

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Vojtěch Ludvík

Bakteriofágová terapie se zaměřením na biofilmy močových katetrů

Bacteriophage therapy with focus on urinary catheters biofilms

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Alena Drda Morávková, MBA, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.9.2017

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat RNDr. Aleně Drda Morávkové, MBA, Ph.D za trpělivost a čas, který mi věnovala po dobu psaní bakalářské práce. Také bych chtěl poděkovat svým přátelům, spolužákům a rodině za podporu během studia a psaní mé práce.

Abstrakt

Pod pojmem bakteriofágová terapie se rozumí využití virů k ničení bakterií. V mé práci pojednávám především o využití bakteriofágové terapie pro léčbu nozokomiálních infekcí způsobených katetrizací močových cest. Zaměřuji se na bakterie, které se vyskytují v biofilmech katetrů a na možný výběr bakteriofágů schopných enzymatické degradace biofilmu a lýzu přítomných bakterií. Po kontaktu tělních tekutin s povrchem katetru se začne vytvářet prostředí pro tvorbu biofilmu vedoucí k jeho rychlému rozvoji a vzniku infekce. Četnost výskytu dosahuje při nesprávné hygieně a nepřiměřené délce katetrizace až 100 %. Bakterie díky biofilmu vykazují vysokou rezistenci vůči ATB, infekce tak v mnoha případech nebývá potlačena a může se stát pro pacienta smrtelnou. Využití bakteriofágového koktejlu a geneticky upravených bakteriofágů může vést k vyléčení infekce nebo k preventivnímu zabránění jejího vzniku.

Klíčová slova: Bakteriofágová terapie, infekce močových cest, katetrizace, biofilm, EPS

Abstract

The term of the bacteriophage therapy denotes the use of viruses for killing bacteria. My thesis refers about the use of the bacteriophage therapy in the process of treating nosocomial infections caused by the urinary tract catheterization. I focus on the bacteria that are found in the catheters' biofilms and on the selection of bacteriophages that will be capable of the enzymatically degradation of the biofilms as well as the lysis of the present bacteria. After the body fluids contact the surface of the catheter, an environment for the evolution of the biofilm begins to evolve, which leads to its fast expansion and to the development of an infection. In the case of improper hygienically measures and unreasonable duration of the catheterization, the incidence of the infections reaches 100%. Because of the presence of the biofilm, the bacteria demonstrate high resistance to antibiotics, which is why the infections often aren't suppressed and may have fatal consequences. If applied, the bacteriophage cocktail and genetically modified bacteriophages can successfully treat the infection and even prevent from its development.

Keywords: Bacteriophage therapy, urinary tract infection, catheterization, biofilm, EPS

Zkratky

Zkratka	český význam:	z anglického slova:
ATB	antibiotika	antibiotics
CAUTI	infekce močových cest z důvodu katetrizace	catheter-associated urinary tract infections,
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
DNasa I	enzym štěpící dna	DNase I
DspB	Dispersin B	dispersin B
EPS	extracelulární polysacharidy	exopolysacharides
NK	nukleová kyselina	nucleic acid
PBS	fosfátový pufr	phosphate buffered saline
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
ss/ds	jednořetězcový/dvouřetězcový	single-strand/double-strand
UTI	infekce močových cest	urinary tract infection
SEM	rastrovací elektronový mikroskop	scanning electron microscope

Obsah

1. ÚVOD	1
2. BIOFILM	3
2.1. TVORBA BIOFILMU NA POVRCHU KATETRU	6
2.2. PŘÍSTUP DO BIOFILMU	6
2.3. FUNKCE BIOFILMU	6
2.3.1. ANTIBIOTIKA – REZISTENCE	7
3. INFEKCE MOČOVÝCH CEST ZPŮSOBENÉ KATETRIZACÍ.....	9
3.1. BAKTERIE VYTVÁŘEJÍCÍ BIOFILMY U CAUTI	10
4. BAKTERIOFÁGY	13
4.1. EPS DEPOLYMERUJÍCÍ ENZYMY	15
5. TERAPIE CAUTI.....	19
5.1. DRUHY	20
5.1.1. E. CLOACAE.....	20
5.1.2. K. PNEUMONIAE	21
5.1.3. E. COLI.....	21
6. TERAPIE <i>IN VIVO</i>	24
7. VÝHODY A NEVÝHODY	25
7.1. NEVÝHODY	25
7.2. VÝHODY	26
8. ZÁVĚR.....	28
9. ZDROJE	29

1. Úvod

Bakteriální společenstva si kolem sebe budují biofilm, ten jim slouží, mimo jiné, jako ochranný štít podílející se na zvýšené rezistenci bakterií vůči antibiotikům (ATB), které tuto mechanickou bariéru nejsou schopny překonat. Bakterie na povrchu biofilmu, k nimž se ATB dostávají, se mohou stát rezistentní a svoji rezistenci, jak horizontálně, tak i vertikálně předávat dalším bakteriím. Rozrušení biofilmu je proto při léčení bakteriálních onemocnění zásadní a mělo by být prvotním cílem pro úspěšné zdoání infekce.

K odstranění biofilmu může docházet mnoha odlišnými způsoby. Ty při nejlepším vedou k jeho naprostému odstranění z povrchů. Je možnost využít prostředky, které buď mechanickou anebo chemickou cestou naruší strukturu biofilmu tak, že adhezni molekuly ztratí kontakt s podložkou. Pokud se tímto způsobem biofilm bezezbytku odstraní, zabrání se tak jeho znovuoobnovení. Existují však místa, kde se tento způsob využít nemůže, jelikož povrch, na kterém se biofilm vyskytuje, může být těmito metodami poškozen, a to by mohlo vést ke ztrátě funkčnosti.

U některých povrchů je možnost mechanického či chemického odstranění biofilmu zcela vyloučena nejen z důvodu narušení povrchu, ale i z možné toxicity detergentů. Zde se jako možný způsob odstranění biofilmu jeví využití ATB. Ta jsou zaměřena na ničení bakterií jako takových, což sice vede k eliminaci počtu bakterií a ke zdánlivému uzdravení, avšak ochranná funkce biofilmu může zajistit přežití bakterií v místech nejbliže k povrchu, na kterém je přichycen. Zde bakterie přečkávají a po čase jsou schopny biofilm obnovit. Další skutečností je, že mnoho bakteriálních kmenů si vytváří rezistenci vůči využívaným antibiotikům, a to tento způsob léčení v mnoha případech ztěžuje.

Využití bakteriofágů k ničení biofilmů se v tomto případě jeví jako velice zajímavý a účinný způsob léčby.

Bakteriofág je schopen procestovat skrze otvory v biofilmu k bakteriím (viz kapitola 2. Biofilm), které napadne a zahájí v nich replikační cyklus vedoucí k mnohonásobnému navýšení jeho počtu. Dochází k destrukci buňky a uvolněné viriony jsou schopny infikovat další bakterie, což je oproti antibiotikům, jež se spotřebovávají, výhodou.

Další výhodou bakteriofágů je vektorová schopnost. Díky té jsou schopni do bakterie přinést gen, kódující proteiny napomáhající degradaci biofilmu (biofilmovou matrix degradující enzym). Tento solubilní enzym se při dokončování lytického cyklu fága uvolní do matrix biofilmu a degradací matrix naruší strukturu biofilmu. V nejlepším případě dojde k narušení adhezních molekul biofilmu držící ho na povrchu předmětu a následnému odstranění.

Narušení matrix biofilmu poté může kolaborovat s dalšími prostředky, například s antibiotiky, jejichž účinnost byla právě díky struktuře biofilmu omezena. To by však neřešilo problematiku rezistentních kmenů bakterií, ale jen překonání mechanické bariéry a vstup do nejhlubších míst biofilmu.

Specifičnost bakteriofágů může být v tomto případě výhodou i nevýhodou. Jako výhoda se dá považovat právě to, že si fág najde konkrétní kmen bakterií a neutočí na ostatní, v mnoha případech pro organismus důležitou mikroflóru. Na druhou stranu má tento fakt dopad i na účinnost terapie. Je důležité najít bakteriofága, který má v biofilmu svého hostitele. Pokud by v biofilmu hostitel nebyl, neměl by fág možnost navázat se na receptor bakterie a vstoupit do lytického reprodukčního cyklu.

Vzhledem k rozšiřující se rezistenci bakterií vůči ATB a potřebě nových metod léčení, získává v posledních letech výzkum terapie pomocí bakteriofágů na významu. Spolu s tím se otevírá spousta otázek zahrnující studie dopadu působení bakteriofágů na organismus léčených pacientů. Zásadní jsou zejména způsoby interakce bakteriofágů, jejich produktů a produktů jejich působení (větší množství zbytků lyzovaných bakterií) s imunitním systémem hostitele a míra schopnosti bakteriofágů rozrušovat a likvidovat vícedruhovou infekci v biofilmech.

Cílem této práce je zjistit jaké bakteriální druhy se účastní infekce močových cest způsobené jejich katetrizací a k těmto bakteriím najít bakteriofágy, které by s velkou pravděpodobností dokázaly infekci vyléčit. Zjistit jaké existují biofilmovou matrix degradující enzymy a jejich možné využití pomocí bakteriofágů při teoretickém léčení infekcí močových cest způsobených jejich katetrizací.

2. Biofilm

Biofilmy jsou mikrobiální společenstva (bakterií, řas, protozoi, kvasinek) chráněna substancí zajišťující jejich soudržnost. Tuto substanci si obyvatelé biofilmu sami extracelulárně secernují. Díky adhesní schopnosti matrixových molekul tak postupně vytváří tenký, gelu podobný, film na tekutinách či různých površích. Těmito místy mohou být i organické povrchy (epitely gastrointestinálního traktu, dýchacích cest, epidermis, apod.) nebo předměty, které se mohou vyskytovat v blízkosti organismu, či do něj mohou být zavedeny (intubační kanyly, močový katetr, apod.). Nadměrná produkce extracelulárních polysacharidů (EPS) vede k postupnému rozšiřování a tím ke zvětšování obytného prostoru biofilmu.

Biofilmy jsou tvořeny jednotlivými buněčnými mikrokoloniemi (15–20 % sušiny) jednoho či více druhů vytvářející nezávislá konsorcia o tisících buňkách. Společně se podílí na tvorbě vlastního životního prostředí. Mikroby (bakterie) kolem sebe produkují glykokalix a EPS (75–80% sušiny) (Saini et al. 2011) skládající se z různých typů (z xanthanů, dextranů, alginátů, celulózy, kyseliny hyaluronové, kyseliny sialové, ...) asociujících s dalšími látkami (NK, proteiny, lipidy, cukry, ...). Největší objem (až 97 % biofilmové masy) je tvořen vodou obsahující živiny, metabolity, části lyzovaných buněk, proteiny, fosfolipidy, NK, apod. (Sutherland 2001).

Biofilmy mohou mít odlišnou strukturu, která souvisí s různým zastoupením jednotlivých mikrobů, fyzikálními vlastnostmi okolí (turbulentní/lineární proudění tekutin) materiálem povrchu, apod. (Sutherland 2001)), množstvím a typem polysacharidů, zastoupením a koncentrací iontů či ostatních makromolekul matrix odpovídajících za stabilitu, viskozitu a za další charakteristické vlastnosti biofilmu.

Polysacharidy se liší svým složením a stavbou podmiňující jejich primární konformaci. Sekundární struktura nabývá tvaru agregovaných helixů. V závislosti na druhu vazby se mění vlastnosti biofilmu. Vazby β -1,4 nebo β -1,3 podmiňují významně rigidní charakter biofilmu. Oproti tomu vazby α -1,2 nebo α -1,6 vedou k tvorbě flexibilních struktur (Sutherland 1997) (další typy vazeb a polysacharidů viz kapitola 4.1. EPS depolymerující enzymy).

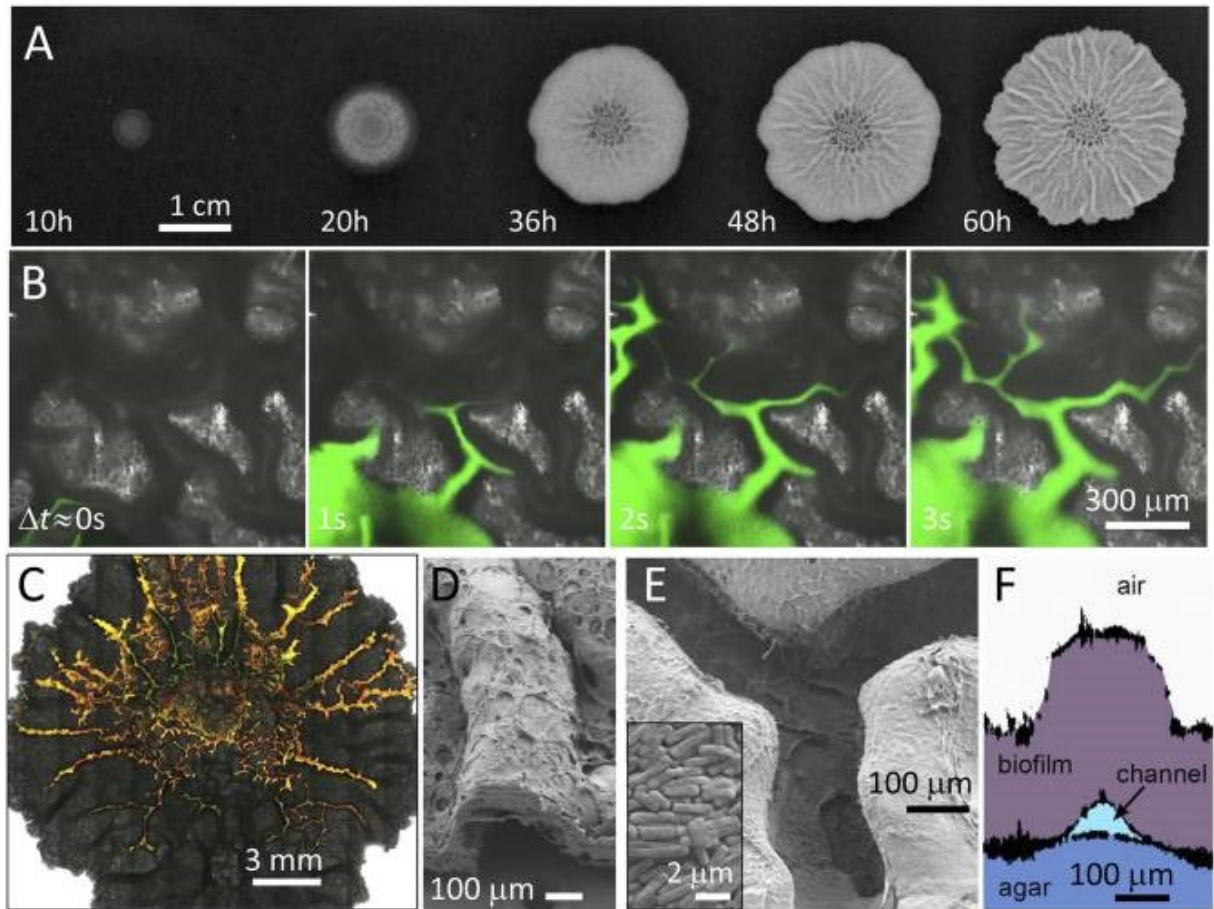
Algináty jsou jednou ze složek EPS produkované, mimo jiné, zástupci Pseudomonád. Skládají se z aniontových lineárních polymerů β -1,4 manuronové

kyseliny a α -L-glukuronové kyseliny. Algináty nejsou esenciální složkou biofilmů, ale hrají důležitou roli v jeho struktuře. Zajišťují hydrataci buněk potřebnou pro jejich přežití.

Odlišné vlastnosti, v tomto případě viskozita, zapříčiní odlišnou efektivitu penetrace skrze biofilm *Pseudomonas aeruginosa* u bakteriofága F116. Viskozita zde byla daná odlišnou koncentrací kationtů Ca^{2+} (Hanlon et al. 2001).

DNA, která byla objevena v matrix biofilmu má také významný dopad na jeho tvorbu a strukturu. Důkazem bylo použití proteinu dnasaI a následná degradace biofilmu u *P.aeruginosa* (Whitchurch et al. 2002).

Krom stavebních látek se na struktuře biofilmu podílí i vodní kanálky. Ty částečně izolují mikrokolonie bakterií a zároveň slouží jako primitivní „cirkulační“ systém biofilmu. Díky EPS, které vytváří pevnou kostru biofilmu, se mohly tyto kanálky vytvořit, aby zajistily přenos esenciálních živin, kyslíku a odvod odpadních látek z nehlubších míst biofilmu. Skrze vodní kanálky je zajištěn i prostup ATB či bakteriofágů. Přestože možnost prostupu bakteriím nebezpečných látek se jeví jako nevýhoda biofilmu, jeho celková strukturovanost a koherence dodává sesilním bakteriím daleko větší rezistenci, než kterou disponují bakterie planktonní (obr. 1).



Obr. 1: Tvorba a struktura vodních kanálů biofilmu *B. subtilis*, upraveno dle (Wilking et al. 2013). (A) Růst biofilmu na agarovém gelu s vodou a živinami. Na výšku biofilm vyrostl o stovky mikrometrů a průměr se zvětšil o pár centimetrů. Lze pozorovat vytvoření vrásek. (B) Po vstříknutí barvy se postupně začala odhalovat místa s kanálky mezi vráskami. (C) Pomocí fluorescenčního barviva se odhalila propojenost kanálků. (D) Rastrovací elektronový mikroskop (scanning electron microscope, SEM) příčný řez vráskou. (E) SEM obrázek zobrazuje mikrostrukturu kanálku. (F) Schéma profilového řezu a zobrazení kanálku v blízkosti agarového gelu.

2.1. Tvorba biofilmu na povrchu katetru

Katetr se při zahájení cévkování dostává do kontaktu s tělními tekutinami. V tomto případě s močí, která se vyskytuje na vnitřním i vnějším povrchu katetru. Glykoproteiny, ionty a polysacharidy se dostanou k povrchu katetru a vytvoří tenký film, ke kterému se přiblíží planktonní bakterie, přisednou a začnou vytvářet biofilm (Tenke et al. 2006). Co se týká souhry organismu Alves et al. 2014 píše (citují): „*Je možné, že některé mikroorganismy mění pH hodnoty produkováním ureázy, jež hydrolyzuje močovinu na amoniak (Tunney et al. 1999). Amoniak navýší hodnoty pH, které reagují s minerály vylučované v moči. Ty vytvářejí usazeninu na katetru stimulující proliferaci biofilmu. Těmito ureázu produkujícími organismy jsou K. pneumoniae, M. morgani, Pseudomonas aeruginosa a Pseudomonas vulgaris (Tunney et al. 1999; Stickler et al. 1993).*”

2.2. Přístup do biofilmu

Biofilmy se vyskytují v mnoha tvarech a strukturách. Co ale má většina společného, jsou vodou vyplněné kanálky. Tento prostor může být cestou pro bakteriofágy, kteří se tak mohou dostat k hlouběji uloženým bakteriím nebo až u dna biofilmu.

Další možností, jak by se bakteriofágy dostaly k bakteriím, je rozrušení povrchové matrix biofilmu pomocí depolymerázy asociované s kapsidou bakteriofága (Hughes et al., 1998). Nebo bakteriální produkci dispersinu B (DspB) (solubilní EPS - depolymeráza) přineseného v NK geneticky upraveného bakteriofága (viz kapitola 5.1. Druhy) (Lu a Collins 2007).

2.3. Funkce biofilmu

Biofilm je pro bakterie velice důležitý v mnoha směrech. Adhezní molekuly, které přichytávají biofilm k různým povrchům vytvoří jakési centrum růstu biofilmu, ze kterého se začne biofilm rozrůstat. Zvětšováním svého objemu vytváří více prostoru pro život bakterií, kterým svým chemickým složením a strukturou zajišťuje ideální niku. Díky kanálkům jsou schopné bakterie mezi sebou komunikovat pomocí Quorum-sensing. Tato komunikace je zprostředkována extracelulárním vylučováním signálních molekul. Bakterie se informují o svém vlastním počtu, o koncentraci živin či o působení stresových faktorů, které by pro ně mohly znamenat nebezpečí.

Pro nás se nejdůležitější vlastností biofilmu stává jeho vliv na rezistenci bakterií vůči ATB. Zastoupení druhů bakterií v biofilmu má zásadní dopad na celkovou rezistenci,

příčemž právě mnohohodruhé biofilmy bývají rezistentnější než jednodruhé, a to jak při působení ATB, tak i při využití bakteriofágové terapie (Tait a Sutherland 2002).

2.3.1. Antibiotika – rezistence

Rizikovým faktorem v léčbě bakteriálních infekcí je stoupající rezistence bakterií podpořená ochrannou funkcí biofilmu. Multirezistentních druhů bylo v přítomnosti biofilmu zjištěno 44,8 % a bez jeho přítomnosti 28,6 %, což poukazuje na fakt, že biofilm se na rezistenci podílí (Alves et al. 2014). Mezi mechanismy, které vedou k této rezistenci, může patřit:

1) **Časové zdržení difuze** v důsledku reakce antibiotických molekul s proteiny EPS tvořící matrix biofilmu. Jedna ze studií poukazuje na působení ciprofloxacinu na biofilm, kde došlo k prodloužení difuzní doby ze 40 sekund bez přítomnosti biofilmu na 21 minut v jeho přítomnosti (Suci et al. 1994).

2) **Stáří biofilmu** - 10 denní biofilm *P. Aeruginosa* byl značně rezistentnější k tobramycinu a piperacillinu než 2 dny starý biofilm (Baillie a Douglas 1998).

3) **Stresové situace** vedoucí k pomalému růstu bakterií. To je způsobeno navýšením toxických metabolitů nebo nedostatkem živin, jež přispívají k tvorbě biofilmu, což se projevuje menší spotřebou antibiotik (Donlan a Costerton 2002).

Rezistence bakterií obývajících biofilmy katetrů byla 100% pro ampicillin, 91,7% pro ciprofloxacin, oproti tomu se s 17,2% rezistencí jevil jako výhodný pro léčení infekcí (konkrétně infekcí močových cest způsobených katetrizací) fosfomycin (Sabir et al. 2017).

Ve studii Alves et al. vykazoval ampicillin 62,1% rezistenci (nejvyšší ze všech použitých), cephalothin 56,9% a kyselina nalidixová, vykazující antibiotické účinky, se potýkala s rezistencí 51,7 %, a u fosfomycinu byla rezistence pouhých 24,1 % (Alves et al. 2014). Tato čísla nám ukazují, že léčení infekcí močových cest způsobených katetrizací se pomocí ATB, díky biofilmu a jeho rezistentním vlastnostem, které bakteriím dodává, potýká v mnoha případech s neúspěchem. Existují ATB, jako například výše zmiňovaný fosfomycin, vůči němuž je rezistence méně vyvinutá. Další výzkumy by se tedy měly zaměřit na využití fosfomycinu společně s bakteriofágovou terapií.

Tyto funkce nám ukazují, jak je biofilm pro bakterie důležitý a jak se bakterie na něm stávají závislé. Pro případnou terapii by mělo být zásadní zaměření se na ničení biofilmu, který svou ochrannou funkcí maří pokusy léčení biofilmových infekcí. Pokud by

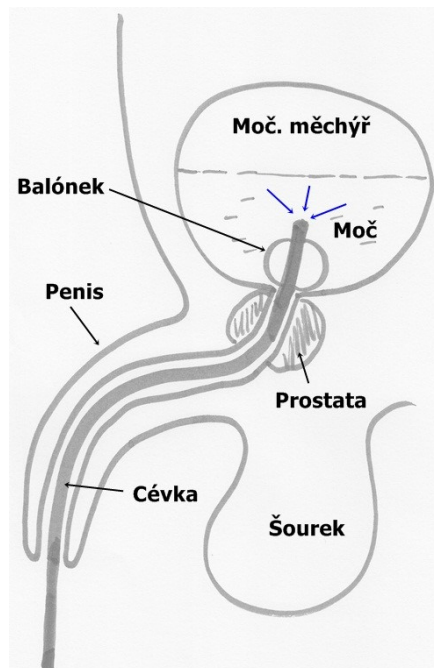
se povedlo zničit matrix biofilmu tak, aby selhala jeho ochrana, otevřel by se prostor pro ATB a fágy, které by provedly finální „pročištění“ vedoucí k definitivnímu zničení bakterií a vyléčení infekce.

Biofilmy jsou výhodné nejen pro bakterie. Jsou součástí potravního řetězce, kde slouží jako živiny pro některý hmyz a další živočichy. Mohou se také podílet na rozpadu látek v půdě a tím zajistit její „čištění“ (v případě předešlé kontaminace půdy). Biofilmy se podílí také na absorpčních procesech rostlin. Podílí se na čištění vod a odpadních vod nebo na biologickém louhování kovů.

Pokud se ale biofilm začne vytvářet v živém organismu, vyvrcholí jeho tvorba většinou v infekci. Ta se pak stává díky jeho ochranným vlastnostem těžko léčitelná. Bakterie asociované s biofilmem se projevují větší rezistencí vůči ATB a díky agregaci buněk a produkci endotoxinů se také stávají rezistentní i vůči hostitelské imunitě (Donlan a Costerton 2002).

3. Infekce močových cest způsobené katetrizací

Katetrizace (cévkování) je zákrok, při kterém se zavádí do močové trubice pomůcka (katetr, cévka) zprostředkávající stálé vylučování moči (obr. 2). Zákrok se provádí na základě několika indikací (retence/inkontinence moči, odběr sterilní moči, měření diurézy, aplikace léků do močového měchýře, při poruchách vědomí, zvětšení či rakovině prostaty, ...). Zavedení katetru vyžaduje důkladnou hygienickou péči a v případě permanentních (30 dní a více) katetrů pravidelnou výměnu.



Obr. 2: Schématické znázornění zavedení katetru (cévky) do mužské močové trubice (zdroj: <http://www.stefajir.cz/?q=cevkovani>)

Infekce močových cest (urinary tract infections, UTI) v důsledku zavedení katetru (catheter-associated urinary tract infections, CAUTI) se u pacientů mohou začít projevovat již po několika málo dnech od provedení zákroku. UTI patří s prevalencí 36 % (Allegranzi et al. 2011) k nejčastějším nozokomiálním infekcím. V USA bylo 97 % UTI způsobeno katetrizací (CAUTI) (Richards et al. 2000). V průměru 12–16 % dospělých pacientů je katetrizováno v průběhu hospitalizace a každým dnem se zvyšuje riziko získání infekce o 3–7 % (Evelyn Lo et al. 2014). Léčba CAUTI se provádí v první řadě za pomoci širokospektrálních ATB. Na základě odebraných vzorků se typ medikamentů upravuje. Kvůli zvýšené pravděpodobnosti vzniku biofilmu se co nejrychleji katetr vyměňuje za nový (Tenke et al. 2017).

Ke studii (Sabir et al. 2017) CAUTI a tvorbě biofilmu byli vybráni pacienti, u kterých se do dvou dnů od zavedení katetru projeví alespoň dva symptomy související s tímto druhem onemocnění (febrilní tělesná teplota až hyperpyrexia, 38 °C a vyšší, zvýšená citlivost podbřišku, zvýšená citlivost až bolest v costovertebrálním úhlu, frekventované nutkání k močení,...). Výzkum zjistil odlišnost projevu CAUTI související s pohlavím pacienta, dobou zavedení katetru a druhu katetru. Z celkového počtu 1 070 pacientů vykazujících symptomy CAUTI bylo 840 (78,5 %) mužů a 230 (21,49 %) žen (Sabir et al. 2017). Delší doba katetrizace zvyšovala pravděpodobnost tvorby biofilmu, stejně tak jako vzrůstající počet předešlých katetrizací (Maha et al. 2010). Materiálem náchylnějším k tvorbě biofilmu byl latexový katetr, u něhož byla tvorba biofilmu potvrzena v 93,9 % z celkového počtu zavedených latexových katetrů. Oproti tomu zavedené silikonové katetry vedly k tvorbě biofilmu v 44,6 % případů z celkového počtu zavedených silikonových katetrů (Sabir et al. 2017). Huang et al. k materiálům dodává, že silikonové katetry spíše podráždí močovou sliznici a častěji dochází k poranění močových cest. O vzniku infekce rozhoduje i výběr systému katetru – volí se mezi otevřeným a uzavřeným systémem s rozdílným zásobníkem moči, který při otevřeném systému komunikuje s vnějším prostředím, což zvyšuje pravděpodobnost vzniku infekce (Hessen et al. 2000).

3.1. Bakterie vytvářející biofilmy u CAUTI

Zástupci, kteří se u pacientů s CAUTI ve studii Sabir et al. 2017 (8 nemocničních zařízení v okolí Rávalpindí/Pakistán, 1070 vzorků) nejčastěji vyskytovali, byli *Escherichia coli* v 52,3 % případů a *Klebsiella pneumoniae* ve 14,5 %. Sabir poté rozdělil procentuální zastoupení druhů v závislosti na tvorbě biofilmu a tím zjistil, které bakterie se nejvíce podílí na vytvoření biofilmu. Těmito zástupci byli *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* a další uvedené níže (tab. 1) (Sabir et al. 2017).

	Rozdělení dle tvorby biofilmu			
	vytvořen (n = 785)		nevytvořen (n = 285)	
	n	%	n	%
<i>Acinetobacter</i>	10	66.7	5	33.3
<i>Citrobacter freundii</i>	40	72.7	15	27.3
<i>Enterobacter cloacae</i>	35	87.5	5	12.5
<i>Enterococcus faecium</i>	95	79.2	25	20.8
<i>Escherichia coli</i>	385	68.8	175	31.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	135	87.1	20	12.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	72.7	15	27.3
Ostatní	45	64.3	25	35.7

Tab. 1: Procentuální podíl účasti bakterií při onemocnění CAUTI v závislosti na vytvoření, anebo nevytvoření biofilmu, převzato z Sabir et al. 2017.

Choe et al. potvrzuje, že *E. Coli* a *E. Cloacae* jsou přítomni ve většině biofilmů močových katetrů a dále uvádí druh *Pseudomonas aeruginosa* s 15,2 % (Choe et al. 2012) a *Staphylococcus aureus* 11,7 % (Abdallah et al. 2011). Tyto bakterie se jeví jako nejvýznamnější patogeny způsobující CAUTI. Zastoupení jednotlivých druhů se v různých studiích liší. V tabulce jsou některé výsledky shrnuty (tab. 2).

Studie⇨	Abdallah	Dias	Tedja	Choe	Murugan
Druh⇩	2011	2003	2015	2012	2016
<i>E. Coli</i>	31,7 %	26,06 %	36 %	18,4 %	
<i>K. Pneumoniae</i>	15 %	15,42 %	6%	8.2 %	
<i>S. Aureus</i>	11,5 %	4,78 %	4%		24 %
<i>Enterobacter</i>	1,7%	5,85 %	8%	5.1 %	
<i>Enterococcus</i>	11,7 %	11,17 %	24%		14 %
<i>P. aeruginosa</i>	6,7 %	15,42 %	12%	15,2 %	18 %

Tab. 2: Znázorňuje studie biofilmů CAUTI a procentuální poměry zastoupení druhů bakterií. V popisku v závorce jsou vypsány další objevené bakterie: **Abdallah et al. 2011** – Káhira/Egypt 72 vzorků (*Proteus* (10%). **Dias Neto José Anastácio et al. 2003** – São Paulo/Brazílie 188 vzorků (*Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Citrobacter*, *Serratia*). **Tedja et al. 2015** – Minnessota/USA 105 vzorků (*M. morgani*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*). **Choe et al. 2012** – Seoul/Jižní Korea 4 vzorky, až 80 druhů bakterií (*Veillonella*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Raoultella*, *Bacteroides*, *Edwardsiella*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Stenrophomonas*, *Streptococcus*). **Murugan et al. 2016** – Erode/Indie 50 vzorků, nejčastější druhy uvedeny v tabulce, zbývajících 44 % uvádí jako ostatní bakterie.

Prostředí moči má kvůli svým vlastnostem (pH, koncentrací solí a cukrů, teplotě) vliv na formování biofilmu. V těchto podmínkách se *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *E. faecalis* projevují velkou schopností tvorby biofilmu (Murugan et al. 2016). Různé studie dále uvádí, že *S. aureus* je primárním patogenem CAUTI a potenciálním rezervoárem pro tvorbu infekcí (Choi et al. 2009).

Získáním informací o bakteriích, které se nejčastěji nachází v biofilmech CAUTI nám pomůže vybrat pro terapii bakteriofágy, kteří by dokázaly infikovat bakterie a pomocí EPS depolymerizujících enzymů rozrušit strukturu biofilmu. Což by vedlo k vyléčení infekce (popřípadě za pomoci účinných ATB).

4. Bakteriofágy

Jsou viry infikující bakterie. Vyskytují se prakticky na všech místech osídlených hostitelskými bakteriemi. V dnešní době se díky svým vlastnostem a možnostem označují za 'živé nebuněčné entity'. Dělení bakteriofágů je založeno na jejich tvaru, velikosti a typu genetické informace (tab. 3).

NK		řád a rodina	Počet členů	Příklady	(Hostitelé)
ds DNA	L	<i>Caudovirales</i>	4900	<i>(Enterobakterie)</i> T4, P1, P2, Mu, SPO1 (<i>E.Coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i>) λ , T1, T5, L5, c2 (<i>E.Coli</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>mycobacterium</i>) T7(<i>E.Coli</i>), P22(<i>Salmonella</i>), Φ 29 (<i>Bacillus</i>)	
		<i>Myoviridae</i>	1243		
		<i>Siphoviridae</i>	3011		
<i>Podoviridae</i>	696				
		<i>Lipothrixviridae</i>	6?	TTV1	<i>Archea</i>
		<i>Rudiviridae</i>	2	SIRV1	<i>Archea</i>
		<i>Tectiviridae</i>	18	PRD1	<i>Enterobakterie,</i> <i>Pseudomonady, Vibria,..</i>
	C, SH	<i>Plasmaviridae</i>	6	L2	<i>Acholeplasma</i>
		<i>Fuselloviridae</i>	8?	SSV1	<i>Archea</i>
		<i>Corticoviridae</i>	3?	PM2	<i>Alteromonas</i>
ss DNA	C, SH	<i>Microviridae</i>	40	Φ X174	<i>Entero.-Chlamidie,</i> <i>Spiroplasma</i>
		<i>Inoviridae</i>	57	fd	<i>Entero- Pseudomonady</i>
ss RNA	L	<i>Leviviridae</i>	39	MS2	<i>Entero. – Acinetobacter,</i> <i>Caulobacter, Pseudomonas</i>
ds RNA	L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	Φ 6	<i>Pseudomonady</i>

Tab. 3: Rozdělení bakteriofágů dle jejich genetické výbavy, upraveno dle Abedon et Calendar 2006. **L** – lineární, **C** – cirkulární, **SH** – suprahelikální, **ds** – double stranded (dvojitězřezový), **ss** – single stranded (jednořezový).

Existují dva životní cykly bakteriofága:

1) Lysogenní cyklus – nejlépe prostudovaný na fágu λ (*E.Coli*). Po vstupu do bakterie se lineární DNA fága spojí v cirkulární (imitace plazmidu). Fág si nechá biochemickým aparátem buňky nasyntetizovat protein zvaný integráza, jejíž gen si přináší ve své NK. Integráza využije mechanismu místně specifické rekombinace (rozeznání specifické sekvence v genomu bakterie a určité sekvence ve “svém“ virovém genomu). Dojde k rozštěpení obou kruhových DNA a jejich propojení. DNA fága se tak stává

součástí genomu bakterie a jako profág se přenáší do dalších generací. Tento proces přenosu a integrování DNA se nazývá transdukcce. V případě negativního vlivu prostředí se genom fága uvolní z genomu bakterie, nechá si nasyntetizovat proteiny virového obalu a přechází do lytického cyklu jehož výsledkem je pomnožení viru a jeho uvolnění se z bakterie za jejího rozpadu.

Procesem lyzogenní konvergence, jež spočívá v přenosu genetické informace fága do genomu bakterie, může fág ovlivnit expresi genů a zapříčinit tak vznik patogenních kmenů. Jelikož nedochází k okamžité lýze buňky, stává se bakteriofág s lysogenním cyklem nevýhodný pro terapii.

- 2) Lytický cyklus – po injektování DNA dojde k její transkripci a replikaci. Z transkribovaných mRNA vznikají proteiny důležité pro sestavení nových virových obalů, do kterých se inkorporuje zreplikovaná NK fága. Fág poté přiměje buňku k produkci lysinu (lysozymu), který rozloží buněčnou stěnu vedoucí k uvolnění nových virionů.

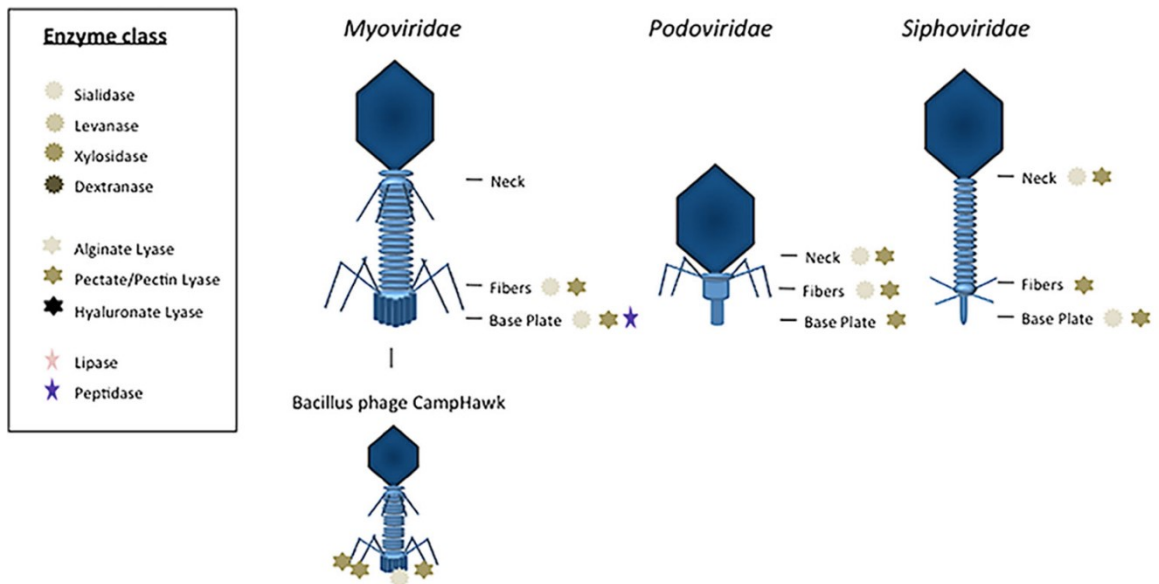
Lytický cyklus fága může mít v této souvislosti také dopad na okolí. Lýzovaný obsah bakterie může být pro organismus toxický, nebo může vést k nepřiměřené mobilizaci imunitního systému. Tento vedlejší účinek terapie by tak mohl mít nepříznivý dopad na organismus.

Regulace lyzogenního/lytického cyklu je nejlépe prostudována u bakteriofága λ . Bakteriofágové geny **cl** a **cro** se jako „přepínač“ účastní regulace cyklu. Jejich odlišná míra exprese rozhoduje mezi lysogenní fází anebo lytickou fází. Exprese represorového proteinu **cl** vede k umlčení ostatních fágových genů důležitých pro lytický cyklus a k aktivaci své vlastní transkripcce a transkripcce integrázy. Tím je bakterii umožněno se dělit a vertikálně tak rozšiřovat virovou DNA v podobě profága. K uvolnění z bakteriální DNA dochází při zvýšené expresi genu **cro**, který působí jako antagonist k **cl**. To znamená, že umožní expresi genů potřebných pro vytvoření a uvolnění virionů lýzou bakterie (Gandon 2016).

Bakteriofágy mohou přinášet ve své NK kromě potřebných genů pro sestavení virionů nebo dokončení lytického cyklu i geny, které budou napomáhat novým virionům v rozšiřování mimo buňku. Tyto enzymy zajišťují bakteriofágům vstup skrze matrix biofilmu tím, že rozkládají EPS. Díky tomu dostaly název EPS – depolymerující enzymy.

4.1. EPS depolymerující enzymy

Jsou enzymy, které dokážou štěpit vazby mezi cukernými složkami extrapolysacharidů matrix biofilmu. Dle review (Pires et al. 2016) bylo zjištěno, podle osekvenovaných genomů fágu z databáze NCBI, že existuje přes 143 fágem kódovaných depolymeráz z údajného celkového počtu 160 (43 *Myoviridae*, 47 *Siphoviridae*, 37 *Podoviridae*, 16 nebylo klasifikováno). Tyto enzymy se dělí podle enzymatické aktivity nebo podle umístění/formy. Enzymy se vykytují 1) asociované s kapsidou fága (126 depolymeráz) (obr. 3) a jako 2) solubilní proteiny (20 depolymeráz) (Pires et al. 2016), které byly nalezeny ve fágových lyzátech hostitelské bakterie (Sutherland 1995, Sutherland et al. 2004).



Obr. 3: Umístění a typy EPS – depolymeráz na kapsidách fágů, upraveno dle (Pires et al. 2016).

Podle enzymatické aktivity se dělí na **hydrolázy** (O-glykosid, hydrolýza glykosidické vazby) a **lyázy** (polysacharidové lyázy, hydrolýza mezi 1,4-glykosidické vazby a zbytkem kyseliny močové).

Mezi hydrolázy patří **sialidázy**, které štěpí α -vazbu mezi terminální sialovou kyselinou a různými glykany (bakterie zakomponují sialovou kyselinu do kapsuly a tím se snaží uniknout hostitelské imunitě). **Levanázy** hydrolyzují β -2,6-vazbu levanu

(polysacharid z fruktózy vyskytující se v biofilmech *Pseudomonas* a *Bacillus*). **Xylosidázy**, **Dextranázy** a **Rhamnosidázy** patří mezi nejvzácnější. Hydrolyzují stejnojmenné cukry. **Peptidázy** působí na γ -vazby kapsulárních glutamátů (poly- γ -glutamát).

Lyázy se dělí na **hyaluronidázy**, které štěpí β -1,4-glykosidickou vazbu hyaluronátu a glukosaminoglukanu. **Alginát-lyázy** ničí vazby lineárních dvou polysacharidů tvořících algináty, a to β -D-manuronové kyseliny a α -L-glukuronové kyseliny. **Pektinové/pektátové lyázy** zajišťují štěpení galakturonové kyseliny převážně tvořené rostlinami, ale i některými bakteriemi. V tabulce jsou shrnuty enzymy společně s fágy se kterými jsou asociované a bakteriemi produkující biofilm z příslušných polysacharidů (tab. 4).

Typ	Skupina	Fág	V biofilmech těchto druhů
Hydrolázy	Sialidázy	mnoho fágů, majoritně u fágů <i>Staphylococcus</i>	<i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>
	Levanázy	fág SP10 (jediný nalezený s touto aktivitou)	<i>Bacillus</i>
	Xylosidázy	fág <i>Caulobacter</i>	<i>Caulobacter</i>
	Dextranázy	Fág <i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
	Rhamnosidázy	Fág P22, SF6, HK620	<i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>
	Peptidázy	Bobb, phiAGATE, SPP1, phiNIT1 (fágy <i>Bacillus</i>)	Gram-pozitivní bak., <i>Bacillus</i>
Lyázy	Hyaluronidázy	phiNIH1, P9	<i>Staphylococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus</i>
	Alginát-lyázy	PT-6, fág <i>Azobacter</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Azobacter</i>
	Pektinové /pektátové lyázy	ϕ 15 , AF	<i>Pseudomonas putida</i>

Tab. 4: Rozdělení EPS – depolymerujících enzymů dle jejich typu (místo štěpení cukerných vazeb), skupin (které cukry štěpí), fágů (s kterým fágem jsou asociované) a biofilmů, kde jsou účinné (rozdělení podle producentů biofilmu). Vytvořeno na základě údajů v Pires et al. 2016.

Komerčně dostupné solubilní EPS depolymerázy jsou běžně k dostání dvě. **Alginát lyáza** (Sigma-Aldrich) a **dispersinB (dspB)** hydroláza (Kane Biotech) (Pires et al. 2016). Jejich výhodou je, že působí na rozpad biofilmu i bez přítomnosti fágů, takže se 100 % účinností (viz kapitola 5.1.4. *E.Coli*).

Ty bakteriofágy, které napadají producenty biofilmu, si pravděpodobně přináší s sebou v NK geny pro enzymy degradující EPS (Hughes et al. 1998).

Rozpadem EPS dochází k postupné degradaci matrix biofilmu. To umožňuje jednak bakteriofágům lepší přístup do hlubších vrstev – napadení hluboko usídlených bakterií a zároveň otevření cesty pro další látky (např. antibiotika) kterým, kvůli této bariéře, byl přístup k bakteriím omezen, či přímo znemožněn.

Obě tyto formy degradující biofilm by bylo možno rozdělit z hlediska funkce v závislosti na cyklu fága. A to na 1) depolymerázu potřebnou pro průnik bakteriofága a 2) disperzi nových virionů.

Depolymeráza asociovaná s kapsidou slouží k průniku skrze biofilm k hostitelské bakterii, degradaci glykokalixu kapsule vedoucí k zpřístupnění receptoru a navázání. Oproti tomu solubilní forma EPS – depolymerujícího enzymu (např. DspB) se při lýze bakterie uvolní společně s nově vzniklými viriony a díky své účinné difuzní schopnosti se rychleji dostane k EPS, degraduje ji a tím vytvoří “únikovou” cestu pro viriony směřující k dalšímu hostiteli.

Tyto depolymerázy, jak je vidět, rozrušují biofilm nezávisle na tom, jestli je jejich konkrétní hostitel přítomen. Stačí pouze, aby složení biofilmu odpovídalo účinkům depolymerázy. Např. bakteriofág SF153b, specifický pro *Enterobacter agglomerans*, obsahoval ve své kapsidě EPS depolymerázu, kterou využíval k tomu, aby mohl prostoupit skrze biofilm a zpřístupnit si tak receptor pro vstup do bakterie. Většina biofilmu byla odstraněna ještě dříve, než došlo k lýze bakterie (Hughes et al. 1998). Tento výzkum nám ukazuje možnost využití bakteriofága s asociovanou depolymerázou, který dokáže rušit EPS okamžitě, aniž by narazil na hostitelskou bakterii.

Bakteriofág PK1A se vyznačuje endosialidasovou aktivitou části ocásku, která degraduje polysialovou kyselinu kapsuly E. Coli (K1) (Pelkonen et al. 1992).

Nejúčinnějším bakteriofágem by byl ten, který by byl schopen produkovat velké množství **EPS – depolymerazy** a zároveň měl velký lytický potenciál s tvorbou nových virionů. Tímto by se prvotně malé iniciační množství použitých bakteriofágů dalo několikanásobně amplifikovat. Po první lytické fázi by EPS-depolymeráza zpřístupnila množství bakterií, které by bylo umístěno hlouběji pod ochranou biofilmu. Takto by ze začátku nemusel bakteriofág prostupovat skrze kanálky, ale mohl by začít působit hned na povrchové bakterie a postupně, rozvolňováním matrix, se dostávat hlouběji až k

podložce, kde by, v nejlepším případě, dokázala depolymeráza rozvolnit vazbu mezi podložkou a adhezními molekulami, a tak zbývající biofilm zcela uvolnit.

Po identifikaci bakterií, které se účastní infekcí močových cest, je možné vybrat enzymy, které by rozložili konkrétní biofilm CAUTI.

5. Terapie CAUTI

Využití bakteriofágů na hubení bakterií a zároveň na ničení biofilmů by mohlo do budoucna patřit k rutinní záležitosti a preventivně tak ochránit pacienty od nemocničních chorob. Měli bychom se zaměřit na konkrétní bakteriofágy, kteří mají v biofilmech své hostitele.

Zásadním faktorem je zjištění druhu bakterií (např. molekulárními metodami jako jsou: denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), pyrosekvenování, kapilární elektroforéza), které se podílí na tvorbě biofilmu, anebo jsou ve většině biofilmech přítomny a na tyto druhy zaměřit terapii. Na základě těchto informací by se měl vybrat bakteriofág, schopný infikovat tyto skupiny bakterií. Další možností je vytvořit koktejl bakteriofágů, který by dokázal společně zabránit/odstranit infekci. Bakteriofág by měl, pro úspěšnost terapie, splňovat určitá kritéria:

- 1) velký hostitelský rozsah (viz níže),
- 2) schopnost přežít v podmínkách daném prostředí (= v moči – teplota, pH,....),
- 3) neměl by mít lysogenní či transdukční potenciál (viz kapitola 4. Bakteriofágy),
- 4) schopnost účinně lyticky inaktivovat bakterie (Skurnik a Strauch 2006),
- 5) mít/nemít imunogenní potenciál – (viz kapitola 7. Výhody a nevýhody),
- 6) geneticky dobře manipulovatelný (např. k inkorporaci genu pro *dspB*, možnost rozšíření jeho hostitelského rozsahu (viz kapitola 5.1.4 *E. Coli*),
- 7) způsob podání a rozšíření v systému (viz kapitola 6. Testy *in vivo*).

Bakteriofágy se vyznačují svoji specifíčností, která se může u jednotlivých druhů lišit. Specifíčnost je určena hostitelským rozsahem. Hostitelský rozsah by měl být široký a působit tak na většinu kmenů, či dokonce druhů bakterií a tím zajistit úspěšnost terapie. Příkladem s velkým rozsahem je bakteriofág T4. K lýze 500 kmenů *E. Coli* z myšního GITu byly využity 4 kmeny bakteriofága T4 (lišící se délkou bičíku a koncových vláken), které stačily na potlačení všech *E. Coli* (Chibani-Chennoufi et al. 2004). Schopnost bakteriofága potlačit všechny kmeny se zdá na první pohled pro terapii přínosnou. Musíme vzít v potaz fakt, že díky této schopnosti se bakteriofág připravuje o svoji specifíčnost, jejíž

výhodou bylo napadání konkrétních kmenů a ignorování pro organismus důležitých bakterií (např. střevní mikroflóry) (Skurnik a Strauch 2006). Další výzkumy by se měly zaměřit na bezpečné zvětšování hostitelského rozsahu.

Pro ničení EPS by měl bakteriofág obsahovat gen produkující EPS depolymerující enzym. Ukazuje se, že takovéto druhy, které jsou schopny indukovat lytický cyklus a zároveň přirozeně produkovat EPS-depolymerazu skutečně existují (Hughes et al. 1998). Ale jejich izolace a kultivace je prakticky nemožná. Naštěstí můžeme pomocí genového inženýrství podobného bakteriofága vytvořit (viz níže).

Co se týká močových katetrů, tak jak jsme zjistili, procentuálně nejvíce zastoupenými skupinami jsou druhy *Escherichia Coli*, *Enterobacter cloacae* a *Klebsiella pneumoniae*. Tito zástupci bývají při CAUTI přítomni ve většině případů. Bakteriofágovou terapii bych zaměřil na tyto bakterie a na jejich ničení.

5.1. Druhy

5.1.1. E. Cloacae

Při studii působení bakteriofágů na několik kmenů *E. Cloacae* se potvrdil velký potenciál fágové terapie. V pokusu (Pereira et al. 2016) se zkoumaly 3 druhy fágů a jejich efektivita inaktivace *E. Cloacae* na fosfátovém pufru (phosphate buffered saline, PBS) a v moči. Fágy byly použity individuálně a v kombinacích jako koktejl. Z fágů E2, E3, a E4 se vytvářely koktejly, které ničili účinněji kmeny *E. Cloacae*, než když byly fágy použity samostatně. Při působení jednotlivých fágů docházelo ke zničení kmenů *E. Cloacae*, přičemž nejúčinnějším fágem byl E4 dále E3 a nejméně účinný E2. Využití koktejlů dvou fágů vedlo k lepším výsledkům, až na kombinaci fágů E3/E4. Pravděpodobně oba tyto fágy využívají stejný receptor pro vstup do bakterie a tím se omezuje účinnost působení (Pereira et al. 2016). Nejúčinnějším v inaktivaci *E. Cloacae*, která se vyskytovala v moči, byl koktejl E2/E4. Moč svým pH snížila efektivitu koktejlu, ale i přes to došlo ke zničení bakterií. Bakteriofágové E2/E4 byly dostatečně viabilní a přeživali v moči po 12 hodin (Silva et al. 2014).

Zajímavé bylo zjištění, že při pokusech dokázaly fágy ničit nejenom *E. Cloacae*, ale i další druhy bakterií z rodiny *Enterobacteriaceae* (*E. coli* AN19 a *Shigella flexneri* DSM 4782) (Pereira et al. 2016).

Fakt, že jejich genetická informace neobsahuje geny pro produkci toxinu, ATB rezistence či integrasové enzymy z nich dělá adepty pro využití v bakteriofágové terapii při léčení CAUTI.

5.1.2. *K. Pneumoniae*

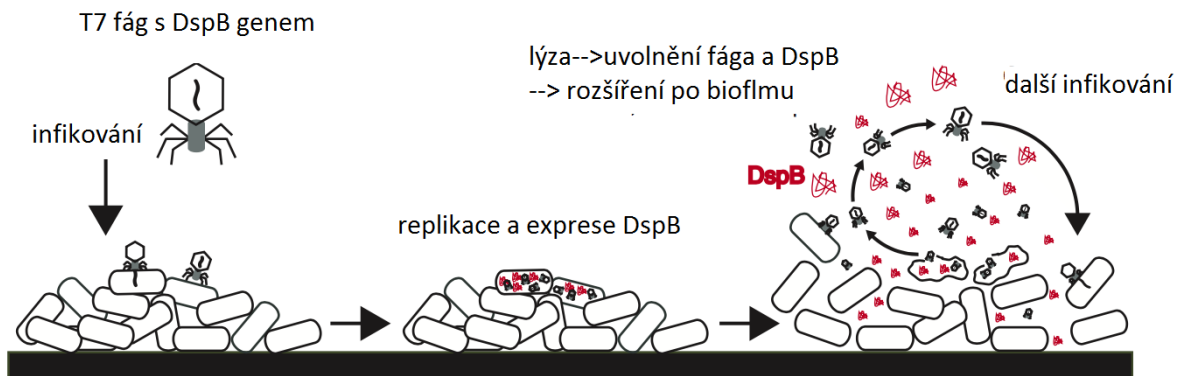
Pro druh *K. Pneumoniae* byl testován fág KPO1K2 vykazující velký hostitelský rozsah, při kterém byl schopen napadnout 7 z 25 klinicky testovaných kmenů *K. Pneumoniae* (pro další testy byly využity kmeny B5055 a 43816) a *Escherichia coli* (ATCC 25922). Jeho účinnost a schopnost lyzovat bakterie byla v rozsahu pH 4–11, přičemž maximální stabilitu vykazoval při pH 7. Fág byl schopen infikovat v rozsahu teplot od 25–40 °C, kde se teplota 37 °C pro něj jevila jako nejpříhodnější a malé odchylky od této teploty neznamenal pro jeho funkci zásadní problém. Fág byl testován na myších za účelem léčení infekcí močových cest, kde pro tuto možnou terapii bylo přínosné, že po intravenózním injikování se titr bakteriofágů mezi krví, ledvinami a močovými cestami lišil, a to tak, že z krve po byl fág odstraněn dříve než z ledvin a močových cest. Díky tomuto faktu, hostitelskému rozsahu, pH a teploty při, které je schopen lyzovat bakterie, se stává dalším možným adeptem pro fágovou terapii CAUTI (Verma et al. 2009).

5.1.3. *E. Coli*

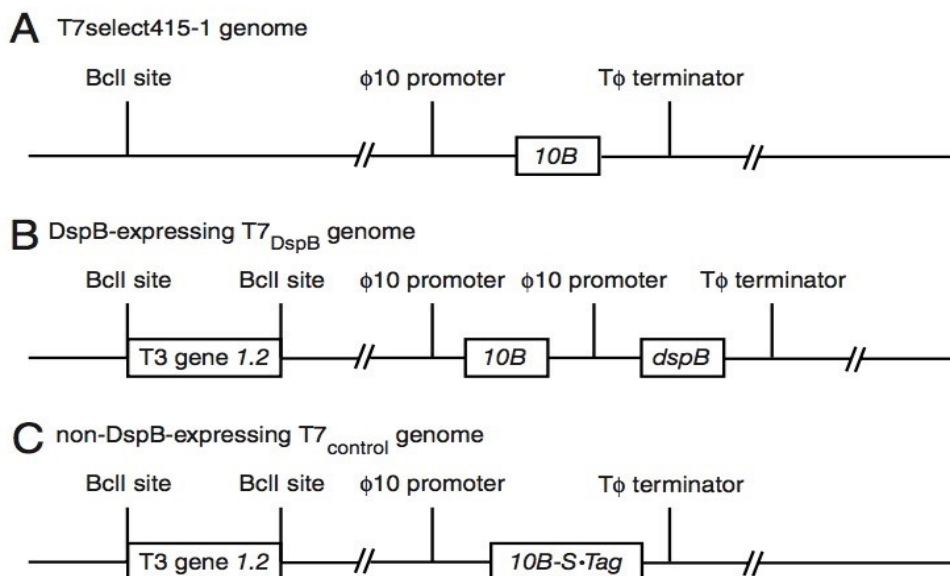
Timothy K. Lu a James J. Collins 2007 geneticky upravili bakteriofága T7 (obr. 4) specifického pro *E. Coli* inkorporací genu pro EPS-depolymerazu, konkrétně pro **dispersin B** (DspB). Aby zajistili silnou expresi toho proteinu, zvolili jako místo pro vložení genu oblast, jež je pod kontrolou silného $\Phi 10$ promotoru (obr. 5). K pokusu použili *E. Coli* TG1, která produkuje silný biofilm. Kvůli přítomnosti F-plasmidu v TG1 se nemohl fág T7 replikovat, a tak byl do jeho genomu zakomponován navíc i gen 1.2 z fága T3, čímž se zvětšil jeho hostitelský rozsah a mohlo docházet k jeho replikaci, aniž by byla omezena jeho lytická schopnost. Tento fakt znázorňuje možný způsob genetických modifikací za účelem rozšíření působnosti fágů. Takovýto fág se stává univerzálnějším v souvislosti s jeho použitím včetně inkorporace odlišných genů pro EPS-depolymerázu s cílem specifitějšího a účelnějšího působení na odlišné druhy biofilmů.

K porovnání účinnosti pokusu (Lu a Collins 2007) byl vytvořen kontrolní T7_{control} fág bez genu dspB, jež byl použit na kontrolní biofilm. Po 48 hodinách od infikování fágy, měl biofilm, na který bylo působeno T7_{dpsB}, o 4,5 řádů menší hustotu

osídlení *E.Coli*. Nejzásadnějším faktem se však stalo procentuální zmenšení biofilmové masy po 48 hodinách ve srovnání s kontrolním biofilmem, a to o $\approx 99.997\%$.



Obr. 4: Geneticky upravený fág T7 s genem pro DspB, upraveno dle (Lu a Collins 2007).



Obr. 5: Genom fága geneticky upraveného pro ničení biofilmu, upraveno dle Lu a Collins 2007. (A) Fág s BclI sekvencí a capsidovým genem (10B). (B) fág exprimující DspB (gen v blízkosti silného promotoru $\phi 10$, obsahující T3 gen 1,2 (zvětšení hostitelského rozsahu) a kapsidový gen (10B). (C) kontrolní fág bez genu pro DspB, obsahující T3 gen 1,2 (zvětšení hostitelského rozsahu), obsahující kontrolní 10B-S-Tag gen pro kapsidový protein (rozpoznání od typu (B)).

Prozatím nejzajímavějším adeptem pro terapii je geneticky modifikovaný bakteriofág T7 pro *E. Coli* vytvořený Lu a Collins. Funkčnost tohoto modelu nám dává naději pro vytvoření bakteriofága, který by s jistotou měl svého hostitele v biofilmu, a který by s sebou nesl gen pro EPS-depolymerační enzymy. Důležitým faktorem pro úspěšnost fága bude získaná schopnost infikovat více kmenů stejného či odlišných druhů. Po tomto zvětšení hostitelského rozsahu se zvětší i pravděpodobnost infekce fágem. Dalším krokem by mělo být prozkoumání složení a přesné struktury EPS biofilmu katetru. Musíme se rovněž ujistit, zda by použitý DspB zničil biofilm CAUTI. Pokud ne, mohla by se najít jiná specifitější/účinnější depolymeraza, tak jak interpretoval (Lu a Collins 2007).

6. Terapie *in vivo*

První studie, která proběhla na lidských dobrovolnících byla studie bakteriofága T4 pro intestinální *E. Coli*. Výsledek terapie sice neukázal kladné hodnoty, co do změny počtu *E.Coli*, ale prozradil nám, že při orálním podáním bakteriofága nedochází k mobilizaci imunitního systému vůči fágům a ani k žádným dalším závažným (pouze sucho v ústech, zvýšená peristaltika střev, ...) vedlejším účinkům. Po týdnu od podání, nebyly po fázích nalezeny žádné stopy. Neúspěšnost terapie je přisuzována malému hostitelskému rozsahu fága T4, který byl vybrán hlavně z důvodu dokonalé znalosti jeho genomu, a jistoty, že neobsahuje žádné toxické geny (Bruttin a Brüssow 2005). Další výzkumy ale ukázaly, že fág imunitnímu systému jednoduše neproklouzne. Při podávání fága T4 pitnou vodou myším po dobu 240 dní se v průběhu pokusu začaly vytvářet protilátky (IgM, IgG a IgA) (Joanna Majewska et al. 2015). Podávání stejných fágů vede u organismu, který se s tímto antigenem již setkal, k daleko rychlejší tvorbě protilátek a zničení fágů hostitelkou imunitou. Proto by měla být terapie navrhnutá tak, aby se účinně a co nejrychlejším způsobem infekce odstranila. Dále by u léčení CAUTI bylo lepší využití lokálního podání fágů. Tím by se zabránilo ztrátám, ke kterým při intravenózním podáním dochází (při podání fága T4 myším intravenózně, bylo po 30 minutách pomocí Kupfferových buněk jater zničeno přes 99% fágů (Inchley 1969)). Při lokálním podání je navíc menší pravděpodobnost, že dojde k vytvoření k reakci s hostitelskou imunitou a vytvoření protilátek.

7. Výhody a nevýhody

7.1. Nevýhody

Zjišťujeme, že spousta bakteriálních populací se stává rezistentní nejen proti ATB, ale i proti bakteriofágům, v jejichž přítomnosti dokážou bakterie přežít. Tato rezistence je založena na změnách v bakteriálním genomu vedoucí například ke změně povrchových receptorů bakterie, načež fág může odpovídat přestavbou svého vlastního genomu a změnou receptoru, či využitím jiného receptoru bakterie (Heller 1992). Bakterie jsou schopny produkce restričních endonukleáz rozrušujících DNA fága a tím ho zničit. Dále bakterie imponují fenotypickou rezistencí, která se může projevit (Bull et al. 2014):

- 1) Změnou exprese receptoru na základě produktů lýzovaných buněk, což vede ke snížení adsorpce bakteriofága.
- 2) Snížení adsorpce na základě fyziologického stavu bakterie.
- 3) Blokováním receptorů fágovými proteiny, uvolněnými během lýze buňky.

Časté mutace fágů mohou vést ke ztrátě schopnosti infikovat další bakterie (Filippov et al. 2011).

Při enzymatické degradaci EPS dojde k uvolnění bakterií a zpřístupnění receptorů pro infekci fágy, ale zároveň se tak otvírá prostor pro jiné druhy bakterií, které začnou pracovat na tvorbě biofilmu na základě svých vlastních EPS, které enzym nemusí ničit. Tímto způsobem by se ve výsledku stavba biofilmu po působení EPS-depolymerázy mohla naopak posílit (Walker et al. 2007).

Dříve než by se terapie mohla zavést, musí být zajištěno několik zásadních informací týkajících se: výsledků klinických testů na zvířecích modelech včetně farmakokinetiky, screeningu fágů vhodných pro terapii (nesmí obsahovat toxiny a geny pro ně) (Merril et al. 2003), problematiky rezistentních kmenů bakterií, interakce fágů s hostitelskou imunitou, způsobu vyloučení fágů organismem, uvolňování toxických látek z lýzovaných bakterií (Schoolnik et al. 2004)

Imunogenní potenciál fága by mohl být pro terapii přínosný i nepřínosný. Fág by mohl svojí přítomností v organismu hostitele mobilizovat složky imunitního systému, které by začaly rozpoznávat fága, zaútočit na něj a eliminovat ho ze systému. Na druhou

stranu, při ničení biofilmu, lýze buněk a odhalování dalších bakteriálních receptorů by mohlo dojít k aktivaci imunitního systému, který by začal odstraňovat bakterie přítomné v biofilmu. Další výzkumy by se proto měly zaměřit na aktivaci imunitního systému, která by pro terapii byla prospěšná. To znamená imunitnímu systému nenápadný fág s velkou účinností.

7.2. Výhody

Jako výhodu terapie můžeme považovat specifickou fágů, které se dokážou zaměřit na konkrétní bakteriální kmeny. Na druhou stranu by terapeuticky nejvýhodnější fág měl umět lýzovat většinu kmenů bakteriálních druhů, protože v případě, že by došlo k vývoji bakteriální rezistence, nemohl by příliš specifický fág úspěšně dokončit lytický cyklus (Faustino et al. 2009).

Bakteriální rezistence, vyvinutá v důsledku působení fágů, vedla ke vzniku rezistentních mikrokolonií, které měly viditelně menší velikost než nerezistentní kmeny. Nerezistentní kmeny byly viditelné po 24 hodinách, kdežto rezistentní kmeny se ukázaly až po 5 dnech (Pereira et al. 2016). Tento poznatek naznačuje, že vyvinutá rezistence ovlivnila fitness bakterie, což by přirozeně vedlo k její eliminaci z prostředí a nahrazení ostatními bakteriemi. Výsledkem vyvinutí rezistence bylo zabránění infekce na úkor fitness bakterií, což mělo vliv i na patogenitu bakterií (Mateus et al. 2014).

Dle review (Chan et al. 2013) má velký potenciál využití bakteriofágového koktejlu, který se ve většině případů setkává s úspěchem. Díky koktejlu se dá překonat rezistence bakterií vůči fágům a možnost působit jednou substancí na více kmenů a někdy dokonce i druhů. Výběr koktejlu by měl být zaměřen na kmen s nejpočetnějším zastoupením při infekci. Následně by mohlo přijít ošetření koktejlem, který by se zaměřil na ostatní účastníky infekce. Takhle by ideálně mohly vzniknout konkrétní koktejly pro konkrétní pacienty.

Levin a Bull shrnují, že pro vyléčení infekce by stačilo, kdyby se hustota patogenních bakterií dostala na úroveň, při které by se imunitní systém hostitele dokázal o zbytek bakterií postarat (Levin a Bull 2004).

Výhodou bakteriofágů je oproti bakteriím fakt, že jejich lokální podání a výpočet množství nemusí být tak těžký jako při nastavování optimální dávky u ATB. ATB se navíc potýkají s dalšími nesnáze v podobě špatného průniku k bakteriím, časté degradaci hostitelskými enzymy atd. Bakteriofág si prakticky sám kontroluje svoji

koncentraci tím, že s v bakteriích množí a postupně se rozšiřuje. ATB by mohla být využita společně s bakteriofágy, ale musí se myslet na fakt, že bakteriofág si potřebuje najít bakterii, ve které by se replikoval. Nejčastěji to bude bakterie, která je přístupna jako jedna z prvních, a to znamená, že se vyskytuje i v dosahu ATB. Je zapotřebí podání těchto dvou složek zajistit tak, aby nebylo kontraproduktivní.

8. Závěr

Infekce močových cest způsobené katetrizací patří k nejpočetnějším nozokomiálním nemocím. Cílem mé práce bylo zjistit, které bakteriální druhy se účastní infekcí močových cest způsobených katetrizací. Nejčastějšími bakteriálními druhy byly *E. Coli*, *K. Pneumoniae*, *E. Cloacae*, přičemž se výsledky jednotlivých studií částečně lišily. Díky četnosti jejich výskytu jsem zvolil bakteriofágy, které by tyto druhy dokázaly zahubit. U všech těchto výzkumů se terapie setkala s úspěchem vedoucím k lýze buňky v prostředí podobném močových cest a u některých i k odstranění biofilmu. Dále práce ukazuje možnost využití geneticky upravených fágů schopných přenosu genů pro DspB, který enzymaticky dokázal rozrušit přes 99 % biofilmové matrix. Vytvoření bakteriofágového koktejlu s těmito vybranými bakteriofágy by mohlo vést k úbytku biofilmu a ke zničení infekce bez použití ATB. Možnost kombinace bakteriofágové terapie s ATB se však nevylučuje. V dalších studiích by bylo zapotřebí zjistit, s jakou účinností dokážou bakteriofágové spolupracovat při použití koktejlů a ATB.

9. Zdroje

- Abdallah, N.M.A., Elsayed, S.B., Yassin, M.M., El-gohary, G.M., El-gohary, M.M. Biofilm forming bacteria isolated from urinary tract infection, relation to catheterization and susceptibility to antibiotics.
- Abedon, S.T., Calendar, R. (2006). *The bacteriophages*. (Oxford: Oxford Univ. Press, 2006).
- Alves, M.J., Pintado, M., Barreira, J.C.M., Ferreira, I.C.F.R., Carvalho, I., Trinta, L., Perreira, L. (2014). Propensity for biofilm formation by clinical isolates from urinary tract infections: Developing a multifactorial predictive model to improve antibiotherapy. *Journal of Medical Microbiology* 63, 471–477.
- Baillie, G.S., Douglas, L.J. (1998). Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 42, 1900–1905.
- Bruttin, A., Brüssow, H. (2005). Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2874–2878.
- Bull, J.J., Schmerer, M., Vegge, C.S., Chaudhry, W.N., Levin, B.R. (2014). Phenotypic resistance and the dynamics of bacterial escape from phage control. *PLoS ONE* 9.
- Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Kutter, E., Sarker, S., Brüssow, H. (2004). In Vitro and In Vivo Bacteriolytic Activities of *Escherichia coli* Phages: Implications for Phage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2558–2569.
- Choe, H.-S., Son, S.-W., Choi, H.-A. (2012). Analysis of the distribution of bacteria within urinary catheter biofilms using four different molecular techniques. *American Journal of Infection Control* 40, e249–e254.
- Choi, S.H., Lee, S.O., Choi, J., Lim, S.K., Chung, J.W. (2009). The clinical significance of concurrent *Staphylococcus aureus* bacteriuria in patients with *S. aureus* bacteremia. *Journal of Infection* 59, 37–41.
- Dias, N.J.A., Martins, A.C.P., Tiraboschi, R.B., Domingos, A.L.A., Silva, L.D.M., Suaid, H.J., Tucci, J.S., Cologna, A.J. (2003). Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. *Acta Cirurgica Brasileira*, Vol 18, Iss suppl.5, Pp 36-38 (2003) 36.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 167–193.
- Faustino, M.A.F., Costa, L., Alves, E., Gomes, N.C.M., Cunha, Â., Almeida, A. (2009). Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants. *Marine Drugs*, Vol 7, Iss 3, Pp 268-313 (2009) 268.
- Filippov, A.A., Sergueev, K.V., He, Y., Huang, X.-Z., Gnade, B.T., Mueller, A.J., Fernandez-Prada, C.M., Nikolich, M.P. (2011). Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: Identification of phage receptors and attenuation for mice. *PLoS ONE* 6.

- Hanlon, G.W., Denyer, S.P., Olliff, C.J., Ibrahim, L.J. (2001). Reduction in Exopolysaccharide Viscosity as an Aid to Bacteriophage Penetration through *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2746–2753.
- Heller, K.J. (1992). Molecular interaction between bacteriophage and the gram-negative cell envelope. *Archives of Microbiology* 158, 235–248.
- Hessen, M.T., Kaye, D., Zuckerman, J.M. (2000). Infections Associated with Foreign Bodies in the Urinary Tract. In *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*, Third Edition, (American Society of Microbiology), p.
- Hughes, K.A., Sutherland, I.W., Clark, J., Jones, M.V. (1998a). Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases--novel tools for study of bacterial biofilms. *Journal Of Applied Microbiology* 85, 583–590.
- Hughes, K.A., Sutherland, I.W., Jones, M.V. (1998b). Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: The role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology* 144, 3039–3047.
- Inchley, C.J. (1969). The activity of mouse kupffer cells following intravenous injection of t4 bacteriophage. *Clinical & Experimental Immunology* 5, 173.
- Lee, K.H., Park, S.J., Choi, S.J., Uh, Y., Park, J.Y., Han, K.H. (2017). The Influence of Urinary Catheter Materials on Forming Biofilms of Microorganisms. *J Bacteriol Virol* 47, 32–40.
- Lo, E., Nicolle, L.E., Coffin, S.E., Gould, C., Maragakis, L.L., Meddings, J., Pegues, D.A., Pettis, A.M., Saint, S., Yokoe, D.S. (2014). Strategies to Prevent Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Update. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 464.
- Lu, T.K., Collins, J.J. (2007). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 11197–11202.
- Maha, T., Soad, H., Tamer, S., Reham, E., Waleed, E., Guillermo, P. (2010). Surveillance of catheter-associated urinary tract infection in 4 intensive care units at Alexandria university hospitals in Egypt. *AJIC (American Journal of Infection Control)* 222.
- Majewska, J., Beta, W., Lecion, D., Hodyra-Stefaniak, K., Kłopot, A., Kaźmierczak, Z., Miernikiewicz, P., Piotrowicz, A., Ciekot, J., Owczarek, B., et al. (2015). Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood. *Viruses*, Vol 7, Iss 8, Pp 4783-4799 (2015) 4783.
- Mateus, L., Costa, L., Silva, Y.J., Pereira, C., Cunha, A., Almeida, A. (2014). Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture* 424–425, 167–173.
- Murugan, K., Selvanayagi, K., Al-Sohaibani, S. (2016). Urinary catheter indwelling clinical pathogen biofilm formation, exopolysaccharide characterization and their growth influencing parameters. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23, 150–159.
- Pelkonen, S., Aalto, J., Finne, J. (1992). Differential activities of bacteriophage depolymerase on bacterial polysaccharide: binding is essential but degradation is inhibitory in phage infection of K1-defective *Escherichia coli*. *Journal Of Bacteriology* 174, 7757–7761.

- Pereira, S., Pereira, C., Santos, L., Klumpp, J., Almeida, A. (2016). Potential of phage cocktails in the inactivation of *Enterobacter cloacae*—An in vitro study in a buffer solution and in urine samples. *Virus Research* 211, 199–208.
- Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P. (2000). Nosocomial Infections in Combined Medical-Surgical Intensive Care Units in the United States. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 21, 510–515.
- Sabir, N., Ikram, A., Zaman, G., Satti, L., Gardezi, A., Ahmed, A., Ahmed, P. (2017). Major Article: Bacterial biofilm-based catheter-associated urinary tract infections: Causative pathogens and antibiotic resistance. *AJIC: American Journal of Infection Control*.
- Saini, R., Saini, S., Sharma, S. (2011). Biofilm: A dental microbial infection. *Journal Of Natural Science, Biology, And Medicine* 2, 71–75.
- Silva, Y.J., Costa, L., Pereira, C., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N.C.M., Almeida, A. (2014). Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microbial Biotechnology* 7, 401–413.
- Skurnik, M., Strauch, E. (2006). Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 5–14.
- Suci, P.A., Mittelman, M.W., Yu, F.P., Geesey, G.G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 2125–2133.
- Sutherland, I.W. (1995). Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiology Reviews* 16, 323–347.
- Sutherland, I.W. (1997). Microbial exopolysaccharides - Structural subtleties their consequences. *Pure and Applied Chemistry* 69, 1911–1917.
- Sutherland, I.W. (2001a). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9, 222–227.
- Sutherland, I.W. (2001b). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (13500872)* 147, 3–9.
- Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C., Tait, K. (2004). The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 232, 1–6.
- Tait, K., Sutherland, I.W. (2002). Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms. *Journal Of Applied Microbiology* 93, 345–352.
- Tedja, R., Wentink, J., O’Horo, J.C., Thompson, R., Sampathkumar, P. (2015). Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Intensive Care Unit Patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 36, 1330–1334.
- Tenke, P., Köves, B., Nagy, K., Hultgren, S.J., Mendling, W., Wullt, B., Grabe, M., Wagenlehner, F.M.E., Cek, M., Pickard, R., et al. (2012). Update on biofilm infections in the urinary tract. *World Journal Of Urology* 30, 51–57.
- Tenke, P., Mezei, T., Böde, I., Köves, B. (2017). Catheter-associated Urinary Tract Infections. *European Urology Supplements* 16, 138–143.
- Trautner, B.W., Darouiche, R.O. (2004). Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Archives Of Internal Medicine* 164, 842–850.

- Verma, V., Harjai, K., Chhibber, S. (2009). Characterization of a T7-Like Lytic Bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: A Potential Therapeutic Agent. *Current Microbiology* 59, 274–281.
- Walker, S.L., Fourgialakis, M., Cerezo, B., Livens, S. (2007). Removal of microbial biofilms from dispense equipment: The effect of enzymatic pre-digestion and detergent treatment. *Journal of the Institute of Brewing* 113, 61–66.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* 295, 1487.
- Wilking, J.N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M.P., Weitz, D.A. (2013). Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 848–852.

Sekundární citace

- Tunney, M.M., Jones, D.S., Gorman, S.P. (1999). Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. *Methods in Enzymology* 310, 558–566. Citováno dle (Alves et al. 2014)
- Stickler, D., Ganderton, L., King, J., Nettleton, J., Winters, C. (1993). *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urological Research* 21, 407–411. Citováno dle (Alves et al. 2014)

Review

- Allegranzi, B., Nejad, S., Combescure, C., Graafmans, W., Attar, H., Donaldson, L., Pittet, D. (2011). Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 377, 228–241.
- Tenke, P., Kovacs, B., Jäckel, M., Nagy, E. (2006). The role of biofilm infection in urology. *World Journal Of Urology* 24, 13–20.
- Schoolnik, G.K., Summers, W.C., Watson, J.D. (2004). Phage offer a real alternative. *Nat Biotech* 22, 505–506.
- Merril, C.R., Scholl, D., Adhya, S.L. (2003). The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2, 489–497.
- Levin, B.R., Bull, J.J. (2004). Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Micro* 2, 166–173.
- Chan, B.K., Abedon, S.T., Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology* 8, 769–783.
- Gandon, S. (2016). Why Be Temperate: Lessons from Bacteriophage λ . *Trends in Microbiology* 24, 356–365.
- Pires, D.P., Oliveira, H., Melo, L.D.R., Sillankorva, S., Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology And Biotechnology* 100, 2141–2151.