



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



Σε συνεργασία με το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

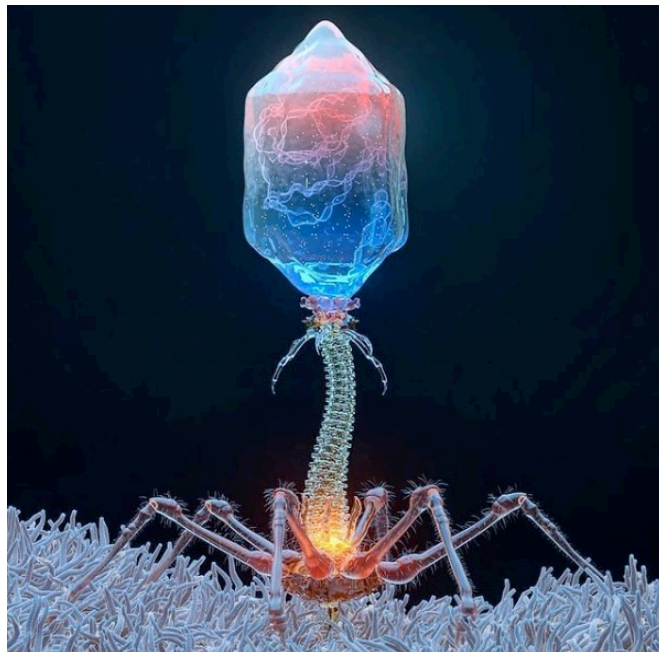


ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## Μελέτη βακτηριοφάγων με χρήση τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενεάς

GRADUATE THESIS

### Bacteriophage study with next generation sequencing technologies (NGS)





Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

**ΕΥΤΥΧΙΑ ΧΟΛΟΓΟΥΝΗ**  
EFTYCHIA CHOLOGOUNI

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ**  
APOSTOLOS BELOUKAS

ΟΝΟΜΑ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ Ε.Ι.Π./ NAME OF THE SUPERVISOR OF H.P.I.

**ΤΙΜΟΚΡΑΤΗΣ ΚΑΡΑΜΗΤΡΟΣ**  
TIMOKRATIS KARAMITROS

ΑΙΓΑΛΕΩ/EGALEO 2021



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



GRADUATE THESIS

## **Bacteriophage study with next generation sequencing technologies (NGS)**

CHOLOGOUNI EFTYCHIA

[eftihia.hol@gmail.com](mailto:eftihia.hol@gmail.com)

FIRST SUPERVISOR

Apostolos Beloukas

SECOND SUPERVISOR

Timokratis Karamitros

THIRD SUPERVISOR

Chryssanthi Voyiatzaki

EGALEO 2021



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



## Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Ευτυχία Χολογούνη



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



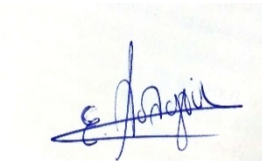
**ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Χολογούνη Ευτυχία του Δημητρίου , με αριθμό μητρώου 62115002 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΣΕΥΠ του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα





## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στη Μονάδα Βιοπληροφορικής και Εφαρμοσμένης Γενωμικής του Ε. Ι. Παστέρ, στο πλαίσιο του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών της σχολής Βιοϊατρικών Επιστημών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, Δρ. Απόστολο Μπελούκα και εισηγητή του θέματος της διπλωματικής εργασίας για τις γνώσεις που έλαβα στο πλαίσιο της φοίτησής μου στη σχολή και για την πολύτιμη ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία σε συνεργασία με εκείνον.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Εντεταλμένο Ερευνητή της Μονάδας Βιοπληροφορικής και Εφαρμοσμένης Γενωμικής του Ε.Ι.Π., Δρ Τιμοκράτη Καραμήτρο, ο οποίος με δέχτηκε στην ερευνητική του ομάδα και με την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές ως προς το ερευνητικό αντικείμενο συνέβαλε καθοριστικά στην εκπόνηση της πτυχιακής.

Ξεχωριστές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Υποψήφια Διδάκτορα Γεθσημανή Παπαδοπούλου για την αμέριστη προσοχή και την βοήθειά της όλο το διάστημα που παρέμεινα στην ερευνητική ομάδα του Δρ Καραμήτρου, όπως επίσης και στην Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Μπούσαλη και την Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Αριστέα Δημάδη για την πολύτιμη βοήθειά και υποστήριξή τους.





Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



## Περίληψη

### Εισαγωγή:

Το βακτήριο *P. aeruginosa*, ένα από τα πιο κοινά παθογόνα στην κοινότητα και το ενδονοσοκομειακό περιβάλλον, περιλαμβάνεται στη λίστα ESKAPE του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, λόγω της εμφάνισης πολυανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών, καθιστώντας τη μελέτη του ιδιαίτερης σημασίας. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η γονιδιωματική ανάλυση νοσοκομειακών στελεχών ανέδειξε την παρουσία γονιδίων αντοχής προφάγων, ενισχύοντας το ενδιαφέρον γύρω από τη μελέτη αυτών και τους ρόλους τους στην έκβαση βακτηριακών λοιμώξεων.

### Σκοπός:

Παρά την ανάδειξη της παρουσίας γονιδίων αντοχής στο γονιδίωμα φάγων, δεν έχει ακόμη μελετηθεί η επίδραση τους στην πορεία της βακτηριακής λοίμωξης από παθογονικά στελέχη. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η συμβολή των βακτηριοφάγων στην λοιμογονικότητα του βακτηρίου *P. aeruginosa* και ο αντίκτυπος της παρουσίας τους στην κλινική έκβαση των ασθενών.

### Μέθοδος:

Στο πλαίσιο της μελέτης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων από πειράματα αλληλούχισης (NGS) του γονιδιώματος του βακτηρίου *P. aeruginosa*. Συνολικά, 222 δείγματα 100 ασθενών υποβλήθηκαν σε *de novo* συναρμολόγηση των βακτηριακών γονιδιωμάτων και στοίχιση έναντι βάσης δεδομένων, για τη διερεύνηση παρουσίας γονιδιωμάτων βακτηριοφάγων σε αυτά. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με χρήση εξισώσεων και μακροεντολών. Για την επιβεβαίωση της παρουσίας προφάγων στα δείγματα, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση αλληλουχιών γονιδίων που κωδικοποιούν ιντεγκράση, τρανσποζάση και χολίνη, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παθογονικότητα του βακτηρίου. Η συσχέτιση της παρουσίας βακτηριοφάγων στα δείγματα, με την υποτροπή της λοίμωξης διερευνήθηκε με εφαρμογή του στατιστικού test Fisher, λόγω του μικρού αριθμού του δείγματος. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με γλώσσα προγραμματισμού R και χρήση της ιστοσελίδας Social Science Statistics.

### Αποτελέσματα:

Η *de novo* συναρμολόγηση ολοκληρώθηκε επιτυχώς σε 195 από τα 222 δείγματα, ενώ σε 193 από αυτά ανευρέθηκαν γονιδιωματικές αλληλουχίες βακτηριοφάγων. Στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 150 δείγματα 67 ασθενών, στα οποία επιβεβαιώνεται η παρουσία φάγων, με το γονιδίωμα αυτών να καλύπτεται κατά τη στοίχιση σε ποσοστό άνω

του 60%. Το Fisher test ανέδειξε οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας δύο βακτηριοφάγων (JQ067085 και NC\_030918) και του θανάτου των ασθενών.

#### **Συμπεράσματα:**

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, οι βακτηριοφάγοι JQ067085 και NC\_030918, πιθανόν φέρουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά καρβαπενέμες. Συγκεκριμένα, ο φάγος JQ067085 παρουσιάζει υψηλή ομολογία με ένα πλασμίδιο που φέρει γονίδια καρβαπενεμασών, ενώ ο φάγος NC\_030918 πιθανόν κωδικοποιεί γονίδια αντοχής αποτελώντας Genomic Island πολυανθεκτικού στελέχους *P. aeruginosa*. Το φαινόμενο μεταφοράς γονιδίων αντοχής από προφάγους σε παθογόνα της λίστας ESKAPE είναι γνωστό, επομένως χρήζει ιδιαίτερης σημασίας η διερεύνηση του ρόλου τους ως δεξαμενές γονιδίων αντοχής, αλλά και της πιθανής αξιοποίησής τους για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων.

## Abstract

### Introduction:

*P. aeruginosa* is considered one of the most common pathogens in both community and intrahospital infections. Considering that it has already been listed in the ESKAPE list of WHO, regarding its increasing tolerance towards antibiotics, the studies revolving the pathogen's genetic material and its pathogenic routes must be further analyzed. Bibliographic information regarding its genetic mobile elements has revealed that a significant amount of antibiotic resistance genes show a high level of homology with prophages, meaning bacteriophages that follow the lysogenic life cycle. Over the last decade, the interest regarding bacteriophages has increased, mainly as they or their lytic enzymes are considered an alternative treatment to infections caused by antibiotic resistant bacteria.

### Purpose:

Even though studies have shown that bacteriophages are a pool of antibiotic resistance genes, their role regarding their presence in antibiotic resistant strains and the possible outcome of the patient has not been clarified. In this study, we researched the relationship between bacteriophages and the clinical outcome of patients that had been infected with intrahospital strains of *P.aeruginosa*.

### Method:

In the present study we analyzed 222 bacterial sequences that originated from 100 patients that spent time in dr. Cipto Mangunkusumo National Central General Hospital's ICU during 2013-2015. The data derived from NGS libraries that were then de-novo assembled using the algorithm SPAdes. 195 samples were then aligned against the <<Virus Host>> database, which includes nucleotide sequences of bacteriophages. The samples that gave a positive result were there further analyzed using formulas and macros (VBA Macro) to confirm the presence of prophages in them. To further establish this speculation, a second alignment was conducted against nucleotide sequences of genes that encode integrase, transposase and hollins, molecules that play a vital role in bacterial pathogenicity. The role of bacteriophages and the outcome of the patients was examined by using the statistical test Fisher, you due to the small sample size of the study. The zero hypothesis  $H_0$  the lack of correlation between the two was set and the p-value that was selected was 0,05 or 5%. The data were then analyzed using the programming language R and the site Social Science Statistics.

### Results:

From the original 222 samples, de novo assembly was completed successfully in 195 samples, of which 193 gave a positive blast hit regarding nucleotide sequences of bacteriophage genomes. Of them 150 samples did have bacteriophages whose total genome during the alignment was above 60%. These 150 samples were isolated from 67 patients, and the statistical analysis was conducted based on them. The Fisher test showed three

bacteriophages (NC\_001331, JQ067085 and NC\_030918) whose presence was slightly related with the death of patients. One particular bacteriophage, NC\_001331, was excluded from the next steps of the study because his presence in the samples was not confirmed neither by the absence of the nucleotide sequences of the three protein molecules neither by his sole existence, as it was discovered that he was present in the same patients as the bacteriophage JQ067085. Further analysis between these two revealed that the nucleotide homology between them reached 94.74%. The final results of the statistical analysis for bacteriophages JQ067085 and NC\_030918 revealed a connection between the presents in certain patients and the patient's death.

#### **Discussion:**

Bibliographic research showed that the two bacteriophages that were found to be statistically significant all connected to carvopeneme resistance genes. Carvopenems are a group of antibiotics that do not belong in the broad spectrum antibiotics and are rarely used to treat community derived infections. Bacteriophage JQ067085 was first isolated in Central Mexico in 2012 and the recent study of 2019 in Brazil revealed that this certain bacteriophage had a high nucleotide homology with a plasmid that carried carvopenemases genes. As for bacteriophage NC\_030918, a recent study has shown that this certain phage is probably a Genomic Island of a multi resistant strain of *P.aeruginosa*. regarding that bibliographic search has shown that bacteriophages can carry antibiotic resistance genes not only in this certain pathogen but others who are also included in the ESKAPE list of WHO, it would be really interesting to study the role of prophages as pools of resistance genes in bacteria, and especially plasmids.

## Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων.....	1
Εισαγωγή.....	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	3
Φυσιολογία και Δομή.....	3
Λοιμογόνοι παράγοντες.....	3
Επιδημιολογία.....	7
Βακτηριακό Γονιδίωμα.....	9
Βακτηριοφάγοι.....	11
Ιστορική Αναδρομή.....	11
Δομικά Χαρακτηριστικά και Ταξινόμηση.....	13
Κύκλος Αναπαραγωγής.....	16
Γονιδίωμα βακτηριοφάγων.....	18
Πρωτεΐνες.....	19
Next Generation Sequencing.....	22
Γενικά Χαρακτηριστικά.....	22
Διαδικασία - Πρωτόκολλα.....	23
Αλγόριθμοι Μεταγενωμικής Ταξινόμησης.....	24
Μεθοδολογία.....	26
Δεδομένα.....	26
Βιοπληροφορική Ανάλυση Δεδομένων.....	27
Αποτελέσματα.....	32
Στατιστική Ανάλυση.....	33
Συζήτηση.....	36



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



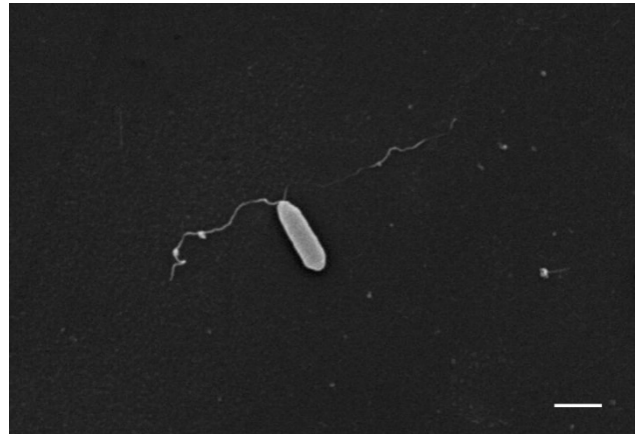
Αναφορές ..... 41

## Εισαγωγή

### *Pseudomonas aeruginosa*

#### Φυσιολογία και Δομή

Το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί ένα από τα πιο κοινά ευκαιριακά παθογόνα και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο τόσο σε φυσικά όσο και σε κλινικά περιβάλλοντα με υψηλή υγρασία. Ανήκει στην οικογένεια Pseudomonadales, που περιλαμβάνει Gram (-) αρνητικά βακτήρια, είναι κινητό χάρη στις βλεφαρίδες και τα πολλαπλά μαστίγια που διαθέτει και είναι κατά βάση αερόβιο<sup>1</sup>. Σε συνθήκες χαμηλής περιεκτικότητας θρεπτικών ουσιών πραγματοποιεί και αναερόβιο μεταβολισμό, αξιοποιώντας μικρή ποσότητα από εναλλακτικές πηγές άνθρακα και αζώτου, όπως ιχνοστοιχεία σε απιονισμένο νερό ή τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου μέσα σε διαλύματα αντισηπτικών<sup>23</sup>. Παράλληλα, παράγει χρωστικές, οι οποίες διαχέονται στα θρεπτικά υλικά, παρέχοντας μια μέθοδο εύκολης ταυτοποίησής του εργαστηριακά. Οι πιο γνωστές από αυτές είναι η πυοκυανίνη (χρώματος μπλε), η πυοβερντίνη (χρώματος κιτρινοπράσινου, που φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως), η πυοερυθρίνη (χρώματος κόκκινου) και τέλος η πυομελανίνη (χρώματος σκούρου καφέ - μαύρου), ενώ δίνει θετική αντίδραση στο τεστ οξειδάσης του κυτοχρώματος, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα εντεροβακτηριακά (3).



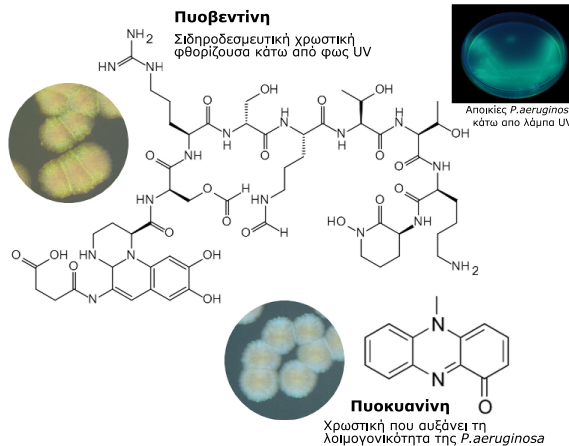
Εικόνα-1 Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*

#### Λοιμογόνοι παράγοντες

Στους λοιμογόνους παράγοντες του βακτηρίου περιλαμβάνεται ένας μεγάλος αριθμός δομικών στοιχείων, τοξινών και ενζύμων που διαδραματίζουν ρόλο στη βακτηριακή παθογονικότητα σε ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, όπως φυτά, ζώα αλλά και στον άνθρωπο. Η δράση του λιπιδίου A του λιποπολυσακχαρίτη του τοιχώματος (LPS) για παράδειγμα, ευθύνεται για την δράση της ενδοτοξίνης, που επιφέρει σε βακτηριαιμίες σηπτικό σοκ. Η προαναφερθείσα χρωστική πυοκυανίνη συμβάλλει στις ιστικές βλάβες, παράγοντας τοξικές μορφές οξυγόνου, όπως οι υπεροξειδικές ρίζες και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ παράλληλα αναστέλλει την λειτουργία των κροσσών του αναπνευστικού επιθηλίου και



διεγείρει την έκκριση ιντερλευκίνης 8 (IL-8), με αποτέλεσμα την αύξηση της φλεγμονώδους απάντησης και την προσέλκυση ουδετεροφίλων<sup>24</sup>. Σε άτομα με προβλήματα του αναπνευστικού, όπως για παράδειγμα ασθενείς που πάσχουν από άσθμα ή χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, αυτή η δράση της πυοκυανίνης μπορεί να αποβεί μοιραία, καθώς έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μικροκυκλοφορίας στα τριχοειδή των κυψελίδων, ενώ οι ίδιες οι κυψελίδες γεμίζουν με δίδρωμα πλούσιο σε πρωτεΐνες, ιντερλευκίνες, ινωδογόνο, ίνες κολλαγόνου τύπου I και II και τέλος μακροφάγα και πολυμορφοπύρνα



κύτταρα, αδυνατώντας να επιτελέσουν την βασική λειτουργία τους. Μία ακόμα χρωστική που συμβάλλει στην παθογονικότητα του βακτηρίου είναι η πυοβεντίνη, η οποία δεσμεύει τον σίδηρο για μετέπειτα μεταβολική χρήση. Αυτή η χρωστική λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας άλλων λοιμογόνων ουσιών, όπως για παράδειγμα της εξωτοξίνης A, που παράγουν τα παθογόνα στελέχη της *P. aeruginosa* ενώ φθορίζει κάτω από φως UV<sup>2</sup>.

Εικόνα-2 Χρωστικές ουσίες που συμβάλλουν στη λοιμογονικότητα του βακτηρίου *P.aeruginosa*

Σημαντικό ρόλο στην παθογονικότητα του βακτηρίου *P.*

*aeruginosa* διαδραματίζει η εξωτοξίνη A, η οποία έχει παρόμοια δράση με τα εξωένζυμα S, T και U, αναστέλλοντας την πρωτεϊνσύνθεση, παρεμποδίζοντας την επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτή της η δράση είναι παρόμοια με τη δράση της τοξίνης της διφθερίτιδας που παράγεται από το βακτήριο *Corynebacterium diphtheriae*, ωστόσο παρά τις ομοιότητες στη δράση και οι δύο τοξίνες διαφέρουν ως προς τη δομή και το ανοσολογικό προφίλ τους, μη δίνοντας διασταυρούμενες αντιδράσεις, ενώ η εξωτοξίνη A είναι λιγότερο ισχυρή από την αντίστοιχη του *C. diphtheriae*. Η εξωτοξίνη A προκαλεί ανοσοκαταστολή και συμβάλλει στη νέκρωση του πλακώδους επιθηλίου του οφθαλμού, του ψευδοπολύστιβου κυλινδρικού κροσσωτού επιθηλίου των πνευμόνων και της τραχείας. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και στις δερματονεκρώσεις, στη νέκρωση, δηλαδή, του κερατινοποιημένου επιθηλίου και των βαθύτερων στρωμάτων της επιδερμίδας στην περίπτωση εγκαύματος<sup>24</sup>. Τα εξωένζυμα S, T και U είναι πρωτεϊνικά μόρια που μεταβιβάζονται από την ψευδομονάδα στα κύτταρα του ξενιστή, μέσω του συστήματος

έκκρισης τύπου III (T3SS), ένα σύστημα διαμεταβίβασης ουσιών από και προς τον ξενιστή, το οποίο απαντάται στα Gram αρνητικά (-) βακτήρια<sup>5</sup>. Το σύστημα διαμεταβίβασης ουσιών T3SS διαπερνά την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, το περίπλασμα, τον εξωκυττάριο χώρο και το σημαντικότερο, την κυτταρική μεμβράνη του ευκαρυωτικού κυττάρου, διαχέοντας με αυτόν τον τρόπο πρωτεΐνες, οι οποίες στη συγκεκριμένη περίπτωση έχουν τοξική δράση, απευθείας στο εσωτερικό του κυττάρου του ξενιστή, επιτρέποντας τη γρήγορη λύση του. Εκτός από τον τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, συμβάλλουν και στην εισχώρηση του βακτηρίου σε βαθύτερα στρώματα των ιστών, με αποτέλεσμα συνήθως την νέκρωση του υφιστάμενου ιστού<sup>2</sup>. Αναλυτικότερα, το εξωένζυμο S διαταράσσει τον κυτταροσκελετό των κυττάρων του ξενιστή, ενώ ελέγχει την ανοσιακή απάντηση του, προκαλώντας βλάβη των ανοσοσφαιρινών IgG και IgA, ενώ το εξωένζυμο U, που είναι το μεγαλύτερο σε μέγεθος ένζυμο του T3SS, δρα ως λυτικός παράγοντας στα λιπίδια, καταστρέφοντας έτσι την κυτταρική μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων<sup>1</sup>. Γίνεται αντιληπτό, ότι η παραπάνω ιδιότητα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση βακτηριαιμίας σε σημαντικό ποσοστό ασθενών, η οποία μπορεί να καταλήξει ακόμα και σε σηπτικό σοκ. Το εξωένζυμο T απαντάται στους περισσότερους γονότυπους του βακτηρίου, όμως τα άλλα δύο εξωένζυμα εντοπίζονται πιο συχνά στα παθογόνα στελέχη, όπως το PAO1 και το PAK σε ποσοστό έως 72% το S και σε 42% το U. Το τελευταίο, συγκεκριμένα, έχει συνδεθεί με αυξημένη κυτταροτοξικότητα στα στελέχη PA14 και PA103<sup>6</sup>.

Οι ελαστάσες, (LasA, LasB) αποτελούν άλλον έναν λοιμογόνο παράγοντα του βακτηρίου, καθώς συμβάλλουν στην καταστροφή των ινών κολλαγόνου, της ελαστίνης, του ινωδογόνου, ενώ απενεργοποιούν τις ανοσοσφαιρίνες IgG και IgA προκαλώντας την εμφάνιση γαγγραινώδους εκθέματος, με βλάβες στο πνευμονικό παρέγχυμα και με αιμορραγικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, διασπούν συστατικά του συμπληρώματος, ενώ αναστέλλουν την χημειοταξία στο στάδιο της μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης, προσβάλλοντας κυτοκίνες, όπως η ιντερφερόνη γ (IFN-γ) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF), και τη δράση των ουδετεροφίλων. Έναντι αυτών των ενζύμων παράγονται αντισώματα στις χρόνιες λοιμώξεις. Παρόμοια με τα προαναφερθέντα ένζυμα, η αλκαλική πρωτεάση συμβάλει στην εξάπλωση του βακτηρίου στους ιστούς, αποδομώντας το ινωδογόνο και παρεμποδίζει την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στις λοιμώξεις του κερατοειδούς<sup>12</sup>.

Στους λοιμογόνους παράγοντες κατατάσσονται και οι βακτηριακές αιμολυσίνες, οι φωσφολιπάσες C και τα ραμνολιπίδια. Οι φωσφολιπάσες, θερμοευαίσθητα ένζυμα που εκφράζονται εξωκυτταρικά, συμβάλλουν στην διάσπαση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των ευκαρυωτικών κυττάρων και κατά συνέπεια στη μετακίνηση του βακτηρίου σε βαθύτερα στρώματα ιστών<sup>7</sup>. Οι ραμνολιπάσες, επίσης εξωκυττάρια θερμοανθεκτικά ένζυμα, έχουν μορφολογία αμφίφυλου μορίου και σε ασθενείς με πνευμονία, αναστέλλουν τη λειτουργία του κροσσωτού αναπνευστικού επιθηλίου<sup>1</sup>, προκαλώντας στάση της βλέννης και κατά συνέπεια αύξηση του μικροβιακού φορτίου στους πνεύμονες. Παράλληλα, λόγω της νεκρωτικής ιδιότητάς τους, αδρανοποιούν τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, ενώ βοηθούν στο σχηματισμό και την διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής του βιοφίλμ και γενικότερα την κίνηση του βακτηρίου<sup>7</sup>.

Τέλος, ένας από τους σημαντικότερους λοιμογόνους παράγοντες της ψευδομονάδας, το πολυσακχαριδικό έλυτρο, επιτρέπει την αποφυγή μηχανισμών φαγοκυττάρωσης του κυττάρου-ξενιστή. Τα ελυτροφόρα στελέχη, τα οποία εντοπίζονται κυρίως σε ασθενείς με κυστική ίνωση είναι αξιοσημείωτα πιο βλεννώδη<sup>2</sup>. Μέσω του ελύτρου προωθείται ο σχηματισμός βιοφίλμ, μίας σταθερής μικροβιακής κοινότητας, ανεξαρτήτως είδους, που χαρακτηρίζεται από κύτταρα προσκολλημένα σε ένα υπόστρωμα, είτε στο περιβάλλον είτε το ένα στο άλλο, τα οποία εμφανίζουν έναν τροποποιημένο φαινότυπο σε σχέση με τους ρυθμούς ανάπτυξης και μεταγραφής γονιδίων<sup>8</sup>. Υπαγόμενοι στο βιοφίλμ, οι μικροοργανισμοί αποφεύγουν την φαγοκυττάρωση και αντιστέκονται στην ωσμωτική πίεση και στη δράση των αντιβιοτικών, αποκτώντας επιπλέον ιδιότητες που επιτρέπουν τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό και την εισχώρηση στους ιστούς, αυξάνοντας την λοιμογονικότητά τους. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στους μηχανισμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των βακτηρίων ενός βιοφίλμ και στα πλεονεκτήματα που προσδίδει αυτή η οργάνωση σε επίπεδο κοινότητας. Οι μελέτες αυτές εστιάζουν σε δύο βασικά σημεία. Το πρώτο είναι το quorum sensing, δηλαδή το αίσθημα απαρτίας, μηχανισμός που επιτρέπει την επικοινωνία μικροοργανισμών μέσω χημικών διαβιβαστών, έτσι ώστε η ρύθμιση του αυτοδιπλασιασμού του γενετικού υλικού και της γονιδιακής έκφρασης να ρυθμίζεται ταυτόχρονα για όλο τον πληθυσμό. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μείωση των δαπανών για τις μεταβολικές ανάγκες και ρυθμίζεται η υπερέκφραση των αντλιών εκροής (efflux pumps)<sup>9</sup>. Το δεύτερο

σημείο στο οποίο επικεντρώνονται οι μελέτες αφορά στην ύπαρξη μέσα στο βιοφίλμ, δύο πληθυσμών, οι οποίοι χωρίζονται με βάση την μεταβολική τους δραστηριότητα σε μεταβολικά ενεργούς και αδρανείς, με τους δεύτερους να είναι πιο ανθεκτικοί στη δράση διαφόρων ανασταλτικών παραγόντων, όπως τα αντιβιοτικά, τα οποία για να προσπεράσουν το φραγμό του κυτταρικού τοιχώματος, χρησιμοποιούν τις μεταβολικές οδούς του βακτηρίου. Όμως, σε πληθυσμούς οι οποίοι είναι μεταβολικά αδρανείς, η εισροή θρεπτικών στοιχείων μειώνεται, περιορίζοντας την ποσότητα αντιβιοτικού που θα εισέλθει στο κύτταρο, καθιστώντας έτσι τη δράση του μη βακτηριοκτόνο ή ακόμα κι μη βακτηριοστατική<sup>10</sup>.

#### Επιδημιολογία

Οι λοιμώξεις από *P. aeruginosa* είναι μεταξύ των πιο διαδεδομένων τόσο στην κοινότητα όσο και στα νοσοκομεία χωρίς να παρουσιάζουν ενδείξεις εποχικότητας ή εντοπιότητας, αν και έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ στελεχών με συγκεκριμένες λοιμώξεις Έχοντας βέβαια διαφορετική κατανομή ως προς την βαλλόμενη περιοχή, οι λοιμώξεις της κοινότητας περιλαμβάνουν συνήθως δερματικές λοιμώξεις και λοιμώξεις των μαλακών μορίων, όπως για παράδειγμα θυλακίτιδα ή οστεοχονδρίτιδα του ποδός, ωτικές και οφθαλμικές λοιμώξεις. Οι ωτικές είναι συχνότερες στους κολυμβητές και κατά βάση αντιμετωπίζονται με τοπική χορήγηση αντιβιοτικών σκευασμάτων σε μορφή κρέμας ή σταγόνων και ξηραντικά μέσα, ενώ οι οφθαλμικές συνήθως σχετίζονται με τη χρήση οφθαλμικών φακών επαφής και τη μη ορθή φύλαξη ή χρήση τους από το άτομο<sup>2</sup>. Όλες οι προαναφερθείσες λοιμώξεις είναι εύκολα αντιμετωπίσιμες χωρίς να παρατηρείται μεγάλο ποσοστό αντοχής στα στελέχη τη κοινότητας. Αντίθετα, στο νοσοκομειακό περιβάλλον οι περισσότερες λοιμώξεις αφορούν ανθεκτικά στελέχη, σε ποσοστό άνω του 20%<sup>6</sup>, προκαλώντας επιδημίες στις ΜΕΘ (Μονάδες Εντατικής Θεραπείας), τις Ογκολογικές Μονάδες και τις Μονάδες Εγκαυμάτων, οι ασθενείς των οποίων, λόγω ανοσοκαταστολής, είναι πιο ευάλωτοι στο συγκεκριμένο παθογόνο. Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας επιδείνωσης στις μονάδες αυτές είναι και οι πολυήμερες νοσηλείες που απαιτούν τα συγκεκριμένα τμήματα, καθώς κατά κανόνα, ο κίνδυνος εμφάνισης λοίμωξης αυξάνει εκθετικά σε σχέση με το χρόνο παραμονής στο χώρο του νοσοκομείου<sup>11</sup>.

Η ψευδομονάδα στους ασθενείς αυτών των μονάδων αποικίζει συνήθως την αναπνευστική οδό, προκαλώντας πνευμονίες, βρογχίτιδες, ακόμα και νεκρωτική βρογχοπνευμονία. Η παρουσία της στον πνευμονικό ιστό έχει συσχετιστεί με την χρήση ιατρικού αναπνευστήρα και λοιπού βοηθητικού αναπνευστικού εξοπλισμού, καθώς πάνω σε τέτοιες επιφάνειες διευκολύνεται ο σχηματισμός βιοφίλμ, εντείνοντας την βαρύτητα της νόσου. Οι δεύτερες συχνότερες ενδοноσοκομειακές λοιμώξεις που σχετίζονται με το συγκεκριμένο παθογόνο είναι οι ουρολοιμώξεις, οι οποίες πλήττουν συχνά ασθενείς με ουροκαθετήρα, σε ποσοστό 97,9%<sup>12</sup>. Σε ασθενείς με μόνιμο καθετήρα, το φαινόμενο των λοιμώξεων από το συγκεκριμένο παθογόνο εντείνεται, καθώς η εκτεταμένη χορήγηση πολλών αντιβιοτικών σχημάτων, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών. Ζήτημα αποτελούν και οι βακτηριαμιές και οι ενδοκαρδίτιδες στις ΜΕΘ και τις Μονάδες Ογκολογικού και Εγκαυμάτων και συνήθως αποτελούν απότοκο λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού, της ανώτερης ουροποιητικής οδού, αλλά και εγκαυμάτων<sup>2</sup>, όπου υπάρχει απευθείας σύνδεση με το αρτηριακό και το φλεβικό δίκτυο. Στις βακτηριαμιές, ένα μικρό ποσοστό των ασθενών εμφανίζει γαγγραινώδες έκθυμα, πιο συχνό σε ασθενείς με συνοδά νοσήματα, όπως για παράδειγμα σακχαρώδη διαβήτη, και στους ουδετεροπενικούς, ενώ η ενδοκαρδίτιδα φαίνεται να αφορά κυρίως χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών μετά από επαφή των συνεργών τμημάτων των ενέσεων, δηλαδή της βελόνης ή της σύριγγας, με μολυσμένο νερό<sup>2</sup>.

Σύμφωνα με την ετήσια επιδημιολογική μελέτη του European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) του 2017, το 97% των ενδοноσοκομειακών πνευμονιών συσχετίστηκε με την διασωλήνωση των ασθενών, ενώ το πιο κοινό παθογόνο που ευθύνεται γι' αυτές είναι το βακτήριο *P. aeruginosa*<sup>12</sup>. Αντίστοιχα ήταν και τα ποσοστά που αφορούσαν λοιμώξεις του ουροποιητικού σχετιζόμενες με καθετηριασμό των ασθενών, με την *P. aeruginosa* να βρίσκεται μεταξύ των τριών πιο κοινών απομονωμένων μικροοργανισμών. Στις αιματογενείς λοιμώξεις παραπάνω από το 1/3 των βακτηριαμιών συνδέεται με καθετηριασμό (36,5%), στο υπόλοιπο 35% η βακτηριαμία εμφανίστηκε ως απότοκος άλλης προϋπάρχουσας λοίμωξης και στο 20,5% η βακτηριαμία παραμένει άγνωστης αιτιολογίας. Το βακτήριο *P. aeruginosa* ανήκε στους δέκα πιο συχνά απομονωθέντες οργανισμούς που αφορούν βακτηριαμιές. Στην ίδια μελέτη αναλύθηκε και η αντοχή του βακτηρίου στα

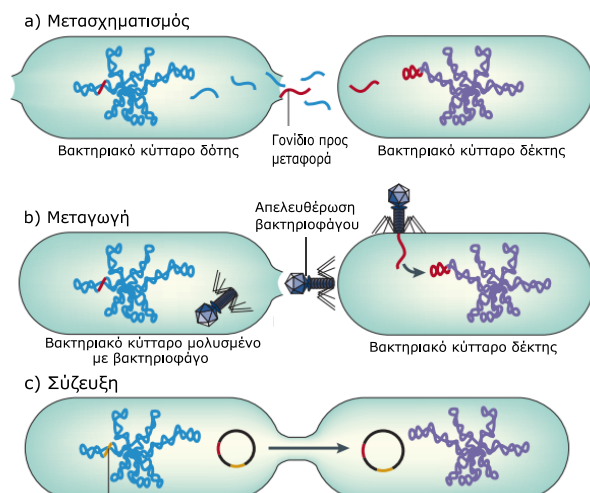
αντιβιοτικά σε 2683 ασθενείς, Με το  $\frac{1}{4}$  περίπου των απομονωθεισών υποθέσεων να αφορούν επιβεβαιωμένη ενδονοσοκομειακή λοίμωξη με αποικισμό από *P. aeruginosa* ανθεκτική στην κεφταζιδίμη, δραστική ουσία που ανήκει στην οικογένεια των κεφαλοσπορινών<sup>13</sup>, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό αντοχής του βακτηρίου στις καρβαπενέμες άγγιζε το 26%<sup>12</sup>.

### Βακτηριακό Γονιδίωμα

Χαρακτηριστικό είναι το μέγεθος του γονιδιώματος της *P. aeruginosa* καθώς είναι από τα μεγαλύτερα στο σύνολο των βακτηριακών ειδών και κυμαίνεται μεταξύ 5 και 7 Mbp<sup>7</sup>, ενώ φέρει ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων, σχεδόν ίδιο με αυτό των ευκαρυωτικών ζυμομυκήτων και περίπου το μισό από του γένους *Drosophila*<sup>3</sup>. Αυτό το χαρακτηριστικό έρχεται σε αντίθεση με την εξελικτική πορεία των γονιδιωμάτων παρασιτικών οργανισμών, στο μέγεθος του γονιδιώματος των οποίων παρατηρείται μείωση<sup>13</sup>. Το εξαιρετικά μεγάλο μέγεθος του βακτηριακού γονιδιώματος δικαιολογεί και την ύπαρξη μεγάλου αριθμού διαφορετικών γονότυπων, η εμφάνιση των οποίων σχετίζεται και με το περιβάλλον κάθε βακτηρίου<sup>14</sup>. Αυτή η ποικιλομορφία στα γενετικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου αφορά συνήθως στο «accessory genome»<sup>15</sup>. Τα γονίδια που απαρτίζουν το «accessory genome» αφορούν περιοχές που προέρχονται από

:

- οριζόντια μεταφορά
- μετασχηματισμό
- μεταγωγή
- σύζευξη
- μετακίνηση μεταθετών στοιχείων<sup>16</sup>.



Εικόνα-3 Τρόποι ανταλλαγής γενωμικού υλικού στα βακτήρια : a) Μετασχηματισμός b) Μεταγωγή c) Σύζευξη

Στο μετασχηματισμό, τα γονίδια εισέρχονται στο βακτήριο με τη μορφή θραύσματος DNA, το οποίο μπορεί να προέρχεται

από νεκρά βακτήρια που μετά τη λύση τους απελευθερώνουν DNA στο περιβάλλον. Αντίθετα, όσον αφορά την περίπτωση μεταγωγής, αυτή πραγματοποιείται μέσω των βακτηριοφάγων. Τέλος, για τη σύζευξη απαιτείται η ύπαρξη ενός ζεύγους βακτηρίων, το ένα εκ των οποίων καλείται δότης και συμβολίζεται με  $F^+$ , ενώ το άλλο δέκτης και συμβολίζεται με  $F^-$  και μέσω των συζευκτικών ινιδίων τα πλασμίδια (παράγοντες  $F$ ), μεταφέρονται από το ένα βακτήριο στο άλλο. Εν αντιθέσει με το «accessory genome», οι πιο σταθερές γονιδιακές περιοχές του βακτηρίου, δηλαδή το «core genome», το οποίο αποτελεί περίπου το 90% ολόκληρης της γονιδιωματικής αλληλουχίας, είναι ισχυρά διατηρημένο, με κάποιες μελέτες να υποστηρίζουν ότι η μέση διαφοροποίηση του κυμαίνεται γύρω στο -0,5%, ποσοστό που αντιστοιχεί δηλαδή σε μία μετάλλαξη ανά περίπου 200 βάσεις<sup>15</sup>.

Όλοι οι προαναφερθέντες τρόποι ανταλλαγής γενωμικού υλικού προσφέρουν πληθώρα νέων ρυθμιστικών γονιδίων, τα οποία ελέγχουν διαδικασίες, όπως ο σχηματισμός νέων και ισχυρότερων βιοφίλμ μέχρι και την εμφάνιση του φαινομένου αντοχής στα αντιβιοτικά. Ιδιαίτερα στην *P. aeruginosa*, που ήδη βρίσκεται στην λίστα ESKAPE του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας<sup>17</sup>, η αντοχή στα αντιβιοτικά ήδη αποτελεί ένα από τα κύρια ζητήματα στην κλινική πρακτική με παγκόσμια κατανομή. Όλο και περισσότερες είναι οι ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις που αφορούν στελέχη ψευδομονάδας ανθεκτικά σε καρβαπενέμες, ενώ λόγω αλόγιστης χρήσης αντιβιοτικών αυξάνονται τα πολυανθεκτικά (MDR) και εκτενώς ανθεκτικά (XDR) στελέχη, ενώ το τελευταίο διάστημα παρατηρούνται περιστατικά και πανανθεκτικά στελέχη (PDR). Σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες του ECDC και του Centers for Disease Control and Prevention (CDC) για να χαρακτηριστεί ένα στέλεχος πολυανθεκτικό, θα πρέπει να διαθέτει αντοχή σε τουλάχιστον 3 κατηγορίες αντιβιοτικών, ενώ για να χαρακτηριστεί ως εκτενώς ανθεκτικό, ο αριθμός των αντίστοιχων κατηγοριών αυξάνει σε τουλάχιστον 6 από τις 8. Τέλος, το πανανθεκτικό στέλεχος, όπως αποκαλύπτει και η ονομασία του, δεν έχει ευαισθησία σε κανένα γνωστό αντιβιοτικό και οι πιθανότητες επιβίωσης για τον πάσχοντα είναι πολύ χαμηλές<sup>18</sup>.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός πως το συγκεκριμένο βακτήριο αποτελεί πιθανή απειλή για την δημόσια υγεία, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι το γονιδίωμα του έχει μελετηθεί

σε βάθος. Σε ορισμένα στελέχη, έχει βρεθεί πως τα Genomic Islands (GIs), δηλαδή συστάδες γονιδίων που έχουν προσληφθεί από το εκάστοτε βακτήριο μέσω οριζόντιας μεταφοράς<sup>16</sup>, αποτελούν το 10%, ίσως και περισσότερο, του βακτηριακού χρωμοσώματος<sup>6</sup>. Παρόλο που τα Genomic Islands (GIs) κωδικοποιούν στοιχεία που αφορούν μεταβολικά μονοπάτια ή γονίδια που επιτρέπουν την συμβίωση και την ύπαρξη αμοιβαίου οφέλους μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα το σύστημα ICEM/Sym<sup>R7A</sup>, συχνά κωδικοποιούν γονίδια αντοχής<sup>16</sup>, συμβάλλοντας στην παθογονικότητα του βακτηρίου. Η αλληλούχιση αυτών των γονιδίων δείχνει πως πολλά εξ αυτών προέρχονται από προφάγους<sup>14</sup>. Πολύ συχνά σε διάφορα στελέχη, ιδιαίτερα σε παθογονικά στελέχη όπως το LESB58, που ευθύνεται για επιδημίες στο Ηνωμένο Βασίλειο και την Αυστραλία σε ασθενείς με κυστική ίνωση<sup>19</sup>, μπορεί να ανευρεθούν έως και έξι ενεργοί προφάγοι με ολοκληρωμένες γονιδιωματικές αλληλουχίες<sup>14</sup>, ενώ συχνά τμήματα γονιδιωμάτων τους υπάρχουν ως γονιδιωματικά θραύσματα. Για αυτό το λόγο η ανίχνευση των προφάγων σε κλινικά στελέχη αλλά και η μετέπειτα ανάλυσή τους είναι ιδιαίτερα σημαντική.

## Βακτηριοφάγοι

### Ιστορική Αναδρομή

Με τον όρο «βακτηριοφάγος», ή αλλιώς φάγος, ορίζεται ένας ιός ο οποίος χρησιμοποιεί ως ξενιστή του τα βακτήρια ή τα αρχαιοβακτήρια. Αναλογιζόμενοι τον αριθμό των βακτηρίων που υπάρχουν στον πλανήτη, υπολογίζεται ότι στη φύση υπάρχουν περισσότεροι από  $10^{31}$  φάγοι, με τεράστια βιοποικιλότητα και εύρος ξενιστών<sup>20</sup>. Με ηλικία ύπαρξης περίπου τα τελευταία τρία δισεκατομμύρια έτη, θεωρούνται η επιτομή της διαφορετικότητας με σχεδόν κάθε είδος γονιδιώματος<sup>21</sup>. Πρωτοανακαλύφθηκαν το 1915 από τον William Twort, όμως ύστερα από δύο χρόνια έγινε ευρέως γνωστή η βακτηριοκτόνος δράση τους από το Felix d'Herelle<sup>22</sup>. Εκείνη την περίοδο, δεδομένου ότι δεν είχε ανακαλυφθεί ακόμη η πενικιλίνη, η επιστημονική κοινότητα εναπόθεσε τις ελπίδες της για την αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων στην ύπαρξη φάγων. Μάλιστα, ο ίδιος ο Felix d'Herelle πέρασε την επόμενη δεκαετία της ζωής του προσπαθώντας να θεραπεύσει ασθενείς σε όλο τον κόσμο, σε μέρη όπως η Αίγυπτος, η Ινδία και η Γαλλία, χορηγώντας βακτηριοφάγους σε ενέσιμη μορφή κατάλληλους για την θεραπεία της εκάστοτε λοίμωξης<sup>21</sup>. Το 1928 μάλιστα συνέβαλε και στην ίδρυση του Ινστιτούτου Βακτηριοφάγων, Μικροβιολογίας και Ιολογίας George Eliava στο



Tbilisi της Γεωργίας, το οποίο υπάρχει ακόμα και σήμερα και εστιάζει στην παραγωγή κοκτέιλ φάγων. Παρά τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων των ερευνών του σε ιατρικά περιοδικά, οι θεωρίες του δεν έγιναν ευρέως αποδεκτές μέχρι και τη δεκαετία του 1940<sup>21</sup>. Από τη δεκαετία του 1930 και έπειτα, η φαρμακευτική βιομηχανία στράφηκε στα ευκόλως παραγόμενα αντιβιοτικά, παραγκωνίζοντας κατά πολύ την έρευνα πάνω στους τότε νεοευρεθέντες ιούς. Η έρευνα για τα αντιβιοτικά εντάθηκε ακόμα περισσότερο κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου, οπότε και οι ανάγκες για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων των στρατιωτών αυξήθηκαν κατακόρυφα. Τα μοναδικά ερευνητικά κέντρα που εστίασαν περισσότερο στους βακτηριοφάγους καθ όλη εκείνη την περίοδο αλλά και μετέπειτα, ανήκαν στις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης, όπου ακόμα και σήμερα η παρουσία κλινικών εξειδικευμένων στην αντιμετώπιση ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων με τη χορήγηση κοκτέιλ φάγων στους ασθενείς είναι διαδεδομένη<sup>22</sup>.

Το τελευταίο διάστημα όμως, λόγω της παγκόσμιας έξαρσης λοιμώξεων προκαλούμένων από νέους ανθεκτικούς μικροοργανισμούς, τόσο σε νοσοκομειακές μονάδες όσο και στην κοινότητα, μεγάλοι οργανισμοί όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και ο ECDC έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην μελέτη των φάγων. Ένα από τα πιο διαδεδομένα προγράμματα παγκόσμιου βεληνεκούς είναι το PhagoBurn. Με πρωτοβουλία της Ευρωπαϊκής Ένωσης και σε συνεργασία των Pherocydes Pharma, Clean Cells, Statitec, France Europe Innovation και πολλών ερευνητικών κέντρων σε Γαλλία, Βέλγιο και Ελβετία μελετήθηκε σε βάθος η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με φάγους σε ασθενείς με εγκαύματα. Τα μοντέλα που μελετήθηκαν αφορούσαν 220 ασθενείς, με την πρώτη ομάδα 110 ατόμων να υφίσταται μόλυνση των εγκαυμάτων από *E. coli* ενώ η δεύτερη ομάδα από *P. aeruginosa*. Το πρόγραμμα διήρκησε από το 2013 έως το 2017 με τις κλινικές δοκιμές σταδίου I και II να ξεκινούν το 2015. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα έδωσε κατευθυντήριες γραμμές στις Ευρωπαϊκές Χώρες όσον αφορά την θεραπεία με φάγους, όμως η απόφαση για τον καθορισμό αυστηρών κριτηρίων σε παγκόσμια ή ευρωπαϊκή κλίμακα ακόμα βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο. Πολλά ακόμη προγράμματα κλινικών δοκιμών εφαρμόζονται σε εθνικό επίπεδο, με τα δύο κύρια να αφορούν το Ινστιτούτο Βακτηριοφάγων, Μικροβιολογίας και Ιολογίας George Eliava στο Tbilisi της Γεωργίας και το Ινστιτούτο Hirsfeld στην Βρότσαβ της Πολωνίας<sup>23</sup>.

### Δομικά Χαρακτηριστικά και Ταξινόμηση

Οι βακτηριοφάγοι παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στη μορφολογία τους, αλλά και σε επίπεδο γονιδιώματος συνδυάζοντας ορισμένες φορές μοναδικά χαρακτηριστικά. Όσον αφορά τη δομή τους, η οποία είναι ορατή μέσω του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί τύποι:

- a) με εικοσαεδρικό καψίδιο
- b) με νηματοειδή δομή
- c) πολυμορφικό σχήμα
- d) δυαδική μορφή.

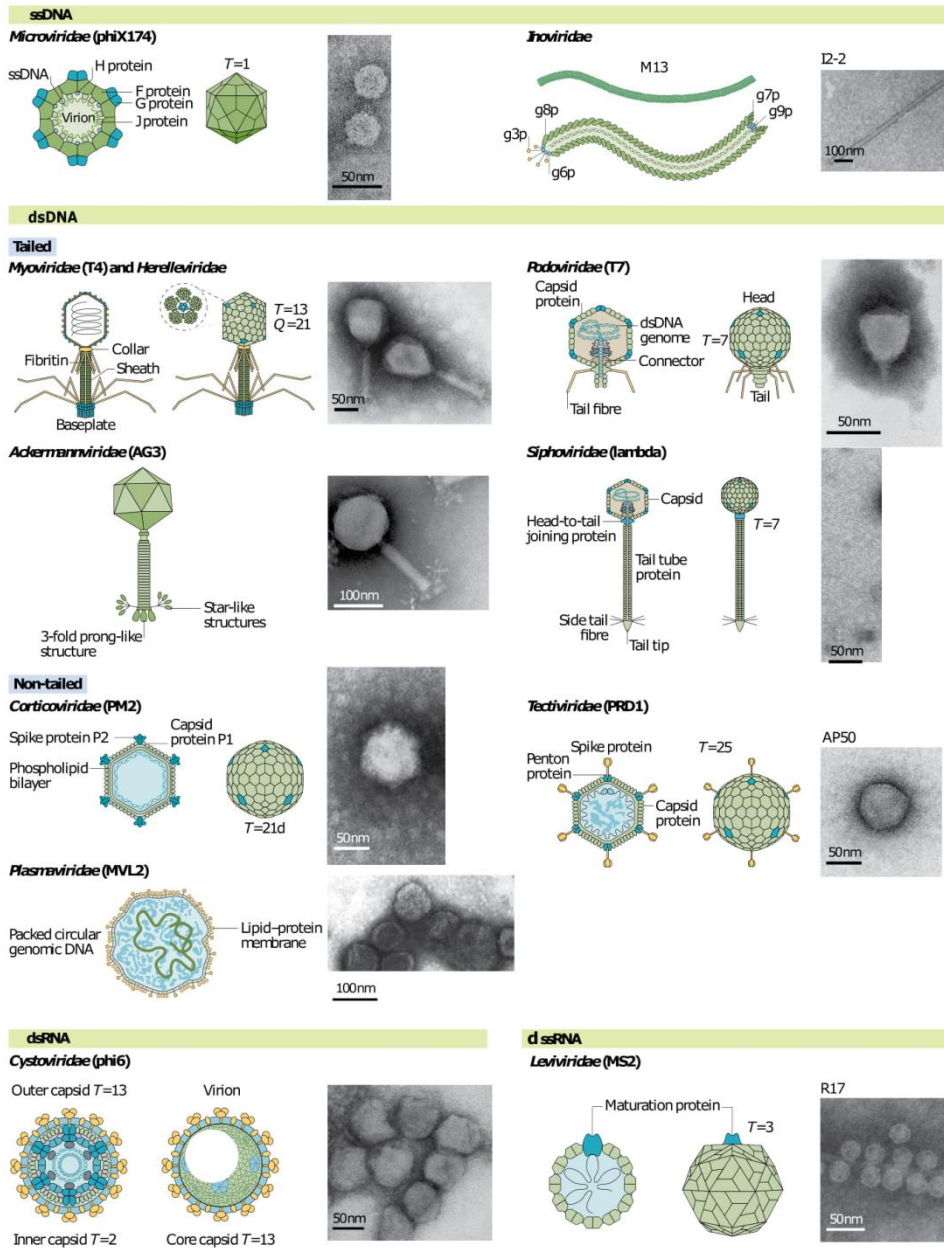
Η τελευταία μορφή είναι και πιο διαδεδομένη μεταξύ των φάγων, με την οποία είναι πιο συχνά αναγνωρίσιμοι. Όλες ανεξαιρέτως οι δομές περιλαμβάνουν την κεφαλή, και το καψίδιο, συνήθως ισοεδρικό, που περιέχει το γονιδίωμα του ιού. Πέραν αυτού όμως, η πλειονότητα τους φέρει και μία ουρά, χαρακτηριστικό γνώρισμα του είδους, η οποία αποτελείται από έναν κενό πρωτεϊνικής φύσεως σωλήνα, μέσω του οποίου κατά τη φάση της μόλυνσης το γονιδίωμα εισέρχεται απευθείας στο εσωτερικό του βακτηρίου<sup>21</sup>. Όσον αφορά την ταξινόμησή τους, το ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) έχει τοποθετήσει όλους τους φάγους σε 1 τάξη, 13 οικογένειες και 31 γένη με βάση το γονιδίωμα τους. Όλες οι οικογένειες ανήκουν στην τάξη *Caudovirales*<sup>24</sup> και απαριθμούνται αναλυτικά παρακάτω στον Πίνακα 1. Οι πιο συχνές από αυτές, οι οποίες αποτελούν περίπου το 96% του σύνολου, περιέχουν dsDNA και είναι οι *Myoviridae*, *Siphoviridae* και οι *Podoviridae*. Οι προαναφερθείσες οικογένειες παρόλο που εμφανίζουν κοινά γνωρίσματα σε πολλά επίπεδα, το χαρακτηριστικό με βάση το οποίο διαχωρίζονται είναι το μήκος της ουράς τους. Οι φάγοι της οικογένειας *Myoviridae* έχουν μακριά και μη συσταλή ουρά, οι φάγοι *Siphoviridae* έχουν και αυτοί μακριά ουρά αλλά κινητή, ενώ τέλος όσοι ανήκουν στην οικογένεια *Podoviridae* έχουν μικρού μήκους ουρά<sup>24</sup>. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά τους είναι παρόμοια, καθώς και οι τρεις οικογένειες έχουν μια εικοσαεδρική κεφαλή η οποία περιέχει το γονιδίωμα τους, το οποίο κυμαίνεται από 17 έως και 50Kbp. Στη συνέχεια της δομής εντοπίζουμε το λαιμό, ο οποίος συνδέει την κεφαλή με το υπόλοιπο σώμα, που αποτελείται από τα ινίδια, την πλάκα βάσης και την ουρά. Τα ινίδια βρίσκονται περιφερικά της κεφαλής και χρησιμοποιούνται ως αρχικό μέσο προσκόλλησης στον ξενιστή. Κάθε φάγος περιλαμβάνει πολλά είδη ινιδίων, στοχεύοντας κάθε φορά σε διαφορετικούς υποδοχείς του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, πρωτεϊνικούς, ολιγοσακχαρικούς ή λιποπολυσακχαρικούς<sup>21</sup>. Λόγω της

ιδιότητας των φάγων να μολύνουν συγκεκριμένα είδη ή ακόμα και στελέχη<sup>23</sup>, τα ινίδια προσκόλλησης τους έχουν πολύ εξειδικευμένη δομή και πολλοί ερευνητές έχουν επικεντρωθεί σε αυτή την ιδιότητα, προσπαθώντας να κατασκευάσουν υποδοχείς που θα επιτρέπουν την μόλυνση ταξινομικά απομακρυσμένων ξενιστών. Δεδομένου ότι τα βακτήρια σχηματίζουν έλυτρο ή βιοφίλμ, προστατευόμενα έτσι εκτός των άλλων και από πιθανή προσκόλληση φάγων στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, πολλοί φάγοι φέρουν ένζυμα διάσπασης Πίνακας 1 - Τα διαφορετικά είδη γονιδιωμάτων των βακτηριοφάγων και οι οικογένειες στις οποίες ανήκουν ανάλογα με τον τύπο του γονιδιώματος που περιέχουν. εξωπολυσακχαριτών

(διπολυμεράσες) πάνω στα ινίδια τους, απελευθερώνοντας έτσι τους υποδοχείς και επιτυγχάνοντας την πρωτογενή λοίμωξη<sup>2526</sup>. Σε φάγους που δεν περιέχουν ουρά ή ινίδια προσκόλλησης, παράγονται ένζυμα που αποικοδομούν τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, προκειμένου να επιτευχθεί η ίδια διαδικασία. Η τελική προσκόλληση του φάγου

Είδος Γονιδιώματος	Οικογένεια
ssRNA	<i>Leviviridae</i>
dsRNA	<i>Cystoviridae</i>
ssDNA	<i>Inoviridae</i>
	<i>Microviridae</i>
dsDNA	<i>Fuselloviridae</i>
	<i>Plasmaviridae</i>
	<i>Corticoviridae</i>
	<i>Tectiviridae</i>
	<i>Lipothrixviridae</i>
	<i>Rudiviridae</i>
	<i>Myoviridae</i>
	<i>Siphoviridae</i>
	<i>Podoviridae</i>

επιτυγχάνεται μέσω των καρφίων που υπάρχουν πάνω στην πλάκα βάσης. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την είσοδο του γονιδιώματος του φάγου μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, η οποία εξασφαλίζεται με μια αλλαγή στην στερεοδιάταξη της κεφαλής, η οποία συσπάται και εγχέει το γονιδίωμα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Από αυτό το σημείο και έπειτα ξεκινάει ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού.



Εικόνα-4 Εικόνες των διαφορετικών οικογενειών βακτηριοφάγων, με αναλυτικές περιγραφές τους.

## Κύκλος Αναπαραγωγής

Οι φάγοι έχουν τέσσερις πιθανούς κύκλους αναπαραγωγής, τον λυτικό, τον λυσιγονικό, τον ψευδολυσιγονικό και την χρόνια μόλυνση<sup>22</sup>. Οι τρεις πρώτοι αφορούν τους ιούς που μολύνουν τα βακτήρια, ενώ ο τελευταίος αφορά φάγους των αρχαιοβακτηρίων. Ο πρώτος και πιο γνωστός κύκλος αναπαραγωγής είναι ο λυτικός, κατά τον οποίο, μετά την είσοδο του γονιδιώματος του φάγου στο βακτήριο, προκειμένου να προστατευτεί από τις νουκλεάσες, κυκλοποιείται μέσω των κολλώδων άκρων του ή τροποποιεί τα γραμμικά άκρα του, δίνοντας έτσι χρόνο στην RNA πολυμεράση του ξενιστή να προχωρήσει στην πρώιμη μεταγραφή των εξωνίων. Αυτά τα πρώιμα εξώνια κωδικοποιούν τα ένζυμα επιδιόρθωσης και περιοριστικές πρωτεΐνες έναντι των νουκλεασών και των πρωτεασών του ξενιστή. Στη συνέχεια, ξεκινάει η αντιγραφή του DNA του βακτηριοφάγου, ενώ τα όψιμα γονίδια που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του ιοσώματος του ξεκινούν να εκφράζονται και οι πρωτεΐνες αυτές παράγονται και στη συνέχεια ανασυγκροτούνται, δημιουργώντας ένα νέο ιικό σωματίο. Τα πρώτα δομικά στοιχεία που συσκευάζονται είναι το καψίδιο, το οποίο περιέχει μέσα και ένα αντίγραφο του DNA του φάγου. Μετά το τέλος της αυτοσυγκρότησης, εκφράζεται και το τελευταίο όψιμο γονίδιο, αυτό που κωδικοποιεί τη λυσοζύμη, ένζυμο που χρησιμοποιείται από τον φάγο για να διασπάσει το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα κατά τη διάρκεια μιας νέας μόλυνσης και αποθηκεύεται στην ουρά των νέων ιοσωματίων. Τα έτοιμα ιικά σωματίια πλέον, φέροντας την λυσοζύμη και άλλες ενδολυσίνες, διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα τη λύση του βακτηρίου και την απελευθέρωση των νέων ιικών σωματίων<sup>2126</sup>.

Ο λυσιγονικός κύκλος αντίθετα δεν περιλαμβάνει την παραγωγή ώριμων ιοσωμάτων από το βακτήριο ούτε προκαλεί λύση του. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το γονιδίωμα του φάγου αφού εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, δεν αρχίζει την διαδικασία αντιγραφής αλλά ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή του<sup>22</sup>, χρησιμοποιώντας το ένζυμο ιντεγκράση<sup>27</sup>. Η θέση στην οποία ενσωματώνεται το γονιδίωμα του είναι καθορισμένη<sup>2728</sup>, με συνήθηστόχο περιοχές που κωδικοποιούν tRNAs<sup>2928</sup>. Υπάρχουν όμως και βακτηριοφάγοι των οποίων το γονιδίωμα ενσωματώνεται τυχαία σε αυτό του βακτηρίου, με τη βοήθεια του ενζύμου τρανσποζάση που οι ίδιοι κωδικοποιούν<sup>21</sup>. Οι προφάγοι παραμένουν ενσωματωμένοι στο βακτηριακό χρωμόσωμα και πολλαπλασιάζονται μαζί με αυτό κατά τη διάρκεια της διαίρεσης, μεταβιβάζοντας έτσι το γονιδίωμα τους και στους απογόνους, παραμένοντας σε

αυτήν την κατάσταση για γενεές. Σε αυτό το στάδιο, οι προφάγοι καταστέλλουν τις διαδικασίες της μεταγραφής, αντιγραφής και μετάφρασης μέσω μιας πρωτεΐνης «καταστολέα». Όταν όμως το βακτήριο εκτεθεί σε εξωγενείς παράγοντες, όπως χημικές ουσίες ή ακτινοβολία UV, ή και αυτόματα περίπου 1 φορά κάθε 10.000 διαιρέσεις, η μεταγραφή της πρωτεΐνης του καταστολέα απενεργοποιείται και κατά συνέπεια το ιικό DNA αποκόπτεται από το βακτηριακό και εισέρχεται στο λυτικό κύκλο, με τη διαδικασία που ακολουθεί στη συνέχεια να είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε προηγουμένως<sup>21</sup>. Με το λυσιγονικό κύκλο, γονίδια τα οποία δεν υπάρχουν φυσιολογικά στο βακτήριο, εκφράζονται αυξάνοντας τη λοιμογόνο ικανότητα του ξενιστή και τροποποιώντας την έκβαση της κλινικής εικόνας του ασθενούς<sup>22</sup>. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται λυσιγονική μετατροπή και μερικές γνωστές περιπτώσεις εφαρμογής της αφορούν το βακτήριο *Corynebacterium diphtheriae* και την εξωτοξίνη της διφθερίτιδας, η οποία εκφράζεται μέσω του προφάγου β<sup>21</sup>, το βακτήριο *Vibrio cholerae* και της χολερικής τοξίνης, η οποία εκφράζεται μέσω του προφάγου CTX<sup>22</sup> και το *Streptococcus pyogenes* και των πυρετογόνων εξωτοξινών του, που εκφράζεται μέσω του προφάγου T12<sup>2130</sup>.

Ο ψευδολυσιγονικός κύκλος αποτελεί αντικρουόμενο αντικείμενο μελέτης, καθώς δεν έχουν καθοριστεί πλήρως οι συνθήκες που τον διέπουν. Γενικότερα, όμως, ορίζεται σαν ένα ενδιάμεσο στάδιο των δύο προαναφερθέντων κύκλων αναπαραγωγής, όπου ο βακτηριοφάγος δεν έχει εισέλθει ούτε στο λυτικό κύκλο ούτε στο λυσιγονικό<sup>22</sup>. Σε αυτό το σημείο, όλες οι διαδικασίες αντιγραφής ή πρωτεϊνοσύνθεσης σταματούν ενώ το γενωμικό υλικό του φάγου παραμένει στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου ως ένα κυκλικό μόριο, παρόμοια με ένα πλασμίδιο<sup>31</sup>. Ο συγκεκριμένος τρόπος αναπαραγωγής έχει συσχετιστεί με συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών<sup>31</sup> και εικάζεται ότι μόλις αυτά αποκατασταθούν, τότε ο φάγος εισέρχεται είτε στον πρώτο είτε στον δεύτερο κύκλο αναπαραγωγής<sup>22</sup>. Τέλος, στις χρόνιες λοιμώξεις από φάγους, το προκαρυωτικό κύτταρο, παρά τη μόλυνσή του, δεν λύεται, αλλά αντίθετα μικρή ποσότητα φάγων εκλύεται από το βακτήριο σε μια εκτεταμένη χρονική περίοδο. Τέτοιες λοιμώξεις επηρεάζουν τα αρχαιοβακτήρια και το ευβακτήριο *Mycoplasma*, ενώ οι φάγοι που δημιουργούν τέτοιες λοιμώξεις ανήκουν στην οικογένεια *Inoviridae* και *Plasmaviridae*<sup>22</sup>.

## Γονιδίωμα βακτηριοφάγων

Οι βακτηριοφάγοι, διαθέτουν όλα τα είδη γονιδιωμάτων (ssRNA, dsRNA, ssDNA, dsDNA), με την πλειοψηφία να περιέχει δίκλωνο DNA, ενώ αντίστοιχα μεγάλο είναι και το εύρος του μεγέθους των γονιδιωμάτων, το οποίο κυμαίνεται από τις 3300 bp, στους ssRNA ιούς έως και τις 500 Kbp, στους «jumbo phages»<sup>2032</sup>. Στις οικογένειες *Podoviridae*, *Siphoviridae* και *Mycoviridae*, που περιέχουν dsDNA, το μήκος του γονιδιώματος παρουσιάζει εύρος από 10 έως και 50 χιλιάδες νουκλεοτίδια, με τα γονίδια που απαιτούνται για την δημιουργία ενός ολοκληρωμένου βακτηριοφάγου να χωρίζονται σε πέντε διαφορετικές ομάδες :

- a) ρύθμιση των δομικών πρωτεϊνών του καψιδίου, της ουράς και των ινιδίων
- b) ένζυμα για την αντιγραφή του γονιδιώματος
- c) ένζυμα για την συσκευασία (packaging) του γονιδιώματος
- d) τους ρυθμιστές μεταγραφής
- e) λυτικά ένζυμα<sup>33</sup>.

Όσο περισσότερο αυξάνει το μέγεθος του γονιδιώματος, τόσο περισσότερες γενετικές πληροφορίες περιέχει ο φάγος και επομένως διαθέτει μεγαλύτερη δυνατότητα να παρεμβαίνει στις διαδικασίες μεταγραφής και μετάφρασης των βακτηρίων<sup>33</sup>. Έχει παρατηρηθεί, επίσης, πως το μέγεθος του γονιδιώματος για κάθε βακτηριοφάγο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λοιμογονικότητά του, καθώς μικρότερο ή μεγαλύτερο μέγεθος του γονιδιώματος μπορεί να οδηγήσει σε αστάθεια του καψιδίου<sup>20</sup>. Η κατάλληλη ποσότητα DNA επιτυγχάνεται είτε μέσω απώλειας είτε μέσω πρόσληψης γονιδίων, ανεξάρτητα από τη λειτουργία τους<sup>20</sup>.

Οι λυσιγονικοί φάγοι ή προφάγοι, όπως προαναφέρθηκε, έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο βακτηριακό γονιδίωμα μέσω της διαδικασίας της μεταγωγής, ενός εκ των τριών τρόπων οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού. Υπολογίζεται ότι περίπου το 10% με 20% του βακτηριακού γονιδιώματος αποτελείται από προφάγους ή τμήματα αυτών<sup>2033</sup>. Κατά τη διαδικασία της μεταγωγής, τμήματα του βακτηριακού γενωμικού υλικού μπορεί να επιλεγούν έναντι των ικών γονιδίων, με αποτέλεσμα να πακεταριστούν (packaged) στα νέα ιικά σωματίδια και να μεταφερθούν σε νέους ξενιστές<sup>34</sup>. Λόγω αυτής της ιδιότητας, οι φάγοι επιδεικνύουν μεγάλη γενετική ανομοιογένεια μεταξύ τους με αποτέλεσμα να μην μπορεί να

εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα όσον αφορά την εξελικτική τους πορεία<sup>35</sup>. Αυτή η γενετική ανομοιογένεια ορίζεται ως μωσαϊκισμός, και μπορεί να παρατηρηθεί κατά μήκος ολόκληρου του φαγικού γονιδιώματος<sup>35</sup>. Πολύ συχνά παρατηρείται ότι φάγοι που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες επιδεικνύουν μεγάλη ομολογία στις πρωτεΐνες τους, ιδιαίτερα της κεφαλής και των δομικών στοιχείων τους<sup>2436</sup>, όπως και σε περιοχές που αφορούν τα λυτικά τους ένζυμα<sup>36</sup>. Ο μωσαϊκισμός ευθύνεται και για την μεταφορά μεταθετών στοιχείων, όπως Genomic Islands (GIs) και πλασμίδια στο γονιδίωμα του ξενιστή<sup>2037</sup>, αποτελώντας δεξαμενή για γονίδια αντοχής και γονιδίων αποφυγής μηχανισμών άμυνας των ευκαρυωτικών οργανισμών<sup>14</sup>.

### Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες των βακτηριοφάγων ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες, ανάλογα με την λειτουργία τους. Οι κυριότεροι ρόλοι τους είναι:

- a) δόμηση του ιικού σωματίου
- b) ενσωμάτωση του φαγικού γονιδιώματος στο βακτηριακό
- c) λύση του βακτηριακού κυττάρου
- d) αντιγραφή του φαγικού γονιδιώματος
- e) πακετάρισμα (package) του νέου ιικού σωματίου
- f) ρύθμιση των φαγικών λειτουργιών (regulation proteins)
- g) συναρμολόγηση του νέου ιικού σωματίου
- h) μόλυνση του βακτηρίου
- i) αποφυγή των μηχανισμών απομάκρυνσης του ξενιστή<sup>38</sup>.

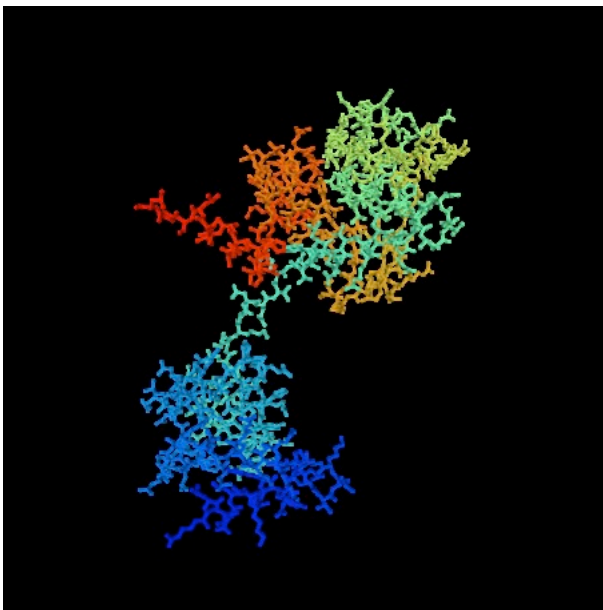
Πολλές πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται ως υποθετικές ή μη ταυτοποιημένες, με άγνωστη λειτουργία, καθώς δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμη ο σχολιασμός τους. Πολλά από αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια έχουν κινήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών ως νέοι πιθανοί αντιμικροβιακοί παράγοντες, με κυριότερες τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην διαδικασία λύσης του βακτηριακού κυττάρου<sup>3934</sup>. Οι ενδολυσίνες, όπως ονομάζονται, χρησιμοποιούνται από τους φάγους όταν αυτοί βρίσκονται στον λυτικό κύκλο, για να διασπάρουν τα εξωτερικά κυτταρικά στρώματα του βακτηρίου προκειμένου να ελευθερωθούν τα νέα ιικά σωματία<sup>34</sup>. Οι ενδολυσίνες ανήκουν σε πολλές διαφορετικές υποκατηγορίες, ανάλογα με το στρώμα του βακτηριακού κυττάρου το οποίο διασπούν. Οι διπολιμεράσες διασπούν τους εξωτερικούς πολυσακχαρίτες στα βιοφίλμ, οι υδρολάσες διασπούν το στρώμα πεπτιδογλυκάνης (VAPGH),



οι μουραμιδάσες αφορούν λυτικά ένζυμα του στρώματος μуреΐνης του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ οι χολίνες δημιουργούν πόρους στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, επιτρέποντας σε ένζυμα όπως η λυσοζύμη και άλλες λυσίνες να φτάσουν το στρώμα πεπτιδογλυκάνης<sup>402141</sup>.

Οι χολίνες αποτελούν αντικείμενο ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, καθώς εντοπίζονται σε φάγους που προσβάλλουν τόσο τα Gram θετικά (+) όσο και τα Gram αρνητικά (-) βακτήρια. Η λειτουργία τους είναι συνεργατική με των ενδολυσινών<sup>40</sup>, αλλά και ρυθμιστική, καθώς αυτές παρέχουν την λειτουργική πρόσβαση των ενδολυσινών στο στρώμα πεπτιδογλυκάνης των βακτηρίων<sup>42</sup>. Συχνά χαρακτηρίζονται ως «μοριακά ρολόγια», καθώς ρυθμίζουν με πολύ μεγάλη ακρίβεια τη στιγμή λύσης του βακτηριακού κυττάρου. Εικάζεται ότι αυτή η ακρίβεια εξελίχθηκε ώστε να παραχθούν όσο το δυνατόν περισσότερα ώριμα ιικά σωματίδια και αρκετή ποσότητα ενδολυσινών, εξασφαλίζοντας έτσι γρήγορη λύση του βακτηρίου και άμεση απελευθέρωση των νέων ιικών σωματίων στο περιβάλλον, χωρίς πιθανή αλλοίωσή τους<sup>42</sup>. Ανάλογα με την δράση τους διακρίνονται σε δύο διαφορετικές ομάδες, τις κανονικές και τις πινοχολίνες. Οι πρώτες δημιουργούν μεγάλες οπές στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου επιτρέποντας στις επιμέρους κλάσεις των ενδολυσινών να δράσουν στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου, ενώ αντίθετα οι πινοχολίνες δημιουργούν πολλές μικρού μεγέθους οπές στην κυτταρική μεμβράνη διαταράσσοντας έτσι την πολικότητα της<sup>40</sup>. Μορφολογικά είναι μικρές σε μήκος πρωτεΐνες και μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κλάσεις, τις  $S^{\lambda}$  and  $S^{21}$ . Παρόλο που αυτές οι κλάσεις δεν παρουσιάζουν κάποια ομοιότητα όσον αφορά την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, έχουν και οι δύο C-τερματικές περιοχές (C-terminal domains), βραχείες πολικές αμινο-τερματικές αλληλουχίες (amino-terminal), μία υδρόφοβη περιοχή και μια σύντομη ακολουθία που πιθανώς να είναι μια περιοχή β-στροφής (β-turn domain) μεταξύ δύο πιθανών ελικοειδών διαμεμβρανικών περιοχών<sup>42</sup>. Η διαφορά μεταξύ των δύο έγκειται στις περιοχές που προβλέπεται ότι δεν έχουν καθαρό φορτίο στις πλευρικές αλυσίδες, καθώς οι χολίνες που ανήκουν στην κλάση  $S^{\lambda}$  έχουν τρεις τέτοιες περιοχές ενώ όσες ανήκουν στην κλάση  $S^{21}$  έχουν μόνο δύο<sup>4239</sup>. Βασικό χαρακτηριστικό τους αποτελεί το ότι μεταγράφονται μόνο κατά τον λυτικό κύκλο. Αυτή τους η ιδιότητα χρησιμοποιείται από προγράμματα μεταγενεωμικών αναλύσεων, όπως το *Phage\_Finder*, για να ανιχνευτεί η ενεργότητα ή μη του ανευρεθέντος προφάγου<sup>2329</sup>.

Πρωτεΐνες με ιδιαίτερα σημαντικό βιολογικό ρόλο είναι οι ιντεγκράσες και οι τρανσποζάσες. Και οι δύο αυτές οικογένειες πρωτεϊνών έχουν σαν βασική λειτουργία τους την ενσωμάτωση του φαγικού γονιδιώματος στο χρωμόσωμα του βακτηρίου<sup>27</sup>. Οι ιντεγκράσες είναι ένζυμα που ενσωματώνουν το γονιδίωμα του εκάστοτε φάγου σε αυτό του βακτηρίου χρησιμοποιώντας κωδικές περιοχές αναγνώρισης, τόσο στο DNA του προφάγου, που ονομάζονται *attP*, όσο και στο βακτηριακό χρωμόσωμα, που ονομάζονται *attB*. Οι περιοχές αναγνώρισης για τις ιντεγκράσες είναι συγκεκριμένες, με καθορισμένο μήκος. Η εξειδίκευση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι πολύ μεγάλη, καθώς έχει παρατηρηθεί πως μια ιντεγκράση αναγνωρίζει τις δικές τις περιοχές πρόσδεσης, χωρίς να τις συγχέει με αντίστοιχες περιοχές άλλου φάγου<sup>27</sup>. Αυτό το χαρακτηριστικό τους τις καθιστά ιδιαίτερα πολύτιμες στον τομέα της Συνθετικής Βιολογίας και της Γενετικής Μηχανικής, διαχωρίζοντάς τες από τις αντίστοιχες ρεκομπινάσες των ρετροϊών, όπου δεν έχουν εξειδίκευση ως προς το



Εικόνα-4 Τρισδιάστατη αναπαράσταση της ιντεγκράσης του βακτηριοφάγου Pf1.

γονιδιακό τμήμα στο οποίο θα ενσωματωθούν<sup>27</sup>. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες οικογένειες, της τυροσίνης και της σερίνης, οι οποίες δεν παρουσιάζουν ομοιότητα ούτε ως προς την μορφολογία τους ούτε ως προς τους μηχανισμούς τους<sup>27</sup>. Η οικογένεια της τυροσίνης περιέχει αμιγώς ιντεγκράσες. Οι ιντεγκράσες που ανήκουν σε αυτήν χρησιμοποιούν το ομώνυμο αμινοξύ για να ενσωματωθούν στο καθορισμένο για αυτές τμήμα DNA<sup>27</sup> ενώ οι περιοχές πρόσδεσης τους (*attP*, *attB*) είναι πιο σύνθετες από αυτές της οικογένειας της

σερίνης. Η οικογένεια της σερίνης αντίθετα περιέχει και ιντεγκράσες και τρανσποζάσες, μεγαλύτερες σε μήκος από τις αντίστοιχες ιντεγκράσες της οικογένειας της τυροσίνης<sup>27</sup>. Οι τρανσποζάσες είναι ένζυμα παρόμοια με τις ιντεγκράσες, αλλά δεν έχουν συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης πάνω στο γονιδίωμα, θυμίζοντας σε κάποιο βαθμό τις ιντεγκράσες των ρετροϊών<sup>43</sup>. Μελέτες κρυσταλλογραφίας ισχυροποιούν αυτήν την παρατήρηση, αναφέροντας ότι η ιντεγκράση του ιού HIV και του ASV παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με

την μεταλλική περιοχή πρόσδεσης (metal binding domain) της τρανσποζάσης των βακτηριοφάγων τύπου Mu<sup>43</sup>.

## Next Generation Sequencing

### Γενικά Χαρακτηριστικά

Η ιδέα της αλληλούχισης ολόκληρου του ανθρωπίνου γονιδιώματος ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970, όπου ο Sanger και η επιστημονική του ομάδα ανέπτυξαν την ομώνυμη μεθοδολογία αλληλούχισης. Η μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger κατέχει ακόμα και σήμερα σημαντική θέση στα εργαστήρια μοριακής και γονιδιωματικής με αρκετές παραλλαγές και εφαρμογές στην καθημερινή κλινική πρακτική ενώ χρησιμοποιείται και ως επιβεβαιωτική μέθοδος νεότερων πλατφορμών αλληλούχισης<sup>44</sup>. Στηρίζεται στον κατακερματισμό και την ανάγνωση τμημάτων συγκεκριμένου μήκους αλληλουχίας του γονιδίου του ενδιαφέροντός μας. Η αλληλούχιση βασίζεται στην εφαρμογή της τεχνικής «τερματισμού αλυσίδας» (chain termination technique), κατά την οποία χρησιμοποιούνται τροποποιημένα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) ως αναστολείς της λειτουργίας της DNA πολυμεράσης, επιτρέποντας εν τέλει την ενίσχυση μιας ολιγονουκλεοτιδικής αλυσίδας<sup>45,46</sup>, παρέχοντας μεγαλύτερη ακρίβεια ως προς την ανακάλυψη μικρών μεταλλαγών, όπως οι αντικαταστάσεις, οι εισαγωγές και οι διαγραφές, στα συγκεκριμένα τμήματα<sup>47</sup>. Παρόλο που η συγκεκριμένη τεχνική έδωσε μια πρώτη ώθηση στην αποκρυπτογράφηση γονιδίων αλλά και ολόκληρων γονιδιωμάτων, ιδιαίτερα μετά την αυτοματοποίηση της, παραμένει αρκετά χρονοβόρα και ακριβή όσον αφορά ερευνητικές διαδικασίες, όπου απαιτείται η γρήγορη και ακριβής ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων. Χαρακτηριστικά, η έναρξη του Human Genome Project το 2004 οδήγησε στην ανάπτυξη και την εμπορευματοποίηση νέων τεχνολογικών μεθόδων, όπως της Αλληλούχισης Νέας Γενιάς<sup>46,48</sup>. Η Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς ή αλλιώς Next Generation Sequencing (NGS) αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 2000 και έκτοτε έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε εργαστηριακό επίπεδο ενώ γίνεται προσπάθεια να ενταχθεί και στην κλινική πρακτική. Πολλές είναι οι πλατφόρμες που έχουν δημιουργηθεί με κυριότερες αυτές της Illumina, της Ion Torrent, της Pacific Biosciences, της Helios και της Roche 454. Λόγω του συνεχούς ανταγωνισμού μεταξύ τους και της ζήτησης αυτών των μεθόδων, το κόστος μιας ανάλυσης έχει μειωθεί πλέον από

τα 100.000.000\$ το 2001 στα 1.000\$ ανά δείγμα το 2014<sup>46</sup>, φτάνοντας το 2019 να στοιχίζει λιγότερο από 200\$<sup>49</sup>.

### Διαδικασία - Πρωτόκολλα

Η διαδικασία που ακολουθείται στην Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς είναι παρόμοια για όλες τις πλατφόρμες, ανάλογα με το πρωτόκολλο (pipeline) που θα χρησιμοποιηθεί από το εκάστοτε εργαστήριο. Αφού συλλεχθεί το δείγμα και πραγματοποιηθεί η απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος, ακολουθεί η παρασκευή της NGS βιβλιοθήκης (NGS library), ενώ το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την αλληλούχιση (sequencing), την στοίχιση (alignment) και την τελική συναρμολόγηση των τμημάτων (assembly)<sup>50</sup>. Η ανάλυση του γονιδιώματος μπορεί να επικεντρώνεται στην αλληλούχιση:

- a) Ολικού γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing)
- b) Ολικού μεταγραφώματος (RNA-seq)
- c) Κωδικοποιητικών περιοχών του γενετικού υλικού (Whole Exome Sequencing)
- d) Ολικού μεταγραφώματος, συμπεριλαμβανομένων μη κωδικοποιητικών περιοχών (Whole Transcriptome Sequencing)

Η γενετική περιοχή που άπτεται του ενδιαφέροντος του ερευνητή τεμαχίζεται σε μικρότερα τμήματα που έχουν μήκος έως 20.000 βάσεις, αν και οι περισσότερες πλατφόρμες επιλέγουν μήκος αλληλουχούμενων βάσεων κάτω από τις 1.000<sup>46</sup>. Η διαδικασία της αλληλούχισης μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο στη μία νουκλεοτιδική αλυσίδα (fragment templates) όσο και στις δύο (mate-pair templates), αν και στις περισσότερες αναλύσεις προτιμάται η ανάλυση pair-end λόγω μεγαλύτερης πιστότητας<sup>4850</sup>. Συνήθως, πριν τη διαδικασία της δημιουργίας βιβλιοθήκης, μπορεί να προηγηθεί η ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων με PCR<sup>46</sup>, αν και αυτό το βήμα μπορεί να παραλειφθεί.

Στη συνέχεια ακολουθεί η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων. Τα τμήματα που προκύπτουν από την διαδικασία της αλληλούχισης, λόγω του μικρού μήκους τους, οφείλουν να έχουν μεγάλη κάλυψη (coverage) ως επαλήθευση της μη τυχαίας στοίχισης τους στο συγκεκριμένο τμήμα. Ως κάλυψη ορίζεται ο αριθμός των σύντομων αναγνώσεων που

αλληλοεπικαλύπτονται σε μια συγκεκριμένη γονιδιωματική περιοχή και συνήθως είναι πάνω από 30<sup>47</sup>. Ο μεγαλύτερος αριθμός κάλυψης, όπως 80 ή 150 επαναλήψεις νουκλεοτιδίων σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή τμήμα του εξασφαλίζει και μεγαλύτερη ευαισθησία. Τα τμήματα αυτά συναρμολογούνται σε μεγαλύτερα με δύο διαφορετικές μεθόδους, α) με τη χρήση στελέχους αναφοράς και β) τη μέθοδο του *de novo assembly*. Στην πρώτη περίπτωση, τα τμήματα που έχουν προκύψει από την αλληλούχιση στοιχίζονται έναντι μιας αλληλουχίας αναφοράς, με τη χρήση βιοπληροφορικών αλγορίθμων στοιχίσισης, όπως είναι το MAQ και το ELAND. Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση ο συνδυασμός των αναγνώσεων (*reads*) από την αλληλούχιση πραγματοποιείται χωρίς την ύπαρξη γονιδιώματος αναφοράς, αλλά βασίζεται στο βαθμό επικάλυψης μεταξύ των *reads*, επιτρέποντας την όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένη συναρμολόγηση του γονιδιώματος, ακόμα και σε ένα μοναδικό ενιαίο τμήμα. Για την πραγματοποίηση του *de novo assembly* χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι όπως το Velvet και το SOAP *de novo*.

### Αλγόριθμοι Μεταγενωμικής Ταξινόμησης

Η ανίχνευση των βακτηριοφάγων μπορεί να επιτευχθεί και μέσω εργαστηριακών τεχνικών και βιοπληροφορικών αναλύσεων. Οι λυτικοί φάγοι, οι οποίοι χρησιμοποιούνται κυρίως για κλινικές δοκιμές βακτηριακών λοιμώξεων, ανιχνεύονται με εργαστηριακές μεθόδους, όπως οι καλλιέργειες<sup>1451</sup>. Αντιθέτως, οι προφάγοι δεν μπορούν να ανιχνευτούν εργαστηριακά, αλλά μόνο με τη χρήση βιοπληροφορικών αλγορίθμων. Την τελευταία δεκαπενταετία έχουν δημιουργηθεί πολλά προγράμματα τα οποία εξειδικεύονται στην αναζήτηση φάγων σε γονιδιώματα βακτηριακής και μεταγενωμικής προέλευσης<sup>5253</sup>. Τα κυριότερα αποτελούν το PHAST<sup>53</sup>, PHASTER<sup>53</sup>, Phage\_Finder<sup>29</sup>, το PhiSpy<sup>28</sup>, το VirFinder<sup>54</sup> και το Prophage Hunter<sup>38</sup>. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, λόγω της αναζωπύρωσης του ενδιαφέροντος για τους βακτηριοφάγους, έχουν δημιουργηθεί πολλοί αλγόριθμοι, οι οποίοι δεν στοχεύουν μόνο στην εύρεση του γονιδιώματος των βακτηριοφάγων αλλά στρέφονται και σε άλλες κατευθύνσεις. Για παράδειγμα ο αλγόριθμος HostPhinder<sup>55</sup> χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη του ξενιστή ή των ξενιστών ενός συγκεκριμένου φάγου, και ο αλγόριθμος PhageTerm<sup>56</sup> χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των τερματικών άκρων του DNA (DNA termini) και των μηχανισμών πακεταρίσματος (*packaging*) του DNA του βακτηριοφάγου.

Οι περισσότεροι αλγόριθμοι για την ταυτοποίηση φάγων ενσωματωμένων σε βακτηριακό DNA χρησιμοποιούν όχι μόνο την ομολογία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των φάγων σε σχέση με αλληλουχίες αναφοράς, αλλά συνδυασμό πληροφοριών, όπως η αναγνώριση συγκεκριμένων επιτόπων, όπως για παράδειγμα τις *attP*, περιοχές πρόσδεσης του DNA του βακτηριοφάγου<sup>28</sup>, ή κωδικόνια έναρξης συγκεκριμένων γονιδίων ή tRNA και tmRNA<sup>52</sup>. Πολλά προγράμματα επικεντρώνονται στην εύρεση αλληλουχιών των πρωτεϊνών του φάγου μέσω του αλγορίθμου BLAST<sup>285338</sup>. Οι πρωτεΐνες στις οποίες στηρίζεται η εύρεση των φάγων ανήκουν στις οικογένειες που:

- a) δομούν το ιικό σωματίο
- b) ενσωματώνουν το φαγικό γονιδίωμα στο βακτηριακό
- c) λύουν το βακτηριακό κύτταρο
- d) μολύνουν το βακτήριο
- e) αποφεύγουν τους μηχανισμούς απομάκρυνσης του ξενιστή

ενώ χρησιμοποιούνται και οι υποθετικές και μη ταυτοποιημένες πρωτεΐνες<sup>38</sup>. Κάθε βιοπληροφορικό εργαλείο έχει διαφορετική πορεία εργασίας για τον εντοπισμό των φάγων, αξιολογώντας τα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιεί για τον εντοπισμό με διαφορετική βαρύτητα το καθένα. Για παράδειγμα, το εργαλείο PHASTER αφού προσδιορίσει τις κωδικές περιοχές και κατά συνέπεια τα γονίδια που αυτές εκφράζουν, στη συνέχεια πραγματοποιεί ανάλυση BLAST έναντι γνωστών γονιδιωμάτων βακτηριοφάγων. Τα αποτελέσματα του BLAST αξιολογούνται με βάση πολλές παραμέτρους, που στηρίζονται κατά κύριο λόγο στον συνολικό αριθμό των γονιδίων που εντοπίζονται ανά φάγο, την ομοιότητα με γνωστές αλληλουχίες και τα ενδιάμεσα κενά που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της στοίχισης<sup>57</sup>. Αντίστοιχες παραμέτρους χρησιμοποιεί και το πρόγραμμα VirFinder, το οποίο χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση γενικότερα ιών και όχι αποκλειστικά βακτηριοφάγων<sup>54</sup>. Και τα δύο αυτά προγράμματα χρησιμοποιούνται στην κλινική μεταγενωμική ανάλυση, εφόσον μπορούν να ανιχνεύσουν ιούς μέσα σε κλινικά δείγματα που περιέχουν το γονιδίωμα τόσο του παθογόνου όσο και του ξενιστή<sup>5754</sup>.

## Μεθοδολογία

### Δεδομένα

Η συγκεκριμένη μελέτη στηρίχθηκε στην ανάλυση δεδομένων NGS προερχόμενων από πειράματα WGS του βακτηρίου *P. aeruginosa* με σκοπό να διαπιστωθεί εάν η παρουσία προφάγων στο γονιδίωμα του βακτηρίου επηρεάζει την κλινική έκβαση των ασθενών. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από μελέτη που πραγματοποιήθηκε την περίοδο 2013-2015, σε ασθενείς που εισήχθησαν σε δύο Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ Ενηλίκων και ΜΕΘ Επειγόντων Περιστατικών) του νοσοκομείου dr. Cipto Mangunkusumo National Central General Hospital, στην Τζακάρτα της Ινδονησίας και είχε ως στόχο την επιδημιολογική επιτήρηση και την εύρεση κλινικού αντίκτυπου των ανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* και *A. baumannii* σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα<sup>58,59</sup>. Η μελέτη αποτελούνταν από τρεις φάσεις, την προ-παρεμβατική (pre-intervention), την παρεμβατική (intervention) και την μετα-παρεμβατική (post-intervention). Δείγματα στελεχών των βακτηρίων, και στην συγκεκριμένη περίπτωση ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *P. aeruginosa*, συλλέχθηκαν από μικροβιακές καλλιέργειες βιολογικών υγρών ασθενών, που απαριθμούνται αναλυτικά στον Πίνακα 2, σε προ-παρεμβατική και μετά-παρεμβατική φάση. Αντίθετα, στην ενδιάμεση φάση της μελέτης, δηλαδή την παρεμβατική φάση, δεν συλλέχθηκαν δείγματα, καθώς εκείνο το διάστημα εφαρμόστηκε εποπτεία στην χορήγηση αντιβιοτικών, αλλά εκτενής καθαρισμός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος και συχνότερη καθαριότητα των ασθενών<sup>59</sup>.

Πίνακας 2 Βιολογικά υλικά ασθενών που συλλέχθηκαν στην προ-παραεμβατική και μετα-παραεμβατική φάση της μελέτης, από τα οποία προέκυψαν οι μικροβιακές καλλιέργειες και στη συνέχεια τα δεδομένα NGS που χρησιμοποιήθηκαν στην παρακάτω μελέτη.

Είδος Δείγματος	Αριθμός Ανά Είδος Δείγματος (στα αρχικά 222 δείγματα)	Αριθμός Ανά Είδος Δείγματος (στα 150 δείγματα που πραγματοποιήθηκε η ανάλυση)
Αίμα	6	6
Ορθικό Επίχρισμα	77	50
Πτύελα	34	27
Ούρα	6	2
Ιστός (Tissue)	3	3
Επίχρισμα φαρυγγικό (Throat)	84	55
Επίχρισμα από δερματική πληγή	5	3
Έντερο (bal)	4	2
Βρογχική πλύση	1	1
Βρογχοκυψελιδική πλύση	1	1

Τα απομονωθέντα στελέχη αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 10% και καταψύχθηκαν στους -80° C. Στη συνέχεια, επανακαλλιεργήθηκαν σε καθαρές καλλιέργειες (pure cultures), από τις οποίες απομονώθηκε γενετικό υλικό της *P. aeruginosa*, το οποίο αλληλουχήθηκε με WGS. Τα δείγματα που συγκεντρώθηκαν κατά την προ-παραεμβατική φάση αλληλουχήθηκαν με τις πλατφόρμες HiSeq 2500 με αναγνώσεις μήκους 150 βάσεων των δύο νουκλεοτιδικών αλυσίδων (paired-end reads) και MiSeq με αναγνώσεις μήκους 200 βάσεων των δύο νουκλεοτιδικών αλυσίδων, ενώ τα δείγματα που συγκεντρώθηκαν κατά την μετά-παραεμβατική φάση αλληλουχήθηκαν με την πλατφόρμα NextSeq 500 με αναγνώσεις μήκους 150 βάσεων των δύο νουκλεοτιδικών αλυσίδων<sup>59</sup>.

### Βιοπληροφορική Ανάλυση Δεδομένων

Τα δεδομένα προέρχονται από πειράματα pair-end αλληλούχισης και είναι ελεύθερα διαθέσιμα στο European Nucleotide Archive (ENA) σε μορφή FastQ αρχείων, τα οποία περιλαμβάνουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία των reads και πληροφορίες για το Q score, δηλαδή την εκτιμώμενη πιθανότητα μη ορθής αλληλούχισης της νουκλεοτιδικής βάσης, που εκφράζεται μέσω χαρακτήρων από τον κώδικα ASCII<sup>60</sup>. Ακολούθησε η διαδικασία της συναρμολόγησης με τη μέθοδο του de novo assembly με χρήση του βιοπληροφορικού εργαλείου SPAdes. Από τη συναρμολόγηση των ομόλογων/συναφών τμημάτων αλληλούχισης του WGS προκύπτουν μεγαλύτερα τμήματα που ονομάζονται contigs<sup>49</sup>, τα



οποία αρχειοθετούνται με βάση το μήκος σε φθίνουσα σειρά, ενώ μαζί με το όνομα τους αναγράφεται το μήκος και η κάλυψη τους (coverage)<sup>49</sup>.

Για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη γονιδιώματος βακτηριοφάγων στα δείγματα πραγματοποιήθηκε στοίχιση BLAST έναντι νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) αποτελεί ένα πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για την εύρεση μιας ομάδας αλληλουχιών που παρουσιάζουν ομολογία (υψηλότερη ή χαμηλότερη) με δεδομένη αλληλουχία, η οποία έχει επιλεγεί από τον χρήστη. Οι οργανισμοί στους οποίους αντιστοιχούν οι αλληλουχίες αυτές παρουσιάζονται από το BLAST με τη μορφή λίστας από την κοντινότερη στην πιο απομακρυσμένη γενετικά. Το πρόγραμμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τη σύγκριση νουκλεοτιδικών όσο και για τη σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών<sup>61</sup>. Στη συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόστηκε βιοπληροφορική στοίχιση BLAST με εφαρμογή διαφόρων παραμέτρων, για την επίτευξη της καλύτερης δυνατής στοίχισης. Το εργαλείο BLAST χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή βάσης δεδομένων με αλληλουχίες γονιδιωμάτων βακτηριοφάγων. Οι αλληλουχίες των βακτηριοφάγων που χρησιμοποιήθηκαν, εντοπίζονται στη βάση δεδομένων «Virus-Host», η οποία περιλαμβάνει πληροφορίες για τη σχέση ιών και των ξενιστών τους, επιτρέποντας την αναζήτηση όλων των ιών που προσβάλλουν ένα συγκεκριμένο οργανισμό. Τα δεδομένα περιλαμβάνουν αποκλειστικά ολόκληρα γονιδιώματα ιών τα οποία αντλούνται από τις βάσεις δεδομένων RefSeq του NCBI (National Center for Biotechnology Information) και EBI Genomes του ENA (European Nucleotide Archive) ενώ συμπεριλαμβάνονται και πληροφορίες για την ταξινόμηση τους στις διάφορες ταξινομικές βαθμίδες (τάξη, οικογένεια, είδος, κτλ)<sup>62</sup>.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία βακτηριοφάγων σε κάθε δείγμα, τα αποτελέσματα της στοίχισης BLAST αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Microsoft Office Excel, (έκδοση 2016), και τη χρήση εξισώσεων και μακροεντολών (VBA Macro) στη γλώσσα προγραμματισμού Visual Basic, ενώ χρησιμοποιήθηκε και το add-in "Kutools". Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία φαγικού γονιδιώματος, εφαρμόστηκαν κριτήρια τόσο στο μήκος στοίχισης (alignment length) όσο και στην επί τοις εκατό ομολογία (% identity) του κάθε αποτελέσματος (hit) της ανάλυσης BLAST. Δημιουργήθηκε ένα πρότυπο υπολογιστικό φύλλο (Template), το οποίο περιείχε όλες τις εξισώσεις που εφαρμόστηκαν. Η κάθε εξίσωση περιείχε τις κατάλληλες αναφορές κελιών με βάση τις οποίες θα πραγματοποιούνταν οι

υπολογισμοί, ώστε να αποφευχθούν τυχαία σφάλματα. Για κάθε δείγμα, τα αρχικά αποτελέσματα της ανάλυσης BLAST αναλύθηκαν σε ξεχωριστά φύλλα, όπου εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι αξιολόγησης με διαφορετικά κριτήρια βασιζόμενα στο μήκος στοίχισης (alignment length) και στην επί τοις εκατό ομολογία (% identity). Στα αποτελέσματα (hits) που πληρούσαν τα κριτήρια και των δύο μεθόδων εφαρμόστηκαν επιπλέον εξισώσεις:

- a) για τη διερεύνηση της ύπαρξης αλληλοεπικάλυψης μεταξύ τμημάτων που στοιχίστηκαν στο ίδιο φάγο
- b) για την εύρεση του συνολικού μήκους στοίχισης των αλληλοεπικαλύψεων για κάθε φάγο
- c) για την εύρεση του τελικού μήκους στοίχισης συμπεριλαμβανομένων των αλληλοεπικαλύψεων για κάθε βακτηριοφάγο
- d) για την εύρεση του τελικού μήκους στοίχισης για κάθε βακτηριοφάγο, αφαιρώντας από το τελικό μήκος στοίχισης το συνολικό μήκος στοίχισης των αλληλοεπικαλύψεων
- e) για την εύρεση της επί τοις εκατό κάλυψης του γονιδιώματος κάθε βακτηριοφάγου με βάση το τελικό μήκος που προκύπτει από το βήμα (d)

Στην πρώτη μέθοδο αξιολόγησης, ορίστηκαν δύο κριτήρια:

- a) το μήκος στοίχισης να είναι τουλάχιστον 2000 βάσεις
- b) η επί τοις εκατό ομολογία να είναι σε ποσοστό τουλάχιστον 95%.

Το μήκος στοίχισης ορίστηκε με βάση την κατανομή των θετικών αποτελεσμάτων, λήφθηκαν δηλαδή υπόψη τα δείγματα στα οποία εντοπίστηκε φάγος και έχοντας υπόψη ότι το μέσο μήκος ενός γονιδίου βακτηριοφάγου είναι τουλάχιστον 1500 βάσεις. Η επί τοις εκατό ομολογία ορίστηκε στο 95%, εφόσον σύμφωνα με τη βιβλιογραφική μας αναζήτηση τόσο απέχουν γενετικά μεταξύ τους δύο είδη βακτηριοφάγων<sup>63</sup>. Με βάση αυτά τα κριτήρια, δημιουργήθηκε μια πρώτη λίστα με βακτηριοφάγους, που περιείχε τον κωδικό ID του NCBI και το τελικό μήκος του που προέκυπτε από το βήμα e). Αντίστοιχα ήταν τα βήματα που ακολουθήθηκαν στην δεύτερη μέθοδο, με την διαφορά πως το μοναδικό κριτήριο σε αυτήν τη μέθοδο αφορούσε την επί τοις εκατό ομολογία των τμημάτων, η οποία έπρεπε να ξεπερνά το 95%. Η δεύτερη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του συνολικού μήκους στοίχισης, λαμβάνοντας υπόψη και μικρότερα τμήματα (< 2000 βάσεων) προκειμένου να λάβουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το πραγματικό μήκος του κάθε βακτηριοφάγου. Με βάση τη δεύτερη μέθοδο δημιουργήθηκε μια δεύτερη λίστα, που περιείχε τον κωδικό ID

του NCBI και το τελικό μήκος του που προέκυπτε από το βήμα e). Οι φάγοι που ήταν κοινοί στις δύο λίστες διαμόρφωσαν την τελική λίστα, η οποία περιείχε τον κωδικό ID για κάθε βακτηριοφάγο και το τελικό μήκος στοίχισης που προέκυπτε από τη δεύτερη μέθοδο. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η επί τοις εκατό κάλυψη του γονιδιώματος για κάθε βακτηριοφάγο ξεχωριστά, με τη διαίρεση του τελικού μήκους στοίχισης προς το μήκος της αλληλουχίας αναφοράς που δίνεται από την βάση δεδομένων RefSeq του NCBI για τον συγκεκριμένο βακτηριοφάγο. Εφόσον το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου καλύπτεται σε ποσοστό 60% από τα τμήματα μας, θεωρούμε ότι υπάρχει λειτουργικός φάγος και επομένως συμπεριλαμβάνεται στο επόμενο βήμα της ανάλυσης. Οι βακτηριοφάγοι που συγκέντρωσαν ποσοστό κάλυψης μικρότερο από 60%, θεωρείται ότι λανθασμένα έχουν εντοπιστεί στο δείγμα και δε συμπεριλαμβάνονται στα μετέπειτα βήματα της ανάλυσης.

Στη συνέχεια για κάθε φάγο της τελικής λίστας πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη ανάλυση BLAST με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες ιντεγκράση, τρανσποζάση και χολίνη. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες για κάθε φάγο ανακτήθηκαν από την βάση δεδομένων της UniProt<sup>64</sup> σε μορφή fasta αρχείου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή των εντολών BLAST αποθηκεύτηκαν σε αρχείο κειμένου και στη συνέχεια αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Microsoft Office Excel, έκδοση του 2016, όπου χρησιμοποιήθηκαν εξισώσεις και μακροεντολές (VBA Macro) στη γλώσσα προγραμματισμού Visual Basic, ενώ χρησιμοποιήθηκε και το add-in "Kutools". Στη συγκεκριμένη ανάλυση εφαρμόστηκε μια μέθοδος αξιολόγησης βασιζόμενη στην επί τοις εκατό ομολογία (% identity) των αλληλουχιών που κωδικοποιούν το εκάστοτε πρωτεϊνικό μόριο με τις αλληλουχίες αναφοράς, η οποία έπρεπε να ανέρχεται σε ποσοστό άνω του 95%. Στα αποτελέσματα (hits) που πληρούσαν το κριτήριο της ποσοστιαίας ομολογίας εφαρμόστηκαν επιπλέον εξισώσεις:

- a) για τη διερεύνηση της ύπαρξης αλληλοεπικάλυψης μεταξύ νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που στοιχίστηκαν στην ίδια αλληλουχία αναφοράς που κωδικοποιεί το πρωτεϊνικό μόριο
- b) για την εύρεση του συνολικού μήκους στοίχισης των αλληλοεπικάλυψεων αλληλουχιών για κάθε πρωτεϊνικό μόριο που αυτές κωδικοποιούν

- c) για την εύρεση του τελικού μήκους στοίχισης συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπικαλύψεων
- d) για την εύρεση του τελικού μήκους στοίχισης αφαιρώντας από το τελικό μήκος στοίχισης το συνολικό μήκος στοίχισης των αλληλοεπικαλύψεων
- e) για την εύρεση της επί τοις εκατό κάλυψης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, η οποία κωδικοποιεί κάθε πρωτεϊνικού μόριο με βάση το τελικό μήκος που προκύπτει από το βήμα (d)

Στη συνέχεια, επιλέχθηκε το ποσοστό cut-off της επί τις εκατό κάλυψης για κάθε πρωτεΐνη, το οποίο ορίστηκε στο 90%. Στον Πίνακα 8 (Παράρτημα) αναγράφονται οι μοναδικοί κωδικοί αναγνώρισης του NCBI για κάθε έναν από τους 28 βακτηριοφάγους της τελικής λίστας και δίπλα σε καθένα οι πρωτεΐνες, για τις οποίες επιβεβαιώθηκε η παρουσία του γονιδίου που τις κωδικοποιεί, στο φάγο που ανευρέθηκαν για κάθε ένα εξ αυτών. Με το σύμβολο (+) υποδηλώνεται η παρουσία και με το (-) η απουσία κωδικοποιούσας αλληλουχίας για την εκάστοτε πρωτεΐνη, όπως προέκυψε από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης BLAST.

## Αποτελέσματα

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 222 δείγματα, τα οποία απομονώθηκαν από 100 ασθενείς που διέμεναν για κάποιο χρονικό διάστημα στις δύο ΜΕΘ του Νοσοκομείου dr. Cipto Mangunkusumo National Central General Hospital στην Ινδονησία και σε αυτούς είχαν ταυτοποιηθεί πολυανθεκτικά στελέχη του βακτηρίου *P.aeruginosa*. Από τους περισσότερους ασθενείς είχαν απομονωθεί περισσότερα από ένα δείγματα από διαφορετικούς ιστούς και άλλα βιολογικά υλικά.

Από τα 222 αρχικά δείγματα, η de novo συναρμολόγηση με το βιοπληροφορικό εργαλείο SPAdes, ολοκληρώθηκε επιτυχώς σε 195 από αυτά, μετά τη ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων με στόχο την όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένη και ορθή συναρμολόγηση των δεδομένων, από τα FastQ αρχεία που ανακτήθηκαν από την ιστοσελίδα του NCBI. Το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία μεγάλου μήκους συναρμολογημένων τμημάτων (contigs). Η στοίχιση των contigs με τη χρήση του αλγορίθμου BLAST, έναντι της Βάσης Δεδομένων Virus Host, ανέδειξε για τα 193 από τα 195 δείγματα, την παρουσία βακτηριοφάγων. Συγκεκριμένα, από το αποτέλεσμα της ανάλυσης, εκτός από το όνομα και το μήκος κάθε contig, λαμβάνουμε πληροφορίες σχετικά με τον βακτηριοφάγο, στην αλληλουχία του οποίου στοιχήθηκαν τα reads και το αποτέλεσμα της στοίχισης. Εκτός από την επίσημη λατινική ονομασία κάθε φάγου και τον κωδικό που έχει λάβει από το NCBI, αναφέρεται το ποσοστό ομοιότητας του τμήματος του γονιδιώματος του φάγου που βρίσκεται στη Βάση Δεδομένων με το τμήμα του contig με το οποίο έχει στοιχηθεί, πληροφορία σημαντική, καθώς μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε την ομολογία μεταξύ της αλληλουχίας του ενδιαφέροντός μας και της αλληλουχίας αναφοράς. Όσον αφορά στη στοίχιση καθεαυτή, τα αποτελέσματα αφορούν το μήκος της και τυχόν διαφορές μεταξύ των δύο αλληλουχιών, όπως για παράδειγμα οι αντικαταστάσεις (mismatches) νουκλεοτιδικών βάσεων ή τα κενά (gaps) που προκύπτουν από τη μη στοίχιση των αλληλουχιών σε ορισμένες θέσεις. Παράλληλα παρατίθενται και οι συντεταγμένες του contig και του γονιδιώματος του φάγου, στις οποίες αντιστοιχεί το στοιχισμένο τμήμα αλληλουχίας, πληροφορία που είναι χρήσιμη για τη μελέτη συγκεκριμένων γενετικών περιοχών.

Στη συνέχεια, στα 193 δείγματα εφαρμόστηκαν οι δύο μέθοδοι για τον υπολογισμό του μήκους του κάθε βακτηριοφάγου και το ποσοστό κάλυψης για κάθε έναν εξ αυτών. Στο

επόμενο βήμα της αναλυτικής διαδικασίας, συμπεριλήφθησαν 150 δείγματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία βακτηριοφάγων, οι οποίοι συγκέντρωσαν ποσοστό κάλυψης μεγαλύτερο από 60%. Τα 150 δείγματα είχαν απομονωθεί από 67 ασθενείς, ενώ οι βακτηριοφάγοι ανά ασθενή προέρχονταν από όλα τα δείγματα του συγκεκριμένου ασθενούς. Σε αυτά τα 150 δείγματα στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με χρήση του αλγορίθμου BLAST έναντι των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων που κωδικοποιούν τρεις πρωτεΐνες, την ιντεγκράση, τη χολίνη και την τρανσποζάση. Η εύρεση και των τριών γονιδίων για όλους τους βακτηριοφάγους της τελικής λίστας δεν ήταν δυνατή, καθώς σε πολλούς βακτηριοφάγους δεν έχει ολοκληρωθεί ο σχολιασμός (annotation) όλων των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης. Ως συνέπεια, πολλές πρωτεΐνες δεν ομαδοποιούνται στις κλάσεις που ανήκουν και παρουσιάζονται ως υποθετικές πρωτεΐνες με άγνωστη λειτουργία. Για τις υποθετικές αυτές πρωτεΐνες, όπως και για κάθε πρωτεϊνικό μόριο, σχολιασμένο ή μη, η βάση δεδομένων της UniProt παρουσιάζει την επί τις εκατό συγγένεια της αμινοξικής αλληλουχίας με αλληλουχίες αναφοράς. Κατά συνέπεια, στις περιπτώσεις μη εύρεσης της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί το πρωτεϊνικό μόριο του ενδιαφέροντός μας, εφόσον δεν είχε ολοκληρωθεί ο σχολιασμός, χρησιμοποιήθηκαν ως αλληλουχίες αναφοράς νουκλεοτιδικές αλληλουχίες γονιδίων υποθετικών πρωτεϊνών οι οποίες είχαν 100% ομολογία με αλληλουχίες αναφοράς της ίδιας οικογένειας. Η συγκεκριμένη πρακτική χρησιμοποιήθηκε ιδιαίτερα για την οικογένεια των χολινών. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης BLAST ανέδειξαν την παρουσία όλων των αλληλουχιών για όλους τους βακτηριοφάγους, ενώ στη συνέχεια, ορίστηκε κατώφλι (cut-off) της επί τις εκατό κάλυψης για κάθε πρωτεΐνη, το ποσοστό 90%. Πράγματι, το ποσοστό κάλυψης της κάθε αλληλουχίας ξεπερνούσε το 90%, επιβεβαιώνοντας την παρουσία προφάγων στα δείγματα. Αναφορικά με το βακτηριοφάγο, NC\_001331 (RefSeq Accession number), δεν επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη αλληλουχιών που κωδικοποιούν την χολίνη και την ιντεγκράση σε κανένα δείγμα στην ανάλυση BLAST.

### Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 150 δείγματα, απομονωμένα από 67 ασθενείς, για τα οποία πληρείται το κριτήριο του άνω του 60% ποσοστού κάλυψης, προκειμένου να καθοριστεί ο ρόλος των βακτηριοφάγων στην έκβαση της λοίμωξης στους πάσχοντες. Οι ασθενείς διέμειναν στις ΜΕΘ από 2 έως 77 ημέρες, με μέση διάρκεια νοσηλείας τις 19 ημέρες. Είκοσι εννέα από αυτούς απεβίωσαν πριν την εξαγωγή τους από τις

ΜΕΘ ενώ οι 38 εξ αυτών επιβίωσαν. Οι λοιμώξεις που είχαν συσχετιστεί με ενδονοσοκομειακή διασπορά ανέρχονται στις 46, με αποτέλεσμα οι υπόλοιπες 21 να ταυτοποιούνται ως λοιμώξεις προερχόμενες από την κοινότητα.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχέτισης της παρουσίας συγκεκριμένων βακτηριοφάγων στα δείγματα, με την υποτροπή της λοίμωξης στους ασθενείς. Η μη συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών παραμέτρων ορίστηκε ως μηδενική υπόθεση  $H_0$  και ως  $p$ -value cut-off επιλέχθηκε το 0,05 ή 5%. Δεδομένου ότι το μέγεθος του δείγματος είναι αρκετά μικρό δεν εφαρμόστηκε απλό  $\chi^2$  test, αλλά το στατιστικό test Fisher, που αποτελεί μια παραλλαγή του  $\chi^2$  test και εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου το μέγεθος του δείγματος είναι πολύ μικρό για να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για το γενικό πληθυσμό. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη γλώσσα προγραμματισμού R και χρήση της ιστοσελίδας Social Science Statistics<sup>65</sup> και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3 - Το  $p$ -value όλων των βακτηριοφάγων για το στατιστικό test Fisher.

Κωδικός Βακτηριοφάγου	Το $p$ -value για κάθε βακτηριοφάγο για το στατιστικό test Fisher	Κωδικός Βακτηριοφάγου	Το $p$ -value για κάθε βακτηριοφάγο για το στατιστικό test Fisher
NC_001331	0.052976033	NC_024782	0.432835821
JQ067085	0.052976033	NC_006552	1
NC_030918	0.054939148	NC_026601	1
NC_042135	0.105897851	NC_020203	1
NC_028667	0.183627318	NC_011613	1
NC_027298	0.183627318	NC_008717	1
NC_005178	0.183627318	JN811560	1
NC_030908	0.308446404	NC_020198	1
NC_027992	0.608388413	NC_011611	1
NC_027384	0.608388413	NC_041851	1
NC_030940	0.573777847	NC_024330	1
NC_020200	0.627624987	NC_023700	1
NC_018274	0.627624987	NC_020202	1
NC_009818	0.627624987	NC_003278	1

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, εντοπίζουμε 3 βακτηριοφάγους (NC\_001331, JQ067085 και NC\_030918), η παρουσία των οποίων σχετίζεται με οριακά στατιστικά σημαντικό τρόπο

με τον θάνατο των ασθενών. Δεδομένου ότι η δεύτερη ανάλυση BLAST δεν επιβεβαίωσε την ύπαρξη νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του βακτηριοφάγου NC\_001331 και δεδομένου του γεγονότος ότι στους ίδιους ασθενείς παρατηρείται ταυτόχρονη παρουσία των βακτηριοφάγων NC\_001331 και JQ067085, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη της σχέσης μεταξύ των δύο αυτών βακτηριοφάγων. Στοίχιση BLAST μεταξύ των αλληλουχιών αναφοράς των δύο φάγων ανέδειξε ομοιότητα των γονιδιωμάτων τους σε ποσοστό 94,74%, επομένως από τα επόμενα βήματα της μελέτης, αποκλείστηκε ο φάγος NC\_001331 και εξετάστηκε μόνο ο ρόλος του φάγου JQ067085. Όσον αφορά τους φάγους JQ067085 και NC\_030918, η παρουσία τους φαίνεται να συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με το θάνατο των ασθενών, εφόσον για τον πρώτο κατεγράφη  $p$ -value 0,053 και για τον δεύτερο 0,055. Ο πρώτος φάγος εντοπίστηκε σε 30 ασθενείς ενώ ο δεύτερος σε 12. Στους παρακάτω Πίνακες φαίνονται τα αποτελέσματα των test Fisher για κάθε έναν από τους δύο βακτηριοφάγους.

Πίνακας 2 - Το στατιστικό test Fisher για τον βακτηριοφάγο JQ067085

Column and Row Totals						
	Dead	Alive				Row Totals
Present	17	13				30
Absent	12	25				37
Column Totals	29	38				67 (Grand Total)

Πίνακας 5 - Το στατιστικό test Fisher για τον βακτηριοφάγο NC\_030918

Column and Row Totals						
	Dead	Alive				Row Totals
Present	2	10				12
Absent	27	28				55
Column Totals	29	38				67 (Grand Total)



## Συζήτηση

Οι λοιμώξεις από *P. aeruginosa* είναι εξαιρετικά διαδεδομένες τόσο σε επίπεδο γενικού πληθυσμού, όσο και ενδονοσοκομειακά<sup>11</sup> και η έκβασή αυτών στο νοσοκομειακό περιβάλλον φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, σε παθογονικά βακτηριακά στελέχη υπάρχουν γονίδια αντοχής, η αλληλούχιση των οποίων έδειξε πως πολλά εξ αυτών προέρχονται από προφάγους<sup>14</sup>, τμήματα των οποίων ή πλήρεις γονιδιωματικές αλληλουχίες είναι δυνατόν να εντοπιστούν στα κλινικά στελέχη.

Στην παρούσα μελέτη τα δεδομένα από τα 222 αρχικά δείγματα, προέρχονται από πειράματα pair-end αλληλούχισης και σε αυτά εφαρμόστηκε η μέθοδος de novo assembly και όχι η στοίχιση με βάση αλληλουχία αναφοράς (mapping alignment). Αυτή η μέθοδος επιλέχθηκε καθώς επιτρέπει την συναρμολόγηση τμημάτων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, βάσει του βαθμού επικάλυψης που αυτές παρουσιάζουν και όχι βάσει στελέχους αναφοράς, από το οποίο τμήματα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών είναι δυνατόν να απουσιάζουν από την αλληλουχία του στελέχους αναφοράς που χρησιμοποιείται. Επίσης, η συγκεκριμένη τεχνική προτιμήθηκε, καθώς τα γονιδιώματα των δειγμάτων που μελετήθηκαν, αφορούσαν κλινικά στελέχη Ψευδομονάδας με εντοπιότητα της Ινδονησίας, οπότε με τη συναρμολόγηση βάσει κάποιου στελέχους αναφοράς πιθανόν να μην αναδεικνυόταν η παρουσία περιοχών που παρουσιάζουν διαφορές (π.χ. πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου, SNPs) μεταξύ αυτού και των αλληλουχιών των δειγμάτων. Καθώς οι προφάγοι δεν εντοπίζονται με βεβαιότητα σε κάθε βακτηριακό στέλεχος Ψευδομονάδας, με τη στοίχιση έναντι κάποιου στελέχους αναφοράς, πιθανό να απορρίπτονταν περιοχές που αντιστοιχούν σε γονιδιωματική περιοχή βακτηριοφάγων. Όπως επισημαίνεται στα αποτελέσματα της μελέτης, από τη στοίχιση των αλληλουχιών των δειγμάτων έναντι της Βάσης Δεδομένων VirusHost επιβεβαιώθηκε η παρουσία γονιδιωμάτων βακτηριοφάγων στην πλειοψηφία των δειγμάτων. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ένα αρκετά σημαντικό ποσοστό ενεργών προφάγων σε στελέχη του βακτηρίου *P. aeruginosa*, τα οποία ευθύνονται για λοιμώξεις και ιδιαίτερα παρουσία φάγων αναφέρεται σε περιπτώσεις ανθεκτικών στελεχών<sup>30</sup>.

Πίνακας 6 - Τελική Λίστα με τους 27 βακτηριοφάγους που ανευρέθησαν στα δείγματα.

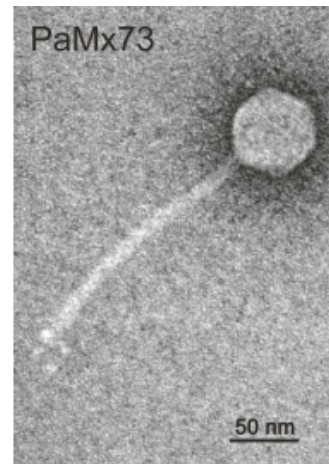
NC_042135	NC_030908	NC_027298	NC_023700	NC_020198	NC_009818	NC_003278
NC_041851	NC_028667	NC_026601	NC_020203	NC_018274	NC_008717	JQ067085
NC_030940	NC_027992	NC_024782	NC_020202	NC_011613	NC_006552	JN811560
NC_030918	NC_027384	NC_024330	NC_020200	NC_011611	NC_005178	

Η αναζήτηση και εύρεση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες ιντεγκράση, τρανσποζάση και χολίνη επιβεβαιώνει την παρουσία των φάγων στα δείγματα και τον καίριο ρόλο των πρωτεϊνικών αυτών μορίων στη διαδικασία της μόλυνσης των βακτηρίων από προφάγους. Η ιντεγκράση και η τρανσποζάση αποτελούν πρωτεΐνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται από τους βακτηριοφάγους για την ενσωμάτωση του γονιδιώματός τους στο γονιδίωμα του βακτηρίου, επομένως η παρουσία τους στα δείγματα της παρούσας μελέτης, επιβεβαιώνει την παρουσία προφάγου στο δείγμα<sup>38</sup>. Αναλυτικότερα, τα ένζυμα ιντεγκράσες, χρησιμοποιούν για την ενσωμάτωση συγκεκριμένες κωδικές περιοχές αναγνώρισης με καθορισμένο μήκος, παρούσες τόσο στο βακτηριακό DNA (*attB*), όσο και στο DNA του προφάγου (*attP*)<sup>27</sup>. Μάλιστα, όπως ήδη αναφέρθηκε, για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μελέτης, αναζητήθηκε η μοναδική αλληλουχία που κωδικοποιεί την ιντεγκράση κάθε φάγου, καθώς οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση, αναγνωρίζοντας περιοχές πρόσδεσης μοναδικές για κάθε φάγο, οι οποίες δε συγχέονται με αντίστοιχες περιοχές άλλου φάγου<sup>27</sup>. Όσον αφορά στη χολίνη, είναι ένα πρωτεϊνικό μόριο που εκφράζεται κατά την απελευθέρωση των νέων ικών σωματίων, δημιουργώντας σπές στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου και η παρουσία της επιβεβαιώνει την ύπαρξη ενεργού προφάγου<sup>29</sup>. Μάλιστα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, μπορούμε να υποθέσουμε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του θανάτου των ασθενών και της παρουσίας δύο βακτηριοφάγων, του JQ067085 και του NC\_030918. Για να επιβεβαιωθεί ο ρόλος που διαδραματίζουν οι δύο συγκεκριμένοι βακτηριοφάγοι στην έκβαση των λοιμώξεων, αναζητήθηκαν βιβλιογραφικά περισσότερα στοιχεία για αυτούς.

Εικόνα - 5 Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του βακτηριοφάγου PaMx73.

Ο βακτηριοφάγος JQ067085 ανήκει στην γενική κατηγορία των Mu-like φάγων και ονομάζεται PaMx73. Απομονώθηκε πρώτη φορά από υδάτινα λύματα, από μία ομάδα επιστημόνων στο Κεντρικό Μεξικό το 2012<sup>66</sup>. Ανήκει στην οικογένεια *Siphoviridae*, έχει

δηλαδή μακριά και συσταλή ουρά, δίκλωνο DNA ως γενετικό υλικό<sup>66</sup> και προκαλεί *in silico* θολές ζώνες αναστολής του βακτηρίου *P. aeruginosa*. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδιώματός του παρουσιάζει ομοιότητες με αυτό του μεταθετού φάγου D3112, ο οποίος επίσης μολύνει την *P. aeruginosa*, ενώ το ποσοστό CG του γονιδιώματος του ανέρχεται στο 64,2%, ποσοστό αρκετά υψηλό<sup>67</sup>. Το μήκος του ανέρχεται στις 36.570 bp και έχει 56 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), ορισμένα εκ των οποίων έχουν συσχετιστεί με γονίδια anti-CRISPR<sup>67</sup>. Οι ειδικοί υποκινητές (promoters) που εντοπίζονται και στα δύο άκρα του γονιδιώματος του υποδεικνύουν τη μεταγραφή βακτηριακού DNA, κατατάσσοντάς τον αυστηρά στην κατηγορία των προφάγων. Ο φάγος JQ067085 πιθανόν μεταφέρει γονίδια καρβαπενεμασών στο βακτήριο *P. aeruginosa*, ενζύμων που αναστέλλουν τη δράση καρβαπενεμών. Οι καρβαπενέμες αποτελούν αντιβιοτικά «έσχατης ανάγκης», καθώς λόγω της στερεοδιάταξης τους παρουσιάζουν αντοχή στις περισσότερες β-λακταμάσες των βακτηρίων. Η χορήγησή τους στα θεραπευτικά σχήματα γίνεται σε περιπτώσεις όπου το βακτήριο είναι ανθεκτικό σε αντιβιοτικά ευρέως φάσματος και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών, και συνήθως χορηγείται σε περιπτώσεις ενδοσοκομειακών λοιμώξεων. Σε μελέτη του 2019 που πραγματοποιήθηκε στη Βραζιλία, ανευρέθηκε ένα μικρό πλασμίδιο, μήκους 3.652 bp στο ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος BH9 *P. aeruginosa*, το οποίο είχε απομονωθεί από υγειονομική μονάδα της Βραζιλίας το 2011 από ρινοφαρυγγικό επίχρισμα<sup>68</sup>. Δεδομένου ότι σε περιοχές του πλασμιδίου ανευρέθηκαν και περιοχές πρόσδεσης τρανσποζάσης, γονίδια που αφορούν ιντεγκράσες και δομικές πρωτεΐνες βακτηριοφάγου, οι ερευνητές συμπέραναν πως το συγκεκριμένο πλασμίδιο περιέχει τμήματα προερχόμενα από προφάγο<sup>68</sup>. Σε μεταγενέστερη ανάλυση, το πλασμίδιο αποδείχτηκε πως παρουσίαζε ομοιότητα 97% με τον βακτηριοφάγο PaMx73<sup>68</sup>. Στην παρούσα μελέτη ανευρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του συγκεκριμένου βακτηριοφάγου και της κλινικής έκβασης των ασθενών με λοίμωξη από ψευδομονάδα, με το φάγο να είναι πιθανόν υπεύθυνος για τη μεταφορά γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες στα βακτήρια, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η πρόγνωση για τον ασθενή, να αυξάνεται ο χρόνος νοσηλείας ή ακόμα και να μην υπάρχει ανταπόκριση στα δεδομένα θεραπευτικά σχήματα που εφαρμόζονται.



Ο βακτηριοφάγος *Pseudomonas phage JBD93* (NC\_030918) ανήκει στην οικογένεια *Siphonviridae*, επομένως και αυτός έχει μακριά και συσταλή ουρά, ενώ το μήκος του γονιδιώματός του (δίκλωνο DNA) ανέρχεται στις 36.629 bp. Προκειμένου να μολύνει το *P. aeruginosa*, χρησιμοποιεί το αντιγόνο O του βακτηρίου, έναν εξωκυττάριο πολυσακχαρίτη του λιποπολυσακχαριτιδικού τοιχώματος (LPS) των Gram αρνητικών (-) βακτηρίων<sup>69</sup>. Η σύσταση του πολυσακχαρίτη αλλάζει από στέλεχος σε στέλεχος, καθιστώντας το κατάλληλο για ταυτοποίηση, ενώ με βάση αυτό παράγονται αντισώματα από τον ξενιστή. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι πιθανόν ο συγκεκριμένος βακτηριοφάγος να αποτελεί ένα Genomic Island του στελέχους KRP1 *P. aeruginosa*, καθώς οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αυτών των δύο στοιχείων ήταν όμοιες σε μεγάλο ποσοστό<sup>69</sup>. Η συγκεκριμένη μελέτη του 2019 υποδεικνύει πως το GI 14 που βρέθηκε στο στέλεχος KRP1 της *P. aeruginosa* παρουσιάζει 92% ομοιότητα με τον βακτηριοφάγο JBD93, ενώ το μήκος στοίχισης της αλληλουχίας του GI ως προς τον βακτηριοφάγο άγγιζε το 86%<sup>69</sup>. Η συγκριτική ανάλυση μεταξύ των δύο πραγματοποιήθηκε με χρήση του βιοπληροφορικού αλγορίθμου PHASTER, εργαλείο διαθέσιμο στο διαδίκτυο (web-server)<sup>53</sup>, αναδεικνύοντας μεγάλο ποσοστό ομοιότητας σε περιοχές όπως οι καταστολείς *ci* και *Neg*, η τρασποζάση και ο εκκινητής μεταγραφής *Mor*<sup>69</sup>. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και δεδομένου ότι η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε υποδεικνύει συσχέτιση μεταξύ του θανάτου των ασθενών και της παρουσίας συγκεκριμένου φάγου, υποδεικνύει δηλαδή, πως ο φάγος λειτουργεί ως επιβαρυντικός παράγοντας για την έκβαση της λοίμωξης, είναι δυνατόν να υποθέσουμε πως ο συγκεκριμένος φάγος πιθανόν φέρει γονίδια αντοχής στις καρβαπενέμες, τα οποία μεταφέρει στο βακτήριο, καθιστώντας το ανθεκτικό και δυσχεραίνοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόγνωση για την επιβίωση των ασθενών. Δεδομένου ότι έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες η μεταφορά γονιδίων αντοχής από βακτηριοφάγους σε άλλα παθογόνα<sup>70</sup>, τα οποία επίσης βρίσκονται στη λίστα ESKAPE του WHO, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί ο ρόλος των προφάγων ως δεξαμενών γονιδίων αντοχής, καθώς και η συμβολή της μεταφοράς γενετικού υλικού, ιδίως γονιδίων αντοχής από τους βακτηριοφάγους σε πλασμίδια βακτηρίων.



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



## Αναφορές

1. Khalifa, A. B. H., Moissenet, D., Thien, H. V. & Khedher, M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: Mécanismes et modes de régulations. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. **69**, 393–403 (2011).
2. Murray, P., Tenover, R. & Tenover, M. *Ιατρική Μικροβιολογία*. (2016).
3. Tortora, G., Funke, B. & Case, C. *Εισαγωγή στη Μικροβιολογία*. (Broken Hill Publishers LTD, 2016).
4. Γιαννουλάκη, Ε. Βακτηριολογία Θεωρία 2. 107–121 (2018).
5. Μπαστάκη, Μ. Λειτουργικός χαρακτηρισμός πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. (Πανεπιστήμιο Κρήτης Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών Τμήμα Βιολογίας, 2009). doi:10.12681/eadd/25940.
6. Juan, C., Peña, C. & Oliver, A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.* **215**, S44–S51 (2017).
7. Moradali, M. F., Ghods, S. & Rehm, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, (2017).
8. Soto, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* **4**, 223–229 (2013).
9. Meylan, S., Andrews, I. W. & Collins, J. J. Targeting Antibiotic Tolerance, Pathogen by Pathogen. *Cell* **172**, 1228–1238 (2018).
10. Barraud, N., Buson, A., Jarolimek, W. & Rice, S. A. Mannitol enhances antibiotic sensitivity of persister bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
11. Γιαννουλάκη, Ε. Κλινική Μικροβιολογία, Λοιμώξεις Ουροποιητικού, Γενετικού. 2–57

(2019).

12. Salmanov, A. *et al.* Healthcare-associated infections in intensive care units. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)* vol. 72 (2019).
13. Botelho, J., Grosso, F. & Peixe, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist. Updat.* **44**, 100640 (2019).
14. Sausseureau, E. & Debarbieux, L. *Bacteriophages in the Experimental Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections in Mice. Advances in Virus Research* vol. 83 (Elsevier Inc., 2012).
15. Winstanley, C. *et al.* Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the liverpool epidemic strain of *pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* **19**, 12–23 (2009).
16. Ramsay, J. P., Hynes, M. F., Sullivan, J. T. & Ronson, C. W. Symbiosis Islands ☆. *Ref. Modul. Life Sci.* 7–9 (2017) doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.07223-x.
17. Sirijan Santajit & Nitaya Indrawattana. Mechanisms of antimicrobial resistance in Pasteurellaceae. *PBioMed Res. Int.* **2016**, 1–8 (2016).
18. Magiorakos, A. *et al.* Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. (2011).
19. Naughton, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* AES-1 exhibits increased virulence gene expression during chronic infection of cystic fibrosis lung. *PLoS One* **6**, 1–8 (2011).
20. Hatfull, G. F. & Hendrix, R. W. Bacteriophages and their genomes. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 298–303 (2011).
21. Shors, T. *Ιολογία Εξερευνώντας τους Ιούς*. (Broken Hill Publishers LTD, 2017).
22. Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V. & Heaphy, S. Phages in nature. *Bacteriophage* **1**, 31–45 (2011).
23. Kakasis, A. & Panitsa, G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human

- infections. A comprehensive review. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 16–21 (2019).
24. Lopes, A., Tavares, P., Petit, M. A., Guérois, R. & Zinn-Justin, S. Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC Genomics* **15**, 1–17 (2014).
  25. Cornelissen, A. *et al.* The t7-related pseudomonas putida phage φ15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PLoS One* **6**, (2011).
  26. Latka, A., Maciejewska, B., Majkowska-Skrobek, G., Briers, Y. & Drulis-Kawa, Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 3103–3119 (2017).
  27. Groth, A. C. & Calos, M. P. Phage integrases: Biology and applications. *J. Mol. Biol.* **335**, 667–678 (2004).
  28. Akhter, S., Aziz, R. K. & Edwards, R. A. PhiSpy: A novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity-and composition-based strategies. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1–13 (2012).
  29. Fouts, D. E. Phage\_Finder: Automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5839–5851 (2006).
  30. Taylor, V. L., Fitzpatrick, A. D., Islam, Z. & Maxwell, K. L. The Diverse Impacts of Phage Morons on Bacterial Fitness and Virulence. in *Advances in Virus Research* (2019). doi:10.1016/bs.aivir.2018.08.001.
  31. Vale, F. F. & Lehours, P. Relating phage genomes to helicobacter pylori population structure: General steps using whole-genome sequencing data. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
  32. Yuan, Y. & Gao, M. Jumbo bacteriophages: An overview. *Front. Microbiol.* **8**, 1–9 (2017).



33. Brüssow, H. & Hendrix, R. W. Phage Genomics: Small is beautiful. *Cell* **108**, 13–16 (2002).
34. Roach, D. R. & Donovan, D. M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage* **5**, e1062590 (2015).
35. Dion, M. B., Oechslin, F. & Moineau, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 125–138 (2020).
36. Grose, J. H. & Casjens, S. R. Understanding the enormous diversity of bacteriophages: The tailed phages that infect the bacterial family Enterobacteriaceae. *Virology* **468**, 421–443 (2014).
37. Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W. & Muniesa, M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* **79**, 1–7 (2015).
38. Song, W. *et al.* Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Res.* **47**, W74–W80 (2019).
39. Young, R. & Bläsi, U. Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 191–205 (1995).
40. Stone, E., Campbell, K., Grant, I. & McAuliffe, O. Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses* **11**, 1–26 (2019).
41. Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D. R., Sillankorva, S. & Azeredo, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2141–2151 (2016).
42. Wang, I. N., Smith, D. L. & Young, R. Holins: The protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 799–825 (2000).
43. Craig, N. L. Transposases and Integrases. *Encycl. Life Sci.* (2001) doi:10.1038/npg.els.0000593.
44. Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. & Zhang, G. The impact of next-generation sequencing

- on genomics. *J. Genet. Genomics* **38**, 95–109 (2011).
45. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463–5467 (1977).
  46. Thermes, C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* **30**, 418–426 (2014).
  47. Behjati, S. & Tarpey, P. S. What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* **98**, 236–238 (2013).
  48. Metzker, M. L. Sequencing technologies the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31–46 (2010).
  49. Douglass, A. P. *et al.* Coverage-versus-length plots, a simple quality control step for de Novo Yeast Genome sequence assemblies. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **9**, 879–887 (2019).
  50. Del Chierico, F. *et al.* Choice of next-generation sequencing pipelines. *Methods Mol. Biol.* **1231**, 31–47 (2015).
  51. Debarbieux, L. *et al.* Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections . *J. Infect. Dis.* **201**, 1096–1104 (2010).
  52. Hurwitz, B. L., Ponsero, A., Thornton, J. & U'Ren, J. M. Phage hunters: Computational strategies for finding phages in large-scale 'omics datasets. *Virus Res.* **244**, 110–115 (2018).
  53. Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y. & Wishart, D. S. PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Brief. Bioinform.* **20**, 1560–1567 (2018).
  54. Ren, J., Ahlgren, N. A., Lu, Y. Y., Fuhrman, J. A. & Sun, F. VirFinder: a novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data. *Microbiome* **5**, 69 (2017).
  55. Villarroel, J. *et al.* HostPhinder: A phage host prediction tool. *Viruses* (2016)

doi:10.3390/v8050116.

56. Garneau, J. R., Depardieu, F., Fortier, L. C., Bikard, D. & Monot, M. PhageTerm: A tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
57. Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y. & Wishart, D. S. PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Brief. Bioinform.* **20**, 1560–1567 (2018).
58. Saharman, Y. R. *et al.* Epidemiology and characterisation of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a large intensive care unit in Jakarta, Indonesia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **54**, 655–660 (2019).
59. Pelegrin, A. C. *et al.* ‘High-Risk International Clones of Carbapenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Endemic to Indonesian Intensive Care Units: Impact of a Multifaceted Infection Control Intervention Analyzed at the Genomic Level’. *MBio* **11**, 1–15 (2019).
60. ASCII Code Webpage. <https://www.ascii-code.com/>.
61. NCBI, (National Center for Biotechnology Information). BLAST. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
62. Laboratory of Chemical Life Science | Kyoto University Bioinformatics Center. Virus-Host Database. <https://www.genome.jp/virushostdb/>.
63. Adriaenssens, E. M. & Rodney Brister, J. How to name and classify your phage: An informal guide. *Viruses* **9**, 1–9 (2017).
64. UniProt. <https://www.uniprot.org/> (2020).
65. Stangroom, J. Social Science Statistics. <http://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/Default2.aspx> (2020).
66. Sepúlveda-Robles, O., Kameyama, L. & Guarneros, G. High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4510–4515

(2012).

67. Cazares, A., Mendoza-Hernández, G. & Guarneros, G. Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages. *BMC Genomics* **15**, 1–13 (2014).
68. Galetti, R., Andrade, L. N., Varani, A. M. & Darini, A. L. C. A phage-like plasmid carrying blaKPC-2Gene in carbapenem-resistant *pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
69. Berger, C. “ Genome based investigations towards understanding carbon source dependent bioelectrochemical activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains ”. (2019).
70. López-Leal, G., Santamaria, R. I., Cevallos, M. Á., Gonzalez, V. & Castillo-Ramírez, S. Prophages Encode Antibiotic Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* . *Microb. Drug Resist.* **00**, 10–12 (2020).
2. Murray, P., Ten, R. & Pfaller, M. *Ιατρική Μικροβιολογία*. (2016).
3. Tortora, G., Funke, B. & Case, C. *Εισαγωγή στη Μικροβιολογία*. (Broken Hill Publishers LTD, 2016).
4. Γιαννουλάκη, Ε. Βακτηριολογία Θεωρία 2. 107–121 (2018).
5. Μπαστάκη, Μ. Λειτουργικός χαρακτηρισμός πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. (Πανεπιστήμιο Κρήτης Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών Τμήμα Βιολογίας, 2009). doi:10.12681/eadd/25940.
6. Juan, C., Peña, C. & Oliver, A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.* **215**, S44–S51 (2017).
7. Moradali, M. F., Ghods, S. & Rehm, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**,

(2017).

8. Soto, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* **4**, 223–229 (2013).
9. Meylan, S., Andrews, I. W. & Collins, J. J. Targeting Antibiotic Tolerance, Pathogen by Pathogen. *Cell* **172**, 1228–1238 (2018).
10. Barraud, N., Buson, A., Jarolimek, W. & Rice, S. A. Mannitol enhances antibiotic sensitivity of persister bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
11. Γιαννουλάκη, Ε. Κλινική Μικροβιολογία, Λοιμώξεις Ουροποιητικού, Γενετικού. 2–57 (2019).
12. Salmanov, A. *et al.* *Healthcare-associated infections in intensive care units. Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)* vol. 72 (2019).
13. Botelho, J., Grosso, F. & Peixe, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist. Updat.* **44**, 100640 (2019).
14. Sausserieau, E. & Debarbieux, L. *Bacteriophages in the Experimental Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections in Mice. Advances in Virus Research* vol. 83 (Elsevier Inc., 2012).
15. Winstanley, C. *et al.* Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the liverpool epidemic strain of *pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* **19**, 12–23 (2009).
16. Ramsay, J. P., Hynes, M. F., Sullivan, J. T. & Ronson, C. W. Symbiosis Islands ☆. *Ref. Modul. Life Sci.* 7–9 (2017) doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.07223-x.
17. Sirijan Santajit & Nitaya Indrawattana. Mechanisms of antimicrobial resistance in Pasteurellaceae. *PBioMed Res. Int.* **2016**, 1–8 (2016).

18. Magiorakos, A. *et al.* Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. (2011).
19. Naughton, S. *et al.* Pseudomonas aeruginosa AES-1 exhibits increased virulence gene expression during chronic infection of cystic fibrosis lung. *PLoS One* **6**, 1–8 (2011).
20. Hatfull, G. F. & Hendrix, R. W. Bacteriophages and their genomes. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 298–303 (2011).
21. Shors, T. *Ιολογία Εξερευνώντας τους Ιούς.* (Broken Hill Publishers LTD, 2017).
22. Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V. & Heaphy, S. Phages in nature. *Bacteriophage* **1**, 31–45 (2011).
23. Kakasis, A. & Panitsa, G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 16–21 (2019).
24. Lopes, A., Tavares, P., Petit, M. A., Guérois, R. & Zinn-Justin, S. Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC Genomics* **15**, 1–17 (2014).
25. Cornelissen, A. *et al.* The t7-related pseudomonas putida phage φ15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PLoS One* **6**, (2011).
26. Latka, A., Maciejewska, B., Majkowska-Skrobek, G., Briers, Y. & Drulis-Kawa, Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 3103–3119 (2017).
27. Groth, A. C. & Calos, M. P. Phage integrases: Biology and applications. *J. Mol. Biol.* **335**, 667–678 (2004).
28. Akhter, S., Aziz, R. K. & Edwards, R. A. PhiSpy: A novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity-and composition-based

strategies. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1–13 (2012).

29. Fouts, D. E. Phage\_Finder: Automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5839–5851 (2006).

30. Taylor, V. L., Fitzpatrick, A. D., Islam, Z. & Maxwell, K. L. The Diverse Impacts of Phage Morons on Bacterial Fitness and Virulence. in *Advances in Virus Research* (2019). doi:10.1016/bs.aivir.2018.08.001.

31. Vale, F. F. & Lehours, P. Relating phage genomes to helicobacter pylori population structure: General steps using whole-genome sequencing data. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).

32. Yuan, Y. & Gao, M. Jumbo bacteriophages: An overview. *Front. Microbiol.* **8**, 1–9 (2017).

33. Brüssow, H. & Hendrix, R. W. Phage Genomics: Small is beautiful. *Cell* **108**, 13–16 (2002).

34. Roach, D. R. & Donovan, D. M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage* **5**, e1062590 (2015).

35. Dion, M. B., Oechslin, F. & Moineau, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 125–138 (2020).

36. Grose, J. H. & Casjens, S. R. Understanding the enormous diversity of bacteriophages: The tailed phages that infect the bacterial family Enterobacteriaceae. *Virology* **468**, 421–443 (2014).

37. Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W. & Muniesa, M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* **79**, 1–7 (2015).

38. Song, W. *et al.* Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Res.* **47**, W74–W80 (2019).

39. Young, R. & Bläsi, U. Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 191–205 (1995).
40. Stone, E., Campbell, K., Grant, I. & McAuliffe, O. Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses* **11**, 1–26 (2019).
41. Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D. R., Sillankorva, S. & Azeredo, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2141–2151 (2016).
42. Wang, I. N., Smith, D. L. & Young, R. Holins: The protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 799–825 (2000).
43. Craig, N. L. Transposases and Integrases. *Encycl. Life Sci.* (2001) doi:10.1038/npg.els.0000593.
44. Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. & Zhang, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J. Genet. Genomics* **38**, 95–109 (2011).
45. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463–5467 (1977).
46. Thermes, C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* **30**, 418–426 (2014).
47. Behjati, S. & Tarpey, P. S. What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* **98**, 236–238 (2013).
48. Metzker, M. L. Sequencing technologies the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31–46 (2010).
49. Douglass, A. P. *et al.* Coverage-versus-length plots, a simple quality control step for de Novo Yeast Genome sequence assemblies. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **9**, 879–887 (2019).
50. Del Chierico, F. *et al.* Choice of next-generation sequencing pipelines.



*Methods Mol. Biol.* **1231**, 31–47 (2015).

51. Debarbieux, L. *et al.* Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *J. Infect. Dis.* **201**, 1096–1104 (2010).

52. Hurwitz, B. L., Ponsero, A., Thornton, J. & U'Ren, J. M. Phage hunters: Computational strategies for finding phages in large-scale 'omics datasets. *Virus Res.* **244**, 110–115 (2018).

53. Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y. & Wishart, D. S. PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Brief. Bioinform.* **20**, 1560–1567 (2018).

54. Ren, J., Ahlgren, N. A., Lu, Y. Y., Fuhrman, J. A. & Sun, F. VirFinder: a novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data. *Microbiome* **5**, 69 (2017).

55. Villarroel, J. *et al.* HostPhinder: A phage host prediction tool. *Viruses* (2016) doi:10.3390/v8050116.

56. Garneau, J. R., Depardieu, F., Fortier, L. C., Bikard, D. & Monot, M. PhageTerm: A tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. *Sci. Rep.* **7**, (2017).

57. Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y. & Wishart, D. S. PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Brief. Bioinform.* **20**, 1560–1567 (2018).

58. Saharman, Y. R. *et al.* Epidemiology and characterisation of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a large intensive care unit in Jakarta, Indonesia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **54**, 655–660 (2019).

59. Pelegrin, A. C. *et al.* 'High-Risk International Clones of Carbapenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Endemic to Indonesian Intensive Care Units: Impact of a Multifaceted Infection Control Intervention Analyzed at the Genomic Level'. *MBio* **11**, 1–15 (2019).

60. ASCII Code Webpage. <https://www.ascii-code.com/>.
61. NCBI, (National Center for Biotechnology Information). BLAST. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
62. Laboratory of Chemical Life Science | Kyoto University Bioinformatics Center. Virus-Host Database. <https://www.genome.jp/virushostdb/>.
63. Adriaenssens, E. M. & Rodney Brister, J. How to name and classify your phage: An informal guide. *Viruses* **9**, 1–9 (2017).
64. UniProt. <https://www.uniprot.org/> (2020).
65. Stangroom, J. Social Science Statistics. <http://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/Default2.aspx> (2020).
66. Sepúlveda-Robles, O., Kameyama, L. & Guarneros, G. High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4510–4515 (2012).
67. Cazares, A., Mendoza-Hernández, G. & Guarneros, G. Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages. *BMC Genomics* **15**, 1–13 (2014).
68. Galetti, R., Andrade, L. N., Varani, A. M. & Darini, A. L. C. A phage-like plasmid carrying blaKPC-2Gene in carbapenem-resistant *pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
69. Berger, C. “ Genome based investigations towards understanding carbon source dependent bioelectrochemical activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains ”. (2019).
70. López-Leal, G., Santamaria, R. I., Cevallos, M. Á., Gonzalez, V. & Castillo-Ramírez, S. Prophages Encode Antibiotic Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Drug Resist.* **00**, 10–12 (2020).



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

Πίνακας 7 - Αρχική λίστα με τους κωδικούς αναγνώρισης του NCBI για τους βακτηριοφάγους που μολύνουν το βακτήριο *P. aeruginosa* της Βάσης Δεδομένων Virus-Host.

NC_042343	NC_041903	NC_029083	NC_027345	NC_022966	NC_015294	NC_008294	NC_002484
NC_042342	NC_041902	NC_029066	NC_027298	NC_022746	NC_015272	NC_007810	NC_001628
NC_042135	NC_041885	NC_029065	NC_027292	NC_022096	NC_015264	NC_007809	NC_001418
NC_042115	NC_041881	NC_029017	NC_026602	NC_022091	NC_015208	NC_007808	NC_001331
NC_042113	NC_041880	NC_028999	NC_026601	NC_021062	NC_013692	NC_007807	LN610588
NC_042107	NC_041877	NC_028980	NC_026600	NC_020203	NC_013691	NC_007806	LN610587
NC_042104	NC_041870	NC_028971	NC_026599	NC_020202	NC_013638	NC_007805	LN610586
NC_042103	NC_041865	NC_028939	NC_026594	NC_020200	NC_012418	NC_007623	LN610585
NC_042092	NC_041851	NC_028933	NC_026587	NC_020198	NC_012091	NC_006552	LN610583
NC_042091	NC_031274	NC_028931	NC_026586	NC_019935	NC_012092	NC_006548	LN610582
NC_042081	NC_031129	NC_028919	NC_024782	NC_019923	NC_012093	NC_005884	LN610581
NC_042080	NC_031110	NC_028885	NC_024381	NC_019918	NC_011810	NC_005178	LN610580
NC_042079	NC_031104	NC_028882	NC_024365	NC_019913	NC_011756	NC_005045	LN610576
NC_042071	NC_031091	NC_028879	NC_024362	NC_019813	NC_011703	NC_004629	LN610575
NC_042072	NC_031073	NC_028836	NC_024330	NC_019451	NC_011613	NC_004466	KM411960
NC_042073	NC_031063	NC_028817	NC_024140	NC_019450	NC_011611	NC_004173	KM411958
NC_042068	NC_031058	NC_028809	NC_024123	NC_018850	NC_011373	NC_004174	KF981875
NC_042069	NC_031014	NC_028770	NC_023700	NC_018282	NC_011166	NC_004175	KC969441
NC_042070	NC_030940	NC_028745	NC_023601	NC_018274	NC_011165	NC_004170	KC862296
NC_042060	NC_030934	NC_028667	NC_023583	NC_017972	NC_011107	NC_004171	JX403939
NC_042054	NC_030931	NC_028661	NC_023575	NC_017971	NC_010821	NC_004172	JQ067085
NC_041994	NC_030929	NC_028657	NC_023006	NC_017865	NC_010326	NC_003714	JQ067083
NC_041968	NC_030923	NC_028652	NC_023005	NC_017864	NC_010325	NC_003715	JN811560
NC_041964	NC_030918	NC_027992	NC_022986	NC_017674	NC_010116	NC_003716	JN254801
NC_041953	NC_030910	NC_027986	NC_022974	NC_016765	NC_009936	NC_003299	JN175269
NC_041934	NC_030909	NC_027388	NC_022971	NC_016764	NC_009935	NC_003300	HE983844
NC_041907	NC_030908	NC_027384	NC_022970	NC_016762	NC_009818	NC_003301	EU056923
NC_041904	NC_029101	NC_027375	NC_022967	NC_016571	NC_008717	NC_003278	

Πίνακας 8 - Ο κωδικός αναγνώρισης των βακτηριοφάγων της τελικής λίστας και οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν για τους συγκεκριμένους βακτηριοφάγους. Το σήμα + συμβολίζει την εύρεση και χρήση της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την εκάστοτε πρωτεΐνη για τον συγκεκριμένο βακτηριοφάγο, ενώ το σήμα - συμβολίζει την απουσία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Κωδικός Βακτηριοφάγου	Ιντεγκράση	Τρανσποζάση	Χολίνη
NC_042135	+	-	-
NC_041851	-	+	-
NC_030940	-	+	-
NC_030918	-	+	-
NC_030908	-	+	-
NC_028667	-	+	+
NC_027992	+	-	+
NC_027384	-	+	-
NC_027298	-	+	-
NC_026601	-	+	-
NC_024782	-	+	-
NC_024330	-	+	-
NC_023700	-	+	-
NC_020203	-	+	-
NC_020202	-	+	-
NC_020200	-	+	-
NC_020198	-	+	-
NC_018274	-	+	-
NC_011613	-	+	-
NC_011611	-	+	-
NC_009818	-	+	-
NC_008717	-	+	-
NC_006552	+	-	+
NC_005178	-	+	-
NC_003278	+	-	+
NC_001331	+	-	+
JQ067085	-	+	-
JNB11560	-	+	-

Πίνακας 9 - Κωδικοί Αναγνώρισης για τα 195 δείγματα που υποβλήθηκαν επιτυχώς σε de-novo assembly

ERR3357960	ERR3357961	ERR3357962	ERR3357963	ERR3357964	ERR3357965	ERR3357966	ERR3357967	ERR3357968	ERR3357969
ERR3357970	ERR3357971	ERR3357972	ERR3357973	ERR3357975	ERR3357976	ERR3357977	ERR3357978	ERR3357979	ERR3357980
ERR3357981	ERR3357982	ERR3357983	ERR3357985	ERR3357987	ERR3357988	ERR3357989	ERR3357990	ERR3357991	ERR3357992
ERR3357993	ERR3357994	ERR3357995	ERR3357996	ERR3357997	ERR3357998	ERR3357999	ERR3358000	ERR3358001	ERR3358003
ERR3358004	ERR3358005	ERR3358006	ERR3358007	ERR3358008	ERR3358009	ERR3358010	ERR3358011	ERR3358012	ERR3358013
ERR3358014	ERR3358015	ERR3358016	ERR3358017	ERR3358018	ERR3358019	ERR3358020	ERR3358021	ERR3358022	ERR3358023
ERR3358024	ERR3358025	ERR3358026	ERR3358027	ERR3358028	ERR3358029	ERR3358030	ERR3358031	ERR3358032	ERR3358033
ERR3358034	ERR3358035	ERR3358036	ERR3358037	ERR3358038	ERR3358039	ERR3358040	ERR3358041	ERR3358042	ERR3358043
ERR3358044	ERR3358045	ERR3358046	ERR3358047	ERR3358048	ERR3358049	ERR3358050	ERR3358051	ERR3358052	ERR3358053
ERR3358054	ERR3358055	ERR3358056	ERR3358057	ERR3358059	ERR3358060	ERR3358061	ERR3358062	ERR3358063	ERR3358064
ERR3358065	ERR3358066	ERR3358067	ERR3358068	ERR3358069	ERR3358070	ERR3358071	ERR3358072	ERR3358073	ERR3358074
ERR3358075	ERR3358076	ERR3358077	ERR3358078	ERR3358079	ERR3358080	ERR3358081	ERR3358082	ERR3358083	ERR3358084
ERR3358085	ERR3358086	ERR3358087	ERR3358088	ERR3358089	ERR3358090	ERR3358091	ERR3358092	ERR3358093	ERR3358094
ERR3358095	ERR3358096	ERR3358097	ERR3358098	ERR3358099	ERR3358100	ERR3358101	ERR3358102	ERR3358103	ERR3358104
ERR3358105	ERR3358106	ERR3358107	ERR3358108	ERR3358109	ERR3358110	ERR3358111	ERR3358112	ERR3358113	ERR3358114
ERR3358115	ERR3358116	ERR3358117	ERR3358118	ERR3358119	ERR3358120	ERR3358121	ERR3358122	ERR3358123	ERR3358124
ERR3358125	ERR3358126	ERR3358127	ERR3358128	ERR3358129	ERR3358130	ERR3358131	ERR3358132	ERR3358133	ERR3358134
ERR3358135	ERR3358136	ERR3358137	ERR3358138	ERR3358139	ERR3358140	ERR3358141	ERR3358142	ERR3358143	ERR3358144
ERR3358145	ERR3358146	ERR3358147	ERR3358148	ERR3358149	ERR3358150	ERR3358151	ERR3358152	ERR3358153	ERR3358154
ERR3358155	ERR3358156	ERR3358157	ERR3358158	ERR3358159	ERR3358160	ERR3358161	ERR3358162	ERR3358163	ERR3358164
ERR3358165	ERR3358166	ERR3358167	ERR3358168	ERR3358169	ERR3358170	ERR3358171	ERR3358172	ERR3358173	ERR3358174
ERR3358175	ERR3358176	ERR3358177	ERR3358178	ERR3358179	ERR3358180				

Πίνακας 10 - Κωδικοί Αναγνώριση του ENA για τα 193 δείγματα που περιέχουν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες βακτηριοφάγων, σύμφωνα με τη στοιχίση BLAST

ERR3357960	ERR3357961	ERR3357962	ERR3357963	ERR3357964	ERR3357965	ERR3357966	ERR3357967	ERR3357968	ERR3357969
ERR3357970	ERR3357971	ERR3357972	ERR3357973	ERR3357975	ERR3357976	ERR3357977	ERR3357978	ERR3357979	ERR3357980
ERR3357981	ERR3357982	ERR3357983	ERR3357985	ERR3357987	ERR3357988	ERR3357989	ERR3357990	ERR3357991	ERR3357992
ERR3357993	ERR3357994	ERR3357995	ERR3357996	ERR3357997	ERR3357998	ERR3357999	ERR3358000	ERR3358003	ERR3358004
ERR3358005	ERR3358006	ERR3358007	ERR3358008	ERR3358009	ERR3358010	ERR3358011	ERR3358012	ERR3358013	ERR3358014
ERR3358015	ERR3358016	ERR3358017	ERR3358018	ERR3358019	ERR3358020	ERR3358021	ERR3358022	ERR3358023	ERR3358024
ERR3358025	ERR3358026	ERR3358027	ERR3358028	ERR3358029	ERR3358030	ERR3358031	ERR3358032	ERR3358033	ERR3358034
ERR3358035	ERR3358036	ERR3358037	ERR3358038	ERR3358039	ERR3358040	ERR3358041	ERR3358042	ERR3358043	ERR3358044
ERR3358045	ERR3358046	ERR3358047	ERR3358048	ERR3358049	ERR3358050	ERR3358051	ERR3358052	ERR3358053	ERR3358054
ERR3358055	ERR3358056	ERR3358057	ERR3358059	ERR3358060	ERR3358061	ERR3358062	ERR3358063	ERR3358064	ERR3358065
ERR3358066	ERR3358067	ERR3358068	ERR3358069	ERR3358070	ERR3358071	ERR3358072	ERR3358073	ERR3358074	ERR3358075
ERR3358076	ERR3358077	ERR3358078	ERR3358079	ERR3358080	ERR3358081	ERR3358082	ERR3358083	ERR3358084	ERR3358085
ERR3358086	ERR3358087	ERR3358088	ERR3358089	ERR3358090	ERR3358091	ERR3358092	ERR3358093	ERR3358094	ERR3358096
ERR3358097	ERR3358098	ERR3358099	ERR3358100	ERR3358101	ERR3358102	ERR3358103	ERR3358104	ERR3358105	ERR3358106
ERR3358107	ERR3358108	ERR3358109	ERR3358110	ERR3358111	ERR3358112	ERR3358113	ERR3358114	ERR3358115	ERR3358116
ERR3358117	ERR3358118	ERR3358119	ERR3358120	ERR3358141	ERR3358142	ERR3358143	ERR3358144	ERR3358145	ERR3358146
ERR3358147	ERR3358148	ERR3358149	ERR3358150	ERR3358151	ERR3358152	ERR3358153	ERR3358154	ERR3358155	ERR3358157
ERR3358158	ERR3358159	ERR3358160	ERR3358161	ERR3358162	ERR3358163	ERR3358164	ERR3358165	ERR3358166	ERR3358167
ERR3358168	ERR3358169	ERR3358170	ERR3358171	ERR3358172	ERR3358173	ERR3358174	ERR3358175	ERR3358176	ERR3358177
ERR3358178	ERR3358179	ERR3358180							