

PROPUNERE DE PROIECT

Izolarea și caracterizarea fenotipică și genomică a bacteriofagilor din mediu activi împotriva *Klebsiella pneumoniae*

Rezumat

Acest proiect își propune izolarea, purificarea și caracterizarea a 1-10 bacteriofagi activi asupra tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae* extensiv rezistente (XDR). Prin analiza fenotipică și secvențierea completă a genomului, vom evalua potențialul terapeutic.

1. Context și Justificare

1.1 Semnificație Clinică

Klebsiella pneumoniae este un patogen oportunist major, responsabil de infecții nosocomiale severe. Apariția tulpinilor multidrog-rezistente (MDR) și extensiv rezistente (XDR) este o provocare pentru sănătatea publică, cu opțiuni terapeutice limitate.

1.2 Terapia Fagică ca Abordare Alternativă

Bacteriofagii – virusuri care infectează specific bacteriile – oferă o alternativă tratamentului antibiotic convențional. Avantajele lor includ specificitatea pentru bacteria gazdă și natura auto-limitantă in vivo.

1.3 Justificarea Proiectului

Acest proiect abordează nevoia critică de noi agenți pentru infecțiile cu *Klebsiella pneumoniae* prin stabilirea unei colecții de fagi caracterizați. Integrarea abordărilor fenotipice și genomice asigură evaluarea proprietăților fagilor, inclusiv caracteristicile biologice, spectrul de gazdă și markerii de siguranță genetică esențiali pentru potențiale aplicații terapeutice.

2. Scop și Obiective

2.1 Scopul General

Izolarea și caracterizarea a 1-10 bacteriofagi activi împotriva *Klebsiella pneumoniae* XDR prin analiză fenotipică, determinarea spectrului de gazdă și secvențierea completă a genomului.

2.2 Obiective Specifice

Obiectivul 1: Izolarea și Purificarea Fagilor

- Izolarea bacteriofagilor din probe de mediu (ape uzate) folosind metoda stratului dublu agar cu *K. pneumoniae* XDR ca bacterie gazdă
- Selectarea a 1-10 fagi care prezintă morfologii de placă distincte și stabile pentru caracterizare detaliată
- Obținerea de lizate fagice purificate prin multiple cicluri de purificare (minimum 2-3 runde) pentru aplicații ulterioare

Obiectivul 2: Caracterizare Fenotipică

- Documentarea caracteristicilor morfologice ale plăcilor, inclusiv dimensiune, definirea marginilor și claritate
- Determinarea titrului fagic (PFU/mL) folosind metoda diluțiilor seriate și stratului dublu agar

Obiectivul 3: Extragerea ADN-ului Viral și Secvențiere

- Generarea lizatelor cu titru înalt ($\geq 10^8$ - 10^{10} PFU/mL) pentru extragerea ADN
- Purificarea ADN-ului fagic folosind protocoale standardizate care asigură eliminarea contaminării cu ADN de la gazdă
- Prepararea probelor pentru secvențierea long-read folosind platforma Oxford Nanopore MinION

Obiectivul 4: Analiza Genomică și Evaluarea Siguranței

- Asamblarea datelor brute de secvențiere folosind pipeline-uri bioinformatică stabilite
- Compararea genomurilor obținute cu secvențele fagilor cunoscuți din baze de date specializate (ex. NCBI Viral Genomes, ICTV, Phagesdb)
- Predicția ciclului biologic al fagului (strict litic vs. temperat) pe baza caracteristicilor genomice

3. Metodologie

3.1 Izolarea și Purificarea Inițială a Fagilor

Probele de mediu (ape uzate) vor fi colectate și procesate pentru izolarea fagilor. Probele vor fi supuse îmbogățirii prin incubarea cu tulpini de *K. pneumoniae* XDR în mediu lichid Luria Bertani. După îmbogățire, testele de tip spot assay vor identifica activitatea litică. Plăcile bine definite vor fi recoltate și supuse la 2-3 runde consecutive de purificare prin izolarea plăcilor individuale pentru a asigura populații clonale. Un subset de 1-10 fagi care prezintă caracteristici morfologice distincte și activitate litică stabilă vor fi selectați pentru caracterizare comprehensivă.

3.2 Morfologia Plăcilor și Determinarea Titrului

Caracteristicile plăcilor (diametru, definirea marginilor, claritate, prezența halourilor) vor fi documentate prin examinare vizuală și imagistică. Titrurile fagice vor fi cuantificate folosind metoda stratului dublu agar cu diluții seriate și calcularea PFU/mL.

3.3 Extragerea ADN și Prepararea pentru Secvențiere

Lizatele fagice cu titru înalt vor fi centrifugate și filtrate (0.22 μm). ADN-ul viral va fi extras folosind kituri comerciale, cu tratament DNază/RNază pentru eliminarea acizilor nucleici ai gazdei. Calitatea și cantitatea ADN vor fi evaluate folosind fluorimetrie (Qubit). Probele care îndeplinesc criteriile de calitate (greutate moleculară mare, contaminare proteică minimă) vor fi pregătite pentru secvențierea long-read Oxford Nanopore conform protocoalelor producătorului.

3.5 Analiza Bioinformatică

Datele brute de secvențiere vor fi filtrate pentru calitate și asamblate folosind programe specializate pentru genomuri fagice. Plasarea filogenetică și predicția ciclului biologic (strict litic vs. temperat) vor fi efectuate folosind sisteme de clasificare stabilite.

4. Rezultate Așteptate și Livrabile

La finalizare, acest proiect va livra:

- O colecție de 1-10 bacteriofagi purificați și caracterizați activi împotriva *K. pneumoniae* XDR
- Profile fenotipice incluzând morfologia plăcilor, titruri
- Genomuri fagice complete asamblate și adnotate cu metrice de calitate

- Evaluarea preliminară a potențialului terapeutic pe baza activității litice, spectrului de gazdă și secvențierii genomice
- Stocuri fagice pastrate pentru cercetări viitoare

5. Cronologia Proiectului

Proiectul este conceput ca un program intensiv de 12 săptămâni cu faze suprapuse pentru a maximiza eficiența:

Săptămâna/Săptămânile	Activități și Etape
1-2	Colectarea probelor, îmbogățirea fagilor, izolarea inițială și purificarea prin multiple pasaje cu plăci individuale. Selectarea fagilor candidați.
3-6	Documentarea morfologiei plăcilor, determinarea titrului prin diluții seriate. Dezvoltarea protocoalelor standardizate pentru fiecare fag.
7-8	Producția de lizate pure, concentrarea fagilor și extragerea ADN. Evaluarea controlului calității și prepararea librăriei pentru secvențiere.
9	Secvențierea probelor prin Oxford Nanopore. Pregătirea rezumatelor preliminare ale datelor fenotipice.
10-11	Asamblarea genomului, evaluarea calității și analiza comparativă.
12	Integrarea datelor fenotipice și genomice. Evaluarea potențialului terapeutic. Pregătirea raportului final și prezentarea.

6. Resurse Necesare

6.1 Materiale Biologice

- Izolate clinice de *K. pneumoniae* XDR caracterizate (fenotipul de rezistență)
- Probe de mediu (ape uzate) pentru izolarea fagilor
- Medii microbiologice: bulion LB, agar LB, top-agar (0.4-0.7% agar)

6.2 Reactivi și Consumabile

- Sisteme tampon: tampon SM
- Enzime: DNază I, RNază A, Proteinază K
- Reactivi pentru extragerea ADN: etanol, kituri comerciale de extracție ADN

- Consumabile sterile: plăci Petri, vârfuri de pipetă, tuburi de microcentrifugă, filtre seringă 0.22/0.45 μm
- Kit de preparare a librăriei Oxford Nanopore și flow cells

6.3 Echipamente și Facilități

- Laborator de Nivel 2 de Biosiguranță (BSL-2) cu hotă de flux laminar
- Incubatoare (37°C) pentru culturi bacteriene și fagice
- Agitatoare orbitale pentru culturi lichide
- Microcentrifugă și centrifugă de mare viteză cu răcire
- Fluorometru (Qubit) pentru cuantificarea precisă a ADN
- Dispozitiv de secvențiere Oxford Nanopore MinION
- Stație de lucru computerizată cu software bioinformatic pentru asamblarea și adnotarea genomului

6.4 Software și Instrumente Bioinformatic

- Base-calling și control calitate: MinKNOW
- Genomică comparativă: BLAST
- Baze de date specializate: NCBI Viral Genomes

7. Semnificație și Impact

7.1 Potențial Terapeutic

Fagii identificați ca strict litici cu spectru larg de gazdă și fără elemente genetice nedorite reprezintă candidați pentru cercetare ulterioară. Acest proiect stabilește baza pentru studii viitoare incluzând testarea eficacității in vitro, formularea de cocktailuri și evaluarea farmaco-chinetică. Colecția locală de fagi oferă o resursă importantă pentru cercetare academică și potențiale aplicații biotehnologice.

7.2 Abordarea Rezistenței Antimicrobiene

Prin dezvoltarea alternativelor la antibioticele convenționale, acest proiect contribuie la eforturile globale de combatere a rezistenței antimicrobiene.

8. Asigurarea Calității și Controale

Pentru a asigura fiabilitatea și reproductibilitatea rezultatelor, vor fi implementate următoarele măsuri de control al calității:

- Puritya fagilor va fi verificată prin multiple runde de purificare

- Tulpinile bacteriene vor fi identificate prin testare specifice
- Calitatea ADN va fi evaluată înainte de secvențiere
- Datele de secvențiere vor fi supuse filtrării calității și multiple strategii de asamblare vor fi comparate

9. Evaluarea și Gestionarea Riscurilor

9.1 Provocări Potențiale

- Recuperare scăzută a fagilor din probele de mediu: Vor fi folosite multiple surse de probe și strategii de îmbogățire
- Probleme de calitate a secvențierii: Controalele de calitate pe parcursul preparării ADN minimizează riscul; vor fi menținute probe de rezervă

9.2 Considerații de Siguranță

Toate lucrările cu bacterii XDR vor fi efectuate în facilități BSL-2 urmând protocoalele instituționale de biosiguranță. Echipamentul individual de protecție va fi purtat permanent. Lizatele fagice vor fi sterilizate prin filtrare pentru a elimina bacteriile viabile. Eliminarea deșeurilor va urma procedurile aprobate pentru materiale infecțioase. Supervizorul proiectului va oferi instruire în siguranță și supraveghere pe toată durata proiectului.

10. Direcții Viitoare

Finalizarea cu succes a acestui proiect va permite mai multe investigații ulterioare:

- Microscopie electronică pentru morfologia virionilor și clasificare taxonomică
- Studii de eficacitate in vitro și acțiunea asupra biofilmelor
- CINETICĂ detaliată a infecției (rate de adsorbție, perioada latentă)
- Testarea stabilității în diverse condiții de mediu (temperatură, pH, stocare)
- Formularea de cocktailuri fagice combinând spectre de gazdă complementare