



DOI: 10.5281/zenodo.18475806

UDC: 578.262

OBȚINEREA ȘI APLICAREA PRACTICĂ A BACTERIOFAGILOR

OBTAINING AND PRACTICAL APPLICATION OF BACTERIOPHAGES

Lucia Galben, Oana-Simina Iaconi, Alina Ferdohleb, Greta Bălan*Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova*

Rezumat

Introducere. Bacteriofagii sunt considerați prădătorii naturali ai bacteriilor și se găsesc oriunde sunt bacterii. Datorită specificității lor, bacteriofagii sunt utilizați în diverse domenii precum medicină, agricultură, industria alimentară, biotehnologie, etc. Pentru ca un bacteriofag să fie util, acesta trebuie să demonstreze că are anumite caracteristici, nu doar simplaucidere a celulei bacteriene.

Material și metode. S-a realizat studiu de tip secundar, sinteză narativă. Termenii utilizați pentru selecția literaturii au fost „bacteriofagi”, „aplicarea practică”, „metode de izolare”, „amplificarea fagilor”, „purificarea fagilor”. Căutarea inițială a rezultat cu 132 de articole, din care au fost selectate și analizate 44 de lucrări eligibile.

Rezultate. Multe tehnici au fost concepute pentru izolarea, amplificarea și purificarea bacteriofagilor, fiecare dintre ele având puncte forte și puncte slabe. Cu toate acestea, tehnicile descrise constau în obținerea unei mostre de bacteriofag relativ pură care poate fi caracterizată. Bacteriofagii pot fi caracterizați pe baza proprietăților fiziologice, morfologice sau de inactivare. Cunoașterea proprietăților caracteristice fiecărui bacteriofag oferă mai multe detalii despre stilul de viață și potențialul de conversie toxigenă sau lizogenă, care asigură siguranță în aplicarea practică a bacteriofagilor.

Concluzii. Acest articol rezumă direcțiile de aplicare a bacteriofagilor și abordează restricțiile specifice și lacunele din domeniu. Sperăm că această evaluare va oferi cercetătorilor informații utile pentru selectarea direcțiilor adecvate de cercetare legate de fagi.

Cuvinte-cheie: bacteriofagi, izolarea fagilor, multiplicarea fagilor, purificarea fagilor, aplicarea practică a fagilor

Summary

Introduction. Bacteriophages are considered the natural predators of bacteria and are found wherever there are bacteria. Due to their specificity, bacteriophages are used in various fields such as medicine, agriculture, food industry, biotechnology, etc. For a bacteriophage to be useful, it is to be demonstrated that it has certain characteristics other than simply killing the bacterial cell.

Material and methods. In a secondary study, narrative synthesis was performed. The terms used for literature selection were "bacteriophages", "practical application", "isolation methods", "phage amplification", "phage purification". The initial search resulted in 132 articles, from which 44 eligible papers were selected and analyzed.

Results. Many techniques have been devised for the isolation, amplification and purification of bacteriophages, each with strengths and weaknesses. However, the techniques described result in a relatively pure sample of bacteriophage that can be characterized. Bacteriophages can be characterized based on physiological, morphological or inactivation properties. Knowing the characteristic properties of each bacteriophage provides more details about the lifestyle and the potential for toxigenic or lysogenic conversion, which ensures safety in the practical application of bacteriophages.

Conclusions. This article summarizes directions for the application of bacteriophages and addresses specific restrictions and gaps in the field. We hope that this review will provide researchers with useful information for selecting appropriate phage-related research directions.

Keywords: bacteriophages, isolation of phages, multiplication of phages, purification of phages, practical application of phages

Introducere

Bacteriofagii (fagii) sunt virusurile care infectează celulele bacteriene, considerați prădătorii naturali ai bacteriilor se găsesc oriunde sunt bacterii. Fagii sunt clasificați în funcție de modul lor de acțiune în fagi virulenți și temperați [1]. După pătrunderea în celulă, un fag temperat își integrează genomul în genomul bacteriei gazdă pentru a forma un profag, care se poate replica în funcție de replicarea celulei gazdă (calea lizogenă). Un fag strict virulent infectează celula gazdă pentru a-și controla dinamica de replicare prin producerea de noi virioni care lizează bacteria gazdă și infectează alte celule bacteriene (calea litică). Caracteristicile fenotipice ale fagilor virulenți sunt determinate de elemente genetice specifice (de exemplu, endolizine și holine), care sunt responsabile de penetrarea învelișului celulei gazde și liza bacteriilor. În lipsa acestor enzime și a prezenței represorilor lizogeni și, de obicei, a proteinelor integrază, fagii devin temperați. Mulți

factori contribuie la trecerea de la stilul de viață litic la cel lizogen și invers. Astfel, endolizinele și alte enzime fagice sunt izolate, purificate și utilizate ca agenți de control al bacteriilor pentru a evita riscul de schimbare a fagilor [1, 2].

Deși descoperirea fagilor datează de la începutul secolului al XX-lea, produsele fagice disponibile comercial sunt foarte limitate. La acest fenomen a contribuit, inclusiv și dezvoltarea rapidă a antibioticelor, care aveau un spectru mai larg de acțiune, farmacocinetica și farmacodinamica bine studiate, metode de fabricare și condiții mai simple de păstrare. Cu toate acestea, majoritatea antibioticelor au devenit ineficiente din cauza dezvoltării rezistenței bacteriilor la acestea [3, 4]. Potrivit unui raport al Organizației Mondiale a Sănătății, lumea se confruntă cu multe bacterii multirezistente care sunt implicate în patologia infecțioasă, iar antimicrobienele disponibile în prezent nu reușesc să ne protejeze din ce în ce mai mult de aceste bacterii [5]. Fiind ucigașul natural al

bacteriilor, fagii au diverse aplicații potențiale în mai multe domenii precum industrie, agricultură, mediu și medicină. Prin urmare, o atenție sporită este acum îndreptată către utilizarea practică a fagilor împotriva bacteriilor. Fagii au fost utilizați în multiple studii recente de succes pentru a controla infecțiile bacteriene, în care s-a reușit scăderea numărului de bacterii, de ex. la nivelul pielii, tractului gastrointestinal, respirator, etc. [6, 7]. De asemenea, fagii pot fi utilizați ca dezinfectanți și agenți de biocontrol, în special împotriva biofilmelor bacteriene [2]; în industrie, ca biosenzori sau conservanți alimentari [8]; în cercetarea de laborator, de ex. legarea fagilor cu nanomateriale [9]; în agricultură, de ex. tratarea plantelor; în tratarea mediului și a apei [10, 11]. Pentru a obține și utiliza fagii în diverse domenii, trebuie de parcurs câteva etape similare, care includ izolarea fagilor, purificarea, caracterizarea și analiza genomului. Mai multe studii redau diferiți pași implicați în cercetarea fagilor, cum ar fi izolarea și caracterizarea, structura și funcția, utilizarea fagilor în terapie [12].

În această lucrare ne propunem să prezentăm etapele de obținere a fagilor în laborator, de la cele inițiale de izolare până la aplicațiile terapeutice și industriale.

Material și metode

S-a realizat un studiu de tip secundar, sinteză narativă. S-a efectuat analiza publicațiilor între 2012-2022 referitor la aspectele teoretice privind izolarea și aplicarea practică a bacteriofagilor, prin utilizarea termenilor „bacteriofagi”, „aplicarea practică”, „metode de izolare”, „amplificarea fagilor”, „purificarea fagilor”. Căutarea inițială a rezultat cu 132 de articole, din ele au fost selectate cele în acces deschis și text integral, rezultând 81 de articole. După excluderea înregistrărilor care nu au legătură cu studiul și revizuirea rezumatelor au rămas 44 de lucrări eligibile ce reflectă izolarea și aplicarea practică a bacteriofagilor. Nu au fost stabilite limite de limbă, dar au fost prioritare articolele în limba engleză, publicate după anul 2010.

Rezultate și discuții

Izolarea fagilor. Au fost identificate multe metode de izolare a bacteriofagelor și toate se bazează pe utilizarea probelor de mediu ca surse de fagi. Este cunoscut că fagii se găsesc oriunde sunt prezente bacteriile. De exemplu, fagii împotriva bacteriei *Flavobacterium psychrophilum*, care infectează peștii, au fost izolați din fermele piscicole [13], iar fagii care lizează *Vibrio vulnificus*, o bacterie patogenă marină, au fost izolați din sedimentul marin bogat în bacterii viabile [14]. De asemenea, fagii care lizează *Erwinia amylovora*, o bacterie care infectează copacii, au fost izolați numai din butași de plante infectate [15]. Fagii care vizează *Escherichia coli* O157:H7 și *Salmonella* spp., care provoacă boli alimentare, au fost izolați din probe de fecale de bovine [16]. În concluzie, cea mai bună alegere pentru a găsi fagi împotriva patogenilor umani sunt apele de canalizare netratate, în special, în apropierea spitalelor și clinicilor medicale.

Procesul de izolare a fagilor a arătat că mulți fagi pot infecta gazde din diverse genuri sau specii („fagi

polivalenți”). De exemplu, phiKP26 este un fag polivalent care poate infecta atât *Salmonella* spp., cât și *E. coli* [17]. Pentru izolarea fagilor polivalenți este utilizată metoda izolării consecutive prin gazde multiple. Actualmente sunt cunoscute două astfel de metode. Prima metodă constă în suprapunerea fagului și bacteria gazdă nr. 1 pe o placă cu dublu strat de agar cu ulterioara incubare pentru formarea plajelor. Apoi, plajele formate sunt colectate și incubate cu bacteria gazdă nr. 2 timp de 4 ore și din nou suprapuse pe o placă cu dublu strat de agar și incubate pentru formarea plajelor. Acești pași se repetă cu gazde diferite. A doua metodă constă în adăugarea unui stoc de fagi la gazda nr. 1, care se află în faza exponențială de creștere, pentru a permite adsorbția fagului timp de 10 minute. Apoi atât fagii liberi, cât și cei adsorbiți sunt separați prin centrifugare la 10.000 xg timp de 5 minute. Supernatantul este adăugat la gazda nr. 1 încă pentru 10 minute, pentru o adsorbție la o viteză scăzută, înainte de a fi îmbogățit timp de 4 ore. Fagii îmbogății sunt adăugați la gazda nr. 2, care se află în faza exponențială de creștere, iar pașii anteriori sunt repetați pentru gazda nr. 3 și așa mai departe. Cu toate acestea, procesul de definire a unui fag polivalent, care are o gamă largă de gazde nu este clar, din cauza lipsei de informații despre numărul standard de tulpini/specii care ar trebui infectate de un fag care poate fi considerat a avea o gamă largă de gazde [18]. Nici o metodă specificată, până acum, nu poate oferi informații despre câte bacterii pot fi infectate de un anumit fag.

Colectarea probei de mediu este urmată de o etapă de îmbogățire a fagilor, pentru a mări titrul de fagi și, în consecință, a crește probabilitatea de a găsi fagi. Inițial, bacteriile prezente în proba colectată sunt îndepărtate, după care proba se adaugă într-un mediu de cultură ce conține cultură selectată de bacterii. Cu cât este mai mică concentrația de fagi în probă, cu atât este mai mare necesitatea de a face îmbogățirea pentru a crește șansa de izolare a fagilor. Cu toate acestea, îmbogățirea fagilor este o etapă opțională, deoarece multe experimente au fost efectuate prin însămânțare directă. Mai mult, valoarea etapei de îmbogățire este discutată mult de către cercetători, deoarece poate duce la o îmbogățire selectivă a fagilor. De exemplu, fagii cu o rată mare de replicare vor fi mult mai mulți decât alții, care ar putea infecta un spectru mai larg de gazde. Cu toate acestea, în cazul preparării unui cocktail de fagi, este important să se efectueze etapa de îmbogățire pe o anumită tulpină bacteriană verificată, pentru a asigura capacitatea cocktailului de a infecta selectiv tulpina patogenă vizată și pentru a scădea incidența dezvoltării rezistenței la fagi [19].

Recent, cercetătorii au dezvoltat metode eficiente de screening cu randament înalt, folosind o placă cu 96 de godeuri în care sunt plasate diferite tulpini bacteriene în fiecare godeu, pentru a verifica spectrul de gazde sau polivalența. Alt grup de cercetători au folosit multiple flacoane de dimensiuni mici, care erau folosite pentru a inocula diferite tulpini bacteriene pentru a fi testate la diverși fagi. Ambele metode pot contribui semnificativ la formarea unei biblioteci numită „biobancă de fagi”. Numărul băncilor de fagi din întreaga lume este încă relativ mic, inclusiv banca de bacteriofagi din Institutul Leibniz, banca de bacteriofagi

din Coreea și banca de fagi pentru terapia adaptivă din Australia [20, 21].

Indiferent dacă fagii au fost îmbogățiți sau nu, procesul de purificare trebuie să fie efectuat. Dacă proba este solidă, se adaugă soluție tampon sterilă și se amestecă pentru a suspenda fagul într-o fază lichidă. Acest proces se realizează prin centrifugare urmată de filtrarea supernatantului pentru a evita contaminarea bacteriană. Procedura de filtrare poate scădea titrul de fag în soluție. Filtrarea poate fi înlocuită prin tratarea cu cloroform, care acționează ca agent bactericid. Cu toate acestea, deși tehnica cu cloroform păstrează cantitatea de fagi, există riscul de a pierde fagii în cazul în care aceștia sunt sensibili la cloroform. Pentru concentrarea titrului de fagi, există diferite metode care pot fi urmate, inclusiv filtrarea cu flux tangențial, ultrafiltrarea cu flux direct, centrifugarea de mare viteză sau chiar citometria în flux. Cu toate acestea, ar putea fi necesară o purificare suplimentară, deoarece există întotdeauna posibilitatea de a găsi mai mult de un fag pentru aceeași gazdă. Din aceste considerente, este necesar de reizolat o singură plajă prin efectuarea striurilor sau prin tăierea plajei folosind de ex. o pipetă Pasteur. Se recomandă reizolarea de mai mult de două ori (cel puțin trei), pentru a confirma puritatea fagului izolat. Regula de aur constă în alegerea unui singur fag dintr-un cocktail de fagi și obținerea plajelor bine conturate pentru determinarea titrului de fagi [20, 22].

Amplificarea și purificarea fagilor. Fagii, ca și alte virusuri, au nevoie de celule gazdă pentru a se multiplica. Deși fagii au activitate antivirală și antifungică [23], celulele bacteriene vii rămân cele mai bune gazde pentru multiplicarea fagilor. Etapele de multiplicare a fagilor au același concept ca și în cazul altor virusuri. Pentru multiplicarea fagilor este necesar de incubat fagul cu celulele bacteriene gazdă într-un mediu adecvat pentru bacteria gazdă. Adăugarea la mediul de cultură a cationilor bivalenți (de ex., calciu, magneziu, stronțiu și bariu) crește șansele de pătrundere a materialului genetic al fagului în celulele bacteriene. Atâta timp cât fagul poate penetra celula gazdă, acesta se poate multiplica. Cu toate acestea, celulele gazdă trebui să fie proaspăt pregătite pentru a fi „destul de tinere”, iar condițiile de mediu trebuie să fie optimale pentru creșterea bacteriilor și activitatea lor metabolică. În caz contrar, fagul va pătrunde în celulele bacteriene și le va ucide fără a crește numărul de fagi. S-a constatat că, la temperaturi scăzute (4°C) sau în timpul fazei staționare de dezvoltare a bacteriilor, fagii pot infecta în continuare celulele gazdă, scăzând titrul bacteriilor, dar cu o capacitate foarte scăzută de a asambla noi fagi, păstrând titrurile fagilor aproape la același nivel. Una dintre cele mai rapide metode de multiplicare a fagilor constă în adăugarea inoculului bacterian (bacteriile cultivate peste noapte) într-un mediu lichid proaspăt pregătit și incubarea pe o perioadă anumită de timp (în dependență de tulpina utilizată). Acest lucru asigură aflarea bacteriilor în faza exponențială de creștere. Ulterior, fagul se adaugă la bacterii timp de 4 ore, după care pot fi urmate etapele de purificare menționate mai sus [24].

Deși inducerea fagilor temperați are loc spontan, la procesul de izolare/multiplicare trebuie adăugată o etapă

de inducție a profagului, care include expunerea la raze ultraviolete (UV), mitomicină C sau fluorochinolone pentru a obține un titru mai mare de fagi. În acest caz, agentul inductor trebuie optimizat pentru a induce eliberarea fagilor maturi înainte de a ucide gazda [25].

O altă metodă este utilizarea mediilor semisolide, care constă în introducerea fagilor și a bacteriilor în fază exponențială în agar, după care amestecul se aplică pe placa de agar cu incubarea timp de 20 de ore la 37°C. După incubare, pe suprafața plăcii se aplică soluție tampon sterilă (1 ml soluție tampon la 63 cm² de agar), pentru a asigura un strat subțire de lichid care acoperă stratul superior de agar, apoi placa este incubată fără agitare la 4°C timp de 20 de ore. Ulterior, soluția tampon cu fagi și resturi bacteriene este colectată cu micropipete pentru a fi supusă purificării. La suprafața agarului se adaugă 1 ml soluție tampon rece la 79 cm² de suprafață a plăci, apoi această suspensie este colectată și amestecată cu cloroform în raport 1:3 (volumul suspensie:volumul cloroform) și incubată timp de 10 min la temperatura camerei. Ulterior, fagul este obținut prin centrifugare timp de 10 min la 13.700 rpm la 4°C, urmată de multiplicarea tradițională în lichid așa cum s-a menționat mai sus [26].

Leshkaheli și colab. au raportat că creșterea secundară a *E. coli* a început să apară după 7 ore de la utilizarea fagului vB_{abaM_3054} [27]. Deși fagul Mimir87 formează plaje clare pe placa cu *Virgibacillus*, după un timp prelungit de incubare la temperatura camerei, în plajele clare a început să apară colonii bacteriene secundare [28]. Creșterea bacteriană secundară în cazul perioadei lungi de incubare se datorează interacțiunii dintre veziculele membranei bacteriene exterioare și fagi, care inhibă infecția cu fagi. Nabergoj și colab. au constatat că creșterea bacteriană secundară poate afecta negativ constanta de adsorbție, perioada latentă și dimensiunea plajei. Conform celor constatate, procesul de amplificare trebuie optimizat prin aplicarea metodei adecvate, timpului de incubare, temperaturii, condițiilor de aerobioză și a inoculului inițial în dependență de natura fagului și a bacteriilor, pentru a obține cel mai mare randament [29].

Selectarea tehnicii de purificare a fagilor variază în funcție de aplicarea dorită pentru care fagul va fi utilizat ulterior. După cum s-a menționat mai sus, utilizarea centrifugării și tratarea cu cloroform sau filtrarea supernatantului printr-un filtru cu dimensiuni de 0,45 sau 0,2 μm, ar putea fi cele mai simple metode de purificare. Ambele tehnici pot fi utilizate pentru obținerea fagilor cu scop de utilizare în tratarea plantelor, administrări orale și aplicații topice, deoarece au puține efecte secundare (ambele abordări vor ajuta la eliminarea resturilor de bacterii. În cazul în care sunt utilizați fagi care sunt infecțioși pentru bacteriile Gram-negative, endotoxina poate fi găsită în soluție și după filtrare, ceea ce nu permite administrarea intravenoasă a fagilor. Cu toate acestea, endotoxinele pot fi precipitate și înlăturate cu sulfat de amoniu, apoi trecute printr-o coloană de anioni de dietil aminoetil celuloză, folosind soluție de acetat de amoniu pentru eluare. Această metodă minimizează efectele secundare adverse, cu risc scăzut de pierdere a titrului de fagi [30].

Amplificarea și purificarea fagilor pot fi extinse spre producerea la scară industrială. După amplificare în recipiente cu agitare, baloane Erlenmeyer mari sau fermentatoare, fagul poate fi purificat prin două runde de centrifugare: centrifugare la viteză mică (4.500 rpm, 30 min, 4°C) și una la viteză mare (35.000 rpm, 40 min, 4°C). Înainte de centrifugarea la viteză mare, fagii sunt suspendați în 20 g de zaharoză/100 ml, care funcționează ca o pernă ce protejează titrul fagilor la sedimentare. De asemenea, cercetătorii au utilizat centrifugarea la viteză medie (20.000 rpm, 4 h, 4°C) în loc de viteză mare, cromatografia cu schimb de ioni și ultrafiltrarea pentru etapa de purificare. Cu toate acestea, cromatografia și ultrafiltrarea au crescut incidența contaminării produsului cu lipopolizaharide (LPS). Pe de altă parte, centrifugarea la viteză mare a demonstrat eliminarea în 90% a LPS, dar a redus semnificativ titrul fagilor, în special în absența pernei de zaharoză. Mai mult decât atât, există mașini brevetate utilizate pentru amplificarea fagilor și purificarea titrului de fagi concentrați, care vizează aplicații clinice și agricole [31].

Caracterizarea fagilor. Odată ce un fag a fost izolat, amplificat și purificat, acesta trebuie să fie caracterizat pentru a indica posibilitatea și siguranța utilizării lui în aplicațiile prevăzute. Aproximativ 70 de proprietăți au fost recomandate de Ackermann pentru caracterizarea fagilor, de ex. natura acidului nucleic (dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNA), anatomie, criterii fizice, proprietăți chimice, genom, morfologia virionului, serologie, metode de inactivare fizică și chimică, asamblarea și fiziologia. Indicarea tipului de fag izolat și a proprietăților acestuia va elucida modul în care acționează acest fag și cât de potrivit este pentru aplicațiile prevăzute [32].

Obiectivul principal al fiziologiei este de a testa funcționalitatea unui fag și capacitatea acestuia de a ataca tulpina bacteriană vizată pentru a identifica dacă este un candidat bun pentru a fi utilizat sau nu în aplicația prevăzută și este considerată una dintre principalele metode de caracterizare a fagilor. Fiziologia fagilor poate fi determinată de diferiți parametri, adică dimensiunea plajei, intervalul de gazde, perioada latentă și virulența fagilor.

Dimensiunea plajei formate reprezintă numărul de fagi care sunt produși de fiecare celulă bacteriană infectată. Este un criteriu esențial care trebuie determinat pentru a înțelege dinamica populației fiecărui fag. Dimensiunea celulei bacteriene și a fagului poate oferi o indicație despre dimensiunea plajei. Celulele bacteriene de dimensiuni mici și fagii mari formează plaje de dimensiuni mici, în timp ce celulele bacteriene mai mari și fagii mai mici formează plaje de dimensiuni mai mari [33].

Nomenclatura fagilor este tripartită, conținând 1) numele genului bacteriei gazdă, 2) cuvântul „fag” și 3) un identificator unic. Cu toate acestea, numele bacteriei gazdă din nomenclatură nu înseamnă că fagul lizează doar o gazdă bacteriană, numele este dat doar pentru prima gazdă de la care a fost izolat fagul. Prin urmare, este necesar de a determina experimental gama de bacterii pe care fagul candidat le poate infecta [34]. Principalul motiv al selectivității fagilor față de o anumită bacterie este faptul că particulele de fagi sunt

adsorbite la un anumit situs a unui receptor de pe suprafața bacteriei. Recunoașterea situsurilor de adsorbție îmbogățește cunoștințele despre sensibilitatea celulei gazdă. Astfel, este necesar să se investigheze modul în care fagul izolat ajunge la bacterii și este adsorbit la situsurile receptorilor. S-a constatat că procesul de adsorbție are loc ca urmare a unei coliziuni aleatorii între fag și celula gazdă, iar legea care reglementează acest proces este legea acțiunii maselor, care afirmă că influența densității gazdei contribuie la procesul de adsorbție. Cu cât rata de adsorbție a fagilor este mai mare, cu atât timpul de liză intermediară va fi mai scurt [35]. Cu toate acestea, Shao și Wang au arătat o relație inversă între timpul de liză intermediară și rata de adsorbție. Mai mult, rata de adsorbție are o influență mai semnificativă asupra ratei de creștere a fagilor decât influența asupra timpului de liză [36].

Fagul poate fi fie un fag virulent atunci când se reproduce numai prin cicluri litice, fie un fag temperat atunci când ambele cicluri de viață lizogenice și litice au potențialul de a avea loc. Importanța diferențierii între fagii virulenți și temperați intră în aplicațiile de terapie cu fagi, deoarece accentul principal este dat pentru fagii virulenți. Materialul genetic al fagilor temperați poate conține gene care codifică toxine care provoacă o schimbare a proprietăților celulei gazdă într-un proces numit „conversie lizogenă”. Fagii pot împărtăși gene de patogenitate între bacterii, chiar și cu unele dintre ele care nu sunt patogeni, transferă gene de la bacterii la alta prin transducție sau cresc imunitatea bacteriilor față de alți fagi virulenți. Fagii pot stimula, de asemenea, evoluția patogenității gazdei bacteriene, făcând-o mai robustă, de ex. transferul genei de rezistență la antibiotice β -lactamice de la fag la *Staphylococcus aureus*. Aceste fenomene de conversie și transducție lizogenă au un rol semnificativ în transferul orizontal al genelor între celulele gazdă [37].

Aplicarea practică a fagilor. Bacteriofagii sunt utilizați în mai multe domenii, inclusiv în medicină, alimentație, agricultură, tratarea apelor uzate și alte aplicații de mediu. Am clasificat aplicațiile în două clase principale: aplicații cu fagi virulenți și aplicații cu fagi „non-virulenți”. Fagii nevirulenți pot fi fagi pseudolizogeni, care nu au urmat un ciclu de viață specific (litic sau lizogeni) sau fagi temperați care adoptă cu ușurință un ciclu lizogenic. Ambele tipuri nu sunt capabile nici să ucidă direct celula bacteriană și nici să producă noi descendenți de fagi în condiții normale. În schimb, genomul lor este inserat în genomul bacterian sau este circularizat ca un epizom asemănător plasmidului, un fag pseudolizogen care nu este integrat în cromozomul bacterian. Mai mult, fagii filamentosi sunt o clasă de fagi care nu provoacă liza bacteriană a gazdei, cu toate acestea, se pot reproduce prin replicare epizomală sau integrare cromozomială [38]. Fagii virulenți, pe de altă parte, sunt capabili să producă proteine de liză (de exemplu, holine și lizine), care sunt activate aproape de sfârșitul ciclului litic pentru a degrada pereții celulelor bacteriene și pentru a elibera virioni nou formați.

Fagii au o importanță semnificativă pentru comunitatea științifică. Multe studii s-au concentrat pe unele dintre aplicațiile lor, cum ar fi utilizarea lor ca alternativă la antimicrobiene, în special în eliminarea biofilmului [39,40]. Au fost raportate unele infecții care au fost asociate cu

formarea de biofilm, cum ar fi parodontita, infecțiile de plagă, infecțiile tractului urinar și otita medie. Aceste infecții au fost tratate cu succes datorită utilizării fagilor. S-a raportat, de asemenea, că terapia cu fagi are un efect semnificativ asupra bacteriilor multi-rezistente la antimicrobiene. Printre motivele eșecului tratamentului cu antibiotice se numără incapacitatea acestora de a ucide bacteriile din biofilme. Cu toate acestea, în cazul terapiei cu fagi, acestea au avantajul că sunt dotați cu enzime, care se găsesc pe partea externă a capsulei și sunt capabile să degradeze substanțele polimerice extracelulare făcând posibilă dizolvarea biofilmelor [41]. În plus, aplicații pre/post-recoltare în agricultură, tratarea animalelor, alimentelor, ambalajelor alimentare, suprafețelor și echipamentelor de procesare a alimentelor [41].

De asemenea, fagii sunt utilizați pentru identificarea bacteriilor patogene pentru investigarea focarelor de boli infecțioase [42]. Specificitatea de gazdă le oferă fagilor capacitatea de a diferenția diferite tulpini ale aceleiași specii de bacterii. Avantajul utilizării fagotipizării este că poate diferenția tulpinile care nu se deosebesc serologic sau biochimic. Prin urmare, poate fi utilizat pentru a studia răspândirea unui agent patogen într-o comunitate. Fagotipizarea a fost utilizată cu succes în scopuri epidemiologice, în special în cazurile de febră tifoidă și în infecția stafilococică. Astfel, fagotipizarea a fost considerată unul dintre cele mai importante instrumente epidemiologice a secolului XX. Cu toate acestea, această metodă nu este utilizată foarte frecvent, din aceste considerente, recomandăm să acordăm mai multă atenție acestei metode atât de ieftine și ușor de efectuat în domeniul epidemiologiei [43].

Majoritatea direcțiilor de aplicare a fagilor utilizează fagi virulenți. Proteinele purificate a fagilor virulenți (de exemplu, endolizinele) pot fi utilizate indirect împotriva bacteriilor pentru a limita creșterea lor sau pentru a le elimina total. De exemplu, Swift și colab. au folosit o endolizină, pe care au purificat-o din ϕ GVE2, ca conservant pentru păsările de

curte, în controlul biologic a *E. coli* [2]. Aplicații mai puțin obișnuite, dar importante, se bazează pe fagi temperați. Liza bacteriană de către fagi virulenți poate duce la eliberarea endotoxinelor, care este principalul obstacol în calea aprobării terapiei cu fagi. Până acum, s-au efectuat câteva studii clinice, dintre care multe se bazează pe raportarea cazurilor unice, în care bacteriile au fost inițial rezistente la toate antibioticele disponibile [44]. Pentru a depăși această problemă, sunt necesare tehnici de purificare a fagilor extrem de eficiente, așa cum sa menționat mai sus. Pe de altă parte, fagi temperați pot fi modificați pentru a acționa ca fagi virulenți sau utilizați ca vehicul pentru livrarea de gene.

Concluzii

În era post-antibiotică, cererea pentru utilizarea bacteriofagilor ca metodă alternativă la utilizarea antimicrobienele, este în ascensiune. Producerea fagilor începe cu izolarea, amplificarea, purificarea și caracterizarea acestora. Cei mai activi fagi sunt izolați în apropierea sursei de infecție. Cu toate acestea, purificarea este pasul cel mai dificil, deoarece asigură prevenirea contaminării cu endotoxine sau produse secundare introduse în timpul etapelor de izolare sau amplificare. Fagii au caracteristici diferite, cum ar fi dimensiunea plajelor, gama de gazde, perioada de latență și virulența. Cunoașterea caracteristicilor fagilor ajută la o mai bună înțelegere a infecțiozității acestora și, prin urmare, a aplicațiilor practice. Spre deosebire de primele decenii de la descoperirea fagilor, doar ultimul deceniu a fost martor la numeroase aplicații a fagilor și metode de obținere și de analiză. Fagii sunt utilizați în diverse direcții medicale, cum ar fi terapia cu fagi, diagnostic și obținerea vaccinurilor. De asemenea, fagii sunt activ utilizați în domeniile agricole și de mediu, de ex. în tratarea apelor uzate și fitoterapie. Toate menționate mai sus subliniază necesitatea investigațiilor suplimentare pentru a explora baza teoretică privind acțiunea fagilor și a prezice interacțiunea dintre fagi și celula gazdă.

Bibliografie

1. Dy R, Rigano L, Fineran P. Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture. *Biochem. Soc. Trans.* 2018;46(6):1605-1613.
2. Swift S, Seal B, Garrish J, Oakley B, Hiett K, et al. Thermophilic Phage Endolysin Fusion to a *Clostridium perfringens*-Specific Cell Wall Binding Domain Creates an Anti-*Clostridium* Antimicrobial with Improved Thermostability. *Viruses*. 2015;7(6):3019-3034.
3. Principi N, Silvestri E, Esposito S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Front. Pharmacol.* 2019;10:513. doi:10.3389/fphar.2019.00513
4. Ferdohleb A, Iaconi O-S, Balan G, Galben L, Dziewit L, Borrego C. Public health problem of resistant bacteria in low and middle income countries, following the example of Moldova. *One Health and Risk Management*. 2024;1:34-42. doi:10.38045/ohrm.2024.1.05
5. WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report, 2022. Disponibil la: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364996/9789240062702-eng.pdf?sequence=1>
6. Iaconi O-S, Balan G, Ferdohleb A. Bacteriophage therapy: a method to combat antimicrobial resistance (narrative analysis). *One Health and Risk Management*. 2024;5:37-46.
7. Rose T, Verbeken G, Vos D, Merabishvili M, et al. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. *Int. J. Burns Trauma*. 2014;4(2):66-73.
8. El-Shibiny A, Dawoud A. Bacteriophage Applications for Food Safety. *Biocommunication of Phages*; Witzany G., Ed.; Springer International Publishing. 2020;463-484. doi:10.1007/978-3-030-45885-0_21
9. Yang T, Li N, Wang X, Zhai J, Hu B, Chen M, Wang J. Dual Functional AgNPs-M13 Phage Composite Serves as Antibacterial Film and Sensing Probe for Monitoring the Corrosion of Chromium-Containing Dental Alloys. *Chin. Chem. Lett.* 2020. doi:10.1016/j.ccl.2019.07.026
10. Pinheiro L, Pereira C, Barreal M, Gallego P, Balcão V, Almeida A. Use of Phage Φ 6 to Inactivate *Pseudomonas Syringae* Pv. *Actinidiae* in Kiwifruit Plants: In Vitro

- and Ex Vivo Experiments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. doi:10.1007/s00253-019-10301-7
11. Ciobanu E, Croitoru C, Balan G, Bernic V, Burduniuc O, Ferdohleb A. Phage treatment and wetland technology as intervention strategy to prevent dissemination of antibiotic resistance in surface waters – a project launch in low-middle in-come countries of Eastern Europe. One Health & Risk Management. 2022;3(25):28. doi:10.38045/ohrm.2022.2.05
12. Hyman P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. Pharmaceuticals (Basel). 2019;12(1):35. doi:10.3390/ph12010035
13. Kim J, Gomez D, Nakai T, Park S. Isolation and identification of bacteriophages infecting ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum*. Vet. Microbiol. 2010;140(1-2):109-115.
14. Cerveny K, Depaola A, Duckworth D, Gulig P. Phage Therapy of Local and Systemic Disease Caused by *Vibrio Vulnificus* in Iron-Dextran-Treated Mice. Infection and Immunity. 2002;70(11):6251-6262. doi:10.1128/IAI.70.11.6251
15. Balogh B, Jones J, Iriarte F, Momol M. Phage therapy for plant disease control. Curr. Pharm. Biotechnol. 2010;11(1):48-57. doi:10.2174/138920110790725302
16. Johnson R, Gyles C, Huff W, et al. Bacteriophages for Prophylaxis and Therapy in Cattle, Poultry and Pigs. Animal health research reviews. In: Conference of Research Workers in Animal Diseases. 2008. doi:10.1017/S1466252308001576
17. Amarillas L, Cháidez-Quiroz C, Sañudo-Barajas A, León-Félix J. Complete genome sequence of a polyvalent bacteriophage, phiKP26, active on *Salmonella* and *Escherichia coli*. Arch. Virol. 2013;158(11):2395-2398. doi:10.1007/s00705-013-1725-4
18. Ross A, Ward S, Hyman P. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. Front. Microbiol. 2016;1352. doi:10.3389/fmicb.2016.01352
19. Chen L, Fan J, Yan T, Liu Q, et al. Isolation and Characterization of Specific Phages to Prepare a Cocktail Preventing *Vibrio* sp. Va-F3 Infections in Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Front. Microbiol. 2019;10:2337. doi:10.3389/fmicb.2019.02337
20. Abdelsattar A, Nofal R, Makky S, El-Sayed A, El-Shibiny A. A Modified High-Throughput Screening Protocol to Isolate Bacteriophages from Environmental Samples. 2021. doi:10.20944/preprints202102.0410.v2
21. Lin R, Sacher J, Ceyssens P-J, Zheng J, Khalid A, Iredell J, Network T.A.P.B. Australian Phage Biobanking Network. Phage Biobank: Present Challenges and Future Perspectives. Curr. Opin. Biotechnol. 2021;68:221-230. doi:10.1016/j.copbio.2020.12.018
22. Serwer P, Wright E. In-Gel Isolation and Characterization of Large (and Other) Phages. Viruses. 2020;12(4):410. doi:10.3390/v12040410
23. Górski A, Bollyky P, Przybylski M, Borysowski J. et al. Perspectives of Phage Therapy in Non-bacterial Infections. Front. Microbiol. 2019;9:3306. doi:10.3389/fmicb.2018.03306
24. Mohamed A, Taha O, El-Sherif H, Connerton P, Hooton S, Bassim N, Connerton I, El-Shibiny A. Bacteriophage ZCSE2 is a Potent Antimicrobial Against *Salmonella enterica* Serovars: Ultrastructure, Genomics and Efficacy. Viruses. 2020;12(4):E424. doi:10.3390/v12040424
25. van Charante F, Holtappels D, Blasdel B, Burrowes B. Isolation of Bacteriophages. Bacteriophages Biol. Technol. Ther. 2021;433-464.
26. Radford D, Ahmadi H, Leon-Varlarde C, Balamurugan S. Propagation method for persistent high yield of diverse *Listeria* phages on permissive hosts at refrigeration temperatures. Res. Microbiol. 2016;167(8):685-691. doi:10.1016/j.resmic.2016.05.010
27. Leshkasheli L, Kutateladze M, Balarjishvili N, Bolkvadze D, Save J, Oechslin F, Que Y-A, Resch G. Efficacy of newly isolated and highly potent bacteriophages in a mouse model of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. J. Glob. Antimicrob. Resist. 2019;19:255-261. doi:10.1016/j.jgar.2019.05.005
28. Zrelavs N, Cernooka E, Dislers A, Kazaks A. Isolation and characterization of the novel *Virgibacillus*-infecting bacteriophage Mimir87. Arch. Virol. 2020;165(3):737-741. doi:10.1007/s00705-019-04516-2
29. Nabergoj D, Modic P, Podgornik A. Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. MicrobiologyOpen. 2018;7(2):e00558. doi:10.1002/mbo3.558
30. Speck P, Smithyman A. Safety and Efficacy of Phage Therapy via the Intravenous Route. FEMS Microbiol. Lett. 2015. doi:10.1093/femsle/fnv242
31. Bourdin G, Schmitt B, Marvin Guy L, Germond J, Zuber S, Michot L, Reuteler G, Brüssow H. Amplification and purification of T4-like *Escherichia coli* phages for phage therapy: from laboratory to pilot scale. Appl. Environ. Microbiol. 2014;80(4):1469-1476. doi:10.1128/AEM.03357-13
32. Pirnay J, Merabishvili M, Van Raemdonck H, De Vos D, Verbeken G. Bacteriophage Production in Compliance with Regulatory Requirements. Methods in Molecular Biology. 2018. doi:10.1007/978-1-4939-7395-8_18
33. Weinbauer M, Höfle M. Size-Specific Mortality of Lake Bacterioplankton by Natural Virus Communities. Aquat. Microb. Ecol. 1998. doi:10.3354/ame015103
34. Adriaenssens E, Brister R. How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. How to name classify your phage. An informal Guid. 2017. doi:10.1101/111526
35. Rakhuba D, Kolomiets E, Dey E, Novik G. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. Pol. J. Microbiol. 2010;59(3):145-155. doi:10.33073/pjm-2010-023
36. Shao Y, Wang I. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. Genetics. 2008;180(1):471-482. doi:10.1534/genetics.108.090100
37. Fattah K, Mizutani S, Fattah F, Matsushiro A, Sugino Y. A comparative study of the immunity region of lambdoid phages including Shiga-toxin-converting phages: molecular basis for cross immunity. Genes Genet. Syst. 2000;75(5):223-232. doi:10.1266/ggs.75.223
38. Olszak T, Latka A, Roszniowski B, Valvano M, Drulis-Kawa Z. Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. Curr. Med. Chem. 2017;24(36):3987-4001. doi:10.2174/0929867324666170413100136
39. Hansen M, Svenningsen S, Røder H, Middelboe M, Burmølle M. Big Impact of the Tiny: Bacteriophage-Bacteria Interactions in Biofilms. Trends Microbiol. 2019;27(9):739-752. doi:10.1016/j.tim.2019.04.006
40. Galben L, Neronova N, Balan G. Utilizarea bacteriofagilor în practica medicală pentru diminuarea fenomenului de rezistență la antimicrobiene. One Health and Risk Management. 2023;5:68.
41. Sommer J, Trautner C, Witte A.K, Fister S, Schoder D, Rossmanith P, Mester P-J. Don't Shut the Stable Door after the Phage Has Bolted-The Importance of Bacteriophage Inactivation in Food Environments. Viruses. 2019;11(5):468. doi:10.3390/v11050468

42. Crabb H, Allen J, Devlin J, Firestone S, Stevenson M, Wilks C, Gilkerson J. Traditional Salmonella Typhimurium typing tools (phage typing and MLVA) are sufficient to resolve well-defined outbreak events only. Food Microbiol. 2019;84:103237. doi:10.1016/j.fm.2019.06.001
43. Kirchhelle C. The Forgotten Typers: The Rise and Fall of Weimar Bacteriophage-Typing (1921–1935). Notes Rec. 2020;74(4):539–565. doi:10.1098/rsnr.2019.0020
44. Kutateladze M, Adamia R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. Med. Mal. Infect. 2008;38(8):426–430. doi:10.1016/j.medmal.2008.06.023

Recepționat – 18.07.2024, acceptat pentru publicare – 31.08.2024

Autor corespondent: Lucia Galben, e-mail: luciagalben15@gmail.com

Declarația de conflict de interese: Autorii declară lipsa conflictului de interese.

Citare: Galben L, Iaconi O-S, Ferdohleb A, Bălan G. Obținerea și aplicarea practică a bacteriofagilor [Obtaining and practical application of bacteriophages]. Arta Medica. 2026;98(1):107–113.