

Powodem podjęcia przedstawionej poniżej tematyki badawczej jest powszechne występowanie zagrożenia jakimi są infekcje u ludzi i zwierząt wywoływane przez patogenne szczepy *E. coli* odznaczające się opornością na antybiotyki i chemioterapeutyki. Obserwowany globalny problem lekooporności wśród szczepów bakteryjnych u ludzi i zwierząt, stanowi najbardziej istotne wyzwanie w XXI wieku w kontroli infekcji bakteryjnych. Oporność bakterii na antybiotyki pojawiła się w wyniku powszechnego stosowania dodatków paszowych, stymulatorów wzrostu oraz ich niekontrolowanej dystrybucji w leczeniu infekcji bakteryjnych u ludzi i zwierząt. Narastająca wielooporność wśród bakterii w odniesieniu do stosowanych antybiotyków istotnie ogranicza skuteczną terapię i kontrolę zakażeń. Trudności w skutecznym zwalczaniu infekcji wynikają również z faktu, że niemal 65% zakażeń bakteryjnych u ludzi przebiega z udziałem biofilmu utworzonego przez bakterie *E. coli*, który został wykryty jako główna przyczyna wielu infekcji jelitowych u ludzi. Brak możliwości skutecznego stosowania chemioterapeutyków u ludzi i zwierząt w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych przyczyniło się do poszukiwania metod alternatywnych, w których szczególną rolę odgrywają terapie fagowe. W wielu przypadkach stanowią one podstawę we wdrażanych terapiach celowanych u ludzi, eksperymentalnych u zwierząt bądź są składnikiem preparatów służących do eliminacji patogenów ze środowiska lub żywności.

Celem prowadzonych badań będzie izolacja oraz charakterystyka bakteriofagów wykazujących działanie bakteriobójcze w stosunku do patogennych szczepów *E. coli* izolowanych ze środowisk utrzymania drobiu oraz z przypadków biegunki u ludzi.

W planowanych badaniach zostanie wykonana izolacja i identyfikacja szczepów *E. coli* izolowanych od ludzi z objawami biegunki oraz pochodzących od drobiu, standardowymi technikami mikrobiologicznymi: posiewy na podłoża podstawowe (BHI, LB) oraz wybiórczo-różnicujące (McConkey, TBX, Karmali), określenie cech fenotypowych, określenia antybiotykooporności uzyskanych szczepów, genotypowa analiza lekooporności na podstawie oceny występowania wybranych genów oporności. Określona zostanie także przynależność szczepów do poszczególnych grup filogenetycznych w oparciu o wykrywanie genów m.in. *chuA* i *yjaA* oraz fragment *TspE4.C2* oraz badanie zdolności adhezyjnych i zdolności tworzenia biofilmu z wykorzystaniem metod klasycznych oraz molekularnych PCR ze szczególnym uwzględnieniem analizy porównawczej całych genomów (WGS). W kolejnym etapie zostanie przeprowadzone różnicowanie w oparciu o profile genetyczne umożliwiające potwierdzenie toksyczności izolatów na podstawie występowania określonych genów zjadliwości.

W stosunku do wszystkich patogennych szczepów *E. coli* zostanie wykonana izolacja bakteriofagów z kału pochodzącego od bydła oraz ocena ich właściwości bakteriobójczych dla badanych szczepów standardowym testem łysinkowym. Analiza morfologiczna fagów zostanie wykonana w transmisyjnym mikroskopie elektronowym, a rodzaj i wielkości fagów będą określane w oparciu o dokumentację fotograficzną. Ocena podobieństwa genetycznego pomiędzy fagami zostanie przeprowadzona na podstawie kompleksowej analizy materiału genetycznego przy pomocy technik molekularnych PCR, PFGE i spektrometrii masowej typu MALDI-TOF. W badaniach zostanie również przeprowadzona analiza zdolności bakteriofagów do hamowania tworzenia biofilmu oraz oznaczenie zdolności eradykacji dojrzały biofilm tworzony przez patogenne szczepy *E. coli*.

Proponowany projekt zawiera nowatorski charakter badań z zakresu izolacji i charakterystyki patogennych szczepów *E. coli* w zakresie ich lekooporności i zjadliwości, a także oceny działania antibakteryjnego bakteriofagów swoistych dla badanych patogennych szczepów *E. coli* pozyskanych od ludzi i drobiu. Uzyskane rezultaty przyczynią się do oceny i kompleksowej charakterystyki fagów, a wyniki będą zaprezentowane na konferencjach międzynarodowych oraz w formie publikacji, które planuje się opublikować w czasopiśmie wyszczególnionych w JCR o znacznym współczynniku wpływu IF. W przypadku uzyskania tzw. „nowych” fagów, ich profil genetyczny zostanie zgłoszony do baz danych GenoMed. Niekwestionowanym efektem będzie również opracowanie metodyki w ocenie kinetyki oddziaływania zastosowanych bakteriofagów w eradykacji oraz tworzeniu biofilmu bakteryjnego przez patogenne szczepy *E. coli*, co może umożliwić zgłoszenie wniosku patentowego do Urzędu Patentowego RP.

Wyizolowane bakteriofagi będą mogły znaleźć zastosowanie jako składniki preparatów niezbędnych do eliminacji w/w patogenów u ludzi i zwierząt. Tym bardziej, że jak potwierdzono w wielu badaniach zastosowanie mieszanek bakteriofagów w postaci koktajlu wykazuje o wiele wyższą skuteczność eliminacji zakażeń poprzez niszczenie biofilmu bakteryjnego. Okazało się również, że o wiele lepsze efekty w redukcji ilości komórek *E. coli* w biofilmie można uzyskać przy jednoczesnym zastosowaniu fago- i antybiotykoterapii w porównaniu do skuteczności samego antybiotyku.

Wymiernym efektem będzie utworzona baza danych w postaci kolekcji własnej zarówno patogennych izolowanych od ludzi oraz zwierząt szczepów *E. coli*, jak też odpowiadających im bakteriofagów, która będzie mogła być wykorzystywana zarówno przez epidemiologów z obszaru medycyny ludzkiej jak i weterynaryjnej w terapiach alternatywnych oraz jako składniki preparatów odkażających.