters* 332: 40-46.
- Principi N., Silvestri E., Esposito S. (2019): Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Pharmacology* 10: 513.
- Rakhuba D.V., Kolomiets E.I., Dey E.S., Novik G.I. (2010): Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology* 59 (3): 145-155.
- Regeimbal J.M., Jacobs A.C., Corey B.W., Henry M.S., Thompson M.G., Pavlicek R.L., Quinones J., Hannah R.M., Ghebremedhin. M., Crane N.J., Zurawski D.V., Teneza-Mora N.C., Biswas B., Hall E.R. (2016): Personalized Therapeutic Cocktail of Wild Environmental Phages Rescues Mice from *Acinetobacter baumannii* Wound Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (10): 5806-5816.
- Rostøl J.T., Marraffini L. (2019): (Ph)ighting Phages: How Bacteria Resist Their Parasites. *Cell Host & Microbe* 25 (2): 184-194.
- Salmond G.P., Fineran P.C. (2015): A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology* 13 (12): 777-786.
- Schaechter M. (2009): *Escherichia Coli*. U: Schaechter M. (ur.) *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Academic Press, str. 125-132.
- Seeley N.D., Primrose S.B. (1980): The Effect of Temperature on the Ecology of Aquatic Bacteriophages. *Journal of General Virology* 46: 87-95.
- Seruga Music M., Hrenovic J., Goic-Barisic I., Hunjak B., Skoric D., Ivankovic T. (2017): Emission of extensively-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital settings to the natural environment. *Journal of Hospital Infection* 96 (4): 323-327.
- Serwer P., Hayes S.J., Zaman S., Lieman K., Rolando M., Hardies S.C. (2004): Improved isolation of undersampled bacteriophages: finding of distant terminase genes. *Virology* 329 (2): 412-424.
- Shan J., Korbsrisate S., Withatanung P., Adler N.L., Clokie M.R., Galyov E.E. (2014): Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen. *Frontiers in Microbiology* 5: 599.
- Shende R.K., Hirpurkar S.D., Sannat C., Rawat N., Pandey V. (2017): Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. *Veterinary World* 10 (8): 973-978.
- Stilinović B., Hrenović J. (2009): *Praktikum iz bakteriologije*. Kugler, Naklada Stih, Zagreb, str.: 37, 39, 42-43.



- Sultan I., Rahman S., Jan A.T., Siddiqui M.T., Mondal A.H., Haq Q.M.R. (2018): Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Frontiers in Microbiology* 9: 2066.
- Taati Moghadam M., Amirmozafari N., Shariati A., Hallajzadeh M., Mirkalantari S., Khoshbayan A., Masjedian Jazi F. (2020): How Phages Overcome the Challenges of Drug Resistant Bacteria in Clinical Infections. *Infection and Drug Resistance* 13: 45-61.
- Tuttle A.R., Trahan N.D., Son M.S. (2021): Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Current Protocols* 1 (1): e20.
- Tušar B., Pavić A., Tedeschi S. (2009): Centralni uređaj za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu (CUPOVZ). *Hrvatske vode* 17 (69/70): 241-250.
- Ventola C.L. (2015): The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics* 40 (4): 277-283.
- Vijayakumar S., Biswas I., Veeraraghavan B. (2019): Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. *Future science OA* 5 (6): FSO395.
- Wang X., Qin L.-J. (2019): A review on *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Acute Disease* 8 (1): 16-20.
- Wentzel R.S., O'Neill P.E., Kitchens J.F. (1982): Evaluation of coliphage detection as a rapid indicator of water quality. *Applied and Environmental Microbiology* 43 (2): 430-434.
- Wittebole X., De Roock S., Opal S.M. (2014): A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 5 (1): 226-235.
- Young R. (2013): Phage lysis: do we have the hole story yet? *Current Opinion in Microbiology* 16 (6): 790-797.
- Yuan Y., Gao M. (2017): Jumbo Bacteriophages: An Overview. *Frontiers in Microbiology* 8: 403.

Mrežne poveznice:

[https://www.atcc.org/products/19606?geo\\_country=hr#detailed-product-information](https://www.atcc.org/products/19606?geo_country=hr#detailed-product-information) (pristupljeno 6.10.2020.)

<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/coliphages-literature-review-report-2015.pdf> (pristupljeno 19.8.2021.)

<https://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PDF-Tbox-4titering.pdf> (Pristupljeno 23.1.2022.)

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (pristupljeno 9.9.2021.)

<https://www.zov-zagreb.hr/hr/> (pristupljeno 1.3.2021.)

[https://www.zov-zagreb.hr/media/k2/items/cache/ada9a09acea936d776a6f55c82778c43\\_M.jpg](https://www.zov-zagreb.hr/media/k2/items/cache/ada9a09acea936d776a6f55c82778c43_M.jpg) (pristupljeno 18.6.2021.)

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Marina Mihaljević

Datum rođenja: 15.04.1997.

### OBRAZOVANJE

2018. godine sam upisala Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije na Prirodoslovno-Matematičkom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, modul Fiziologija i imunobiologija. 2015.-2018. sam pohađala Preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Prirodoslovno-Matematičkom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te sam stekla akademsko zvanje Sveučilišna prvostupnica biologije. 2011.-2015. godine sam pohađala XV. gimnaziju u Zagrebu.