

მულტირეზისტენტული *Enterococcus* spp-ს სპეციფიკური
ბაქტერიოფაგების დახასიათება

სოფიო რიგვავა

სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
მეცნიერებისა და ხელოვნების ფაკულტეტზე სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა
დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: აივენგო შათირიშვილი, ემერიტუსი
ირინე ჭყონია, ბმდ

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი 2014

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

სოფიო რიგვავა

06.03.2014

აბსტრაქტი

Enterococcus spp. ნორმალური ნაწლავური ფლორის წარმომადგენელია, თუმცა ზოგიერთ სახეობას შუძლია გამოიწვიოს ისეთი ნოზოკომიალური დაავადებები როგორიცაა: ენდოკარდიტი, მენინგიტი, სეპტიცემია, ნეონატალური სეფსისი და შარდ-სასქესო სისტემის ინფექციები, *Enterococcus* spp-თ გამოწვეული დაავადების მკურნალობა ხშირად გართულებულია ანტიბიოტიკორეზისტენტობის გამო. ბევრი ენტეროკოკის შტამი რეზისტენტულია ვანკომიცინის მიმართ, ვანკომიცინ რეზისტენტული ენტეროკოკით გამოწვეული დაავადებები ლეტალობის მაღალი მაჩვენებლის და სოციალ-ეკონომიური ზარალის გამო თანამედროვე მედიცინის სერიოზულ პრობლემას წარმოადგენს. მულტი რეზისტენტული შტამების აფეთქებებმა განაახლა ინტერესი ფაგოთერაპიის მიმართ. ფაგოთერაპიას ანტიბიოტიკოთერაპიასთან შედარებით მრავალი უპირატესობა ახასიათებს, როგორიცაა: რეზისტენტობის დაბალი სიხშირე, მკაცრი სპეციფიურობა მხოლოდ სამიზნე ბაქტერიაზე ისე, რომ ზიანი არ მიაყენოს ორგანიზმის ნორმალურ მიკროფლორას. მოცემული კვლევის მთავარ მიზანს წარმოადგენდა *Enterococcus* spp-ს მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება. ენტეროკოკის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები გამოყოფილ იქნა მდინარე მტკვრის ჩამდინარე წყლებიდან. კვლევაში გამოყენებული ფაგებიდან 3 ფაგი *vB_GEC-EfS_2*, *vB_GEC-EfS_3* და *vB_GEC-EfS_4* *Syphoviridae* -ს ჯგუფს განეკუთვნებოდა, ხოლო ფაგი *vB_GEC-EfM_9* - *Myoviridae*-ს. შესწავლილ იქნა თითოეული ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი, ადსორბცია, ლიზისური აქტივობა, სეროლოგია ასევე სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურის, pH-ის და UV-ს პირობებში. მიღებულმა შედეგებმა გამოავლინა მოცემული ფაგების მაღალი სტაბილურობა გარემო ფაქტორებისადმი, რაც საშუალებას იძლევა, რომ აღნიშნული ფაგები გამოყენებულ იქნას გარემოს დეკონტამინაციისათვის. ლიზისური აქტივობის შესწავლით დადგინდა, რომ მოცემული ფაგები აქტიური არიან მხოლოდ *Enterococcus* spp-ს მიმართ. ფაგების *vB_GEC-EfS_2* და *vB_GEC-EfS_4* გენომის სრული სექვენსის ანალიზის საშუალებით დადგინდა, რომ *vB_GEC-EfS_2* ფაგი არის ზომიერი, ხოლო *vB_GEC-EfS_4* კი-ვირულენტური. ფაგი *vB_GEC-EfS_4* გამოვიყენეთ ინტრაპერიტონალური ინფექციის სამკურნალოდ ცხოველურ მოდელში, სადაც ინფიცირება მოვახდინეთ, როგორც პატრონ შტამით, ასევე ველური შტამით, რათა გვეჩვენებინა ამ ფაგის თერაპიული

შესაძლებლობა და არატოქსიურობა. მიღებულმა შედეგებმა საშუალება მოგვცა დავადასტუროთ, რომ ფაგი *vB_GEC-EfS_4* არის ჭეშმარიტად ვირულენტური ფაგი და აქვს კარგი პოტენციალი ფაგოთერაპიის თვალსაზრისით.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: *Enterococcus* spp., ბაქტერიოფაგი, ფაგოთერაპია.

Abstract

Enterococcus spp. is common commensal inhabitants of the mammalian gastrointestinal tract. However, some strains can cause opportunistic infections in humans. *Enterococcus* spp. cause many nosocomial infections such as endocarditis, urinary and genital tract infections, meningitis, septicemia and neonatal sepsis. Treatment of infections caused by *Ent. spp* are often confounded by antibiotic resistance. For example, many *Enterococcus* strains are resistant to Vancomycin, a drug of last resort. Infections caused by Vancomycin Resistant *Enterococcus* (VRE) are among the most important problems in medicine today because of high rate of infection lethality and social- economic damage. The spread of multy resistant bacterial strains renewed interest in phage therapy. Phage preparations are widely used to treat infections caused by different bacteria. Phage therapy has a number of advantages: first of all, the frequency of resistance development is lower, than the one with antibiotics. Phages are strictly specific, they affect only their target microbes and do not destroy flora that is necessary to the organism. The main goal of the given research was to isolation and characterization of bacteriophages specific to multy resistant *Enterococcus* spp. Bacteriophages active against these strains were isolated from sewage water from the Mtkvari River. Three phages were designated vB_GEC-EfS_2, vB_GEC-EfS_3 and vB_GEC-EfS_4 (*Syphoviridae*) and vB_GEC-EfM_9 (*Myoviridae*) were specific for only *Enterococcus* spp. Each phage's growth patterns and adsorption rates were quantified. Sensitivity to temperature, ultraviolet light (UV) and pH was determined; as was host range and serology. The given results shown that these phages have high thermal, UV and pH stability; what made these phages very promised for application against environment contamination or treatment infections caused by *Enterococcus* spp. Physiological characterization of phages showed that they are very specific in lysing *Enterococcus* spp. Whole genomes of phages vB_GEC-EfS_2 and vB_GEC-EfS_4 were sequenced and analyzed and detected that vB_GEC-EfS_2 is temperate phage and vB_GEC-EfS_4 is virulent. Phage vB_GEC-EfS_4 was used in animal model for treatment intraperitoneal infection caused by host strain and wild type strain to demonstrate non toxicity of phage application and its effectiveness as an antibacterial agent. We can assume that phage vB_GEC-EfS_4 is virulent and have good potential for therapy.

Key Words: *Enterococcus* spp., bacteriophages, phage therapy.

სადოქტორო ნაშრომის ძირითადი ნაწილი შესრულებულია გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის ბაზაზე, ზოგადი მიკრობიოლოგიის ლაბორატორიაში.

მადლიერებას გამოვხატავ შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის და GRDF მიმართ, ვინაიდან მათ მიერ ერთობლივად დაფინანსებული ინდივიდუალური სამეცნიერო-სტაჟირების გრანტის ფარგლებში სადოქტოროს ნაშრომის ნაწილი შესრულდა The city University of New Yourk, Queens college, მ.დ ჯონ დენეჰის ხელმძღვანელობით და ჰარვარდის სამედიცინო სკოლა, ბოსტონი, პროფ. მაიკლ გილმორის ხელმძღვანელობით.

მადლობას ვუხდის ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტს და სადოქტორო ნაშრომის სამეცნიერო ხელმძღვანელებს თანადგომისთვის და გაწეული დახმარებისთვის.

სარჩევი	VII
ცხრილების ჩამონათვალი	X
გრაფიკების ჩამონათვალი	XI
ილუსტრაციების ჩამონათვალი	XII
აბრევიატურების ჩამონათვალი	XIII
შესავალი	15
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა	18
თავი 1. <i>Enterococcus</i> spp დახასიათება	18
1.1 ტაქსონომია, მახასიათებლები და გავრცელება	18
1.2 კლინიკური მნიშვნელობა	18
1.3 ეპიდემიოლოგია, მკურნალობა	19
თავი 2. ბაქტერიოფაგები	21
2.1 ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა და გავრცელება	21
2.2 ფაგოთერაპია	24
მეთოდოლოგია	26
თავი 1. გამოყენებული მასალა	26
თავი 2. ბაქტერიული შტამების დასახასიათებლად გამოყენებული მეთოდები	28
თავი 3. ბაქტერიოფაგების დასახასიათებლად გამოყენებული მეთოდები	29
3.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა	29
3.2 ბაქტერიოფაგების გამოვლენა-Spot test	29
3.3 ბაქტერიოფაგის ლიზისური აქტივობის და სპექტრის განსაზღვრა	30
3.4 ბაქტერიოფაგების ტიტრის დადგენა	30
3.4.1 თხიერ საკვებ არეში- აპელმანის მეთოდი	30
3.4.2 მყარ საკვებ არეზე - გრაციას მეთოდი	30
3.5 ბაქტერიოფაგის გამრავლება	31
3.5.1 კონცენტრირების მეთოდი	31
3.5.2 გამრავლება თხიერ საკვებ არეში	31
3.6 ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპია	32
3.7 ბაქტერიოფაგების პატრონ უჯრედზე ადსორბცია	32

3.8 ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი	33
3.9 ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური ნათესაობის შესწავლა	33
3.10 ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის შესწავლა სხვადასხვა გარემო პირობებში: ქლოროფორმის თანაობისას, ტემპერატურული ინაქტივაცია, ულტრაიისფერი სხივების (UV) და pH - ის გავლენა	34
3.11 ბაქტერიოფაგების დნმ-ის გამოყოფა და რესტრიქციული ანალიზი	35
3.12 ბაქტერიოფაგების მთლიანი გენომის სექვენირება და ანალიზი	36
3.13 ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ მოდელზე	37
3.14 ბაქტერიოფაგის ენდოლიზინების გამოყოფა	38
შედეგები	39
თავი 1. ბაქტერიული შტამების დახასიათება	39
1.1 <i>Enterococcus spp.</i> შტამების იდენტიფიკაცია	39
თავი 2. <i>Enterococcus spp</i> სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება	40
2.1 ბაქტერიოფაგის გამოყოფა და მორფოლოგიური დახასიათება	40
2.2 ბაქტერიოფაგების პატრონ უჯრედზე ადსორბცია და გამრავლების ერთჯერადი ციკლი	43
2.3 ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის განსაზღვრა სხვადასხვა ტემპერატურის, UV-ს და pH - ის პირობებში	46
2.4 ბაქტერიოფაგების აქტივობის სპექტრის შესწავლა	49
2.5 ბაქტერიოფაგების vB_GEC_EFS_4 და vB_GEC_EFM_9 სეროლოგიური დახასიათება	50
2.6 ბაქტერიოფაგების გენეტიკური დახასიათება. vB_GEC_EFS_2 და vB_GEC_EFS_4 ფაგების მთლიანი გენომის სექვენსის ანალიზი	51
2.7 ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ მოდელზე	78
2.8 vB_GEC_EFS_4 -ის ენდოლიზინების გამოყოფა და ლიზისური აქტივობის დადგენა	79
დისკუსია/ინტერპრეტაცია	81
დასკვნა და რეკომენდაციები	89
ბიბლიოგრაფია	90

ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1. კვლევის პროცესში გამოყენებული პრაიმერები	27
ცხრილი 2. <i>vB_GEC_EFS_2</i> ფაგის გენომის სექვენსის ანოტაცია	56
ცხრილი 3. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 1-ის ანოტაცია	63
ცხრილი 4. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 2-ის ანოტაცია	66
ცხრილი 5. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 4-ის ანოტაცია	69
ცხრილი 6. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 5-ის ანოტაცია	70
ცხრილი 7. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 6, 7 და 9-ის ანოტაცია	73

გრაფიკების ჩამონათვალი

გრაფიკი 1: <i>vB_GEC_EFS_2</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	43
გრაფიკი 2: <i>vB_GEC_EFS_3</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	44
გრაფიკი 3: <i>vB_GEC_EFS_4</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	44
გრაფიკი 4: <i>vB_GEC_EFM_9</i> ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა	45
გრაფიკი 5: ბაქტერიოფაგების სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურის (ა.) UV-ს(ბ.) და pH-ის (გ.) პირობებში	47
გრაფიკი 6: <i>vB_GEC_EFS_2</i> , <i>vB_GEC_EFS_3</i> , <i>vB_GEC_EFS_4</i> და <i>vB_GEC_EFM_9</i> -ის მოქმედების დიაპაზონი	49
გრაფიკი 7: <i>vB_GEC_EFS_4 in vivo</i> აქტივობის შესწავლა	79

ილუსტრაცია 1 : <i>vB_GEC_EFS_2</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	41
ილუსტრაცია 2: <i>vB_GEC_EFS_3</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	41
ილუსტრაცია 3: <i>vB_GEC_EFS_4</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	42
ილუსტრაცია 4: <i>vB_Ab-S-T14</i> -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია	42
ილუსტრაცია 5. <i>vB_GEC_EFS_2</i> კონტიგი1-ის გენეტიკური რუკა	51
ილუსტრაცია 6. ფილოგენეტიკური ხე (ჰოლინის მაკოდირებული გენის მიხედვით)	51
ილუსტრაცია 7. <i>vB_GEC_EFS_2</i> კონტიგი2-ის გენეტიკური რუკა	52
ილუსტრაცია 8. <i>vB_GEC_EFS_2</i> tRNA-met (cat)-ს მეორეული სტრუქტურა	53
ილუსტრაცია 9. <i>vB_GEC_EFS_2</i> გენომის მსგავსება NCBI ბაზაში არსებულ გენომთან	53
ილუსტრაცია 10. <i>vB_GEC_EFS_2</i> და <i>phiEf11</i> გენომების მსგავსება	55
ილუსტრაცია 11. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი1-ის გენეტიკური რუკა	62
ილუსტრაცია 12. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი2-ის გენეტიკური რუკა	65
ილუსტრაცია 13. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 4-ის გენეტიკური რუკა	67
ილუსტრაცია 14. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 5-ის გენეტიკური რუკა	67
ილუსტრაცია 15. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 6-ის გენეტიკური რუკა	71
ილუსტრაცია 16. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 7-ის გენეტიკური რუკა	71
ილუსტრაცია 17. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 8-ის გენეტიკური რუკა	75
ილუსტრაცია 18. <i>vB_GEC_EFS_4</i> კონტიგი 9-ის გენეტიკური რუკა	75
ილუსტრაცია 19. ფაგი <i>vB_GEC_EFS_4</i> -ს და ფაგი phiEF24C შედარებითი მსგავსება ნუკლეოტიდურ დონეზე	76
ილუსტრაცია 20. ფაგი <i>vB_GEC_EFS_4</i> -ის გენომის სავარაუდო აგებულება	77

აბრევიატურების ჩამონათვალი

Spp, გვარში გაერთიანებული რამოდენიმე სახეობა (Several Species);

bp, ნუკლეოტიდურ ფუძეების წყვილი (base pair);

PBPs, პენიცილინ-შემაკავშირებელი ცილა (Penicillin-Binding-Proteins);

PCR, პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია (Polymerase Chain Reaction);

VRE, ვანკომიცინ რეზისტენტული ენტეროკოკი (Vancomycin Resistant Enterococcus);

ICTV, ვირუსთა ტაქსონომიის საერთაშორისო გაერთიანება (International Committee on Taxonomy of Viruses);

dsDNA, ორჯაჭვიანი დნმ;

MOI, ინფიცირების მრავლობითობა (Multiplicity of Infection);

ORF, ღია წაკითხვის ჩარჩო (Open Reading Frame).

შესავალი

ჩირქოვანი ინფექციები, თანამედროვე მედიცინის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი პრობლემაა, ვინაიდან ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტული მიკროორგანიზმები ფართოდ არიან გავრცელებული, რაც ართულებს ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობასა და პროფილაქტიკას. 1984 წელს ენტეროკოკი ცალკე გვარად იქნა აღიარებული და უკვე 1989 წელს პირველი ვანკომიცინ რეზისტენტული შტამები გავრცელდა ევროპასა და ამერიკის შეერთებულ შტატებში. 1989 წლიდან 1993 წლამდე ვანკომიცინრეზისტენტული ენტეროკოკების პროცენტული მაჩვენებელი მხოლოდ აშშ-ში 0,3% –დან 7,9% მდე გაიზარდა. ენტეროკოკული ინფექციები გასული საუკუნის 70-80 იანი წლების წამყვანი პრობლემა იყო, როგორც შარდსასქესო სისტემის ინფექციების, ასევე პოსტოპერაციული ინფექციების გამომწვევის სახით და წელიწადში 10000-დან 25000-მდე ადამიანის სიკვდილის მიზეზი გახდა აშშ-ში (54). წლების განმავლობაში საგრძნობლად შეიცვალა ენტეროკოკის ანტიბიოტიკებისადმი მგრძნობელობა (23). დღეისათვის ენტეროკოკების ანტიბიოტიკორეზისტენტობა მნიშვნელოვანი პრობლემაა, ვანკომიცინრეზისტენტული *Enterococcus faecium* კლინიკებში გამოყოფილი შტამების 80%-ს შეადგენს (4).

როგორც ავღნიშნეთ ენტეროკოკული ინფექციები ყველაზე მეტად ვლინდება შარდ-სასქესო გზების ინფიცირებისას და მათი უმრავლესობა ნოზოკომიურია და ხშირ შემთხვევაში დაკავშირებულია ინსტრუმენტებით და კათეტერიზაციის გზით გამოწვეულ ინფიცირებასთან. ენტეროკოკული ბაქტერიემიის დროს უპირატესად აღინიშნება პოლიმიკრობული ასოციაცია გრამუარყოფით ჩხირებთან (21,46). ასევე ენტეროკოკულ ინფექციებს ხშირად ვხვდებით იმუნიტეტ დაქვეითებულ პაციენტებში, რომლებიც ქიმიოთერაპიის კურსს გადიან. ბოლო წლებში ვანკომიცინრეზისტენტული ენტეროკოკი წარმოადგენს დიდ პრობლემას სამედიცინო პრაქტიკაში (46,68).

უდავოა ის ფაქტიც, რომ ფართო დიაპაზონის ანტიბიოტიკებმა მნიშვნელოვანი როლი შეასრულეს ინფექციების წინააღმდეგ ბრძოლაში, მაგრამ ამასთანავე ინფექციების მკურნალობისათვის ანტიბიოტიკების ფართო გამოყენების პრაქტიკამ გამოიწვია ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამების საყოველთაო გავრცელება თავისი მრავლობითი უკუჩვენებებით, რომლებიც ხშირად თან ახლავს ანტიბიოტიკოთერაპიას (4,29,68).

თუ ანტიბიოტიკების აღმოჩენის პირველ ეტაპზე ისინი ითვლებოდნენ უალტერნატივო საშუალებად, რომლებსაც შეუძლიათ ინფექციური დაავადებების სამკურნალო პრაქტიკის რადიკალური შეცვლა, ახლა ექსპერტები ამტკიცებენ, რომ ანტიბიოტიკების ოქროს საუკუნე დამთავრებულია.

სამედიცინო პრაქტიკაში მიკრობთა ანტიბიოტიკებისადმი პოლირეზისტენტული ფორმებით გამოწვეული ინფექციების სიმრავლემ და თანამედროვე მეთოდებით მათთან ბრძოლის სირთულემ, აღიარება მოუტანა ისეთ სამკურნალო-პროფილაქტიკურ საშუალებას, როგორიცაა ბაქტერიოფაგი. 1917 წლიდან იწყება ბაქტერიოფაგის პრაქტიკული გამოყენების ერა. აღმოჩენისთანავე ბაქტერიოფაგი, როგორც ბაქტერიის ვირუსი, მიჩნეულ იქნა მიკრობთა მიერ გამოწვეული ინფექციური დაავადებების სამკურნალო საშუალებად, მაგრამ ანტიბიოტიკების აღმოჩენამ და მათი გამოყენებით მიღებულმა სწრაფმა ეფექტმა შეზღუდა ბაქტერიოფაგების გამოყენება ამ დანიშნულებით. ბაქტერიოფაგებს ანტიბიოტიკებთან შედარებით მრავალი უპირატესობა გააჩნიათ, რომელთაგან განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიების ლიზისის უნარი. ფაგებისათვის დამახასიათებელია მაღალი სპეციფიკურობა, რომელიც განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია პათოგენური ბაქტერიული შტამებით ინფიცირების შემთხვევაში (9,55,81). ფაგით მკურნალობისას არ ირღვევა ნორმალური ბაქტერიული ფლორა. სწორედ ამ მახასიათებლების გამო ბაქტერიოფაგებით მკურნალობამ თანამედროვე სამედიცინო პრაქტიკაში დიდი ყურადღება დაიმსახურა, რის გამოც მათ განიხილავენ ანტიბიოტიკების ალტერნატივად. უამრავმა კვლევებმა და მრავალწლიანმა პრაქტიკულმა გამოცდილებამ აჩვენა, რომ ფაგები არიან აბსოლუტურად უვნებელნი და არ გააჩნიათ გვერდითი მოვლენები (1,7,11,38,39,41,60,71,72). ცნობები ენტეროკოკის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგის გამოყოფისა და შესწავლის შესახებ პირველად 1963 წელს გამოჩნდა, მაშინ როდესაც ენტეროკოკები D ჯგუფის სტრეპტოკოკებად განიხილებოდნენ. ს.როჯერსის და ვ. სარლესის მიერ *Enterococcus faecalis*-ით დასნეზოვებული ვირთაგვებიდან იდენტიფიცირებულ იქნა პათოგენური ენტეროკოკის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგი და დახასიათდა ბიოლოგიურად (65). 2000 წლიდან დაიბეჭდა რამოდენიმე სტატია ენტეროკოკის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების თერაპიული პოტენციალის შესახებ. ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი კვლევა ჩატარდა 2002 წელს ვანკომიცინრეზისტენტული *Enterococcus faecium*-ით გამოწვეული სეპტიცემიის სამკურნალოდ თავგებში. ექსპერიმენტის შედეგები

საკმაოდ წარმატებული და დამაიმედებელი იყო, ამიტომ ავტორები ფაგს, როგორც ანტიბიოტიკის უდავო ალტერნატივას და ვანკომიცინ რეზისტენტული შტამების საწინააღმდეგო რეალურ საშუალებად განიხილავენ(5).

ასევე 2011 წელს იაპონიაში და 2013 წელს ჩინეთში მეცნიერების სხვადასხვა ჯგუფმა ჩამდინარე წყლებიდან გამოყო ენტეროკოკის მიმართ აქტიური ვირულენტური ბაქტერიოფაგები. მიღებული შედეგები ამ ფაგების თერაპიულ შესაძლებლობებს უსვამს ხაზს (78,85).

წარმოდგენილი ნაშრომის კვლევის ობიექტს წარმოადგენს *Enterococcus* spp და მათი სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები.

კვლევი მიზანი: ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა *Enterococcus* spp-ის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, დახასიათება და თერაპიული აქტივობის შესწავლა.

კვლევის ძირითადი ამოცანებია:

1. *Enterococcus* spp-ის ბაქტერიული შტამების შეგროვება, შესწავლა
2. *Enterococcus* spp-ის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა
3. *Enterococcus* spp -ის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მორფო-გენეტიკური თვისებების შესწავლა
4. ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის შესწავლა სხვადასხვა ტემპერატურის, pH-ის, ულტრაიისფერი სხივების და სადეზინფექციო საშუალების პირობებში.
5. *Enterococcus* spp -ის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგის *in vitro* და *in vivo* თერაპიული ეფექტის განსაზღვრა.

თავი 1. *Enterococcus* spp დახასიათება

1.1 ტაქსონომია, მახასიათებლები და გავრცელება

Enterococcus spp გრამ-დადებითი მიკრობია, *Lactobacillales* გვარის და *Enterococcaceae*-ს ოჯახის წარმომადგენელი, ფიზიკური მახასიათებლებით ის ძალიან ახლოს დგას სტრეპტოკოკებთან და 1984 წლამდე ისინი D ჯგუფის სტრეპტოკოკებად მიიჩნეოდნენ. დნმ-ს ანალიზის მეშვეობით დადგინდა, რომ ენტეროკოკები ცალკე ოჯახს წარმოადგენდნენ. მათ გააჩნიათ ოვალური ფორმა, ზომით 0,6-2,5მკმ. არ წარმოქმნიან სპორებს და კაფსულას. ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა წარმოადგენს 35-37°C. ენტეროკოკები ფაკულტატური ანაერობებია და მათ შეუძლიათ სხვადასხვა ექსტრემალურ პირობებში არსებობა – 6,5% NaCl კონცენტრაციაზე და pH 9,6. მათთვის მისაღები ტემპერატურა 10°C - დან 45°C-მდე მერყეობს. შეუძლიათ ზრდა ნაღვლის მარილების 40% კონცენტრაციაზე. მათი პათოგენური ფორმები ძალიან დიდ საშიშროებას წარმოადგენენ, რადგან ხასიათდებიან ჰემოლიზური აქტივობით, გამძლეობით სხვადასხვა გარემო ფაქტორების მიმართ და გამოირჩევიან მაღალი ანტიბიოტიკორეზისტენტობით.

ადამიანებში დაავადების გამომწვევი ენტეროკოკის სახეობებს მიეკუთვნება: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus solitarius*, *Enterococcus dispar*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus flavescens*. უკანასკნელ წლებში განსაკუთრებულ საშიშროებას წარმოადგენს ვანკომიცინრეზისტენტული ენტეროკოკი (VRE). იგი ძალიან ხშირად გვევლინება მეორადი ინფექციების გამომწვევად (6,10,15,21,30,46,52,57,59,76).

1.2 კლინიკური მნიშვნელობა

უახლესი სამეცნიერო პუბლიკაციების მონაცემების მიხედვით *Enterococcus* spp ითვლება საავადმყოფოსშიდა ინფექციების გამომწვევ ერთ-ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან პათოგენად. პირობით პათოგენური ენტეროკოკი ნაწლავებში ბინადრობს და ორგანიზმის იმუნიტეტის დაქვეითებისას, კანისა და ლორწოვანი გარსის დაზიანების შემთხვევაში ღრმად შეიჭრება ქსოვილში და განაპირობებს პათოლოგიური პროცესების ჩამოყალიბებას (14,27,48). პათოგენური ენტეროკოკები გამოიშუშავენ ტოქსინებს, რომლებიც ამძიმებს დაავადების მიმდინარეობას (23,31,54).

ენტეროკოკი შარდ-სასქესო გზების ინფექციის ერთ-ერთ ძირითად პათოგენად მიიჩნევა. გაურთულებელი ცისტიტისა და პიელონეფრიტის გარდა ენტეროკოკი იშვიათად,

მაგრამ შესაძლებელია გახდეს პროსტატიტისა და პერინეფრული აბსცედირების მიზეზი. საშარდე გზების ენტეროკოკული ინფექცია ხშირად რთულდება ბაქტერიემიით.

ბაქტერიემიის ძირითად წყაროს წარმოადგენს აბდომინალური ინფექცია, ქრილობები, საშარდე ტრაქტის ინფექცია, ინტრავასკულური კათეტერები, ქოლანგიტი. ენტეროკოკული ბაქტერიემიის დროს განვითარებული სეპტიური შოკის დროს, როგორც წესი, ნახულობენ თანდართულ პოლიმიკრობულ ასოციაციას უპირატესად გრამუარყოფით ჩხირებთან. ენტეროკოკული ბაქტერიემიები შეიძლება გართულდეს ენდოკარდიტით. ენდოკარდიტი ძირითადად დამახასიათებელია საყოფაცხოვრებო პირობებში განვითარებული ბაქტერიემიისათვის. ჰოსპიტალური ენტეროკოკული ბაქტერიემია ხშირად პოლიმიკრობულია და ენტეროკოკული ენდოკარდიტი ზოგადად ბაქტერიული ენდოკარდიტების 10-20%-ს შეადგენს (4,21,23,31,46,54,56,68,70).

აღწერილია აგრეთვე ენტეროკოკული მენინგიტი შიდს-ით ან მწვავე ლეიკოზით დაავადებულ პაციენტებში. მენინგიტით შესაძლოა გართულდეს ნეონატალური ენტეროკოკული სეფსისიც. ენტეროკოკი შესაძლოა გახდეს სეფსისის მიზეზი ინტრავასკულური კათეტერიზაციის შემთხვევებშიც (4,21,23,31,46,54,56,68,70).

1.3 ეპიდემიოლოგია და მკურნალობა

ენტეროკოკები გამოირჩევიან მაღალი რეზისტენტობით გრამდადებითი ბაქტერიების საწინააღმდეგო რუტინული ანტიბიოტიკების მიმართ. განსაკუთრებით მაღალი რეზისტენტობით გამოირჩევა *Enterococcus faecium*-ის ბაქტერიული შტამები. ტრადიციულად ენტეროკოკული ინფექციების სამკურნალოდ გამოიყენება პენიცილინი ან ამპიცილინი ამინოგლიკოზიდებთან კომბინაციაში მაღალი სინერგიზმის გამო. მაგრამ უკანასკნელ პერიოდში, განსაკუთრებით *Enterococcus faecium*-ის შტამებმა განავითარეს მაღალი რეზისტენტობა პენიცილინის მიმართ პენიცილინ შემაკავშირებელი ცილის (PBP) ცვლილების გამო. იზრდება რეზისტენტობა ამინოგლიკოზიდების მიმართაც. ცნობილია რომ ენტეროკოკებს ამინოგლიკოზიდებისადმი კონსტიტუციურად დაქვეითებული მგრძნობელობა გააჩნიათ ენტეროკოკის უჯრედის გარსის შეზღუდული პენეტრაციის გამო. სწორედ ეს განაპირობებს ამინოგლიკოზიდების სინერგიზმს უჯრედის კედელზე მოქმედ ანტიბიოტიკებთან (პენიცილინი, იმიპენემი, ვანკომიცინი). ენტეროკოკებში განვითარდა ამინოგლიკოზიდებისადმი შემენილი რეზისტენტობა ორი მექანიზმით: რიბოსომული

მუტაცია, რაც მხოლოდ სტრუქტომიცინისადმი რეზისტენტობას განაპირობებს და პლაზმიდური ამინოგლიკოზიდგარდამქმნელი ენზიმების გამომუშავება, რაც სხვადასხვა ამინოგლიკოზიდებისადმი სხვადასხვა აქტივობით მოქმედებს. ენტეროკოკების აღმოჩენიდან ძალიან მალევე გამოვლენილ იქნა რეზისტენტობა ვანკომიცინის მიმართ. ნანახია ვანკომიცინისადმი რეზისტენტული *Enterococcus faecium*-ის სამი განსხვავებული შტამი – VanA ფენოტიპი, რეზისტენტული ტეიკოპლანინის მიმართ და VanB, VanC მგრძნობიარე ტეიკოპლანინის მიმართ. არსებული ცნობების და კვლევების შედეგები იძლევა იმის საფუძველს რომ ენტეროკოკი განხილულ იქნას როგორც პოტენციურად ერთ-ერთი საშიში პათოგენი ანტიბაქტერიული თერაპიის თვალსაზრისით (12,21,57,68).

თავი 2. ბაქტერიოფაგები

2.1 ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა და გავრცელება

ბაქტერიოფაგებზე პირველი დაკვირვებები ეკუთვნის რუს ბაქტერიოლოგს ნიკოლაი გამალეას (1898 წ.), რომელმაც შეამჩნია, რომ ციმბირის წყლულის გამომწვევი ბაცილების ფილტრატი იწვევდა ამ მიკროორგანიზმების ახალი კულტურების ლიზისს. ბაქტერიების ლიზისის ფენომენზე დაკვირვებები სხვა მეცნიერებსაც ჰქონდათ, მათ შორის, 1915წ. ქართველმა მეცნიერმა გ. ელიავამ აღნიშნა *vibrio cholerae*-ს ბაქტერიების თვითლიზისის მოვლენა (7,71,72). ამ თვალსაზრისით აღსანიშნავია ინგლისელი ბაქტერიოლოგის ფრედერიკ ტუორტის გამოკვლევები, რომელიც სწავლობდა ვირუსების ზრდას სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე და ექსპერიმენტების მიმდინარეობისას მისი ყურადღება მიიქცია სტაფილოკოკების კოლონიების (რომლითაც ხდებოდა ფინჯნების დაბინძურება) უჩვეულო “მინისებრმა გარდაქმნამ”. ტუორტმა აღნიშნა, რომ ასეთი კოლონიები კარგავდა გადათესვის უნარს და მათი შეტანა ნორმალურ (ჯანმრთელ) კოლონიებში იწვევდა ამ უკანასკნელების გარდაქმნას. ეს აღმოჩენა მეცნიერულად დასაბუთებული იქნა კანადელი ბაქტერიოლოგის ფელიქს დერელის მიერ. მან 1917 წ. დიზენტერიით დაავადებული ავადმყოფის ნაწლავებიდან გამოყო შიგელები, რომლებიც შეიცავდა ბაქტერიების ლიზისის უნარის მქონე პასირებად აგენტს და უწოდა მას “უჩინარი ბაქტერიული ანტაგონისტი”

“ბაქტერიოფაგი”, რაც “ბაქტერიის მშთანთქმელს” ნიშნავს (18,45,61,62). დერელმა დაასკვნა, რომ ბაქტერიოფაგი წარმოადგენს ბაქტერიების ვირუსს, რომელიც მრავლდება ბაქტერიული უჯრედის შიგნით, რის შედეგადაც ხდება უჯრედის ლიზისი და გარემოში გამოდის კვლავ წარმოქმნილი ვირიონის შთამომავლობა (11,26,49).

ბაქტერიოფაგები შეადგენენ ვირუსების ყველაზე ფართო ჯგუფს. ისინი ბინადრობენ ჩამდინარე წყლებში, ადამიანის, ცხოველების სხეულის და მცენარეების ზედაპირზე (28,74). ფაგები მორფოლოგიურად არიან წანაზარდიანი (კუდიანი), კუბური, ძაფისებრი, ან პლეომორფული. ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა შედგება ფაგის თავისაგან-კაფსიდისაგან, რომელიც შეიცავს ერთ ან ორმაფიან დნმ-ს ან რნმ-ს და კუდისაგან. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია ემყარება ისეთი კრიტერიუმების შესწავლას, როგორიცაა გენომის სტრუქტურა, ანტიგენური მახასიათებლები, ნეგატიური კოლონიის მორფოლოგია, მოქმედების სპექტრი, ფიზიკო-ქიმიური თვისებები, ქიმიური შემადგენლობა, ბიოლოგიური თავისებურებანი (16,17,19,26,40).

თანამედროვე კლასიფიკაციით (ICTV -ის რეკომენდაციით) მორფოლოგიისა და ნუკლეინის მჟავის ტიპის მიხედვით ბაქტერიოფაგები გაერთიანებულია 13 ოჯახად და 31 გვარად (8,42).

დღესდღეობით კუდიანი ფაგები წარმოადგენენ ყველაზე მრავალრიცხოვან და ფართოდ გავრცელებულ ჯგუფს, რომლებიც მორფოლოგიური, ფიზიკო-ქიმიური და ფიზიოლოგიური მახასიათებლებით ემსგავსებიან ერთმანეთს, ამიტომ ისინი გაერთიანებული არიან ცალკე ოჯახად *Caudovirales*. ამ ოჯახში შემავალი ფაგები კი კუდის სტრუქტურის მიხედვით იყოფა სამ დიდ ჯგუფად(8,42):

Myoviridae - წარმოადგენენ ფაგებს კუმშვადი კუდით, რომელიც შედგება ცენტრალური ღერძისაგან და შეკუმშვის უნარის მქონე შალითისაგან. (ამ ოჯახში გაერთიანებულია კუდიანი ფაგების დაახლოებით 25 %). ტიპური წარმომადგენელია T4 ფაგი.

Siphoviridae ფაგები გრძელი კუდით, რომლის შალითასაც არ გააჩნია შეკუმშვის უნარი(გაერთიანებულია კუდიანი ფაგების დაახლოებით 61%). წარმომადგენლები არიან T5 და λ ფაგები.

Podoviridae ფაგები მოკლე კუდებით, რომელთაც ასევე არ აქვთ შეკუმშვის უნარი, როგორიც არის T7 ფაგი.

Caudovirales ანუ კუდიანი ფაგები შეიცავენ ორჯაჭვიან დნმ-ს (dsDNA). მათი გენომის ზომა შესაძლოა 18,000 - დან 500,000 bp სიგრძემდე მერყეობდეს. ვირუსის ნაწილაკებს აქვთ მკაფიო ბინალური სიმეტრია, მათი თავები არის კუბური სიმეტრიის, ხოლო კუდები ჰელიკალურია. კაფსიდი კი არის იკოსაედრის ფორმის (ოცწახნაგა), რომელიც შეიცავს ვირუსულ გენომს და საყელოს საშუალებით უკავშირდება კუდს. კაფსიდური პროტეინები ორგანიზებულია კაპსომერში სუბერთეულებად. თუმცა კაპსომერი იშვიათად ჩანს. კუდიანი ფაგების სტრუქტურაში შედის აგრეთვე თავისა და კუდის ფიბრიები, ბაზალური ფირფიტა, საყელო და ტერმინალური სპიკები. აღსანიშნავია, რომ *Myoviridae* -ს კაფსიდი უფრო დიდი ზომისაა და მეტი რაოდენობით დნმ-ს შეიცავს (2,3,8,33,40,42,74).

ბაქტერიოფაგის ურთიერთქმედება ბაქტერიულ უჯრედთან მკაცრად სპეციფიურია. არსებობს ბაქტერიოფაგების განვითარების ორი ციკლი: 1. ლიზისური და 2. ზომიერი. ინფექციის საბოლოო შედეგის მიხედვით ფაგები იყოფა რამდენიმე ჯგუფად: 1. ჭეშმარიტად ვირულენტური ფაგები; 2. ზომიერი ფაგები; 3. ფაგები განვითარების უწყვეტი ციკლით; 4. ფაგები, რომლებიც შედის ფსევდოლიზოგენურ ურთიერთობაში უჯრედთან. ჭეშმარიტად ვირულენტური ფაგები ყოველთვის განვითარების ლიზისურ ციკლს გადიან. ლიზისურ ციკლში გამოყოფენ შემდეგ სტადიებს: 1. ადსორბცია; 2. ფაგის ინექცია – ვირუსული დნმ-ის შეჭრა; 3. ფაგის რეპროდუქცია; 4. ვირუსის ახალი თაობის პოპულაციის გამოსვლა ბაქტერიული უჯრედიდან – გამოთავისუფლება(8,42).

რაც შეეხება ზომიერ ფაგებს, სპეციფიკური ბაქტერიული უჯრედების ინფიცირებისას შესაძლებელია განვითარების 2 გზა – ლიზისური ან ზომიერი. ლიზისური გზის შემთხვევაში ზომიერი ფაგები, ისევე როგორც ჭეშმარიტად ვირულენტური ფაგები, იწვევენ ბაქტერიული უჯრედის ლიზისს და ფაგის შთამომავლობის გამოთავისუფლებას. ზომიერი გზის შემთხვევაში ფაგი განიცდის გარდაქმნას, ამ დროს ბაქტერიული ვირუსის დნმ ინტეგრირდება ბაქტერიულ ქრომოსომაში პროფაგის სახით. მოცემულ ფენომენს ეწოდება ლიზოგენია, ხოლო პროფაგის შემცველი ბაქტერიების პოპულაციას – ლიზოგენური კულტურა(8,42). სამკურნლო ფაგური პრეპარატის კოსტრუირებისას ყველაზე მნიშვნელოვანია ფაგების სწორად შერჩევა, რადგან დაუშვებელია ფაგოთერაპიისათვის ზომიერი ფაგების გამოყენება. პრეპარატში ზომიერი ფაგების მოხვედრა გამოიწვევს ლიზოგენური შტამების წარმოქმნას ამიტომაც, აუცილებელია თერაპიული ფაგის შემადგენლობაში შემავალი კლონების სრული გენეტიკური დახასიათება.

2.2 ფაგოთერაპია

ფაგოთერაპიის ისტორია ბაქტერიოფაგების აღმოჩენიდან იღებს სათავეს და დღემდე წარმატებულად გამოიყენება ზოგიერთ ქვეყანაში, მათ შორის საქართველოში, რუსეთსა და პოლონეთში. ანტიბიოტიკების აღმოჩენამ გამოიწვია ფაგოთერაპიის მიმართ ინტერესის დაკარგვა, მაგრამ რეზისტენტული შტამების გავრცელებამ გამოიწვია ბაქტერიოფაგების მიმართ ახლებული მიდგომა და ინტერესი (9,55,81).

დიდია ქართველ მეცნიერთა წვლილი ბაქტერიოფაგის ბიოლოგიური თვისებების შესწავლასა და მისი სამკურნალო-პროფილაქტიკური მიზნით გამოყენების შესაძლებლობის დადგენაში. ქართველმა მეცნიერებმა და პრაქტიკოს მედიკოსებმა ერთ-ერთმა პირველებმა გამოიყენეს ბაქტერიოფაგი ინფექციურ დაავადებათა წინააღმდეგ. არსებობს არაერთი მონოგრაფია ფაგების სამედიცინო პრაქტიკაში გამოყენების შესახებ, განსაკუთრებულ ყურადღებას იმსახურებს გ. კვიტაიშვილის, ქ.ბაგდოევას და ი. ხარინის კვლევები დიზენტერიის ფაგებით მკურნალობის შესახებ (11,38,39). ასევე მნიშვნელოვანი მონაცემები არსებობს გასული საუკუნის პირველ ნახევარში ფაგების ინფიცირებული ჭრილობების სამკურნალოდ გამოყენების შესახებ. ფაგებს წარმატებით იყენებდნენ მეორე მსოფლო ომის დროს ქართველი ექიმები წულუკიძე და არშბა. ლიტერატურაში არსებობს მრავალი მონაცემი, რომლებიც ადასტურებს ბაქტერიოფაგების ეფექტურ გამოყენებას თერაპიული მიზნით, სხვადასხვა ეტიოლოგიის ბაქტერიული ინფექციების დროს (1,7,11,38,39,41,60,71,72). დღეისათვის ბაქტერიოფაგით მკურნალობამ დაავადებათა ფართო სპექტრი მოიცვა. ესენია ნებისმიერი ლოკალიზაციის ყველა სახის ჩირქოვანი-ანთებადი პროცესი, ტრავმატული დაზიანებები, ინფიცირებული ჭრილობები, დამწვრობის შედეგად განვითარებული გართულებები, გინეკოლოგიური, დერმატოლოგიური, სტომატოლოგიური, თვალისა და ყელ-ყურ- ცხვირის ანთებად- ჩირქოვანი დაავადებები, ნაწლავური ინფექციები და სხვა. გ. ელიავას სახ. ბ.მ.გ. ინსტიტუტის ბაზაზე დამზადებული ბაქტერიოფაგების კომერციული პრეპარატები: ინტესტი ფაგი, პიოფაგი, სტაფილოფაგი, ენკოფაგი, ფერსისი და სესი ეფექტურად გამოიყენება სხვადასხვა ეტიოლოგიის ინფექციების პრევენციისა და მკურნალობისათვის რომლებიც გამოწვეულია *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *E .coli*, *Ps. aeruginosa*, *Salmonella spp*, *Enterococcus spp* და ბაქტერიული შტამებით (1,7,11,38,39,41,60,71,72).

მეთოდოლოგია

თავი 1. გამოყენებული მასალა

კვლევის დროს გამოყენებული იყო შემდეგი ბაქტერიული შტამები:

1. *Enterococcus* spp-ს 711 შტამი, აქედან - 15 შტამი მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყნიდან მიღებული (მათ შორის ტრინიდადიდან, აშშ, ჩინეთი) და 67 - საქართველოს კლინიკებში გამოყოფილი შტამები. ბრაიტონის უნივერსიტეტის კოლექციის 502 შტამი. ჰარვარდის სამედიცინო სკოლის კოლექციის 47 *Enterococcus faecalis*-ს და 41 *Enterococcus faecium*-ის შტამი და მასაჩუსეტსის ცენტრალური ჰოსპიტალში გამოყოფილი 39 *Enterococcus faecalis*-ის შტამი.

2. ასევე გამოყენებულ იქნა 70 შტამი გ.ელიავას ბაქტერიოფაგიის, მირობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის (ელიავა ბმვ, EBMV) ზოგადი მიკრობიოლოგიის ლაბორატორიაში არსებული *Esherichia coli*-ს 10, *Staphylococcus* –10 და *Streptococcus* - 10 ბაქტერიული შტამი. მასაჩუსეტსის ცენტრალური ჰოსპიტლის 20 სტაფილოკოკის და 20 სტრეპტოკოკის შტამი.

მუშაობის პროცესში გამოყენებული ბაქტერიოფაგები:

vB_GEC_EFS_2, *vB_GEC_EFS_3*, *vB_GEC_EFS_4* და *vB_GEC_EFM_9*, რომელთა პატრონი შტამებია *Enterococcus faecium* 12; *Enterococcus faecalis* 31, *Enterococcus faecium* 14 და *Enterococcus faecalis* 106.

ბაქტერიოფაგების დასახელებებში პრეფიქსი vB აღნიშნავს ბაქტერიულ ვირუსს (Bacterial virus), ” GEC ” – George Eliava Colection, „*Efs Efm*” *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* -ს, S-syphoviridae, M-myoviridae (37).

კვლევის პერიოდში გამოყენებული საკვები ნიადაგები და ძირითადი რეაქტივები:

1. Brain Heart Infusion Broth; Brain Heart Infusion agar (Difco);
2. Difco m *Enterococcus* agar (საიდენტიფიკაციო ნიადაგი);
3. *Enterococcus* selective agar (საიდენტიფიკაციო ნიადაგი);
4. სისხლიანი აგარი;
5. Millipore - ის მემბრანული სასტერილიზაციო ფილტრები ფორების ზომით: 0,8 μm ; 0.45 μm და 0.22 μm
6. ადიუვანტი (Freund's complete adjuvant, Difco)
7. რესტრიქციული ენდონუკლეაზები: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *HincII*, *PstI*,
8. გამოყენებული პრაიმერები

ცხრილი 1 კვლევის პროცესში გამოყენებული პრაიმერები

Ent.faecalis-ის პრაიმერები		Ent.faecium-ის პრაიმერები	
სახელი	სექვენსი (5' - 3')	სახელი	სექვენსი (5' - 3')
<i>dgh-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT	<i>Adk-1</i>	TATGAACCTCATTTTAATGGG
<i>gdh-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	<i>Adk-2</i>	GTTGACTGCCAAACGATTTT
<i>gyd-1</i>	CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC	<i>Atpa-1</i>	CGGTTCATACGGAATGGCACA
<i>gyd-2</i>	CATTTGTTGTCATACCAAGC	<i>Atpa-2</i>	AAGTTCACGATAAGCCACGG
<i>pstS-1</i>	CGGAACAGGACTTTTCGC	<i>ddl-1</i>	GAGACATTGAATATGCCTTATG
<i>pstS-2</i>	ATTACATCACGTTCTACTTGC	<i>ddl-2</i>	AAAAAGAAATCGCACCG
<i>gki-1</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	<i>gdh-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT

<i>gki-2</i>	ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	<i>gdh-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA
<i>aroE-1</i>	TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC	<i>gyd-1</i>	CAAACGTCTTAGCTCCAATGGC
<i>aroE-2</i>	GTCCTGTCCATTGTTCAAAGC	<i>gyd-2</i>	CATTTGTTGTCATACCAAGC
<i>xpt-1</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	<i>purK1</i>	GCAGATTGGCACATTGAAAGT
<i>xpt-2</i>	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	<i>purK2</i>	TACATAAATCCCGCCTGTTTC/T
<i>yqil-1</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	<i>pstS1</i>	TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG
<i>yqil-2</i>	GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	<i>pstS2</i>	CGTGATCACGTTCTACTTCC

თავი 2. ბაქტერიული შტამების დასახასიათებლად გამოყენებული მეთოდები

Enterococcus spp შტამების იდენტიფიცირება განხორციელდა:

სპეციფიკური საკვები აგარის გამოყენებით(i)- სისხლიან და ენტეროკოკის საიდენტიფიკაციო ნიადაგზე შტამები გვადლევნ ღია მონაცრისფრო და მუქ წითელ, სველ კოლონიებს, რაც გამა ჰემოლიზის შედეგია. იდენტიფიკაციისათვის გამოიყენება გრამის წესით შეღებვა, ენტეროკოკები ასევე იზრდებიან 6.5% NaCL-ის და ნალვლის მარილების პირობებში;

PCR (ii) - *Enterococcus faecalis* და *Enterococcus faecium* -ის შტამების იდენტიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ პოლიმერული ჯაჭვური რეაქცია (PCR) სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით(50,66,75);

MLST- Multy locus sequence typing (iii)- არის ორგანიზმების გენეტიკური ტიპირების მეთოდი, რომელიც დაფუძნებულია დნმ-ში გენების თანმიმდევრობის დადგენაზე. ამ

მეთოდით ხორციელდება „house keeping gene” ანალიზი და მისი მეშვეობით ადვილად ხდება პოპულაციებს შორის ფილოგენეტიკური ნათესაობის დადგენა და სისტემატიზაცია, რაც თვის მხრივ ხელს უწყობს მოცემული ბაქტერიის ეპიდემიოლოგიის შესწავლას. ტექნიკურად **MLST** შედგება რამოდენიმე ეტაპისგან, პირველ რიგში გამოიყოფა ბაქტერიის დნმ და ამპლიფიკაცია ხდება პოლიმერული ჯაჭვური რეაქციის (PCR) ის მეშვეობით, სპეციფიური 7 წყვილი პრაიმერით, რის შემდეგაც მასალა სექვენირდება ავტომატური სექვენატორით. ფუნქციური ანალიზი ხდება სპეციალური პროგრამით Genewiz და MLST ონლაინ ბაზის გამოყენებით (24,53).

VITEK 2 სადიაგნოსტიკო სისტემა (iiii)-*Enterococcus faecalis* და *Enterococcus faecium* პატრონ შტამების იდენტიფიკაცია მოხდა VITEK 2 bioMérieux სისტემის გამოყენებით. ეს მეთოდი დაფუძნებულია 41 ფლუორესცენტული ბიოქიმიური ტესტის შემცველ 64 - უჯრიან პლასტმასის მიკრო თევშებით (card) იდენტიფიკაციაზე. Card ავტომატურად ივსება ვაკუუმის საშუალებით და ავტომატურადვე ილუქება. შემდეგ კი აღნიშნული Card- ი იდება VITEK 2 სისტემის თერმოსტატში და შედეგები იკითხება 18 საათში (22).

თავი 3. ბაქტერიოფაგების დასახასიათებლად გამოყენებული მეთოდები

3.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა

ბაქტერიოფაგების გამოსაყოფად გამოყენებულ იქნა სხვადასხვა ტერიტორიიდან აღებული ჩამდინარე წყალი. ჩამდინარე წყლის 100 მლ-ს ვუმატებთ 10 მლ კონცენტრირებულ ბულიონს და 1 მლ წინასწარ შერჩეული ინდიკატორული კულტურის ან კულტურების ნარევს. თერმოსტატში 37 °C-ზე 18 სთ ინკუბაციის შემდეგ ნარევს ვაცენტრიფუგირებთ 5,000 გ-ზე 30-40 წთ და სუპერნატანტს ვფილტრავთ 0.22 μm ზომის მემბრანულ ფილტრებში (Milipore). ამის შემდეგ ფილტრატს ვამოწმებთ ფაგის შემცველობაზე. ფაგების გამოყოფის შემთხვევაში მათი გასუფთავება გრძელდება ერთგვაროვანი ნეგატიური კოლონიების მიღებამდე. ფაგის კოლონიებიანი ფინჯნებიდან ხდება სტერილური პასტერის პიპეტით ერთგვაროვანი ნეგატიური კოლონიის ამოღება და მისი შეტანა 1 მლ ბულიონიან სინჯარაში. სინჯარას 1 სთ ვათავსებთ თერმოსტატში 37 °C ტემპერატურაზე. შემდგომ კი იტიტრება გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. ფაგის ერთგვაროვანი ნეგატიური კოლონიების მისაღებად აღნიშნული პროცესი რამდენიმე პასაჟს საჭიროებს (34,42).

3.2 ბაქტერიოფაგების გამოვლენა - Spot test

ბაქტერიოფაგების გამოსავლენად კეთდება ბაქტერიული კულტურის გაზონი: 0.1 მლ ინდიკატორულ ბაქტერიულ კულტურას ემატება 4.5 მლ 0.7 %-იანი აგარი და ვასხამთ პეტრის ფინჯანზე. გამყარების შემდეგ ვაწვეთებთ საკვლევი სუპერნატანტის 10 μ l -ს. 37 °C-ზე 18 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ ფაგის არსებობას ვამოწმებთ ლიზისური ზონების არსებობით (34,40,42).

3.3 ბაქტერიოფაგის ლიზისური აქტივობის და სპექტრის განსაზღვრა

ლიზისური აქტივობისა და სპექტრის განსაზღვრისათვის ვიღებთ 24 საათიანი ბაქტერიული კულტურის ჩამონარეცხს ირიბი აგარიდან, ვაზავებთ ათჯერ (10^8 უჯრ/მლ), ვაკეთებთ გაზონს პეტრის ფინჯანზე, როგორც ეს Spot test -ის მეთოდშია აღწერილი და ვაწვეთებთ 10 μ l ფაგს . 37 °C-ზე 18 - 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ფაგის მიერ წარმოქმნილი ლიზისური ზონების ხარისხის მიხედვით ხდება ლიზისური აქტივობის განსაზღვრა(40,42).

3.4 ბაქტერიოფაგების ტიტრის დადგენა

ბაქტერიოფაგების ტიტრის დადგენა ხდება როგორც თხიერ საკვებ არეში-აპელმანის მეთოდით, ასევე მყარ საკვებ არეში- გრაციას მეთოდით

3.4.1 თხიერ საკვებ არეში- აპელმანის მეთოდი

თხიერ საკვებ არეში ტიტრის დასადგენად 4.5 მლ საკვებ ბულიონიან სინჯარებში ხდება საკვლევი ფაგის თანმიმდევრული ათჯერადი განზავება და ყოველ სინჯარას ემატება 0,1 მლ ბაქტერიული შტამი 10^8 უჯრ/მლ კონცენტრაციით პარალელურად იდგმება კონტროლი (0,1 მლ ბაქტერიული შტამი ემატება 4,5მლ საკვებ არეში ფაგის დამატების გარეშე). 37 °C-ზე 18 – 24 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ ფაგის აქტივობა განისაზღვრება

კულტურის კონტროლთან შედარებით საკვლევი სინჯარების გამჭვირვალობის ხარისხის მიხედვით(40,42).

3.4.2 მყარ საკვებ არეზე - გრაციას მეთოდი

გამოსაკვლევ ფაგს ვტიტრავთ სასურველ განზავებამდე ათჯერადი განზავების მეთოდით. სათანადო განზავებიდან ფაგის 1 მლ გადაგვაქვს ცალკეულ სტერილურ სინჯარებში, რომელთაც ემატება 0.1 მლ ტესტ-კულტურისა და დაახლოებით 7 მლ 0.7%-იანი აგარი. სინჯარებს აღნიშნული ნარევით სწრაფად ვანჯღრევთ და შიგთავსს თანაბრად ვანაწილებთ 2 % -იან აგარიან პეტრის ფინჯნებზე. ფინჯნებს ვათავსებთ საინკუბაციოდ თერმოსტატში 37 °C -ზე. 18-24 სთ-ის შემდეგ ვითვლით ნეგატიური კოლონიების რაოდენობას. ფაგის ტიტრი განისაზღვრება 1 მლ საკვლევ სითხეში აქტიური ფაგური ნაწილაკების რაოდენობით (36,42).

3.5 ბაქტერიოფაგების გამრავლება

3.5.1 კონცენტრირების მეთოდი

კონცენტრირების გზით ბაქტერიოფაგების გასამრავლებლად გამოიყენება ორშრიანი აგარის მეთოდი. თავდაპირველად ფაგს ვტიტრავთ სასურველ განზავებამდე. სტერილურ სინჯარაში გადაგვაქვს 1მლ $\cdot$ 10⁹ უჯრ/მლ კონცენტრაციის ბაქტერიული შტამი, რომელსაც ემატება 0.1 მლ ფაგი შესაბამისი განზავებიდან და 7 მლ 0.7 % ნახევრად თხიერი აგარი. შემდეგ სინჯარის შიგთავსი ისხმება 2 % აგარიან პეტრის ფინჯნებზე. 37 °C 18-24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ, ფინჯნებიდან მიღებულ ზედა შრე ჩამოიხვეტება და და 5,000 g -ზე 30-40 წთ ცენტრიფუგირების გზით მიღებული სუპერნატანტი იფილტრება 0.22 μ m ზომის მემბრანულ ფილტრებში (Milipore) (34,42).

3.5.2 გამრავლება თხიერ საკვებ არეში

ფაგის გამრავლება ხდება ასევე თხიერ საკვებ არეში. ამისთვის 18 საათიანი 1 $\cdot$ 10⁹ უჯრ/მლ კონცენტრაციის ბაქტერიული შტამის 0.1მლ შეაქვთ 9.9 მლ ბულიონში. სინჯარა

თავსდება სანჯღრეველაზე 37 °C -ზე. 2-3 სთ -ის შემდეგ შესაბამის ბაქტერიულ კულტურას ლოგარითმულ ფაზაში (როდესაც მიკრობის ტიტრი აღწევს 2×10^8 უჯრ/მლ) ემატება გასამრავლებელი ფაგის 0.1 მლ 2×10^7 ნაწ/მლ ტიტრით. სინჯარას ტოვებენ 18 – 24 სთ ინკუბაციისათვის, ხოლო შემდეგ ფილტრავენ 0.45 - 0.22 μm ზომის მემბრანულ ფილტრებში (Milipore) და ტიტრს ადგენენ გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით (42).

3.6 ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპია

ბაქტერიოფაგების მორფოლოგიის შესწავლა ხდება ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპით. მიკროსკოპიისათვის გამოიყენება გასუფთავებული ფაგური ლიზატი ტიტრით 9×10^9 ნაწ/მლ, რომელიც თავსდება პიოლოფორმიანი საფენის მქონე ბადეებზე. ბადე ირეცხება ორჯერ, ორმაგად დისტილირებული წყლით და ემატება 2 წვეთი 1 % -იანი ურანილ აცეტატის ხსნარი. ზედმეტი ხსნარი მაშინვე სცილდება და ბადეები შრება ჰაერზე. სინჯების დათვალიერება ხდება 80-100kV დენის ძაბვით JEOL JEM 1400 ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპის დახმარებით (58).

3.7 ბაქტერიოფაგების პატრონ უჯრედზე ადსორბცია

ბაქტერიულ უჯრედზე ფაგის ადსორბციის სიჩქარის დასადგენად იღებენ ფაგისა (10^7 ნაწ/მლ) და ლოგარითმული ფაგის მიკრობის (10^8 უჯრ/მლ) თანაბარ რაოდენობას. სინჯარა აღნიშნული ნარევით თავსდება 37 °C - ზე წყლის აბაზანაში. 0.1 მლ -ის ოდენობით სინჯები იღება დროის გარკვეულ ინტერვალებში (0', 3', 5', 7', 10', 12') და ემატება 9.9 მლ საკვებ ბულიონიან და 0.4 მლ ქლოროფორმიან წინასწარ გაციებულ სინჯარას, სინჯარის კარგად შენჯღრევის შემდეგ 10 წუთით იდგმება საყინულეში. შემდეგ ფაგის შესაბამისი განზავებები გადაიტანება სტერილურ სინჯარაში და იტიტრება ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით. მეორე დღეს ფაგის ნეგატიური კოლონიების რაოდენობით ხდება შედეგების შეჯამება და ადსორბციის დროისა და ადსორბციის სიჩქარის კონსტანტის გამოთვლა. ბაქტერიულ უჯრედზე ფაგის ადსორბციის სიჩქარე გამოისახება სპეციალური ფორმულით:

$$k = 2.3/Bt \times \log P_0/P$$

სადაც k ადსორბციის სიჩქარის კონსტანტაა (მლ/წთ); B - ბაქტერიების კონცენტრაცია, t - დრო, რომლის განმავლობაშიც ფაგის საწყისი ტიტრი P_0 ეცემა ფაგის საბოლოო P ტიტრამდე (32,47,64).

3.8 ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი

ბაქტერიოფაგის ორი მნიშვნელოვანი მახასიათებლის - უჯრედშიდა გამრავლების ლატენტური პერიოდისა და ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის შემდგომ ფაგის საშუალო გამოსავლის განსაზღვრისათვის გამოიყენება ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი. ცდის შესრულებისთვის 9.9 მლ საკვებ ბულიონს ემატება 0.1 მლ 24 სთ-იანი ბაქტერიული კულტურის ჩამონარეცხი, თავსდება 37°C - ზე წყლის აბაზანაში ექსპონენციალური ფაზის მიღწევამდე (10^8 უჯრ/მლ) შემდეგ 0.9 მლ ექსპოტენციალური ფაზის ბაქტერიულ კულტურას ემატება 0.1 მლ ფაგი (ტიტრით 10^8 ნაწ/მლ), რაც წარმოქმნის 1 მლ უჯრედებს ინფიცირების მრავლობითობით 0.1 (MOI). აღნიშნული ნარევი იდგმება 37°C - ზე წყლის აბაზანაში 3 წთ და იწყება დროის ათვლა. 3 წთ-ის შემდეგ ვიღებთ 0.1 მლ-ს, რომელიც ზავდება 10 მლ საკვებ ბულიონში. კარგად შენჯღრევის შემდეგ ამოგვაქვს ისევ 0.1 მლ-ი და ემატება 2.5 მლ საკვები ბულიონი, რომელსაც პირობითად "განზავებულ კულტურას" ვუწოდებთ. "განზავებულ კულტურას" ვაბრუნებთ წყლის აბაზანაში. ვაფიქსირებთ დროს და ვიღებთ პირველ სინჯს. სინჯების აღება გრძელდება დროის გარკვეულ ინტერვალში (5', 7', 10', 15', 18', 20', 25', 35', 50', 60', 75', 80', 90') 0.1 მლ -ის ოდენობით. სინჯები გადაგვაქვს ორშრიანი აგარის მეთოდით სხვადასხვა განზავებებით (1:4, 1:10, 1:100 და 1:1000), რათა მეორე დღეს შესაძლებელი გახდეს კოლონიების ზუსტი რაოდენობის დათვლა(32,80).

3.9 ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური ნათესაობის შესწავლა

ბაქტერიოფაგებს შორის ნათესაობას ადგენენ სეროლოგიური მეთოდით, რომელიც ხორციელდება ორ ეტაპად:

პირველ ეტაპზე ხდება ცხოველთა იმუნიზაცია სპეციფიკური ანტიფაგური შრატის მისაღებად, ამისთვის ტარდება ბოცვერების იმუნიზაცია. პირველადი იმუნიზაციისთვის თითოეული ბოცვერის უკანა თათის კუნთში თანაბარი რაოდენობით შეჰყავთ 1მლ ბაქტერიოფაგი ტიტრით 1×10^{10} ნაწ/მლ და 1მლ ადიუვანტის ნარევი. ეს უკანსკნელი წარმოადგენს ზეთოვან ნარევს, რომელშიც ემულგირებულია მიკობაქტერიის ანტიგენები. მეორადი იმუნიზაცია ტარდება 1 თვის შემდეგ და ამჯერად (კურდღლებში) ბოცვერში ინტრავენურად შეჰყავთ 1მლ ბაქტერიოფაგი ტიტრით 1×10^{10} ნაწ/მლ. რეიმუნიზაციიდან 2 კვირის შემდეგ ბოცვერების გულის მარცხენა პარკუჭიდან იღებენ სისხლს 25მლ-ის ოდენობით და აქედან იწყება სეროლოგიური ნათესაობის შესწავლის მეორე ეტაპი. მიღებულ შრატში ანტიფაგური ანტისხეულების არსებობას და ტიტრს საზღვრავენ ნეიტრალიზაციის რეაქციით, რისთვისაც 0,1 მლ ბაქტერიოფაგს ტიტრით 1×10^7 ნაწ/მლ ემატება 0,9 მლ შრატი გარკვეული განზავებით (1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000) და დროის გარკვეულ ინტერვალებში (5', 10', 15', 20', 30') იღებენ სინჯებს 0,1 მლ ოდენობით და ანზავებენ 100 ჯერ. შემდგომ ამ განზავებიდან 0,1 მლ გადააქვთ პეტრის ფინჯნებზე ბაქტერიულ კულტურასთან ერთად და ასხამენ ორშრიანი აგარის მეთოდით. პარალელურად იდგმება ფაგის კონტროლი, რომელშიც ანტიფაგური შრატის ნაცვლად იყენებენ ფიზიოლოგიურ ხსნარს ან საკვებ ბულიონს. პეტრის ფინჯნები საინკუბაციოდ თავსდება თერმოსტატში 37°C -ზე. 18-24 საათის შემდეგ თითოეულ ფინჯანზე ითვლიან ბაქტერიოფაგის ნეგატიური კოლონიების რაოდენობას. ნეიტრალიზაციის სიჩქარის კონსტანტა გამოითვლება სპეციალური ფორმულით:

$$K = 2.3 \frac{D}{t} \times \log \frac{P_0}{P_t}$$

სადაც P_0 არის ფაგის რაოდენობა დროის საწყის მომენტში; P_t - ფაგის რაოდენობა t დროისთვის; D - ანტიფაგური შრატის განზავება; K - ნეიტრალიზაციის სიჩქარის კონსტანტა(წთ⁻¹) (22,79).

3.10 ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის შესწავლა სხვადასხვა გარემო პირობებში
ქლოროფორმის თანაობისას, ტემპერატურული ინაქტივაცია, ულტრაიისფერი სხივების (UV) და pH - ის გავლენა

ფაგის აქტივობაზე ქლოროფორმის გავლენის შესასწავლად, 0.1მლ ფაგურ ლიზატს ემატება 9.9 მლ საკვები ბულიონი და 0.4 მლ ქლოროფორმი. ნარევს აყოვნებენ და დროის გარკვეულ ინტერვალებში ხდება სინჯების აღება (0', 5სთ, 24სთ). სინჯებს ტიტრავენ გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით შესაბამისი განზავებებიდან. პარალელურად იდგმება ფაგის კონტროლი ქლოროფორმის გარეშე. ფინჯნებს ათავსებენ თერმოსტატში 37° C- ზე საინკუბაციოდ (34).

ფაგის აქტივობასა და სტაბილურობას სწავლობენ აგრეთვე სხვადასხვა ტემპერატურის პირობებში 37°C, 45°C, 65°C - ზე. ბაქტერიოფაგის ლიზატს (ტიტრით $1 \cdot 10^8$ ნაწ/მლ) ათავსებენ შესაბამის ტემპერატურაზე და იღებენ სინჯებს დროის სხვადასხვა მონაკვეთებში 0', 4სთ, 18სთ, 24სთ. შედეგებს ითვლიან გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით.

ბაქტერიოფაგზე pH - ის გავლენის შესასწავლად იღებენ სხვადასხვა pH- (pH 3', 5', 7', 9', 11') საკვებ ბულიონს . ცდისათვის გამოყენებული ფაგის 0.5 მლ შეაქვთ შესაბამისი pH-ის მქონე 4.5 მლ საკვებ ბულიონში და საინკუბაციოდ ათავსებენ თერმოსტატში 37 °C - ზე. სინჯების აღება ხდება 0', 5სთ და 24სთ-იანი დროის ინტერვალთ და გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით დგინდება ფაგის აქტივობა (34,64).

ბაქტერიოფაგზე UV-ს გავლენის შესასწავლად ბაქტერიოფაგის ლიზატის დასხივება ხდება 365ნმ სიგრძის UV სხივებით 20, 40, 60, 80, 100, 150, 180, 200 და 240 წამის განმავლობაში, სინჯები იტიტრება და გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით დგინდება ფაგის აქტივობა (64).

3.11 ბაქტერიოფაგების დნმ-ის გამოყოფა და რესტრიქციული ანალიზი

ფაგის დნმ-ის გამოსაყოფად გამოიყენება კლასიკური ფენოლ-ეთანოლით ექსტრაქციის მეთოდი.თავდაპირველად ფაგის ლიზატს (უმჯობესია PEG პრეციპიტირებული SM ბუფერში) ემატება 1-1 μ ლ ფერმენტები Dnase და Rnase მიკრობული დნმ-ის მოსაცილებლად და საინკუბაციოდ დებენ 37 °C-ზე 1 საათით. შემდგომ ამატებენ თანაბარი მოცულობით ფენოლს, ხელში ფრთხილად ურევენ და აცენტრიფუგირებენ 15000 g- ზე 4 °C 10 წთ. სუპერნატანტს იღებენ ისე, რომ პიპეტმანი არ შეეხოს ქვედა ფენას,

შეგროვილ წყლიან ფაზას კი ამატებენ თანაბარი მოცულობით P:C:I-ს (ფენოლ: ქლოროფორმ: იზოამილალკოჰოლს (25:24:1)). ხელში ნაზად ანჯღრევენ და აცენტრიფუგირებენ 15000 გ- ზე 4 °C 10 წთ. ისევ ფრთხილად ამოაქვთ სუპერნატანტი და ამატებენ თანაბარი რაოდენობით ქლოროფორმ: იზოამილალკოჰოლს (C:I 24:1). კვლავ ათავსებენ ცენტრიფუგაში 15000 გ- ზე 4 °C 10 წთ და ამოღებულ სუპერნატანტს უმატებენ რაოდენობის 0.4 მოცულობას 7.5 M ამონიუმის აცეტატს და ორმაგ რაოდენობა იზოპროპანოლს. ტოვებენ ყინულზე 1 სთ, შემდეგ კი აცენტრიფუგირებენ 21000 გ- ზე 20 წთით. სუპერნატანტს ღვრიან, ნალექს კი რეცხავენ 70 % ეთანოლით 15000 გ- ზე 10წთ ცენტრიფუგირების პირობებში. ეთანოლს ასხამენ, ნალექს აშრობენ ჰაერზე (არაუმეტეს 20 წთ) და ხსნიან 50 µl სტერილურ გამოხდილ წყალში ან EB ბუფერში (10mM Tris HCl, pH 8.5). ასევე ფაგის დნმ-ს გამოსაყოფად გამოიყენება ვირუსული დნმ-ის გამოსაყოფი კიტი.

3.12 ბაქტერიოფაგების მთლიანი გენომის სექვენირება და ანალიზი

ფაგის გენომის სექვენსი განხორციელდა Single-Molecule Real-Time Sequencing მეთოდის საშუალებით, რომელიც მესამე თაობის სექვენირების მეთოდად არის მიჩნეული (67). სექვენირებული მასალის აწყობა (assemble) მოხდა Newmbler 2.3 პროგრამის საშუალებით. ღია წაკითხვის ჩარჩოების (ORFs) იდენტიფიცირებისათვის გამოყენებულ იქნა შემდეგი პროგრამები: Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>); Genemark (http://exon.gatech.edu/gmhmm2_prok.cgi); Glimmer (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi). პრომოტორული და ტერმინატორული უბნები შესწავლილ იქნა ARNOLD და BPROM, BDGP პროგრამების საშუალებით (73).

ღია წაკითხვის ჩარჩოების პირველადი ანოტაცია განხორციელდა blastp და PSIBlast-ის საშუალებით. ხოლო ფუნქციური ანალიზისთვის გამოყენებულ იქნა შემდეგი პროგრამები:

- pfam <http://pfam.sanger.ac.uk/search>
- HMMER <http://hmmer.janelia.org/>
- ProDom <http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/form.php>
- SMART <http://smart.embl-heidelberg.de/>
- InterProScan <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>
- TIGRfam <http://blast.jcvi.org/web-hmm/>

- HHpred - <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>
- SignalP <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- Transmembrane helics <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

სატრანსპორტო რნმ-ის გენების იდენტიფიცირება მოხდა შემდეგი პროგრამებით :

- <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/ARAGORN/>
- <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>

გენომის რუკის შესაქმნელად გამოყენებულ იქნა Artemis პროგრამა, გენომების შესადარებლად ArtemisAct, ფილოგენეტიკური ხის ასაგებად Mega 5.2 პროგრამა.

3.13 ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ მოდელზე

ცდაში გამოვიყენეთ ზრდასრული ვირთაგვები წონით 200-300გრ. საკვლევი მიკრობის და ფაგის ექსპერიმენტისთვის საჭირო დოზების დასადგენად 30 ვირთაგვა დავასნებოვნეთ მოცემული მიკრობებით სხვადასხვა მოცულობით: 0,3; 0,6; 0,9; 3; 5 მლ შტამით ($5 \cdot 10^8$ უჯრ/მლ), რომელიც შევანილ იქნა ინტრაპერიტონალურად და 1 კვირიანმა დაკვირვებამ გვაჩვენა რომ ინფექციური პროცესი ყველაზე კარგად და გამოხატული სურათით მიმდინარეობდა იმ ვირთაგვებში რომლებშიც ერთჯერადად შევანილ იქნა კულტურა $5 \cdot 10^8$ უჯრ/მლ ტიტრით 5 მლ ოდენობით. სამკურნალოდ გამოყენებულ იქნა ფაგი $5 \cdot 10^7$ ნაწ/მლ ტიტრით. ამის შემდეგ 30 ვირთაგვა დაიყო 5 ჯგუფად, სულ 5 ვირთაგვა თითო ჯგუფში.

I ჯგუფი- *Enterococcus faecium* 14 მიკრობის საკონტროლო ჯგუფი: ერთჯერადად შევანილ იქნა 5მლ ბაქტერიული კულტურა მუცლის ღრუში.

II ჯგუფი- *Enterococcus faecalis* 31 მიკრობის საკონტროლო ჯგუფი: ერთჯერადად შევანილ იქნა 5მლ ბაქტერიული კულტურა მუცლის ღრუში.

III ჯგუფი - ფაგის საკონტროლო ჯგუფი: შევანილ იქნა საკვლევი ფაგი 5მლ ოდენობით მუცლის ღრუში.

IV ჯგუფი- ინტრაპერიტონალური ინფიცირება 5 მლ *Enterococcus faecium* 14, 24 საათის შემდეგ ასევე ინტრაპერიტონალურად 1მლ ფაგის შევანა, რაც გრძელდებოდა 10 დღის განმავლობაში.

V ჯგუფი- ინტრაპერიტონალური ინფიცირება 5 მლ *Enterococcus faecalis* 31, 24 საათის შემდეგ ასევე ინტრაპერიტონალურად 1მლ ფაგის შეყვანა, რაც გრძელდება 10 დღის განმავლობაში.

VI ჯგუფი- საკონტროლო ჯგუფი (არაინფიცირებული თაგვები)

ფაგის აპლიკაციამდე დროის შემდეგ ინტერვალებში 0'(12'), 24', 48', 72' და 144'... ('-საათი) სტერილური სინჯარის გამოყენებით ხდებოდა ფეკალური მასის აღება. თითოეულ სინჯს ემატებოდა 4,5მლ ბულიონი და ხდებოდა სინჯში ფაგისა და ბაქტერიის ტიტრის დადგენა. ბაქტერიის ტიტრის დასადგენად გამოიყენებოდა ენტეროკოკის აგარი, დაბინძურების შემთხვევაში ცდომილების თავიდან ასაცილებლად. ფაგის ტიტრის განსაზღვრა ხდებოდა თანმიმდევრული განზავებით და გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით.

3.14 ბაქტეროფაგის ენდოლიზინების გამოყოფა

ენდოლიზინების გამოსაყოფად გამოყენებულ იქნა ფიზიკო-ქიმიური მეთოდი. 10მლ ბაქტერიულ კულტურას ემატებენ 500 მლ საკვებ ბულიონს და 3 სთ ტოვებენ 37° C ზე სანჯღრეველაზე, რის შემდეგ ემატება 20მლ ფაგი და ათავსებენ 37° C -ზე გარკვეული დროით, დრო ისაზღვრება საკვლევი ფაგის ლატენტური პერიოდიდან გამომდინარე, ანუ საინკუბაციო პერიოდი უნდა იყოს ფაგის ლატენტურ პერიოდზე ნაკლები. ამის შემდეგ ფაგით ინფიცირებული კულტურის ცენტრიფუგირება ხდება 30წთ 6000რპმ-ზე და იხსნება 5მლ ბულიონში, მოცემული სუსპენზიის ინკუბაცია გრძელდება 4-5 საათი 37° C -ზე, სანამ არ დაფიქსირდება სრული ლიზისი, ამის შემდეგ სუსპენზიას აცენტრიფუგირებენ 8000რპმ-ზე 30 წთ. სუპერნატანტს ემატება 40% ამონიუმის სულფატი და ინახება -4° C -ზე 18 საათი. მომდევნო დღეს სუსპენზიას აცენტრიფუგირებენ 14000 რპმ-ზე 30 წთ და ისევ ემატება 50% ამონიუმის სულფატი. 4 საათის შემდეგ პრეციპიტანტი, რომელიც შეიცავს ენდოლიზინს, ილექება 14000 რპმ-ზე ცენტრიფუგირების მეშვეობით და იხსნება 1მლ ბუფერ A -ში(Alcaline lysis buffer) და დიალიზდება იგივე 5ლიტრი ბუფერით 24 საათის განმავლობაში (20,25).

შედეგები

თავი 1. ბაქტერიული შტამების დახასიათება

1.1 *Enterococci* - ს შტამების იდენტიფიკაცია

კვლევის პროცესში ჩვენს ლაბორატორიაში მიღებული იყო *Enterococcus* spp 87 შტამი. აქედან 20 შტამი წარმოადგენდა უროლოგიური დაავადებების მქონე პაციენტებიდან გამოყოფილ *Enterococcus faecalis*, 20 შტამი სხვადასხვა საკვლევი მასალიდან გამოყოფილი *Enterococcus faecium*. ამ შტამებიდან 10 ვანკომიცინრეზისტენტული შტამი მივიღეთ აშშ-დან. ასევე კვლევის პროცესში გამოყენებულ იქნა ბრაიტონის უნივერსიტეტის კოლექციაში არსებული ენტეროკოკის 505 შტამი, რომელთაგან 45 *Enterococcus faecalis*, 66 *Enterococcus faecium*, 58 *Enterococcus hirae*, 20 *Enterococcus gallinarum* და 18 *Enterococcus flavescens* იყო და ასევე 325 *Enterococcus* spp. შტამი.

შტამების იდენტიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ ენტეროკოკის საიდენტიფიკაციო აგარი, ხოლო ზუსტი იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებულ იქნა PCR-ის მეთოდი *Enterococcus faecalis* და *Enterococcus faecium*-ის MLST (multy locus sequence typing) სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით.

პატრონ შტამები რომლებიც კვლევის პერიოდში გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების გამოსაყოფად გამოვიყენეთ დამატებით იდენტიფიცირებულ იქნა VITEK 2 სისტემის მეშვეობით. ამ მონაცემებით *Enterococcus* 12 და *Enterococcus* 14 შტამები 99 % - ით იდენტიფიცირდნენ როგორც *Enterococcus faecium*, ხოლო *Enterococcus* 3 და *Enterococcus* 106 - 99 % - ით წარმოადგენენ *Enterococcus faecalis*-ს.

თავი 2. *Enterococcus* spp სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება

2.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და მორფოლოგიური დახასიათება

მოცემული სამეცნიერო კვლევის ჩატარების პერიოდში *Enterococcus* spp.-ის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფის მიზნით ბაქტერიების ჩათესვა ჩამდინარე წყლებში ხდებოდა პერიოდულად და სულ გამოყოფილ იქნა 15 ფილტრატი, მრავალჯერადი თანამიმდევრული პასირების შედეგად შერჩეული იქნა 4 *Enterococcus* spp.-ს სპეციფიკური ფაგი. ესენია: *vB_GEC_EFS_2*, *vB_GEC_EFS_3*, *vB_GEC_EFS_4* და *vB_GEC_EFM_9*.

ფაგი *vB_GEC_EFS_2* 2005 წელს იქნა გამოყოფილი მდინარე მტკვრის ჩამდინარე წყლიდან. პატრონ ბაქტერიულ შტამს წარმოადგენს *Enterococcus faecium* 12.

ფაგი *vB_GEC_EFS_3* გამოყოფილ იქნა 2009 წელს მდინარე მტკვრის წყლიდან და პატრონ უჯრედს წარმოადგენს *Enterococcus faecalis* 31.

vB_GEC_EFS_4 ფაგი 2007 წელს იქნა გამოყოფილი, მის პატრონ შტამს წარმოადგენს *Enterococcus faecium* 14, რომელიც კლინიკურ მასალას წარმოადგენდა და ვაგინალური ინფექციის მქონე პაციენტისგან იქნა აღებული.

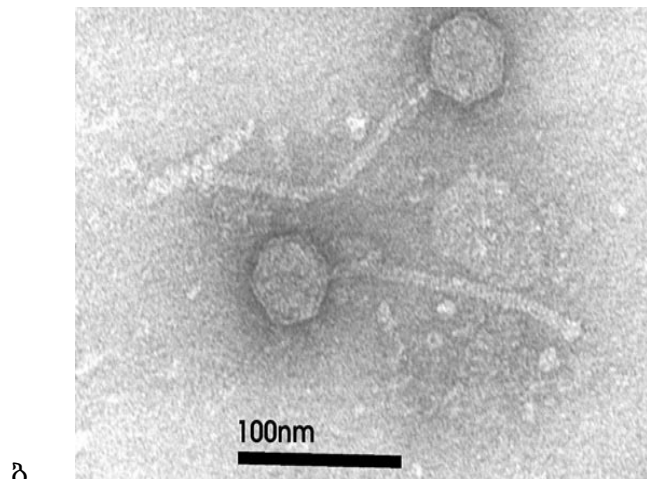
vB_GEC_EFM_9 გამოყოფილია 2011 წელს, პატრონ შტამს წარმოადგენს *Enterococcus faecalis* 106, რომელიც უცხოელი პაციენტის კლინიკური მასალიდან იქნა იდენტიფიცირებული.

ფაგი *vB_GEC_EFS_2* დამახასიათებელია საშუალო ზომის ნათელი კოლონიები. ელექტრონული მიკროსკოპით დადგინდა, რომ *vB_GEC_EFS_2* მიეკუთვნება *Siphoviridae*-ს ოჯახს, ზომებით: 60 ნმ თავი, 180 ნმ კუდი (ილუსტრაცია 1). მისი ტიტრი გრაციას მეთოდით განიზასღვრა როგორც $2 \cdot 10^{10}$ ნაწ/მლ ხოლო აპელმანის მეთოდით 10^6 ნაწ/მლ.

ილუსტრაცია 1 : *vB_GEC_EFS_2*-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.



ა.

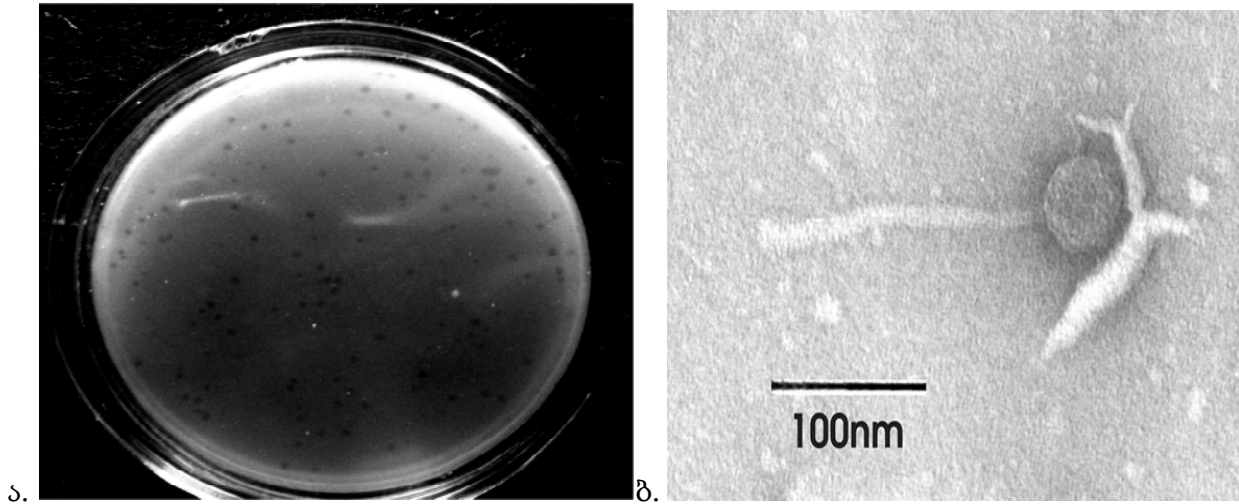


ბ.

ფაგი *vB_GEC_EFS_3* ფინჯანზე იძლევა წვრილ, ნათელ კოლონიებს. ელექტრონული მიკროსკოპით დადგინდა, რომ *vB_GEC_EFS_3* მიეკუთვნება *Syphoviridae*-ს ოჯახს და აქვს

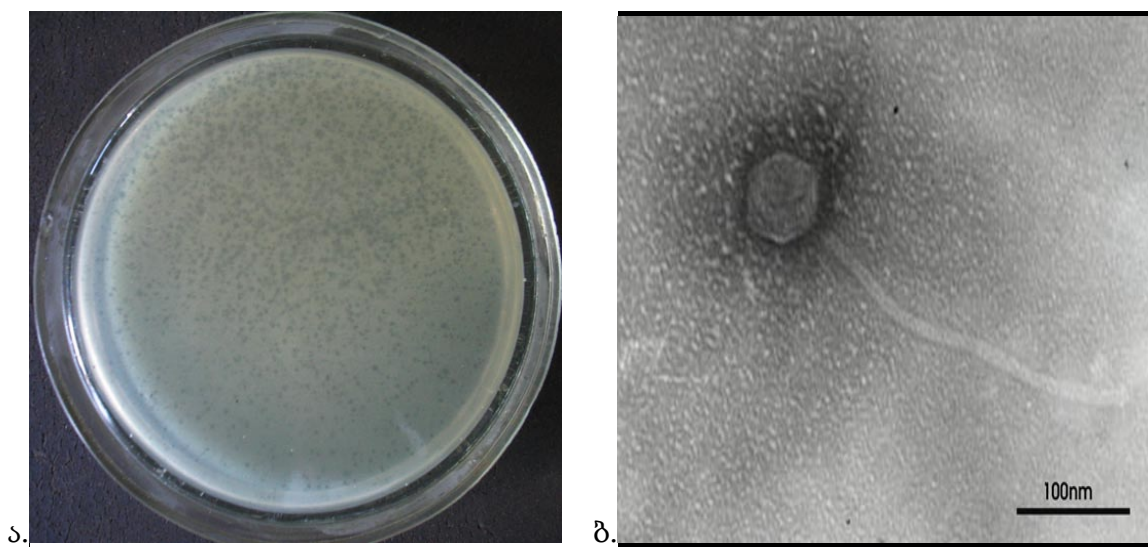
43.7 ნმ თავი და კუდი 175 ნმ (ილუსტრაცია 2). ტიტრი გრაციას მეთოდით შეადგენდა $1 \cdot 10^9$ ნაწ/მლ, ხოლო აპელმანის მიხედვით კი 10^{-6} ნაწ/მლ.

ილუსტრაცია 2: *vB_GEC_EFS_3* -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.



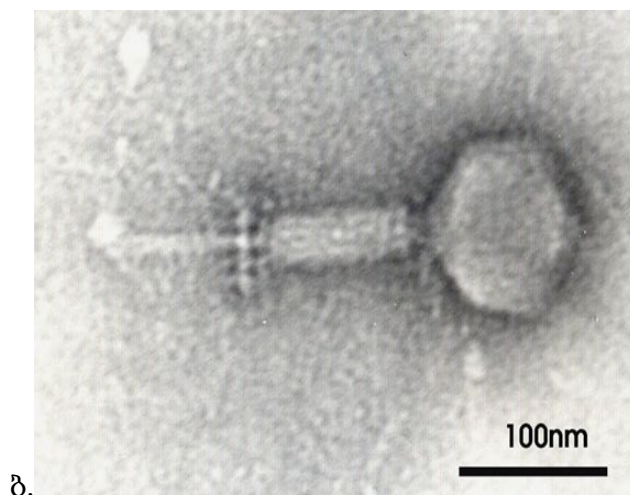
vB_GEC_EFS_4 ფაგისთვის დამახასიათებელია ნათელი, წვრილი ნეგატიური კოლონია. ელექტრონული მიკროსკოპის მიხედვით, ფაგი *Syphoviridae*-ს ოჯახს მიეკუთვნება (ილუსტრაცია 3).

ილუსტრაცია 3: *vB_GEC_EFS_4*-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.



vB_GEC_EFM_9 ფაგისთვის დამახასიათებელია წვრილი, ნათელი ნეგატიური კოლონიები. ელექტრონული მიკროსკოპით დადგინდა, რომ ის მიეკუთვნება *Myoviridae*-ს (ილუსტრაცია 4).

ილუსტრაცია 4: *vB_GEC_EFM_9* -ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონია; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია.

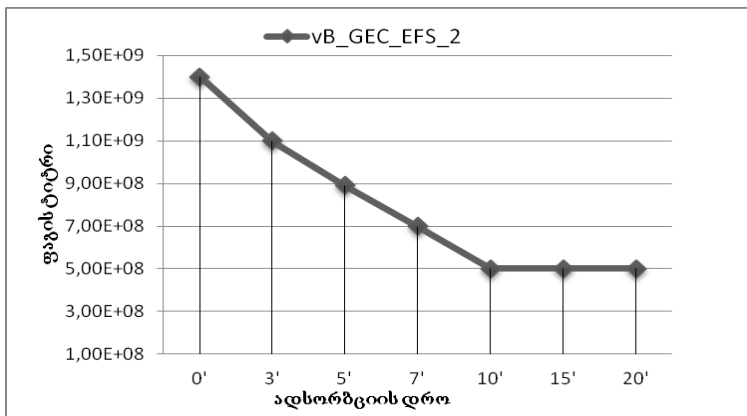


2.2 ბაქტერიოფაგების პატრონ უჯრედზე ადსორბცია და გამრავლების ერთჯერადი ციკლი

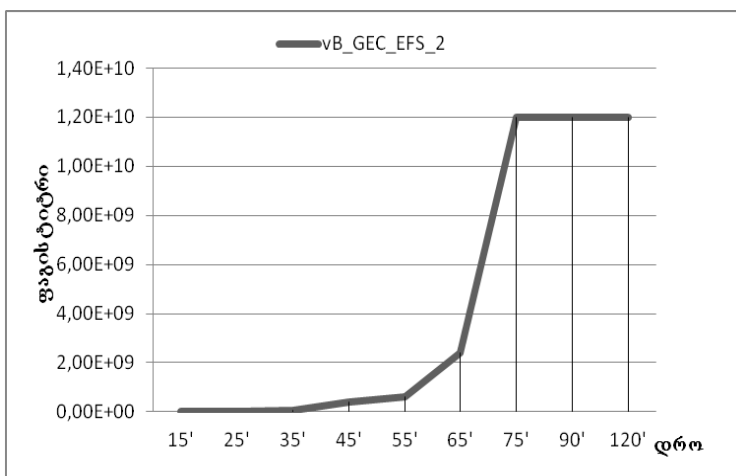
ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური მახასიათებლებიდან მნიშვნელოვანია ფაგის ადსორბცია და გამრავლების ერთჯერადი ციკლი. ფაგი *vB_GEC_EFS_2* -ის ადსორბციის დრო შეესაბამებოდა 10 წთ (90%), ფაგის ლატენტური პერიოდი შეადგენს 73 წთ-ს, ხოლო გამოსავლიანობა $122(\pm 25)$ ფაგურ ნაწილაკს (გრაფიკი 1).

გრაფიკი 1: *vB_GEC_EFS_2* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა.

ა. ადსორბცია



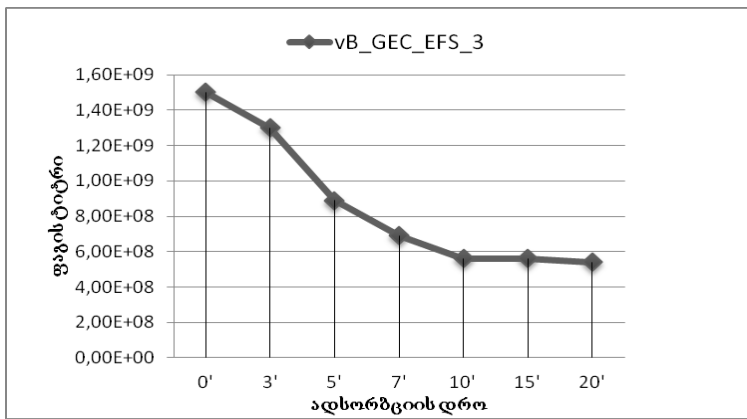
ბ, ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა



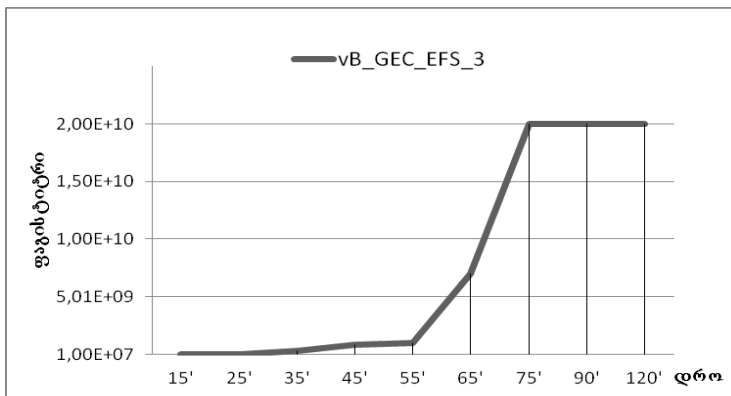
vB_GEC_EFS_3 ფაგისთვის ადსორბციის დრო 10 წთ (89%), ლატენტური პერიოდი 73 წუთი და გამოსავლიანობა -122 ფაგური ნაწილაკი (გრაფიკი 2).

გრაფიკი 2: *vB_GEC_EFS_3* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. ადსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა.

ა, ადსორბცია



ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა

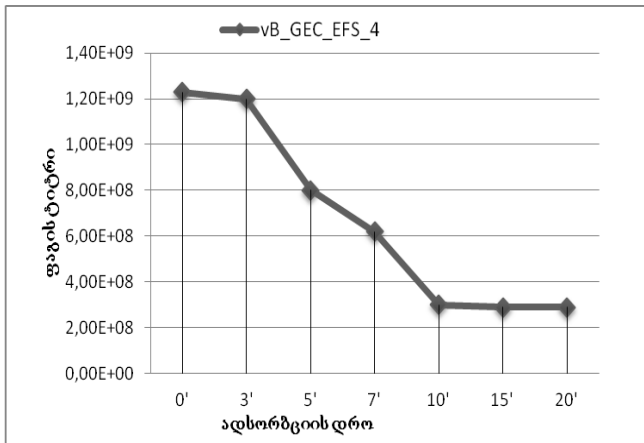


ერთჯერადი გამრავლების ციკლის შესწავლამ აჩვენა რომ *vB_GEC_EFS_4* -ის შემთხვევაში ფაგების 88,9% აღსორბირდებოდა 10 წუთში, ლატენტური პერიოდი კი შეადგენს 30 წუთს და ხასიათდებოდა მაღალი გამოსავლიანობით-155 ფაგური ნაწილაკი (გრაფიკი 3).

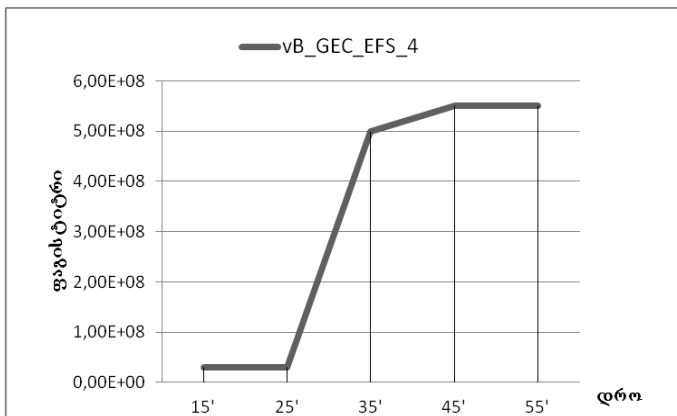
გრაფიკი 3: *vB_GEC_EFS_4* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი.

ა. აღსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა

ა. აღსორბცია;



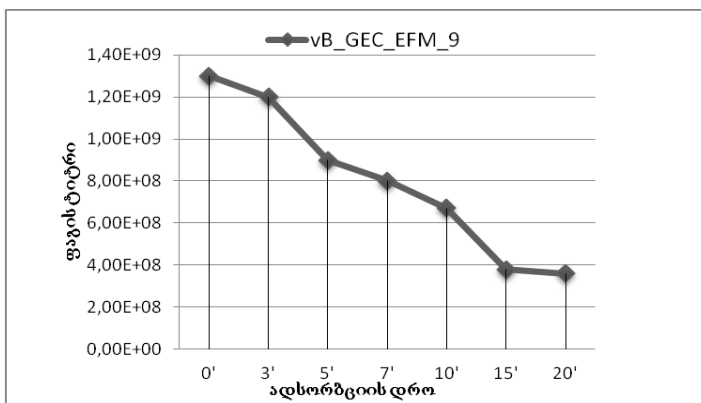
ბ, ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა



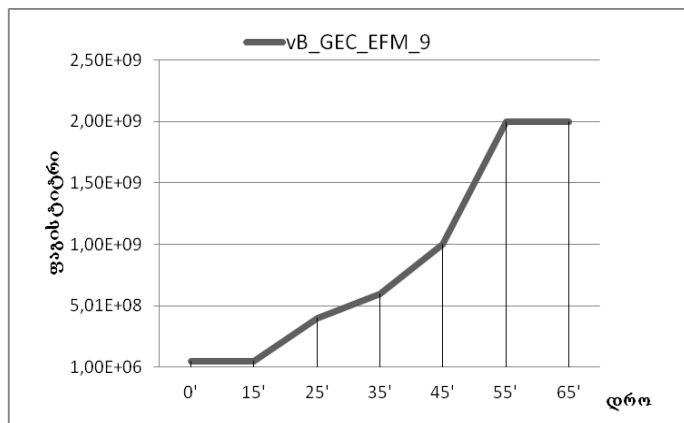
vB_GEC_EFM_9 ფაგის 89% აღსორბირდება 15 წუთის განმავლობაში, ლატენტური პერიოდი წარმოადგენს 45 წუთს და ეს ფაგი ხასიათდება მაღალი გამოსავლიანობით-222 ფაგური ნაწილაკი (გრაფიკი 4).

გრაფიკი 4: *vB_GEC_EFM_9* ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი. ა. აღსორბცია; ბ. ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა.

ა, აღსორბცია



ბ, ფაგის ლატენტური პერიოდი, გამოსავლიანობა



2.3 ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის განსაზღვრა სხვადასხვა ტემპერატურის, UV-ს და pH - ის პირობებში

სხვადასხვა ტემპერატურის, ულტრაიისფერი დასხივების და pH-ის პირობებში, ასევე ქიმიური ნივთიერებების ზემოქმედებისას ფაგის აქტივობის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ ქლოროფორმის დამატებისას *vB_GEC_EFS_2*-ის აქტივობა არ შეცვლილა. 45°C-ზე 24 საათის განმავლობაში *vB_GEC_EFS_2*-ის ტიტრმა დაიკლო 2 რიგით, ხოლო 65°C-ზე 24 საათის განმავლობაში ტიტრმა 4 რიგით დაიკლო. *vB_GEC_EFS_2* აღმოჩნდა გამძლე pH-ის სხვადასხვა პირობებში. pH= 5-11 ის ფარგლებში ფაგის აქტივობამ დაიკლო მხოლოდ ერთი რიგით 24 საათის განმავლობაში. pH=3-ზე კი ფაგი 24 საათში ინაქტივირდება. ულტრაიისფერი სხივებით დასხივების შედეგად ფაგი *vB_GEC_EFS_2* 40 წამის განმავლობაში ინარჩუნებდა ტიტრს, მაგრამ შემდეგ 60-180 წამის ფარგლებში საგრძნობლად იკლო და ინაქტივირდა.

vB_GEC_EFS_3 -ის აქტივობა არ იცვლება ქლოროფორმის ზემოქმედებისას. ასევე ეს ფაგი ხასიათდება გამძლეობით მაღალი ტემპერატურის პირობებში. UV-ს ზემოქმედების შედეგად ფაგი სრულად ინაქტივირდა 1 წუთის შემდეგ. pH= 5-11 ის ფარგლებში ფაგის ტიტრი სტაბილური იყო 24 საათის განმავლობაში, მაგრამ pH=3-ზე ფაგი მთლიანად კარგავს აქტივობას 24 საათში.

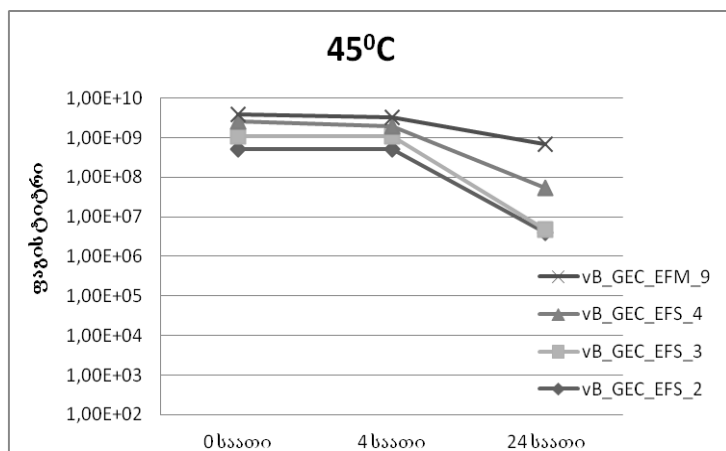
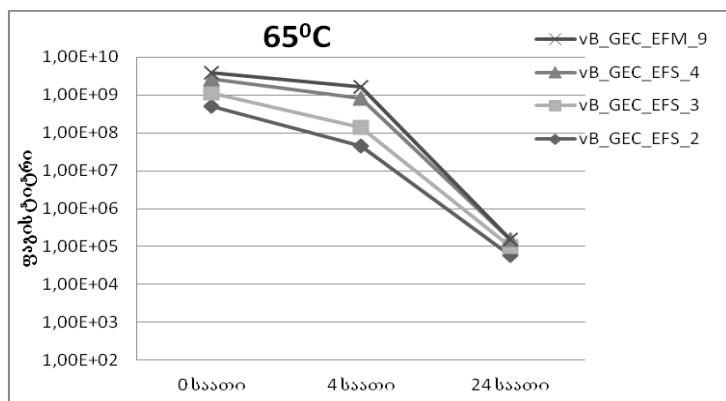
vB_GEC_EFS_4 -ის აქტივობა ასევე არ იცვლება ქლოროფორმის ზემოქმედებისას. ეს ფაგი ხასიათდება გამძლეობით მაღალი ტემპერატურის პირობებში. UV-ს ზემოქმედების შედეგად ფაგი ინაქტივირდა 2 წუთის შემდეგ. pH= 5-11 ის ფარგლებში ფაგის ტიტრი

სტაბილური იყო 24 საათის განმავლობაში, მაგრამ pH=3-ზე ფაგი მთლიანად კარგავს აქტივობას 24საათში.

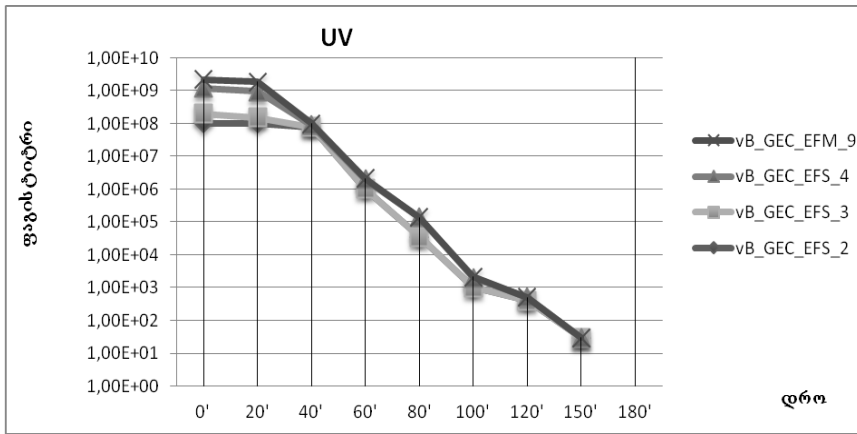
ფაგის სტაბილურობის ტესტმა აჩვენა, რომ *vB_GEC_EFM_9* რეზისტენტულია ქლოროფორმის მიმართ. ის ასევე მდგრადი აღმოჩნდა მაღალი ტემპერატურის მიმართ. კერძოდ, 45°C-ზე 24 საათის განმავლობაში ტიტრმა დაიკლო მხოლოდ 1 რიგით. 65°C-ზე კი ტიტრი დაეცა $1 \cdot 10^3$ ნაწ/მლ-მდე. pH=5-11-ის დიაპაზონში *vB_GEC_EFM_9* ინარჩუნებს აქტივობას, მაგრამ მკვეთრად იკლებს pH=3-ის დროს, სადაც 24 საათში ფაგის ტიტრი განისაზღვრა როგორც $1 \cdot 10^3$ ფაგური ნაწილაკი/მლ(ფ.ნ/მლ). *vB_GEC_EFM_9* ასევე მგრძნობიარე აღმოჩნდა ულტრაიისფერი სხივების მიმართ ფაგის ტიტრი 80 წამის შემდეგ დაეცა $1 \cdot 10^3$ ნაწ/მლ-მდე, ხოლო 2 წუთში სრულად ინაქტივირდა. (გრაფიკი 5).

გრაფიკი 5: ბაქტერიოფაგების სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურის (ა.) UV-ს(ბ.) და pH-ის (გ.) პირობებში.

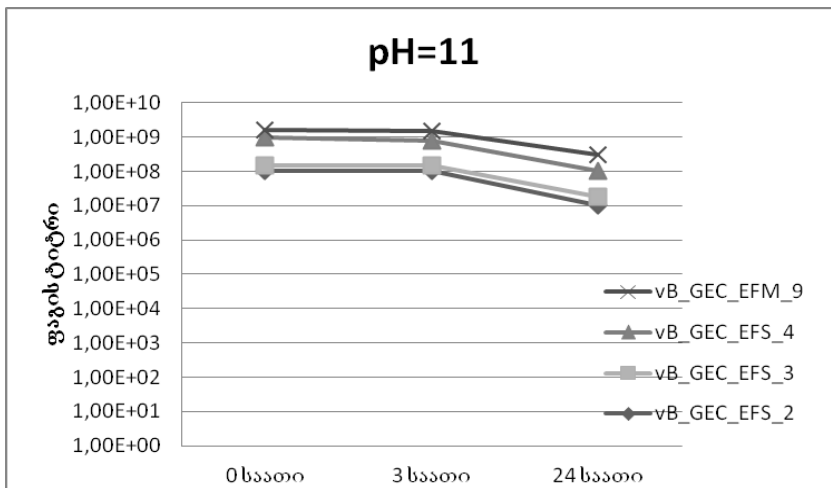
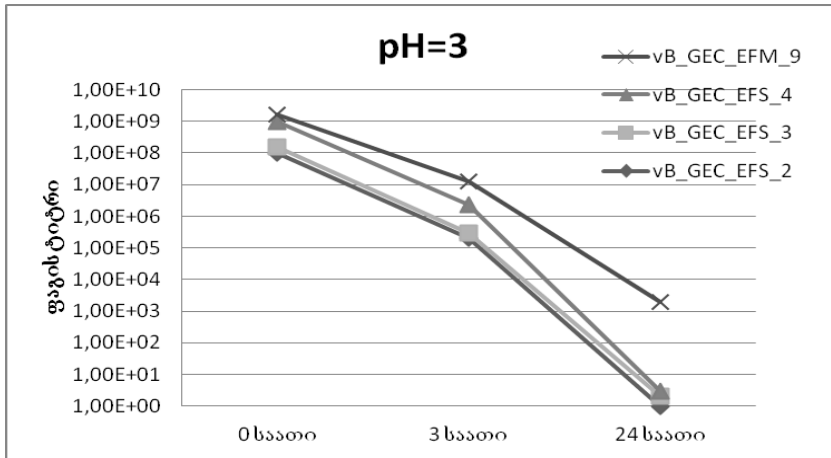
ა,



ბ,



ბ.

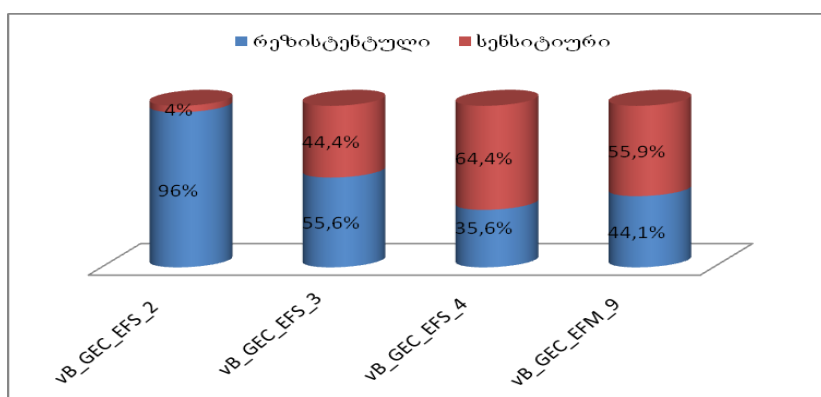


2.4 ბაქტერიოფაგების აქტივობის სპექტრის შესწავლა

ბაქტერიოფაგების მოქმედების დიაპაზონის შესასწავლად გამოვიყენეთ *Enterococcus faecalis*-ის 112, *Enterococcus faecium*-ის 127, *Enterococcus hirae* 58, *Enterococcus gallinarum* 20, *Enterococcus flavescens*-18, *Enterococcus* spp.-ის 325 და 60 სხვა გვარის წარმომადგენელი ბაქტერიული შტამი (10 *Staphylococcus aureus*, 20, *Staphylococcus epidermidis* 10, *E. coli*, 10 *Streptococcus* spp. 30).

ფაგის მოქმედების დიაპაზონის შესწავლამ აჩვენა, რომ მოცემულ კვლევაში გამოყენებული ენტეროკოკის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგები ვერ ახდენენ სხვა გვარის წარმომადგენელი ბაქტერიული შტამების ლიზისს. ხოლო კვლევაში გამოყენებული ენტეროკოკის 660 შტამზე მოქმედების შედეგების მიხედვით ფაგი *vB_GEC_EFS_2* აქტივობის სპექტრი განისაზღვრა 4 %-ით , ფაგი *vB_GEC_EFS_3*-ის აქტივობის სპექტრი განისაზღვრა 44,4%-ით, მოქმედების სპექტრის შესწავლამ აჩვენა, რომ ფაგი *vB_GEC_EFS_4* ფართო სპექტრის აქტივობით ხასიათდება მხოლოდ *Enterococcus*-ის გვარის წარმომადგენლების მიმართ; 660 ბაქტერიული შტამიდან ის 64,4 % ის ლიზისს ახდენს. ასევე ფაგი *vB_GEC_EFM_9* აქტიურია მხოლოდ *Enterococcus* მიმართ და არ მოქმედებს სხვა გვარის წარმომადგენლებზე (10 *Staphylococcus aureus*, 10 *E. coli*, 10 *Streptococcus* spp, 10 *Acinetobacter* spp, 10 *Proteus*). 660 შტამიდან ის ახდენს 420 -ის ლიზისს , რაც 63,6%-ს შეადგენს. (გრაფიკი 6).

გრაფიკი 6: *vB_GEC_EFS_2* , *vB_GEC_EFS_3*, *vB_GEC_EFS_4* და *vB_GEC_EFM_9* -ის მოქმედების დიაპაზონი



2.5 ბაქტერიოფაგების *vB_GEC_EFS_4* და *vB_GEC_EFM_9* სეროლოგიური დახასიათება

ფაგებს შორის სეროლოგიური ნათესაური კავშირის დასადგენად გამოყენებულ იქნა ნეიტრალიზაციის რეაქცია. იმუნიზაციისთვის შერჩეულ იქნა 2 ფაგი *vB_GEC_EFS_4* და *vB_GEC_EFM_9*.

ბოცვერების იმუნიზაციით მიღებულ იქნა ანტიფაგური შრატი და სტანდარტული ნეიტრალიზაციის რეაქციით შესწავლილ იქნა ფაგებს შორის სეროლოგიური ნათესაობის არსებობა. ბოცვერების იმუნიზაციის შედეგად მივიღეთ ორი ანტიფაგური შრატი: N1- *vB_GEC_EFS_4* და N2- *vB_GEC_EFM_9*. პირდაპირი ნეიტრალიზაციის კონსტანტა N2 ანტიფაგური შრატით ფაგი *vB_GEC_EFM_9* სთვის 5 წუთში იყო 284.6 და ნეიტრალიზაციის პროცენტი 94%. პირდაპირი ნეიტრალიზაციის კონსტანტა N1 ანტიფაგური შრატით ფაგი *vB_GEC_EFS_4* სთვის 10 წუთში იყო 295 და ნეიტრალიზაციის პროცენტი 95%. ჯვარედინი ნეიტრალიზაცია არ დადგინდა, რაც იმაზე მეტყველებს რომ ეს ფაგები სეროლოგიურად არ წარმოადგენენ მონათესავე ფაგებს.

2.6 ბაქტერიოფაგების გენეტიკური დახასიათება. *vB_GEC_EFS_2* და *vB_GEC_EFS_4* ფაგების მთლიანი გენომის სექვენსის ანალიზი

ფაგებს შორის გენეტიკური ნათესაური კავშირის დასადგენად გამოყენებულ იქნა ფაგების რესტრიქციული ანალიზი, რომელიც *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII*, *SpeI*, *NdeI*, *PstI* ფერმენტების საშუალებით ერთნაირ პირობებში იქნა ჩატარებული. რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით ფაგების დნმ სხვადასხვა ზომით დაიჭრა. რესტრიქციული ანალიზის შედეგად აღმოჩნდა, რომ ფაგი *vB_GEC_EFS_3* რეზისტენტული იყო *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*-ს მიმართ, ხოლო *vB_GEC_EFS_4* ფაგის დნმ-ი ავლენდა რეზისტენტობას *EcoRV*-ის მიმართ, რაც იმაზე მიუთითებს რომ მოცემული ბაქტერიოფაგების გენომები განსხვავებულია. მოვახდინეთ ფაგების *vB_GEC_EFS_2* და *vB_GEC_EFS_4* სრული სექვენსი და ანალიზი.

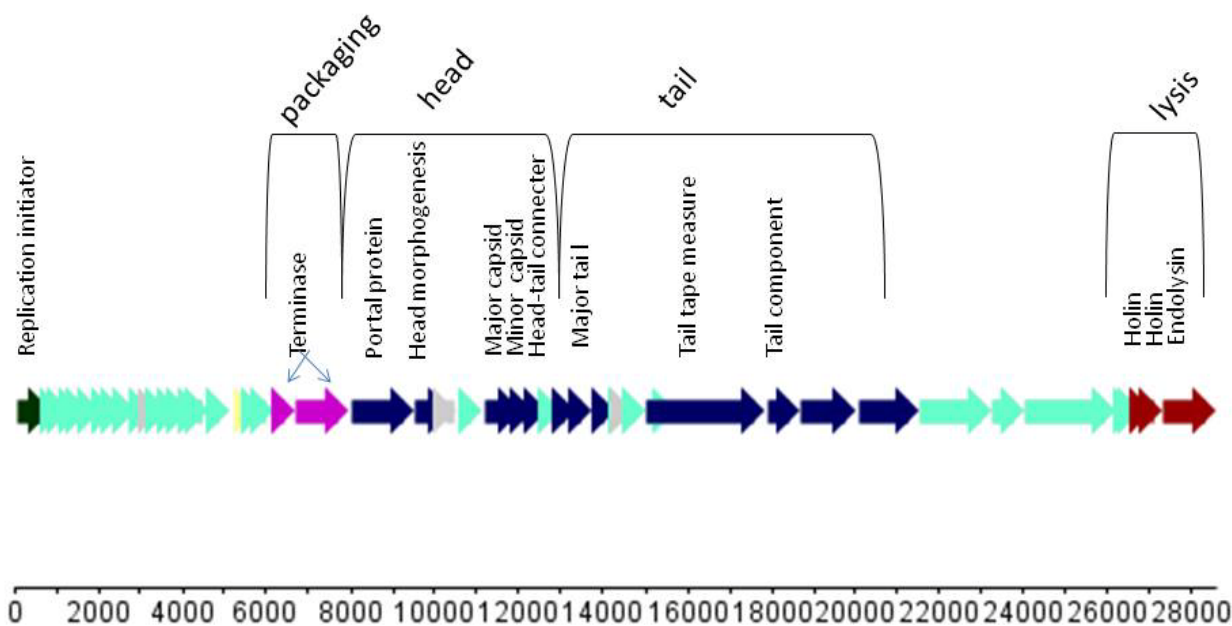
vB_GEC_EFS_2 ფაგის გენომის სეკვენირებული მასალის აწყობის შედეგად მივიღეთ 2 სხვადასხვა ზომის კონტიგი. თითოეულის ანალიზი დამოუკიდებლად განხორციელდა.

კონტიგი 1.- კონტიგი 1-ის ზომა არის 28606bp, შეიცავს 44 ღია წაკითხვის ჩარჩოს (ORF), 3 პრომოტორს და 1 ტერმინატორულ უბანს. G+C შემცველობა არის 38.19%.

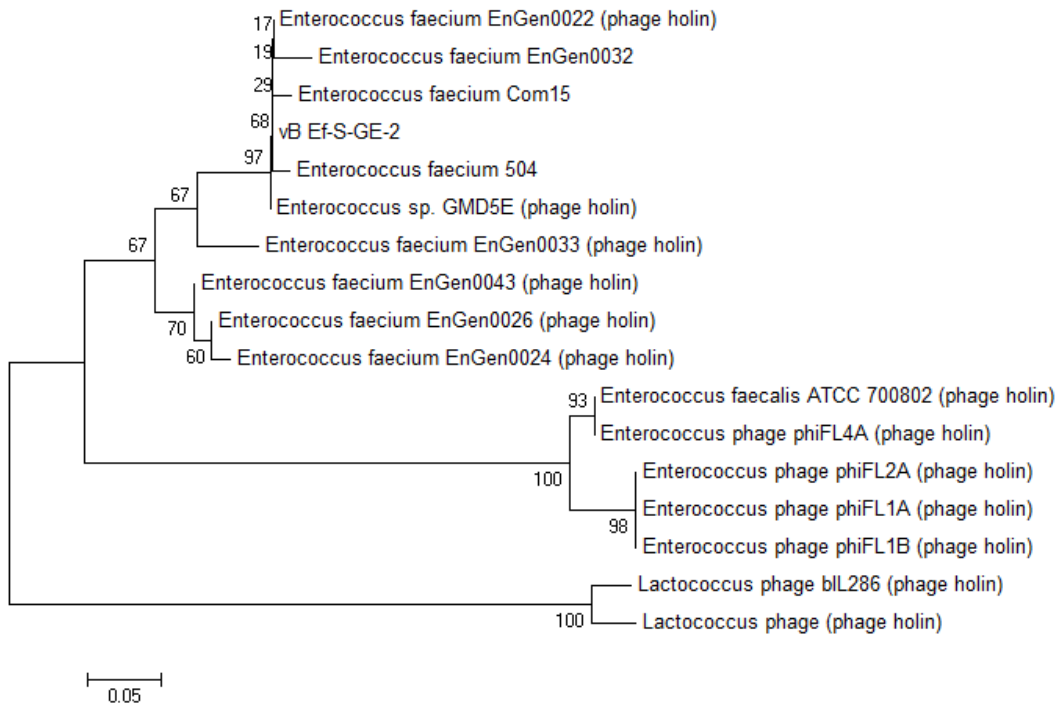
44 ORF-დან 3 მონაწილეობს პატრონი უჯრედის ლიზისში, 13 წარმოადგენს სტრუქტურულ გენს, 1 დნმ-ის რეპლიკაციის გენია და დანარჩენი 27 გენი კი აკოდირებს

სავარაუდო პროტეინებს, რომლის ფუნქცია ჯერ შეუსწავლეია (ცხრილი 2, ილუსტრაცია 5,6). 44-ვე გენი მსგავსია NCBI-ის ბაზაში მყოფი *Enterococcus faecium*-სხვადასხვა შტამის გენებისა.

ილუსტრაცია 5. *vB_GEC_EFS_2* კონტიგი1-ის გენეტიკური რუკა

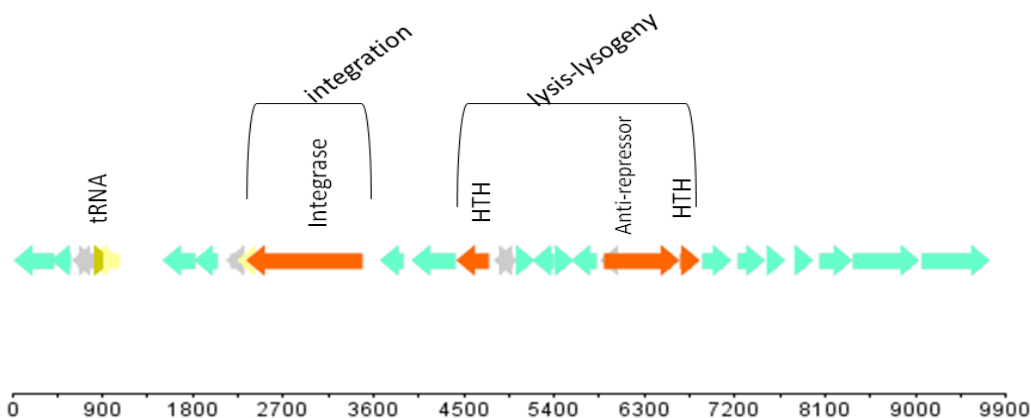


ილუსტრაცია 6. ფილოგენეტიკური ხე (ჰოლინის მაკოდირებული გენის მიხედვით)



კონტიგი 2.- კონტიგი 2-ის ზომა არის 9902bp, შეიცავს 21 ღია წაკითხვის ჩარჩოს, 6 პრომოტორს და 3 ტერმინატორულ უბანს. G+C შემცველობა არის 33,97%. 21 გენიდან, 1 გენი განსაზღვრავს ლიზოგენიას (ინტეგრაზა), 3 გენი არეგულირებს ლითიურ/ლიზისურ ციკლს, დანარჩენი გენები კი აკოდირებენ ცილებს რომელთა ფუნქციები ბოლომდე არ არის შესწავლილი და მოიხსენიებიან როგორც სავარაუდო პროტეინები (ილუსტრაცია 7).

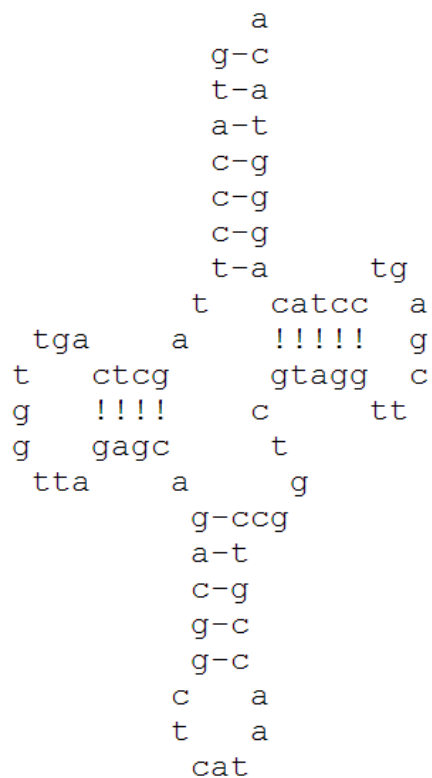
ილუსტრაცია 7. *vB_GEC_EFS_2* კონტიგი2-ის გენეტიკური რუკა



tRNAscan-SE 1.21 პროგრამის გამოყენებით დადგინდა რომ ფაგი *vB_GEC_EFS_2* -ის გენომი შეიცავს 1 სატრანსპორტო რნმ-ის გენს, რომელიც შეესაბამება tRNA-met (cat)-ს,

შედგება 74 ნუკლეოტიდური წყვილისგან სადაც G+C არის 54.1%. მეორეული სტრუქტურა გამოხატულია ილუსტრაცია 8-ზე:

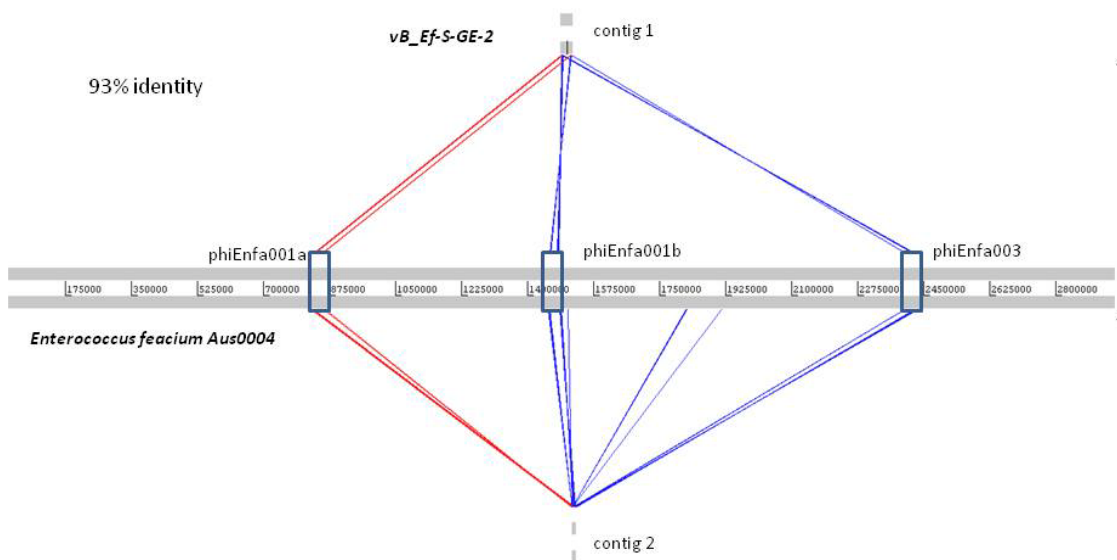
ილუსტრაცია 8. *vB_GEC_EFS_2* tRNA-met (cat)-ს მეორეული სტრუქტურა



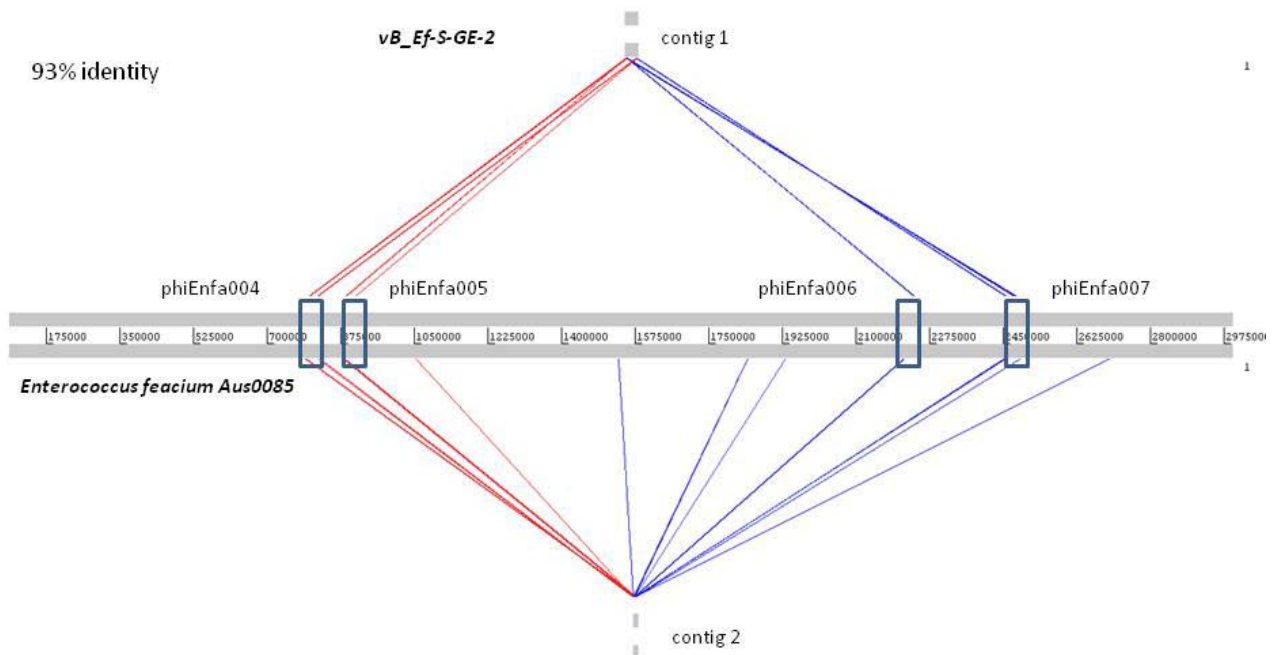
ფაგის გენომის შედარებამ NCBI-ის ბაზაში არსებულ სეკვენირებულ მასალასთან აჩვენა, რომ ორივე კონტიგი 94-95% მსგავსებას ავლენს *Enterococcus faecium*-ის რამდენიმე შტამის მცირე უბნებთან (10-17%) , სადაც E value= 0.0, რაც მსგავსების მაღალი მაჩვენებელია (ილუსტრაცია 9) (43,44,63).

ილუსტრაცია 9. *vB_GEC_EFS_2* გენომის მსგავსება NCBI ბაზაში არსებულ გენომთან

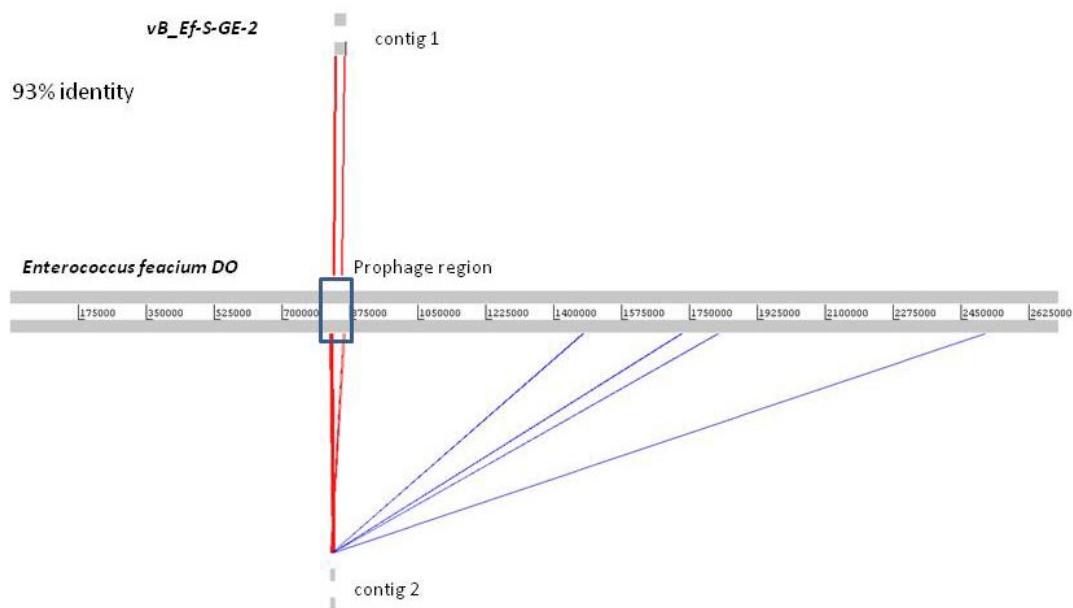
Enterococcus faecium ous0004



Enterococcus faecium aus0085

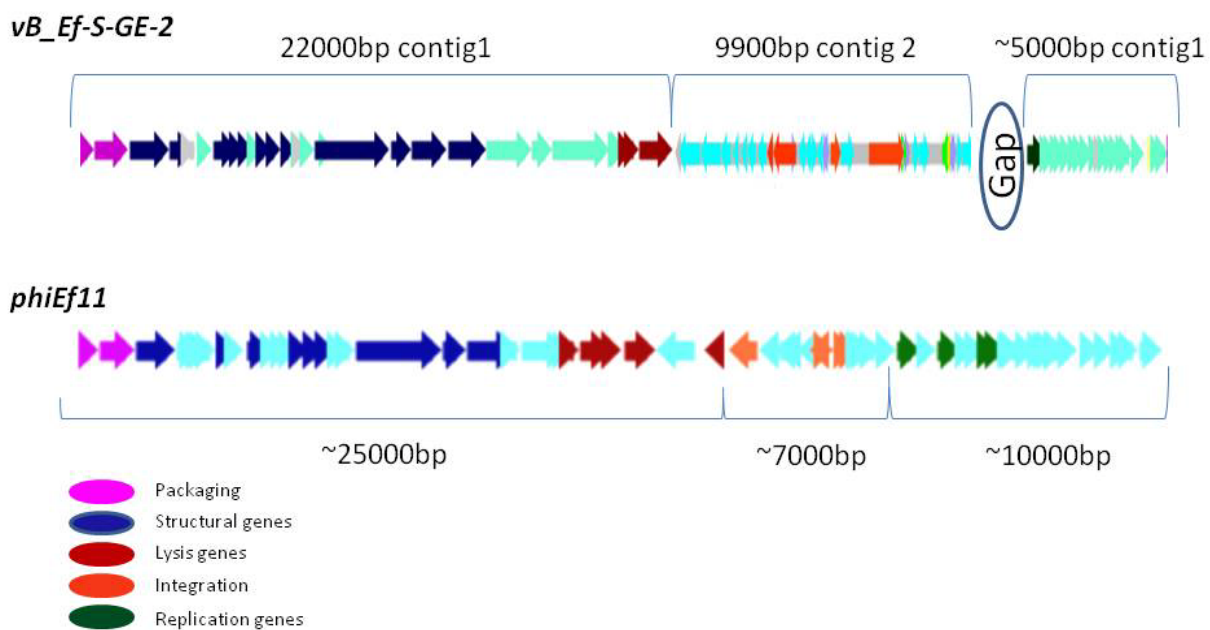


Enterococcus faecium DO



გენების განლაგების მიხედვით ფაგი *vB_GEC_EFS_2* მსგავსია *phiEf11* ფაგისა (69) (ილუსტრაცია 10).

ილუსტრაცია 10. *vB_GEC_EFS_2* და *phiEf11* გენომების მსგავსება



ფაგი *vB_GEC_EFS_2* -ის გენომის ფუნქციური ანალიზის შედეგები მოცემულია ცხრილში 2

ცხრილი 2. *vB_GEC_EFS_2* ფაგის გენომის სექვენსის ანოტაცია

ა, კონტიგი 1

ლი წაკითხვის ჩარჩო	მდებარეობა		სიგრძე (ფუძე)	ზომა (ამინ ომეა ვა)	პროდუქტი ცილა	NCBI მონაცემთა ბაზის ანალიზი			ცილების დომეინი		
	დასაწყისი...დ ასასრული	+/-				ფაგებისა და ბაქტერიების გენების პროდუქტის ჰომოლოგები	ბაზა	E value	სავარაუდო დომეინი	ბაზა	E value
Efph2_con1_1	88..900	+	813	270	phage replication initiation protein	Enterococcus faecium WP_002343406.1	Blastp	0.0			
Efph2_con1_2	912..1181	+	270	89	hypothetical protein	WP_010726894.1 Enterococcus faecium	Blastp	7e-55			
Efph2_con1_3	1186..1350	+	165	54	hypothetical protein	WP_002301521.1 Enterococcus	Blastp	6e-31			
Efph2_con1_4	1343..1645	+	303	100	hypothetical protein	WP_002338903.1 Enterococcus faecium	Blastp	6e-67			
Efph2_con1_5	1642.. 1803	+	162	53	hypothetical protein	WP_002301517.1 Enterococcus faecium	Blastp	2e-26			
Efph2_con1_6	1806.. 2105	+	300	99	hypothetical protein	WP_002322110.1 Enterococcus faecium	Blastp	2e-26			
Efph2_con1_7	2105.. 2422	+	318	105	Phage protein	WP_002342953.1 Enterococcus faecium	Blastp	4e-68	Protein of unknown function (DUF1140)	pfam	4.8e-49
Efph2_con1_8	2419.. 2637	+	219	72	hypothetical protein	WP_005874789.1 Enterococcus faecium	Blastp	6e-26			
Efph2_con1_9	2650.. 2931	+	282	93	hypothetical protein	WP_016176560.1 Enterococcus durans	Blastp	1e-60			
Efph2_con1_1 0	2928..3326	+	399	132	phage conserved hypothetical protein TIGR01671	WP_002322116.1 Enterococcus faecium	Blastp	1e-84	YopX protein domain	pfam	4.4e-20
Efph2_con1_1 1	3522..3716	+	195	64	hypothetical protein	WP_002318209.1 Enterococcus faecium	Blastp	3e-36			
Efph2_con1_1	3747..3977	+	231	76	hypothetical protein	WP_002343501.1	Blastp	3e-46			

2						Enterococcus faecium					
Efph2_con1_1 3	3984..4187	+	204	67	Toxin PIN	WP_002309099.1 Enterococcus faecium	Blastp	3e-36			
Efph2_con1_1 4	4184..4483	+	300	99	hypothetical protein	WP_010726029.1 Enterococcus faecium	Blastp	7e-67			
Efph2_con1_1 5	4473..4631	+	159	52	hypothetical protein	WP_002318682.1	Blastp	4e-28			
Efph2_con1_1 6	4726..5139	+	414	137	ArpU family phage transcriptional regulator	WP_016922447.1 Enterococcus faecium	Blastp	3e-93	ArpU family	prodom	9e-05
									transmembrane_regions [72..92]	TMHMM	-1.0
Efph2_con1_1 7	5833..5994	+	162	54	Hypothetical protein	WP_002323920.1 Enterococcus faecium	Blastp	5e-28			
Efph2_con1_1 8	5994..6218	+	225	74	Hypothetical protein	WP_002372679.1	Blastp	7e-46			
Efph2_con1_1 9	6244..6699	+	456	151	terminase small subunit	WP_002311445.1 Enterococcus faecium	Blastp	2e-104	terminase small subunit (Terminase 2 family)	pfam	8.7e-26
Efph2_con1_2 0	6689..7990	+	1302	433	phage terminase large subunit	WP_010730522.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0	phage terminase large subunit (Terminase 3 family)	pfam	2.7e-101
Efph2_con1_2 1	8003..9502	+	1500	499	SPP1 family phage portal protein	WP_010723676.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0	phage portal protein, SPP1 Gp6-like	pfam	7.4e-91
Efph2_con1_2 2	9507..10433	+	927	308	Phage_Mu_F family phage head morphogenesis protein	WP_010723677.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0	Phage Mu protein F like protein	pfam	2.2e-14
Efph2_con1_2 3	10560..11162	+	603	200	DUF4355 family hypothetical protein	WP_002322712.1 Enterococcus	Blastp	5e-140	DUF (domain of unknown function) 4355	pfam	4.3e-27
Efph2_con1_2 4	11175..12098	+	924	307	phage major capsid protein	WP_002330281.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0	Capsid protein	pfam	3.8e-38
Efph2_con1_2 5	12116..12379	+	264	87	Big_2 domain Minor capsid protein	WP_002323699.1 Enterococcus faecium	Blastp	6e-50	Bacterial Ig-like domain (2)	pfam	3.1e-6

									Minor capsid protein (lactobacillus phage ATCC) EMBL: AFU63014.1	HMME R	2.6e-6
Efph2_con1_2 6	12391..1272 0	+	330	109	phage gp6-like head- tail connector protein	WP_002333304.1 Enterococcus faecium	Blastp	4e-71	phage gp6-like head-tail connector protein	pfam	1.6e-9
Efph2_con1_2 7	12717..1304 3	+	327	108	hypothetical protein	WP_002333305.1 Enterococcus faecium	Blastp	3e-71			
Efph2_con1_2 8	13027..1336 5	+	339	112	HK97 gp10 family phage tail component protein	WP_010722880.1 Enterococcus faecium	Blastp	2e-76	HK97 gp10 family phage tail component protein	pfam	2.2e-11
Efph2_con1_2 9	13365..1375 7	+	393	130	DUF3168 family phage capsid and scaffold protein	WP_002343456.1 Enterococcus faecium	Blastp	4e-90	DUF3168 family	pfam	1.0e-12
									phage capsid and scaffold protein	HMME R	2.7e-81
Efph2_con1_3 0	13768..1428 0	+	513	170	TP901-1 family phage major tail protein	WP_010731247.1 Enterococcus faecium	Blastp	8e-117	phage major tail protein	pfam	8.4e-25
Efph2_con1_3 1	14325..1469 3	+	369	122	DUF3647 family phage protein	WP_002293018.1 Enterococcus faecium	Blastp	7e-79	DUF3647 family phage protein	pfam	1.6e-26
Efph2_con1_3 2	14774..1503 4	+	261	86	phage protein	WP_002293019.1 Enterococcus faecium	Blastp	1e-55			
Efph2_con1_3 3	15051..1787 3	+	2823	940	phage tail tape measure protein, TP901 family	WP_002323931.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0	Phage-related minor tail protein	pfam	5.5e56
									Transmembrane regions [391-411] [441-463]	TMHM M	-1.0 -1.0
Efph2_con1_3 4	17906..1867 3	+	768	255	Sipho_tail family phage tail component protein	WP_002375465.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0	Sipho_tail family phage tail protein	pfam	2.8e-23
Efph2_con1_3 5	18670..2003 7	+	1368	455	phage minor structural protein	WP_002337190.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0	put_anti_recept: phage minor structural protein, N	TIFRFA Ms	5.9e-39
Efph2_con1_3	20090..2150	+	1413	470	peptidase family M23	WP_002337190.1	Blastp	0.0	peptidase family M23	pfam	6.4e-28

6	2				phage minor structural protein, partial	Enterococcus faecium					
Efph2_con1_37	21516..23261	+	1746	581	hypothetical protein	WP_002323706.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0			
Efph2_con1_38	23274..24032	+	759	252	hypothetical protein	WP_002323707.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0			
Efph2_con1_39	24048..26213	+	2166	721	DUF2479 family hypothetical protein	WP_002323708.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0	DUF2479 family	pfam	1.9e-19
Efph2_con1_40	26225..26671	+	447	148	hypothetical protein	YP_005354046.1 Enterococcus faecium Aus0004	Blastp	1e-99			
Efph2_con1_41	26673..26810	+	138	45	Phage_XkdX family hypothetical protein	WP_002290625.1 Enterococcus	Blastp	5e-24	Phage_XkdX family	pfam	1.8e-18
Efph2_con1_42	26846..27088	+	243	80	XhlA family phage holin	WP_002342098.1 Enterococcus faecium	Blastp	2e-44	XhlA family	pfam	4e-21
Efph2_con1_43	27104..27301	+	198	65	putative holing	WP_002319084.1 Enterococcus faecium	Blastp	8e-37			
Efph2_con1_44	27312..28589	+	1278	425	Endolysin	WP_010722467.1 Enterococcus faecium	Blastp	0.0	Glycosyl hydrolases family 25 [32-216]	pfam	3.5e-37
									LysM domain [331-374]		5.2e-15
									LysM domain [383-423]		3.5e-14
									Transmembrane-regions [1-25]	TMHMM	-1.0

ბ, კონტიგი 2

ლია წაკითხვის ჩარჩო	მდებარეობა		პროდუქტი ცილა	NCBI მონაცემთა ბაზის ანალიზი			ცილების დომეინი		
	დასაწყისი...დ ასასრული	+/-		ფაგებისა და ბაქტერიების გენების პროდუქტის ჰომოლოგიები	ბაზა	E value	სავარაუდო დომეინი	ბაზა	E value
Efph2_con2_1	complement (32..415)	-	hypothetical protein	WP_016627840.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	2e-84			
Efph2_con2_2	complement (406..579)	-	hypothetical protein	WP_016627840.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	1e-25	Transmembrane-regions [29-47]	TMHM M	-1.0
Efph2_con2_3	complement (1516..1821)	-	hypothetical protein	WP_002323244.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	2e-63			
Efph2_con2_4	complement (1821..2051)		hypothetical protein	WP_002302745.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	4e-46			
Efph2_con2_5	complement (2347..3495)	-	Phage integrase	WP_002311406.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	0.0	Phage integrase family	pfam	7.7e-33
Efph2_con2_6	complement (3668..3898)	-	hypothetical protein	WP_002346879.1 [Enterococcus]	Blastp	5e-44	Signal-peptide [1-50] Transmembrane-regions [27-47] [53-71]	SIGNAL P TMHM M	-1.0 -1.0
Efph2_con2_7	complement (3986..4408)	-	DUF955 family hypothetical protein	WP_002290613.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	5e-96	DUF955	pfam	4.3e-10
Efph2_con2_8	complement (4426..4746)	-	HTH3 family DNA-binding protein; repressor	WP_008266657.1 [Enterococcus]	Blastp	7e-71	Helix turn helix 3	pfam	1.9e-06
Efph2_con2_9	5046..5204	+	hypothetical protein	WP_002315390.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	2e-25			
Efph2_con2_10	complement (5201..5389)	-	predicted protein with zinc-ribbon domain	WP_002311412.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	4e-33	Zinc-ribbon 3 family	pfam	1.5e-05

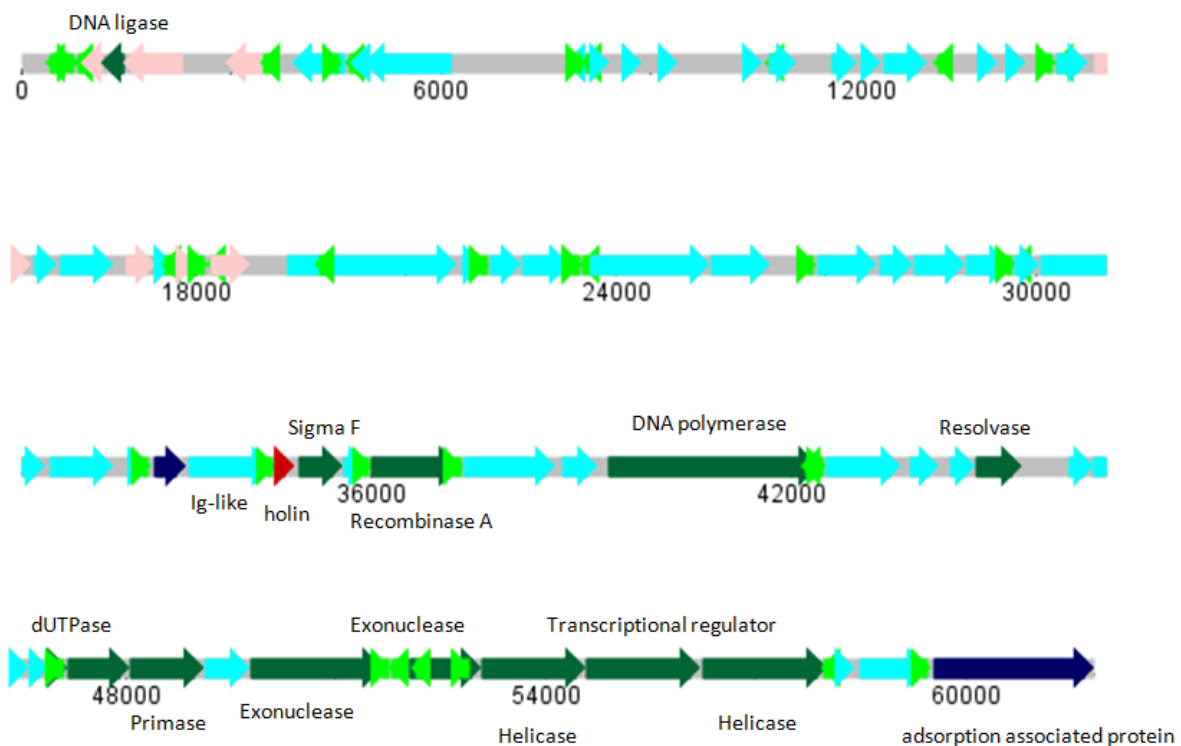
Efph2_con2_1 1	5440..5595	+	hypothetical protein	WP_002311413.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	5e-27			
Efph2_con2_1 2	complement (5576..5827)	-	hypothetical protein	WP_002311414.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	3e-52			
Efph2_con2_1 3	5903..6649	+	bro family anti- repressor protein	WP_002346878.1	Blastp	0.0	Bro-N family; ANT family	pfam	2.4e-24 2e-34
Efph2_con2_1 4	6664..6867	+	helix-turn-helix domain protein	YP_005354005.1 [Enterococcus faecium Aus0004]	Blastp	8e-39	HTH 3 family	pfam	2.7e-05
Efph2_con2_1 5	6882..7181	+	hypothetical protein	WP_002311418.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	7e-67			
Efph2_con2_1 6	7229..7513	+	hypothetical protein	WP_002311419.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	6e-60			
Efph2_con2_1 7	7534..7722	+	hypothetical protein	WP_002311421.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	4e-33			
Efph2_con2_1 8	7861..7989	+	hypothetical protein	WP_002322004.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	3e-20			
Efph2_con2_1 9	8045..8386	+	hypothetical protein	WP_002368894.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	1e-76			
Efph2_con2_2 0	8379..9050	+	DUF1071 family hypothetical protein	WP_010777089.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	2e-163	DUF 1071 family	pfam	3.5e-64
Efph2_con2_2 1	9056..9742	+	DUF968 family hypothetical protein	WP_002340819.1 [Enterococcus faecium]	Blastp	2e-164	DUF 968 family	pfam	1e-32

vB_GEC_EFS_4 ფაგის გენომის სეკვენირებული მასალის აწყობის შედეგად მივიღეთ 8 სხვადასხვა ზომის კონტიგი. თითოეულის ანალიზი დამოუკიდებლად განხორციელდა.

კონტიგი 1.

შედგება 61845bp ნუკლეოტიდური წყვილისაგან, სადაც C+G-ის შემცველობა არის 35.35%, მოიცავს 85 ღია წაკითხვის ჩარჩოს, ინტერგენული უბნებიდან იდენტიფიცირდა 18 პრომოტორული და 9 ტერმინატორული უბანი. 85 ORFs-დან 17 ORFs მონაწილეობს დნმ-ის რეპლიკაციის რეგულაციაში. კონტიგი 1 ასევე მოიცავს ჰოლინს და ფაგის კუდის სტრუქტურული ცილის მაკოდირებელ გენს (ილუსტრაცია 11) 85 ღია წაკითხვის ჩარჩოდან 54 ავლენს მსგავსებას phiEF24C ფაგის შესაბამის გენებთან (ცხრილი 3).

ილუსტრაცია 11. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი1-ის გენეტიკური რუკა



ცხრილი 3. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 1-ის ანოტაცია

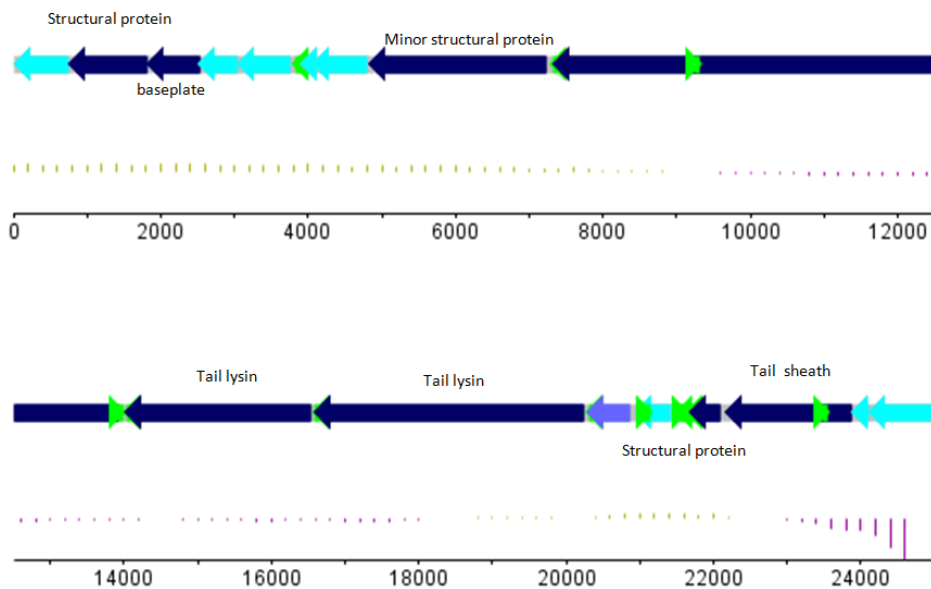
ლი წაკითხვის ჩარჩო	მდებარეობა		პროდუქტი ცილა	NCBI მონაცემთა ბაზის ანალიზი			ცილის დომეინი		
	დასაწყისი...დასასრული	+/-		ფაგებისა და ბაქტერიების გენების პროდუქტის ჰომოლოგიები	ბაზა	E value	სავარაუდო დომეინი	ბაზა	E value
Efph4_con1_03	880..1158	+	putative transcriptional regulator, HTH_3 family	YP_006877653.1 Streptomyces venezuelae ATCC 10712	pBLAS T	1e-05	Helix-turn-helix family	pfam	1.6e-13
Efph4_con1_04	1162..1476	+	NAD-dependent DNA ligase	YP_004306904.1 Streptococcus phage Dp-1	pBLAS T	5e-08			
Efph4_con1_11	4909..6153	+	tRNA-splicing ligase RtcB	WP_010746235.1 Enterococcus raffinosus	pBLAS T	2e-142	RtcB family	pfam	2.5e-95
Efph4_con1_38	Complement (17459..17707)	-	transcriptional regulator	YP_001504198.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	4e-13	Helix-turn-helix family	pfam	2.9e-12
Efph4_con1_58	Complement (33396..34592)	-	Ig-like protein	YP_001504177.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	2e-97	Bacterial Ig-like domain 2 family	pfam	4.2e-17
Efph4_con1_59	Complement (34642..34920)	-	Phage holin	YP_001504176.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	3e-55	holin	pfam	7.4e-18
Efph4_con1_60	Complement (34988..35605)	-	sigma factor	YP_001504175.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	2e-113			
Efph4_con1_62	Complement (36015..37262)	-	recombinase A	YP_001504173.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0	RecA family	pfam	1.6e-34
Efph4_con1_65	Complement (39385..42411)	-	DNA polymerase	YP_001504170.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0	DNA polymerase family A	pfam	2.8e-80
Efph4_con1_69	Complement (44641..45318)	-	putative resolvase	YP_001504165.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	2e-117			
Efph4_con1_71	Complement (46321..46632)	-	putative phosphotransferase/anion transport protein	YP_001504163.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	2e-10			
Efph4_con1_73	Complement (46934..47170)	-	dUTPase	YP_001504161.1	pBLAS T	6e-6			
Efph4_con1_74	Complement (47170..48051)	-	dUTPase family protein	YP_001504160.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	2e-105			
Efph4_con1_75	Complement (48061..49116)	-	putative primase	YP_001504158.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	3e-175	CHC2 zinc finger [24-78] Toprim domain [243-327]	pfam	3.8e-07 1.7e-07
Efph4_con1_77	Complement	-	putative exonuclease	YP_001504156.1 Enterococcus	pBLAS	0.0	AAA domain		1.1e-12

	(49793..51685)			phage phiEF24C	T				
Efph4_con1_79	Complement (52058..53098)	-	putative exonuclease	YP_001504155.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0	Metallophos 2 family	pfam	4e-09
Efph4_con1_80	Complement (53098..54570)	-	putative helicase	YP_001504154.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0	AAA25 family	pfam	3.7e-13
Efph4_con1_81	Complement (54584..56227)	-	putative transcriptional regulator	YP_001504153.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0			
Efph4_con1_82	Complement (56243..58018)	-	putative helicase	YP_001504152.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0	Helicase conservec C terminal domain	pfam	1.1e-12
Efph4_con1_85	Complement (59539..61845)	-	adsorption associated tail protein	YP_001504150.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0			

კონტიგი 2.

შედგება 25052 ნუკლეოტიდური წყვილისაგან, სადაც C+G-ის შემცველობა არის 37,71 %, მოიცავს 17ღია წაკითხვის ჩარჩოს, ინტერგენული უბნებიდან იდენტიფიცირდა 2 პრომოტორული და 6 ტერმინატორული უბანი. 17 ღწმ-დან 10ღწმ(გაშიფრე) წარმოადგენს სტრუქტურული ცილების მაკოდირებელ გენებს (ცხრილი 4, ილუსტრაცია 12), დანარენი 7 კი აკოდირებს სავარაუდო ცილებს რომელთა ფუნქციები ჯერ არ არის შესწავლილი. 17ღწმ მსგავსია phiEF24C შესაბამისი გენების. კონტიგი 2-ის გენომის რუკაზე მოცემულია გენების განლაგება.

ილუსტრაცია 12. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი2-ის გენეტიკური რუკა



ცხრილი 4. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 2-ის ანოტაცია

ღია წაკითხვის ჩარჩო	მდებარეობა		პროდუქტი ცილა	NCBI მონაცემთა ბაზის ანალიზი			ცილის დომეინი		
	დასაწყისი... დასასრული	+/-		ფაგებისა და ბაქტერიების გენების პროდუქტის ჰომოლოგები	ბაზა	E value	სავარაუდო დომეინი	ბაზა	E value
Efph4_con2_02	Complement (756..1808)	-	putative baseplate J-like protein	YP_001504147.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBL AST	0.0	baseplate J family	pfam	8.6e-22
Efph4_con2_03	Complement (1823..2527)	-	putative baseplate	YP_001504146.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBL AST	4e-144			
Efph4_con2_08	Complement (4817..7231)	-	putative minor structural siphovirus protein	YP_001504141.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBL AST	0.0	Siphovirus proteins DUF859	pfam	1e-19
Efph4_con2_09	Complement (7320..13925)	-	putative tail fiber	YP_001504140.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBL AST	0.0			
Efph4_con2_10	Complement (14024..16540)	-	putative tail lysin	YP_001504139.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBL AST	0.0	NLPC P60 family	pfam	2.4e-14
Efph4_con2_11	Complement (16590..20246)	-	putative tail lysin	YP_001504138.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBL AST	0.0			
Efph4_con2_12	Complement (20294..20875)	-	putative RNA polymerase	YP_001504137.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBL AST	1e-105			
Efph4_con2_14	Complement (21672..22094)	-	structural protein	YP_001504133.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBL AST	3e-95			
Efph4_con2_15	Complement (22160..23869)	-	putative tail sheath protein	YP_001504132.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBL AST	0.0	Phage tail sheath 1	pfam	1.4e-17

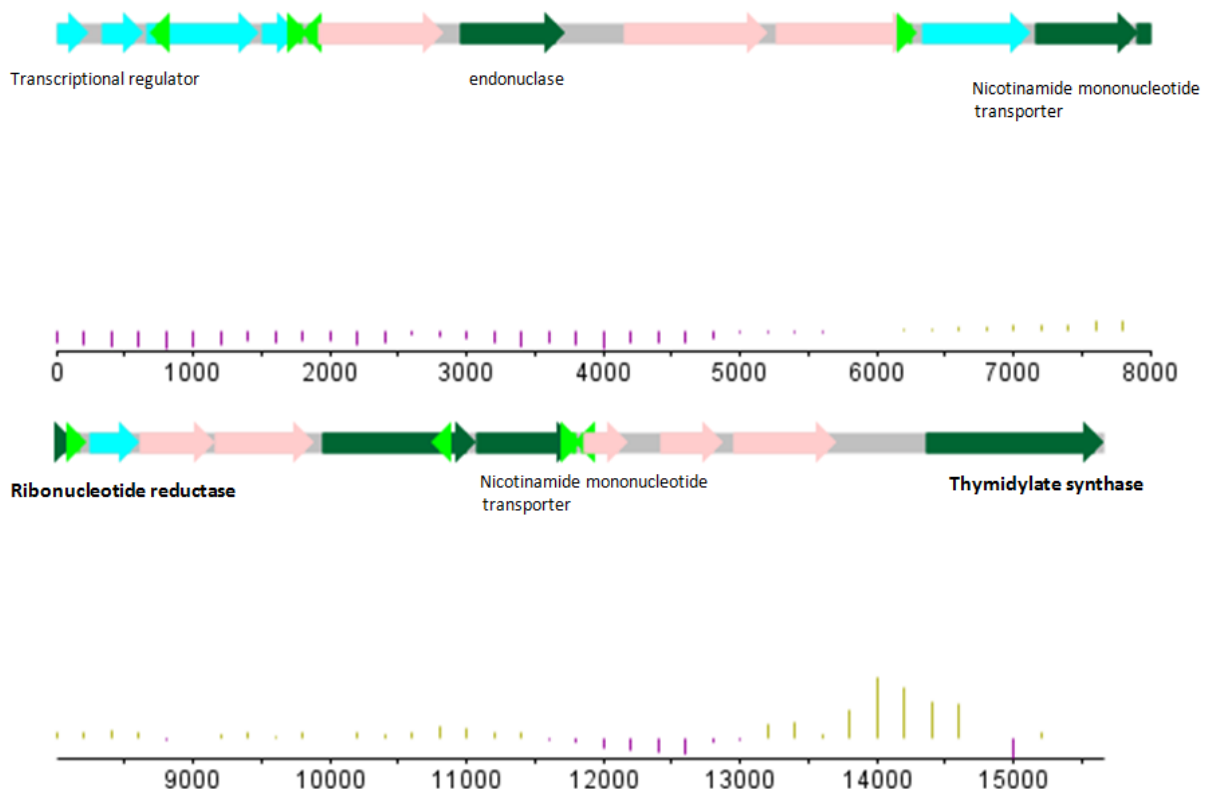
კონტიგი 4 და 5.

კონტიგი 4 შედგება 15661 ნუკლეოტიდური წყვილისაგან, რომელშიც G+C არის 36.23%, იდენტიფიცირდა 20 ღწ, 3 პრომოტორული და 3 ტერმინატორული უბანი.

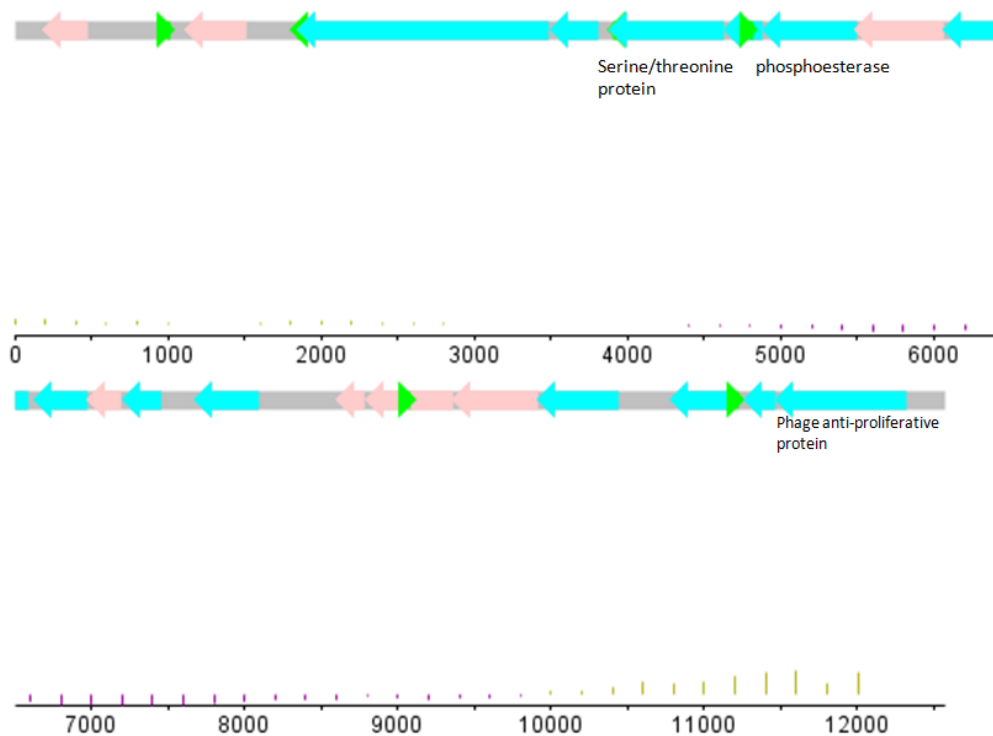
კონტიგი 5 შედგება 12568 ნუკლეოტიდური წყვილისაგან, სადაც G+C არის 36.83%, განისაზღვრა 22 ღწ, 2 პრომოტორული და 2 ტერმინატორული უბანი.

კონტიგ 4-ისა და 5-ის გენების ფუნქციური შესწავლისას ინახა რომ 42 ღწ-დან 13-ია მსგავსი phiEF24C შესაბამისი გენების. გენები რომელთა ფუნქციის გაშიფვრა მოხერხდა ბიოინფორმატიკული ანალიზის საფუძველზე მოცემულია ცხრილში (ცხრილი 5, 6), ხოლო გენების განლაგება გრაფიკულად გამოსახულია რუკაზე (ილუსტრაცია 13,14).

ილუსტრაცია 13. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 4-ის გენეტიკური რუკა



ილუსტრაცია 14. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 5-ის გენეტიკური რუკა



ცხრილი 5. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 4-ის ანოტაცია

ღია წაკითხვის ჩარჩო	მდებარეობა		პროდუქტი ცილა	NCBI მონაცემთა ბაზის ანალიზი			ცილის დომეინი		
	დასაწყისი... დასასრული	+/-		ფაგებისა და ბაქტერიების გენების პროდუქტის ჰომოლოგიები	ბაზა	E value	სავარაუდო დომეინი	ბაზა	E value
Efph4_con4_01	2..238	+	putative transcriptional regulator, with HTH domain	YP_001504322.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	1e-20	HTH19 family	pfam	1.2e-09
Efph4_con4_05	1925..2836	+	ribonucleoside-triphosphate reductase large subunit	YP_007924204.1 Streptococcus oligofermentans AS 1.3089	pBLAS T	3e-116	ATP core domain	pfam	1e-15
Efph4_con4_06	2952..3728	+	putative SegB homing endonuclease	YP_006488736.1 Enterococcus phage BC-611	pBLAS T	3e-17	GIY-YIG catalytic domain	pfam	1.6e-13
Efph4_con4_07	4159..5211	+	ribonucleoside-triphosphate reductase	WP_002411317.1 Enterococcus faecalis	pBLAS T	0.0	NRDD family	pfam	7.9e-45
Efph4_con4_09	6335..7132	+	deoxyguanosine kinase	YP_001469049.1 Lactococcus phage KSY1	pBLAS T	5e-80	deoxyguanosine kinase	pfam	2.2e-23
Efph4_con4_10	7158..7916	+	nicotinamide mononucleotide transporter	AFU63136.1 Lactobacillus phage ATCC 8014-B2	pBLAS T	8e-80	NMN transporter	pfam	5.2e-30
Efph4_con4_11	7909..8148	+	ribonucleotide reductase	YP_001504319.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	6e-18	Glutaredoxin	pfam	1e-11
Efph4_con4_15	9950..11077	+	nicotinamide-nucleotide adenyllyltransferase with AAA domain	YP_003164790.1 Leptotrichia buccalis C-1013-b	pBLAS T	3e-118	AAA28 family	pfam	9.3e29
Efph4_con4_16	11079..11822	+	nicotinamide mononucleotide transporter	WP_010201521.1 Psychrobacter sp. PAMC 21119	pBLAS T	2e-32	NMN transporter family	pfam	1.1e-12
Efph4_con4_18	12418..12885	+	DNA mismatch repair protein MutT	WP_016853214.1 Enterococcus faecium	pBLAS T	3e-04			
Efph4_con4_20	14362..15660	+	putative thymidylate	YP_001504312.1	pBLAS	6e-44	Thymidylate synthase	pfam	5e-47

			synthase	Enterococcus phage phiEF24C	T		(დნმ-ის სინთეზი)		
--	--	--	----------	--------------------------------	---	--	------------------	--	--

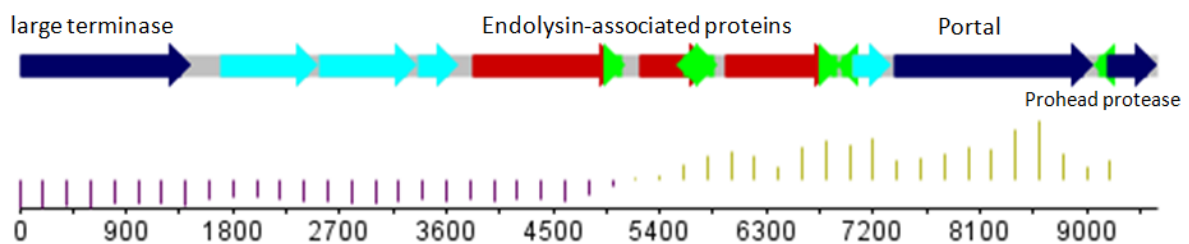
ცხრილი 6. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 5-ის ანოტაცია

ლია წაკითხვის ჩარჩო	მდებარეობა		პროდუქტი ცილა	NCBI მონაცემთა ბაზის ანალიზი			ცილის დომეინი		
	დასაწყისი... დასასრული	+/-		ფაგებისა და ბაქტერიების გენების პროდუქტის ჰომოლოგები	ბაზა	E value	სავარაუდო დომეინი	ბაზა	E value
Efph4_con5_07	Complement (3887..4627)	-	putative serine/threonine protein	YP_001504287.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	2e-102	Metallophos family	pfam	8e-12
Efph4_con5_09	Complement (4881..5489)	-	putative phosphoesterase	YP_001504290.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	5e-68	Metallophos 2 family	pfam	8.3e-09
Efph4_con5_10	Complement (5486..6061)	-	putative hydrolase	WP_008532665.1 Rhizobium sp. Pop5	pBLAS T	2e-18			
Efph4_con5_22	Complement (11464..12321)	-	putative anti- proliferative protein	YP_001504316.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0	Band 7 family	pfam	9.8e-24

კონტიგი 6

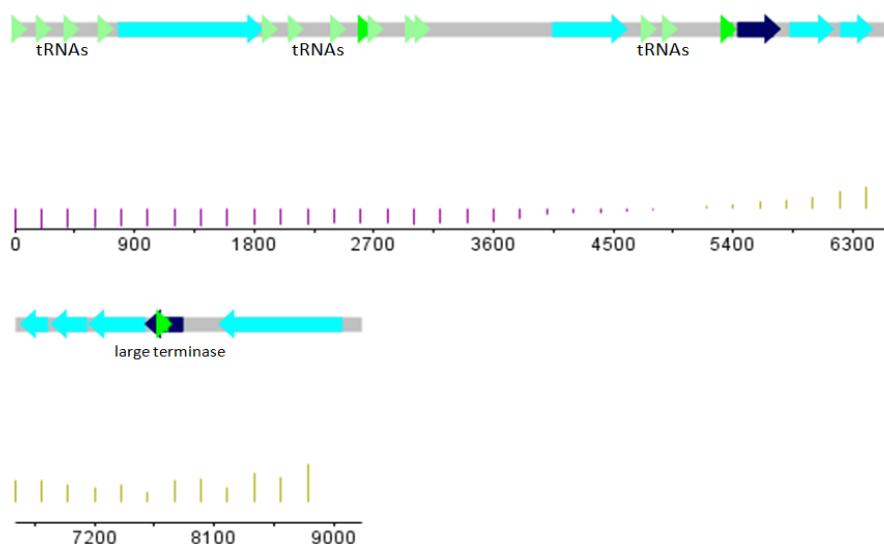
შედგება 9602 ნუკლეოტიდური წყვილისაგან სადაც GC - 37,48% და ბიოინფორმატიკულმა ანალიზმა აჩვენა რომ მოიცავს 10 ღია წაკითხვის ჩარჩოს, 3 პრომოტორულ და 2 ტერმინატორულ უბანს. 10ღწმ-დან მნიშვნელოვანია ტერმინაზა, პატრონი უჯრედის ლიზისში მონაწილე ენდოლიზინის მაკოდირებელი გენი და ასევე 2 სტრუქტურული გენი (ცხრილი 7, ილუსტრაცია 15). 10 ღწმ დან 9 ავლენს მსგავსებას phiEF24C შესაბამის გენებთან.

ილუსტრაცია 15. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 6-ის გენეტიკური რუკა



კონტიგი 7 შედგება 9215 ნუკლეოტიდური წყვილისაგან, შეიცავს 10 ღია წაკითხვის ჩარჩოს, 6 პრომოტორულ და 1 ტერმინატორულ უბანს, 12 სატრანსპორტო რნმ-ს. ციტოზინისა და გუანინის პროცენტული შემცველობა არის 37.39%. 10 ღწმ-დან მნიშვნელოვანია ტერმინაზას მაკოდირებელი გენი და სტრუქტურული გენი (ცხრილი 7, ილუსტრაცია 16)

ილუსტრაცია 16. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 7-ის გენეტიკური რუკა



კონტიგი 7 შეიცავს შემდეგ 12 სატრანსპორტო რნმ (tRNA):

1. tRNA-Arg(acg)- 73 ფუძე, %GC = 43.8; 2. tRNA-Lys(ttt)- 77 ფუძე, %GC = 53.2; 3. tRNA-Lys(ctt)- 76 ფუძე, %GC = 48.7; 4. tRNA-Thr(tgt)-72 ფუძე, %GC = 45.8; 5. tRNA-Phe(gaa)- 74 ფუძე, %GC = 52.7; 6. tRNA-Cys(gca)- 73 ფუძე, %GC = 53.4; 7. tRNA-Trp(cca)-74 ფუძე, %GC = 58.1; 8. tRNA-Met(cat)-74 ფუძე, %GC = 48.6; 9. tRNA-Glu(ttc)-74 ფუძე, %GC = 54.1; 10. tRNA-Asp(gtc)-77 ფუძე, %GC = 54.5; 11. tRNA-Gln(ttg)-74 ფუძე, %GC = 51.4; 12. tRNA-Asn(gtt)-73 ფუძე, %GC = 43.8.

ცხრილი 7. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 6 , 7 და 9-ის ანოტაცია

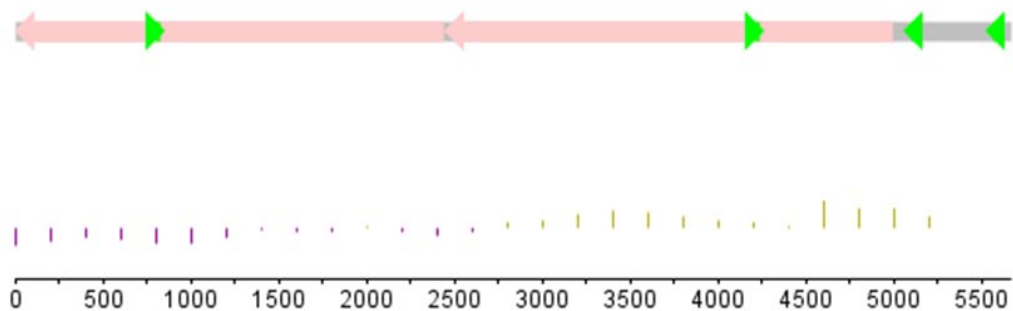
ღია წაკითხვის ჩარჩო	მდებარეობა		პროდუქტი ცილა	NCBI მონაცემთა ბაზის ანალიზი			ცილის დომეინი		
	დასაწყისი... დასასრული	+/-		ფაგების და ბაქტერიების გენების პროდუქტის ჰომოლოგიები	ბაზა	E value	სავარაუდო დომეინი	ბაზა	E value
Efph4_con6_01	3..1448	+	putative large terminase	YP_001504114.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0	Terminase GpA family	pfam	2.4e-18
Efph4_con6_05	3821..5077		putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	YP_001504118.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	7e-113	Amidase 2 family	pfam	6.5e-21
Efph4_con6_06	5235..5843	+	peptidoglycan-binding LysM	YP_001504119.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	6e-66	LysM family	pfam	5.8e-08
Efph4_con6_07	5947..6891	+	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	AAT01859.1 Enterococcus sp. phage 1	pBLAS T	0.0	Amidase 5 family	pfam	1.2e-61
Efph4_con6_09	7382..9070		putative portal protein	YP_001504121.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	0.0	Phage portal protein	pfam	8.4e-23
Efph4_con6_10	9170..960		putative prohead protease	YP_001504123.1 Enterococcus phage phiEF24C	pBLAS T	1e-83			

ღია წაკითხვის ჩარჩო	მდებარეობა		პროდუქტი ცილა	NCBI მონაცემთა ბაზის ანალიზი			ცილის დომეინი		
	დასაწყისი... დასასრული	+/-		ფაგების და ბაქტერიების გენების პროდუქტის ჰომოლოგიები	ბაზა	E value	სავარაუდო დომეინი	ბაზა	E value
Efph4_con7_03	Complement (5427..5765)	-	structural protein	YP_001504328.1		1e-15			

				Enterococcus phage phiEF24C					
Efph4_con7_09	7583..7870	+	putative large terminase	YP_001504113.1 Enterococcus phage phiEF24C		6e-53			
Efph4_con9_01	Complement (1..1152)	-	adsorption associated tail protein	YP_001504150.1 Enterococcus phage phiEF24C		0.0			
Efph4_con9_02	Complement (1169..1714)	-	structural protein	YP_001504149.1 Enterococcus phage phiEF24C		1e-92			

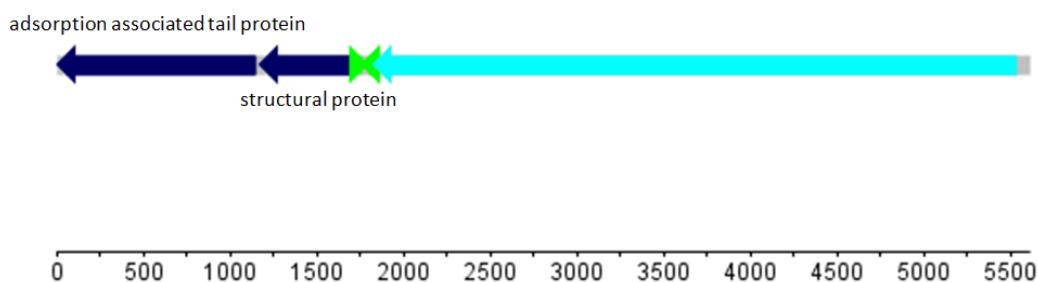
კონტიგი 8 შედგება 5674 ნუკლეოტიდური წყვილისაგან, მოიცავს 3 ღია წაკითხვის ჩარჩოს, 1 ტერმინატორულ და 1 პრომოტორულ უბანს, ციტოზინის და გუანინის შემცველობაა 37.34%. 3 ღწჩ აკოდირებს ჰიპოთეტიკულ პროტეინებს, რომელთა ფუნქციები ჯერ შეუსწავლელია (ილუსტრაცია 17).

ილუსტრაცია 17. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 8-ის გენეტიკური რუკა



კონტიგი 9 შედგება 5613 ნუკლეოტიდური წყვილისაგან, სადაც C+G არის 36.82%, ბიოინფორმატიკულმა ანალიზმა აჩვენა რომ შეიცავს 3 ღია წაკითხვის ჩარჩოს და 2 ტერმინატორულ უბანს (ცხრილი 7, ილუსტრაცია 18).

ილუსტრაცია 18. *vB_GEC_EFS_4* კონტიგი 9-ის გენეტიკური რუკა

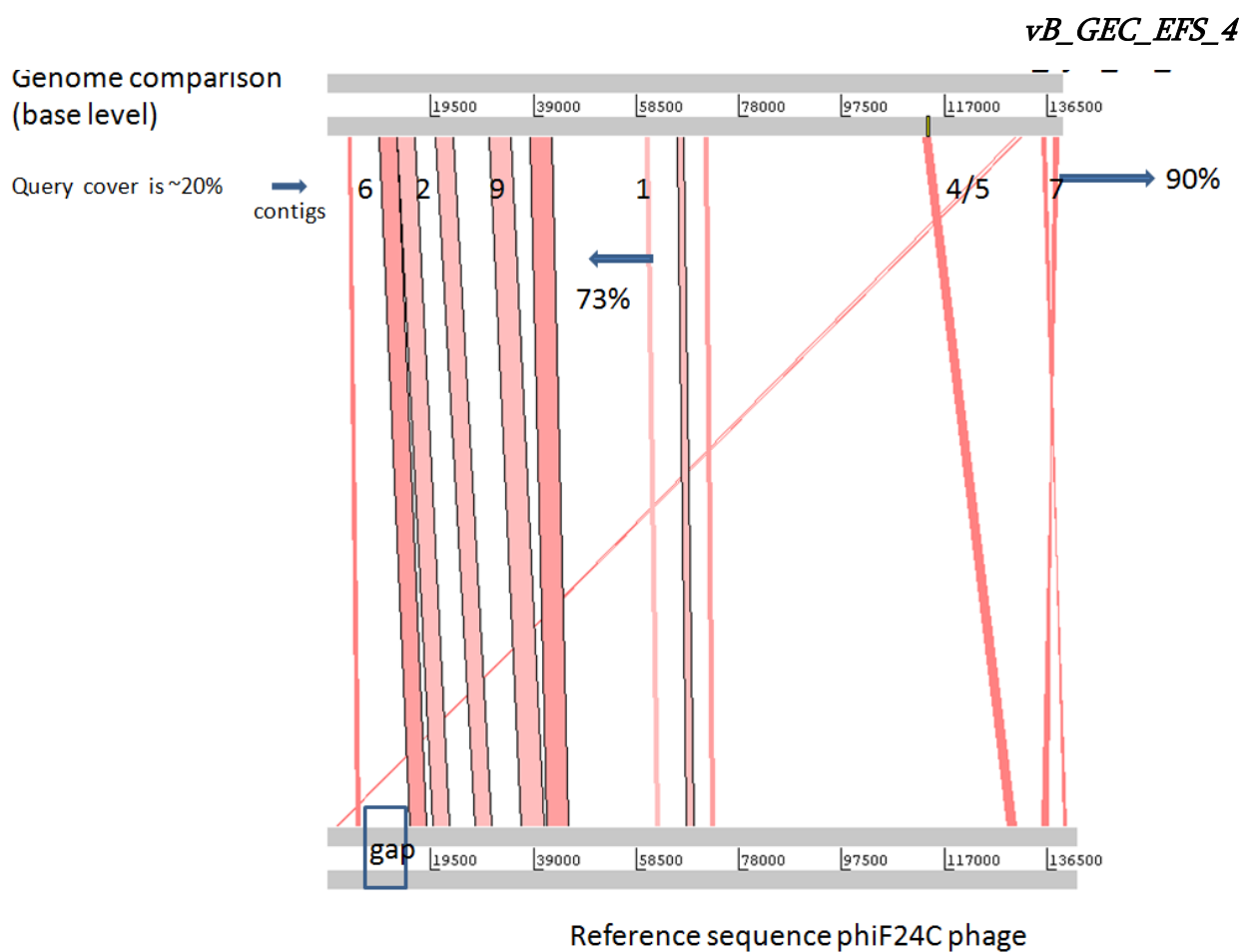


ფაგი *vB_GEC_EFS_4*-ის გენომის 145230 ნუკლეოტიდური წყვილის თანმიმდევრობის შესწავლამ აჩვენა, რომ ეს ფაგი შეიცავს სულ 170 ღია წაკითხვის ჩარჩოს, რომელთაგან 103 ღწჩ მსგავსია ენტეროკოკის უკვე დახასიათებული ფაგის phiEF24C შესაბამისი გენებისა. ფაგი *vB_GEC_EFS_4*-ს და ფაგი phiEF24C გენომების

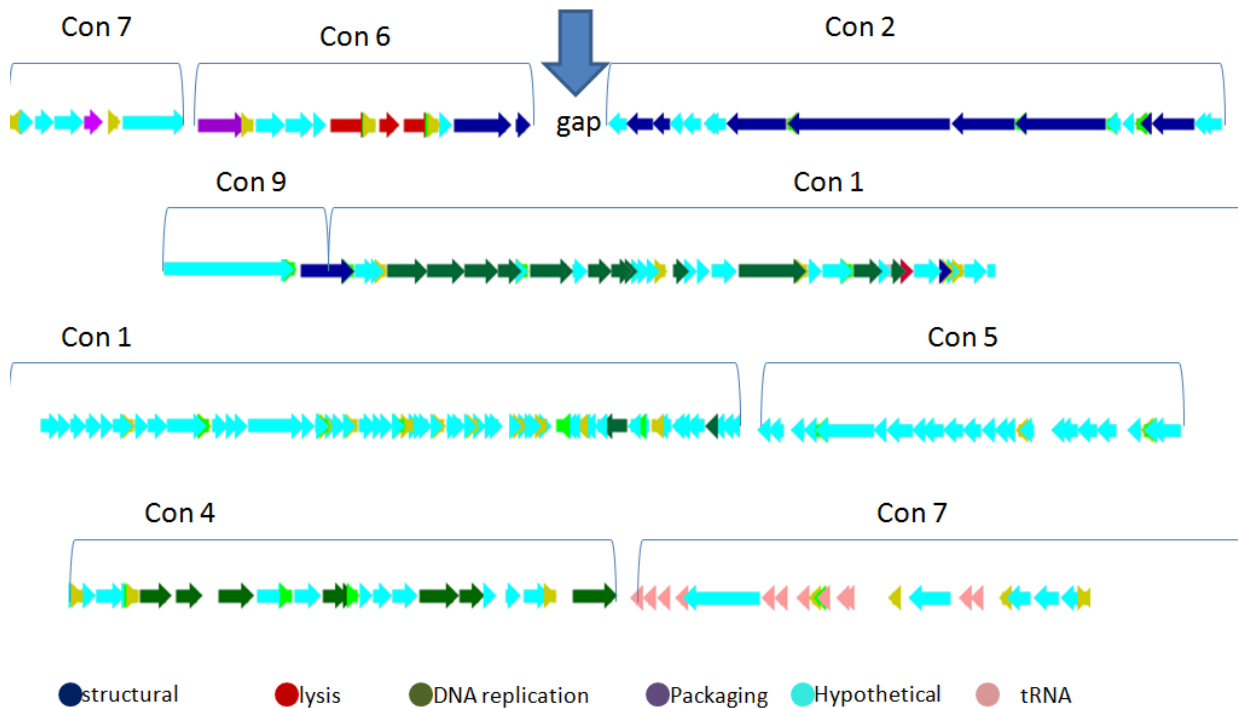
შედარებამ აჩვენა, რომ ნუკლეოტიდების დონეზე მათი მსგავსება ფარავს მხოლოდ 20%-ს და ამ 20%-ში მსგავსება გამოიხატება >90% -ით (77).

Artemis Act პროგრამის საშუალებით შესაძლებელი გახდა გვეჩვენა ფაგი *vB_GEC_EFS_4* -ის გენომის სავარაუდო აგებულება და კონტიგების სავარაუდო განლაგება (ილუსტრაცია 19, 20).

ილუსტრაცია 19. ფაგი *vB_GEC_EFS_4*-ს და ფაგი phiEF24C შედარებითი მსგავსება ნუკლეოტიდურ დონეზე



ილუსტრაცია 20. ფაგი *vB_GEC_EFS_4*-ის გენომის სავარაუდო აგებულება



2.7 ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ მოდელზე

ექსპერიმენტში პირველი და მეორე ჯგუფი წარმოადგენდა საკონტროლო ჯგუფს - ამ ჯგუფში მოხდა 5 მლ *Enterococcus faecium* 14 და *Enterococcus faecalis* 31 ბაქტერიული შტამების ინტრაპერიტონალური შეყვანა (5×10^8 უჯრ/მლ). მეორე დღისთვის ორივე ჯგუფის ცხოველებში უკვე ადვილი შესამჩნევი იყო ანთებით პროცესის მიმდინარეობა, აღინიშნა დაჩირქება, კუჭ-ნაწლავის ფუნქციის დარღვევა, რაც მიუთითებს ინფექციის განვითარებაზე და არა კოლონიზაციაზე. ამ ჯგუფში არ ხდებოდა არც ფაგის და არც მიკრობის შეყვანა და მიმდინარეობდა ზოგადი დაკვირვება.

ფეკალურ მასაში კულტურის ტიტრი 5×10^8 უჯრ/მლ იყო, კლება ხდებოდა საკმაოდ ნელა მაგრამ თანმიმდევრულად (5×10^8 დან 5×10^3 მდე ჩამოვიდა მე-14 დღეს თერაპიულ ჯგუფებში). ფაგი ფეკალურ მასებში გამოჩნდა მხოლოდ შეყვანიდან 3

დღეს როგორც IV, ასევე V თერაპიულ ჯგუფში და ფაგის ტიტრი $5 \cdot 10^3$ დან– 10^5 მდე ავიდა (გრაფიკი 7).

ასევე ინფიცირებიდან მე-7 და მე-14 დღეს ავიღეთ სისხლი, რომლიდანაც დამზადდა შრავი, რომელიც ინაქტივირდა 56°C . მომზადდა სადიაგნოსტიკო შესაბამისი პრეპარატები–ერიტროციტარული დიაგნოსტიკუმი. ცხვრის ერიტროციტების სასენსიბილიზაციოდ გამოყენებულ იქნა 1) *Enterococcus faecium* 14 ბაქტერიული სუსპენზია, 2)ენტეროკოკის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგი vB_GEC_EFS_4 და 3)ენტეროკოკული ფაგოლიზატი. სადიაგნოსტიკოდ გამოყენებულ იქნა პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქცია, რომელმაც გვაჩვენა რომ კულტურის და ფაგის მცირე დოზების შეყვანის შემთხვევაში (0,3-0,9მლ) მოხდა ანტისხეულების ტიტრის ნიველირება განსხვავებით 3მლ და 5 მლ შეყვანისა. ანტისხეულების ტიტრი საკონტროლო ჯგუფში სადაც არ მიმდინარობდა ფაგოთერაპია იყო 1: 1280, ხოლო სამკურნალო ჯგუფში –1:320.

2.8 vB_GEC_EFS_4 -ის ენდოლიზინების გამოყოფა და ლიზისური აქტივობის დადგენა

ბაქტერიოფაგების მთლიანი გენომის სექვენსის ანალიზმა აჩვენა რომ ფაგი vB_GEC_EFS_4 შეიცავდა ენდოლიზინების მაკოდირებელ გენებს,

Endolysin-associated genes

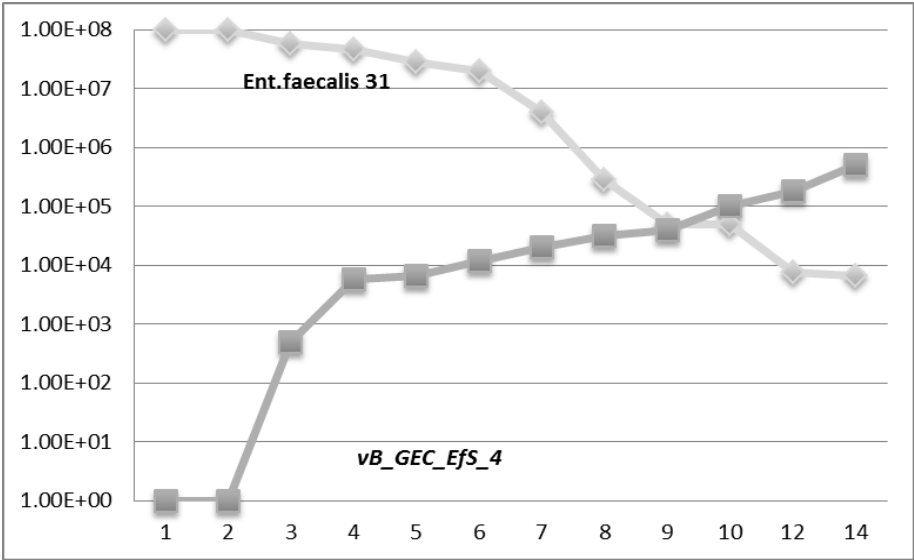
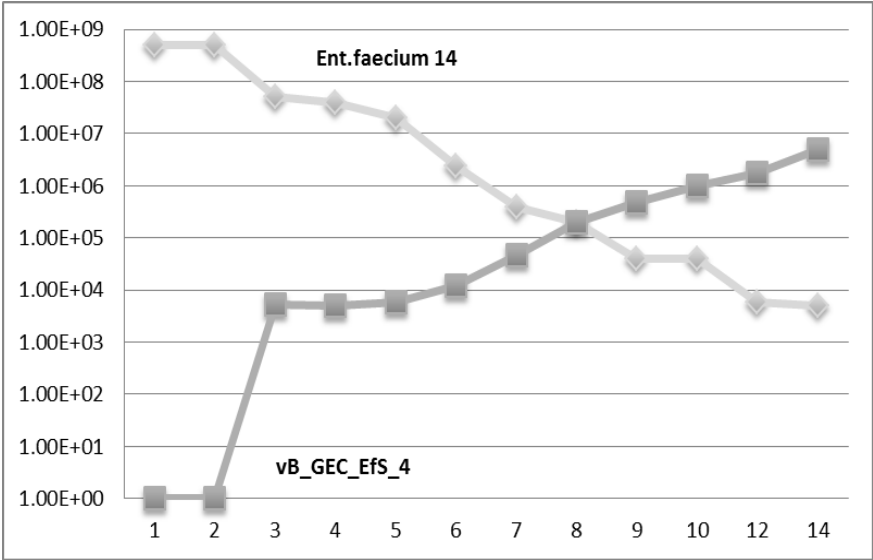
>Efph4_con6_05 Efph4_con6_05 putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase 3821:5077;

>Efph4_con6_06 Efph4_con6_06 peptidoglycan-binding LysM 5235:5843

Efph4_con6_07 Efph4_con6_07 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase 5947:6891

spot test”-ის მეშვეობით შემოწმდა ფიზიკო-ქიმიური მეთოდით გამოყოფილი ბაქტერიოფაგის ენდოლიზინების ლიზისური აქტივობა. სკრინინგისთვის გამოყენებულ იქნა 86 *Enterococcus faecalis*, 41 *Enterococcus faecium*, 10 *Staphylococcus aureus*, 10 *Staphylococcus Eppidermidis*, 10 *Streptococcus mitis*, 5 *Streptococcus* group A და 5 *Streptococcus* group B. vB_GEC_EFS_4 დან გამოყოფილი ენდოლიზინი გარდა ექსპერიმენტში გამოყენებული ენტეროკოკების შტამებისა, აღიზიარებდა სტაფილოკოკების 5%-ს და სტრეპტოკოკების 23%-ს.

გრაფიკი 7. *vB_GEC_EFS_4* in vivo აქტივობის შესწავლა



დისკუსია/ინტერპრეტაცია

მულტირეზისტენტული მიკრობებით გამოწვეული ინფექციები თანამედროვე მედიცინის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი პრობლემაა, ვინაიდან ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტული მიკროორგანიზმები ფართოდ არიან გავრცელებული, რაც ართულებს ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობასა და პროფილაქტიკას. ენტეროკოკები გვხვდებიან ადამიანის კუჭ-ნაწლავის ნორმალური მიკროფლორის შემადგენლობაში. მაგრამ მათი პათოგენური ფორმები ძალიან დიდ საშიშროებას წარმოადგენენ, რადგან ხასიათდებიან ჰემოლიზური აქტივობით, გამძლეობით სხვადასხვა გარემო ფაქტორების მიმართ და გამოირჩევიან მაღალი ანტიბიოტიკორეზისტენტობით. ენტეროკოკებში განვითარდა ამინოგლიკოზიდებისადმი შეძენილი რეზისტენტობა ორი მექანიზმით: რიბოსომული მუტაცია, რაც მხოლოდ სტრუქტომიცინისადმი რეზისტენტობას განაპირობებს და პლაზმიდური ამინოგლიკოზიდგარდამქმნელი ენზიმების გამომუშავება, რაც სხვადასხვა ამინოგლიკოზიდებისადმი სხვადასხვა აქტივობით მოქმედებს. მე-20 საუკუნის 80-იან წლებში პირველად გამოვლინდა ენტეროკოკების რეზისტენტობა გრამდადებით ბაქტერიებზე მოქმედ ყველაზე პოტენციური ანტიბიოტიკის – ვანკომიცინის მიმართ. ნანახია ვანკომიცინისადმი რეზისტენტული *Enterococcus faecium*-ის სამი განსხვავებული შტამი – VanA ფენოტიპი, რეზისტენტული ტეიკოპლანინის მიმართ და VanB, VanC მგრძნობიარე ტეიკოპლანინის მიმართ (6,10,35,82).

ენტეროკოკი ძალიან ხშირად გვევლინება მეორადი ინფექციების გამომწვევად (21,46,52,57,59). უახლესი სამეცნიერო პუბლიკაციების მონაცემების მიხედვით *Enterococcus* spp ითვლება საავადმყოფოსშიდა ინფექციების გამომწვევ ერთ-ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან პათოგენად (83). პირობით პათოგენური ენტეროკოკი ნაწლავებში ბინადრობს და ორგანიზმის იმუნიტეტის დაქვეითებისას, ღრმად იჭრება ქსოვილში და განაპირობებს პათოლოგიური პროცესების ჩამოყალიბებას. პათოგენური ენტეროკოკები გამოიმუშავენ ტოქსინებს, რომლებიც ამძიმებს დაავადების მიმდინარეობას და ასრულებს დამამძიმებელ როლს პათოგენეზში (23,31,54).

ამრიგად, ენტეროკოკი წარმოადგენს პოტენციურად ერთ-ერთ საშიშ პათოგენს ანტიბაქტერიული თერაპიის თვალსაზრისით (12,21,57,68).

ყოველივე ზემოთქულიდან გამომდინარე ჩვენს მიზანს წარმოადგენდა მულტირეზისტენტული ენტეროკოკის მიმართ აქტიური, ფართო სპექტრის მქონე ბაქტერიოფაგების იდენტიფიკაცია, დახასიათება და მათი თერაპიული აქტივობის შესწავლა. ბოლო წლებში ანტიბიოტიკორეზისტენტული ენტეროკოკის პროცენტული მაჩვენებლის ზრდამ განაპირობა თერაპიულ პროცესში ბაქტერიოფაგის ჩართვის მიზანშეწონილობა და ჩვენ მიზნად დავისახეთ, გამოგვეყო რამოდენიმე მაღალ აქტიური ფაგი, რომელთა ჩართვა სამკურნალო პოლიკლონარულ ფაგურ პრეპარატში იქნებოდა შესაძლებელი. აღსანიშნავია, რომ თერაპიული მიზნით ბაქტერიოფაგების გამოყენებამდე აუცილებელია ამ ფაგების სრული გენეტიკური ანალიზი, რათა დავრწმუნდეთ მათ ვირულენტურ ბუნებაში. ხშირ შემთხვევაში ლიზოგენური ფაგები თავად არიან რეზისტენტული გენებისა და პლაზმიდის გადამტანები. აღნიშნული ფაქტი შესაძლებელია გახდეს რეზისტენტობის განვითარებისა და გავრცელების მიზეზი და მათი მეშვეობით მოხდეს ანტიბიოტიკორეზისტენტობის განმსაზღვრელი გენის გავრცელება. მოცემულ კვლევაში გამოყენებულ იქნა 572 *Enterococcus* spp. შტამი, გამოყოფილ იქნა მათ მიმართ აქტიური 4 ბაქტერიოფაგი *vB_GEC_EFS_2*, *vB_GEC_EFS_3*, *vB_GEC_EFS_4* და *vB_GEC_EFM_9*, რომელთა პატრონი შტამებს წარმოადგენდნენ *Enterococcus faecium* 12; *Enterococcus faecalis* 31, *Enterococcus faecium* 14 და *Enterococcus faecalis* 106. პატრონი შტამები იდენტიფიცირება განხორციელებულ იქნა VITEK 2 სადიაგნოსტიკო სისტემის საშუალებით, რომელიც აღნიშნული შტამების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლას ეფუძნება და მიღებული შედეგების მიხედვით, 12 და 14 შტამი *Enterococcus faecium*-ია, ხოლო 31 და 106 *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus* spp - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები გამოყოფილი იქნა თბილისის ჩამდინარე წყლებიდან. *vB_GEC_EFS_2*, *vB_GEC_EFS_3*, *vB_GEC_EFS_4* და *vB_GEC_EFM_9* ფაგები განსხვავდებიან ერთმანეთისგან მორფოლოგიურად და ლიზისური აქტივობით, ოთხივე ფაგმა აჩვენა მდგრადობა ტემპერატურული ცვლილების, სხვადასხვა pH-ის და ულტრაიისფერი დასხივების მიმართ, რაც მნიშვნელოვანი მახასიათებლებია, რადგან ამ მონაცემების მიხედვით მოცემული ფაგები რეზისტენტულები აღმოჩნდნენ ექსტრემალური პირობების მიმართ. მათი ტრანსპორტირება შესაძლებელია მაცივრის გარეშე და ასევე

გამოყენება ისეთ ადგილებში, სადაც ტემპერატურა ნორმის ფარგლებს აღემატება. მიუხედავად იმისა რომ მოცემულ ფაგებს აქვთ საკმაოდ დიდი ლატენტური პერიოდი(30-75 წთ) ისინი მაღალი გამოსავლიანობით და მოკლე დროში (10-15 წთ) ადსორბციის მაღალი პროცენტით გამოირჩევიან აქამდე დახასიათებული ენტეროკოკული ბაქტერიოფაგებისგან.

Enterococcus spp-ს მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების იმუნოგენური თვისებების შესწავლის მიზნით ბოცვრების იმუნიზაციის შედეგად მიღებულ იქნა ორი ანტიფაგური შრატი: N1-vB_GEC_EfS_4 და N2- vB_GEC_EfS_3. ჯვარედინი ნეიტრალიზაცია არ დადგინდა, რაც იმაზე მეტყველებს რომ ეს ფაგები სეროლოგიურად არ წარმოადგენენ მონათესავე ფაგებს.

vB_GEC_EFS_2 და vB_GEC_EFS_4 ფაგების ბიოინფორმატიკული ანალიზი ჩატარდა იმისათვის, რომ დავრწმუნებულიყავით ამ ფაგების ვირულენტობაში.

ფაგი vB_GEC_EFS_2 გენომის 38508bp სეკვენირებული მასალის ანალიზმა აჩვენა, რომ ის შეიცავს 65 ღია წაკითხვის ჩარჩოს. უმეტესი მათგანისთვის სტარტ კოდონს (დამწყები კოდონი) წარმოადგენდა ATG (Met), თუმცა ვხვდებით ასევე რამდენიმე გენს, რომელიც იწყება მხოლოდ პროკარიოტებისთვის დამახასიათებელი სტარტ კოდონებით: GTG (V) და TTG (L). თითოეული ღია წაკითხვის ჩარჩოს წინ არსებული RBS უბნები (AGGAGG, GGAGA, GGGGG, GAGA, GGTGTG, AGGT) მიუთითებს მათი ექსპრესიის მიმდინარეობაზე. ინტერგენული უბნები საკმაოდ მცირეა და შეესაბამება პრომოტორულ და ტერმინატორულ უბნებს, რომელთა ნაწილიც სწორედ იდენტიფიცირდა შესაბამისი პროგრამების გამოყენების საშუალებით: სულ 9 პრომოტორული და 6 ტერმინატორული უბანი.

ფაგების წარმატებული ინფექცია საჭიროებს გენების ექსპრესიის რეგულაციას, შედეგად დნმ-ის რეპლიკაციას, ფაგის კაფსიდის ფორმაციას და ახალი ფაგური ნაწილაკების გამონთავისუფლებას ინფიცირებული უჯრედიდან. ბაქტერიოფაგების გენომის უმეტესობაში გენები, რომლებიც აკოდირებენ ფუნქციურად მსგავსს გენებს მეზობლად არიან განლაგებულნი და ხდება მათი ჩართვა გამორთვა ფაგის სასიცოცხლო ციკლის ფაზის მიხედვით. გენების მსგავსი განლაგება დახასიათებულია ლამბდა ფაგშიც, რომელშიც გამოიყოფა 11 ფუნქციური უბანი. ეს ფუნქციური მოდულები ძირითადად მოიცავს ინტეგრაციის, ჰომოლოგიური რეკომბინაციის, ადრეულ გენების, დნმ-ის რეპლიკაციის, გვიანი გენების, თავის

მორფოგენების, კუდის მორფოგენების, ლიზისის და 3 სხვა ფუნქციურად არადატვირთულ უბანს. ფაგი *vB_GEC_EFS_2*-ის შემთხვევაში 65 ORFs გამოიყოფა ძირითადად 2 ერთმანეთისგან საპირისპიროდ მიმართული გენების ჯგუფი, რომლებიც მოიცავენ 10 და 55 გენებს. 10 მემარცხენე-ტრანსკრიპტირებადი გენებიდან გამოირჩევა გენები რომლებიც პასუხისმგებელია ლიზის/ლიზოგენური ციკლის მიმდინარეობაზე, ინტეგრირებაზე, მაშინ როცა 55 გენი რომელიც მემარჯვენე-ტრანსკრიპტირებად rightward-transcribed გენებს მიეკუთვნება ჩართულია ლითიურ ციკლში და მოიცავს შემდეგ ფუნქციურდ მსგავს გენებს: 1. დნმ-ის ამწყობი (packaging) 2 . თავის მორფოგენების 3. კუდის მორფოგენების 4. ლიზისის 5. დნმ-ის რეპლიკაციის. უნდა აღინიშნოს რომ ფაგის გენომის სექვენსი სრული არ არის და არასექვენირებული უბანი სავარაუდოდ მცირე ზომისაა და უნდა მოიცავდეს ძირითადად დნმ-ის რეპლიკაციაში მონაწილე გენებს, რადგან არსებული სექვენირებული მასალიდან იდენტიფიცირდა მხოლოდ დნმ-ის რეპლიკაციის ინიციატორული გენი (*Efph2_con1_1*). გენების მსგავსი განაწილება ახასიათებს ასევე *E.feacalis* სპეციფიკურ ფაგს *φEf11* (69), მსგავსება კარგად ჩანს ილუსტრაცია 9-ზე. გენთა მოდულების ისეთი განლაგება როგორიც არის ფაგ *vB_GEC_EFS_2* -ში (packaging -> თავის მორფოგენები -> კუდის მორფოგენები -> ლიზისი -> რეკომბინაცია -> ლიზის/ლიზოგენიის კონტროლი -> დნმ-ის რეპლიკაცია) ნაჩვენებია მრავალ ლიზოგენურ ფაგის გენომში.

ცალკე განსახილველია რეკომბინაციისა და ადრეული გენების მაკონტროლებელი მოდულები, რომლებიც ლიზოგენური ფაგის გენომში ყველაზე ადრეული ტრანსკრიპტირებადი აქტივობით ხასიათდება (*Efph2_con2_8* *Efph2_con2_13* *Efph2_con2_14*). რეპრესორული გენის ტრანსკრიპტირება განსაზღვრავს ცილა რეპრესორის სინთეზს, რაც ბლოკავს ლითიურ სასიცოცხლო ციკლში მონაწილე გენების ტრანსკრიპციას. ამას თუ თან ახლავს ინტეგრაცია გენის ექსპრესია, რეკომბინაციაში მონაწილე მოდულთან ერთად გამოვლინდება ფაგის გენომის ინტეგრაცია მასპინძელი უჯრედის გენომში (51,69,84).

იმის გამოსაკვლევად თუ არსებობდა უკვე დახასიათებული ფაგი ან პროფაგი, რომლის გენომის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა მსგავსი იქნებოდა ფაგი *vB_GEC_EFS_2* -ის გენომის, გამოვიყენეთ nBLAST და ვნახეთ მსგავსება NCBI-ის მონაცემთა ბაზაში არსებულ დასეკვენირებლ მასალასთან. შედეგებმა აჩვენა, რომ

ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობით ფაგი *vB_GEC_EFS_2* -ის გენომი მსგავსია რამდენიმე *E. faecium*-ის რამდენიმე შტამის გენომის გარკვეული უბნების. მსგავსება საკმაოდ მაღალი პროცენტობით გამოვლინდა 90-95% (ილუსტრაცია 8) (43,44,63). შტამების გენომში ფაგი *vB_GEC_EFS_2* -ის გენომის მსგავსი უბნების შემდგომმა კვლევამ ცხადყო, რომ ეს უბნები შეესაბამებოდა ინტეგრირებული პროფაგის უბნებს. აღნიშნული პროფაგები NCBI-ის მონაცემთა ბაზაში დამოუკიდებლად არ ფიგურირებენ და დახასიათებულნი არიან როგორც *E. faecium* Aus0004, *E. faecium* Auc0085, *E. Faecium* OD-ის გენომის ნაწილი (43,44,63). აღნიშნული ინფორმაცია კიდევ ერთხელ ხაზს უსვამს *vB_GEC_EFS_2* ფაგის ლიზოგენურ ბუნებას.

ფაგის გენომის დახასიათებისას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ლიზისის მოდულს, რომელიც მოიცავს გენებს ენდოლიზინს და ჰოლინს და რომელიც ექსპრესირდება ლიზისური ციკლის შემთხვევაში და პასუხისმგებელია მასპინძელი უჯრედის ლიზისზე. ფაგი *vB_GEC_EFS_2* -ის გენომი შეიცავს 1 ენდოლიზინს (Efph2_con1_44) და ჰოლინის 2 გენს (Efph2_con1_42, Efph2_con1_43). თითოეულ გენში ფუნქციურად აქტიური დომენების შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ Efph2_con1_42 შეიცავს „Haemolysin XhIA” უბანს (13). ეს უბანი კი როგორც ლიტერატურიდანაც ცნობილი წარმოადგენს უჯრედის ზედაპირზე ასოცირებულ ჰემოლიზინს, რომელიც ბოცვრებსა და ცხენებში ახდენს ერითროციტების ლიზისს. აღნიშნულ XhIA მოდულსა და ჰოლინში არსებულ მოდულს შორის მსგავსება საკმაოდ მაღალია, სადაც E-value=4e-21, რაც გამორიცხავს შეცდომას/დამთხვევას (ცხრილი 2). ამ შედეგებიდან გამომდინარე საინტერესო გახდა გვეჩვენებინა ფაგი *vB_GEC_EFS_2* -ის ჰემოლიზური ბუნება. ჰოლინის გენი ექსპრესირდება მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ ფაგი გადის ლიზისურ სასიცოცხლო ციკლს. ლიზოგენური სასიცოცხლო ციკლის შემთხვევაში აღნიშნული გენი ბლოკირებულია, შესაბამისად ეს ფაგი პატრონ-შტამის გენომში ინტეგრირების შემთხვევაში ვერ გახდება შტამის ჰემოლიზური აქტივობის მიზეზი და პირიქით, ფაგი *vB_GEC_EFS_2* -ის ლიზისური ციკლის შემთხვევაში სინთეზირებული ჰოლინი წარმოადგენს ერითროციტების დაშლის პოტენციურ წყაროს.

ფაგი *vB_GEC_EFS_4* სეკვენირებული გენომის ბიოინფორმატიკულმა ანალიზმა აჩვენა რომ შედგება 145230 ნუკლეოტიდური წყვილისგან. გენომი მიიჩნევა წრიულად, რადგან არ იქნა იდენტიფიცირებული ტერმინალური უბნები. 170 ღია

წაკითხვის ჩარჩო და 12 სატრანსპორტო რნმ იდენტიფიცირდა. ღია წაკითხვის ჩარჩოს სტარტ კოდონი აქაც უმეტეს შემთხვევაში ATG-ია (Met), თუმცა არის ასევე ღწრ, რომელიც იწყება პროკარიოტებისთვის დამახასიათებელი სხვა სტარტ კოდონებით (GTG (V) და TTG (L)). ინტერგენულ უბნებში 35 პრომოტორული და 26 ტერმინატორული უბანი იქნა იდენტიფიცირებული.

170ღწრ მოიცავს გენებს რომლებიც საჭიროა ფაგის ლითიური სასიცოცხლო ციკლისთვის და რომლებიც მოიცავს ფაგის დნმ-ის რეპლიკაციის გენებს, სტრუქტურულ გენებს, მასპინძელი უჯრედის ლიზისის გენებს, ასევე ჰიპოთეტიკური პროტეინების მაკოდირებელ გენებს, რომელთა ფუნქცია ჯერ არ არის შესწავლილი და მიიჩნევა, რომ თითოეული ფაგისთვის მსგავსი ცილები ყველაზე სპეციფიკურია. ფაგი *vB_GEC_EFS_4* -ის გენომშიც, ისევე როგორც დამახასიათებელია სხვა ფაგების გენომისთვის ფუნქციურად მსგავსი გენები ერთმანეთთან ახლოსაა განლაგებული და ქმნიან მოდულებს: 1. დნმ-ის აწყობის მოდული (*Efph4_con6_01*, *Efph4_con7_09*) 2. დნმ-ის რეპლიკაციის მოდული 3. დიდი სტრუქტურული მოდული, რომელიც მოიცავს თავისა და კუდის კომპონენტების მაკოდირებელ გენებს. რაც შეეხება ლიზისის მოდულს, ფაგი *vB_GEC_EFS_4* -ის გენომში ენდოლიზინისა და ჰოლინის მაკოდირებელ გენები ერთმანეთისგან შორს არიან განლაგებულში, მათ შორის ვხვდებით სტრუქტურულ და დნმ-ის რეპლიკაციის მოდულებს. მასპინძელი უჯრედის ლიზისში მონაწილე გენების მსგავსი განლაგება სხვა ფაგებშიც არის ნანახი, მაგალითად ΦEF24C, T4 ფაგებში (77).

ფაგი *vB_GEC_EFS_4* -ის გენომის სექვენირებული ნაწილის ბიოინფორმატიკულმა ანალიზმა აჩვენა რომ იდენტიფიცირებული 170ღწრ-დან არც ერთი არ აკოდირებს ლიზოგენიაში მონაწილე გენებს, ტოქსინისა თუ ანტიბიოტიკორეზისტენტობის განმსაზღვრელი ცილების მაკოდირებელ გენებს. აგრეთვე, 170ღწრ-დან 103ღწრ მსგავსებას ავლენს ფაგი ΦEF24C-ის შესაბამის გენებთან. ეს მსგავსი 103ღწრ მოიცავს ფაგის სასიცოცხლო ციკლში მონაწილე ყველა გენს (დნმ-ის რეპლიკაცია, სტრუქტურული გენები, ლიზისში მონაწილე გენები). ფაგი ΦEF24C გენომი სრულად არის შესწავლილი და ნანახია, რომ ის წარმოადგენს ჭეშმარიტად ვირულენტულ ფაგს. ამრიგად, ფაგი *vB_GEC_EFS_4* -ის ასეთი მსგავსება ΦEF24C ფაგთან და ასევე ფაგი *vB_GEC_EFS_4* -ის გენომის სექვენირებული მასალის ანალიზის შედეგები ცხადყოფს ფაგი *vB_GEC_EFS_4* -ის ვირულენტულ ბუნებას, რაც

საშუალებას გვაძლევს აქტიურად განვიხილოთ მისი ფაგოთერაპიაში გამოყენების საშუალება.

ბიოინფორმატიკული ანალიზის შედეგებიდან გამომდინარე *in vivo* ცდისთვის შეირჩა ფაგი *vB_GEC_EFS_4*, რადგანაც ბიოინფორმატიკულმა ანალიზმა ცხადჰყო მისი ვირულენტური ბუნება, კვლევის პერიოდში დახასიათებული ენტეროკოკის მიმართ აქტიური ფაგებიდან მან ყველაზე დიდი ლიზისური აქტივობა აჩვენა, აქვს მოკლე ადსორბციის დრო 10 წუთი, ლატენტური პერიოდი 30 წუთი და მაღალი გამოსავლიანობა 155 ფაგური ნაწილაკი.

in vivo ცდა ჩატარდა ფაგი *vB_GEC_EFS_4*-ით, თავგები დავაინფიცირეთ ამ ფაგის პატრონ შტამით *Enterococcus faecium* 14 და შემთხვევითი შტამით *Enterococcus faecalis* 31, რომელზეც *vB_GEC_EFS_4* ფაგის ადაპტაცია არ ჩატარებულა. ცხოველური მოდელის გამოყენებით ვაჩვენეთ, რომ ფაგის ლეტალური დოზა, რომელიც 200-300 გრ ვირთაგვებში განისაზღვრება ერთჯერადად შეყვანილი 5მლ ოდენობით, არ ახდენს მავნე გავლენას და ფაგს არ გააჩნია ტოქსიკური ეფექტი ვირთაგვებზე.

წარმატებული აღმოჩნდა ფაგის ინტრაპერიტონალურად შეყვანა ფაგოთერაპიული ჯგუფის ვირთაგვებში, ანთებითი პროცესები ინფიცირებიდან 48 საათის განმავლობაში გახდა თვალსაჩინო, თუმცა მეშვიდე დღიდან ცდის ბოლოსთვის მთლიანად გაქრა, რაც ასევე აისახა ბაქტერიული შტამების ტიტრის კლებაში. თერაპიული ეფექტი თითქმის მსგავსი ეფექტურობით წარიმართა *Enterococcus faecalis* 31-ით ინფიცირებულ თავგებში. ფაგი ფეკალურ მასებში გამოჩნდა შეყვანიდან მე-3 დღეს როგორც IV ასევე V თერაპიულ ჯგუფში და ფაგის ტიტრი $5 \cdot 10^3$ დან– 10^5 მდე ავიდა (გრაფიკი 7).

ასევე ინფიცირებიდან მე-7 და მე -14 დღეს ავიღეთ სისხლი, რომლიდანაც დამზადდა შრავი და სადიაგნოსტიკოდ გამოყენებულ იქნა პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქცია, რომელმაც გვაჩვენა რომ კულტურის და ფაგის მცირე დოზების შეყვანის შემთხვევაში (0,3-0,9მლ) მოხდა ანტისხეულების ტიტრის ნიველირება განსხვავებით 3მლ და 5 მლ შეყვანისა. ანტისხეულების ტიტრი საკონტროლო ჯგუფში სადაც არ მიმდინარობდა ფაგოთერაპია 1: 1280, ხოლო სამკურნალო ჯგუფში 1:320.

ფაგი *vB_GEC_EFS_4*-ს *in vivo* გამოცდა კიდევ ერთხელ ნათელყოფს ვირულენტური ფაგის არატოქსიკურობას და მის ეფექტურობას მიკრობული

ინფექციების მკურნალობაში. ნაშრომის სიახლეს წარმოადგენს ის, რომ ინტრაპერიტონალური ინფიცირებისთვის შემთხვევითად შერჩეული შტამის გამოყენებით ჩვენ შევქმენით ინფექციის რეალური სურათი. ასევე *Enterococcus* spp.-ს მიმართ სპეციფიკური ანტისხეულების რაოდენობრივი მაჩვენებლის დადგენით ხაზი გავუსვით მის უვნებლობას და ფაგოთერაპიაში გამოყენების შესაძლებლობებს.

დასკვნები და რეკომენდაციები

1. გამოყოფილია *Enterococcus* spp-s მიმართ სპეციფიური ოთხი ფაგი, რომელთაგან *vB_GEC_EFS_2*, *vB_GEC_EFS_3* და *vB_GEC_EFS_4* მიეკუთვნება *Siphoviridae*-ს, ხოლო *vB_GEC_EFM_9* *Myoviridae* -ს.
2. კვლევაში გამოყენებული 572 ენტეროკოკის შტამზე მოქმედების შედეგების მიხედვით ფაგი *vB_GEC_EFS_2* აქტივობის სპექტრი განისაზღვრა 4 %-ით , ფაგი *vB_GEC_EFS_3*-ის აქტივობის სპექტრი განისაზღვრა 44,4%-ით. ფაგი *vB_GEC_EFS_4* - 64,4 % ის ლიზისს ახდენს. ხოლო ფაგი *vB_GEC_EFM_9* აქტიურია 55,9%-ის მიმართ.
3. ფაგების სასიცოხლო ციკლის შესწავლისას გამოვლინდა 10 წთ განმავლობაში ადსორბციის მაღალი პროცენტი (94 - 99 %) და მაღალი გამოსავლიანობა (60-300) ლატენტური პერიოდი (30-75 წთ).
4. ფაგების *vB_GEC_EFS_2* და *vB_GEC_EFS_4*-ის გენომის სექვენირების შედეგებმა გვაჩვენა, რომ *vB_GEC_EFS_2* გენომი შეიცავს ინტეგრასასა და ცილა რეპრესორების მაკოდირებელ გენს რაც მიუთითებს მის ზომიერ ბუნებაზე. *vB_GEC_EFS_4* ჭეშმარიტად ვირულენტური ფაგია და მსგავსებას ავლენს ფაგი ΦEF24C-სთან.
5. დადგინდა ფაგებთან შედარებით ენდოლიზინების მაღალი ანტიბაქტერიული აქტივობა.
6. ენტეროკოკით ინტრაპერიტონალურად ინფიცირებულ ვირთაგვებში *vB_GEC_EFS_4* ფაგით მკურნალობით, კიდევ ერთხელ დადასტურდა ფაგოთერაპიის არატოქსიკურობა და მაღალი ეფექტურობა.

ბიბლიოგრაფია

1. Abedon, S. T., S. J. Kuhl, B. G. Blasdel, and E. M. Kutter. 2011. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 1:66-85. doi:10.4161/bact.1.2.15845 [doi];2159-7073-1-2-2 [pii].
 2. Ackermann, H. W. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch.Virol.* 152:227-243. doi:10.1007/s00705-006-0849-1 [doi].
 3. Ackermann, H. W. 2009. Phage classification and characterization. *Methods Mol.Biol.* 501:127-140. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_13 [doi].
 4. Arias, C. A. and B. E. Murray. 2008. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* 6:637-655. doi:10.1586/14787210.6.5.637 [doi].
 5. Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A. N. Trostel, B. Powell, R. Carlton, and C. R. Merrill. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect.Immun.* 70:204-210.
 6. Bonten, M. J., R. Willems, and R. A. Weinstein. 2001. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect.Dis.* 1:314-325. doi:S1473-3099(01)00145-1 [pii];10.1016/S1473-3099(01)00145-1 [doi].
 7. Burrowes, B., D. R. Harper, J. Anderson, M. McConville, and M. C. Enright. 2011. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* 9:775-785. doi:10.1586/eri.11.90 [doi].
 8. Calendar Richard. *The Bacteriophages*. 2006.
- Ref Type: Generic
9. Carlton, R. M. 1999. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* 47:267-274.
 10. Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin.Microbiol.Rev.* 13:686-707.
 11. Chanishvili, N. 2012. Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv.Virus Res.* 83:3-40. doi:B978-0-12-394438-2.00001-3 [pii];10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3 [doi].
 12. Coque, T. M., P. Seetulsingh, K. V. Singh, and B. E. Murray. 1998. Application of molecular techniques to the study of nosocomial infections caused by enterococci. *Methods Mol.Med.* 15:469-493. doi:10.1385/0-89603-498-4:469 [doi].
 13. Cowles, K. N. and H. Goodrich-Blair. 2005. Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. *Cell Microbiol.* 7:209-219. doi:CMI448 [pii];10.1111/j.1462-5822.2004.00448.x [doi].
 14. Das, I. and J. Gray. 1998. Enterococcal bacteremia in children: a review of seventy-five episodes in a pediatric hospital. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 17:1154-1158.

15. de Kraker, M. E., V. Jarlier, J. C. Monen, O. E. Heuer, N. van de Sande, and H. Grundmann. 2013. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin.Microbiol.Infect.* 19:860-868. doi:10.1111/1469-0691.12028 [doi].
16. De, P. M. and F. Taddei. 2006. Viruses' life history: towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages. *PLoS.Biol.* 4:e193. doi:05-PLBI-RA-1429R3 [pii];10.1371/journal.pbio.0040193 [doi].
17. Dennehy, J. J. and P. E. Turner. 2004. Reduced fecundity is the cost of cheating in RNA virus phi6. *Proc.Biol.Sci.* 271:2275-2282. doi:U3QEX3RBXRQY256N [pii];10.1098/rspb.2004.2833 [doi].
18. Duckworth, D. H. 1976. "Who discovered bacteriophage?". *Bacteriol.Rev.* 40:793-802.
19. Ellis, E. L. and M. Delbruck. 1939. THE GROWTH OF BACTERIOPHAGE. *J.Gen.Physiol* 22:365-384.
20. Fischetti, V. A. 2005. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.* 13:491-496. doi:S0966-842X(05)00225-8 [pii];10.1016/j.tim.2005.08.007 [doi].
21. Fisher, K. and C. Phillips. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155:1749-1757. doi:mic.0.026385-0 [pii];10.1099/mic.0.026385-0 [doi].
22. Funke, G., D. Monnet, C. deBernardis, G. A. von, and J. Freney. 1998. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. *J.Clin.Microbiol.* 36:1948-1952.
23. Gilmore, M. S., F. Lebreton, and S. W. van. 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr.Opin.Microbiol.* 16:10-16. doi:S1369-5274(13)00009-X [pii];10.1016/j.mib.2013.01.006 [doi].
24. Gilmore, M. S., F. Lebreton, and S. W. van. 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr.Opin.Microbiol.* 16:10-16. doi:S1369-5274(13)00009-X [pii];10.1016/j.mib.2013.01.006 [doi].
25. Han, F., M. Li, H. Lin, J. Wang, L. Cao, and M. N. Khan. 2014. The novel *Shewanella putrefaciens*-infecting bacteriophage Spp001: genome sequence and lytic enzymes. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* 41:1017-1026. doi:10.1007/s10295-014-1438-z [doi].
26. Hanlon, G. W. 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int.J.Antimicrob.Agents* 30:118-128. doi:S0924-8579(07)00203-8 [pii];10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006 [doi].
27. Harwood, V. J., N. C. Delahoya, R. M. Ulrich, M. F. Kramer, J. E. Whitlock, J. R. Garey, and D. V. Lim. 2004. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Lett.Appl.Microbiol.* 38:476-482. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01518.x [doi];LAM1518 [pii].

28. Hatfull, G. F. and R. W. Hendrix. 2011. Bacteriophages and their genomes. *Curr.Opin.Virol.* 1:298-303. doi:10.1016/j.coviro.2011.06.009 [doi].
29. Hegstad, K., T. Mikalsen, T. M. Coque, G. Werner, and A. Sundsfjord. 2010. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin.Microbiol.Infect.* 16:541-554. doi:CLM3226 [pii];10.1111/j.1469-0691.2010.03226.x [doi].
30. Huycke, M. M., D. F. Sahm, and M. S. Gilmore. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg.Infect.Dis.* 4:239-249. doi:10.3201/eid0402.980211 [doi].
31. Huycke, M. M., C. A. Spiegel, and M. S. Gilmore. 1991. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 35:1626-1634.
32. Hyman, P. and S. T. Abedon. 2009. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol.Biol.* 501:175-202. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_18 [doi].
33. Jonczyk, E., M. Klak, R. Miedzybrodzki, and A. Gorski. 2011. The influence of external factors on bacteriophages--review. *Folia Microbiol.(Praha)* 56:191-200. doi:10.1007/s12223-011-0039-8 [doi].
34. Karumidze, N., I. Kusradze, S. Rigvava, M. Goderdzishvili, K. Rajakumar, and Z. Alavidze. 2013. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Curr.Microbiol.* 66:251-258. doi:10.1007/s00284-012-0264-7 [doi].
35. Kayser, F. H. 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int.J.Food Microbiol.* 88:255-262. doi:S0168160503001880 [pii].
36. Kropinski, A. M., A. Mazzocco, T. E. Waddell, E. Lingohr, and R. P. Johnson. 2009. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol.Biol.* 501:69-76. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_7 [doi].
37. Kropinski, A. M., D. Prangishvili, and R. Lavigne. 2009. Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of Bacteria and Archaea. *Environ.Microbiol.* 11:2775-2777. doi:EMI1970 [pii];10.1111/j.1462-2920.2009.01970.x [doi].
38. Kutateladze, M. and R. Adamia. 2008. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med.Mal Infect.* 38:426-430. doi:S0399-077X(08)00180-7 [pii];10.1016/j.medmal.2008.06.023 [doi].
39. Kutateladze, M. and R. Adamia. 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* 28:591-595. doi:S0167-7799(10)00137-X [pii];10.1016/j.tibtech.2010.08.001 [doi].
40. Kutter, E. 2009. Phage host range and efficiency of plating. *Methods Mol.Biol.* 501:141-149. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_14 [doi].
41. Kutter, E., V. D. De, G. Gvasalia, Z. Alavidze, L. Gogokhia, S. Kuhl, and S. T. Abedon. 2010. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Curr.Pharm.Biotechnol.* 11:69-86.

42. Kutter, E. and Sulakvelidze, A. Bacteriophages: biology and application. 2005.
Ref Type: Generic

43. Lam, M. M., T. Seemann, D. M. Bulach, S. L. Gladman, H. Chen, V. Haring, R. J. Moore, S. Ballard, M. L. Grayson, P. D. Johnson, B. P. Howden, and T. P. Stinear. 2012. Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J.Bacteriol.* 194:2334-2341. doi:JB.00259-12 [pii];10.1128/JB.00259-12 [doi].
44. Lam, M. M., T. Seemann, N. J. Tobias, H. Chen, V. Haring, R. J. Moore, S. Ballard, L. M. Grayson, P. D. Johnson, B. P. Howden, and T. P. Stinear. 2013. Comparative analysis of the complete genome of an epidemic hospital sequence type 203 clone of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *BMC.Genomics* 14:595. doi:1471-2164-14-595 [pii];10.1186/1471-2164-14-595 [doi].
45. Lederberg, J. 1996. Smaller fleas ... ad infinitum: therapeutic bacteriophage redux. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:3167-3168.
46. Lee, Y. D. and J. H. Park. 2012. Complete genome sequence of enterococcal bacteriophage SAP6. *J.Virol.* 86:5402-5403. doi:86/9/5402 [pii];10.1128/JVI.00321-12 [doi].
47. Lin, N. T., P. Y. Chiou, K. C. Chang, L. K. Chen, and M. J. Lai. 2010. Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Res.Microbiol.* 161:308-314. doi:S0923-2508(10)00077-X [pii];10.1016/j.resmic.2010.03.007 [doi].
48. Low, D. E., N. Keller, A. Barth, and R. N. Jones. 2001. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin.Infect.Dis.* 32 Suppl 2:S133-S145. doi:CID001237 [pii];10.1086/320185 [doi].
49. Lu, T. K. and M. S. Koeris. 2011. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr.Opin.Microbiol.* 14:524-531. doi:S1369-5274(11)00112-3 [pii];10.1016/j.mib.2011.07.028 [doi].
50. Malathum, K., K. V. Singh, G. M. Weinstock, and B. E. Murray. 1998. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *J.Clin.Microbiol.* 36:211-215.
51. Matos, R. C., N. Lapaque, L. Rigottier-Gois, L. Debarbieux, T. Meylheuc, B. Gonzalez-Zorn, F. Repoila, M. F. Lopes, and P. Serror. 2013. *Enterococcus faecalis* prophage dynamics and contributions to pathogenic traits. *PLoS.Genet.* 9:e1003539. doi:10.1371/journal.pgen.1003539 [doi];PGENETICS-D-12-02777 [pii].
52. McBride, S. M., V. A. Fischetti, D. J. Leblanc, R. C. Moellering, Jr., and M. S. Gilmore. 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS.One.* 2:e582. doi:10.1371/journal.pone.0000582 [doi].
53. McBride, S. M., V. A. Fischetti, D. J. Leblanc, R. C. Moellering, Jr., and M. S. Gilmore. 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS.One.* 2:e582. doi:10.1371/journal.pone.0000582 [doi].
54. McKinnell, J. A., D. F. Kunz, E. Chamot, M. Patel, R. M. Shirley, S. A. Moser, J. W. Baddley, P. G. Pappas, and L. G. Miller. 2012. Association between vancomycin-

- resistant Enterococci bacteremia and ceftriaxone usage. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 33:718-724. doi:10.1086/666331 [doi].
55. Merrill, C. R., D. Scholl, and S. L. Adhya. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2:489-497. doi:10.1038/nrd1111 [doi];nrd1111 [pii].
 56. Mundy, L. M., D. F. Sahm, and M. Gilmore. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* 13:513-522.
 57. Murray, B. E. 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N.Engl.J.Med.* 342:710-721. doi:10.1056/NEJM200003093421007 [doi].
 58. Nale, J. Y., J. Shan, P. T. Hickenbotham, W. N. Fawley, M. H. Wilcox, and M. R. Clokie. 2012. Diverse temperate bacteriophage carriage in *Clostridium difficile* 027 strains. *PLoS.One.* 7:e37263. doi:10.1371/journal.pone.0037263 [doi];PONE-D-12-00463 [pii].
 59. Ofner-Agostini, M., B. L. Johnston, A. E. Simor, J. Embil, A. Matlow, M. Mulvey, D. Ormiston, and J. Conly. 2008. Vancomycin-resistant enterococci in Canada: results from the Canadian nosocomial infection surveillance program, 1999-2005. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 29:271-274. doi:10.1086/528812 [doi].
 60. Pagava, K. I., K. K. Gachechiladze, I. A. Korinteli, M. G. Dzuliashvili, Z. I. Alavidze, N. Hoyle, and G. D. Metskhvarishvili. 2011. [What happens when the child gets bacteriophage per os?]. *Georgian.Med.News*101-105.
 61. Pier, G. B., J. M. Saunders, P. Ames, M. S. Edwards, H. Auerbach, J. Goldfarb, D. P. Speert, and S. Hurwitch. 1987. Opsonophagocytic killing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in older noncolonized patients with cystic fibrosis. *N.Engl.J.Med.* 317:793-798. doi:10.1056/NEJM198709243171303 [doi].
 62. Podschun, R. and U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin.Microbiol.Rev.* 11:589-603.
 63. Qin, X., J. R. Galloway-Pena, J. Sillanpaa, J. H. Roh, S. R. Nallapareddy, S. Chowdhury, A. Bourgonne, T. Choudhury, D. M. Muzny, C. J. Buhay, Y. Ding, S. Dugan-Rocha, W. Liu, C. Kovar, E. Sodergren, S. Highlander, J. F. Petrosino, K. C. Worley, R. A. Gibbs, G. M. Weinstock, and B. E. Murray. 2012. Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. *BMC.Microbiol.* 12:135. doi:1471-2180-12-135 [pii];10.1186/1471-2180-12-135 [doi].
 64. Rigvava, S., I. Tchgonia, D. Jgenti, T. Dvalidze, J. Carpino, and M. Goderdzishvili. 2013. Comparative analysis of the biological and physical properties of *Enterococcus faecalis* bacteriophage vB_EfaS_GEC-EfS_3 and *Streptococcus mitis* bacteriophage vB_SmM_GEC-SmitisM_2. *Can.J.Microbiol.* 59:18-21. doi:10.1139/cjm-2012-0385 [doi].
 65. ROGERS, C. G. and W. B. SARLES. 1963. CHARACTERIZATION OF ENTEROCOCCUS BACTERIOPHAGES FROM THE SMALL INTESTINE OF THE RAT. *J.Bacteriol.* 85:1378-1385.

66. Ruiz-Garbajosa, P., M. J. Bonten, D. A. Robinson, J. Top, S. R. Nallapareddy, C. Torres, T. M. Coque, R. Canton, F. Baquero, B. E. Murray, C. R. del, and R. J. Willems. 2006. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J.Clin.Microbiol.* 44:2220-2228. doi:44/6/2220 [pii];10.1128/JCM.02596-05 [doi].
67. Shin, S. C., d. H. Ahn, S. J. Kim, H. Lee, T. J. Oh, J. E. Lee, and H. Park. 2013. Advantages of Single-Molecule Real-Time Sequencing in High-GC Content Genomes. *PLoS.One.* 8:e68824. doi:10.1371/journal.pone.0068824 [doi];PONE-D-13-05291 [pii].
68. Sood, S., M. Malhotra, B. K. Das, and A. Kapil. 2008. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J.Med.Res.* 128:111-121.
69. Stevens, R. H., M. R. Ektefaie, and D. E. Fouts. 2011. The annotated complete DNA sequence of *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEf11 and its comparison with all available phage and predicted prophage genomes. *FEMS Microbiol.Lett.* 317:9-26. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02203.x [doi].
70. Stuart, C. H., S. A. Schwartz, T. J. Beeson, and C. B. Owatz. 2006. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J.Endod.* 32:93-98. doi:S0099-2399(05)00093-2 [pii];10.1016/j.joen.2005.10.049 [doi].
71. Sulakvelidze, A. 2005. Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections. *Drug Discov.Today* 10:807-809. doi:S1359-6446(05)03441-0 [pii];10.1016/S1359-6446(05)03441-0 [doi].
72. Sulakvelidze, A., Z. Alavidze, and J. G. Morris, Jr. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob.Agents Chemother.* 45:649-659. doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001 [doi].
73. Thomas, J. A., M. R. Rolando, C. A. Carroll, P. S. Shen, D. M. Belnap, S. T. Weintraub, P. Serwer, and S. C. Hardies. 2008. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* myovirus 201varphi2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy. *Virology* 376:330-338. doi:S0042-6822(08)00214-6 [pii];10.1016/j.virol.2008.04.004 [doi].
74. Thurber, R. V. 2009. Current insights into phage biodiversity and biogeography. *Curr.Opin.Microbiol.* 12:582-587. doi:S1369-5274(09)00120-9 [pii];10.1016/j.mib.2009.08.008 [doi].
75. Tomayko, J. F. and B. E. Murray. 1995. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *J.Clin.Microbiol.* 33:2903-2907.
76. Treitman, A. N., P. R. Yarnold, J. Warren, and G. A. Noskin. 2005. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J.Clin.Microbiol.* 43:462-463. doi:43/1/462 [pii];10.1128/JCM.43.1.462-463.2005 [doi].
77. Uchiyama, J., M. Rashel, I. Takemura, H. Wakiguchi, and S. Matsuzaki. 2008. In silico and in vivo evaluation of bacteriophage phiEF24C, a candidate for treatment of *Enterococcus faecalis* infections. *Appl.Environ.Microbiol.* 74:4149-4163. doi:AEM.02371-07 [pii];10.1128/AEM.02371-07 [doi].

78. Uchiyama, J., I. Takemura, M. Satoh, S. Kato, T. Ujihara, K. Akechi, S. Matsuzaki, and M. Daibata. 2011. Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage PhiEF24C with a spontaneous point mutation. *PLoS.One.* 6:e26648. doi:10.1371/journal.pone.0026648 [doi];PONE-D-11-11608 [pii].
79. Waddell, T. E., K. Franklin, A. Mazzocco, and R. P. Johnson. 2009. Preparation and characterization of anti-phage serum. *Methods Mol.Biol.* 501:287-292. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_24 [doi].
80. Wang, J., V. Michel, M. Hofnung, and A. Charbit. 1998. Cloning of the J gene of bacteriophage lambda, expression and solubilization of the J protein: first in vitro studies on the interactions between J and LamB, its cell surface receptor. *Res.Microbiol.* 149:611-624. doi:S0923-2508(99)80009-6 [pii].
81. Weber-Dabrowska, B., M. Mulczyk, and A. Gorski. 2000. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* 48:547-551.
82. Willems, R. J., J. Top, B. N. van Den, B. A. van, H. Endtz, D. Mevius, E. Stobberingh, B. A. van Den, and J. D. van Embden. 2000. Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J.Infect.Dis.* 182:816-823. doi:JID000160 [pii];10.1086/315752 [doi].
83. Willems, R. J., J. Top, S. M. van, D. A. Robinson, T. M. Coque, F. Baquero, H. Grundmann, and M. J. Bonten. 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg.Infect.Dis.* 11:821-828. doi:10.3201/eid1106.041204 [doi].
84. Yasmin, A., J. G. Kenny, J. Shankar, A. C. Darby, N. Hall, C. Edwards, and M. J. Horsburgh. 2010. Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis* temperate bacteriophages. *J.Bacteriol.* 192:1122-1130. doi:JB.01293-09 [pii];10.1128/JB.01293-09 [doi].
85. Zhang, W., Z. Mi, X. Yin, H. Fan, X. An, Z. Zhang, J. Chen, and Y. Tong. 2013. Characterization of *Enterococcus faecalis* phage IME-EF1 and its endolysin. *PLoS.One.* 8:e80435. doi:10.1371/journal.pone.0080435 [doi];PONE-D-13-24776 [pii].