

Transkrypt - Innovirology session 7.1 Tradycyjne fagotypowanie

Slajd 1:

Tradycyjnym biotechnologicznym zastosowaniem fagów jest ich użycie do identyfikacji wyizolowanych szczepów bakteryjnych, jak również do wykrywania tych szczepów w próbkach różnego typu.

W tym temacie zostanie omówiona oryginalna strategia fagotypowania oraz kilka jej adaptacji.

Slajd 2:

Typowanie mikrobiologiczne jest podstawą identyfikacji mikroorganizmów na poziomie szczepu, co jest istotne w kontekście rozpoznawania szczepów wirulentnych, potwierdzania potencjalnych zagrożeń epidemiologicznych, określania źródła i drogi infekcji oraz śledzenia krostransmisji patogenów w jednostkach służby zdrowia. Dodatkowo, pozwala również na ocenę efektywności środków kontroli.

Rozwinięto wiele technik typowania. Jedną z nich opiera się na naturalnej specyficzności fagów. Rzeczywiście, bakteryjne wirusy cechuje zdolność specyficznego oddziaływania i infekcji jedynie konkretnych szczepów, dzięki czemu można wykorzystywać biblioteki fagów do identyfikacji izolatów bakterii na poziomie podgatunku.

Slajd 3:

Żeby to osiągnąć, hodowla bakterii zostaje rozprowadzona na płytce, tworząc murawę bakteryjną, na którą nanoszone są punktowo preparaty różnych fagów. Jeśli dojdzie do infekcji, w miejscu naniesienia preparatu będą widoczne łyśinki. Ponieważ do typowania używane są różne fagi, każdy szczep bakteryjny doje charakterystyczny wzór infekcji, co w konsekwencji pozwala określić rodzaj i gatunek bakterii.

Zasadniczym ograniczeniem tej metody jest to, że pozwala ona jedynie na detekcję tych bakterii, które można namnażać, a czas diagnozy jest dodatkowo ograniczony przez tempo replikacji komórek bakteryjnego gospodarza. Może to stanowić problem w przypadku niektórych patogenów, np. prątków. Kolejnym wyzwaniem jest pracochłonność tej metody, ponieważ fagotypowanie wymaga ciągłej produkcji i przechowywania dużych ilości preparatów fagowych.

Slajd 4:

Aby przezwyciężyć te ograniczenia, na przestrzeni lat rozwinięto kilka modyfikacji tej metody.

Pierwszą z nich – znaną jako *phage amplification assay* – znajduje zastosowanie głównie w wykrywaniu bakterii wolnorosnących, takich jak prątki. Ominięcie ograniczenia związanego z wolnym tempem wzrostu bakterii jest możliwe dzięki wprowadzeniu dodatkowego etapu wykorzystującego szybko rosnące komórki zastępcze. Wyjściowa próbka nadal zostaje zainfekowana bakteriofagami w celu wykrycia obecności specyficznych patogenów, jednak w kolejnym kroku stosuje się środek wirusobójczy, którego zadaniem jest zniszczenie wszystkich nadmiarowych bakteriofagów. Dzięki

temu w próbce pozostają jedynie te fagi, które zainfekowały komórki bakterii i w konsekwencji tylko one mogą wytworzyć fagi potomne. Po zakończeniu tego cyklu infekcji, nowopowstałe fagi potomne zostają użyte do zainfekowania szybko rosnących zastępczych komórek bakteryjnych. Ich wysianie pozwala na oznaczenie ilości łysek, wskazujących na replikację bakteriofagów.

Slajd 5:

Druga adaptacja jest znana jako *reporter phage assay*. Ta strategia pozwala ominąć konieczność powstania łysek, tym samym umożliwiając szybszą detekcję. Wykorzystuje ona fagi, które zostały genetycznie zmodyfikowane w taki sposób, żeby kodowały konstrukt reporterowy – różnego typu, od białek fluorescencyjnych po specyficzne enzymy.

5.1: Gdy genom faga zostaje wprowadzony do komórki docelowej podczas infekcji, gen reporterowy ulega ekspresji.

5.2: Możliwa jest wówczas detekcja sygnału genu reporterowego, a także skorelowanie siły sygnału z liczbą komórek docelowych obecnych w próbce.

5.3: Jednym z przykładów fagowego systemu reporterowego jest zastosowanie lucyferazy do wykrywania prątków. Zainfekowane komórki wytwarzają lucyferazę, a dodanie lucyferyny skutkuje wówczas emisją sygnału świetlnego, który może być zmierzony.

Slajd 6:

Trzecia strategia to tak zwana *dual phage technology*, która jeszcze silniej wzmacnia specyficzność typowania fagowego. Ta strategia opiera się na wykorzystaniu dwóch fagów, z których każdy koduje inny gen oporności i jest zdolny do jego transdukcji do komórek docelowych. Dodatkowo, fagi są chemicznie sprzężone z przeciwciałami specyficznymi wobec różnych epitopów tego samego antygeny, pochodzącego od określonego patogenu.

6.1: Oba fagi są dodawane do próbki, która potencjalnie może zawierać docelowy antygen.

6.2: Wrażliwe bakterie są następnie dodawane do próbki, w celu umożliwienia infekcji przez kompleksy fag-antygen. Należy podkreślić, że tylko te fagi, które są związane z tym samym antygenem będą zdolne do koinfekcji komórek bakteryjnych.

6.3: W ostatnim kroku zainfekowane komórki bakteryjne są wysiewane na stałe podłoże zawierające oba antybiotyki selekcyjne w celu selekcji tych komórek, w których doszło do koinfekcji. Dzięki temu liczba uzyskanych na płytce kolonii koreluje z liczbą antygenów obecnych w wyjściowej próbce.

Slajd 7:

Poniższe pozycje literaturowe stanowią dobre podsumowanie potencjału zastosowania fagów do detekcji bakterii. Ten temat zostanie obszerniej omówiony w kolejnej sekcji.