

Izolacja oraz określenie potencjału terapeutycznego fagów specyficznych wobec szczepów *Acinetobacter baumannii*

Bakterie z gatunku *Acinetobacter baumannii*, ze względu na ich rosnącą oporność wobec obecnie stosowanych antybiotyków, stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi. Badania wykazały, że wzrost stosowania antybiotyków w szpitalach przekłada się na wzrost oporności wśród szczepów szpitalnych *A. baumannii* wobec tych chemioterapeutyków. Na zakażenia wywołane przez szczepy *A. baumannii* szczególnie narażone są osoby długotrwale hospitalizowane, zwłaszcza pacjenci oddziałów intensywnej terapii oraz osoby z niedoborami odporności. Bakterie te mogą być czynnikami etiologicznymi związanymi z zakażeniami krwi, dróg moczowych lub tkanek miękkich. Śmiertelność związana z zakażeniami *A. baumannii* oscyluje od 26 do 60% i zależna jest od czynników takich jak niecelowane leczenie, oporność na stosowane leki, małopłytkowość oraz podłączenie pacjenta do respiratora. Warto jednak zaznaczyć, że związek między wyższą śmiertelnością a wielolekoopornością szczepów *A. baumannii* nie został potwierdzony. Raporty WHO klasyfikujące bakterie pod względem priorytetu badań nad nowymi antybiotykami przypisały szczepy *A. baumannii* odporne na karbapenemy do grupy krytycznego priorytetu. Dane te pokazują jak ważne jest poszukiwanie nowych środków terapeutycznych skierowanych przeciwko opornym szczepom bakteryjnym. Oprócz oporności na antybiotyki bakterie te charakteryzują się opornością na czynniki środowiskowe. Szczepy te zdolne są także do wytwarzania biofilmu na powierzchniach oraz wyposażeniu szpitalnym, w tym na cewnikach urologicznych, co może skutkować rozwinięciem się trudnych w leczeniu infekcji układu moczowego.

Bakteriofagi, czyli wirusy zdolne do amplifikacji wyłącznie w komórkach bakteryjnych, są jednymi z najliczniej występujących na Ziemi cząstek biologicznych. Różnią się między sobą morfologią oraz organizacją i wielkością genomu. Opublikowane w ostatnich latach wyniki badań dotyczących fagów litycznych, swoistych wobec *A. baumannii* wykazały, że są one zdolne do redukcji szczepów opornych na antybiotyki, co wskazuje na możliwość ich wykorzystania do celowanej terapii fagowej. Badania *in vitro* potwierdziły, że bakteriofagi zdolne są do skutecznego usuwania biofilmu wytworzonego przez szczepy *A. baumannii*, z kolei badania *in vivo* w modelach zwierzęcych wykazały, że bakteriofagi ułatwiają zwalczanie infekcji bakteryjnych nie wykazując działania cytotoksycznego wobec komórek zwierzęcych.

W świetle powyższego terapia fagowa jest obiecującą alternatywą dla antybiotykoterapii w leczeniu zakażeń wywołanych przez wielolekooporne szczepy *A. baumannii*.

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie w warunkach *in vitro* potencjału terapeutycznego bakteriofagów swoistych wobec szczepów *A. baumannii* jako alternatywy wobec antybiotyków lub wsparcia w leczeniu zakażeń wywoływanych przez szczepy odporne na antybiotyki. W ramach realizacji celu rozprawy doktorskiej sformułowano poniższe **hipotezy badawcze**:

1. ścieki komunalne oraz szpitalne stanowią źródło do izolacji bakteriofagów swoistych wobec wielolekoopornych szczepów *A. baumannii*,

2. kompleksowa analiza właściwości biologicznych, morfologicznych i genomicznych umożliwia wybór fagów do celów terapeutycznych,
3. bakteriofagi wykazują potencjał do eradykacji biofilmów formowanych przez uropatogenne szczepy *A. baumannii*.

Określono również **zadania badawcze (cele szczegółowe)**, które pozwoliły na weryfikację postawionych hipotez badawczych:

- 1) izolacja bakteriofagów specyficznych wobec wielolekoopornych szczepów *A. baumannii*,
- 2) wyznaczenie najkorzystniejszego współczynnika infekcji (ang. *multiplicity of infection*, MOI) wyizolowanych bakteriofagów celem określenia optymalnych parametrów amplifikacji indywidualnie dla każdego z fagów,
- 3) badanie właściwości biologicznych wyizolowanych fagów, w tym morfologii łysinek, ultrastruktury wirionów fagowych, spektrum litycznego, swoistości gatunkowej oraz kinetyki adsorpcji fagów do komórek bakteryjnych,
- 4) izolacja materiału genetycznego badanych fagów wraz z kompleksową analizą bioinformatyczną uzyskanych sekwencji genomów fagowych,
- 5) badanie stabilności wyizolowanych fagów w różnych warunkach przechowywania: w szerokim zakresie temperatur, pH podłoża hodowlanego, a także ocena stabilności fagów w wybranych dezynfektantach, roztworach jonów metali, olejkach eterycznych oraz moczu ludzkim (pochodzącym zarówno od osób zdrowych, jak również chorych ze zdiagnozowanym bakteryjnym zakażeniem układu moczowego),
- 6) badanie wpływu pojedynczych fagów oraz koktajlu fagowego na degradację biofilmu bakteryjnego utworzonego przez uropatogenne szczepy *A. baumannii*.

Rozprawę doktorską stanowi cykl powiązanych tematycznie prac w postaci czterech publikacji naukowych. Wyniki badań zostały przedstawione w dwóch oryginalnych publikacjach, z kolei w dwóch publikacjach przeglądowych podsumowano aktualny stan wiedzy o rosnącym zagrożeniu dla zdrowia i życia człowieka związanym z infekcjami wywołanymi przez szczepy *A. baumannii*. Omówiono potencjał terapeutyczny fagów swoistych wobec tych szczepów, a zwłaszcza zastosowanie terapii fagowej w leczeniu zakażeń układu moczowego wywoływanych przez uropatogenne szczepy *A. baumannii*.

W dwóch pracach przeglądowych (**P1** Bagińska i in., 2019; **P2** Bagińska i in., 2021) zwrócono szczególną uwagę na trudności w zwalczaniu infekcji wywołanych przez szczepy *A. baumannii*, ze względu na ich rosnącą oporność na obecnie stosowane antybiotyki oraz zdolność do tworzenia biofilmu bakteryjnego. Zaprezentowano również najnowsze informacje dotyczące zastosowania fagów swoistych wobec szczepów *A. baumannii* w walce z infekcjami wywołanymi przez te szczepy oraz podkreślono przewagę terapii fagowej w porównaniu do konwencjonalnie stosowanej antybiotykoterapii.

W pierwszej publikacji oryginalnej **P3** (Bagińska i in., 2023) opisano procedurę izolacji, amplifikacji oraz badania właściwości biologicznych bakteriofagów. Do badań wykorzystano próbki ścieków środowiskowych, komunalnych i szpitalnych pobranych z różnych lokalizacji w Polsce (Bagińska i in., 2023). Poszukiwanie fagów swoistych wobec szczepów *A. baumannii*

przeprowadzono metodą typowania fagowego wykorzystując próbki surowe i zagęszczone lub próbki inkubowane wcześniej w temp. 37°C (metoda hodowli wzbogaconej). Przeprowadzone badania pozwoliły określić właściwości biologiczne i morfologię badanych fagów. W wyniku przeprowadzonych badań scharakteryzowano 12 bakteriofagów (z czego 6 wcześniej zdeponowanych w Laboratorium Bakteriofagowym Zakładu Terapii Fagowej IITD PAN oraz 6 nowo wyizolowanych) specyficznych wobec szczepów *A. baumannii* - 11 fagów łagodnych oraz jeden lityczny. Wartości spektrum litycznego fagów oscylowały od 11 do 75%. Większość fagów wytwarzała małe i przezroczyste łysinki, a dla jednego z nich odnotowano wyraźnie większe łysinki z efektem „halo”. W oparciu o morfologię fagów określoną z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), większość fagów została sklasyfikowana jako fagi ogonkowe (klasa *Caudoviricetes*) o morfotypie syfowirusów, a jeden jako przedstawiciel morfotypu podowirusów. Wszystkie fagi posiadały dwudziestościenne symetrię kapsydu. Określono również stałą szybkości adsorpcji oraz współczynnik zakażenia (MOI), czyli stosunek liczby cząstek wirusa zakażającego do znanej liczby komórek bakteryjnych w hodowli. Optymalne wartości MOI były różne dla badanych fagów i oscylowały w zakresie od 0,001 do 10. W oparciu o badania genetyczne i analizę bioinformatyczną uzyskanych sekwencji oraz podobieństwo do genomów wcześniej opisanych bakteriofagów, badane fagi specyficzne wobec *A. baumannii* pierwotnie (data wydania publikacji) sklasyfikowano do podrodziny *Beijerinckvirinae* (Acba_6) i *Junivirinae* (wszystkie pozostałe). Obecnie Acba_6 jest przedstawicielem rodzaju *Friunavirus*, fagi: Acba_1, Acba_4, Aclw_8, Acba_15 oraz Acba_16 należą do klasy *Caudoviricetes* oraz rodzaju *Vieuvirus*. Natomiast pozostałe fagi Acba_3, Aclw_9, Acba_11 oraz Acba_13, Acba_14 oraz Acba_18 należą do klasy *Caudoviricetes*.

Druga publikacja oryginalna **P4** (Bagińska i in., 2024) opisuje badania stabilności 12 bakteriofagów w różnych wartościach temperatury oraz pH płynnego podłoża, dostępnych na rynku środków dezynfekcyjnych, olejkach eterycznych i środkach powierzchniowo czynnych (Bagińska i in., 2024). Przeprowadzono także badania stabilności fagów w moczu osób zdrowych oraz pacjentów ze zdiagnozowaną infekcją układu moczowego. Ostatnim etapem badań było określenie zdolności fagów do degradacji biofilmu wytworzonego przez uropatogenne szczepy *A. baumannii*. W oparciu o długoterminowe badania stabilności, najbardziej optymalną metodą przechowywania fagów *A. baumannii* okazała się temperatura -70°C. Natomiast temperatura 60°C spowodowała istotne obniżenie aktywności fagów po godzinie inkubacji. Najmniejsze obniżenie miana fagów zaobserwowano po ich inkubacji w podłożu o pH w zakresie od 7,0 do 9,0, przy czym redukcja miana fagów była najwyższa przy niskich wartościach pH. Przeprowadzone badania wykazały, że cząstki fagowe cechują się najwyższą stabilnością w warunkach obojętnych i lekko zasadowych, natomiast kwaśne środowisko znacząco obniża ich aktywność biologiczną. Wyniki te wskazują, że pH otoczenia jest jednym z kluczowych czynników wpływających na stabilność fagów, co ma istotne znaczenie przy ich potencjalnym zastosowaniu w terapii fagowej. Warto zauważyć, że środki dezynfekcyjne na bazie etanolu spowodowały istotną redukcję miana fagów już po 30 sekundach inkubacji. Roztwory nanocząstek miedzi i srebra również spowodowały obniżenie miana fagów, ale w znacznie mniejszym stopniu niż środki dezynfekcyjne. Natomiast bakteriofagi inkubowane przez 24 godziny w olejkach eterycznych (cynamonowym

i eukaliptusowym – 1% roztwór) można uznać za niewrażliwe na te związki. Fagi zachowały również stabilność po 60 minutach inkubacji w ludzkim moczu niezależnie od pochodzenia moczu (dawcy zdrowi/pacjenci ze zdiagnozowanym zakażeniem układu moczowego - uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy IITD PAN, numer zgody: KB-12/2022). Dodatkowo badania z wykorzystaniem biofilmu bakteryjnego wykazały, że pojedyncze fagi w większym stopniu degradują biofilm wytworzony przez uropatogenne szczepy *A. baumannii* w porównaniu do zastosowanego koktajlu fagowego.

Powyższe badania poszerzają stan wiedzy na temat fagów specyficznych wobec szczepów *A. baumannii*, które obecnie stanowią poważne zagrożenie dla ludzkiego życia i zdrowia. Uzyskane wyniki oraz dalsze badania, w tym poszukiwanie nowych fagów litycznych oraz badania z wykorzystaniem wyizolowanych fagów w mysim modelu zakażenia układu moczowego mogą w przyszłości przyczynić się do dalszego rozwoju celowanej terapii fagowej - ukierunkowanej na eradykację infekcji wywołanych przez wielolekooporne szczepy *A. baumannii*.